

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**Enraizamiento y Aclimatación de plántulas de *Vanilla planifolia* Andrews,
provenientes de cultivo de tejidos con fines de conservación**

Informe de Tesis presentado por

Evelyn Xiomara Agvik España

Para optar el título de
Bióloga

Guatemala, abril de 2011

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cobar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. José Roy Morales Coronado	Vocal IV
Br. Cecilia Liska de León	Vocal V

DEDICATORIA

Acto que dedico:

A DIOS:

Fuente inagotable de sabiduría.

A MIS PADRES:

Carlos Agvik y Esperanza España, por sus sabios consejos, cariño y apoyo incondicional que me han mostrado siempre.

A MIS HERMANOS:

Claudia, Leslie y Carlos, por su apoyo y cariño.

A MI SOBRINITO:

Jorgito, que sus pasos sean guiados con sabiduría. Con especial cariño.

A MI CUÑADO:

Vinicio Girón, con cariño.

A MIS ABUELITOS:

Papá Fabio, con cariño y admiración. Papá Beto, Mamá Mery y Mamá Elvira, Q.E.P.D., que fueron ejemplo para mi vida, los llevaré siempre en mi corazón.

A MIS TIOS Y PRIMOS:

A cada uno, sin excepción, por sus consejos y apoyo, gracias. A mi tío Fabito y tío Raúl, Q.E.P.D, los llevaré siempre en mi corazón.

A MIS AMIGOS:

Por compartir experiencias y conocimientos a lo largo de nuestra carrera y por agregarle más alegría a mi vida, con mucho cariño. Gracias por su apoyo.

A todos, por ser parte esencial de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A GUATEMALA:

País de la Eterna Primavera. Un triunfo más para su engrandecimiento.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA:

Por acogerme en sus aulas, y hacer de mí una profesional.

AL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, FAUSAC:

Por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones, y al Ing. Agr. Mak Milán Cruz por sus conocimientos y apoyo mostrados.

INDICE

1.	RESUMEN	4
2.	INTRODUCCIÓN.....	5
3.	ANTECEDENTES	7
3.1	MARCO TEÓRICO	7
3.1.1	Clasificación botánica de la Vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews).....	7
3.1.2	Cultivo de tejidos vegetales	12
3.1.3	Micropropagación.....	14
3.1.4	Cultivo de Tejidos en <i>Vanilla planifolia</i> Andrews	15
3.1.5	Hormonas y reguladores de crecimiento en los cultivos <i>in vitro</i>	16
3.1.6	Aclimatación.....	20
4.	JUSTIFICACIÓN.....	23
5.	OBJETIVOS.....	25
5.1	General	25
5.2	Específicos.....	25
6.	HIPÓTESIS	26
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1	Universo de Trabajo	27
7.2	Procedimientos	27
7.2.1	Medios de Cultivo.....	27
7.2.2	Preparación de Medios de Cultivo Modificados.....	27
7.2.3	Condiciones de Cultivo.....	29
7.2.4	Monitoreo del experimento.....	29
7.3	Diseño de la Investigación	29
7.3.1	Fase de Enraizamiento	29
7.3.2	Aclimatación:.....	31
7.4	Análisis estadístico	33
8.	RESULTADOS	34
8.1	Enraizamiento.....	34
8.2	Aclimatación	39
9.	DISCUSIÓN.....	43
10.	CONCLUSIONES	50
11.	RECOMENDACIONES	51
12.	REFERENCIAS	52
13.	ANEXOS	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Vanilla planifolia</i>	7
Figura 2 A. se muestra la planta completa de <i>V. planifolia</i> , B. el fruto de la misma.	8
Figura 3 Estructura de la flor	10

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Tratamientos a evaluar con las diferentes concentraciones de AIB y ANA, combinados con diferentes concentraciones de MS.	30
--	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Número de plantas con raíz por tratamiento.....	34
Tabla 2 Resumen de datos obtenidos para la variable número de raíces en cada tratamiento.....	35
Tabla 3 Resumen de datos obtenidos para la variable longitud de raíces en cada tratamiento.....	38
Tabla 4 Porcentaje (%) de sobrevivencia de los diferentes sustratos.....	39
Tabla 5 Crecimiento promedio de los sustratos utilizados para la aclimatación.....	41
Tabla 6 Valores mínimos, máximos y medianas de cada tratamiento en la fase de aclimatación.....	42

1. RESUMEN

La vainilla es una especie de orquídea que reviste importancia económica en varios países, lo que ha causado la sobreexplotación de las poblaciones silvestres. El objetivo de esta investigación fue establecer una metodología de enraizamiento *in vitro* y aclimatación en plántulas de vainilla para la obtención de las mismas, a través de la evaluación de las auxinas ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA) a diferentes concentraciones (AIB: 0.5, 1.5, 3.0 mg/L.; y ANA: 1.0, 2.0, 3.0 mg/L.) combinadas con medio Murashige & Skoog (1960) y para la fase de aclimatación se evaluaron cuatro sustratos: *Sphagnum* (peat moss), broza, arena-tierra y fibra de coco.

Los resultados obtenidos en la fase de enraizamiento indican que todos los tratamientos fueron efectivos. El T7 (75% MS, 3.0 mg/L.AIB) mostró los mejores resultados con una mediana de 4 raíces por planta y 3 cm. de longitud. En la fase de aclimatación la turba presentó el 100% de sobrevivencia, una altura promedio de 2.24 cm. y coloración verde indicando que las plantas se encontraban completamente sanas al final de las observaciones. Se concluye que para la fase de enraizamiento *in vitro* las dos auxinas pueden ser utilizadas, ya que no presentaron algún tipo de toxicidad en las plantas, aunque los mejores resultados se presentaron en el T7; y para la fase de aclimatación el mejor sustrato es el *Sphagnum* (peat moss), no obstante, pueden utilizarse los demás ya que presentaron resultados positivos y pueden ser de menor costo.

Palabras clave: *In vitro*, ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), aclimatación.

2 INTRODUCCIÓN

La vainilla pertenece a la familia de las orquidáceas y es una especie que ha sido poco estudiada en nuestro país, se le puede considerar como una especie agrícola rara, aún cuando en México se le cultivó desde tiempos prehispánicos.

Se ha estimado que existen alrededor de 110 especies de vainilla en la zona intertropical del mundo, pero la *Vanilla planifolia* es la especie de mayor importancia económica, la cual es la base de la mayoría de las explotaciones vainilleras en los países de mayor producción de vainilla del mundo.

En los últimos años el cultivo *in vitro* ha constituido una alternativa para la producción de plantas a través de la micropropagación, lo que ha beneficiado a los productores de este cultivo, debido a que una limitante del cultivo es la obtención de material vegetativo con características de alta productividad, libres de microorganismos patógenos y plagas; aun así, se buscan nuevas tecnologías que permitan la automatización y mejoren los protocolos para la climatización de las plantas (González, 2003). Asimismo, se puede utilizar como método para la conservación de recursos fitogenéticos y de plantas en peligro de extinción.

En investigaciones realizadas para la inducción de raíces de brotes de papaya *in vitro*, han sido utilizadas las auxinas AIB (ácido indolbutírico) y ANA (ácido naftalenacético), se ha demostrado que en términos de porcentaje y número de raíces el AIB ha sido superior a las demás auxinas (Drew 1992).

En la fase de climatización, las plantas cultivadas *in vitro* con un sistema radicular desarrollado bajo estas mismas condiciones presenta algunas ventajas sobre otros procedimientos. Para el desarrollo de raíces en plantas cultivadas *in vitro*, las condiciones cambian de acuerdo con la especie de la planta y en ocasiones según las variedades de una misma especie, por lo cual las variaciones en las concentraciones de auxinas son

diferentes (González, 2003). El objetivo de esta investigación fue determinar las concentraciones de auxinas y medio Murashige & Skoog (1962) adecuadas para obtener plántulas de vainilla con raíces para posteriormente someterlas a aclimatación, y de tal manera su adaptación a cultivo.

3 ANTECEDENTES

3.1 MARCO TEÓRICO

3.1.1 Clasificación botánica de la Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews)

La especie vainilla pertenece a la familia de las orquídeas. Es la única especie de las orquídeas que produce frutos comestibles. La vainilla es una planta enredadera con raíces aspiradoras que nacen de brotes, tiene hojas carnosas, flores de color blanco amarillento hasta crema y un solo estambre. En las variedades comercializables, el fruto capsular verde alcanza un largo de 15 a 20 cm. Al madurar toma un color amarillo y se abre a lo largo. Como las semillas son muy pequeñas y la cápsula contiene sustancias que impiden la germinación, la reproducción para el cultivo comercial se hace en forma vegetativa mediante plantones (Naturland, 2000).

El género *Vanilla* Plum. ex Mill. incluye la única especie de orquídea de importancia económica, aparte de las especies ornamentales. Los frutos de *V. planifolia* G. Jackson producen la vainilla comercial una vez que las cápsulas carnosas se deshidratan y fermentan. Otras especies americanas también producen frutos fragantes, pero raramente se utilizan como fuente de aromatizantes. Las más de 110 especies de *Vanilla* están ampliamente distribuidas en las zonas bajas de los trópicos del Viejo y el Nuevo Mundo, pero solamente dos especies aparte de *V. planifolia*, se cultivan en menor escala: *V. pompona* Schiede y *V. tahitiensis* J.W. Moore.



Figura 1 *Vanilla planifolia* (Orquidaceae)

En México se colectan frutos de *V. pompona* para usos locales en diversas regiones, principalmente en Nayarit y Oaxaca. *Vanilla odorata* es colectada ocasionalmente en la Selva Lacandona principalmente para aromatizar ron. Las cápsulas de *Vanilla odorata* se han colectado también en Ecuador y Bolivia con fines similares (Soto M, 1999).



Figura 2 A. se muestra la planta completa de *V. planifolia*, B. el fruto de la misma.

Tradicionalmente *Vanilla* sp. ha sido considerado como un grupo taxonómicamente difícil debido a distintas razones. Existe muy poco material preservado en los herbarios porque se trata de especies hemiepífitas que florecen generalmente en el dosel de la selva, tienen muy bajas densidades poblacionales y florecen sincrónicamente. El poco material disponible es además difícil de estudiar debido a la mala preservación de las flores. Aunado a lo anterior debe mencionarse que los especímenes estériles son frecuentemente imposibles de identificar, pues el hábito hemiepífito conlleva una enorme variación en la morfología de tallos y hojas; por ejemplo, un mismo individuo puede presentar o no hojas en distintas partes de él expuestas a distintos ambientes lumínicos. Otro factor adicional que complica su estudio es que probablemente la mitad de las especies del género fueron descritas de material estéril (Soto M, 1999).

3.1.1.1 Origen

La vainilla presenta un origen y una distribución Pantropical, aunque se dice que es un cultivo autóctono de México y Centroamérica en donde se localizan cultivares primitivos congéneres silvestres y poblaciones silvestres. En Guatemala se ha encontrado en forma silvestre en bosques vírgenes, a alturas que oscilan entre 305 y 1218 m.s.n.m. (González, 2003).

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es originaria de las regiones húmedas tropicales de México y América Central, pero también se encuentra en forma silvestre en las selvas de América del Sur. Los nativos la utilizaban como especia y también como “perfume”. Durante la época de la Conquista los españoles la llevaron a Europa, posteriormente llegó hasta África y Asia. Por su sabor aromático es muy cotizada. Al final de los años 50 la vainilla natural, que era cara, fue sustituida por la vainillina sintética, barata, que se elabora de eugenolo o guayacol, y su cultivo quedó casi completamente abandonado. Al principio de los años 80 la demanda de vainilla natural empezó a subir nuevamente debido a su mejor aroma. El uso de vainilla sintética como ingrediente no se permite en el procesamiento de productos de procedencia ecológica (como chocolates, helados etc.) (Naturland, 2000).

3.1.1.2 Taxonomía y morfología

La vainilla es una orquídea tropical que pertenece al género *Vanilla* de la familia Orchidaceae, tribu Ophidiinae. Se conocen más de 50 especies, de ellas las más utilizadas son: *planifolia*, *fragans* y *pompona* (González, 2003).

Es una planta sarmentosa de tallo simple y ramificado, cilíndrico, grande, flexible, sustancioso, verde y carnoso. Con entrenudos dispuestos en zigzag. Las hojas son de un verde brillante, grandes, suculentas, elípticas, estrechamente lanceoladas. Con nervaduras

paralelas y oscuras que se vuelven prominentes cuando la hoja se seca. Están opuestas a las raíces adventicias (CONCAVAI, s.f).

