

Germinación *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación

In vitro germination of *Vanilla planifolia* Jacks seeds and comparison of micropropagation methods

Oscar Flores Castaños,¹ Juan Francisco Cuéllar Zometa,²
María Elena Montes de Godoy,² Martín Roberto Gámez Pastrana,¹
María Teresa González Arnao,^{3*} Marina Guevara Valencia³
y Noé Aguilar Rivera¹

¹ Universidad Veracruzana (UV), Campus Córdoba-Orizaba
Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Peñuela, Amatlán SN, Centro
Amatlán de los Reyes, Veracruz (México) (C. P. 94945).
Teléfono: 01 2717166129

² Universidad Católica de El Salvador (UNICAES)
By pass a Metapán y Carretera Antigua a San Salvador
Santa Ana, El Salvador.
Teléfono: 5032484060

³ Universidad Veracruzana (UV), Campus Córdoba-Orizaba
Facultad de Ciencias Químicas
Prolongación de Avenida Oriente 6 1009, Rafael Alvarado
Orizaba, Veracruz (México) (C. P. 94340).
Teléfono: 01 2727240120

*Correspondencia: mtgarnao1@hotmail.com

Resumen

En este trabajo se evaluó el cultivo *in vitro* con la especie *Vanilla planifolia*, a través de la germinación de semillas de cápsulas colectadas en áreas identificadas en El Salvador. Se compararon dos métodos de micropropagación, el convencional por cultivo en medio semisólido y en medio líquido usando biorreactores de inmersión temporal. Por análisis de prospección se seleccionó una localidad al occidente del país donde se colectaron cápsulas de tres tamaños: 4 cm, 9 a 10 y de 15 a 18 cm. La germinación *in vitro* de semillas se indujo en medio semisólido Murashige y Skoog (MS) con la adición o no

Abstract

In this work, we evaluated the *in vitro* culture of *Vanilla planifolia* specie through germination of seeds from capsules collected in identified areas of El Salvador. Two micropropagation methods were compared, the conventional by the culture on semisolid medium, and in liquid medium using temporary immersion bioreactors. By prospection analysis we selected a location at the occident of the country where capsules of three sizes: 4 cm, 9 to 10 and 15 to 18 cm were collected. *In vitro* germination of seeds was induced on semisolid medium Murashige and Skoog (MS) with or without addition of

de carbón activado y el cultivo en condiciones de fotoperiodo o en total oscuridad. Los brotes obtenidos se propagaron después de cinco subcultivos en medio semisólido MS modificado con la adición de hormonas y en biorreactores de inmersión temporal tipo BIT®. Con ambos métodos, se evaluó la altura alcanzada, el número de brotes formados y la capacidad formadora de brotes (CFB) a los 30 días de cultivo. Los resultados demostraron que el 90 % de las semillas inmaduras de cápsulas de 9 a 10 cm germinaron *in vitro* a los dos meses de cultivo en oscuridad. No se encontraron diferencias significativas entre el número de brotes y la CFB para ambos métodos de propagación, aunque la inmersión temporal, propició un mayor crecimiento en el mismo tiempo de cultivo. No obstante, los resultados obtenidos corroboraron la utilidad de ambas alternativas biotecnológicas para la multiplicación *in vitro* de vainilla.

Palabras clave

Prospección, colecta, cápsulas, medio semisólido, inmersión temporal.

activated charcoal, and by culture under photoperiod conditions or in total darkness. Shoot regenerated were multiplied after five subcultures on semisolid medium MS modified with addition of hormones and in liquid medium using temporary immersion bioreactors BIT® type. With both methods the height reached was evaluated, the number of shoots formed and the shoot formation capacity (SFC) after 30 days of culture. The results demonstrated that 90 % of immature seeds from capsules of 9-10 cm germinated *in vitro* after two months of culture in darkness. No significant differences were detected between the number of shoots formed and the SFC for both methods, although the temporary immersion, produced more growth in the same culture time. Nevertheless, the obtained results corroborated the utility of both biotechnological alternatives for *in vitro* multiplication of vanilla.

Keywords

Prospection, collect, capsules, semisolid medium, temporary immersion.

Introducción

V*anilla planifolia* es una especie que pertenece a la familia Orchidaceae y constituye la fuente natural por excelencia para la obtención de vainillina, producto de gran valor comercial por su amplio uso a nivel industrial como saborizante y aromatizante (Dignum *et al.*, 2001; Sagarpa, 2010). Este género comprende alrededor de 110 especies distribuidas en las regiones tropicales del mundo, excepto en Australia (Purseglove *et al.*, 1981; Bory *et al.*, 2008).

De las especies reconocidas del género *Vanilla*, se ha determinado que 15 son originarias de México y Centroamérica; de las cuales, las dos más cultivadas son *V. planifolia* y *V. pompona*, que además se encuentran emparentadas (Azofoifa-Bolaños *et al.*, 2014; Soto-Arenas y Dressler, 2010).

