

## Efecto de la desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogénico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews<sup>1</sup>

### Disinfection effect of nodal segments from *Vanilla planifolia* Andrews on the morphogenetic response of *in vitro* plants

José Bernal Azofeifa-Bolaños<sup>2</sup>, German Rivera-Coto<sup>3</sup>, Amelia Paniagua-Vásquez<sup>2</sup>, Roberto Cordero-Solórzano<sup>4</sup>, Eduardo Salas-Alvarado<sup>5</sup>

- <sup>1</sup> Recibido: 14 de febrero, 2018. Aceptado: 18 de julio, 2018. Este trabajo formó parte de los resultados de la tesis del primer autor, del Programa de Maestría Académica en Manejo de Recursos Naturales de la Universidad Estatal a Distancia con énfasis en gestión de la Biodiversidad. Montes de Oca, San José, Costa Rica.
- <sup>2</sup> Universidad Nacional (UNA), Instituto de Investigación y Servicios Forestales. Heredia, Costa Rica. [jb12azo@gmail.com](mailto:jb12azo@gmail.com) (<https://orcid.org/0000-0002-8902-0352>); [amelia.paniagua.vasquez@una.cr](mailto:amelia.paniagua.vasquez@una.cr)
- <sup>3</sup> Universidad Nacional (UNA), Escuela de Ciencias Agrarias, Laboratorio de Fitopatología. Heredia, Costa Rica. [sobralias.rivera911@gmail.com](mailto:sobralias.rivera911@gmail.com)
- <sup>4</sup> Universidad Nacional (UNA), Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Ecología Funcional y Ecosistemas Tropicales. Heredia, Costa Rica. [ticolamb@gmail.com](mailto:ticolamb@gmail.com) (<https://orcid.org/0000-0001-7270-104x>).
- <sup>5</sup> Universidad Nacional (UNA), Escuela de Ciencias Agrarias. Heredia, Costa Rica. [glomus123@yahoo.com](mailto:glomus123@yahoo.com)

## Resumen

**Introducción.** El establecimiento aséptico en condiciones de laboratorio de parientes silvestres de *Vanilla planifolia*, no ha sido documentado, así como tampoco se ha evaluado la importancia de la desinfección en el aumento del vigor. **Objetivo.** El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta morfogénica de vitroplantas de *V. planifolia* a la desinfección en invernadero y en laboratorio, durante el establecimiento y multiplicación *in vitro*. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó durante el 2015 y 2016 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. El medio empleado fue el cultivo Murashige y Skoog (MS). Se evaluaron seis tratamientos: 1) alcohol 70%/NaClO 0,35%; 2) kilol/NaClO 0,35%; 3) testigo/NaClO 0,35%; 4) alcohol 70%/HgCl<sub>2</sub> 0,2%; 5) kilol/HgCl<sub>2</sub> 0,2% y 6) testigo/HgCl<sub>2</sub> 0,2%. Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de contaminación total, por bacterias y hongos; longitud, peso y diámetro del brote; número, longitud y peso de las raíces. **Resultados.** Los géneros de bacterias y hongos más dominantes fueron *Pantoea* sp. (33%) y *Fusarium* sp. (12%). El mejor tratamiento de desinfección se obtuvo con el uso de kilol en invernadero y HgCl<sub>2</sub> en laboratorio, donde se logró un 100% de explantes libres de contaminantes. Este mismo tratamiento presentó valores significativamente superiores para la longitud y peso del brote, número y peso de las raíces, durante el establecimiento. En la etapa de multiplicación, la condición aséptica de los grupos experimentales presentó valores significativamente mayores para las variables longitud y peso del brote comparado con la respuesta morfogénica presentada por las vitroplantas verdes y vigorosas en la condición de contaminación. **Conclusión.** La secuencia de tratamientos de desinfección representa la línea base para la optimización de protocolos de cultivo *in vitro* de parientes silvestres de *V. planifolia*, constituye un aporte para la conservación *ex situ* de materiales únicos y sirve para incrementar material genético promisorio.

**Palabras claves:** vainilla, sanidad de la planta, desinfección de bacterias, control de hongos.



## Abstract

**Introduction.** The aseptic establishment in laboratory conditions of wild type *Vanilla planifolia* has not been documented in any sterilization and regeneration protocols, nor has been evaluated the importance of disinfection to enhance the plant vigor. **Objective.** The aim of this experiment was to evaluate the effect of a double disinfection process (greenhouse and laboratory) on the morphogenetic response of nodal segments of vanilla during the establishment and *in vitro* multiplication. **Materials and methods.** Laboratory experiments were conducted during 2015 and 2016 at “Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad Nacional (UNA)”, Heredia, Costa Rica. The culture medium used was Murashige and Skoog (MS). Six treatments were evaluated: 1) alcohol 70%/NaClO 0.35%; 2) kilol/NaClO 0.35%; 3) control/NaClO 0.35%; 4) alcohol 70%/HgCl<sub>2</sub> 0.2%; 5) kilol/HgCl<sub>2</sub> 0.2% and 6) control/HgCl<sub>2</sub> 0.2%. Growth variables evaluated were: percentage of total, bacterial and fungal contamination; length, weight, and diameter of the shoot; number, length and weight of the roots. **Results.** The main genera of bacteria and fungi were *Pantoea* sp. (33%) and *Fusarium* sp. (12%). The best disinfection treatment was obtained with the use of kilol in the nursery and HgCl<sub>2</sub> in the laboratory, where 100% pathogen-free explants were obtained. For this treatment, a significant increase of length and weight of the shoot, number and weight of the roots were achieved during the establishment. In the multiplication stage, the experimental groups in the aseptic condition showed significant higher values for the variables length and weight compared to the morphogenic response obtained for the green and vigorous *in vitro* plants in the condition of contamination. **Conclusion.** The disinfection treatments sequence represents the base line to the optimization of *in vitro* culture protocols of wild type relatives of *V. planifolia*, this constitutes a contribution for the *ex situ* conservation of unique materials and increases promising genetic material.

**Keywords:** vanilla, plant quality, bacteria disinfection, fungus control.

## Introducción

El género *Vanilla* tiene una distribución pantropical y está compuesto por aproximadamente 110 especies (Gigant et al., 2011). De estas, solo *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. × tahitensis* producen vainillina, el compuesto aromatizante y saborizante más popular en el mundo (Havkin-Frenkel y Belanger, 2007; Ranadive, 2011; Anuradha et al., 2013; Maruenda et al., 2013). El 95% de la producción global se obtiene de los frutos fermentados de *V. planifolia*, lo cual la posiciona como la orquídea con mayor importancia económica y la segunda especie más cara, antecedida por el azafrán (Havkin-Frenkel y Belanger, 2007).

En los últimos años, el mercado mundial de la vainilla natural ha experimentado una demanda constante y creciente, ocasionando un cambio en las estrategias de comercialización, y por consiguiente, un reordenamiento de las unidades productoras para suplir con rapidez la poca oferta. Para solventar esta situación deficitaria, es necesario aumentar el área de cultivo y optimizar la siembra, a través de cultivos intensivos. En ambos casos, se requiere la generación rápida y masiva de semilla de calidad, para lo cual es indispensable contar con protocolos que permitan obtener suficientes plantas con características genéticas idóneas (Azofeifa, 2018).

Los bancos de germoplasma o programas de mejoramiento implementan técnicas eficientes para la producción vegetal masiva, inmersos en una estrategia global de manejo y aprovechamiento de los recursos fitogenéticos (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007). La Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) lidera un programa en ese sentido, para lo cual ya se ha establecido un banco de germoplasma (con más de 150 accesiones), se han caracterizado especies recolectadas en diversas partes del país (incluida una especie nueva), y se ha recurrido a la multiplicación de material *in vitro* para reproducir materiales valiosos (Azofeifa-Bolaños et al., 2014; 2017).

Como parte de la estrategia integral para la conservación de vainilla en Costa Rica, es indispensable salvaguardar los recursos genéticos en un banco de germoplasma *in vitro*, con la intención de perpetuar genotipos valiosos de *V. planifolia* y multiplicar de forma masiva dicho material, para su posterior uso en unidades

productivas. Sin embargo, para lograr esto, es necesario optimizar un protocolo de desinfección que garantice la supervivencia de material vegetal de accesiones únicas, escasas o difíciles de establecer de forma vegetativa en invernadero (Azofeifa-Bolaños et al., 2014).

La validez de la asepsia durante la desinfección para el cultivo *in vitro* de plantas tropicales ha sido documentada de forma limitada, a pesar de que esta estrategia es un factor clave para lograr el establecimiento y multiplicación óptima de estas especies (Mng'omba et al., 2012). En el caso de la vainilla, existen diversidad de protocolos de micropropagación donde se mencionan procedimientos de desinfección (Tan et al., 2011a; Zuraida et al., 2013; Mujar et al., 2014). No obstante, la literatura no indica la efectividad de tales procesos, con excepción del trabajo de Abebe et al. (2009), quienes lograron un 90% de explantes libres de contaminación al utilizar 0,1%  $\text{HgCl}_2$ , de los cuales, solo el 60% sobrevivió a la desinfección.