El sistema radical es denso y corto. Las raíces subterráneas son llamadas trazadores y se extienden en un radio de 80 cm. También tiene raíces adventicias o crampones las cuales son carnosas y largas que la planta utiliza para adherirse al tutor y nutrirse a través de una estructura exterior llamada velamen (Asociación Costarricense de Orquideología, 2000).

Las flores están dispuestas en racimos axilares, cortos, fuertes, con 20 o más flores amarillo verdosas y poco visibles. Salen de las axilas de las hojas. Con eje corto y succulento, son de poca duración (1 – 2 días como máximo), la inflorescencia es sucesiva (Asociación Costarricense de Orquideología, 2000).

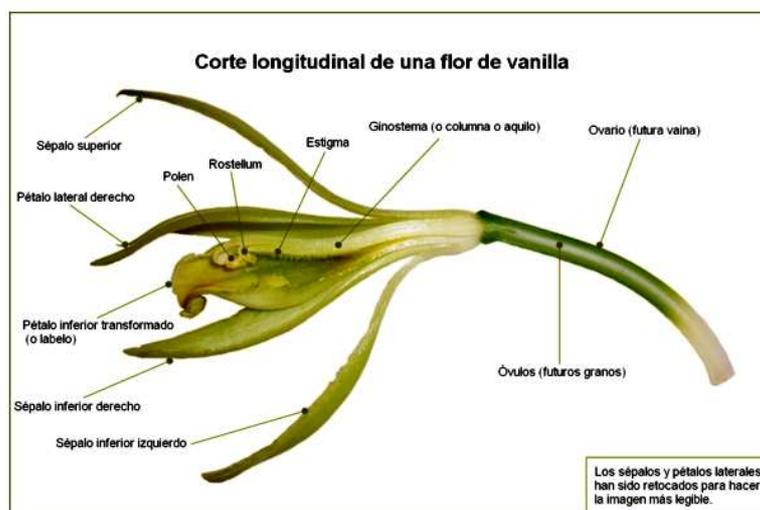


Figura 3 Estructura de la flor. Corte longitudinal

El fruto es una vaina casi cilíndrica. El conjunto de vainas sobre una misma inflorescencia se llama pezón. Las semillas son diminutas, carecen de endosperma. Son fértiles solo si son producto de polinización natural (Asociación Costarricense de Orquideología, 2000).

La sustancia responsable del olor y el sabor de la vainilla es la vainillina ($C_8H_8I_3$). Su contenido varía según la especie y el lugar donde se cultive. Sin embargo, no es proporcional a la calidad o el valor de la especie. Contiene otras sustancias secundarias como el aceite vainillínico, aceite fijo, resina suave, goma, oxalato de lima, grasa, éter aromático fuerte, sustancia colorante y constituyente mineral. La vainilla se encuentra disuelta en aceite café oscuro, alrededor de las semillas en el centro de la vaina, de aquí su color casi negro de las vainas (Asociación Costarricense de Orquideología, 2000).

3.1.1.3 Importancia económica y distribución geográfica

La familia de las orquídeas tiene importancia económica no sólo por las ornamentales que se emplean en el comercio de flores, sino también por la vainilla, el saborizante que se obtiene de las vainas de ciertas especies del género *Vanilla* sp. Se considera una de las más ricas del reino vegetal ya que tiene cerca de 1000 géneros y de 15000 a 20000 especies distribuidas en el mundo, aunque más abundantes en las áreas tropicales y raras en las regiones árticas (Herrera, s.f).

La vainilla es un cultivo de exportación, pues la vainilla que se obtiene de sus frutos es considerada hoy el saborizante natural de mayor importancia en el ámbito mundial. Se usa en la industria alimenticia, refresquera, licorera, farmacéutica, de perfumería y cosméticos, y en menor cantidad en la industria tabacalera y de artesanías (González, 2003).

Las industrias de productos lácteos, helados, bombones, dulces, pasteles y perfumes, son las más consumidoras de vainilla en su forma natural como extracto o esencia, o dispersa en una base de azúcar de dextrosa. A nivel mundial luego de la década de los años sesenta, la producción de la vainilla decayó por un periodo de 20 años. Esta situación se debió a factores como la caída de precios internacionales por un aumento de la producción de países africanos y asiáticos, y la introducción al mercado mundial de

grandes volúmenes de ethilvainillina y cumarina, sustitutos de la vainilla a precios más bajos (González, 2003).

3.1.2 Cultivo de tejidos vegetales

Dentro de la Biotecnología Vegetal existen diferentes técnicas que están a disposición del hombre; avances tecnológicos que está obligado a utilizar no solo en un beneficio directo sino también indirecto, a forma de preservar y mejorar su medio ambiente natural. La Biotecnología es, sin duda, una de las áreas del conocimiento con mayor impacto sobre la sociedad del siglo XXI. Es así que la propagación por cultivo de tejidos vegetales o también llamada cultivo *in vitro*, es una herramienta biotecnológica para lograr el rescate de especies amenazadas de extinción, utilizando el principio de la totipotencialidad celular para obtener grandes cantidades de individuos en un tiempo menor que el que se requeriría naturalmente sin perder las características genéticas y morfológicas de la planta donante (Ordoñez, 2003).

El cultivo de tejidos vegetales se define como el aislamiento y crecimiento de tejidos en un medio sintético y aséptico, bajo condiciones controladas. Consiste en preservar y lograr la proliferación de diversas porciones de la planta, en un medio nutritivo complementado con vitaminas, reguladores de crecimiento y fuentes de carbono. Algunas de las investigaciones efectuadas desde los inicios de cultivo de tejidos son los primeros cultivos exitosos de órganos y el descubrimiento de la importancia de las vitaminas y de las auxinas para el crecimiento de raíces; los reportes sobre crecimiento indefinido de callos en medios artificiales; los trabajos de organogénesis de Skoog; la descripción del fenómeno de embriogénesis en cultivos de zanahoria; la obtención de los primeros protoplastos; el cultivo de anteras para regenerar plantas haploides a partir de granos de polen y otros (Hernández, 1991).

En la naturaleza las plantas poseen la capacidad de reproducirse vegetativamente, estos mismos factores que dan inicio al crecimiento y a la multiplicación naturalmente

están involucrados en el cultivo de tejidos, aunque de manera más eficiente, debido a que se proporciona un ambiente artificial favorable para el desarrollo de la planta (Ordoñez, 2003).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son los estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; bioconversión y producción de compuestos útiles; obtención de plantas libres de patógenos; propagación de plantas; y conservación e intercambio de germoplasma (Hartmann, 1992).

El cultivo de tejidos tiene un enorme potencial para el mejoramiento de cosechas, por la facilidad relativa con que se pueden seleccionar características deseables. El establecimiento de los cultivos de tejidos dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee (Hernández, 1991).

Tipos de explantes empleados en la técnica de cultivo de tejidos:

1. Cultivo de células y tejidos: se establecen a partir de masas aisladas de células con una misma función.
2. Cultivo de órganos: los tallos, raíces y hojas segmentados y desinfectados se transfieren a medios en donde originarán conglomerados celulares indiferenciados (callos), embriones o embrioides somáticos (embriogénesis) o nuevos tallos, hojas y raíces (organogénesis).
3. Cultivo de embriones: los embriones se separan del tejido de protección circundante, y se les coloca en medios nutritivos adecuados para inducir su desarrollo (Hernández, 1991).

3.1.3 Micropropagación.

Es una multiplicación masiva *in vitro* en donde se obtiene una descendencia uniforme en condiciones de asepsia. En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y más recientemente, en especies leñosas. En algunas especies, esta metodología ha demostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación.

Fases de la micropropagación según Roca, 1991 y García *et al*, 2002 (Anexo 4, página 63):

- Establecimiento del cultivo aséptico: una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente. La iniciación del cultivo corresponde a la preadaptación del material parental a condiciones homogéneas que favorezcan la multiplicación vegetativa *in vitro*.
- Crecimiento y multiplicación del explante: en estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ella, según las condiciones de cultivo. La fase de crecimiento puede deberse también a la división de sus células, al aumento de su tamaño o a ambas cosas. Los tallos inducidos son multiplicados por medio de la inducción de brotes adventicios para aumentar el número de plantas que se derivan de una sola planta madre.
- Enraizamiento de brotes y aclimatación: el proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. También se requiere cambiar el balance hormonal. Los tallos producto de las fases de inducción y multiplicación son ahora tratados para inducir la formación de raíces y producir plántulas completas. El trasplante es la etapa más difícil del cultivo, requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que las plántulas no mueran por pérdida excesiva de agua o por el ataque de microorganismos.

3.1.4 Cultivo de Tejidos en *Vainilla planifolia* Andrews

Entre los primeros trabajos reportados sobre el cultivo *in vitro* de vainilla, se encuentra el realizado por G. Bouriquet en 1947 según Knudson (1950); en dicho trabajo se logró la germinación *in vitro* de semillas de vainilla en un medio de cultivo especial, a 27°C y condiciones de oscuridad o luz difusa. En los años siguientes la micropropagación de la vainilla se ha logrado empleando ápices de raíces aéreas, ápices de yemas axilares, de tallos vegetativos, segmentos de tallo conteniendo nudos con yemas axilares y embriones maduros e inmaduros. A pesar de estas investigaciones, el cultivo *in vitro* de la vainilla no está tan bien establecido si lo comparamos con el resto de especies ornamentales de la misma familia. En el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (CIDASTH), Instituto Tecnológico de Costa Rica; el cultivo de la vainilla se ha estudiado desde hace más de 15 años. En dichos estudios se han obtenido resultados que incluyen protocolos de micropropagación para esta especie, donde se usan como explantes ápices de tallo, de raíz y yemas nodales (González, 2003).

Una investigación cuyo objetivo fue contribuir a la adaptación de una metodología que permita la conservación *in vitro* de la variabilidad genética de la vainilla, se llevó a cabo en dos fases: en la fase de germinación de semillas, los medios de cultivo que presentaron mejores resultados fueron MS al 10% de su concentración, y el medio Knudson C, al 50% de su concentración, con 4.72 y 3.21% de germinación, respectivamente. Para la fase de crecimiento de plántulas, el medio de cultivo que mostró mejores resultados fue 3 ml/L. de Bayfolán, suplementado con 200 ml/L. de agua de coco y 20 g/L. de sacarosa. Las plántulas trasplantadas a este medio presentaron, a los dos meses de cultivo *in vitro*, muy buena altura de planta (4.0 cm), buen número de hojas (6.3), buen número de raíces (3.8) y buena longitud de raíces (2.6 cm) (ICTA, 2004).

La multiplicación *in vitro* de la vainilla ha sido reportada a través de cultivo de callos, protocormos, raíces y yemas axilares, se han encontrado que el uso de inhibidores de etileno como el nitrato de plata ha sido beneficioso para la multiplicación de brotes,

raíces y en estudios de cultivo de tejidos vegetales. Sus resultados indican que los explantes a los que les aplicaron las auxinas ANA y AIB, presentaron un 100% de enraizamiento con las concentraciones más altas (2 mg/L) (Giridhar, P, Obul B, Ravishankar GA, 2001).

Kalimuthu *et al* (2006) dieron a conocer en un estudio un medio eficiente, simple y único para cultivo primario y multiplicación sin muchos reguladores de crecimiento y sustancias orgánicas. Utilizaron un medio MS más BAP y agua de coco para la iniciación, multiplicación, elongación y enraizamiento de vainilla. Siendo el mejor tratamiento 1mg/L de BAP (la segunda concentración) más agua de coco para número de brotes por explante, elongación de brotes y enraizamiento.

3.1.5 Hormonas y reguladores de crecimiento en los cultivos *in vitro*

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta y translocado a otra parte donde, en concentraciones muy bajas, produce una respuesta fisiológica (Salisbury, 2000). En la propagación de plantas, las hormonas vegetales tienen gran importancia ya que no sólo son parte del mecanismo interno que regula la función vegetal, sino que ellas pueden inducir una respuesta específica en el cultivo (Martínez, 2007).

También existen ciertas sustancias químicas, algunas naturales y otras sintéticas, que muestran efectos hormonales en plantas, éstos son clasificados como reguladores de crecimiento vegetal (Martínez, 2007).