Las áreas con mayor prioridad de protección son aquellas con altas concentraciones de especies que mantienen la estructura y funcionalidad de los ecosistemas. La identificación y localización de estas áreas se realiza mediante estudios de prospección, utilizando como antecedentes fundamentales los indicadores del grado de polimorfismo, distribución geográfica de las especies, configuración de los paisajes, entre otros parámetros (Squeo y Arroyo, 2001). Por lo tanto, la identificación y localización de estas áreas potenciales contribuye al desarrollo del conocimiento biológico de las especies, a la conser-

vación de la biodiversidad y representan una alternativa importante de apoyo para el rescate y preservación de un patrimonio natural en términos ecosistémicos (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014).

La importancia del estudio de la vainilla como cultivo, no sólo radica en su potencial económico, sino también, por su relevancia como recurso genético primario que se encuentra severamente amenazado en su hábitat original. Las causas fundamentales están asociadas al desconocimiento de la variación genética de especies silvestres, a la excesiva recolección para su propagación vegetativa y a la pérdida de la calidad del producto, debido a la subutilización de otras especies distintas a la *V. planifolia* (Bory *et al.*, 2008; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012; Soto-Arenas, 2006).

Esta problemática afecta principalmente a los productores que la utilizan como sustento familiar, por lo que resulta necesario establecer alternativas que contribuyan no sólo al rescate de la especie, sino también a establecer metodologías de propagación que garanticen la disponibilidad de material para solventar las necesidades de los distintos sectores de interés.

La micropropagación es el proceso de multiplicación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Esta es una de las aplicaciones más extendidas entre todas las técnicas que componen la llamada biotecnología vegetal; ello se debe a su enorme productividad, al compararse con las técnicas tradicionales de propagación (Debergh y Read, 1991). Entre las ventajas que ofrece este proceso destacan: el mantenimiento de las características genotípicas del material inicial, el uso de ambientes controlados en condiciones asépticas y el número ilimitado de plantas que se pueden obtener a corto plazo (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

La tasa a la cual los cultivos *in vitro* crecen y producen yemas durante la micropropagación puede estar influenciada por la composición y tipo de medio de cultivo utilizado (George *et al.*, 2008). Generalmente, se emplean medios semisólidos o medios líquidos. El medio semisólido presenta la desventaja de tener una baja tasa de multiplicación en algunas especies y que se requiera lavar el agente gelificante utilizado (Agar, fitagel, entre otros) de las raíces, antes de trasladar las plántulas al sustrato para su cultivo *ex vitro* (Evans *et al.*, 1984).

Por su parte, el medio líquido —aunque propicia mayores tasas de crecimiento— debido a que facilita la adsorción de nutrientes por el aumento de la superficie de contacto del explante con el medio, presenta la desventaja de que la inmersión continua de los tejidos provoca síntomas de estrés por oxidación y vitrificación (Hvoslef-Eide *et al.*, 2005). Los problemas que presentan los medios líquidos pueden ser superados con el uso de métodos alternativos, como los biorreactores de inmersión temporal; los cuales se basan en sólo la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, permitiendo el intercambio gaseoso dentro del recipiente que los contiene (Damiano *et al.*, 2003).

La implementación de estos sistemas automatizados para la propagación de plantas en condiciones *in vitro*, y específicamente en el caso de la *Vanilla planifolia*, ha demostrado que el sistema de Biorreactores de Inmersión Temporal tipo BIT® favorece la generación de plantas vigorosas y sin anomalías morfológicas, además de representar una

alternativa económica para la micropropagación comercial que puede aplicarse a otras especies (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016).

El cultivo *in vitro* de la vainilla, generalmente, se inicia con la introducción y establecimiento de las yemas axilares después de un proceso riguroso de desinfección de los explantes. Aunque pudiera pensarse que inducir la geminación *in vitro* de sus semillas sería una práctica muy conveniente, este proceso no se realiza porque —a diferencia de muchas otras orquídeas— sus semillas no germinan.

Al considerar estas dificultades y con la intención de definir alternativas metodológicas que contribuyan a mitigar estos aspectos, el objetivo de este trabajo fue aplicar técnicas de cultivo de tejidos para estudiar la germinación *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia* colectadas en El Salvador y evaluar, comparativamente, dos métodos de micropropagación: cultivo en medio semisólido y en sistemas de inmersión temporal.

Materiales y métodos

Parámetros utilizados para la realización de estudios de prospección

Se utilizaron datos georreferenciados de colectas de especies nativas del género *Vanilla*, distribuidas desde México hasta el norte de Sudamérica, a través de la Infraestructura Mundial de Información en Biodiversidad (GBIF) con mayor énfasis en la localización de áreas en el territorio salvadoreño. Para cada sitio se verificó la ubicación, empleando la base de datos de GEONet Names Server (GNS). La identidad taxonómica se corroboró utilizando la lista de cotejo para la familia Orchidaceae (Govaerts *et al.*, 2015).