El manejo de los recursos genéticos de vainilla en la UNA, sugiere la necesidad de una estandarización de las desinfecciones, pues el establecimiento aséptico no es fácil. La causa de esto obedece a tres factores: la presencia de los microorganismos endófitos que indica la literatura (Khoiratty et al., 2015), la sobrevivencia de microorganismos fitopatógenos externos y el tipo de estrategia llevada a cabo, cuyo diseño requiere conocer aspectos genéticos y fisiológicos del material (Trigiano y Gray, 2004).

Ante la escasa información metodológica y la importancia del estado sanitario en el trasiego de germoplasma y el desempeño de las plantas de vainilla, el objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta morfogénica de vitroplantas de *V. planifolia* a la desinfección en invernadero y en laboratorio, durante el establecimiento y multiplicación *in vitro*.

## Materiales y métodos

### Fase de establecimiento

Los explantes usados para el establecimiento en laboratorio fueron obtenidos de plantas de *V. planifolia*, correspondientes a la accesión UNA-VAN-00229, del banco de germoplasma de vainilla de la Universidad Nacional (UNA), ubicado en la Finca Experimental Santa Lucía de la Escuela de Ciencias Agrarias, Santa Lucía, Barva, Heredia, Costa Rica (10° 01' 22,188" N — 84° 06' 46,235" W, 1278 msnm). El experimento se realizó durante el 2015 y 2016.

Con la finalidad de seleccionar las mejores soluciones desinfectantes para el establecimiento *in vitro*, se realizó un experimento donde se evaluaron dos condiciones. En invernadero se desinfectó la superficie externa de los segmentos nodales (nudos) y los entrenudos de las plantas de vainilla, con fibras de algodón absorbente estéril, con dos productos: solución de alcohol 70%, kilol (2,5 ml/l) y agua como testigo. En el laboratorio se hizo la desinfección con: hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 0,35% y con cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0,20%. La combinación de ambas condiciones resultó en seis tratamientos: 1) alcohol 70%/ $\text{NaClO}$  0,35%; 2) kilol/ $\text{NaClO}$  0,35%; 3) testigo/ $\text{NaClO}$  0,35%; 4) alcohol 70%/ $\text{HgCl}_2$  0,2%; 5) kilol/ $\text{HgCl}_2$  0,2% y 6) testigo/ $\text{HgCl}_2$  0,2%.

En el invernadero se seleccionaron seis plantas con al menos quince nudos, a las cuales se les realizó el proceso de desinfección una vez por semana, durante cinco semanas consecutivas. Las secciones vegetales desinfectadas se cortaron y trasladaron al laboratorio en bolsas de polipropileno, etiquetadas según el tratamiento de desinfección.

En el laboratorio, los treinta segmentos vegetales de cada tratamiento donde se aplicó la desinfección en invernadero (alcohol, kilol y agua), se colocaron de forma independiente en un frasco de 1000 ml durante una hora con flujo constante de agua. Luego se colocaron en 500 ml de agua con 20 ml de jabón líquido antibacterial, en agitación constante, durante 15 min. El excedente de jabón se eliminó con tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, los explantes se colocaron en frascos de 100 ml con una solución de alcohol 70% por 1 min.

Se procedió a aplicar los dos tratamientos de desinfección en el laboratorio ( $\text{NaClO}$  y  $\text{HgCl}_2$ ) de la siguiente forma: quince explantes de cada tratamiento de desinfección en invernadero se colocaron en una solución de  $\text{NaClO}$  al 0,35%, durante 20 minutos y en agitación constante. Los otros quince nudos se colocaron en una solución con  $\text{HgCl}_2$  al 0,2% por 15 minutos, también en agitación constante. En todos los casos, se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar, previo al establecimiento en el medio de cultivo.

Se utilizó un diseño completamente al azar con quince repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió de un nudo que en promedio presentó una longitud de 4,48 cm, un peso de 1,07 g y un diámetro de 0,51 cm. En total se utilizaron noventa nudos de vainilla. Los nudos se sembraron en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100%, complementado con 30,00 g de sacarosa (3% p/v) y 2,70 g/l de agente gelificante (Phytigel®).

El pH de la solución del medio de cultivo se ajustó a 5,70 antes de su esterilización. Se utilizaron frascos cilíndricos de vidrio con un diámetro de 4,00 cm, una altura de 13,00 cm y con un volumen de 163,36 ml, en los cuales se dispensaron 20,00 ml del medio de cultivo. La esterilización del medio se realizó a una presión de 1,03  $\text{kg/cm}^2$  y 121°C, durante 25 min.

Para propiciar el crecimiento de los explantes, los cultivos se colocaron en un cuarto de crecimiento a 28 °C, 30  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  de intensidad lumínica y un fotoperiodo de 16 h, durante dos meses. Se evaluó el porcentaje de contaminación total, fúngica y bacteriana; longitud, peso y diámetro de los brotes nuevos; longitud, peso y número de las raíces adventicias por planta y vigorosidad. Para la obtención de los valores de peso, cada unidad experimental se colocó sobre una balanza electrónica, mientras que, para la medición del diámetro y las longitudes, primero se colocó una regla métrica de 50 cm junto a las unidades experimentales y luego se tomaron fotografías en formato JPG, las cuales fueron etiquetadas y almacenadas en un ordenador. Los valores absolutos se obtuvieron con el analizador de imágenes ImageJ (Schneider et al., 2012).

Se analizó la proporción de explantes contaminados mediante una regresión logística, debido a que esta es una variable del tipo binomial. A las otras variables de crecimiento de los explantes (longitud, peso y diámetro de los brotes nuevos; longitud, peso y número de raíces) se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA), por ser variables del tipo normal.

En todos los casos el modelo consideró dos factores: desinfección en invernadero y desinfección en laboratorio, y su interacción. Cuando se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de un factor, se efectuó la separación de las medias de mínimos cuadrados mediante la prueba DMS protegida (“protected LSD” en inglés). El primer análisis se hizo con el Proc Genmod y el segundo con el Proc GLM, ambos del paquete estadístico SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Cuando la interacción entre factores resultó significativa se representó mediante una figura gráfica. Los porcentajes de contaminación total, por hongos y bacterias, se obtuvieron mediante tablas de frecuencias.

Al finalizar el periodo de evaluación y bajo condiciones asépticas, los brotes vivos y verdes emergidos de los nudos sometidos al proceso de desinfección, se cortaron y separaron para la fase de multiplicación.

## Fase de multiplicación

Para evaluar el efecto de la desinfección sobre la capacidad de multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales obtenidos de la fase anterior, el modelo consideró tres factores: desinfección en invernadero, desinfección en laboratorio y contaminación (explantes provenientes de brotes limpios originados de estacas asociadas con contaminación y asépticas). La combinación de los tres factores resultó en doce tratamientos. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 82 repeticiones para el tratamiento asociado con contaminación y 164 repeticiones para el tratamiento aséptico. La unidad experimental consistió de un segmento nodal de aproximadamente 2,00 cm. En total se utilizaron 246 nudos. Los brotes se cultivaron bajo las mismas condiciones

de crecimiento anteriormente descritas, excepto en las dimensiones de los frascos cilíndricos de crecimiento: 2,50 cm de diámetro, 15,00 cm de altura y una capacidad de 73,63 ml. Tres meses después de la siembra, se evaluó la longitud y peso del brote. La obtención de los valores de peso y longitud se realizó de la misma forma que durante el establecimiento.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA). Cuando se obtuvo diferencias significativas entre los niveles de un factor, se efectuó la separación de las medias de mínimos cuadrados mediante la prueba DMS protegida (“protected LSD” en inglés). El análisis se realizó con el Proc GLM del paquete estadístico SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Cuando la interacción entre factores resultó significativa se representó mediante una figura gráfica.

Las estacas infectadas con hongos fueron desechadas, pues en la mayoría de los aislamientos, ocasionaron la muerte de las plántulas *in vitro*, mientras que las contaminadas con bacterias se desinfectaron y subcultivaron para aumentar la cantidad de plantas para ensayos subsecuentes.

### **Ensayo fitopatológico**

Una vez evaluado y extraído el explante, los frascos con el medio de crecimiento que presentaron contaminación asociada a los segmentos nodales, se sellaron y trasladaron al Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la UNA para su respectiva identificación.

Las muestras de medio MS con presencia de contaminación se subcultivaron en el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), contenido en placas de petri de 9,00 cm de diámetro y complementado con dos gotas de ácido láctico (25%) para estimular el crecimiento de los hongos y evitar la proliferación de bacterias. Cada muestra se cultivó por duplicado, para incubarlas en la oscuridad y a temperatura ambiente.