Las dos clases de hormonas más importantes son las auxinas y las citocininas las cuales controlan la formación de la raíz, del tallo y el callo (Hartmann, 1992). Las citocininas son compuestos de adenina sustituidos que promueven la división celular en los sistemas tisulares cultivados *in vitro*, tal como los cultivos de médula de tabaco,

floema de zanahoria o tallos de soja (Salisbury, 2000). Las citocininas que más se emplean son: KIN, BAP y ZEA (Hartmann, 1992).

Existen también giberelinas que son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis). El ácido giberélico GA3 fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta (EFN.UNCOR, 1999).

El etileno, es un hidrocarburo muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Se sabe que el efecto del etileno sobre las plantas y secciones de las plantas varía ampliamente. Ha sido implicado en la maduración, abscisión, senectud (senescencia), floración y otras respuestas; parece ser producido esencialmente por todas las partes vivas de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejidos específicos y su estado de crecimiento y desarrollo. Se ha encontrado que las alteraciones en la tasa sintética de etileno están asociadas cercanamente al desarrollo de ciertas respuestas fisiológicas en plantas y sus secciones, por ejemplo, la maduración de frutas climatéricas y la senectud de flores. A diferencia de otras hormonas, el etileno se difunde fácilmente fuera de la planta porque es gaseoso. Esta emanación pasiva del etileno fuera de la planta parece ser la principal forma de eliminar la hormona (EFN.UNCOR, 1999).

3.1.5.1 Las auxinas

Grupo de hormonas vegetales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. La auxina estimula la iniciación de raíces en tallos, pero puede inhibir o reducir el crecimiento subsecuente de las raíces (Roca, 1991).

Existen varias auxinas llamadas naturales, que incluyen el AIA, compuesto de mayor utilización. También se utiliza un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente, entre las cuales 2,4-D, el ANA y el AIB que se utilizan comúnmente (Roca, 1991).

El ácido indolacético, AIA, la auxina más común, se suele formar cerca de los brotes nuevos, en la parte superior de la planta, y fluye hacia abajo para estimular el alargamiento de las hojas recién formadas. Los científicos han obtenido compuestos químicos, llamados estimulantes del crecimiento, basados en las auxinas naturales. Estas sustancias sintéticas, que se aplican en forma de aerosol o de polvo, se usan para frenar el brote de los ojos o yemas de las patatas almacenadas, para destruir las malas hierbas de hoja ancha y para evitar la caída prematura de frutos y pétalos de flores. Las sustancias de crecimiento se usan también para obtener frutos sin semillas, como tomates, higos y sandías, y para estimular el crecimiento de las raíces en los esquejes (Enciclopedia Encarta, 2003).

El AIB se utiliza para causar la formación de raíces aún más a menudo que el ANA o cualquier otra auxina. El AIB es activo pese a que se metaboliza con rapidez a AIB -aspartato y al menos otro compuesto conjugado con un péptido. Se ha sugerido que la formación de conjugado almacena al AIB y que su liberación gradual mantiene niveles adecuados de concentración de AIB, especialmente en las etapas finales de la formación de la raíz. El AIB, en un principio se pensó que era sólo una auxina sintética activa, pero está presente naturalmente en hojas de maíz y en varias dicotiledóneas (Salisbury, 2000).

El Ácido naftalenacético, comúnmente abreviado ANA, es un compuesto orgánico con la fórmula $C_{10}H_7CH_2CO_2H$. ANA es una hormona vegetal de la familia de las auxinas y es un ingrediente en muchos productos comerciales para enraizamiento; es un agente enraizador y es usado en la propagación vegetativa de plantas. También es usado en el cultivo de tejidos (Martínez, 2007).

3.1.5.1.1 Efectos de las auxinas sobre las raíces y su formación

La práctica de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia debido a que tiene como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces son fundamentales para lograr la transferencia de las vitroplantas a condiciones de invernadero. El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente el trasplante a un medio de cultivo modificado. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas. Entre los efectos auxínicos en las plantas, se encuentra la formación de raíces (Quintero *et al*, 2003).

Como se demostró por primera vez en la década de los treinta, la administración de auxinas promueve la elongación de secciones escindidas de raíces e incluso de raíces intactas de muchas especies, pero sólo en concentraciones extremadamente bajas. Con concentraciones mayores, casi siempre se inhibe la elongación. La suposición es que las células de la raíz suelen contener auxina suficiente o casi suficiente para la elongación normal. Se cree que parte de esta inhibición se debe al etileno, ya que todos los tipos de auxinas estimulan la producción de etileno en muchas clases de células vegetales, especialmente cuando se añaden cantidades de auxina relativamente grandes. Evidencias indican que las auxinas de los tallos influyen de forma acusada en la iniciación de la raíz y estimulan el desarrollo de raíces secundarias en los tallos. En 1935, Went y Kenneth V. Thimann demostraron que el AIA estimula la iniciación de las raíces a partir de cortes de tallo. La auxina sintética ANA suele ser más eficaz que el AIA (Salisbury, 2000).

El desarrollo de raíces es el tipo de órganos más frecuente. La rizogénesis puede ser promovida por auxinas, hidratos de carbono, luz (fotoperíodo y oscuridad). Las condiciones cambian de acuerdo con la especie de la planta y en ocasiones según las variedades de una misma especie, por lo cual las variaciones en las concentraciones de auxinas son diferentes (González, 2003).

El enraizamiento *in vitro*, se ha trabajado en diferentes especies vegetales. Mogollón *et al*, 2004 realizaron un estudio de enraizamiento en *Ananas comosus* L. Para el enraizamiento cultivaron brotes mayores a 1 cm en un medio semisólido de MS + ANA en las concentraciones de 0; 0,25; 0,50; 1,0 y 2,0 mg/L. Después de cuatro semanas, el mayor número de raíces (28,4) se registró al usar 2,0 mg/L; mientras que la longitud máxima de raíces tuvo el mismo comportamiento en las cuatro dosis menores (1,3 a 1,6 cm), siendo superior a la longitud obtenida con 2,0 mg/L (0,5 cm). La multiplicación masiva se logró con la combinación BA y ANA en medio líquido; mientras que el enraizamiento fue satisfactorio con ANA en medio semisólido.

En otro estudio, evaluaron el efecto del ANA en el medio de cultivo sobre el enraizamiento *in vitro* de tres cultivares de ñame (*Dioscorea* sp). Para el enraizamiento se estudio el efecto de cuatro concentraciones del regulador de crecimiento (0, 0.3, 0.6 y 0.9 mg/L). Los resultados indicaron que tanto la hormona como el genotipo tuvieron efecto sobre todas las variables consideradas en el estudio (número y grosor de raíces, oxidación del medio y producción de callo). Uno de los cultivares registró los mayores valores de número y grosor de raíces. Se pudo determinar además que al aplicar concentraciones de 0.6 y 0.9 mg/L de la auxina, la emisión de raíces y el grosor de las mismas registró significativamente mayores valores. (Quintero *et al*, 2003)

3.1.6 Aclimatación

Numerosos esfuerzos han sido dirigidos a optimizar las condiciones de la micropropagación de plantas *in vitro*, pero los procesos de aclimatización en suelo no han sido suficientemente estudiados. Consecuentemente, el transplante sigue siendo el cuello de botella en la micropropagación de muchas plantas (Francisco, 2008).

La adaptación de las plantas a condiciones de invernadero es el punto que marca el éxito de la micropropagación de orquídeas, debido a que el buen manejo que se les

proporcione en esta etapa, dará como resultado el alto grado de supervivencia de las plantas y los costos serán bajos (Archila E, 2000).

Para la aclimatación de las plántulas procedentes del cultivo en su fase de multiplicación *in vitro*, se pueden utilizar varios procedimientos: uno de ellos es el enraizamiento *in vivo*, presentando la ventaja que cuando se está en un proceso de enraizamiento, al mismo tiempo los brotes se adaptan a las condiciones ambientales en las cuales crecerán y se desarrollarán las plantas, sin embargo, con este método existe una probabilidad muy alta de que el número de plántulas sobrevivientes sea bajo, ya que éstas aún no han desarrollado raíces para realizar sus funciones de absorción y transporte nutrimental. El enraizamiento *in vitro*, después de inducir al enraizamiento, los brotes son establecidos en las condiciones de adaptación, usando una humedad relativa alta durante el período de aclimatación, la cual se va reduciendo gradualmente hasta alcanzar el nivel normal en invernadero o campo (Olivera *et.al*, 2000).

La respuesta a la aclimatación que manifiestan las plantas provenientes de *in vitro*, depende: del estado de crecimiento y desarrollo, estado nutrimental de las plántulas, la sanidad, la protección a estrés abiótico y el sustrato en el que se induzca la aclimatización. Se reporta que las características ideales para un sustrato son principalmente, elevada capacidad de retención de agua y alta porosidad (80%) (Francisco, 2008).

Cuando las plantas van a ser sembradas en invernadero es deseable que tengan una altura aproximada de 5 ó 6 centímetros y aproximadamente 3 ó más raíces. En la mayoría de las ocasiones es preferible realizar un proceso de climatización la cual consiste en colocar los frascos conteniendo el material vegetal en el invernadero por un período de 2 ó 3 semanas. Los factores que más afectan el crecimiento de las plantas al momento de la aclimatación son la humedad relativa, la temperatura, la iluminación y la estación del año (Archila E, 2000).

3.1.6.1 Sustratos

Las plantas tienen una serie de necesidades que el horticultor debe satisfacer con ayuda de modernos medios y técnicas de cultivo. El término “sustrato”, que se aplica en la producción en vivero, se refiere a todo material sólido diferente del suelo que puede ser natural o sintético, mineral u orgánico y que colocado en contenedor, de forma pura o mezclado, permite el fijado de las plantas a través de su sistema radicular; el sustrato puede intervenir o no en el proceso de nutrición de la planta. Esto último, clasifica químicamente a los sustratos en inertes (perlita, lana de roca, roca volcánica, entre otras) y activos (turbas, corteza de pino, principalmente) (Francisco, 2008).

La aclimatación de plántulas provenientes de cultivo *in vitro* ha sido estudiada en varias especies vegetales. Salazar & Mata (2003) lograron el establecimiento *ex vitro* de tres especies de orquídeas, logrando los mayores porcentajes de sobrevivencia las plántulas sembradas en corteza de pino, carbón de encino y tepecil (3:1:1) con una sobrevivencias de 89%, 76% y 60.1% en *Mormodes tuxtlensis* Salazar, *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex y *Lycaste skinneri* (Batem. Ex Lindl) Lindl. En las especies de orquídeas *Trichocentrum carthagenense* (Jacq.) Sw. y *Laelia eyermeriana* Rchb.f., el mejor sustrato fue la hoja de palma y la fibra de palma, respectivamente (Francisco, 2008). En otras especies, como la gerbera (*Gerbera jamesonni* H. Bolus) esta fase fue afectada en forma significativa por el efecto residual de los tratamientos utilizados en la fase de inducción de brotes y enraizamiento, observando que los tratamientos con cinetina dieron mejores resultados de sobrevivencia con un promedio de 89.4% (Olivera *et.al*, 2000).

4 JUSTIFICACIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews), al igual que muchos otros recursos naturales, es sobreexplotada porque las poblaciones silvestres han sido destruidas con la colecta excesiva y subutilizada debido a que no existe un plan de manejo y producción. La tala irracional de bosques que sufre el mundo ha puesto a la familia de las orquídeas, como tantas otras botánicas y zoológicas, al borde de la extinción, principalmente por la destrucción de su hábitat (Sociedad Colombiana de Orquideología, 2001).

Las especies nativas de orquídeas tienen la particularidad de que su germinación, crecimiento vegetativo y reproductivo natural es muy lento; la utilización de técnicas biotecnológicas, como lo es la técnica de cultivo de tejidos vegetales, que suministran a las semillas todos los nutrientes que necesitan para su crecimiento, proporciona ventajas por medio de las cuales se puede obtener una propagación masiva de materiales en menor tiempo, principalmente orquídeas con alto valor comercial o bien materiales en peligro de extinción (Archila 2000 & Rodríguez *et al* 2005).

Dentro de la técnica de cultivo de tejidos vegetales se presentan tres fases a nivel de laboratorio: iniciación, multiplicación y enraizamiento; posteriormente se realiza una fase de aclimatación, la cual se realiza en condiciones de invernadero. Actualmente se pretende la aclimatación de las plantas, pero existe el inconveniente de realizar la fase de enraizamiento y de tal manera completar el ciclo del cultivo *in vitro*, fase imprescindible para obtener el soporte y una fuente de nutrición como lo es la raíz en los explantes.