Los datos georreferenciados por especie, junto con 19 capas de información bioclimática de WORLDCLIM versión 1.4 (Hijmans *et al.*, 2008) a una resolución de 30 segundos de arco y modelos digitales de elevación para el área (Jarvis *et al.*, 2008), fueron empleados para la generación de mapas de distribución potencial por especie. Las variables bioclimáticas se derivaron de valores mensuales de temperatura y precipitación, que representan tendencias anuales, estacionales y factores extremos ambientales. Los datos utilizados correspondieron a colectas de material biológico dentro de un amplio rango temporal, desde 1960 hasta el año 2015, realizadas desde el norte de México hasta el norte de Sudamérica.

Los modelos de distribución potencial se realizaron usando el programa MaxEnt versión 3.3.3k (Elith *et al.*, 2011) y los parámetros: porcentaje de prueba aleatoria de 20%, dos réplicas y, como regla de umbral, el percentil 10 de los datos de presencia de entrenamiento. Los mapas generados por MaxEnt se reclasificaron para generar mapas binarios de ausencia-presencia, con una línea de corte igual al promedio de los umbrales de las dos réplicas.

Del total de especies se seleccionaron aquellas cuyos mapas binarios indicaban sitios idóneos para la presencia de *Vanilla* dentro del territorio salvadoreño y se sumaron para generar un mapa único que mostrara espacialmente la factibilidad de encontrar de una a

tres especies. Para la obtención de límites departamentales se utilizó la base de datos de áreas administrativas globales, versión 2.8.

Colecta e introducción in vitro semillas

Se realizó la colecta de cápsulas en el mes de junio antes del mediodía, en temporada de lluvias en la finca Matala, Ahuachapán en el municipio de la Concepción de Ataco (El Salvador). Se seleccionaron tres cápsulas de tres tamaños (4 cm, 9 a 10 cm y de 15 a 18 cm) con un grosor de 0.5 a 1 cm y todas de coloración verde intenso, a pesar de las diferencias en las dimensiones. El material colectado se transfirió al Laboratorio de Cultivo de Tejido de la Universidad Católica de El Salvador (UNICAES) para iniciar los trabajos de germinación *in vitro*.

Desinfección de las cápsulas y cultivo in vitro de semillas

Se realizó la desinfección superficial manteniendo las cápsulas sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 5% y tres gotas de Tween® 80 en 100 mL de agua durante 20 minutos. Se realizaron tres lavados con agua tratada en ósmosis inversa durante tres minutos y el material lavado se introdujo en una cámara de flujo laminar. Posteriormente, las cápsulas se sumergieron en etanol al 95% y se colocaron sobre una lámina de papel aluminio donde se flamearon hasta la combustión total del etanol.

Terminado el proceso de desinfección en condiciones asépticas, se procedió a realizar la disección de las cápsulas con ayuda de un bisturí, efectuando cortes primeramente en los extremos y luego un solo corte longitudinal a la mitad de la cápsula. Las semillas con un tamaño máximo de 0.5 mm y de color blanco arenoso se extrajeron y dispersaron sobre el medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) con la adición (2.5 g L^{-1}), o no, de carbón activado, ajustado a un pH de 5.8 y previamente esterilizado a 122°C a una presión de 1.75 kg cm^2 por 15 minutos.

Para inducir la germinación *in vitro*, las semillas colocadas sobre el medio nutritivo se mantuvieron bajo dos condiciones de cultivo: fotoperiodo a 16h luz/8h oscuridad con una intensidad lumínica de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y en total oscuridad; ambas, a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Cuando las semillas mantenidas a la oscuridad mostraron indicios claros de ruptura de la testa, fueron transferidas a las condiciones de fotoperiodo, con la finalidad de inducir su desarrollo expuestas al nivel de iluminación estándar utilizado en el cultivo *in vitro*.

A los cuatro meses de iniciados los experimentos de germinación, los brotes que se desarrollaron fueron propagados en un medio MS semisólido modificado por la adición de 2 mg L^{-1} de 6-*N*-Bencilaminopurina (BAP), 1 mg L^{-1} de Ácido Indol-3-Butírico (IBA) y 3 g L^{-1} de fitagel (SIGMA).

Propagación in vitro

Medio semisólido

La propagación en medio semisólido se realizó utilizando plántulas de la especie *V. planifolia* donadas por la UNICAES al Laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal

de la Universidad Veracruzana, las cuales se obtuvieron por germinación *in vitro* de semillas de los frutos colectados en El Salvador. Después de 30 días del último subcultivo (cinco subcultivos) en el medio de propagación, anteriormente descrito, el material se homogenizó mediante el corte a una altura inicial de 2 cm y los explantes se transfirieron nuevamente al medio de cultivo semisólido y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura.

