

BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUBLA

**FACULTAD DE INGENIERÍA
COLEGIO INGENIERÍA INDUSTRIAL**

**Uso de Recipientes de
Inmersión Temporal
Automatizados (RITA[®]) para la
micropropagación comercial de
vainilla empleando
nanopartículas de plata**

**Tesis presentada como requisito para obtener
el título de:**

Licenciatura en Ingeniería Industrial

PRESENTA:

ANNET YAMILI MÉNDEZ ALEGRÍA

ASESORES:

**DR. ALEJANDRO BAUTISTA HERNÁNDEZ
(FACULTAD DE INGENIERIA-BUAP)**

**DR. JERICO JABIN BELLO BELLO
(COLEGIO POSTGRADUADOS-CÓRDOBA)**

OCTUBRE 2014



BUAP

Contenido

DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
INDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aspectos Generales	1
1.2 Hipótesis y Objetivos	2
1.2.1 Hipótesis.....	2
1.2.2 Objetivos	2
Objetivo general	2
Micropropagar vainilla en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITAs) empleando nanopartículas de plata.	2
Objetivos específicos	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 La micropropagación de plantas.....	4
2.2 Uso de birreactores automatizados durante la micropropagación.....	5
2.2.1 Diseño sistema neumático	8
2.2.2 Controlador lógico programable (PLC).....	10
2.2.3 El Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA).....	11
2.3 Contaminantes durante micropropagación de plantas	13
2.3.1 Formas de combatir la contaminación <i>in vitro</i>	14
2.4 Nanopartículas de plata	15
2.4.1 Uso de nanopartículas de plata durante la micropropagación de plantas	16
2.5. Generalidades de la vainilla	18
2.5.1 Importancia de la vainilla	18
2.5.2 Producción de la vainilla	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Ubicación del experimento	21
3.2. Instalación del sistema RITA.....	21
3.3. Fuente de explante	22
3.4. Preparación y esterilización de medios de cultivo.....	23
3.5. Condiciones de incubación.....	23
3.6. Efecto de las nanopartículas de plata sobre la contaminación <i>in vitro</i> y el coeficiente de multiplicación	23
3.7. Diseño experimental y análisis estadístico.....	24

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata sobre la contaminación <i>in vitro</i>	26
4.2 Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata y los biorreactores semiautomatizados en el incrementando del coeficiente de multiplicación en la micropropagación	26
4.3 Discusión	28
5. CONCLUSIONES.....	29
5.1 Perspectivas.....	29
ANEXO 1	38

DEDICATORIA

Todo lo que hago es por mi Dios, esto es por ti padre.

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a mis padres Zenaida y Agustín por siempre mi corazón y mi agradecimiento infinito.

Para mi sangre, Elibeth muchas gracias por ser quien siempre me ha enseñado, por tu amor y apoyo; Ivonne, Julián, Karon y Annia, que esto sea el comienzo de futuras metas, los amo.

Con mucho cariño para mi Ohana, Itzel, Omar y Elideth, por ese apoyo y amor brindado, por ser la familia que yo elegí.

Linda, Monse, Dany y Eve, mi paso por la universidad fue grandioso gracias a ustedes, este trabajo también es dedicado a ustedes.

Para mis amigos que conocí en diferentes lugares del mundo, gracias por su amistad y enseñanzas.

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Dr. Alejandro Bautista Hernández por su disposición y apoyo brindados durante trabajos de investigación realizados durante mis estudios universitarios. Gracias por sus consejos, sugerencias y entusiasmo para lograr concluir este ciclo.

Al Dr. Jericó Jabín Bello Bello del Colegio de Posgraduados Campus Cordoba, por ser mi asesor externo y darme la oportunidad, el apoyo y la confianza durante éste tiempo para la realización exitosa de éste trabajo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, campus Ensenada, por proporcionar las Nanopartículas de Plata empleadas en este estudio.

A mis maestros de la Facultad de Ingeniería de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como un ingeniero de bien y preparada para los retos que pone la vida profesional.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la micropropagación y sus fases de cultivo. a) Selección de la planta madre, b) Selección del explante, c) Establecimiento *in vitro*, d) Multiplicación del tejido, e) Elongación y enraizamiento, f) Adaptación al medio externo (aclimatización).

Figura 2. Los biorreactores en la micropropagación. A) Propagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en BIT[®], B) Micropropagación de agave (*Agave* spp.) en BioMINT[®] y C) Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]).

Figura 3. Esquema de un sistema neumático básico. PRODUCCION 1. Compresor, 2. Motor eléctrico, 3. Presostato, 4. Válvula anti-retorno, 5. Depósito, 6. Manómetro, 7. Purga automática, 8. Válvula de seguridad, 9. Secador de aire refrigerado, 10. Filtro de línea. UTILIZACIÓN 1. Purga de aire, 2. Purga automática, 3. Unidad de acondicionamiento de aire, 4. Válvula direccional, 5. Actuador, 6. Controladores de velocidad.

Figura 4. Fases del sistema de inmersión temporal automatizado RITA[®]. Fase emergida. 1) Los explantes están colocados sobre un disco. Fase sumergida. 2) Una sobrepresión de aire estéril sube el medio de cultivo a la parte alta donde se encuentran los explantes. 3) El aire inyectado permite la oxigenación del medio. El aire de la parte alta se renueva totalmente. 4) La bomba de aire se apaga y el medio de cultivo vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Tomado de CIRAD, 2001.

Figura 5. Contaminación microbiana durante la micropropagación (FIA, 2009).

Figura 6. *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews., tomada de Damirón, 2004.

Figura 7. Instalación del Sistema de Inmersión Temporal A) PLC y Filtros de venteo. B) Catálogo de materiales para sistema neumático: tuberías,

mangueras y válvulas. C) Compresor conectado a filtros controlado por el PLC.
D) Conexión de Biorreactores RITA[®] a sistema neumático.

Figura 8. Plantas de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews en medio sólido.

Figura 9. Aplicación de nanopartículas de plata en el medio de cultivo líquido.
A) Medios de cultivos líquidos sin nanoplata. B) Medios de cultivo con nanoplata: Recipiente 0=0 mg l⁻¹, 1=25 mg l⁻¹, 2= 50 mg l⁻¹, 3= 100 mg l⁻¹.
C) Medición de pH= 5.8 para las cuatro concentraciones. D) Tres biorreactores RITA contenedor[®] por cada concentración de nanoplata.

Figura 10. Diagrama experimental establecido para determinar la concentración óptima de nanopartículas de plata para reducir la contaminación *in vitro* y aumentar el coeficiente de multiplicación en los explantes en la Vainilla (*V. planifolia* Jacks ex Andrews) a través del uso de biorreactores de inmersión temporal.

Figura 11. Efecto de nanoplata en la proliferación de brotes de vainilla (*V. planifolia*) utilizando biorreactores de inmersión temporal después de 4 semanas de cultivo *in vitro*. a-d: 0, 25, 50 y 100 mg l⁻¹ de nanopartículas de plata, respectivamente. Bar = 2 cm.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Indicadores internacionales de producción de Vainilla 2005-2007 (SAGARPA, 2010).

Tabla 2. Efecto de nanoplata en el porcentaje de contaminación en Vainilla (*V. planifolia*), usando biorreactores de inmersión temporal.

Tabla 3. Efecto de nanoplata en el número y longitud de brotes en Vainilla (*V. planifolia*), usando biorreactores de inmersión temporal.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medio MS (Murashige y Skoog, 1962), soluciones concentradas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos Generales

Actualmente las industrias, tanto manufactureras como de procesos, realizan grandes esfuerzos en la optimización de los procesos productivos. Algunas se centran en el aspecto de la calidad, mientras que otras en el aspecto de los costos. Ambos factores son condicionantes fundamentales en estas industrias y, en este sentido, la automatización industrial contribuye decisivamente (Ponsa *et al.*, 2008). Respecto a instrumentación de control de procesos, uno de los elementos básicos capaces de llevar a cabo el control secuencial o la regulación continua dentro del control de procesos industriales es el llamado autómatas programable PLC. Durante los casi ya treinta años de utilización de autómatas programables en la industria han destacado por su eficaz labor en el control secuencial de procesos. Una de las aplicaciones de mayor éxito es la combinación de autómatas programables con la tecnología electroneumática (Tompkins *et al.*, 2006).

Por otra parte, la biotecnología vegetal es una de las disciplinas científicas que más desarrollo ha mostrado en los últimos años. Actualmente ofrece una alternativa real para la resolución de un gran número de problemas relacionados con el mejor aprovechamiento de las plantas para la industria agrícola. Esta disciplina es sin duda una herramienta invaluable para incrementar tanto la cantidad como la calidad de los alimentos de origen vegetal, así como para obtener nuevos productos con diversas aplicaciones a partir de plantas (Bello-Bello, 2013). Una de las aplicaciones de la biotecnología vegetal es la micropropagación de plantas. Actualmente la industria biotecnológica agrícola en México, en lo referido a micropropagación masiva de plantas, cuenta con un gran potencial productivo. Sin embargo, el empleo de la micropropagación a escala comercial se ha limitado cada vez más debido a los altos costos ocasionados por la mano de obra, la baja eficiencia biológica y a la falta de automatización durante los procesos de propagación *in vitro* de plantas. El empleo de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), como son: el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA), el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG),

entre otros, se han convertido en una herramienta de gran utilidad para lograr la semiautomatización, reducción de costos y aumento en los índices de multiplicación de los cultivos *in vitro*.

Una característica que afecta el cultivo *in vitro* de plantas en biorreactores son las pérdidas de material vegetal causada por la contaminación. De acuerdo a Mroginski *et al.* (1993) el impacto de éstas pérdidas, en promedio, en laboratorios dedicados a ésta práctica se le puede estimar alrededor de 10%. Una nueva alternativa para la eliminación de los contaminantes puede ser mediante la aplicación de nanopartículas de plata (NPsAg), pues la nanotecnología ha amplificado su efectividad como agente antimicrobiano (Lamsal *et al.*, 2011).