A partir del cuarto día de incubación, las placas de petri se observaron diariamente en busca de estructuras morfológicas para la identificación taxonómica de hongos. Las bacterias contaminantes se purificaron en el medio PDA sin acidificar, mediante un estriado sobre el medio endurecido. La caracterización de las colonias de bacterias se realizó con base en los siguientes criterios: forma, color, elevación, olor y consistencia sobre los medios PDA, YDC (extracto de levadura, dextrosa y carbonato de calcio) y KB (B de King). La morfología se determinó por observación al microscopio de un frotis sometido a la tinción de Gram (Bartholomew y Mittwer, 1952). Las propiedades fisiológicas y bioquímicas se analizaron mediante la aplicación de las pruebas de crecimiento anaeróbico en medio líquido PD (papa-dextrosa), actividad pectolítica en papa y crecimiento a 37 y 40 °C (Schaad et al., 2001).

### **Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Con el objetivo de garantizar la calidad fitosanitaria del establecimiento *in vitro* de las plantas silvestres de *V. planifolia*, se tomaron diez muestras de hojas de las plantas utilizadas en los tratamientos de desinfección en invernadero para realizar la prueba serológica conocida como ELISA, para los siguientes virus: potexvirus del mosaico del Cymbidium (CymMV), tobamovirus de la mancha anillada del Odontoglossum (ORSV), cucumovirus del mosaico del pepino (CMV) y potyvirus (Poty). Para cada muestra, se evaluó por duplicado el ensayo de captura de anticuerpos monoclonales conocido como inmunoensayo de triple anticuerpo (TAS-ELISA), con el propósito de detectar tempranamente los antígenos específicos para cada virus. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (CIBCM-UCR).

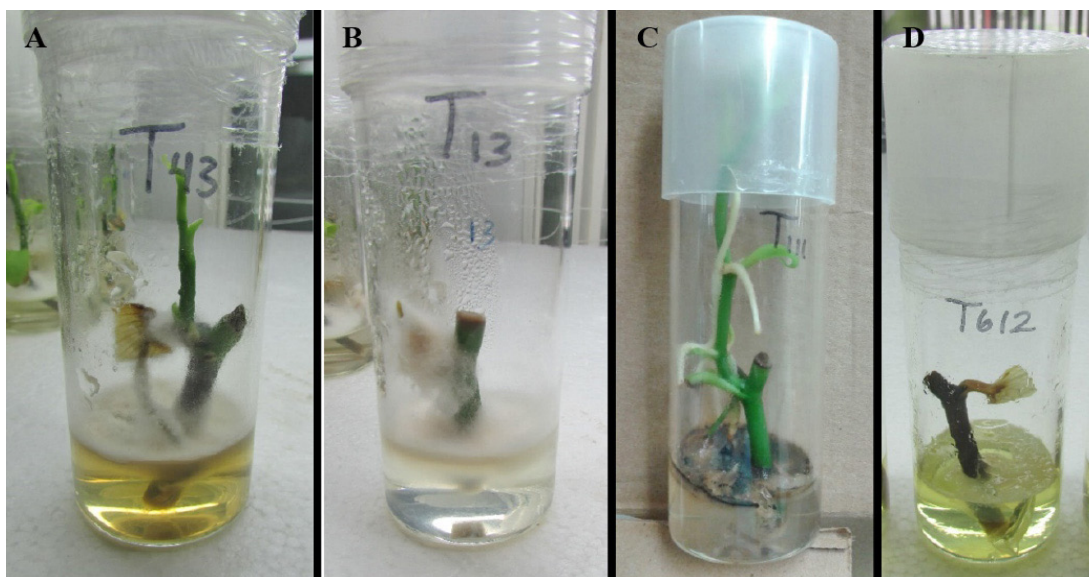


## Resultados

El procedimiento implementado para reducir la carga patogénica de los segmentos nodales durante el establecimiento, no controló algunos géneros comunes de bacterias y hongos, que persistieron luego del proceso de desinfección. Del total de aislamientos bacterianos encontrados, los géneros predominantes fueron *Pantoea* (64%), seguido de *Erwinia* (26%), *Acidovorax* (4%), *Pseudomonas* (4%) y *Xanthomonas* (2%). La predominancia de *Pantoea* en los medios de cultivo no afectó el crecimiento de la planta en forma cualitativa, pues todas las que presentaron contaminación, crecieron verdes, vigorosas y sin lesiones necróticas. La especie identificada que predominó fue *P. citrea* y constituye la primera vez que se informa sobre la presencia de la especie en vainilla. Sin embargo, para garantizar la fidelidad genética de los aislados, se necesitan estudios futuros de biología molecular.

Para los efectos de este experimento no fue posible establecer una asociación patogénica de *Erwinia* con vainilla. De la misma forma, en las colonias del género *Acidovorax* que persistieron después de la desinfección, no fue posible determinar la especie, así como tampoco su efecto patógeno con vainilla. Por su parte, solo dos aislados de *Pseudomonas fluorescens* resistieron la desinfección y no mostraron evidencia de afectar los explantes.

En los aislamientos fúngicos, el más frecuente fue *Fusarium oxysporum* (28%), seguido de hongos con micelio estéril, *F. solani*, *F. semitectum*, *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp. y *Cladosporium* sp. La supervivencia de *F. oxysporum* y *F. solani* en el experimento, ocasionó la muerte de las plántulas *in vitro*, motivo por el cual, la presencia de estas especies se consideró nociva. De forma opuesta, la persistencia en los aislamientos de *Phoma* sp. no causó lesiones a la planta, a pesar de ser evidente su manifestación (Figura 1).



**Figura 1.** Contaminación asociada a segmentos nodales de *V. planifolia* luego del proceso de doble desinfección durante el establecimiento en laboratorio. (A) *F. oxysporum*, (B) *F. solani*, (C) *Phoma* sp. y (D) *Erwinia* sp. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015.

**Figure 1.** Microorganism contamination associated to nodal segments of *V. planifolia* after a double-disinfection process during the establishment in laboratory. (A) *F. oxysporum*, (B) *F. solani*, (C) *Phoma* sp. y (D) *Erwinia* sp. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015.

No hubo diferencias significativas en la interacción entre los factores (desinfección en invernadero por desinfección en laboratorio) para las variables contaminación por bacterias ( $\chi^2=5,85$ ;  $n=90$ ;  $p=0,0538$ ) y debida a hongos ( $\chi^2=2,17$ ;  $n=90$ ;  $p=0,3375$ ). Sin embargo, la contaminación total (ocasionada por cualquier microorganismo) resultó con diferencias significativas ( $\chi^2=6,68$ ;  $n=90$ ;  $p=0,0354$ ) en la interacción entre los factores.

La contaminación bacteriana fue mayor que la fungosa. Independientemente de la solución desinfectante utilizada en el laboratorio, el kilol resultó la solución desinfectante aplicada en el invernadero con la menor contaminación (total, bacterias y hongos) durante el establecimiento de los explantes en el laboratorio. El kilol redujo 2,9, 3,3 y 2,6 veces la contaminación total, por bacterias y por hongos respecto al alcohol y 2,5, 2,4 y 2,3 veces la contaminación de estos grupos de microorganismos respecto al testigo. El efecto del alcohol sobre el desarrollo de microorganismos fue similar ( $p>0,05$ ) al testigo en el invernadero.

Independientemente del desinfectante usado en el invernadero, la solución desinfectante utilizada en el laboratorio que redujo en mayor grado la contaminación por microorganismos fue  $\text{HgCl}_2$  respecto a  $\text{NaClO}$  ( $p\leq 0,0093$ ). Las reducciones fueron 1,8, 1,8 y 2,6 veces la contaminación total, por bacterias y hongos.

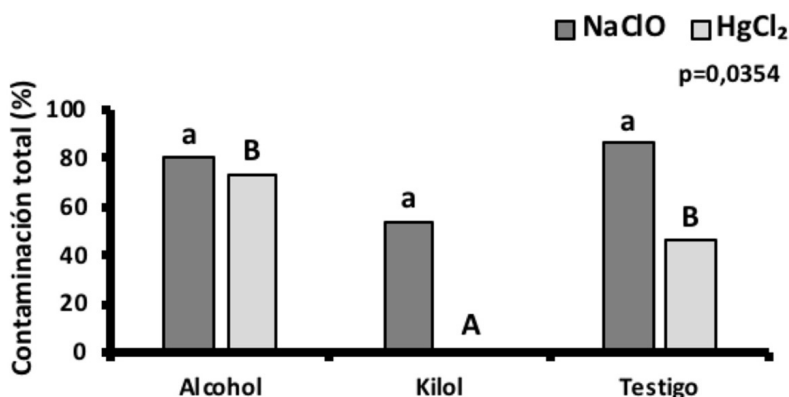
Para contaminación total no hubo diferencias significativas ( $p\geq 0,0586$ ) entre los desinfectantes usados en invernadero seguido por la desinfección con  $\text{NaClO}$  en el laboratorio. Por el contrario, cuando el desinfectante en el laboratorio fue el  $\text{HgCl}_2$ , posterior a la desinfección en invernadero, se presentaron diferencias entre el kilol respecto al alcohol y el testigo ( $p<0,0001$ ), mientras que entre estos dos últimos tratamientos no hubo diferencias ( $p=0,1422$ ).