Biorreactores de inmersión temporal tipo BIT®

Para la propagación mediante el método de inmersión temporal, se empleó el modelo tipo BIT® utilizando igualmente explantes con un tamaño inicial de 2 cm y provenientes de la propagación en medio semisólido, como se describió anteriormente. Se instaló un módulo de cinco biorreactores consistente, cada uno, de dos recipientes de capacidad de 1 litro interconectados por tubos de silicona. Un frasco se utilizó para mantener el medio de cultivo líquido, empleando 230 mL, y otro, para contener los explantes. Los biorreactores se esterilizaron primeramente vacíos en autoclave a la misma presión descrita, pero aumentando el tiempo de esterilización a 20 minutos.

Posteriormente, se armaron en campana de flujo laminar y se colocaron 13 vitroplántulas por cada sistema, así como el volumen de medio de cultivo, previamente indicado en los respectivos frascos. El periodo de inmersión de las plántulas en el medio líquido y la frecuencia se reguló a 1 minuto de inmersión cada 4 horas, mediante el uso de cronómetros programados y conectados a válvulas solenoides que controlan el paso del aire y regulan el traslado del medio líquido de un recipiente a otro. Todo esto, producto de la presión de aire interna en el rango de 60-100 Bar generada con ayuda de un compresor.

Evaluación del crecimiento y formación de nuevos brotes

Se realizó la evaluación del desarrollo de los explantes sometidos a ambos métodos de propagación a los 30 días de cultivados. Se midió la altura de las plántulas en crecimiento y se contabilizó el número de brotes obtenidos. Adicionalmente, se calculó la capacidad de formación de brotes (CFB), acorde a la formulación establecida por Pulido *et al.* (1992).

$$CFB = \frac{(\text{Promedio de brotes por explante})(\% \text{ de explantes con brotes})}{100}$$

Análisis estadístico

Los experimentos de germinación *in vitro* a pesar de que contemplaron la comparación de tres tamaños de cápsulas, la adición o no de carbón activado al medio nutritivo y dos condiciones de cultivo (luz y oscuridad), no se procesó estadísticamente debido a la imposibilidad de cuantificar el número de semillas por cápsula. La evaluación de este proceso únicamente se realizó observando la ocurrencia de germinación o no. Los ensayos de los dos métodos de propagación (medio semisólido y BIT) se llevaron a cabo por duplicado

con una $n: 13$ y los parámetros evaluados fueron altura, formación de nuevos brotes y CFB. Se aplicó un análisis de varianza y las medias se compararon según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico MINITAB® Versión 17.1.0 (Lesik, 2009).

Resultados

Estudios de prospección

Los estudios de prospección realizados permitieron identificar áreas potenciales de colecta con probabilidades de encontrar de una a tres especies de vainilla. Acorde al programa MaxEnt, las especies con mayor probabilidad de presencia en el territorio salvadoreño fueron *V. odorata*, *V. planifolia* y *V. pompona*.

El mapa resultante mostró la localización de zonas geográficas con base en una escala de grises, la cual se representó gráficamente en la figura 1 con formas geométricas: sitios donde encontrar una sola especie, se indicaron con el rectángulo; dos especies, con el óvalo; y hasta tres especies, con el triángulo.

A partir de este análisis se asumió que las dos áreas señaladas con triángulos y localizadas en la zona occidental o centro-oriental del Territorio de El Salvador, deberían ser las más apropiadas para realizar colecta. Estratégicamente, se seleccionó por cercanía y facilidades de acceso desde Santa Ana, el departamento de Ahuachapán, región ubicada en el Municipio de la Concepción de Ataco y se trazó una ruta factible para llegar al área localizada en las siguientes coordenadas: $13^{\circ}49'06.10''N$ y $89^{\circ}54'26.00''O$ (figura 2).

Figura 1

Distribución potencial de *V. odorata*, *V. planifolia* y *V. pompona* en El Salvador.