El presente estudio se enmarca en una realidad nacional y mundial que apunta una producción de vainilla de óptima calidad desde el punto de vista genético y sanitario, producidas a escala comercial. El objetivo de éste estudio es micropropagar vainilla en biorreactores semiautomatizados empleando nanopartículas de plata (NPsAg). La herramienta básica de trabajo será la Ingeniería Industrial, a través de la optimización de materiales y recursos.

1.2 Hipótesis y Objetivos

1.2.1 Hipótesis

El empleo de nanopartículas de plata en biorreactores semiautomatizados mejorará la eficiencia en la tasa de multiplicación a través de la disminución en la contaminación del medio líquido y la formación de brotes de Vainilla.

1.2.2 Objetivos

Objetivo general

Micropropagar vainilla en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITAs) empleando nanopartículas de plata.

Objetivos específicos

- Diseñar el sistema neumático para determinar el flujo de aire y unificar la inmersión en los biorreactores.
- Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata sobre el número de brotes por explante en *V. planifolia* cultivada en biorreactores.

- Determinar la dosis óptima, tóxica y letal de nanopartículas de plata sobre la contaminación de la vainilla *V. planifolia* cultivada en biorreactores.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La micropropagación de plantas

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) consiste en una serie de técnicas que permiten el cultivo y manipulación, bajo condiciones artificiales y controladas de células, tejidos y órganos vegetales (Molphe-Balch *et al.*, 1999). Una de las más importantes aplicaciones del CTV es la micropropagación, pues mediante las técnicas que se desarrollan dentro de la micropropagación han permitido establecer protocolos de regeneración a gran escala de plantas con un alto valor comercial.

La micropropagación o propagación clonal *in vitro* cobra cada día mayor importancia cuando es utilizada en cultivos de interés económico, pues permite obtener una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas (clones) a partir de un solo fragmento (explante) proveniente de la planta madre (Figura 1). Esta técnica posee un gran potencial comercial debido a la velocidad de propagación, la alta calidad de plantas obtenidas y la posibilidad de producir plantas libres de patógenos (Steward *et al.*, 1970; Ammirato, 1985).

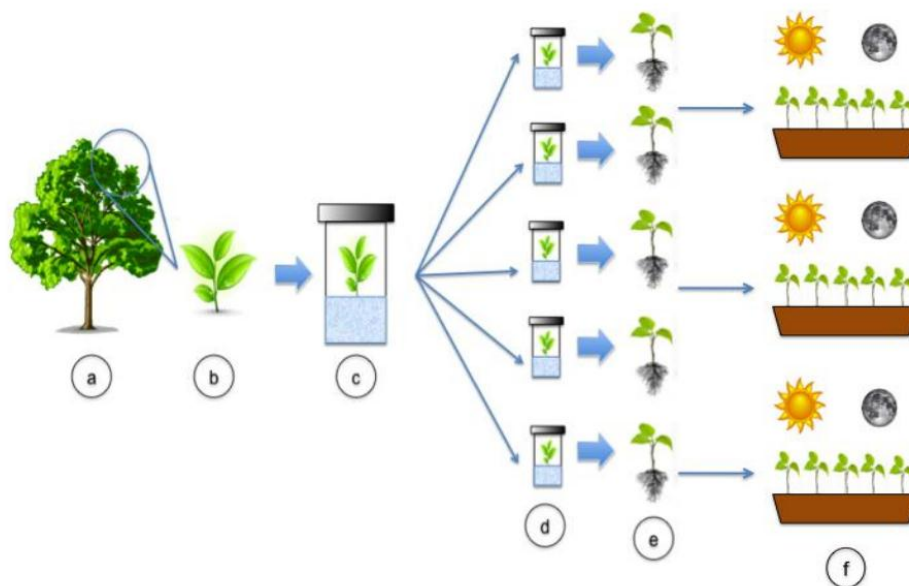


Figura 1. Esquema de la micropropagación y sus fases de cultivo. a) Selección de la planta madre, b) Selección del explante, c) Establecimiento *in vitro*, d) Multiplicación del tejido, e) Elongación y enraizamiento, f) Adaptación al medio externo (aclimatación).

Sin embargo, la micropropagación tiene la desventaja de ser una técnica relativamente costosa, debido a que requiere mucha mano de obra y agentes gelificantes que representan hasta el 60% de los costos de producción; para abaratar costos una opción es el uso de medio de cultivo líquido (Perugorría, 2013). Durante el cultivo en medio líquido suelen presentarse problemas como la hiperhidricidad y la falta de oxígeno los cuales pueden ser solucionados utilizando sistemas de inmersión temporal (Etienne y Berthouly, 2002).

El establecimiento de la micropropagación comercial como industria tiene sus comienzos en las décadas de los 70 y 80, y se han logrado significativos avances desde entonces en el cultivo de plantas y células *in vitro* (Jones y Sluis, 1991). El uso de la tecnología *in vitro* para la propagación de plantas, ha tenido un gran desarrollo en la industria de la horticultura y la forestación. En el sector forestal, la micropropagación significará una alternativa comercial de gran importancia en comparación con la propagación tradicional gracias a la rápida ganancia genética que ofrece en los programas de mejoramiento. Los altos costos en que incurre esta técnica puede ser una de las mayores limitante (FAO/IAEA, 2004). Esta técnica es extremadamente demandante en cuanto al uso de mano de obra, atribuyéndose a la manipulación de las plantas aproximadamente el 46% de los costos del proceso. Lo anterior hace necesaria la reducción de los costos de producción para la generalización de esta tecnología y en respuesta a esta demanda es imprescindible la automatización del proceso productivo para la optimización del uso de los recursos (George, 1993). La eficiencia del proceso de micropropagación desde el punto de vista comercial, depende de una rápida y prolongada fase de proliferación con grandes escalas de producción.

2.2 Uso de biorreactores automatizados durante la micropropagación

Los SIT se sustentan en el uso de biorreactores automatizados que permiten el escalamiento para propagación masiva de especies vegetales en medio líquido. El mecanismo de estos sistemas consiste básicamente en la exposición intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes bajo un tiempo y frecuencia de inmersión determinada, y controlada por PLC (por sus siglas en inglés: Programmable Logic Controller) que regulan un período de tiempo establecido.

El uso de biorreactores bajo el esquema de los sistemas de inmersión temporal genera un contexto bioquímico, que describe el empleo de recipientes autónomos con un ambiente estéril, estos permiten a los explantes aprovechar la máxima absorción de nutrientes mediante el suministro de medio líquido y ayudan a mantener un ambiente favorable a través del flujo continuo de aire. Fueron diseñados para el cultivo intensivo y ofrecen la oportunidad de controlar microcondiciones ambientales tales como: agitación, aireación, temperatura, niveles de oxígeno, pH, etc.(Mehrotra *et al.*, 2007).

El cultivo en medio líquido utilizando sistemas de inmersión temporal con diferentes frecuencias de inmersión fue reportado para mejorar la calidad de la plantas y elevar las tasas de multiplicación de banano, café y hule (Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1995; Etienne *et al.*, 1997).

Los biorreactores están siendo utilizados en laboratorios comerciales en los EE.UU., Japón, Taiwán, Corea, Cuba, Costa Rica, Holanda, España, Bélgica y Francia para la micropropagación de plantas ornamentales, bulbosas, piña, papa, y algunos árboles forestales (Ziv, 2000).



Figura 2. Los biorreactores en la micropropagación. A) Micropropagación de agave (*Agavespp.*) en BioMINT[®] B) propagación de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en BIT[®], y C) Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]).

La principal ventaja de los SIT es incorporar un mayor grado de automatización en los procesos de multiplicación (proliferación), elongación y enraizamiento del cultivo *in vitro*. En algunas especies tropicales como plátano y piña, los SIT han demostrado ser altamente eficientes, ya que han permitido reducir de 30 a 40% el uso de mano de obra, reactivos, agentes gelificantes, manipulación de

explantes y el tiempo de producción de plantas, dependiendo de la especie. Además, éstos sistemas han permitido aumentar la tasa de multiplicación, el porcentaje de enraizamiento, así como la supervivencia de plantas en la etapa de aclimatación en porcentajes que pueden variar de un 40 hasta un 50%, dependiendo del tipo de cultivo y de la producción de plantas por m² instalado de laboratorio. Todo ello ha permitido una disminución de los costos de producción de hasta un 50%, en comparación con el sistema de micropropagación convencional (Paredes, 2005).

El SIT en biorreactores constituye una herramienta tecnológica interesante, principalmente para el sector agroindustrial, ya que su implementación permitiría mejorar la eficiencia del proceso de propagación *in vitro* de distintas especies, con los siguientes méritos respecto a la técnica convencional (FIA, 2009):

- Aumento importante en la tasa de multiplicación.
- Mejoramiento en el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación.
- Aumento en los niveles de mecanización de algunas etapas de la micropropagación.
- Reducción en el uso de la mano de obra.
- Reducción en los costos de reactivos e insumos por planta final.
- Menor costo por planta.
- Aumento en la rentabilidad del proceso.

La economía de escala que se produce por efecto en la utilización de estos sistemas es importante, ya que al producir un mayor número de plantas en un tiempo determinado, los costos por unidad se reducen significativamente (FIA, 2009).

El desarrollo de biorreactores más sofisticados y mejor adaptados a cada una de las necesidades microambientales en que se desarrollan las especies cultivadas, ha permitido hacer más eficiente el empleo de los sistemas de inmersión temporal, es por ello que periódicamente se patentan nuevos prototipos, cuya finalidad es innovar y mejorar las condiciones de cultivo para mejorar la producción y calidad de plantas micropropagadas (Bello-Bello, 2013).

El empleo combinado de medios de cultivo en estado líquido y sistemas de cultivo semiautomatizados (biorreactores) han demostrado ser eficientes en la propagación *in vitro* de muchas especies de plantas (Escalona, 2006; Mehrotra *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2009).

Los biorreactores ofrecen la solución a un sin fin de problemas relacionados con la regeneración de plantas *in vitro*. Estos sistemas permiten una adecuada aireación dentro del recipiente de cultivo, uso del medio líquido, así como una mayor disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento (Bello-Bello *et al.*, 2010).