Para el desarrollo de raíces las condiciones cambian de acuerdo con la especie de la planta y en ocasiones según las variedades de una misma especie, por lo cual las variaciones en las concentraciones de auxinas son diferentes (González, 2003). Por esta razón, y debido a la falta de información sobre el enraizamiento de *Vanilla planifolia* en la fase III de la micropropagación, se hace imprescindible la presente investigación para evaluar concentraciones y reguladores del crecimiento inductores de raíces como también

concentraciones del medio de Murashige & Skoog. Lo anterior es indispensable para obtener plántulas con raíz para aclimatarlas en condiciones de invernadero, y de tal manera completar la propagación *in vitro*. En la fase de aclimatación, las plántulas enraizadas fueron evaluadas en distintos tipos de sustratos; lo cual permite, posteriormente llevarlas a su hábitat para lograr su adaptación a los sistemas naturales de donde es originaria para su conservación.

La realización de este proyecto contribuye a la conservación y uso sostenible de especies nativas de orquídeas de importancia ecológica, introduciendo técnicas de cultivo adecuadas tendientes a reducir la amenaza de extinción.

5 OBJETIVOS

5.1 *General*

Establecer una metodología de enraizamiento (fase III del cultivo *in vitro*), aclimatación de plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) para la obtención de plántulas.

5.2 *Específicos*

- 5.2.1 Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) combinados con diferentes concentraciones del medio Murashige & Skoog para la inducción de raíz en brotes de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews).
- 5.2.2 Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) combinados con diferentes concentraciones del medio Murashige & Skoog para la inducción de raíz en brotes de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews).
- 5.2.3 Evaluar diferentes sustratos para la aclimatación de las plántulas de vainilla enraizadas *in vitro*.
- 5.2.4 Obtener plántulas de vainilla procedentes de cultivo de tejidos.

6 HIPÓTESIS

- 6.1 Al menos una de las diferentes concentraciones de ácido naftalenacético combinados con diferentes concentraciones del medio Murashige & Skoog inducirá al desarrollo de raíces en las plántulas de vainilla.
- 6.2 Al menos una de las diferentes concentraciones de ácido indolbutírico combinados con diferentes concentraciones del medio Murashige & Skoog inducirá al desarrollo de raíces en las plántulas de vainilla.
- 6.3 Alguno de los sustratos a evaluar garantizará la aclimatación de las plantas de vainilla provenientes de cultivo *in vitro*.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 *Universo de Trabajo*

Los brotes de vainilla *Vanilla planifolia* Andrews (Orchidaceae) desarrollados *in vitro* en el medio basal de Murashige & Skoog mantenidas en cultivo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Facultad de Agronomía Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2 *Procedimientos*

7.2.1 Medios de Cultivo

Se prepararon medios de cultivo Murashige & Skoog (MS), (Anexo 1) para desarrollo y multiplicación de las plántulas de vainilla.

7.2.2 Preparación de Medios de Cultivo Modificados

La preparación de medios Murashige & Skoog (MS) consistió en tres diferentes concentraciones: 75%, 50% y 25%, se adicionó concentraciones de reguladores de crecimiento. AIB: 0.5, 1.0 y 3.0 mg/L.; y ANA: 1.0, 2.0 y 4.0 mg/L.

Para la esterilización del equipo: La cristalería que se utilizó en la preparación de soluciones madre se esterilizaron en un horno autoclave de vapor seco. La cristalería y equipo para la siembra y trasplante se realizó en la cámara de flujo laminar, en la cual se empleó material quirúrgico estéril como: cajas de petri, pinzas, mangos de bisturí y agua desmineralizada. El material contaminado se esterilizó para que no se disemine dentro del laboratorio.

En la preparación de soluciones patrón: fue necesaria la esterilización de cristalería y agua destilada, se prepararon cantidades de 100 a 500 ml de solución.

Preparación de medios de cultivo: En un beaker se agregaron los diferentes compuestos como la sacarosa, micro y macroelementos, vitaminas y reguladores de crecimiento según el medio a preparar, se aforó con agua destilada. Se introdujo un magneto para disolver mejor la solución. Se llevó a pH óptimo de 5.7 regulado con NaOH a concentraciones de 0.001 N, 0.01 N y 0.1 N y HCl a una concentración de 1N y 0.25 N, y se agregó agar; luego se calentó en horno de microondas en punto de ebullición para disolver el gelificante. La solución caliente se vertió en los frascos para cultivo y se taparon con papel aluminio. Las bandejas con los frascos se llevaron a la autoclave por 20 minutos para su esterilización a 250° F (121°C) y 15 lb/in³.

Preparación de la cámara de flujo laminar: se encendió aproximadamente 30 minutos antes de utilizarla, se desinfectó el área de trabajo con alcohol al 70% y se colocó el material necesario dentro de la misma.

Siembra: Se esterilizaron los instrumentos que se utilizaron y se limpió la cámara. Todo el procedimiento se realizó con pinzas y bisturí. Se colocó el material vegetal sobre un plato cajas petri previamente esterilizadas. Se separaron cada una de las plantas haciendo cortes, escogiendo las mejores plantas. Se colocaron de una a dos en cada frasco nuevo. Se etiquetó el frasco, colocando el medio utilizado y la fecha de siembra. Se transfirieron al cuarto de crecimiento con temperatura media de 24°C y fotoperíodo de 12 horas.

Cuarto de crecimiento: el material vegetal que se sembró se llevó al cuarto de crecimiento o de incubación bajo condiciones controladas de temperatura de 24°C +/- 2°C y fotoperíodo de 12 horas de oscuridad.

7.2.3 Condiciones de Cultivo

Los brotes se colocaron en cuartos de crecimiento con temperatura media de 24°C +/- 2°C, con luz controlada y un fotoperiodo de 16 horas, 1000 lux (lumen/m²) de intensidad lumínica con tubos de gas neón.

7.2.4 Monitoreo del experimento

Los cultivos fueron observados durante todo el tiempo de cultivo para control de contaminación, crecimiento en el proceso de proliferación de raíces, evaluación de tratamientos de reguladores y su adaptación fuera del laboratorio.

7.3 Diseño de la Investigación

7.3.1 Fase de Enraizamiento

7.3.1.1 Población y Muestra

Población: brotes de vainilla de 0.5 a 1 cm de altura, desarrollados *in vitro*.

Muestra: 180 brotes de vainilla (10 réplicas por tratamiento)

De acuerdo a los análisis obtenidos en la fase de enraizamiento, se seleccionó el tratamiento con los mejores resultados en la obtención de plántulas y se obtuvo un nuevo lote de plántulas enraizadas para su uso en la aclimatación.

7.3.1.2 Tratamientos y Diseño del Experimento

Tres concentraciones de AIB: 0.5, 1.0 y 3.0 mg/L. y tres concentraciones de ANA: 1.0, 2.0 y 4.0mg/L. combinados con diferentes concentraciones de MS: 75%, 50% y 25%. Diseño bifactorial completamente al azar. Cada tratamiento se repitió 10 veces.

Cuadro 1. Tratamientos a evaluar con las diferentes concentraciones de AIB y ANA, combinados con diferentes concentraciones de MS.

Tratamiento	Medio MS	[AIB] mg/L.	[ANA] mg/L.
T1	75	0.5	--
T2	50	0.5	--
T3	25	0.5	--
T4	75	1.5	--
T5	50	1.5	--
T6	25	1.5	--
T7	75	3	--
T8	50	3	--
T9	25	3	--
T10	75	--	1
T11	50	--	1
T12	25	--	1
T13	75	--	2
T14	50	--	2
T15	25	--	2
T16	75	--	4
T17	50	--	4
T18	25	--	4

Fuente: Elaboración propia.

7.3.1.3 Variables

Dependientes: número de plantas con raíz, número de raíces, longitud de la raíz.

Independientes: Tratamientos evaluados (concentraciones de MS combinadas con los reguladores de crecimiento).

Toma de datos:

Número de plantas con raíz: se obtuvo la información de las plantas que presentaron raíz en cada tratamiento evaluado.

Número de raíces por planta: se tomó el número de raíces que presentó cada una de las plantas.

Longitud de raíces: se midió cada una de las raíces que presentaron las plantas.

De acuerdo a los análisis obtenidos en la fase de enraizamiento, se seleccionó el tratamiento con los mejores resultados en la obtención de plántulas y se obtuvo un nuevo lote de plántulas enraizadas para su uso en la aclimatación.

7.3.2 Aclimatación:

Población: plántulas de vainilla enraizadas, desarrollados *in vitro*.

Muestra: 40 plántulas de vainilla enraizadas (10 réplicas por tratamiento)

Las plantas enraizadas fueron ubicadas en microtuneles, para evitar su deshidratación y de tal manera evaluar su crecimiento en condiciones fuera del laboratorio. Se utilizaron bandejas plásticas como contenedores.

7.3.2.1 Sustratos:

Se evaluaron los siguientes sustratos como iniciadores en la aclimatación de las plantas.

- ❖ *Sphagnum* (peat moss).
- ❖ Broza.
- ❖ Arena blanca: tierra 1:1.
- ❖ Fibra de coco.

7.3.2.2 Variables

Dependientes: porcentaje de pegue (sobrevivencia), altura y coloración.

Independientes: Tratamientos evaluados (sustratos).

Toma de datos:

Sobrevivencia: se tomaron datos en tres tiempos diferentes. El primero, al ser sembradas en las bandejas, el segundo cuatro semanas después de haber sido sembradas y el tercero ocho semanas después de ser sembradas.

Altura: se midió cada una de las plantas al ser sembradas y después de cuatro y ocho semanas de ser sembradas.

Coloración: se midió en una escala de tres coloraciones verde, amarilla o café.

Los datos se tomaron, al ser sembradas, después de cuatro y ocho semanas. Se utilizó la Tabla de Munsell para determinar la coloración.

Diseño totalmente al azar.

7.3.2.3 Procedimiento:

- a. Antes de remover las plantas de los frascos fueron expuestas gradualmente a la luz brillante por dos semanas. Esto con el objetivo de endurecer las plantas.
- b. Previo a la siembra, se prepararon bandejas de plástico que contenían los diferentes sustratos evaluados.
- c. Para la siembra de las orquídeas se procedió a la extracción de las plantas utilizando pinzas y espátulas de metal y se colocaron en un recipiente con agua a temperatura ambiente.
- d. Se eliminaron los residuos de medio de cultivo con agitación y si estaban adheridos se utilizó una pinza pequeña.
- e. Con una pinza se hizo un pequeño agujero en el sustrato con un tamaño similar al del sistema radicular y se sembraron las plantas para luego presionar suavemente el sustrato alrededor de las raíces.
- f. Al estar realizando la siembra se aplicó constantemente agua para evitar la deshidratación.

7.4 Análisis estadístico

Para las variables número de raíces y longitud de raíces, se utilizó la prueba de Kruskal- Wallis y la prueba de comparaciones múltiples pareadas de Dunn.

En la fase de aclimatación se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas para cada tratamiento, para la variable coloración se realizó la prueba de Kruskal-Wallis (utilizando una escala numérica para clasificar los colores) y análisis descriptivo, utilizando la Tabla de Munsell para la determinación del color; para la variable altura se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

8 RESULTADOS

8.1 Enraizamiento

Para realizar los análisis de datos se utilizó el programa GraphPad InStat 3 (trial). Para la variable número de plantas con raíces por tratamiento no se aplicó alguna prueba estadística debido a que se evidencia claramente que todos los tratamientos tuvieron crecimiento de raíces. Para las variables número de raíces por planta y longitud de raíces, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn.

8.1.1 Número de plantas con raíz por tratamiento

Tabla No 1. Número de plantas con raíz por tratamiento

Tratamiento	No. Plantas con raíz
T1	9
T2	10
T3	10
T4	10
T5	9
T6	10
T7	10
T8	9
T9	10
T10	10
T11	9
T12	10
T13	10
T14	10
T15	10
T16	10
T17	10
T18	10

Fuente: Datos Experimentales

En la Tabla 1 se muestra la cantidad de plantas que presentan raíz por tratamiento, se puede observar que la mayoría de plantas presentó raíces de un total de 10 explantes por tratamiento.