Los explantes obtenidos de material vegetal previamente desinfectado con alcohol en el invernadero, presentaron una menor contaminación total que alcanzó solo 8% ( $p=0,6668$ ) con el uso del  $\text{HgCl}_2$ , respecto al  $\text{NaClO}$ . Por el contrario, los explantes que provenían de material vegetal desinfectados con kilol en el invernadero, presentaron una reducción del 100% en contaminación total ( $p<0,0001$ ) cuando se utilizó  $\text{HgCl}_2$  en vez de  $\text{NaClO}$  como desinfectantes en el laboratorio. La combinación kilol y  $\text{HgCl}_2$  fue altamente efectiva, pues evitó por completo la contaminación por cualquier microorganismo. Los explantes provenientes de material vegetal de invernadero sin desinfectante (testigo), redujeron su contaminación en un 46% ( $p=0,0291$ ) al emplear  $\text{HgCl}_2$  en el laboratorio respecto a  $\text{NaClO}$ . La eficacia del  $\text{HgCl}_2$  para reducir la contaminación total en el laboratorio después de usar kilol y su poca eficacia después de usar alcohol y agua en el invernadero, explica la interacción significativa entre factores ( $\chi^2=6,68$ ;  $n=90$ ;  $p=0,0354$ ) (Figura 2).

En cuanto al desarrollo de los explantes, tanto el diámetro del brote como la longitud de raíces presentaron diferencias entre los tratamientos de desinfección en invernadero y entre desinfectantes utilizados en el laboratorio, las otras variables no presentaron diferencias significativas excepto el peso de raíces para el factor invernadero (Cuadros 1 y 2). El diámetro del brote presentó una diferencia de 7 a 11% mayor cuando provenía de material vegetal de invernadero desinfectado con alcohol o kilol respecto al testigo (Cuadro 1). Los explantes desinfectados en el laboratorio con  $\text{NaClO}$  presentaron mayor diámetro que con  $\text{HgCl}_2$  (Cuadro 2).

La longitud de las raíces fue de 29 a 33% mayor cuando provenía de material vegetal de invernadero con los tratamientos testigo o kilol, al compararse con el alcohol. Los explantes desinfectados en laboratorio con  $\text{HgCl}_2$  presentaron una longitud de las raíces 21% mayor, en contraste con la desinfección con  $\text{NaClO}$  (Cuadro 2). El peso de las raíces fue de 40 a 45% mayor cuando el material vegetal provenía de invernadero sometido a los tratamientos testigo o kilol respecto al alcohol (Cuadro 1).

Para el efecto correspondiente a la interacción entre factores, se presentaron diferencias significativas en las variables largo del brote ( $F=4,43$ ;  $n=90$ ), peso del brote ( $F=4,68$ ;  $n=90$ ), número de raíces ( $F=4,02$ ;  $n=90$ ) y peso de raíces ( $F=3,33$ ;  $n=90$ ) (Figura 3). Los valores más altos de estas cuatro variables se obtuvieron con la combinación kilol- $\text{HgCl}_2$ , y las mayores diferencias se presentaron entre la combinación kilol- $\text{HgCl}_2$  respecto a kilol- $\text{NaClO}$  (Figura 3). Por su parte, las interacciones para las variables diámetro del brote ( $F=0,22$ ;  $n=90$ ;  $p=0,8019$ ) y longitud de las raíces ( $F=2,01$ ;  $n=90$ ;  $p=0,1433$ ) no fueron significativas.



**Figura 2.** Porcentaje de contaminación total (n=15) de explantes de plantas silvestres de *V. planifolia*, según tratamiento de desinfección en invernadero (alcohol, kilol, testigo) y desinfección en laboratorio (NaClO y HgCl<sub>2</sub>). Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015. Letras minúsculas iguales sobre las barras pertenecientes a NaClO significan que no hubo diferencias (p>0,05), mientras letras mayúsculas diferentes sobre las barras con HgCl<sub>2</sub> significan que hubo diferencias entre tratamientos de desinfección en invernadero (p<0,05), según el método de medias de mínimos cuadrados. Valor *p* asociado a la interacción entre los factores desinfección en invernadero y desinfección en laboratorio del ANDEVA.

**Figure 2.** Percentage of total contamination (n=15) in explants of *V. planifolia* according to the greenhouse disinfection (alcohol, kilol, control) and laboratory (NaClO y HgCl<sub>2</sub>) treatments. Greenhouse of the Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015. Same lowercase letters above NaClO dark bars denote non-significant (P>0.05) differences, while different capital letters above HgCl<sub>2</sub> light bars denote significant (P<0.05) differences among greenhouse treatments, according to least squares means procedures. ANOVA *p*-values associated to the interaction between factors.

**Cuadro 1.** Medias de algunas variables de crecimiento ( $\pm$  error estándar) de los brotes emergentes de *V. planifolia* durante el establecimiento *in vitro* según el tratamiento de desinfección en invernadero. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015.

**Table 1.** Mean number of some growth parameters ( $\pm$  standard error) from emerging *V. planifolia* shoots during the *in vitro* establishment according to the greenhouse disinfection treatment. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015.

Tratamiento	Brote			Raíces		
	Longitud (cm)	Peso (g)	Diámetro (cm)	Número	Longitud (cm)	Peso (g)
Kilol (n=30)	8,64(0,63)	1,99(0,15)	0,31(0,01)a	4,14(0,32)	5,05(0,46)a	0,11(0,01)a
Alcohol (n=30)	9,05(0,64)	1,56(0,16)	0,30(0,01)a	4,44(0,32)	3,40(0,46)b	0,06(0,01)b
Testigo (n=30)	8,74(0,60)	1,67(0,15)	0,28(0,01)b	4,51(0,30)	4,78(0,43)a	0,10(0,01)a
	<i>F</i> * ( <i>p</i> )**	<i>F</i> ( <i>p</i> )	<i>F</i> ( <i>p</i> )	<i>F</i> ( <i>p</i> )	<i>F</i> ( <i>p</i> )	<i>F</i> ( <i>p</i> )
	0,11(0,8953)	2,18(0,1215)	3,81( <b>0,0279</b> )	0,38(0,6867)	3,57( <b>0,0343</b> )	4,43( <b>0,0161</b> )

\*Estadístico F. \*\*Probabilidad asociada al ANDEVA, en negrita los valores significativos. Tratamientos cuyas medias tienen letras iguales en una misma columna no difieren (p>0,05) según el método de medias de mínimos cuadrados / \*F statistic. \*\* ANOVA *p*-values. Significant values are shown in bold. Same letters in the same column denote non-significant differences among treatments (p>0.05), according to least squares means procedures.

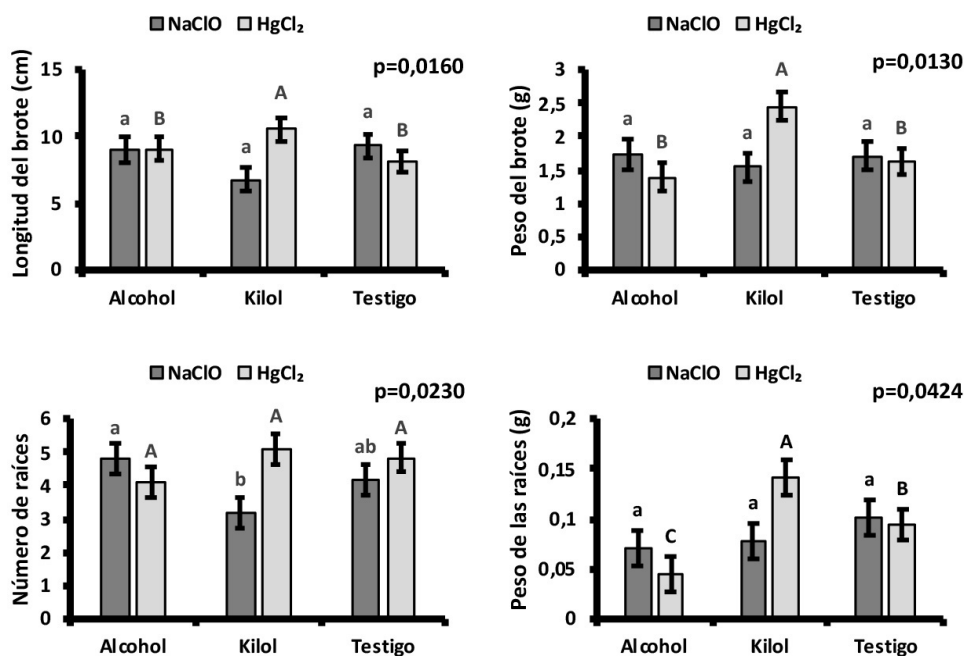


**Cuadro 2.** Medias de algunas variables de crecimiento ( $\pm$  error estándar) de los brotes emergentes de *V. planifolia* durante el establecimiento *in vitro* según el tratamiento de desinfección en laboratorio. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015.