2.2.1 Diseño sistema neumático

El auge que ha tomado la automatización de los procesos industriales ubica en un nivel de importancia todo el potencial que ofrece el aire como elemento de trabajo. En la actualidad es posible disponer de una gran variedad de componente neumáticos que están prácticamente involucrados en todo proceso industrial de producción y, ofrecen estándares de seguridad, confiabilidad y operatividad que se ajustan a las exigencias de las diferentes normas vigentes en el sector (Poveda, 2007).

La neumática es la tecnología que emplea el aire comprimido como modo de transmisión de la energía necesaria para mover y hacer funcionar mecanismos. El aire es un material elástico y por tanto al aplicarle una fuerza se comprime, mantiene esta compresión y devolverá la energía acumulada cuando se le permita expandirse, según la ley de los gases ideales (Millán, 1995).

Los sistemas neumáticos se complementan con los eléctricos y electrónicos, lo que les permite obtener un alto grado de sofisticación y flexibilidad. Utilizan válvulas de selenoide, señales e interruptores eléctricos de final de carrera. El PLC les permite programar la lógica de funcionamiento de un cilindro o de un conjunto de cilindros realizando una tarea específica (Creus, 2011).

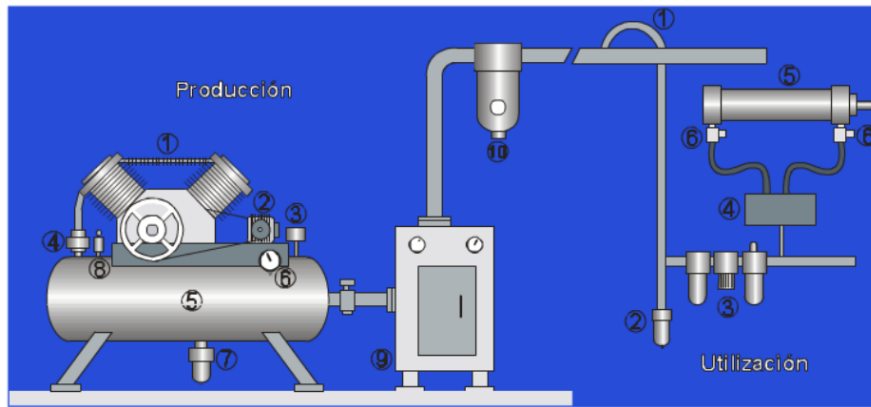


Figura 3. Esquema de un sistema neumático básico. PRODUCCION 1.Compresor, 2. Motor electrico, 3. Presostato, 4. Válvula anti-retorno, 5.Deposito, 6. Manómetro, 7. Purga automática, 8. Válvula de seguridad, 9.Secador de aire refrigerado, 10. Filtro de línea. UTILIZACIÓN 1. Purga de aire, 2. Purga automática, 3. Unidad de acondicionamiento de aire, 4. Válvula direccional, 5. Actuador, 6. Controladores de velocidad.

En la actualidad, en la industria encontramos una gran cantidad de aplicaciones debido a la simplicidad de su aplicación y a sus bajos costos de instalación. Se podría decir que todo tipo de industria tiene una instalación de aire comprimido (Poveda, 2007), por ejemplo para la inmersión temporal se han establecido recipientes especiales y también se han creado sistemas con elementos convencionales de un laboratorio en cualquier caso el desplazamiento del medio líquido se realiza con el uso de aire comprimido (Mulet, 1999). El funcionamiento del sistema de inmersión temporal automatizado consiste en colocar los explantes sobre un disco dentro del biorreactor, posteriormente una sobrepresión de aire estéril sube el medio de cultivo a la parte alta donde se encuentran los explantes. El aire inyectado permite la oxigenación del medio pues el aire de la parte alta se renueva totalmente. Posteriormente la bomba de aire se apaga y el medio de cultivo vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior (CIRAD, 2001).

La aplicación a escala comercial de las técnicas de micropropagación se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, calidad de los explantes y altos costo ocasionados por el uso intensivo de mano de obra en las etapas de multiplicación y enraizamiento (Castro et al, 2002).

La mecanización y automatización de los procesos de micropropagación pueden aportar una solución para superar la limitación que significa la intensiva labor de las técnicas convencionales de propagación de plantas (Levin *et al.*, 1988).

Por lo anterior, la automatización de una o más etapas de los procesos de micropropagación es una opción para la reducción de costo de manipulación, reducción del espacio e incremento de volúmenes de producción (Aharoni, 2002).

2.2.2 Controlador lógico programable (PLC)

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) se sustentan en el uso de biorreactores automatizados que permiten el escalamiento para propagación masiva de especies vegetales en medio líquido. El mecanismo de estos sistemas consiste básicamente en la exposición intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes bajo un tiempo y frecuencia de inmersión determinada y controlada por PLCs que regulan un período de tiempo establecido (Ziv, 2000).

Un PLC es un sistema de control basado en un microprocesador y los elementos necesarios para que este microprocesador opere de forma conveniente, pues el PLC es un elemento de control de procesos de propósito general amoldable a prácticamente todas las situaciones en las que se requiera una automatización siendo una máquina diseñada para controlar en tiempo real y en entornos industriales procesos de naturaleza combinacional y secuencial (Domingo *et. al.*, 2003).

El principio de funcionamiento en los sistemas de inmersión intermitente se basa en la posibilidad de absorción de nutrientes y otras sustancias por las plantas *in vitro*, durante períodos alternos de inmersión en el medio de cultivo líquido y posterior permanencia en el recipiente sin el medio de cultivo, este proceso de nutrición alternativa suministra los elementos necesarios al material vegetal e incrementa notablemente la oxigenación del medio interno, lo cual influye positivamente en el crecimiento y multiplicación de las plantas. La frecuencia y duración de los períodos de inmersión pueden ir desde 4 períodos de inmersión por 15 min diariamente, hasta 1 período de inmersión de 1 min generalmente (Mulet, 1999).

Para controlar éste proceso es necesario el uso de un sistema que controle las variables fundamentales del proceso.

La eficiencia de un proceso independientemente de su naturaleza, depende del control de sus variables fundamentales, las cuales se definen como condiciones que están sujetas a cambios, ya sea en los materiales del proceso o en los equipos y por esto el mantenimiento del control del mismo en su totalidad es parte muy importante del diseño.

Para diseñar las estructuras de instrumentación y control automático del sistema se deben considerar las siguientes variables:

1. Tiempo de repetición.
2. Tiempo de permanencia.
3. Tiempo de ejecución.

Es por ello que se hace uso de PLC dentro de algunos Sistemas de Inmersión Temporal, pues el autómeta programable es un dispositivo que opera digitalmente, utiliza una memoria para el almacenamiento interno de instrucciones con el fin de implementar funciones específicas tales como: lógica, registro, control de tiempos, operación de manera secuencial y cíclica, es decir, una vez finalizado el recorrido completo de un programa comienza a ejecutar su primera instrucción (Hernández *et al.*, 2011).

2.2.3 El Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA)

Uno de los más notorios sistemas de inmersión temporal a partir del cual otros sistemas han sido diseñados bajo el mismo principio fue el desarrollado por Alvard *et al.*, (1993) del Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD, Francia), el empleo de éste sistema fue reportado en especies como plátano (*Musa sp.*), hule (*Hevea brasiliensis*) y café (*Coffea arabica*). Dos años más tarde éste sistema fue modificado por Teisson y Alvard (1995), quienes diseñaron un recipiente denominado RITA[®] (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado), donde el sistema era controlado por un software que regulaba el tiempo y frecuencia de inmersión (Figura 4). Éste recipiente permite el contacto total del medio de cultivo con todas las partes del explante y brinda una atmosfera adecuada mediante la constante ventilación del sistema. Actualmente éste sistema ha sido empleado en la regeneración manzano (Zhu *et al.*, 2005), orquídeas

(Tirado, 2005), eucalipto (McAlister *et al.*, 2005, fresa (Hanhineva y Kärenlampi, 2007) arándano (Ross y Castillo, 2009), entre otras.

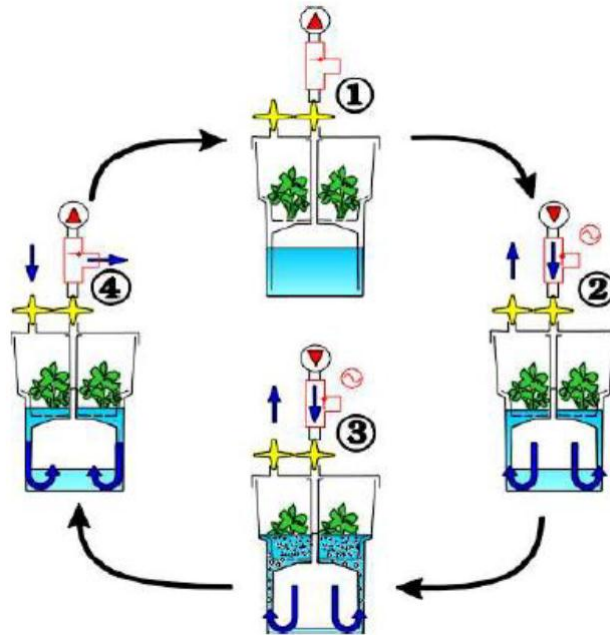


Figura 4. Fases del sistema de inmersión temporal automatizado RITA. Fase emergida. 1) Los explantes están colocados sobre un disco. Fase sumergida. 2) Una sobrepresión de aire estéril sube el medio de cultivo a la parte alta donde se encuentran los explantes. 3) El aire inyectado permite la oxigenación del medio. El aire de la parte alta se renueva totalmente. 4) La bomba de aire se apaga y el medio de cultivo vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Tomado de CIRAD, 2001.

Este sistema se logró a partir de la aplicación de un flujo de aire a uno de sus frascos el cual hacía subir el medio de cultivo y luego de bañar los explantes el medio descendía por gravedad. Este método ha revolucionado los métodos tradicionales de micropropagación pues se ha logrado una mayor tasa de multiplicación, enraizamiento y aclimatación, así como niveles elevados de supervivencia en condiciones de campo, se plantea que este sistema provoca cambios en la atmósfera interna de los frascos, trayendo un mayor crecimiento y desarrollo de los explantes, además de que las vitroplantas mantienen una capa superficial de medio de cultivo hasta la próxima inmersión lo que evita la pérdida por desecación (Rosales *et al.*, 2003).