8.1.2 Número de raíces

Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, se obtuvo un valor de $p = < 0.0001$. Se realizó esta prueba debido a que no todos los datos presentaban normalidad según la prueba de Kolmogorov Smirnov (KS) (ver Anexo 3, pág. 58). El valor de $p = < 0.0001$ nos indica que los tratamientos presentan diferencias significativas entre ellos. En la prueba de comparación múltiple de Dunn (ver Anexo 3, pág. 59) se observó que solamente 4 parejas de tratamientos presentaron valores menores a 0.05.

En la Tabla No. 2 se presentan los datos de las medianas de cada tratamiento, así como el valor mínimo y máximo. El T7 (3.0 AIB, 75% MS) muestra el mayor valor para medianas (4).

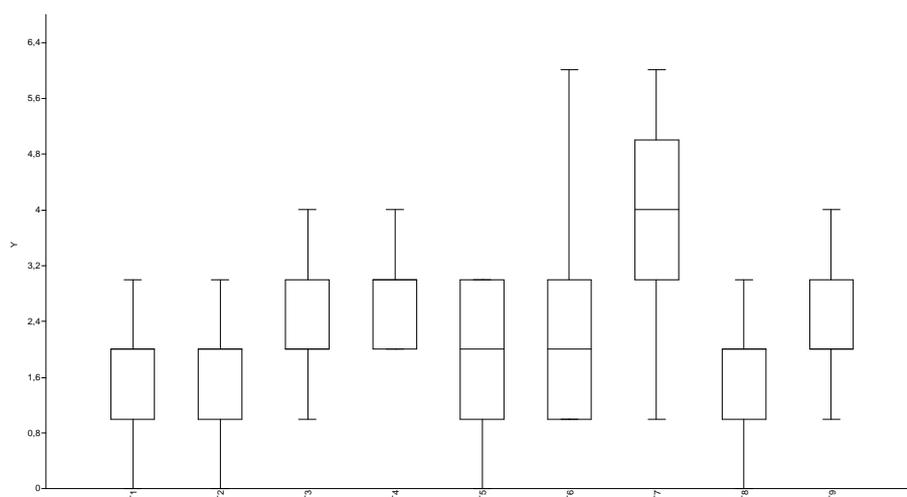
Tabla No. 2 Resumen de datos obtenidos para la variable número de raíces en cada tratamiento

Tratamiento	Número de réplicas	Mediana	Mínimo	Máximo
T1	10	2	0	3
T2	10	1.5	0	3
T3	10	2	1	4
T4	10	3	2	4
T5	10	1.5	0	3
T6	10	2	1	6
T7	10	4	1	6
T8	10	2	0	3
T9	10	2	1	4
T10	10	2	2	4
T11	10	3	0	4
T12	10	3	2	6
T13	10	3	2	5
T14	10	2	1	3
T15	10	3	1	5
T16	10	3	1	4
T17	10	1	1	2
T18	10	1.5	1	4

Fuente: Datos Experimentales

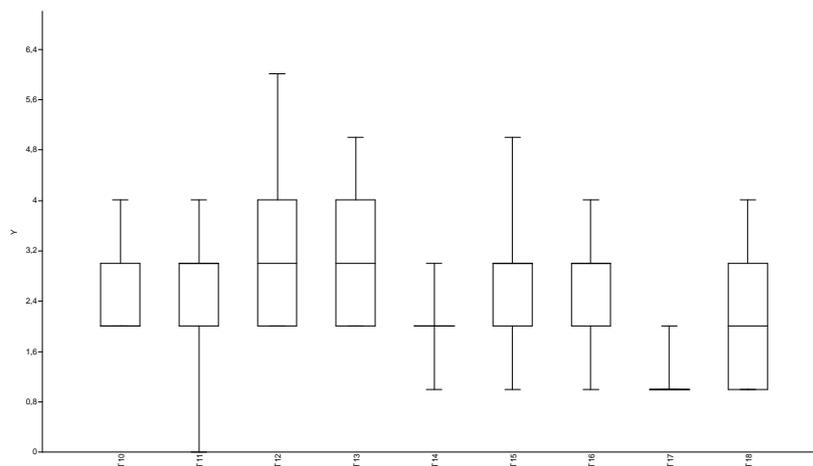
Como se puede observar en la gráfica 1 en los tratamientos con AIB, el T6 (1.5 AIB, 75% MS) y T7 (3.0 AIB, 75% MS) fueron los que presentaron mayor número de raíces (6), con una mediana de 2 y 4 respectivamente. En los tratamientos con ANA (Gráfica 2), el que presentó mayor cantidad de raíces en una planta fue el 12 (1.0 ANA, 25% MS) con un valor de 6.

Número de Raíces



Gráfica 1. Representación gráfica de la distribución de datos para la variable número de raíces por planta que presenta cada uno de los tratamientos con AIB.

Número de Raíces



Gráfica 2. Representación gráfica de la distribución de datos para la variable número de raíces por planta que presenta cada uno de los tratamientos con ANA.

Se puede observar que ambos reguladores respondieron positivamente en todos los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento que presentó la mediana con el valor mayor fue con el regulador ácido indolbutírico (AIB).

8.1.3 Longitud de Raíces

Al igual que en la variable número de raíces, no todos los datos presentan normalidad según la prueba de Kolmogorov Smirnov (KS), por lo que se procedió a realizar la prueba de Kruskal Wallis y posteriormente la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (ver Anexo 3, pág. 60 y 61).

El valor de $p = < 0.0001$, es considerado extremadamente significativo. En el test de Dunn, de comparación múltiple, se puede observar en el Anexo 3 que 13 parejas presentan valores menores a 0.05. El tratamiento T1 vs T17, T3 vs T16, T3 vs T17, T4 vs T8, T4 vs T17 y T6 vs T17, y otros.

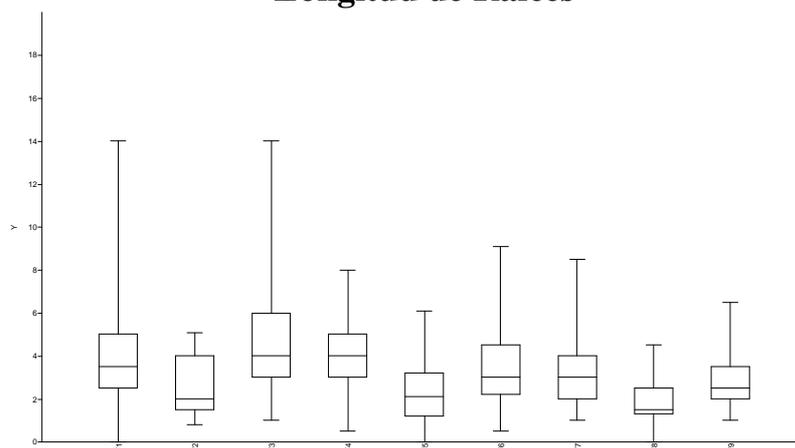
Los valores de rango mínimo y máximo se presentan en la Tabla 3, siendo el tratamiento 1 y 3 los que muestran el valor máximo para longitud de raíz (14 cm). El tratamiento 7 tuvo el mayor número de raíces con un total de 38 raíces, con una mediana de 3 y un valor máximo de 8.5 cm de longitud.

Tabla No. 3 Resumen de datos obtenidos para la variable longitud de raíces en cada tratamiento

Tratamiento	No. total de raíces por trat.	Mediana	Mínimo	Máximo
T1	19	3.5	0	14
T2	15	2	0.8	5.1
T3	25	4	1	14
T4	27	4	0.5	8
T5	18	2.05	0	6.1
T6	22	2.95	0.5	9.1
T7	38	3	1	8.5
T8	17	1.5	0	4.5
T9	22	2.5	1	6.5
T10	26	3.35	0.8	13
T11	25	3.7	0	13
T12	31	2.5	1	7.5
T13	30	2.85	1.1	7.2
T14	20	2.6	0.5	11.2
T15	27	2.1	0.7	8.1
T16	26	1.6	0.5	9.1
T17	11	0.9	0.4	1.8
T18	20	2.5	0.7	9

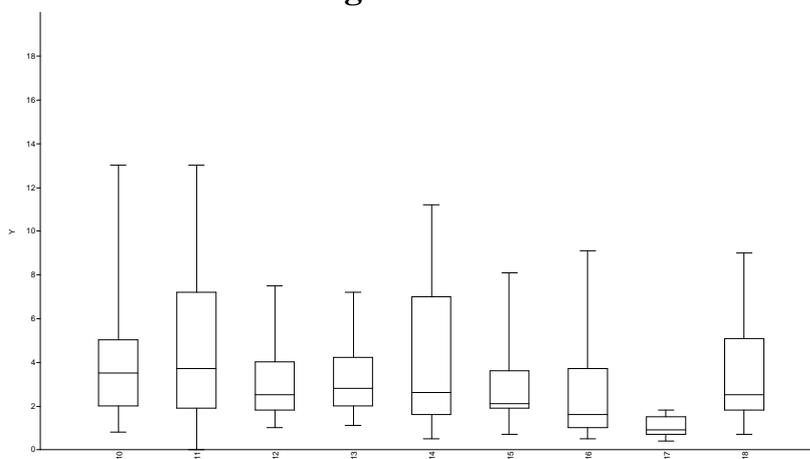
Fuente: Datos Experimentales

Longitud de Raíces



Gráfica No 3. Representación gráfica de la distribución de datos para la variable longitud de raíces que presenta cada uno de los tratamientos con AIB.

Longitud de Raíces



Gráfica No 4. Representación gráfica de la distribución de datos para la variable longitud de raíces presenta cada uno de los tratamientos con ANA.

En la gráfica 3 y 4, están representados los datos de la Tabla No. 3 donde se puede observar con mayor claridad la distribución de los datos. Los tratamientos T1 (0.5 AIB, 75% MS) y T3 (0,5 AIB, 25% MS) presentan la mayor longitud en raíces con un valor de 14 cm. En los tratamientos con ANA el T10 (0 1,0 ANA, 75% MS) y el T11 (1,0 ANA, 50% MS) mostraron los mejores resultados con un valor de 13 cm. (Gráfica 4).

8.2 Aclimatación

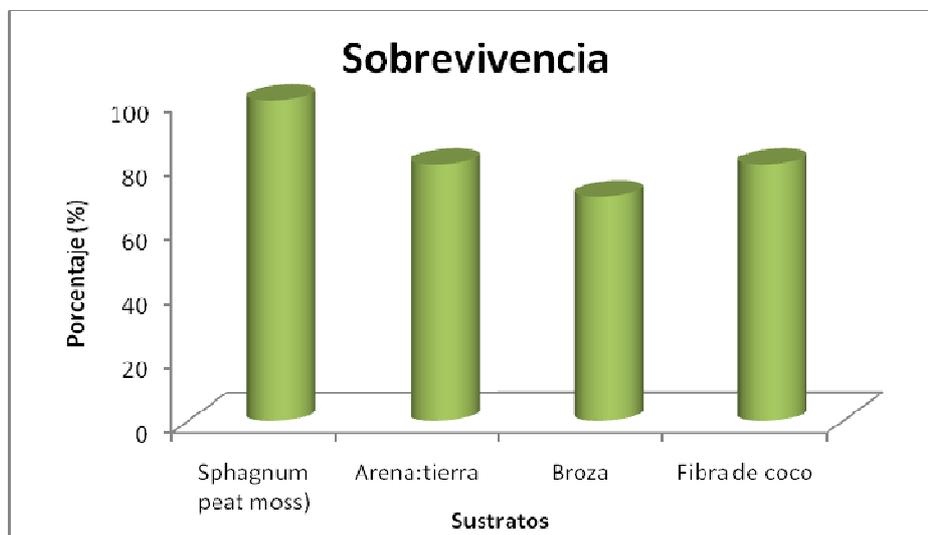
8.2.1 Sobrevivencia

Para los cuatro sustratos utilizados, el porcentaje de sobrevivencia fue alto, presentando un 100% el *Sphagnum* (peat moss), seguido del sustrato arena:tierra y fibra de coco con un 80%.

Tabla No 4. Porcentaje (%) de sobrevivencia de los diferentes sustratos.

<i>Sphagnum</i> (peat moss)	Arena:tierra	Broza	Fibra de coco
100	80	70	80

Fuente: Datos Experimentales



Gráfica No 5. Porcentaje (%) de sobrevivencia de los diferentes sustratos.