**Table 2.** Mean number of some growth parameters ( $\pm$  standard error) from emerging *V. planifolia* shoots during the *in vitro* establishment according to the laboratory disinfection treatment. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015.

Tratamiento	Brote			Raíces		
	Longitud (cm)	Peso (g)	Diámetro (cm)	Número	Longitud (cm)	Peso (g)
NaClO (n=45)	8,36(0,52)	1,66(0,13)	0,31(0,01)a	4,06(0,27)	3,86(0,38)b	0,08(0,01)
HgCl <sub>2</sub> (n=45)	9,26(0,50)	1,82(0,12)	0,28(0,01)b	4,68(0,25)	4,90(0,36)a	0,09(0,01)
	<i>F</i> * ( <i>p</i> )**	<i>F</i> ( <i>p</i> )	<i>F</i> ( <i>p</i> )	<i>F</i> ( <i>p</i> )	<i>F</i> ( <i>p</i> )	<i>F</i> ( <i>p</i> )
	1,53(0,2203)	0,87(0,3546)	7,69( <b>0,0074</b> )	2,81(0,0988)	4,03( <b>0,0493</b> )	0,56(0,4553)

\*Estadístico F. \*\*Probabilidad asociada al ANDEVA, en negrita los valores significativos. Tratamientos cuyas medias tienen letras iguales en una misma columna no difieren ( $p > 0,05$ ) según el método de medias de mínimos cuadrados / \*F statistic. \*\* ANOVA p-values. Significant values are shown in bold. Same letters in the same column denote non-significant differences among treatments ( $p > 0,05$ ), according to least squares means procedures.



**Figura 3.** Respuesta morfogenética de algunas variables de crecimiento de plantas silvestres de *V. planifolia*, según la combinación de tratamientos de desinfección en invernadero (alcohol, kilol, testigo) y desinfección en laboratorio (NaClO, HgCl<sub>2</sub>). Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015.

Letras minúsculas iguales sobre las barras pertenecientes a NaClO significan que no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ), mientras letras mayúsculas diferentes sobre las barras con HgCl<sub>2</sub> significan que hubo diferencias entre tratamientos de desinfección en invernadero ( $p < 0,05$ ), según el método de medias de mínimos cuadrados. Probabilidad (valor *p*) asociada a la interacción entre factores del ANDEVA.

**Figure 3.** Morphogenetic responses of some growth parameters of wild *V. planifolia* plants according to the greenhouse disinfection (alcohol, kilol, control) and laboratory (NaClO, HgCl<sub>2</sub>) treatments combinations. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2015.

Same lowercase letters above NaClO dark bars denote non-significant ( $p > 0,05$ ) differences, while different capital letters above HgCl<sub>2</sub> light bars denote significant ( $p < 0,05$ ) differences among greenhouse treatments, according to least squares means procedures. ANOVA p-values associated to the interaction between factors.

La combinación kilol-HgCl<sub>2</sub> obtuvo un incremento de un 36% para la variable longitud del brote en comparación con la combinación kilol-NaClO (p=0,040), pero con el resto de combinaciones, el aumento no fue significativo.

Por su parte, el tratamiento combinado kilol-HgCl<sub>2</sub> registró un aumento del 43% en el peso del brote en comparación con la secuencia alcohol-HgCl<sub>2</sub> (p=0,014), y del 38% respecto a la combinación kilol-NaClO (p=0,040). En ninguno de los tratamientos restantes las diferencias fueron significativas.

Para el caso de la variable número de raíces, la combinación kilol-HgCl<sub>2</sub> obtuvo un 37% más raíces que kilol-NaClO, aunque no hubo diferencia significativa con respecto a alcohol o agua.

La interacción entre tratamientos no fue significativa para la longitud radical, sin embargo, la mejor combinación indicada de forma previa, incrementó hasta un 47% más el tamaño de las raíces en comparación con el tratamiento alcohol-HgCl<sub>2</sub>.

Para la variable peso de las raíces, kilol-HgCl<sub>2</sub> presentó un 71% de aumento con relación a alcohol-HgCl<sub>2</sub> (p=0,004). En el resto de las combinaciones no hubo diferencias significativas.

En lo que se refiere al desarrollo de los explantes en el ensayo de multiplicación, se obtuvo diversas respuestas en el análisis de los factores Condición (Cond), Invernadero (Inv), Laboratorio (Lab) y las respectivas interacciones.

Las variables peso y longitud del brote presentaron diferencias significativas para el factor condición, las otras variables no presentaron diferencias significativas, excepto la variable longitud del brote para los factores Inv y la interacción Cond\*Inv\*Lab (Cuadro 3, Figura 4).

**Cuadro 3.** Resultados del ANDEVA de tres vías de los efectos de una desinfección de doble fase en invernadero y laboratorio sobre la respuesta de crecimiento de las variables peso y longitud del brote de *V. planifolia* durante la multiplicación *in vitro*. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2016.

**Table 3.** Three-way ANOVA results of a double-disinfection process in greenhouse and laboratory on the growth response of the variables weight and length of *V. planifolia* shoots during the *in vitro* multiplication. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2016.

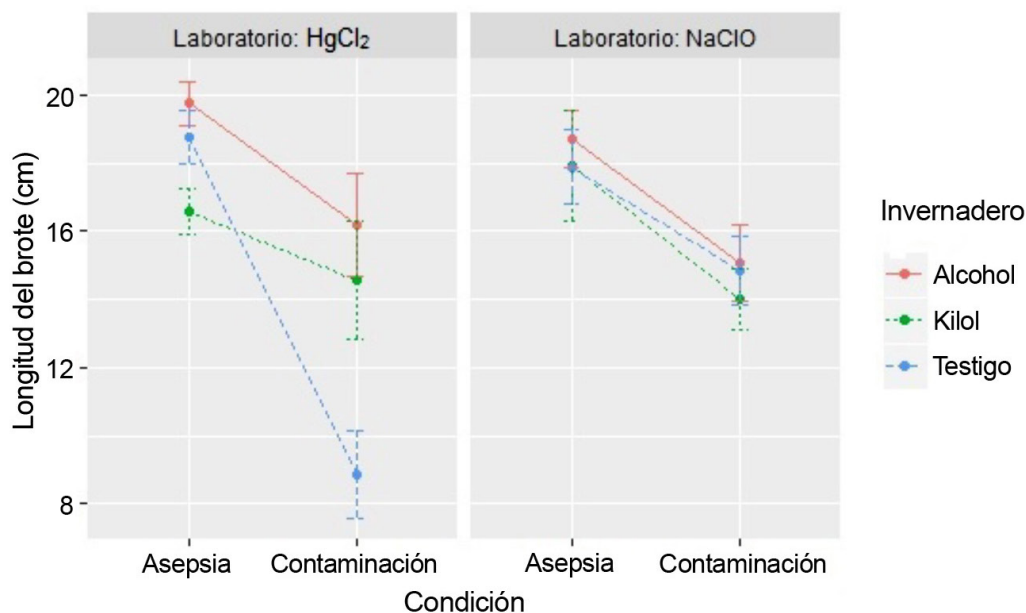
Fuente de variación	Peso			Longitud		
	gl*	F**	p***	Gl	F	P
Condición	1	42,34	<b>&lt;,0001</b>	1	22,63	<b>&lt;,0001</b>
Invernadero	2	4,97	<b>0,0077</b>	2	2,73	0,0673
Condición x invernadero	2	2,75	0,066	2	0,94	0,3922
Laboratorio	1	0,89	0,3468	1	0,15	0,6953
Condición x laboratorio	1	1,51	0,2209	1	2,54	0,1123
Invernadero x laboratorio	2	2,9	0,0568	2	0,27	0,7607
Condición x invernadero x laboratorio	2	4,17	<b>0,0167</b>	2	1,65	0,1947

\*gl=grados de libertad. \*\*Estadístico F. \*\*\*Probabilidad asociada al ANDEVA, en negrita los valores significativos (p<0,05). n=246 / \*df=degrees of freedom. \*\*F statistic. \*\*\* ANOVA p-values. Significant values are shown in bold (p<0.05). n=246.

Los brotes sanos obtenidos donde no se presentó contaminación (Asp) durante el establecimiento, fueron 24% más pesados y largos comparados con los brotes sanos obtenidos donde hubo contaminación (Cont) (p≤,0001).