2.3 Contaminantes durante micropropagación de plantas

Una de las condiciones básicas que se requieren para la micropropagación es la asepsia, es decir la ausencia en el sistema de cualquier organismo contaminante que pudiera afectar los resultados o incluso matar el tejido vegetal cultivado. Por desgracia, la contaminación de los cultivos propagados *in vitro* es un fenómeno frecuente, que se ve facilitado por el hecho de que se utilizan medios muy ricos en nutrientes en los cuales pueden prosperar una muy amplia gama de microorganismos (Molphe-Balch *et al.*, 1999).

La contaminación microbiana (Figura 5) es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales en el mundo, produce cuantiosas pérdidas de material tanto en la micropropagación comercial como en los trabajos de investigación (Digonzelli, 2005).



Figura 5. Contaminación microbiana en micropropagación *in vitro* (FIA, 2009).

En la micropropagación de la caña de azúcar por ejemplo, la contaminación bacteriana produce grandes pérdidas directas e indirectas como: reducción de la tasa de multiplicación, inhibición del enraizamiento y muerte de plantas en todas las etapas del proceso (Alvarado, 1999). Trabajos realizados en Cuba (Acosta, 1999) demostraron que en la fase de establecimiento *in vitro* las bacterias son responsables del 15 al 34 % de las pérdidas.

Existen dos fuentes probables de contaminación para los cultivos; aquella que proviene de los instrumentos utilizados y las condiciones en que se manipula los mismos y segundo, aquella que proviene del explante mismo siendo esta más difícil de controlar. (Molphe-Balch *et al.*, 1999).

2.3.1 Formas de combatir la contaminación *in vitro*

Es indispensable evitar la contaminación con microorganismos para lograr éxito en el establecimiento, incubación y manipulación del tejido *in vitro*, ya que éstos pueden destruir los explantes, retrasar su desarrollo al competir con ellos o generar modificaciones en el medio que afectan negativamente su sobrevivencia y desarrollo (Sanchez *et al.*, 2004).

Los hongos y bacterias son los microorganismos más comunes que se encuentran sobre o en los tejidos vegetales. Para eliminar la contaminación bacteriana durante la propagación *in vitro*, se han desarrollado diferentes métodos en los últimos años (Barrett y Cassells 1994; Hussain *et al.*, 1994).

Uno de ellos es realizar todas las manipulaciones que implique la exposición de los tejidos o del medio de cultivo en área axénica, siendo lo ideal trabajar en una campana de flujo laminar. Así también esterilizar todos los implementos utilizados para la manipulación de los tejidos antes de hacer uso de ellos.

Los frascos o recipientes de cultivo deben permanecer sellados en un ambiente libre de polvo y de corrientes de aire durante el período de incubación. (Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Los antibióticos se utilizan comúnmente en el medio para eliminar los contaminantes no deseados en los sistemas de micropropagación (Smart *et al.* 1995). En teoría puede parecer que todos los problemas de contaminación podrían ser superados por la incorporación de uno o más antibióticos al medio de cultivo. Sin embargo los antibióticos son frecuentemente fitotóxicos por lo que pueden retardar o incluso inhibir el crecimiento de los tejidos vegetales. Además la exposición prolongada de células o tejidos a los antibióticos puede resultar en el desarrollo de la resistencia a través del cambio genético (mutación). La mayoría de los antibióticos, han mostrado efectos inhibidores del crecimiento en plantas (Pankhurst 1977). Se ha reportado que el uso de antibióticos en los medios inhiben tanto la multiplicación como el enraizamiento de los brotes (Leifert *et al.*, 2000).

La contaminación bacteriana durante el cultivo *in vitro* de segmentos internodales maduros de plantas madre cultivadas en invernadero es generalmente responsable de la pérdida de los explantes cultivados en un medio libre de antibióticos. Sin embargo la adición de antibióticos al medio de

cultivo requiere de una cuidadosa evaluación de sus efectos sobre la regeneración de las plantas, ya que varios informes han demostrado que podían tener efectos positivos o negativos sobre la morfogénesis *in vitro* (Costa *et al.*, 2000;.. Tang *et al.*, 2004; Mendes ., 2009).

Por lo tanto, es necesario evaluar los efectos de la concentración de los productos químicos sobre la regeneración *in vitro* de plantas, con el fin de aclarar la relación entre la concentración y el efecto fitotóxico de los productos químicos (Ferreira *et al.*, 2003).

Una nueva alternativa para eliminar los contaminantes *in vitro* lo constituye el uso de nanopartículas de plata (NPsAg).

2.4 Nanopartículas de plata

El ámbito de la nanotecnología es una de las áreas más activas de la investigación en ciencia de los materiales. Las nanopartículas tienen propiedades completamente nuevas o mejoradas basadas en características específicas tales como: tamaño, distribución y morfología (Shokri S. *et al.*, 2012). Las nuevas aplicaciones de las nanopartículas y nanomateriales están surgiendo rápidamente. Un ejemplo de ello son las nanopartículas de plata, que han encontrado enormes aplicaciones en el campo de la alta sensibilidad de detección biomolecular y diagnóstico, los antimicrobianos y la terapéutica; así como la catálisis y microelectrónica (Jain *et al.*, 2009).

Las nanopartículas de plata son una nueva clase de material con características físico-químicas y biológicas muy diferentes, tales como el aumento de la actividad óptica, catalítica, propiedades antimicrobianas en comparación con los materiales en bulto, es decir, macroscópicos (Choi, 2009). Las nanopartículas no son en la actualidad sólo objeto de la investigación científica, sino que pueden ser continuamente encontradas no sólo en los laboratorios científicos, aplicaciones industriales y tecnologías químicas, sino también como parte de la vida común debido a su uso en productos disponibles en el mercado (Kvitek L., *et al.* 2010).

Estudios han demostrado que los antibióticos pueden causar incidencia de patógenos resistentes a los antibióticos a través de mutaciones inducidas o mediante la preparación de tierra para la selección natural que finalmente conduce a la necesidad de nuevos antibióticos (Taji *et al.* 1993). Actualmente,

el uso de partículas de plata con dimensiones nanométricas (nanoplatas) ha demostrado tener efectos antibacteriano, antifúngico y antiviral (Nomiya., *et al.*, 2004; Sondi y Salopek-Sondi, 2004).

Las nanopartículas de plata puede ser debido a su alta actividad antibacteriana, baja toxicidad frente a los organismos superiores y la resistencia bacteriana; considerado uno de los mayores agentes antibacterianos para el tratamiento de quemaduras (Ip M., *et al.*, 2006) o para la prevención de la colonización bacteriana en los catéteres, prótesis y materiales dentales (Alt V. *et al.*, 2004). Desde el principio del siglo XXI, las nanopartículas de plata han sido ampliamente utilizadas como agentes antibacterianos en muchos productos de la industria cosmética, médica, farmacéutica, doméstica, pintura, construcción, agrícola y textil (Kvitek L., *et al.* 2010).

2.4.1 Uso de nanopartículas de plata durante la micropropagación de plantas

Debido a la importancia en controlar la contaminación para lograr los objetivos del cultivo de tejidos se han sugerido muchos métodos diferentes, con sus respectivas ventajas y desventajas. La aplicación de hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio, soluciones alcohólicas y los antibióticos son los ejemplos más comunes. Sin embargo por los efectos secundarios ambientales de cloruro de mercurio (Mutter *et al.*, 2005) y los antibióticos se están disminuyendo su uso, así que la necesidad de considerar nuevos agentes antimicrobianos es evidente (Fakhrfeshani M. *et al.*, 2012).

Las nanopartículas de plata representan el material que puede ser utilizado como un agente antibacteriano potencial en aplicaciones médicas y diferentes productos comerciales debido a su actividad biológica (Kvitek L. *et al.*, 2010).

Debido a sus efectos antimicrobianos a bajas concentraciones de nanopartículas de plata, podría aplicarse sin efectos adversos sobre el crecimiento y desarrollo de plantas (Sarmast *et al.*, 2011). El uso de 100 mg l⁻¹ de solución de nanopartículas de plata, después de la esterilización superficial resultó un mayor porcentaje de explantes desinfectados (Abdi *et al.*, 2008). Así también, se encontró que las nanopartículas de plata tienen un buen potencial para la eliminación de los contaminantes bacterianos en los procedimientos de cultivo de tejidos de plantas de tabaco (Safavi *et al.*, 2011).

Actualmente, resultados en valeriana (*Valeriana officinalis L.*) muestran que la plata de tamaño nanométrico puede controlar la infección bacteriana en condiciones de cultivo *in vitro*. En general, el uso de nanopartículas de plata tuvo una influencia aceptable sobre los contaminantes bacterianos, sin efectos adversos en caracteres de crecimiento en la micropropagación de la valeriana (Gholamreza Abdi, 2012).

El uso de nanopartículas de plata en medio de cultivo *in vitro* de híbridos Durazno*Almendra, los resultados indican que la adición de 10 a 20 mgm⁻³ de nanopartículas de plata es efectiva para el control del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo. (Gholamhoseinpour Anvari Sh. *et al.*, 2012).

Por otro lado, las nanopartículas de plata controlan exitosamente la contaminación bacteriana y fúngica, tiene efectos no deseados en la regeneración de plántulas en Gerbera (*Gerbera jamesonii*) en cultivos de tejidos. (Fakhrfeshani *et al.*, 2012).

En otros estudios del uso de nanopartículas plata, los resultados muestran que la concentración de 100 ppm de nanoplata, la cual es agregada directamente al medio puede reducir la contaminación bacteriana y la tasa de exudación fenólica en cultivo *in vitro* de Rosa (*Rosa hybrida L.*), (Shokri, S. *et al.*, 2012).

De acuerdo al uso de soluciones de nanopartículas de plata en el cultivo de tejidos se han obtenido diferentes resultados como la compatibilidad del medio ambiente siendo de bajo costo y también otros hallazgos científicos que muestra que las nanopartículas de plata no son tóxicas para humanos y es probable que los microorganismos no desarrollen resistencia contra la plata, ya que afecta una amplia gama de patógenos (Rai M. *et al.*, 2009).