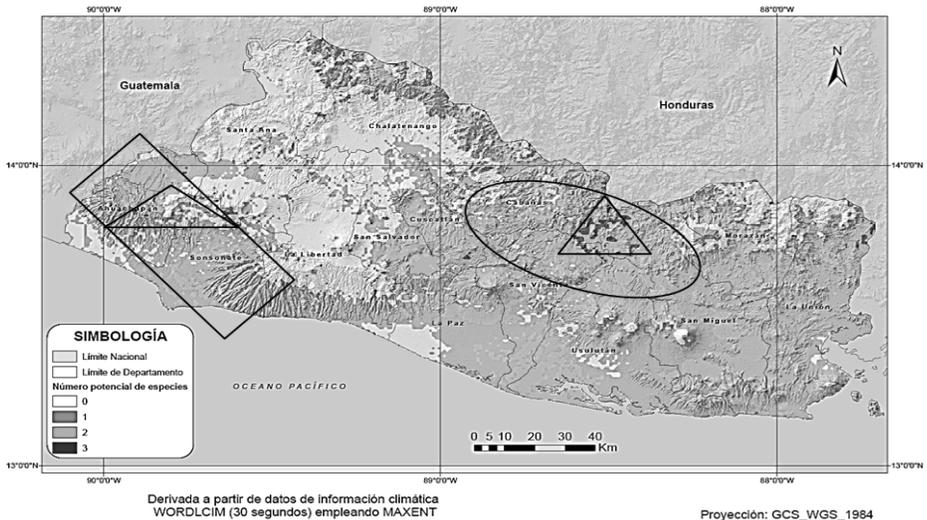


Figura 2

Ruta establecida para la colecta de cápsulas de vainilla (*V. planifolia*) en el departamento de Ahuachapán, municipio de la Concepción de Ataco (El Salvador).



Estudios de germinación de semillas in vitro

La evaluación realizada —a los cuatro meses de cultivo *in vitro* de las semillas de vainilla— demostró que las que provenían de cápsulas con tamaños de 4 y de 15 a 18 cm, no germinaron bajo ninguna de las condiciones estudiadas de medio de cultivo (con o sin carbón activado) y expuestas, o no, al fotoperiodo.

En cambio, las semillas obtenidas de cápsulas de tamaño intermedio (9 a 10 cm), empezaron a germinar (alrededor del 90%), al cabo de los dos meses de cultivo, cuando se utilizó el medio MS sin carbón activado y se mantuvieron en total oscuridad.

Después de este periodo, los brotes generados y transferidos a la luz, alcanzaron un tamaño aproximado de 1 cm después de los siguientes dos meses y a pesar de que se observó una ligera segregación de fenoles hacia el medio de cultivo (figura 3). Las semillas cultivadas igualmente en la oscuridad, pero en medio con carbón activado, no germinaron (figura 4).

Figura 3

Brotos obtenidos de la germinación *in vitro* de semillas de *V. planifolia* después de 2 meses de cultivo en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) semisólido en total oscuridad y 2 meses posteriores expuestos a fotoperiodo (intensidad lumínica $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura 26°C .

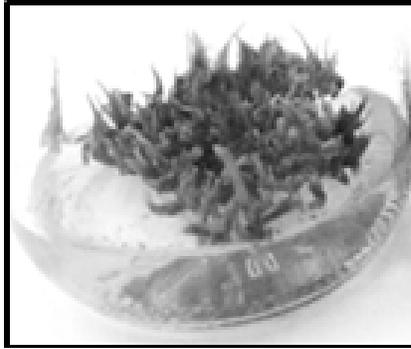


Figura 4

Semillas de *V. planifolia* no germinadas después de 2 meses de cultivo en la oscuridad en medio MS con carbón activado.



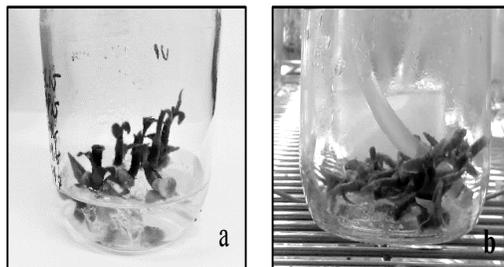
Comparación de la propagación en medio semisólido y en biorreactores de inmersión temporal

En las figuras 5a y b, se puede apreciar el desarrollo de los brotes a los 30 días de cultivo, bajo ambos métodos de propagación.

Figura 5

Propagación *in vitro* de explantes de *Vanilla planifolia*
después de 30 días de cultivo:

a) propagación en medio semisólido, b) propagación en el biorreactor tipo BIT®.