8.2.2 Coloración

Se utilizó una escala de coloración de 1 a 3, siendo el 1=verde (sano), el 2=amarillo y 3=café (podrido o muerto). La mayoría presentaban un estado sano por lo que el color que predominó en todos los sustratos fue el verde. Se realizó la prueba de normalidad (KS), donde ninguno de los datos presentaba normalidad. Se procedió con la prueba de Kruskal Wallis, obteniéndose un valor de $p=0.2346$, siendo < 0.05 , considerándose no significativo. Para el análisis descriptivo se utilizó la Tabla de Munsell para la coloración de suelos para tener una referencia más precisa de la tonalidad del color.

Para la coloración que presentaron las plantas vivas y sanas (verde) no hubo una coloración que se asemejara a este en la Tabla de Munsell. Para las otras coloraciones, de acuerdo a la Tabla de Munsell, la codificación para el color café (plantas muertas o en mal estado) es 10 YR $\frac{3}{4}$ y para la coloración intermedia (amarillo) 2.5 Y $\frac{6}{6}$ (Figura 4), haciendo referencia a Y: yellow y R: red indicando que el amarillo predomina sobre el rojo (10), el numerador indica el brillo y el denominador la intensidad.

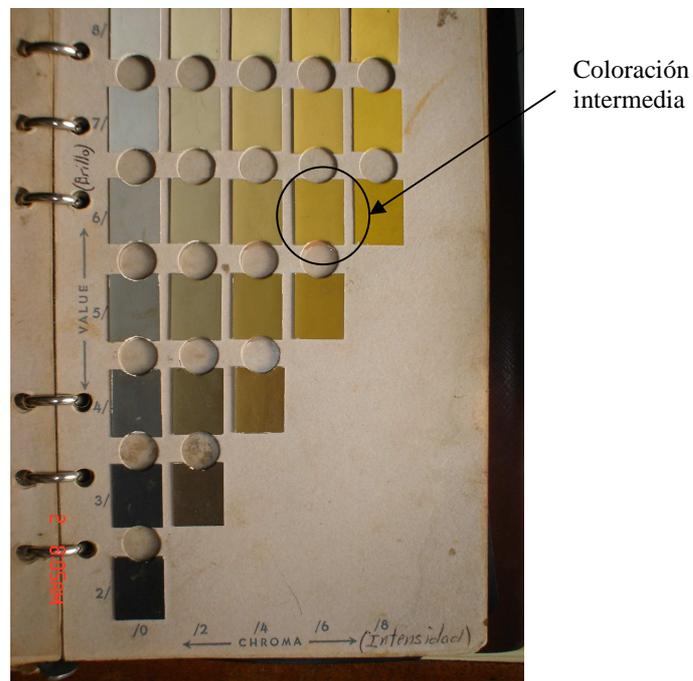


Figura 4 Tabla de coloración de Munsell

8.2.3 Altura

Cada tratamiento constó de 10 repeticiones, las cuales fueron medidas al momento de ser sembradas y a las 4 y 8 semanas. En la tabla 5 se muestra el promedio total de crecimiento para cada uno de los tratamientos; como se puede observar el *Sphagnum* (peat moss) presenta un crecimiento promedio de 2.24 cm. seguido del sustrato de arena y tierra con 2.08 cm. en promedio. El sustrato que fue menos efectivo para la aclimatación de la vainilla fue la broza, con un crecimiento promedio de 1.05 cm., después de 8 semanas.

Tabla No. 5. Crecimiento promedio de los sustratos utilizados para la aclimatación.

<i>Sphagnum</i> (peat moss)	Arena:tierra	Broza	Fibra de coco
2.24	2.08	1.05	1.68

Fuente: Datos Experimentales

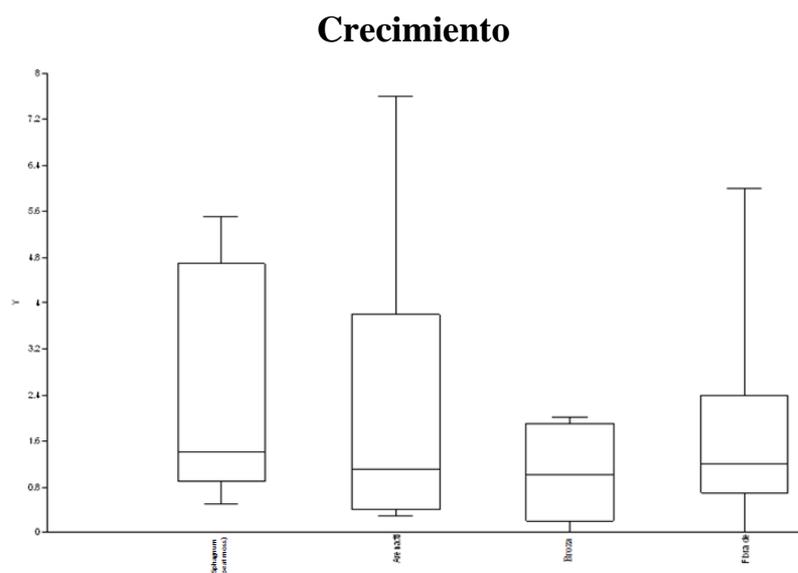
Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov- Smirnov, para esta variable y al menos uno de los sustratos no presenta normalidad en los datos. Se procedió a realizar la prueba de Kruskal Wallis. El valor de $p= 0.6015$, mayor a 0.05, considerado no significativo. Ya que el valor de $p>0.05$ no se procedió a hacer la prueba de comparaciones múltiples (Anexo 3, página 61).

En la Tabla 6 y gráfica 6 se presentan los valores mínimos y máximos de la variable altura para cada tratamiento, el *Sphagnum* (peat moss) y la mezcla arena:tierra presentan los valores máximos. También se muestran los valores de las medianas, donde se observa que la turba es la que presenta una mediana de 1.4, siendo este el valor más alto.

Tabla No. 6 Valores mínimos, máximos y medianas de cada tratamiento en la fase de aclimatación.

Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Sphagnum</i> (peat moss)	1.4	0.5	5.5
Arena:tierra	1.15	0.3	7.6
Broza	1.05	0	2
Fibra de coco	1.05	0	6

Fuente: Datos Experimentales



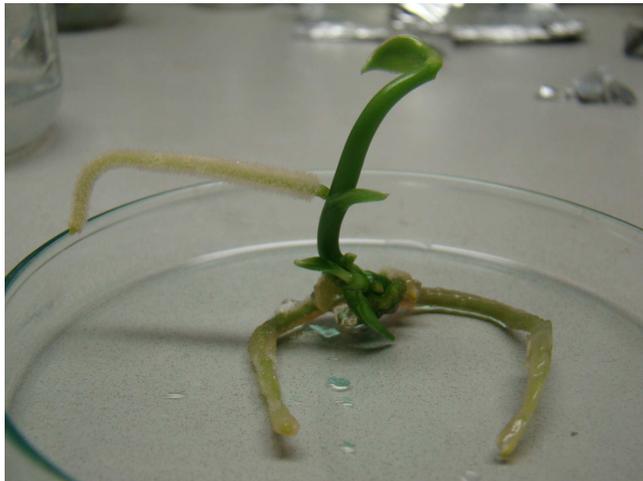
Gráfica No 6. Distribución de datos de los sustratos utilizados para la aclimatación.

9 DISCUSIÓN

9.1 Enraizamiento

La práctica de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia debido a que tiene como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces son fundamentales para lograr la transferencia de las vitroplantas a condiciones de invernadero. Sin embargo, algunos autores han reportado inconvenientes al realizar la misma, lo cual sería lógico al considerar que existen respuestas diferenciales entre especies (Quintero I, Polo J., Jarma A, y Espitia A., 2003).

Los resultados de enraizamiento obtenidos en *V. planifolia* muestran que todos los tratamientos respondieron positivamente a los reguladores de crecimiento. Como se puede observar en la gráfica 1 y 3 de todos los tratamientos evaluados, el T7 (3.0 AIB, 75% MS) muestra la mejor respuesta para las variables número de raíces y longitud de raíces, además mostró un crecimiento considerable. El T7 está compuesto por la concentración más alta de regulador AIB (3.0 mg/L.) y la concentración más alta de medio MS (75%). Se puede observar en las gráficas 1 y 3 que existe una leve tendencia a disminuir el número y longitud de raíces en los tratamientos con AIB, conforme va disminuyendo el porcentaje de MS, pero no es un patrón generalizado. Y en los tratamientos con ANA es menos evidente. Podría decirse que la cantidad de MS añadida al medio, influye en el enraizamiento y prolongación de la raíz en las plantas de vainilla, dando mejores resultados (para *V. planifolia*) los tratamientos con 75% de MS, debido a que la cantidad de nutrientes disponibles para el explante es mayor (Fotografía 1 y 2).



Fotografía 1. Tratamiento 4 (1.5 mg/L. AIB, 75% MS)



Fotografía 2. Tratamiento 7 (3.0 mg/L. AIB, 75% MS)

El ácido indolbutírico como enraizador se ha utilizado en diferentes investigaciones, presentando resultados similares a los obtenidos en este estudio. Condemarín C, Chico J, Claudia C (2007) evaluaron el efecto del AIB en *Enclyclia microtos*, obteniendo raíces a concentraciones de 1 ppm y 2 ppm del regulador. También, se ha utilizado en *Prosopis hassleri* a una concentración de 3 mg/L. de AIB, presentando formación de raíces (Castillo G & Vega M., s.f).

Salisbury (2000) resalta que el AIB se utiliza para causar la formación de raíces aún más a menudo que ANA o cualquier otra auxina.

Un factor importante que se observó en las plantas fue su crecimiento, ya que en algunos tratamientos el desarrollo de raíces fue efectivo pero el crecimiento de la planta no. En los tratamientos con altas concentraciones de ANA, se pudo observar este fenómeno (Fotografía 3 y 4).



Fotografía 3. Tratamiento 15 (2,0 mg/L. ANA, 25% MS)



Fotografía 4. Tratamiento 17 (4,0 mg/L. ANA, 50% MS)

Las concentraciones de ANA utilizadas en vainilla fueron de 1.0, 2.0 y 4.0 mg/L. adicionadas al medio MS. Los tratamientos con las menores concentraciones de ANA fueron los que presentaron mayor longitud de raíces, aunque los datos entre tratamientos fueron muy similares. Los tratamientos que contenían 4.0 mg/L. de ANA fueron los que presentaron el menor número de raíces y longitud de raíces. Trabajos realizados por Quintero I, Polo, J, Jarma A, y Espitia A. (2003) en *Dioscorea sp* indican que a medida que aumentó la dosis de ANA, el número de raíces fue mayor hasta registrar 3.6 raíces por planta con dosis de 0.9 mg/L., menor a las utilizadas en esta investigación. Se encontró que en otros estudios realizados en donde han utilizado el ANA para el desarrollo de raíces, las concentraciones utilizadas son menores o iguales a 1.0 mg/L. (Kalimuthu K, R Senthilkumar & N Murugalatha, 2006).

En estudios previos realizados en vainilla, se ha utilizado el AIB y el ANA para el enraizamiento de las plántulas presentando un 100% de enraizamiento con las concentraciones más altas utilizadas en el experimento (2.0 mg/L.). No obstante, el AIB presentó mejores resultados que el ANA en cuanto a número y longitud de raíces (Giridhar, P, Obul B, Ravishankar GA, 2001). Aktar *et al*, encontró que los mejores resultados para la obtención de raíces en *Dendrobium sp.* a una concentración de 1.0 mg/L de AIB en donde el número de raíces fue de 1.81 por planta y 0.35 cm de longitud. El AIB no sólo se utiliza para enraizamiento de orquídeas, sino también se utiliza en muchas otras especies vegetales como por ejemplo el azahar de la India (*Murraya paniculata* L. Jack) utilizando una concentración de 4 mg/L. para el enraizamiento de esta especie. También se ha utilizado en papaya (*Carica papaya* L.) combinando concentraciones de AIB con diferentes tiempos de incubación en oscuridad, obteniendo los mejores resultados en medio con 14.7 µM de AIB (Bhattacharya *et al*, 2003/4). Yu *et al* (2000), demostraron en su estudio que la iniciación y desarrollo de raíz es mejor con una baja concentración de AIB en esta especie (papaya).