Puede ser propuesta el uso de nanopartículas de plata como una nueva generación de agente antimicrobiano para el cultivo de tejidos, sin embargo, el limitado estudio sobre los métodos de aplicación ventajas y desventajas de nanopartículas de plata a través del proceso de cultivo de tejidos vegetales y animales, hacen necesarios ensayos experimentales para entender la toxicidad, su actividad como un componente de medio o sus efectos en el explante y en otras especies de patógenos (Fakhrfeshani *et al.*, 2012).

2.5. Generalidades de la vainilla

2.5.1 Importancia de la vainilla

La Vainilla es un género de orquídeas, distribuidas mundialmente en las regiones tropicales. El género de vainilla comprende más de 100 especies, sin embargo se cultivan sólo tres variedades de vainilla comercial por su fruto: *Vanilla tahitensis*, *Vanilla pompona* y *Vanilla planifolia*, ésta última teniendo el valor comercial más alto de las variedades de vainilla.

Vainilla (*V. planifolia*) es una orquídea (Figura 6), comercialmente cultivada por sus vainas de la que se extrae la sustancia llamada vainilla (Geetha y Sudheer, 2000). Se reconocen de 18 a 35 especies del género *Vanilla* que son aromáticas; *V. planifolia*, (Orchidaceae) es la especie cultivada en 95 % de ocho regiones tropicales del mundo dedicadas a su producción, incluyendo México.

La vainilla es la segunda especia más cara del mundo y es utilizada en diversas industrias como la alimentaria, cosmética (perfumes), confitería y decoración. Su uso se concentra al sabor y el aroma característico de este fruto, antes de la funcionalidad y el valor nutricional de los productos derivados de la extracción de las vainas de vainilla (SAGARPA, 2010).



Figura 6. *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews., tomada de Damirón, 2004.

2.5.2 Producción de la vainilla

De las 110 especies de vainilla distribuidas en el mundo, *V. planifolia* es la especie económicamente más importante y (León, 1987) la única explotada en la industria. La producción mundial de vainilla se ha incrementado gracias a que diversos países han domesticado y mejorado las técnicas de producción (Ver Tabla 1). La vainilla es el principal aromatizante de la industria alimentaria, el consumidor está tan acostumbrado a los productos con vainilla que su mercado sigue siendo muy grande y además ha tenido un crecimiento en los últimos años, ya que se han desarrollado nuevas aplicaciones de la vainilla y algunos productos derivados, como los jabones y los artículos bucales, son hoy día mucho más populares (Soto, 2006). Al mismo tiempo, también se ha caracterizado por ser una especia de alto valor así como por ostentar una fluctuación en el precio en los últimos años.

Tabla 1. Indicadores internacionales de producción de Vainilla 2005-2007 (SAGARPA, 2010).

Producción (tons)	2005	2006	2007
China	1000	1200	1350
Comoras	65	75	50
Indonesia	3600	3700	3700
Madagascar	2613	2534	2600
México	280	291	637
Mundo	7980	8310	8667

México se considera uno de los centros de origen de la vainilla (*vainilla planifolia*), sin embargo, la producción de vainilla dentro del país se ha reducido principalmente por la baja productividad que presentan los productores nacionales.

A pesar de que *V. planifolia* es originaria de México, el 90% de la producción a nivel nacional proviene de la región del Totonacapan que comprende nueve municipios veracruzanos y tres poblanos; el resto se produce en Hidalgo, Oaxaca, Tabasco y Quintana Roo. El área establecida con vainilla en México, se estima en 2,000 ha, de las cuales solo 600 están en producción y son

manejadas por unos 1,000 productores (Sánchez *et al.*, 2001). Esto se debe principalmente a dos factores:

- 1) La retención de los frutos se reduce hasta en 50 % por la baja disponibilidad hídrica durante su desarrollo.
- 2) La variación del manejo y sombreado del cultivo.

Un gran número de las parcelas de cultivos de vainilla carecen de infraestructura de riego, pues sólo 8 % de los productores tienen recursos económicos para regar por aspersión y la mayoría destinan áreas pequeñas para el cultivo (alrededor de 0.5 ha) y no hay fuentes de agua superficial o subterránea para riego (Castro *et al.*, 2011).

Por otra parte países como Madagascar, principal país productor a nivel mundial, han incrementado los volúmenes de producción a una escala mayor a la que se presenta en México. El comercio internacional de vainilla es abastecido en gran medida por la producción de Madagascar. México por su parte a pesar de exportar cerca del cien por ciento de la producción nacional es baja su participación en el mercado mundial. La competencia internacional en el mercado de la vainilla está definida por el nivel tecnológico y el grado de organización en la producción entre otros factores. Además de la competencia entre productores de vainilla natural se encuentra en el mercado vainilla sintética, la cual es un sustituto perfecto con un precio en el mercado mucho menor (SAGARPA, 2010).

En México la vainilla es comercialmente propagada por medio de esquejes. Sin embargo el poco control de la calidad en este método ha contribuido en la generación de plagas y enfermedades que son responsables de pérdidas financieras significativas en la producción de vainilla (Pinaría *et al.*, 2010). Existen varios protocolos de micropropagación para *V. Planifolia* (Geetha and Sudheer 2000; Giridhar and Ravishankar 2004; Janarthanam and Seshadri 2008). Sin embargo la mejor opción de propagación para esta especie es por medio de la micropropagación con un Sistema de Inmersión Temporal usando un medio MS y una frecuencia de inmersión de dos minutos cada cuatro horas, pues la multiplicación de los brotes se triplicó comparado a los sistemas con medio sólido, teniendo un 90% de supervivencia en el proceso de trasplante y aclimatización de las plantas cultivadas *in vitro* (Ramos *et al.*, 2014).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, ubicado en Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, congregación Manuel León, municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz. C. P. 94946. MÉXICO.

3.2. Instalación del sistema RITA

Para la instalación del SIT, primeramente se adecuo un espacio físico al interior del Laboratorio, donde se pudo mantener el control de las condiciones de temperatura y humedad necesarias para el desarrollo e incubación de los cultivos *in vitro*.

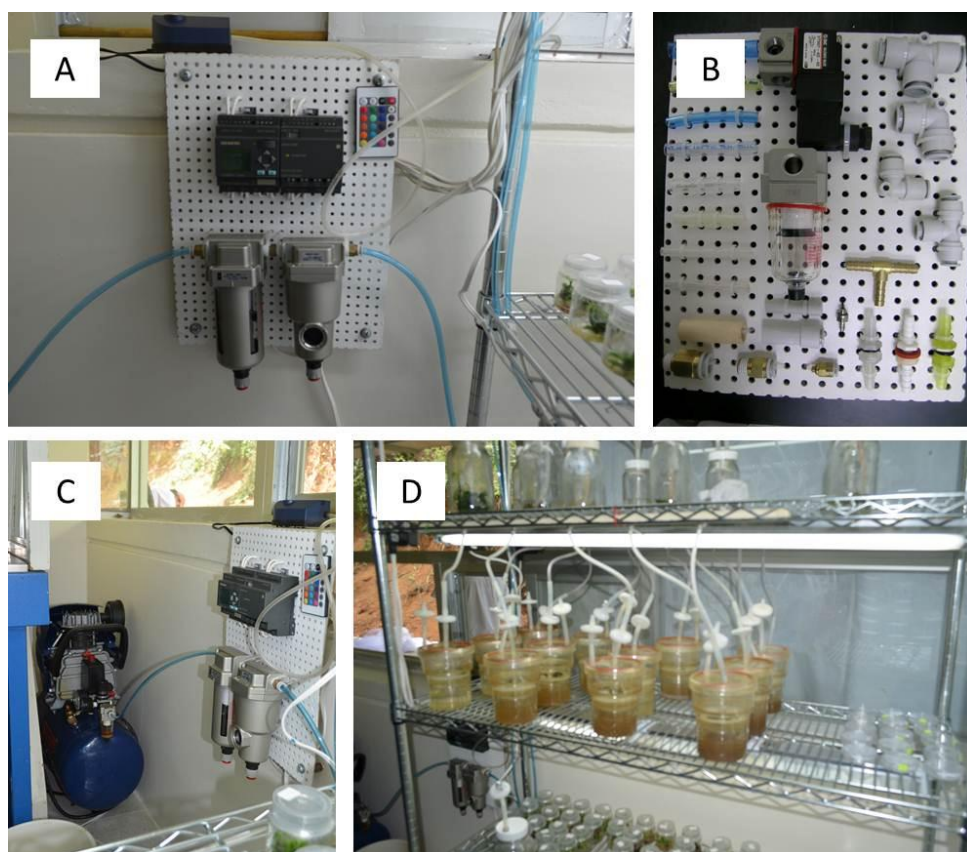


Figura 7. Instalación del Sistema de Inmersión Temporal A) PLC y Filtros de venteo. B) Catalogo de materiales para sistema neumático: tuberías, mangueras y válvulas. C) Compresor conectado a filtros controlado por el PLC. D) Conexión de Biorreactores RITA contenedor® a sistema neumático.

Se dispuso de un anaquel estructurado por 4 repisas (Figura 7). En la repisa superior se instalaron las mangueras utilizando los conectores en T y en L que a su vez, permitieron la conexión a tres válvulas solenoides acopladas eléctricamente a un sistema de temporización programado (PLC) cada una y además, a dos filtros uno de aceite de 5 μ y el filtro de aire de 3 μ empalmados a las mangueras encargadas de conducir el flujo de aire a un solo frasco (capacidad de 350 ml) de cada recipiente que componen un biorreactor. Esta operación se realizó para instalar 12 biorreactores RITA[®].

La adecuación de las válvulas solenoides fue para regular el flujo de aire y garantizar la difusión el medio de cultivo líquido del recipiente, igualmente se llevó a cabo mediante la conexión por mangueras y dos filtros de venteo de 0.2 μ m y 47 mm de diámetro a un compresor de aire con capacidad de 25 L. con una frecuencia de inmersiones de 2 min cada 4 h, temporizado por un PLC SIEMENS LOGO! Logic Module.