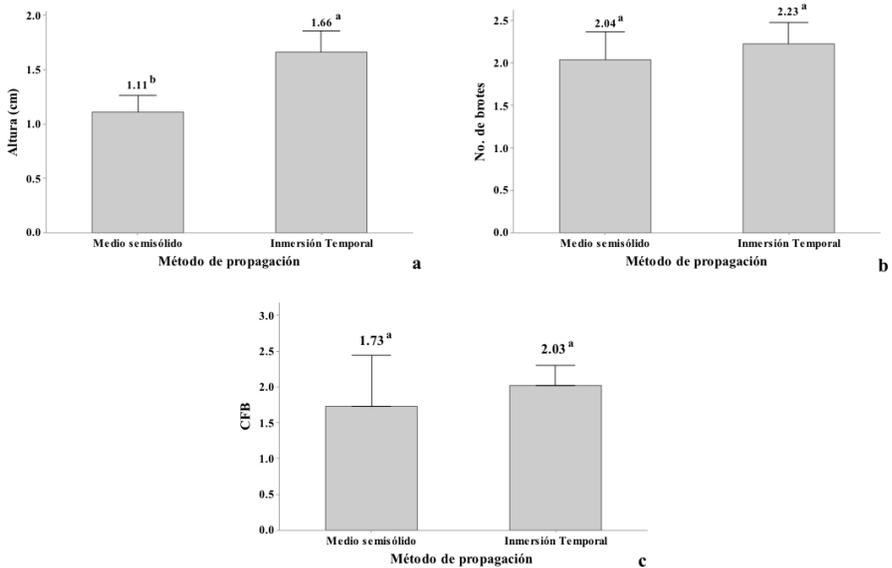


En el medio de cultivo semisólido, los explantes alcanzaron una altura máxima de 2.10 cm, con un crecimiento promedio de 1.11 cm. En el caso de la propagación en biorreactores, se observó que la elongación máxima alcanzada ascendió a 4.10 cm, duplicando la obtenida en medios semisólidos y lo que resultó significativamente mayor, con un crecimiento promedio de 1.66 cm.

A los 30 días de cultivo, el mayor número de brotes formados con la propagación en medio semisólido fue de 8, con una media general de 2.04 por explante y el 15%, no generó brotes y la CFB fue de 1.73; con el método de inmersión temporal, el mayor número de brotes formados fue de 5 con un promedio general de 2.23 y el 23 %, no generó brotes, y la CFB fue 2.03, lo que representó 0.30 unidades más que con la propagación en medio semisólido. No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre estos parámetros para los dos métodos evaluados (figura 6b y c).

Figura 6

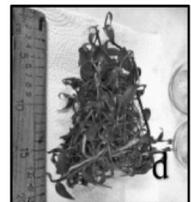
Efecto del método de propagación en la altura (a), formación de brotes (b) y Capacidad Formadora de Brotes (CFB) (c) después de 30 días de cultivo.



La instalación de un sistema de biorreactores de inmersión temporal tipo BIT® (figura 7a y b) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNICAES, igualmente evidenció altos índices de multiplicación de plántulas vigorosas desarrolladas al cabo de tres meses de cultivo (figura 7c y d).

Figura 7

Implementación de biorreactores de inmersión temporal para la propagación *in vitro* de *V. planifolia* en la UNICAES: a) y b) implementación, c) extracción de las vitroplantas obtenidas en el biorreactor, d) evaluación de la calidad de las plantas.



Discusión

Realizar estudios exploratorios y de prospección, favorece el desarrollo de estrategias de colecta y la adquisición de material biológico perteneciente a un ecosistema con características específicas (Prina y Alfonso, 2002). Estos análisis sobre bases científicas contribuyen a la localización de territorios donde pueden encontrarse especies de interés, aun cuando no hayan sido anteriormente explorados.

Los estudios de prospección usando un número similar de capas de información ambiental (WorldClim y altitud) ha sido empleado con éxito para determinar la distribución de otras especies de orquídeas como *Vanda bicolor* (Deb *et al.*, 2017). En el caso específico de El Salvador y de acuerdo a datos de investigaciones anteriores (Soto-Arenas y Dressler, 2010), existe información muy limitada sobre la distribución del género *Vanilla*. Por lo tanto, estos resultados fueron de utilidad para identificar áreas donde encontrar diferentes especies de vainilla en dicho país y en Centroamérica.

El uso del cultivo de tejidos para el establecimiento de colecciones y bancos de germoplasma a partir de la germinación *in vitro* de semillas de vainilla, es una alternativa subutilizada, dado que se conoce que es un proceso complejo e ineficiente, que no es recomendable debido a que la germinación es errática (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014), sus semillas son muy pequeñas, presentan un embrión indiferenciado, tienen tegumentos muy duros (Pedroso-de-Moraes *et al.*, 2012) y cerosos que contienen inhibidores de germinación (Bory *et al.*, 2008).

En respuesta a esta problemática, diversos autores han ensayado distintas metodologías y en la mayoría de los reportes logrados, se han utilizado híbridos de esta especie. Los máximos valores de germinación han sido variables: 33% (Knudson, 1950), 64% (Lugo, 1955) y 85% (Menchaca *et al.*, 2011); mediante modificaciones del medio de cultivo, como la disminución de la concentración de nitrógeno o de iones (Lugo, 1955) o añadiendo reguladores como glutamina y el sulfato de adenina (Menchaca *et al.*, 2011).

En algunos casos se ha recomendado realizar una escarificación de las semillas utilizando altas concentraciones de ácido sulfúrico en tiempos cortos (Pedroso-de-Moraes *et al.*, 2012) o simplemente, incubar a 32 °C en total oscuridad (Knudson, 1950). Experimentos realizados con semillas de cápsulas maduras con coloración en tonos café y cultivadas *in vitro* bajo las mismas condiciones que resultaron favorables en este estudio, no garantizaron la germinación y, por el contrario, sólo mostraron el hinchamiento y oxidación de las semillas, lo que demuestra que el estado fisiológico respecto al grado de madurez de las cápsulas y por consiguiente de las semillas, es determinante (resultados no publicados), sin embargo, a pesar de las complejidades para germinar semillas de vainilla *in vitro*, esta opción continúa siendo un desafío por su utilidad, ya que las semillas constituyen una fuente biológica ilimitada para la obtención de nuevas plantas y una alternativa adicional para la propagación masiva en condiciones aséptica debido a su gran abundancia por cápsula.