En invernadero, la longitud promedio del material vegetal desinfectado con alcohol fue 9 y 13% mayor respecto al kilol y al testigo, respectivamente (p=0,0077).

La longitud del brote presentó interacción significativa entre los tres factores (p=0,0167). Los valores más altos se obtuvieron a partir de los explantes desarrollados en la condición Asp durante el establecimiento (Figura



**Figura 4.** Longitud del brote de *V. planifolia* según el tratamiento de desinfección en invernadero, en cada nivel de desinfección en laboratorio y de acuerdo a la condición del material (triple interacción entre factores) durante la multiplicación *in vitro*. Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2016.

**Figure 4.** Shoot length of *V. planifolia* during the *in vitro* multiplication according to the greenhouse disinfection treatment, at each laboratory disinfection level and according to the provenance of the plant material (triple disinfection between factors). Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2016.

4). La mayor diferencia (55%) se presentó entre la combinación alcohol-HgCl<sub>2</sub> de esta condición, respecto a la combinación testigo-HgCl<sub>2</sub> de los brotes sanos obtenidos donde hubo contaminación (Cont) ( $p \leq 0,0001$ ). Además, cuando la comparación se realizó entre los tratamientos de desinfección de invernadero (kilol, alcohol, testigo) con la desinfección con NaClO en laboratorio de la condición Cont, la mejor combinación del experimento presentó un incremento de al menos 24% ( $p=0,001$ ). Para los brotes sanos obtenidos donde no presentó contaminación (Asp), no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, excepto para alcohol-HgCl<sub>2</sub>, la cual presentó 16% más longitud en comparación con kilol-HgCl<sub>2</sub> ( $p=0,035$ ).

## Discusión

Ante el desafío de lograr plántulas *in vitro* libres de contaminación y con un desempeño morfológico adecuado para la producción comercial, la desinfección efectuada en invernadero y en laboratorio fue efectiva. Para el logro de ese objetivo se tomaron en consideración aspectos inherentes al explante y fisiológicos del material donante, considerados como fundamentales para la selección del diseño experimental en ensayos generales de cultivo *in vitro* (Trigiano y Gray, 2004); entre ellos, se verificó con exactitud la fidelidad genética de la población (Azofeifa-Bolaños et al., 2017), se incrementó el material en invernadero (ambiente protegido) para aumentar el crecimiento activo de los brotes y disminuir la carga microbiana de las plantas silvestres expuestas a la lluvia y al polvo (George et al., 2008), se utilizó un tamaño de explante inicial diferente a lo indicado en la literatura que

propició un adecuado crecimiento, tanto en invernadero como en laboratorio, y se realizó un preacondicionamiento (desinfección) en invernadero en la época más seca del año. Este último procedimiento es fundamental en las plantas que viven en asociación con hongos endófitos (Mng'omba et al., 2012), como es el caso de *V. planifolia* (Khojratty et al., 2015).

En lo que concierne a la presencia de bacterias del género *Pantoea*, posterior al proceso de desinfección, está ampliamente documentada la acción fitopatogénica de algunos de sus miembros (Walterson y Stavrinides, 2015). No obstante, los resultados demostraron que su presencia no limitó las respuestas morfogénicas. De forma similar, Luna-Guevara et al. (2016) determinaron la frecuencia de aislamiento de esta bacteria en frutos verdes y beneficiados, sin daño físico ni crecimiento microbiológico aparente, lo cual sugiere que en vainilla, *Pantoea* sp., es un microorganismo endófito.

En relación con los géneros *Erwinia* y *Acidovorax*, la mayoría de sus miembros son considerados fitopatógenos (Fegan, 2006; Kado, 2006), y su permanencia luego del proceso de desinfección podría considerarse un aspecto negativo, sin embargo, no fue posible establecer una asociación patogénica con vainilla. Esta condición la presentan algunas especies que se encuentran con frecuencia en el suelo, agua y como endófitas, las cuales son incapaces de ejercer acción patogénica en plantas (Fegan, 2006).

Acerca de la presencia de *P. fluorescens*, es importante señalar que algunas cepas han obtenido buenos resultados para el combate biológico de *F. oxysporum* en vainilla en campo (Radjaccomare et al., 2010), mientras que, otras muestran una fuerte actividad antagonista *in vitro* (Gangadara et al., 2010), sin embargo, en la presente investigación, no se determinó la posible acción antagonista de esta bacteria.

En lo que se refiere a la presencia de *Fusarium* spp., los resultados concuerdan con los publicados por Pinaria et al. (2010), quienes hallaron *F. oxysporum* en un 55,72% del total de los aislamientos, seguido de *F. solani* (25,65%) y *F. semitectum* (11,07%).

Aunque *F. oxysporum* se ha identificado como un endófito en vainilla, la forma especial *vanillae* es el agente causal de la pudrición del tallo y la raíz en *V. planifolia* en todas las áreas productoras, mientras que *F. solani* se considera como patógeno secundario (Koyyappurath et al., 2016). Por otro lado, *F. semitectum* está asociado a diversas enfermedades en varios cultivos, pero en vainilla, es considerado un endófito o un colonizador saprofito del tallo con una capacidad de establecerse en las partes aéreas de las plantas como un invasor secundario (Pinaria et al., 2010).

El hongo *Phoma* sp., es reconocido como fitopatógeno, pero en pruebas de patogenicidad en vainilla no indujo lesiones necróticas en los tallos (Santa-Cardona et al., 2012), por lo cual, se considera un hongo endófito (Ordóñez et al., 2012).

Los resultados obtenidos permiten sugerir que el  $HgCl_2$  fue más efectivo como desinfectante que el  $NaClO$ , tanto de manera independiente como combinada con un previo tratamiento de desinfección en invernadero. Con respecto a este desempeño, se confirmó por qué el cloruro de mercurio es el agente más utilizado en los protocolos de cultivo *in vitro* de vainilla en laboratorios de todo el mundo (Geetha y Shetty, 2000; Kalimuthu et al., 2006; Janarthanam y Seshadri, 2008; Divakaran y Babu, 2009; Tan et al., 2011b; Renuga y Saravana-Kumar, 2014).

La efectividad del proceso de doble desinfección concuerda con los resultados de Mng'omba et al. (2012), quienes determinaron que la aplicación de fungicidas a las plantas madres contribuyeron de forma significativa a las condiciones asépticas de los cultivos *in vitro*. Además, los mismos autores afirmaron que una fase previa de desinfección en invernadero, puede disminuir la necesidad de usar desinfectantes más fuertes en laboratorio como el  $HgCl_2$ . Los resultados de este experimento, concordaron de forma parcial con los investigadores antes mencionados, pues el proceso de desinfección en invernadero con kilol logró disminuir la contaminación en laboratorio tanto con el uso de  $NaClO$  como  $HgCl_2$ ; aún así, la efectividad de los tratamientos restantes fue menor, lo cual indica la necesidad de mejorar el establecimiento con agentes esterilizadores para el material vegetal e inoocuos para el explante, el ser humano y el ambiente. Sin embargo, ante la falta de metodologías efectivas para el cultivo aséptico en laboratorio y para el establecimiento formal de ensayos, en vainilla o algunas especies leñosas

con endófitos, el  $\text{HgCl}_2$  continúa siendo la mejor opción.

El uso de alcohol como método preventivo en invernadero, no fue efectivo para disminuir la contaminación, incluso en presencia de  $\text{HgCl}_2$ , lo cual podría explicarse, al menos de forma parcial, por la cutícula, cuya estructura está compuesta por polímeros lipofílicos (cutina y ceras), que dentro de sus funciones está prevenir a la planta del déficit hídrico y proveer una barrera muy efectiva contra la entrada de patógenos (Reina-Pinto y Yephremov, 2009). Por lo tanto, si hay ruptura de la composición de la cutícula por la acción de solventes orgánicos como el alcohol, se elimina una de las barreras naturales al contacto con los patógenos (Tafolla-Arellano et al., 2013).

Aunque el  $\text{HgCl}_2$  es un antiséptico de amplio espectro, su uso debe ser analizado con anterioridad al establecimiento *in vitro* de cada cultivo, pues su efectividad puede ser menor si no se aplica un procedimiento de desinfección previo en invernadero. Por ejemplo, el uso de este compuesto durante el proceso de desinfección de la especie *Uapaca kirkiana* (Phyllanthaceae), fue menos eficiente cuando se utilizaron explantes de especímenes colectados directamente del campo (Mng'omba et al., 2007).

En Costa Rica los protocolos de desinfección clásicos que utilizan diversas concentraciones de hipoclorito de calcio [ $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ],  $\text{NaClO}$ , alcohol y otros, no han logrado la asepsia adecuada para el establecimiento *in vitro* de vainilla (Araya et al., 2014), lo cual implica una pérdida constante de material genético promisorio que compromete la supervivencia de las plantas, muchas de las cuales son escasas y únicas.