3.3. Fuente de explante

Se utilizaron plántulas de la especie vegetal: vainilla (*V. planifolia*) (Figura 8), previamente establecidas en cultivo *in vitro* para la proliferación de brotes.



Figura 8. Plantas de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews en medio sólido.

3.4. Preparación y esterilización de medios de cultivo

En todos los experimentos, en el medio basal contenía las sales y suplementos orgánicos del medio Murashige y Skoog (1962) (Anexo 1) y 3% de sacarosa. El pH fue siempre ajustado a 5.8 ± 0.1 y los medios fueron esterilizados en autoclave a 1.5 Kg/cm² de presión durante 15 minutos.

Para el sistema de inmersión temporal se utilizaron recipientes RITA[®] de 1 litro de capacidad dosificados con 250 ml de medio de cultivo. Los recipientes utilizados, biorreactores, todos ellos conteniendo el medio de cultivo y nanopartículas de plata (NPsAg), fueron esterilizados en el autoclave durante 15 min a 1.05 kg cm⁻² de presión de vapor (121 °C) y se mantuvieron en el área aséptica hasta su utilización.

3.5. Condiciones de incubación

Los explantes una vez colocados en el medio de cultivo, fueron incubados a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con fotoperíodo (16 hrs. luz) a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.6. Efecto de las nanopartículas de plata sobre la contaminación in vitro y el coeficiente de multiplicación

Para evaluar el efecto de las nanopartículas de plata sobre la contaminación en la micropropagación así como el efecto en el coeficiente de multiplicación en los explantes en la Vainilla (*V. planifolia* Jacks ex Andrews) en un Sistema de Inmersión Temporal, se procedió a diseñar un experimento exploratorio, utilizando 12 biorreactores RITA[®] conectados a un sistema neumático automatizado, de acuerdo a diferentes protocolos donde se utiliza nanopartículas de plata en el medio de cultivo, Rosa *R. hybrida* L., (Shokri et al., 2012), Gerbera *G. jamesonii*, (Fakhrfeshani et al., 2012) y Valeriana *V. officinalis* L. (Abdi 2012), se recomienda utilizar concentraciones menores a 100 mg l^{-1} , por lo cual se utilizaron las siguientes concentraciones de nanoplatina: 0 mg l^{-1} , 25 mg l^{-1} , 50 mg l^{-1} y 100 mg l^{-1} , formando 4 grupos de 3 biorreactores.

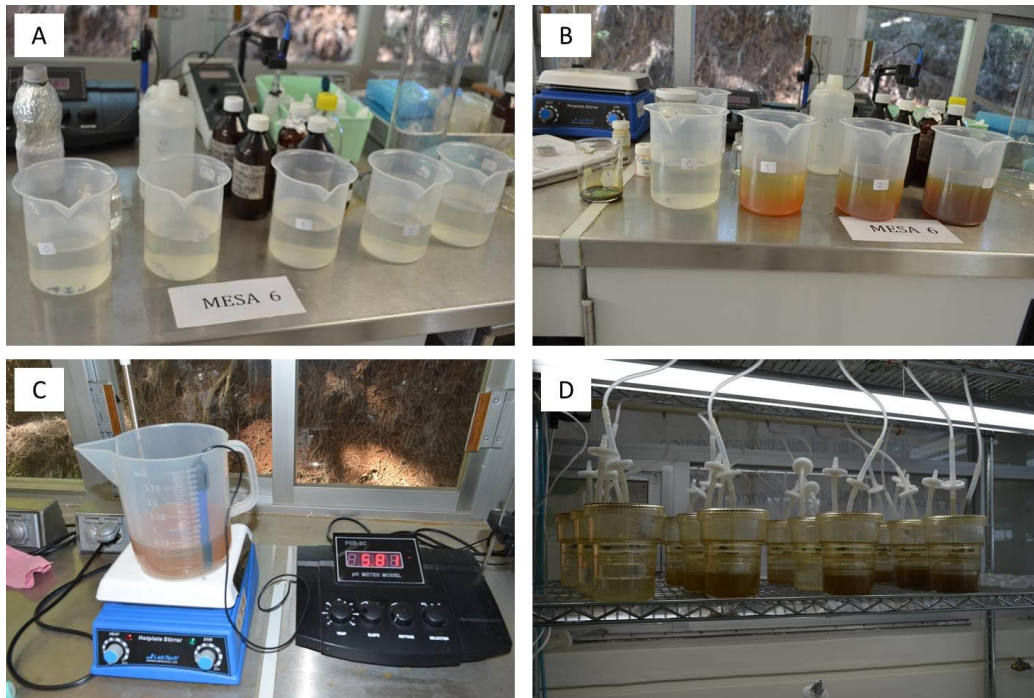


Figura 9. Aplicación de nanoplata en el medio de cultivo líquido. A) Medios de cultivos líquidos sin nanoplata. B) Medios de cultivo con nanopartículas de plata: Recipiente 0=0 mg l⁻¹, 1=25 mg l⁻¹, 2= 50 mg l⁻¹, 3= 100 mg l⁻¹. C) Medición de pH= 5.8 para las 4 concentraciones. D) 3 biorreactores RITA[®] por cada concentración de nanopartículas de plata.

3.7. Diseño experimental y análisis estadístico

Con el fin de diseñar un sistema que permita mejorar la eficiencia de micropropagación de la Vainilla (*V. planifolia* Jacks ex Andrews), se estableció un experimento para evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en 3 diferentes concentraciones y 1 testigo, para lo cual se establecieron cultivos *in vitro* en inmersión temporal, utilizando la mejor frecuencia de inmersión, de 2 min cada 4 h (Ramos *et al.*, 2014). En el siguiente diagrama se explica la secuencia del experimento (Figura 10).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, las evaluaciones de los parámetros de crecimiento y formación de nuevos brotes, se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5 (para Windows). Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y comparación de medias de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$), cuando fue requerido.

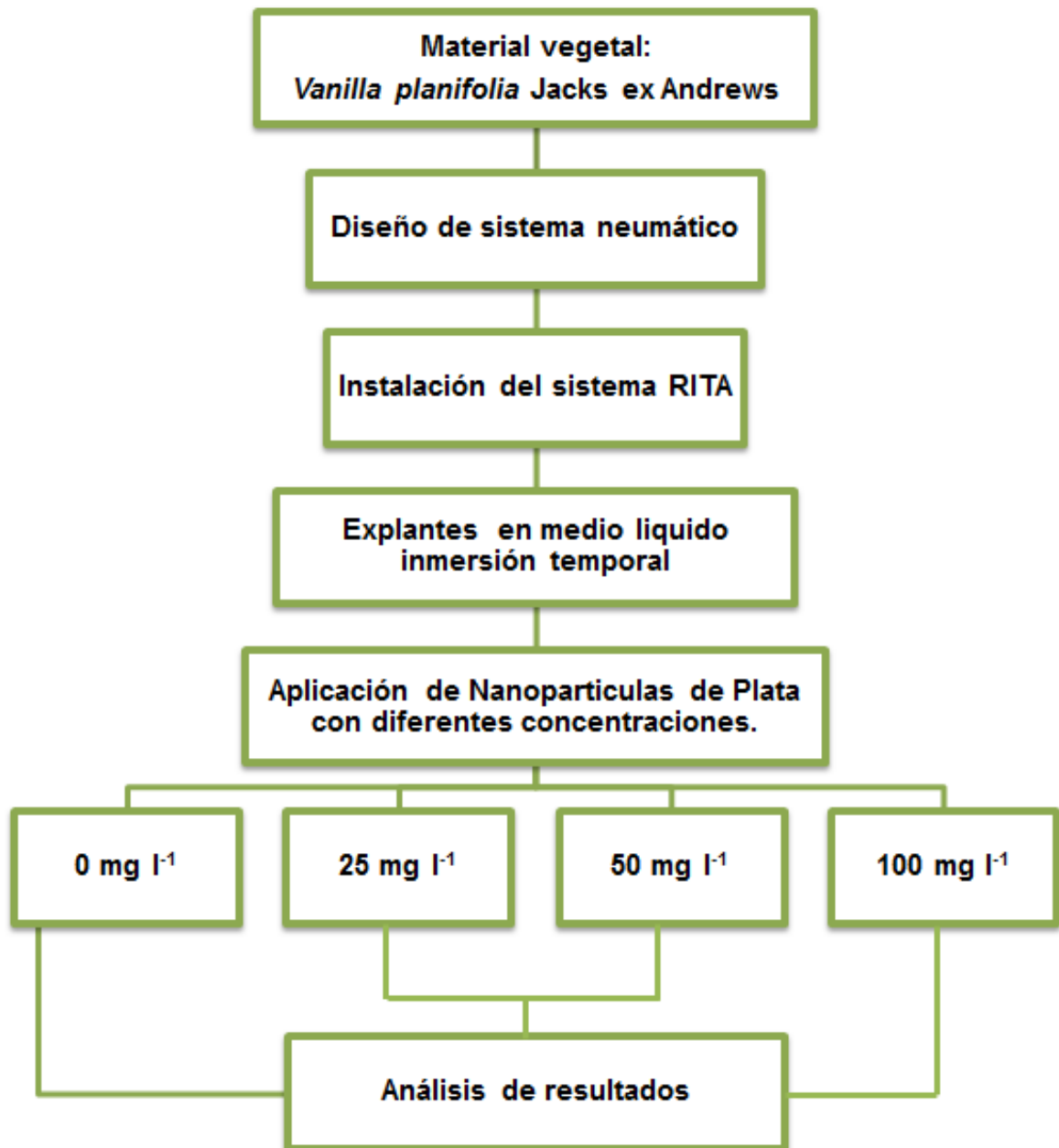


Figura 10. Diagrama experimental establecido para determinar la concentración óptima de nanoplata para reducir el la contaminación *in vitro* y aumente el coeficiente de multiplicación en los explantes en la Vainilla (*V. planifolia* Jacks ex Andrews) a través del uso de biorreactores de inmersión temporal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata sobre la contaminación *in vitro*

Al analizar el efecto de las nanopartículas de plata con diferentes concentraciones (25, 50 y 100 mg l⁻¹) aplicadas al medio de cultivo líquido en biorreactores RITA[®] para la micropropagación *V. planifolia*, se observó que las 3 concentraciones evaluadas inhiben la contaminación a 0%, teniendo un 30% de contaminación en el biorreactor sin aplicación de nanopartículas de plata (ver Tabla 1).