En el presente trabajo, la metodología de germinación *in vitro* se basó en el uso de semillas inmaduras de *V. planifolia* provenientes de frutos con un tamaño máximo de 10

cm. A diferencia de otros reportes (Menchaca *et al.*, 2011), no se utilizaron semillas de cápsulas de un híbrido, así como tampoco la adición de hormonas al medio de inducción. El cultivo en la oscuridad durante los primeros dos meses contribuyó a evitar el fenómeno de fotooxidación.

En la actualidad, los avances de los trabajos de investigación enfocados al sector agroindustrial, contribuyen al desarrollo de nuevas tecnologías que reducen los costos de producción, el tiempo de manipulación, aumentan la tasa de multiplicación y mejoran la calidad de las plántulas obtenidas (Caamal-Velázquez y Bello-Bello, 2014). La ventaja de implementar la micropropagación es que permite generar a corto plazo grandes volúmenes de plantas y en buen estado fitosanitario (Divakaran y Babu, 2009).

En este trabajo, los dos métodos de propagación *in vitro* aplicados produjeron plántulas vigorosas y aunque el sistema de inmersión temporal logró una elongación significativamente mayor de los explantes, no se encontraron diferencias estadísticas entre el número de brotes obtenidos y la CFB en comparación con el cultivo en medio semisólido.

Estos resultados corroboran por una parte, que los sistemas de inmersión temporal propician un crecimiento más rápido en el mismo tiempo de cultivo y a su vez demuestran que ambas alternativas biotecnológicas son de utilidad y pueden estar influenciadas por las condiciones propias de cada laboratorio, lo que explicaría las diferencias con lo obtenido y reportado por otros autores (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016) utilizando las mismas metodologías de propagación en vainilla.

Conclusiones

Los estudios científicos de prospección apoyaron la identificación de áreas potenciales de localización de la especie *Vanilla planifolia* en El Salvador, así como el trazado de una ruta adecuada para la colecta del material utilizado en los estudios de germinación y propagación *in vitro* de germoplasma de vainilla.

Se corroboró la utilidad de emplear semillas inmaduras extraídas de cápsulas con tamaños de 9 a 10 cm para lograr alrededor de un 90% de germinación *in vitro* con la especie *Vanilla planifolia*. Se obtuvieron brotes al cabo de dos meses de cultivo en total oscuridad, utilizando un medio MS sin reguladores de crecimiento.

A pesar de no detectarse diferencias significativas entre la propagación en medio semisólido o en biorreactores de inmersión temporal respecto al número de brotes y la CFB, la inmersión temporal produjo un crecimiento significativamente mayor. No obstante, de manera general, los resultados obtenidos demuestran la utilidad de ambas alternativas para la multiplicación *in vitro* en dicha especie.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero proporcionado por el proyecto SEP-CONACYT de Ciencia Básica No. 166332 que auspició la colaboración científica entre la Universidad Veracruzana y la Universidad Católica de El Salvador (UNICAES).