En los resultados obtenidos en este experimento los tratamientos que presentaron mayor número de raíces fueron los que contenían el mayor porcentaje de MS (75%) y las

concentraciones más altas de AIB (siendo mayores a las utilizadas en los estudios citados anteriormente), y en cuanto a la longitud, ésta mostró una leve disminución al aumentar la concentración del regulador. En los tratamientos con ANA los mejores resultados fueron las que contenían las menores concentraciones. Esto puede indicar que tanto AIB como ANA pueden ser utilizados para enraizamiento de *V. planifolia*, ya que al aplicarse las diferentes concentraciones no presentan toxicidad alguna.



Fotografía 5. Tratamiento 11 (1,0 mg/L. ANA, 50% MS)

9.2 Aclimatación

La fase de aclimatación a invernadero es el punto crítico de las plantas provenientes de cultivo *in vitro*, donde sigue siendo un cuello de botella en la micropropagación de muchas plantas (Francisco, 2008).

La adaptación de las plantas a condiciones de invernadero es el punto que marca el éxito de la micropropagación de orquídeas, debido a que el buen manejo que se les proporcione en esta etapa, dará como resultado el alto grado de supervivencia de las plantas y los costos serán bajos (Archila E, 2000).

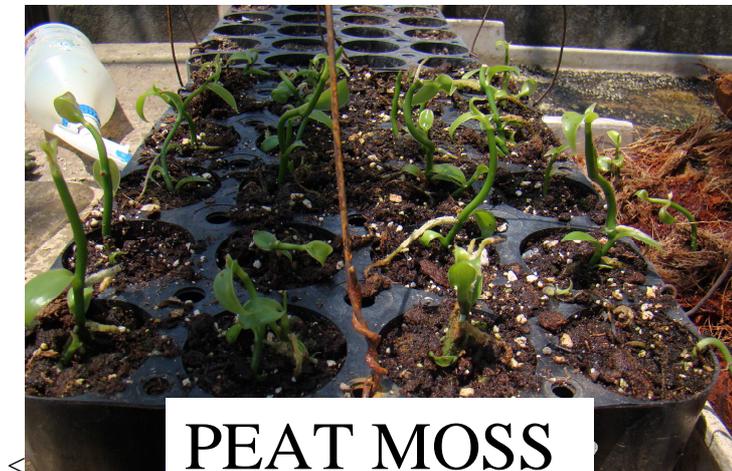


Fotografía 6. Sustratos evaluados en invernadero (*Sphagnum* (peat moss), Arena:tierra, brosa y fibra de coco)

El sustrato a utilizar en las plantas provenientes de cultivo *in vitro* va a influir en la respuesta que tengan para la aclimatación. En los resultados obtenidos, se observa (Gráfica 5) que la sobrevivencia en los cuatro sustratos evaluados fue elevada. Todos los sustratos presentaron un porcentaje de sobrevivencia mayor o igual a 70%, el *Sphagnum* (peat moss) presentó el mayor porcentaje con un 100% de sobrevivencia presentando una coloración verde, lo cual indicaba que las plantas estaban completamente sanas. En algunos casos se presentó otro tipo de coloración como amarillo o café, indicando que la planta ya no estaba en las condiciones óptimas para trasplantar. Estos resultados son similares a los obtenidos en otras especies de orquídeas utilizando como sustratos corteza de pino, carbón de encino y tepecil (3:1:1) con una sobrevivencia de 89%, 76% y 60.1% en *Mormodes tuxtlenensis* Salazar, *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex y *Lycaste skinneri* (Batem. Ex Lindl) Lindl (Salazar V & M Mata, 2003).

Para la variable altura, el valor de $p= 0.6015 (>0.05)$, nos indica que las diferencias entre tratamientos no son significativas. No obstante, el sustrato con el que las plantas obtuvieron mayor crecimiento fue el *Sphagnum* (peat moss), seguido del sustrato de arena: tierra. Para que un sustrato sea eficiente para la aclimatación debe presentar una elevada capacidad de retención de agua y alta porosidad (Francisco, 2008); en cuanto a la retención de agua el *Sphagnum* (peat moss) presenta un 70% y la fibra de coco 57%, que

sigue siendo aceptable. Siendo similar esta característica para los otros dos sustratos (sin datos cuantitativos) (HIDROENVIRONMENT, s.f).



Fotografía 7. *Sphagnum* (peat moss), sustrato que presentó mejores resultados



Fotografía 8. Crecimiento de *V. planifolia* en sustrato (*Sphagnum* (peat moss))

Se puede observar que en otras especies de orquídeas, al igual que *V. planifolia*, han tenido éxito en la fase de aclimatación, como *Trichocentrum carthagenense* (Jacq.) Sw. y *Laelia eyermeriana* Rchb.f., donde el mejor sustrato fue la hoja de palma y la fibra de palma, respectivamente (Francisco, 2008). Como se puede observar, los sustratos orgánicos han sido efectivos en estas especies de orquídeas, pero se debe tomar en cuenta que estos datos pueden variar entre las especies.

10 CONCLUSIONES

- 10.1** En los resultados obtenidos en la fase de enraizamiento *in vitro* existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p = <0.0001$). Los tratamientos que presentaron mayor número de raíces fueron los que contenían el mayor porcentaje de sales Murashige & Skoog (75%) combinados con el ácido indolbutírico (AIB).
- 10.2** El tratamiento 7 (3.0 AIB, 75% MS), presentó los mejores resultados en cuanto a número de raíces con una mediana de 4 raíces por planta y resultados positivos en cuanto a longitud de raíces (mediana: 3).
- 10.3** En los tratamientos con ANA (ácido naftalenacético), los mejores resultados fueron los que contenían la menor concentración utilizada (1.0 mg/L), aunque el valor de las medianas fue similar.
- 10.4** Los tratamientos evaluados (*Sphagnum* (peat moss), fibra de coco, arena:tierra y broza) en la fase de aclimatación no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p = >0.05$) para las variables coloración y crecimiento.
- 10.5** Los sustratos evaluados son efectivos para la fase de aclimatación en *Vanilla planifolia* Andrews, siendo el *Sphagnum* (peat moss) el que presentó mejores resultados en cuanto a la sobrevivencia (100%) y crecimiento (altura) de las plantas con una mediana de 1.4.

11 RECOMENDACIONES

- 11.1** Evaluar concentraciones menores a las utilizadas de AIB (ácido indolbutírico) y de ANA (ácido naftalenacético), en este experimento, para reducir los costos del cultivo in vitro.
- 11.2** A pesar de que el mejor sustrato para la aclimatación es el *Sphagnum* (peat moss), se puede utilizar otro sustrato de menor costo como la fibra de coco, que presentó similar efectividad.
- 11.3** Se recomienda utilizar plántulas mayores a los 4 cm. de altura para la aclimatación, para que presente mayor probabilidad de sobrevivencia.

12 REFERENCIAS

- (1) Asociación Costarricense de Orquideología. (2000). Boletín Informativo. San José, Costa Rica. Recuperado de: www.ticorquideas.com
- (2) Archila, E. (2000). *Manual de Propagación de Orquídeas in vitro*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- (3) Castillo G, Vega MV. (s.f.). Enraizamiento *In Vitro* de Algarrobo Paraguayo. (*Prosopis hassleri*). Universidad Nacional de Formosa, Argentina.
- (4) Condemarín C, Julio, C. Vargas. (2007). Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo *in vitro* de yemas axilares de *Encyclia microtos* (rchb.f.) Hoehne (Orchidaceae). Laboratorio de fisiología y cultivo de tejidos vegetales. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad nacional de Trujillo, Perú. *Lankesteriana* 7(1-2): 247-254.
- (5) Drew, R. (1992). Improved Techniques for in Vitro Propagation and Germplasm Storage of Papaya. *Hort Science* 27(10):1122-1124.
- (6) EFN.UNCOR. (1999). Hormonas de las Plantas. Recuperado de: <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>
- (7) Enciclopedia Microsoft Encarta 2003.
- (8) Francisco, J. (2008). Propagación in vitro y establecimiento en invernadero de las orquídeas *Trichocentrum carthagenense* (Jacq.) Sw. y *Laelia eyermaniana* Rchb. f., para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. México.
- (9) García *et al.* (2002). *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa. 636 páginas
- (10) Giridhar, P, B Obul, A Ravishankar. (2001). *Current Science*. Vol 81, No 9. Plant Cell Biotechnology Department, Central Food Technological Research Institute, Mysore 570 013, India
- (11) González, K. (2003). Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Instituto tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. Informe de práctica de especialidad. Cartago.
- (12) HIDROENVIRONMENT. (s.f.) Tipos de Sustratos para Hidroponía. Recuperado de: http://www.hydroenvironment.com.mx/catalogo/index.php?main_page=page&id=34&chapter=2

- (13) Kalimuthu K, R Senthilkumar & N Murugalatha. (2006). Regeneration and mass multiplication of *Vainilla planifolia* Andr. – a tropical orquid. *Current Science*. Vol. 91(10).
- (14) Martínez, A. (2007). *Estudio de inducción de embriogénesis somática y organogénesis en embriones cigóticos de Xate. (Chamaedorea elegans Mart)*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- (15) Mogollón *et al.* (2004). Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 21 (1): 15-21.
- (16) Molina, L. (s.f.) Evaluación de medios de cultivo para la germinación y desarrollo de plántulas de Vainilla (*Vanilla planifolia*) *in vitro* Biotecnología Tecnoregión: UCIT
- (17) Munsell Color. Munsell Soil Color Charts. Macbeth a división of KollMorgen Corporation. Baltimore, Maryland.
- (18) Olivera *et al.* (2000). Cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera hamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro*, vol 12:3, 75-80. Venezuela.
- (19) Ordoñez, M. (2003). *Propagación in vitro de Mammillaria vobuernesii* Scheer. (Cactaceae) (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- (20) Quintero I, Polo, J., Jarma A, Espitia A. (2003). Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol V No. 2. Pp 51-56
- (21) Roca, W. & M. Luis. (1991). *Cultivo de tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- (22) Salazar V & M. Mata. (2003). Micropropagación y Conservación de Orquídeas mexicanas en el Jardín Botánico Clavijero. *Lankesteriana* 7:151-153.
- (23) Salisbury, F. (2000). *Fisiología de las Plantas 3: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Madrid, España: International Thomson Editores.
- (24) Soto, M. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoin AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J101. México D. F.

13 ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO MS (Murashige & Skoog, 1960)

Para desarrollo de plantas sin hormonas, se usa en banano, plátano, papaya, piña, orquídeas y otros.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN	1000 ml	500 ml	250 ml
Macronutrientes	10x	100 ml	50 ml	25 ml
Micronutrientes A	1000x	1 ml	0.5 ml	0.25 ml
Micronutrientes B	5000x	0.2 ml	0.1 ml	0.05 ml
KI	1000x	1 ml	0.5 ml	0.25 ml
CaCl ₂ . H ₂ O	10x	100 ml	50 ml	25 ml
Hierro	1000x	10 ml	5 ml	2.5 ml
Myo-inositol	100x	10 ml	5 ml	2.5 ml
Vitaminas	1000x	1 ml	0.5 ml	0.25 ml
Sucrosa	30%	30 g	15 g	7.5 g
Agar	7%	7 g	3.5 g	1.75 g
pH		5.7	5.7	5.7

Para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, se deben preparar medios apropiados según la especie a trabajar y los propósitos de éste. Previo a preparar los medios de cultivo, se deben preparar las soluciones madre o patrón. El medio de cultivo que más se utiliza en este laboratorio es el MS (Murashige y Skoog, 1962), a diferentes concentraciones (25,50 y 100%).

Para preparar un litro de medio de cultivo se procede de la siguiente manera:

- ✓ Se preparan soluciones en beakers de 1 o 2 litros (generalmente).

- ✓ En el beaker se van agregando los diferentes compuestos como la sacarosa, micro y macroelementos, vitaminas y reguladores de crecimiento según el medio a preparar
- ✓ Se afora con agua destilada.
- ✓ Se introduce un magneto para que se disuelva mejor.
- ✓ Se agrega agar y se lleva a pH óptimo de 5.7;
- ✓ Luego se calienta en horno de microondas en punto de ebullición para disolver el gelificante.
- ✓ La solución caliente se vierte en los frascos para cultivo y se tapan.
- ✓ Los frascos se llevan a la autoclave por 20 minutos para esterilizar a 250° F y 15 lb/in³.