Tabla 2. Efecto de nanopartículas de plata en el porcentaje de contaminación en Vainilla (*V. planifolia*), usando biorreactores de inmersión temporal.

Concentración de Nanopartículas de plata (mg l ⁻¹)	Contaminación (%)
0	30
25	0
50	0
100	0

4.2 Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata y los biorreactores semiautomatizados en el incrementando del coeficiente de multiplicación en la micropropagación

Al evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en diferentes concentraciones en la proliferación de brotes múltiples en el cultivo *in vitro* de Vainilla en inmersión temporal, se observó que la concentración de 25 mg l⁻¹ de nanopartículas de plata aumentó significativamente el número y longitud de brotes por explante de en un rango de 12.0±0.40 y 5.0±0.21, respectivamente. Para el caso de la mayor concentración de nanopartículas de plata (100 mg l⁻¹), se registraron los valores más bajos de número y tamaños de brotes por explante, logrando alcanzar un índice de multiplicación de 4.0±0.19 brotes/explante y 1.0±0.09 cm de largo en los brotes, difiriendo significativamente del elemento testigo 9.8±0.35 brotes/explante y 2.2±0.16 cm de largo. Mientras que la concentración de 50 mg l⁻¹ de nanopartículas de plata, no presenta los valores más bajos del experimento, pero tampoco los más altos en comparación al elemento testigo (ver Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de las nanopartículas de plata en el número y longitud de brotes en Vainilla (*V. planifolia*), utilizando biorreactores de inmersión temporal.

Concentración de nanoplatata (mg l^{-1})	No. de brotes por explante	Longitud de brote (cm)
0	9.8 ± 0.35^b	2.2 ± 0.16^c
25	12.0 ± 0.40^a	5.0 ± 0.21^a
50	7.6 ± 0.25^c	3.5 ± 0.10^b
100	4.0 ± 0.19^b	1.0 ± 0.09^d

Los valores siguientes, denotados con letras indican diferencias significativas estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos representan la media \pm SE. Después de 4 semanas de cultivo *in vitro*.

Resultó evidente que los brotes formados donde fue evaluada la menor concentración de nanopartículas de plata (25 mg l^{-1}), se presentan en mayor número y longitud siendo esta concentración la que mantiene al explante en buenas y mejores condiciones en comparación al elemento testigo (0 mg l^{-1} de nanopartículas de plata). En los experimentos con mayor concentración de nanopartículas de plata (50 mg l^{-1} y 100 mg l^{-1}) presentan menores brotes con tamaños pequeños en comparación al elemento testigo, sin presentar daños en los explantes (Ver Figura 11).



Figura 11. Efecto de las nanopartículas de plata en la proliferación de brotes de vainilla (*V. planifolia*) utilizando biorreactores de inmersión temporal después de 4 semanas de cultivo *in vitro*. a-d: 0, 25, 50 y 100 mg l^{-1} de nanopartículas de plata, respectivamente. Barra = 2 cm.

4.3 Discusión

Una de las mejores técnicas para la micropropagación de vainilla consiste en el uso de SIT de acuerdo a Sreedhar (2009). Utilizando éste sistema con biorreactores Growtek™ obtuvieron 2.46 brotes/explante. Ramos *et al.* (2014) utiliza el sistema RITA® incremento a 14.27 brotes/explante con una longitud promedio de 1.350 cm por explante. En nuestro estudio el uso de nanopartículas de plata (NPsAg) en el medio de cultivo líquido en biorreactores RITA® favoreció el desarrollo de los brotes a bajas concentraciones.

La contaminación bacteriana es considerada como uno de los problemas principales en el proceso de micropropagación de plantas (Panyala *et al.* 2008). Debido a la importancia de controlar la contaminación y lograr los objetivos del cultivo de tejidos, muchos métodos de desinfección han sido sugeridos. La aplicación de hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio, soluciones alcohólicas y antibióticos son los ejemplos más comunes (Mutter *et al.* 2005, Contador y Buchanan 2004). Sin embargo el uso de NPsAg ha demostrado tener efectos antibacterianos y antifúngicos (Nomiya *et al.*, 2004; Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Safavi *et al.* (2011) demostró que las NPsAg tienen efecto potencial para la eliminación de los contaminantes bacterianos en los procedimientos de CTV. Rostami y Shahsavari (2009) recomiendan utilizar bajas concentraciones de nanoplatina como agente desinfectante en el medio de cultivo para Olivo (*Olive Mission*). En uso de NPsAg ha sido también reportado por Shokri *et al.*, (2012) para el cultivo de Rosa *Rosa hybrida L.*, Fakhrfeshani *et al.*, (2012) en Gerbera (*Gerbera jamesonii*) y Abdi (2012) en Valeriana (*Valeriana officinalis L.*). De manera general los resultados obtenidos en éstos estudios demuestran que concentraciones mayores a 100 mg l⁻¹ de nanoplatina puede llegar a ser tóxica para los tejidos vegetales. De acuerdo a Panyala *et al.* (2008) el uso de NPsAg a bajas concentraciones no afecta el crecimiento de las plantas. Aunque éste metal en tamaño macroscópico tiene baja reacción, en dimensiones nanométricas presentan un efecto de esterilización (Shokri *et al.*, 2012). Así también nuestros resultados muestran que las nanopartículas de plata a bajas concentraciones puede controlar de manera similar la contaminación bacteriana en condiciones de cultivo de tejidos.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración óptima de las tres elegidas para su evaluación en este trabajo es la de 25 mg l⁻¹ de nanopartículas de plata (NPsAg), ya que maximiza la productividad de vainilla mediante la micropropagación *in vitro* de Vainilla (*V. planifolia*), en biorreactores RITA[®], reduce la contaminación de 30% en un sistema común de inmersión temporal a 0% de contaminación empleando nanopartículas de plata, obteniendo explantes con mayor proliferación, garantizando la calidad de la producción de Vainilla (*V. planifolia*) mediante este método.

5.1 Perspectivas

En cuanto a las nanopartículas de plata, para evaluar el aumento en el número y crecimiento de brotes se sugiere utilizar concentraciones que oscilen a los 25 mg l⁻¹ sin superar a las concentraciones evaluadas en este trabajo y aplicar este estudio a otras especies.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, G., Salehi, H. and Khosh-Khui, M. 2008. Nano-Silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 709-714.
- Acosta, M., Y. Alvarado y A. Flores. 1999. Contaminantes fungosos en la micropropagación de plantas con el uso de la esterilización química de los medios de cultivo. Libro de reportes cortos "Biotecnología Vegetal". 5° Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal: 239-240.
- Alvarado, Y., L. Garcia, Y. Martinez, D. Ramirez, T. Pichardo y N. Portal. 1999. Estudio de la influencia de la contaminación bacteriana en la micropropagación de caña de azúcar var. Cuba 87-51. Libro de reportes cortos "Biotecnología Vegetal". 5° Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal: 241-243.
- Alvard D., F. Cote and C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55–60.
- Alonso J., Sanchez J. Nanotecnología en España. *Nanociencia y Nanotecnología I*. No. 32. Enero-Febrero 2006.
- Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E and Schnettler R. (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 25 4383-4391.
- Aharoni, M. 2002. Aspects of commercial plant tissue culture propagation in liquid media. 1st International Symposium. 'Liquid Systems for in Vitro Mass Propagation of Plants'. As. Norway p. 70 – 71.
- Ammirato P. (1985). Patterns of development in culture. In: Henke R. K. Hughes K, Constantin M, and Hollaender A (eds.), *Tissue culture in forestry and agriculture*. Plenum Publ., New York p. 9-29.
- Barrett C and Cassells AC (1994). An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. 'Grand Slam' explants in vitro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 36:169-175

- Bello-Bello J. 2012. Reducción de costos y automatización in vitro In: Los Biorreactores en la Micropropagación de Plantas y su Aplicación Comercial (comp.).16-19 de enero. Xalapa, Ver. p. 27.
- Bello-Bello E. 2013. Escalamiento en la micropropagación de la orquídea *Myrmecophila tibicinis*, empleando biorreactores de inmersión temporal (BIT). (Tesis Licenciatura). Universidad Veracruzana.
- Borges M, Estrada E, Pérez I, Meneses S. Uso de los diferentes tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Rev Colomb Biotecnol 2009. 10:127-135.
- Castro, D; Díaz, J y Montoya, N. 2002. Clonal propagation of bananas by biorreactors of temporary immersion. Memorias XV Reunión: Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA. Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología. p. 44-48.
- CIRAD. RITA®, temporary immersion system 2001; <http://www.cirad.fr/produits/rita/es/contact.html>. Consultado el 12 de enero del año 2013 a las 8:00 pm.
- Choi, O., T.E. Clevenger, B. Deng, R.Y. Surampalli, L. Ross y Z.Hu, 2009. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. Water Res., 43: 1897-1886.
- Creus A. (2011). Neumatica e Hidraulica. Marcombo. ESPAÑA.
- P. Digonzelli, L. Díaz y S. Carrizo de Bellone. Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación in vitro de caña de azúcar. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2005, 22: 22-32.
- Domingo J., Gamiz J., Grau A., Martínez H. (2003). Introducción a los autómatas programables. UOC. ESPAÑA.
- Emtiazi, G., M. Hydary and T. Saleh, 2009 Collaboration of Phanerocheate chryso sporium and nanofilter for MTBE removal. The International Conference on Nanotechnology: Science and Applications (Nanotech Insight '09) Barcelona, Spain, March 29-April 2, (2009) pp: 276.
- Etienne H. L., N. Michaux F., P. Carron M., M. Berthouly and C. Teisson. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*