Los resultados de este trabajo en cuanto a la respuesta morfogénica de la longitud del brote, en ausencia de reguladores de crecimiento, fueron muy superiores a los indicados en algunos procedimientos de otros autores (Giridhar y Ravishankar, 2004; Tan et al., 2011b; Zuraida et al., 2013). El promedio logrado ( $10,54 \pm 0,89$  cm) no se ha obtenido en protocolos con periodos de evaluación de sesenta días, aún con el uso de reguladores de crecimiento. Al respecto, se han obtenido valores de  $4,20 \pm 0,14$  cm al utilizar un medio MS complementado con 1 mg/l BAP (Tan et al., 2011b),  $3,8 \pm 0,2$  cm en un medio MS complementado con 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l ANA (Tan et al., 2011a) y  $2,9 \pm 0,19$  cm en un medio MS complementado con 5 mg/l BAP + 1 mg/l AFA (ácido fenilacético) (Giridhar et al., 2003). Otros protocolos similares con un periodo de evaluación de 45 días originaron valores de  $4,5 \pm 0,14$  cm (Zuraida et al., 2013),  $2,6 \pm 0,1$  cm (Giridhar y Ravishankar, 2004) y  $3,81 \pm 0,33$  cm (Giridhar et al., 2001).

En lo que respecta al desarrollo morfogénico de la variable longitud de la raíz, en ausencia de auxinas y en medio MS, los resultados de este trabajo ( $6,20 \pm 0,63$  cm) no coinciden con referencias previas donde se evaluó esta variable. Los valores obtenidos, están por encima de lo alcanzado en otras investigaciones donde se complementaron los medios con auxinas, las cuales son precursoras de los meristemas radiculares (George et al., 2008). Por ejemplo, al complementar el medio MS con 2 mg/l BAP + 1 mg/l AFA se obtuvo  $1,04 \pm 0,25$  cm después de sesenta días de evaluación (Giridhar et al., 2003). Otros investigadores, después de treinta días de evaluación, obtuvieron  $4,52 \pm 0,21$  cm en medio MS (Zuraida et al., 2013),  $4,01 \pm 0,22$  cm y  $4,42 \pm 0,2$  al complementar el medio MS con 1 mg/l de ANA (Tan et al., 2011a; 2011b). Por su parte, Janarthanam y Seshadri (2008) obtuvieron  $6,37 \pm 1,10$  cm al complementar el medio con 1 mg/l de AIA + 0,1 mg/l de ANA, mientras que Giridhar et al. (2001) obtuvieron  $8,5 \pm 2,07$  cm con el uso de 2 mg/l de AIB, ambos trabajos obtuvieron los resultados mencionados después de un periodo de observación de 45 días.

Este trabajo indica valores de referencia para las variables peso y diámetro del brote, número y peso de raíces durante el establecimiento *in vitro* de *V. planifolia*, los cuales podrían incorporarse como parámetros agronómicos importantes para la selección temprana de rasgos deseables en futuros programas de mejoramiento. Las investigaciones basadas en las mediciones de las variables longitud del brote y longitud de la raíz no proporcionan argumentos suficientes para este trabajo como una medida confiable del rendimiento morfogénico, pues un mayor tamaño no significa una mejor vigorosidad de la planta ni una mayor adaptación a condiciones *ex vitro*. Los resultados de este experimento permitieron la obtención de mayores evidencias para la definición de una planta vigorosa y saludable adecuada para la producción comercial, la cual se podría usar de forma directa durante la aclimatización, pues los valores de longitud del brote y longitud de la raíz, complementados con los valores de las



demás variables, fueron mayores en comparación con los protocolos indicados en la literatura (Giridhar et al., 2003; Giridhar y Ravishankar, 2004; Tan et al., 2011a; 2011b; Zuraida et al., 2013).

Durante el establecimiento *in vitro* de vainilla, y con base en los resultados de este trabajo, se sugiere indicar valores de referencia homogéneos de la longitud, el peso y el diámetro de los explantes iniciales. Lo anterior, para evitar modificaciones en las reservas de carbono, y por tanto, la respuesta organogénica. Esto, junto con las diferentes condiciones experimentales, no permite una comparación adecuada del potencial morfogénico del explante entre un trabajo y otro.

La interacción entre los tres factores (Figura 4), validó los resultados de los efectos independientes y demostró que la desinfección en vainilla tiene efectos directos en la longitud del brote durante la multiplicación, por lo cual, no solo hay que considerar el mecanismo de desinfección aplicado durante las fases iniciales, sino la condición del material procedente de la fase de establecimiento. Si el material proviene de brotes limpios que se originaron de estacas asociadas con contaminación bacteriana, la longitud será menor que si proceden de medios asépticos ( $p \leq 0,05$ ).

Los resultados de esta investigación, refuerzan la tesis de que el éxito de un protocolo de cultivo de tejidos empieza con una esterilización efectiva de los explantes. Para el caso particular de la vainilla, se muestra el efecto de la contaminación asociada a los segmentos nodales de vainilla sobre el rendimiento morfogénico durante el establecimiento y multiplicación. Si bien los resultados indicaron que se puede obtener respuestas morfogénicas en presencia de contaminación, la prevalencia de contaminantes *in vitro* limitan el desarrollo de los explantes; además, estos contaminantes compiten por los componentes nutricionales del medio de cultivo (Pierik, 1997; George et al., 2008). Las evidencias encontradas concuerdan con lo propuesto por los autores antes mencionados, tanto en el ensayo de establecimiento como en el de multiplicación, puesto que, aún cuando las plantas en los medios contaminados permanecieron verdes y vigorosas de manera visible, los valores de crecimiento evaluados fueron estadísticamente menores que los obtenidos en los medios libres de microorganismos.

Los análisis serológicos del material utilizado mostraron la ausencia de los virus más comunes en vainilla y confirman de nuevo que, en Costa Rica, los principales problemas fitosanitarios de la vainilla y otras orquídeas, son causados principalmente por hongos y bacterias comunes (Rivera-Coto y Corrales-Moreira, 2007). Por esta razón, en cualquier intercambio de material vegetal entre países, es necesario reducir el riesgo de introducir patógenos exóticos (en especial virus), por lo que es perentorio cumplir con las obligaciones de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (FAO, 1997), en especial lo concerniente al certificado fitosanitario que se requiere para cualquier transferencia de material vegetal (Roux-Cuvelier y Grisoni, 2010).

## Conclusiones

Con base en el procedimiento de esterilización y regeneración empleado para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas silvestres de *V. planifolia*, se logró un 100% de explantes libres de contaminantes durante el establecimiento de segmentos nodales homogéneos en cuanto a longitud, peso y diámetro con el uso de un proceso de doble desinfección (kilol en invernadero y  $HgCl_2$  en laboratorio). Este procedimiento puede ser efectivo para el establecimiento formal de ensayos, la reducción óptima de la carga microbiológica y para el aumento significativo de la respuesta morfogénica de las variables de crecimiento durante el establecimiento y multiplicación sin el uso de aditivos al medio de cultivo. Su aplicación podrá constituir un aporte para la conservación *ex situ* de las vainillas costarricenses.

Para el establecimiento de plantaciones comerciales en el corto y mediano plazo, a partir de material genético certificado, se sugiere continuar con la optimización de estos tratamientos y, paralelo a ello, es necesaria la caracterización morfológica, molecular, bioquímica y agronómica de las plantas donantes antes del establecimiento de un programa de micropropagación comercial.

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Stefanny Orozco Cayasso y Juan Pablo Castillo Jiménez del Laboratorio de Fitopatología de la ECA-UNA por su ayuda en los ensayos fitopatológicos, a Lisela Moreira Carmona y William Villalobos Müller del CIBCM-UCR por su colaboración en las pruebas serológicas.