Literatura citada

- Azofeifa-Bolaños, J. B.; Paniagua-Vásquez, A. y García-García, J. A. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (*Orchidaceae*) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 25(1): 189-202.
- Bory, S.; Grisoni, M.; Duval, M. F. and Besse, P. (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: Present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55(4): 551-571.
- Caamal-Velázquez, J. H. y Bello-Bello, J. (2014). Manual de micropropagación de caña de azúcar (*Sacharum* spp.). *Fundación Produce Campeche*. México. 1-24 pp.
- Damiano, C.; Gentile, A.; La Starza, S. R.; Frattarelli, A. y Monticelli, S. (2003). Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae*. (616): 359-364.
- Deb, C.R.; Jamir, N.S. y Kikon, Z.P. (2017). Distribution Prediction Model of a Rare Orchid Species (*Vanda bicolor* Griff.) Using Small Sample Size. *American Journal of Plant Sciences*, 8: 1388-1398 pp.
- Debergh, P. C. y Read, P. E. (1991). Micropropagation. En: P. C. Debergh y R. H. Zimmerman (Eds.). *Micropropagation: Technology and Application*. Dordrecht: Springer Netherlands. 1-13 pp.
- Dignum, M. J. W.; Kerler, J. y Verpoorte, R. (2001). Vanilla Production: Technological, Chemical, and Biosynthetic Aspects. *Food Reviews International*. 17(2): 119-120.
- Divakaran, M. y Babu, K.N. (2009). Micropropagation and *in vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). En: *Methods in Molecular Biology*. pp. 129-138.
- Eliith, J.; Phillips, S. J.; Hastie, T.; Dudík, M.; Chee, Y. E. y Yates, C. J. (2011). A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*. 17(1): 43-57.
- Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Bravo, J. E. (1984). Cell culture methods for crop improvement. En: W. R. Sharp; D. A. Evans; P. V. Ammirato y Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*. Macmillan: New York. 47-68 pp.
- George, E. F.; Hall, M. A. y Klerk, G. J. (2008). Plant Tissue Culture Procedure. En: E. F. George, M. A. Hall y G. J. De-Klerk. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer Netherlands. Dordrecht 1-28 pp.
- Govaerts, R.; Newman, M. y Lock, J. M. (2015). World Checklist of *Orchidaceae*. *Royal Botanic Gardens*. Recuperado a partir de <http://apps.kew.org/wcsp/>. (Consultado el 19 de enero del 2017).
- Herrera-Cabrera, B. E.; Salazar-Rojas, V. M.; Delgado-Alvarado, A.; Campos-Contreras, J. y Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*. 2(1): 43-50.
- Hijmans, R. J.; Cameron, S. E.; Parra, J. L.; Jones, P.; Jarvis, A. y Richardson, K. (2008). WorldClim version 1.4. <http://www.worldclim.org>. (Consultado el 10 de diciembre de 2008).
- Hvoslef-Eide, K. A. y Preil, W. (2005). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer Netherlands. Dordrecht. 588 pp.
- Jarvis, A.; Upadhyaya, H.; Gowda, C.; Aggarwal, P. K.; Fugisaka, S. y Anderson, B. (2008). *Climate Change and its Effect on Conservation and Use of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture and Associated Biodiversity for Food Security*. Thematic study for the SoW Report on PGRFA FAO. Rome, Italy. 26 pp.
- Knudson, L. (1950). Germination of Seeds of Vanilla. *American Journal of Botany*. 37(3): 241.
- Lesik, A. S. (2009). *Applied Statistical Inference with MINITAB®*. New Britain, Connecticut Chapman and Hall/CRC; Har/Cdr edition. U.S.A. 464 pp.
- Lugo, H. L. (1955). The Effect of Nitrogen on the Germination of *Vanilla planifolia*. *American Journal of Botany*. 42(7): 679.
- Menchaca, R.; Ramos, J.; Moreno, D.; Luna, M.; Mata, M.; Vázquez, L. y Lozano, M. (2011). Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13(1): 80-84.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Pedroso-de-Moraes, C.; de Souza-Leal, T.; Panosso, A. R. y de Souza, M. C. (2012). Effect of chemical scarification and concentration of nitrogen on the germination and *in vitro* development of *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (*Orchidaceae: Vanilloideae*). *Acta Botanica Brasilica*. 26(3): 714-719.

- Peréz-Molphe-Balch, E.; Ramírez, R.; Núñez, H. G. y Ochoa, N. (1999). *Introducción al cultivo de tejidos*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 179 pp.
- Prina, A. y Alfonso, G. (2002). La importancia actual de las prospecciones florísticas en biología de conservación. Una experiencia en el árido del centro-oeste de Argentina. *Ecosistemas*. 3. 8.
- Pulido, C. M.; Harry, I. S. y Thorpe, T. A. (1992). Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 29(3): 247-255.
- Purseglove, J. W.; Green, C. L.; Brown, E. G. y Robbins, S. R. J. (1981). *Spices*. Wiley-Blackwell (Vol. 2). Longman, London and New York. 88-736 pp.
- Ramírez-Mosqueda, M. A. e Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 52(2): 154-160.
- SAGARPA (2010). Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla mexicana. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/VAINILLA.pdf. (Consultado el 19 de enero de 2017).
- Soto-Arenas, M. A. (2006). La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. *Biodiversitas*. 66: 1-9.
- Soto-Arenas, M. A. y Dressler, R. (2010). A Revision of the Mexican and Central American Species of *Vanilla plumier* Ex Miller with a characterization of their its region of the nuclear Ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9(3): 285-354.
- Squeo, F. A. y Arroyo, M. T. K. (2001). Presentación científica del *Libro Rojo* de la flora nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo. En: F. A. Squeo, G. Arancio y J. R. Gutiérrez. *Libro Rojo de la flora nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo*. La Serena, Chile. Universidad de la Serena. 3-11.

Recepción: 01 de febrero de 2017

Envío arbitraje: 07 de febrero de 2017

Dictamen: 05 de julio de 2017

Aceptación: 22 de septiembre de 2017



Título: *Retrato agropecuario de Colima*

Dimensiones: 19.5 x 24.5 cm

Técnica: Acuarelas y lápiz sobre papel corrugado

Autora: Marisol Herrera Sosa