- using the temporary immersion technique. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 33: 81–87.
- Escalante R., Catalán H., Galindo L. y Reyes O. (2007). Desagrarización en México: tendencias actuales y retos hacia el futuro. Documento de trabajo, México.
 - Escalante R., Catalán H. y Galindo L. (2005). Evolución del producto de sector agropecuario mexicano, 1960-2002: algunas regularidades empíricas. *Cuadernos Desarrollo Rural*. Num. 54, pp. 87-112.
 - Escalante S., Rello R. (2000). El sector agropecuario mexicano: los desafíos del futuro. *Comercio Exterior*. Vol. 50. Num.11.
 - Escalona M. Comunicación personal 2007.
 - Fakhrfeshani M., Bagheri A., and Sharifi A. (2012). Disinfecting Effects of Nano Silver Fluids in *Gerbera* (*Gerbera jamesonii*) Capitulum Tissue Culture. *Journal of Biology and Environmental Science*. IRAN.
 - FAO/IAEA (2004). Low cost options for tissue culture technology in developing countries Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26-30 August 2002 February 2004.
 - Ferreira J., Palva R., Ibrahim M., Pinto E. (2003). Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of Annonaceae leaf segments cultured *in vitro*. *Fruits / Volume 58 / Issue 06 / noviembre 2003* , pp 357-361 © CIRAD, EDP Sciences.
 - FIA (Fundación para la Innovación Agraria). (2009). Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. CHILE.
 - Geetha S, Sudheer A. (2000). *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Curr Sci* 79:885–889.
 - George E. (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd., Edington
 - Gholamhoseinpour Anvar (2012) Effects of Nanosilver and Vancomycin in sterilization of Peach x Almond hybrids in te invitro cultures. *International Journal of AgriScience*, IRAN.

- Gholamreza Abdi (2012). Evaluation the potential of Nano silver for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. Persian Gulf Research and Studies Center, Persian Gulf University, Boushehr 75168, IRAN.
- Giridhar P, Ravishankar GA. (2004). Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. Under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian J Biotechnol* 3:113–118.
- Hernández F., Martínez J., y Rodríguez R. (2011). Desarrollo de una metodología para la evaluación de proyectos de automatización de procesos electroneumáticos mediante un autómeta programable y una interfaz humano-maquina a través de simulación virtual. (Tesis Licenciatura). Instituto Politécnico Nacional. MEXICO.
- Hussain S, Lane SD, and Price DN (1994). A preliminary evaluation of the use of microbial culture filtrates for the control of contaminants in plant tissue culture systems. *Plant Cell Tiss Org Cult* 36:45-51.
- Ip M, Lui S L, Poon V K M, Lung I and Burd A 2006 *J. Med. Microbiol.* 55 59-63.
- Jain, D., Daima, H.K., Kachhwaha, S. and Kothari, S. 2009. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. *Digest journal of nanomaterials and biostructures*, 4: 557-563.
- Janarthanam B, Sheshadri S. (2008). Plantlet regeneration from leaf derived call us of *Vanilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cell Dev Biol–Plant*44:84–89.
- Jones J., and Sluis C. (1991). Marketing of micropropagated plants. In Debergh P and Zimmerman R, (ed), mac Millan New York, p: 141-54.
- Kvittek L., Panacek A., Pucek R., Soukupova J., Vanickova M., Kolar M., and Zboril R.(2010). Antibacterial activity and toxicity of silver - nanosilver versus ionic silver. *Nanosafe2010: International Conference on Safe Production and Use of Nanomaterials. Journal of Physics: Conference Series* 304 (2011) 012029.

- Lamsal K, Woo S, Hee J, Seok Y, Su K, Su Y. Application of silver Nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species *in vitro* and pepper *Anthraco*nose disease in field. *Mycobiology* 2011; 39(3): 194-199.
- Leifert C, Waites B, Keetley JW, Wright SM, Nicholas JR, and WM. Waites. 2000. Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 42:149-155.
- Levin R., Gaba V., Tal B., Hirsch S., Denola D., and Vasil I. (1988). Automated plant tissue culture for mass propagation. *Bio/Technology* 6:1035-1040.
- Millán S. (1995). Automatización neumática y electroneumática. *NORGREN*.16-17.
- Mroginski L, Sansberro P, Flaschland E. establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. *Biotecnología y Mejoramiento vegetal INTA* 2010; 1: 35.
- Mulet M., De la Cruz G., Otero M., González A., Brito L., y Marañón M. (1999). Sistemas de Inmersión Temporal Automatizado. *Tecnología Química* Vol. 19, No. 1. 22-24.
- Mutter J, Naumann J, Schneider R, Walach H, and Haley B (2005). Mercury and autism: Accelerating Evidence. *Neuroendocrinol Lett* 26(5):439–446
- Nomiya K, Yoshizawa A, Tsukagoshi K, Kasuga NC, Hirakava S, and Watanabe J (2004). Synthesis and structural characterization of silver (I), aluminium (III) and cobalt (II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitiol) showing noteworthy biological activities. Action of silver (I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities. *J Inorg Biochem* 98:46-60.
- Pankhurst CE (1977). Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. *Canad J Microbiol* 23:1026–1033
- Panyala, N.R., Peña-Méndez, E.M. and Havel, J. 2008. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health. *J Appl Biomed*, 6: 117-129.

- Perez-Molphe-Balch E., R. Ramirez-Malagon, H. Nuñez-Paleniús y N. Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes (ed), Primera edición México. 179 pp.
- Perugorría M. (2013). Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en biorreactores. (Tesis Maestría). Universidad de la República. URUGUAY.
- Pinaria AG, Liew EC, Burgess LW (2010). *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australas Plant Path* 39:176–183.
- Ponsa P., Vilanova R. (2005). Automatización de procesos mediante la guía GEMMA. Edicions de la Universitat Politècnica de Catalunya, SL. Barcelona, ESPAÑA.
- Poveda G. (2007). Modelo matemático y dimensional para el planteamiento óptimo de industrias de procesos. Instituto tecnológico metropolitano. COLOMBIA.
- Rai M, Yadav A, and Gade A (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27: 76-83.
- Ramos A., Iglesias L., Bello J., and Lee H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant Tissue Culture*. DOI10.1007/s11627-014-9602-8. MEXICO.
- Rostami, A. and Shahsavari, A. 2009. Nano-Silver particles eliminate the in vitro contaminations of olive 'Mission' explants. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8: 505-509.
- Safavi, K., Esfahanizadeh, M., Mortazaeinezhad, D.H. and Dastjerdi, H. 2011. The study of Nano-Silver (NS) antimicrobial activity and evaluation of using NS in tissue culture media. *International Conference on Life Science and Technology IPCBEE*.
- SAGARPA (2010). Estudio de oportunidades de Mercado internacional para la vainilla mexicana. Fideicomiso de riesgo compartido. Comité estatal Sistema Producto Vainilla de Puebla A.C.

- Sarmast, M., Salehi, H. and Khosh-Khui, M. 2011. Nano-Silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* explants. *Acta Biologica Hungarica*, 62: 477-484.
- Sánchez M., y Salaverría J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.) *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 21-26. 2004.
Sánchez S, Becerril A, Tijerina L, Santizo J. (2001). Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción de Papantla, Veracruz. *Rev Fitotec Mex* 2001; 24:49-56.
- Shokri, S. Babaei, A., Ahmadian, M. and Arab, M. M. (2012). The effects of different concentrations of Nano-Silver on elimination of Bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (*Rosa hybrida* L.) in vitro culture. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran.
- Smart DR A, FerroK, Ritchie and Bugbee BG (1995). On the use of antibiotics to reduce rhizoplane microbial populations in root physiology and ecology investigations. *Physiol Plant* 95:533–540
- Sondi I and Salopek-Sondi B (2004). Silver nano particles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 275:177-182
- Soto MA.(2006) La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. *Biodiversitas* 2006; 66: 1-9.
- Sreedhar RV (2009). Novel approaches for molecular analyses, micropropagation and curing of vanilla (*Vanilla planifolia*). PhD thesis. University of Mysore, New Delhi, India.
- Steward F., Ammirato P., and Mapes M., (1970). Growth and development of totipotent cells; some problems, procedures and perspectives. *Ann. Bot.* 34: 761-787.
- Taji AM, Dodd WA, Williams RR (1993). *Plant Tissue Culture Practice*. University Of New England. London.
- Teisson C. D. and D. Alvard. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. pp: 105 -110.

- Tompkins, J.A., White, J.A., Bozer, Y.A. y Tanchoco, J.M.A. "Planeación de instalaciones". Editorial Thomson, Tercera Edición, 2006.
- Usui, K., K. Okabe, P. Victories y A. Ramírez. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. ICTA Guatemala, Gua. 165 p.
- Ziv M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 277-285.
- Ziv M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticulture Review* 24: 1-30.

ANEXO 1

Se utilizó el medio Lee-Espinoza (2008) modificado que consistió en: medio MS suplementado con 9.55 μM de BA, 150 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 35mg L⁻¹ de cisteína, 100 ml L⁻¹ de agua de coco y 2.2 g L⁻¹ de phytigel correspondiente a 1 L de medio de cultivo.

MEDIO MS (MURASHIGUE Y SKOOG 1962)

SOLUCIONES CONCENTRADAS

SOLUCION A: CONCENTRACION 10X VOLUMEN 50 mL.

KNO ₃	9.5 g
NH ₄ NO ₃	8.25 g

SOLUCION B: CONCENTRACION 10X VOLUMEN 50 mL.

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.85 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.0825 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.043 g

SOLUCION C: CONCENTRACION 10X VOLUMEN 50 mL.

CoCl ₂	0.000125 g
KI	0.00415g
CaCl ₂	1.65 g

SOLUCION D: CONCENTRACION 10X VOLUMEN 50 mL.

KH_2PO_4	0.85 g
H_3BO_3	0.031 g
$\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00125 g

SOLUCION E: CONCENTRACION 10X VOLUMEN 50 mL.

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0139 g
Na_2EDTA	0.0185 g

SOLUCION F: CONCENTRACION 10X VOLUMEN 50 mL.

Glicina	0.01 g
Mio-inositol	0.5 g
Acido nicotínico	0.0025 g
Pyrodoxina HCl	0.005 g
Tiamina HCl	0.0005 g