## Literatura citada

- Abebe, Z., A. Mengesha, A. Teressa, and W. Tefera. 2009. Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African J. Biotechnol.* 8:6817-6821.
- Anuradha, K., B.N. Shyamala, and M.M. Naidu. 2013. Vanilla- Its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53:1250-1276. doi:10.1080/10408398.2011.563879
- Araya, C., R. Cordero, A. Paniagua, y J.B. Azofeifa (eds). 2014. I Seminario Internacional de Vainilla: Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica. INISEFOR/UNA, Heredia, CRC.
- Azofeifa, J.B. 2018. Respuestas morfogenéticas de plántulas *in vitro* y esquejes de *Vanilla planifolia* Andrews provenientes de poblaciones silvestres, caracterizadas molecularmente y cultivadas en invernadero y en sistemas agroforestales, Guápiles, Costa Rica. Tesis MSc., Universidad Estatal a Distancia, San José, CRC.
- Azofeifa-Bolaños, J., L.R. Gigant, M. Nicolás-García, M. Pignal, F.B. Tavares-González, E. Hagsater, G.A. Salazar-Chávez, D. Reyes-López, F.L. Archila-Morales, J.A. García-García, D. da-Silva, A. Allibert, F. Solano-Campos, G.C. Rodríguez-Jimenes, A. Paniagua-Vásquez, P. Besse, A. Pérez-Silva, and M. Grisoni. 2017. A new vanilla species from Costa Rica closely related to *V. planifolia* (Orchidaceae). *Eur. J. Taxon.* 284:1-26. doi:10.5852/ejt.2017.284
- Azofeifa-Bolaños, J.B., A. Paniagua-Vásquez, y J.A. García-García. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 25:189-202. doi:10.15517/am.v25i1.14220
- Bartholomew, J., and T. Mittwer. 1952. The gram stain. *Bacteriol. Rev.* 16:1-29.
- Divakaran, M., and K.N. Babu. 2009. Micropropagation and *in vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). In: S.M. Jain, and P.K. Saxena, editors, *Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. Methods in molecular biology.* Humana Press, Totowa, NJ, USA. p. 129-138.
- FAO. 1997. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. FAO, Roma, ITA.
- Fegan, M. 2006. Plant pathogenic members of the genera *Acidovorax* and *Herbaspirillum*. In: S.S. Gnanamanickam, editor, *Plant-Associated bacteria.* Springer, Dordrecht, HOL. p. 671-702. doi:10.1007/978-1-4020-4538-7\_18
- Gangadara, N.B., M. Saifulla, R. Nagaraja, and M.K. Basavaraja. 2010. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, the causal agent of stem rot of vanilla *in vitro*. *Int. J. Sci. Nat.* 1:259-261.
- Geetha, S., and S.A. Shetty. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Curr. Sci.* 79:886-889.
- George, E., M. Hall, and G.J. De-Klerk. (eds.). 2008. *Plant propagation by tissue culture. Vol. 1. The Background.* 3<sup>rd</sup> ed. Springer, HOL.
- Gigant, R., S. Bory, M. Grisoni, and P. Besse. 2011. Biodiversity and evolution in the *Vanilla* genus. In: O. Grillo, and G. Venora, editors, *Dynamical processes of biodiversity: Case studies of evolution and spatial distribution.* InTech, Rijeka, CRO. p. 1-27.

- Giridhar, P., B. Obul-Reddy, and G.A. Ravishankar. 2001. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. *Curr. Sci.* 81:1166-1170.
- Giridhar, P., D.V. Ramu, and G.A. Ravishankar. 2003. Phenyl acetic acid-induced *in vitro* shoot multiplication of *Vanilla planifolia*. *Trop. Sci.* 43:92-95. doi:10.1002/ts.96
- Giridhar, P., and G.A. Ravishankar. 2004. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian J. Biotechnol.* 3:113-118.
- Havkin-Frenkel, D., and F.C. Belanger. 2007. Application of metabolic engineering to vanillin biosynthetic pathways in *Vanilla planifolia*. In: R. Verpoorte et al., editors, *Applications of plant metabolic engineering*. Springer, HOL. p. 175-196.
- Janarthanam, B., and S. Seshadri. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 44:84-89. doi:0.1007/s11627-008-9123-4
- Kado, C.I. 2006. *Erwinia* and related genera. In: M. Dworkin et al., editors, *The prokaryotes*. Springer, NY, USA. p. 443-450.
- Kalimuthu, K., R. Senthilkumar, and N. Murugalatha. 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. – a tropical orchid. *Curr. Sci.* 91:1401-1403.
- Khojraty, S., J. Dupont, S. Lacoste, T.L. Palama, Y.H. Choi, H.K. Kim, B. Payet, M. Grisoni, M. Fouillaud, R. Verpoorte, and H. Kodja. 2015. Fungal endophytes of *Vanilla planifolia* across Réunion Island: isolation, distribution and biotransformation. *BMC Plant Biol.* 15:142. doi:10.1186/s12870-015-0522-5
- Koyyappurath, S., T. Atuahiva, R. Le-Guen, H. Batina, S. Le-Squin, N. Gautheron, V. Edel-Hermann, J. Peribe, M. Jahiel, C. Steinberg, E.C.Y. Liew, C. Alabouvette, P. Besse, M. Dron, I. Sache, V. Laval, and M. Grisoni. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. *Plant Pathol.* 65:612-625. doi:10.1111/ppa.12445
- Luna-Guevara, J.J., H. Ruiz-Espinosa, E.B. Herrera-Cabrera, A. Navarro-Ocaña, A. Delgado-Alvarado, y M.L. Luna-Guevara. 2016. Variedad de microflora presente en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) relacionados con procesos de beneficiado. *Agroproductividad* 9(1):3-9.
- Maruenda, H., M.D.L. Vico, J.E. Householder, J.P. Janovec, C. Cañari, A. Naka, and A.E. González. 2013. Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by HPLC-DAD. *Food Chem.* 138:161-167. doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.037
- Mng'omba, S.A., E.S. du-Toit, F.K. Akinnifesi, and H.M. Venter. 2007. Effective preconditioning methods for *in vitro* propagation of *Uapaca kirkiana* Müell Arg. tree species. *African J. Biotechnol.* 6:1670-1676.
- Mng'omba, S.A., G. Sileshi, E.S. du-Toit, and F.K. Akinnifesi. 2012. Efficacy and Utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. In: D. Dhanasekaran et al., editors, *Fungicides for plant and animal diseases*. InTech, Rijeka, CRO. p. 245-254.
- Mujar, E.K., N.J. Sidik, N.A. Sulong, S.S. Jaapar, and M.H. Othman. 2014. Effect of low gamma radiation and methyl jasmonate on *Vanilla planifolia* tissue culture. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 27:163-167.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Ordóñez, N.F., J.T. Otero, y M.C. Díez. 2012. Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agron.* 61:282-290.
- Pierik, R.L.M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Springer, HOL.
- Pinaria, A.G., E.C.Y. Liew, and L.W. Burgess. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australas. Plant Pathol.* 39:176183. doi:10.1071/AP09079

- Radjacommaré, R., S. Venkatesan, and R. Samiyappan. 2010. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 43:1-17. doi:10.1080/03235400701650494
- Ranadive, A. 2011. Quality control of vanilla beans and extracts. In: D. Havkin-Frenkel, and F. Belanger, editors, Handbook of vanilla science and technology. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA. p. 141-161.
- Reina-Pinto, J.J., and A. Yephremov. 2009. Surface lipids and plant defenses. Plant Physiol. Biochem. 47:540-549. doi:10.1016/j.plaphy.2009.01.004
- Renuga, G., and S.N. Saravana-Kumar. 2014. Induction of vanillin related compounds from nodal explants of *Vanilla planifolia* using BAP and Kinetin. Asian J. Plant Sci. Res. 4(1):53-61.
- Rivera-Coto, G., y G. Corrales-Moreira. 2007. Problemas fitosanitarios que amenazan la conservación de las orquídeas en Costa Rica. Lankesteriana 7:347-352. doi:10.15517/lank.v7i1-2.19562
- Roux-Cuvelier, M., and M. Grisoni. 2010. Conservation and movement of vanilla germplasm. In: E. Odoux, and M. Grisoni, editors, Vanilla. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p. 31-41.
- Santa-Cardona, C., M. Marín-Montoya, y M.C. Díez. 2012. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. Rev. Mex. Mic. 35:23-34.
- Schaad, N.W, J.B. Jones, and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 9:671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Soto-Arenas, M.A., y A.R. Solano-Gómez. 2007. *Vanilla planifolia*. En: M.A. Soto-Arenas, editor, Fichas de especies del proyecto W029: Información actualizada sobre especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL- 2000. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO, México, D. F., MEX. p. 1-18. [http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/W029\\_Fichas%20de%20especies.pdf](http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/W029_Fichas%20de%20especies.pdf) (consultado feb. 2018)
- Tafolla-Arellano, J.C., A. González-León, M.E. Tiznado-Hernández, L.Z. García, y R. Báez-Sañudo. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en Plantas. Rev. Fitotec. Mex. 36:3-12.
- Tan, B.C., C.F. Chin, and P. Alderson. 2011a. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 105:457-463. doi:10.1007/s11240-010-9866-6
- Tan, B.C., C.F. Chin, and P. Alderson. 2011b. An improved plant regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. Plant Tiss. Cult. Biotechnol. 21:27-33. doi:10.3329/ptcb.v21i1.9560
- Trigiano, R.N., and D.J. Gray. 2004. Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Walterson, A.M., and J. Stavrínides. 2015. *Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. FEMS Microbiol. Rev. 39:968-984. doi:10.1093/femsre/fuv027
- Zuraida, A.R., K.H.F. Liyana, O.A. Nazreena, W.S. Wan-Zaliha, C.M.Z. Che-Radziah, Z. Zamri, and S. Sreeramanan. 2013. A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of *Vanilla planifolia*. Am. J. Plant Sci. 4:1685-1692. doi:10.4236/ajps.2013.49205