ANEXO 2. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO Y CANTIDAD AGREGADA

No.	Nombre del Compuesto	Fòrmula	mg/L. MS	Cantidad vol. Deseado		
Macronutrientes 10x				500 ml	250 ml	100 ml
1	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1900	8.25	4.125	
2	Nitrato de potasio	KNO ₃	1600	9.5	4.75	
3	Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1.85	0.925	
4	Dihidrogeno fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	170	0.85	0.425	
Micronutrientes A 1000x						
5	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2			0.62
6	Sulfato de manganeso monohidratado	MnSO ₄ .H ₂ O	22.3			2.23
7	Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6			0.86
8	Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25			0.025
Micronutrientes B 5000x						
9	Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025			0.125
10	Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025			0.125
Ioduro de potasio 1000x						
11	Ioduro de potasio	KI	0.83			0.083
Cloruro de calcio 10x						
12	Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	2.2	1.1	
Myo-inositol 100x						
13	Myo-inositol 100x	C ₆ H ₁₂ O ₆	100			1
Solución de hierro 100x						
14	Cristales de sal disodio dihidratada	Na ₂ EDTA	37.3			0.373
15	Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8			0.278
Tiamina 1000x						
16	Tiamina monoclorhidrica	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS.H ₂ O	0.1			0.01
Vitaminas 1000x						
17	Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.5			0.05
18	Piridixol hidrocloreto	C ₈ H ₁₂ ClNO ₃	0.5			0.05
19	Tiamina monoclorhidrica glicina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS.H ₂ O	0.1			0.01
20	Glicina	H ₂ NCH ₂ COOH	2			0.2

REGULADORES DE CRECIMIENTO						
	AUXINAS		ppm	500 ml		100 ml
21	Ácido-3-indolacético IAA °	$C_{10}H_9NO_2$	250			0.025
22	Ácido 3-indolbutírico IBA °	$C_{12}H_{13}NO_2$	250			0.025
23	Ácido 1-naftalenacético ANA °	$C_{12}H_{10}NO_2$	250			0.025
24	Ácido giberélico 90% "	$C_{19}H_{22}O_6$	250			0.028
25	2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) "		1000			0.103
	CITOCININAS					
26	Cinetina 6-furfurilaminopurina °	$C_{10}H_9N_5O$	250			0.252
27	N-6-benziladenina	$C_{12}H_{11}N_5$	250			0.252
28	6-benzilaminopurina °	$C_{12}H_{11}N_5$	250			0.252
29	Adenina 6-aminopurina	$C_5H_5N_5 \cdot 1/2 H_2SO_4$	250			
	Solvente: ° NaOH; " EtOH 95%					

ANEXO 3. PRUEBAS ESTADISTICAS

NÚMERO DE RAÍCES POR PLANTA

Prueba de Normalidad

Tabla 4. Prueba de Normalidad utilizando el test de Kolmogorov y Smirnov.

Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
T1	0.2861	0.0199	No
T2	0.2218	>0.10	Yes
T3	0.2965	0.0129	No
T4	0.2716	0.0351	No
T5	0.2456	0.0888	Yes
T6	0.2514	0.0731	Yes
T7	0.2472	0.0842	Yes
T8	0.2824	0.0231	No
T9	0.2861	0.0199	No
T10	0.3616	0.0006	No
T11	0.2954	0.0135	No
T12	0.2310	>0.10	Yes
T13	0.2400	>0.10	Yes
T14	0.3000	0.0111	No
T15	0.2053	>0.10	Yes
T16	0.2451	0.0903	Yes
T17	0.5241	<0.0001	No
T18	0.2886	0.0179	No

Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 5. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Calculation detail

Group	Number of Points	Sum of Ranks	Mean of Ranks
T1	10	715.00	71.500
T2	10	558.50	55.850
T3	10	1011.0	101.10
T4	10	1136.5	113.65
T5	10	663.50	66.350
T6	10	787.00	78.700
T7	10	1378.5	137.85
T8	10	610.50	61.050
T9	10	875.00	87.500
T10	10	1063.0	106.30
T11	10	1008.5	100.85
T12	10	1215.5	121.55
T13	10	1264.0	126.40
T14	10	791.00	79.100
T15	10	1076.0	107.60
T16	10	1064.0	106.40
T17	10	322.00	32.200
T18	10	750.50	75.050

Kruskal-Wallis Statistic KW = 51.289 (corrected for ties)

Tabla 6. Prueba de Comparaciones múltiples de Dunn

Dunn's Multiple Comparisons Test			
Comparison	Mean Rank Difference		P value
T1 vs. T2	15.650	ns	P>0.05
T1 vs. T3	-29.600	ns	P>0.05
T1 vs. T4	-42.150	ns	P>0.05
T1 vs. T5	5.150	ns	P>0.05
T1 vs. T6	-7.200	ns	P>0.05
T1 vs. T7	-66.350	ns	P>0.05
T1 vs. T8	10.450	ns	P>0.05
T1 vs. T9	-16.000	ns	P>0.05
T1 vs. T10	-34.800	ns	P>0.05
T1 vs. T11	-29.350	ns	P>0.05
T1 vs. T12	-50.050	ns	P>0.05
T1 vs. T13	-54.900	ns	P>0.05
T1 vs. T14	-7.600	ns	P>0.05
T1 vs. T15	-36.100	ns	P>0.05
T1 vs. T16	-34.900	ns	P>0.05
T1 vs. T17	39.300	ns	P>0.05
T1 vs. T18	-3.550	ns	P>0.05
T2 vs. T3	-45.250	ns	P>0.05
T2 vs. T4	-57.800	ns	P>0.05
T2 vs. T5	-10.500	ns	P>0.05
T2 vs. T6	-22.850	ns	P>0.05
T2 vs. T7	-82.000	*	P<0.05
T2 vs. T8	-5.200	ns	P>0.05
T2 vs. T9	-31.650	ns	P>0.05
T2 vs. T10	-50.450	ns	P>0.05
T2 vs. T11	-45.000	ns	P>0.05
T2 vs. T12	-65.700	ns	P>0.05
T2 vs. T13	-70.550	ns	P>0.05
T2 vs. T14	-23.250	ns	P>0.05
T2 vs. T15	-51.750	ns	P>0.05
T2 vs. T16	-50.550	ns	P>0.05
T2 vs. T17	23.650	ns	P>0.05
T2 vs. T18	-19.200	ns	P>0.05
T3 vs. T4	-12.550	ns	P>0.05
T3 vs. T5	34.750	ns	P>0.05
T3 vs. T6	22.400	ns	P>0.05
T3 vs. T7	-36.750	ns	P>0.05
T3 vs. T8	40.050	ns	P>0.05
T3 vs. T9	13.600	ns	P>0.05
T3 vs. T10	-5.200	ns	P>0.05
T3 vs. T11	0.2500	ns	P>0.05
T3 vs. T12	-20.450	ns	P>0.05

LONGITUD DE RAÍCES

Prueba de Normalidad

Tabla 7. Prueba de Normalidad utilizando el test de Kolmogorov y Smirnov.

Group	KS	P Value	Passed normality test?
T1	0.2147	0.0213	No
T2	0.2568	0.0088	No
T3	0.1512	>0.10	Yes
T4	0.08594	>0.10	Yes
T5	0.1437	>0.10	Yes
T6	0.1759	0.0750	Yes
T7	0.1253	>0.10	Yes
T8	0.2254	0.0217	No
T9	0.2181	0.0078	No
T10	0.2562	0.0001	No
T11	0.1885	0.0222	No
T12	0.1435	>0.10	Yes
T13	0.1389	>0.10	Yes
T14	0.2107	0.0202	No
T15	0.2070	0.0044	No
T16	0.1916	0.0150	No
T17	0.1592	>0.10	Yes
T18	0.2509	0.0019	No

Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 8. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Calculation detail

Group	Number of Points	Sum of Ranks	Mean of Ranks
T1	19	4928.0	259.37
T2	15	2602.0	173.47
T3	25	7110.0	284.40
T4	27	7326.0	271.33
T5	18	2791.5	155.08
T6	22	5294.0	240.64
T7	38	8278.5	217.86
T8	17	2006.0	118.00
T9	22	4199.5	190.89
T10	26	6314.0	242.85
T11	25	6245.0	249.80
T12	31	6256.0	201.81
T13	30	6518.5	217.28
T14	20	4422.0	221.10
T15	27	5168.5	191.43
T16	26	3796.5	146.02
T17	11	460.00	41.818
T18	20	4274.0	213.70

Kruskal-Wallis Statistic KW = 70.799 (corrected for ties)

Tabla 9. Prueba de Comparación Múltiple de Dunn

Dunn's Multiple Comparisons Test

Comparison	Mean Rank Difference	P value
T1 vs. T2	85.902	ns P>0.05
T1 vs. T3	-25.032	ns P>0.05
T1 vs. T4	-11.965	ns P>0.05
T1 vs. T5	104.29	ns P>0.05
T1 vs. T6	18.732	ns P>0.05
T1 vs. T7	41.513	ns P>0.05
T1 vs. T8	141.37	ns P>0.05
T1 vs. T9	68.482	ns P>0.05
T1 vs. T10	16.522	ns P>0.05
T1 vs. T11	9.568	ns P>0.05
T1 vs. T12	57.562	ns P>0.05
T1 vs. T13	42.085	ns P>0.05
T1 vs. T14	38.268	ns P>0.05
T1 vs. T15	67.942	ns P>0.05
T1 vs. T16	113.35	ns P>0.05
T1 vs. T17	217.55	*** P<0.001
T1 vs. T18	45.668	ns P>0.05
T2 vs. T3	-110.93	ns P>0.05
T2 vs. T4	-97.867	ns P>0.05
T2 vs. T5	18.383	ns P>0.05
T2 vs. T6	-67.170	ns P>0.05
T2 vs. T7	-44.389	ns P>0.05
T2 vs. T8	55.467	ns P>0.05
T2 vs. T9	-17.420	ns P>0.05
T2 vs. T10	-69.379	ns P>0.05
T2 vs. T11	-76.333	ns P>0.05
T2 vs. T12	-28.340	ns P>0.05
T2 vs. T13	-43.817	ns P>0.05
T2 vs. T14	-47.633	ns P>0.05
T2 vs. T15	-17.939	ns P>0.05
T2 vs. T16	27.447	ns P>0.05
T2 vs. T17	131.65	ns P>0.05
T2 vs. T18	-40.233	ns P>0.05
T3 vs. T4	13.067	ns P>0.05
T3 vs. T5	129.32	ns P>0.05
T3 vs. T6	43.764	ns P>0.05
T3 vs. T7	66.545	ns P>0.05
T3 vs. T8	166.40	** P<0.01
T3 vs. T9	93.314	ns P>0.05
T3 vs. T10	41.554	ns P>0.05
T3 vs. T11	34.600	ns P>0.05
T3 vs. T12	82.594	ns P>0.05
T3 vs. T13	67.117	ns P>0.05
T3 vs. T14	63.300	ns P>0.05
T3 vs. T15	92.974	ns P>0.05
T3 vs. T16	138.38	** P<0.01

CRECIMIENTO DE RAÍCES

Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 10 . Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA)

The P value is 0.6015, considered not significant.
Variation among column medians is not significantly greater than expected by chance.

The P value is approximate (from chi-square distribution) because at least one column has two or more identical values.

Calculation detail

Group	Number of Points	Sum of Ranks	Mean of Ranks
peatmoss	10	237.50	23.750
Arena:tierra	10	214.50	21.450
Brosa	10	168.00	16.800
Fibra	10	200.00	20.000

Kruskal-Wallis Statistic KW = 1.862 (corrected for ties)

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

COLORACIÓN DE PLANTAS

Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 11. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA)

The P value is 0.2346, considered not significant.
Variation among column medians is not significantly greater than expected by chance.

The P value is approximate (from chi-square distribution) because at least one column has two or more identical values.

Calculation detail

Group	Number of Points	Sum of Ranks	Mean of Ranks
peatmoss	10	166.50	16.650
Arena:tierra	10	194.00	19.400
Brosa	10	249.00	24.900
Fibra	10	210.50	21.050

Kruskal-Wallis Statistic KW = 4.261 (corrected for ties)

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

ANEXO 4. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN

FASE 0: Selección y preparación de la planta madre

FASE 1: Establecimiento de cultivo en condiciones de asepsia



FASE 2: Multiplicación



FASE 3: Enraizamiento



FASE 4: Aclimatación



Evelyn Xiomara Agvik España
Autor

Ing. Agr. Mak Mílan Cruz
Asesor

Lic. Mario Cifuentes
Revisor

Dr. Sergio Melgar
Director de Escuela

Dr. Oscar Cobar Pinto
Decano