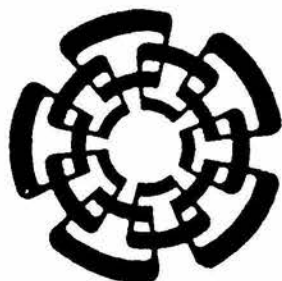
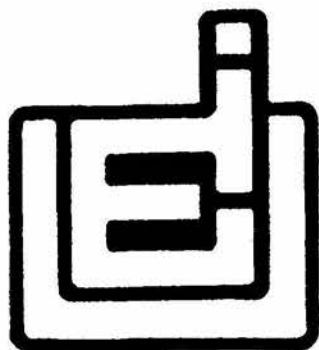




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES:
IZTACALA



ESTUDIOS SOBRE LA INDUCCION Y DESARROLLO DEL CULTIVO
DE CALLOS DE *Vanilla planifolia*, PARA LA
PRODUCCION DE VAINILLINA.



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ANTONIO LEJARAZO CRUZ.

LOS REYES IZTACALA, EDO DE MEXICO

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTUDIOS SOBRE LA INDUCCION Y DESARROLLO DEL CULTIVO
DE CALLOS DE Vanilla planifolia, PARA LA
PRODUCCION DE VAINILLINA.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del M. en C. Graciano Calva Calva en co-tutoría con la Q.F.B. Elvira Ríos Leal.

DEDICATORIAS

A MI MADRE:

POR TODO EL SACRIFICIO QUE REALIZASTE
PARA QUE SIGUIERA ADELANTE EN LA VIDA
POR TODO ESTO GRACIAS.

A MI HERNANA AURELIA (MI SEGUNDA MADRE):

POR TU APOYO INCONDICIONAL, POR QUE
SIEMPRE DISTE MAS DE TI Y AUN MAS DE
TUS POSIBILIDADES. GRACIAS.

A MIS HERMANOS Y SOBRINOS.

POR SU APOYO Y PALABRAS DE ALIENTO A LO
LARGO DEL CAMINO DE NUESTRAS VIDAS,
DESEANDO QUE CULMINEN SUS METAS.

A AURORA:

POR SU AMOR, APOYO, COMPRESION Y CONFIANZA
POR COMPARTIR CONMIGO CADA MOMENTO PARA
ALCANZAR NUESTRAS METAS.

A G R A D E C I M I E N T O S

- Al M. en C. Graciano Calva Calva por su valiosa ayuda en la realización de esta tesis, por su apoyo incondicional.
- A la Q.F.B. Elvira Rios Leal por su participación en el presente trabajo, por la ayuda brindada en la asesoría de los análisis cromatográficos, realizados en su laboratorio.
- Al Dr. Fernando Esparza García, por la oportunidad que me brindó, por su apoyo y palabras de aliento.
- A todas aquellas personas que me alentaron a seguir en este camino de la ciencia.
- A mis compañeros del laboratorio de cultivo de células vegetales del CINVESTAV, que contribuyeron de una u otra forma en mi formación.

INDICE TEMATICO

Indice de Tablas y Figuras.....	I
Abreviaturas.....	IV
Resumen.....	1
1. Introducción.....	4
Objetivos.....	6
Plan de Trabajo.....	7
2. Antecedentes.	
2.1. Descripción Botánica de <i>Vanilla planifolia</i> (L) Andrews.....	8
2.2. Cultivo de Células y Tejidos Vegetales (C.C.T.V).....	14
3. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i>	26
4. Materiales y Métodos	
4.1 Material Biológico.....	29
4.2 Desinfestación del material biológico.	
4.2.1. Desinfestación de las semillas.....	29
4.2.2. Desinfestación del tejido (planta).....	30
4.3 Establecimiento de cultivos.	
4.3.1. Germinación de las semillas.....	30
4.3.2. Propagación del material biológico.....	31
4.3.3. Inducción de tejido calloso.	
4.3.3.1.A) Planta adulta.....	31
4.3.3.2.B) Plántulas <i>in vitro</i>	31
4.4 Cultivo de células en suspensión.....	32
4.5 Cinética de crecimiento callo-callos.....	33
4.6 Ensayos	
4.6.1. Determinación del peso fresco de callos.....	33
4.6.2. Determinación del peso seco de callos.....	33
4.6.3. Determinación de parámetros cinéticos.....	34
4.7 Técnicas analíticas.	
4.7.1. Determinación de vainillina y compuestos relacio- nados.....	34
4.8 Modelo estadístico.....	35
5. Resultados.	
5.1 Desinfestación y germinación de las semillas.	
5.1.1. Efecto del tiempo de exposición y concentración del agente desinfectante en la germinación de - semillas de vainilla.....	37

5.2	Micropropagación de <i>Vanilla planifolia</i>	38
5.3	Estudios con cultivos de callos de vainilla.	
5.3.1.	Efecto del balance del 2,4-D y CIN sobre la inducción de callos de <i>Vanilla planifolia</i> adulta.....	38
5.3.2.	Efecto del balance del AIA/CIN sobre la inducción de callos de <i>Vanilla planifolia</i> obtenida <i>in vitro</i>	39
5.3.3.	Efecto del balance del 2,4-D y CIN en la inducción de callo en explantes de tallo de <i>Vanilla planifolia</i> obtenida <i>in vitro</i>	40
5.3.4.	Efecto del balance ANA/BAP en la inducción de callo de <i>V. planifolia</i> obtenida <i>in vitro</i>	42
5.3.5.	Efecto del balance p-CPA/CIN y del medio de cultivo en la inducción de callo de <i>V. planifolia</i> obtenida <i>in vitro</i>	43
5.3.6.	Efecto del balance ANA/BAP en la inducción de callos de <i>V. planifolia</i> obtenida <i>in vitro</i>	44
5.3.7.	Efecto del tipo y posición del explante en la inducción de callos de <i>Vanilla planifolia</i> obtenida <i>in vitro</i>	45
5.3.8.	Efecto de la intensidad de luz sobre la inducción y crecimiento de callo de <i>Vanilla planifolia</i>	46
5.3.9.	Cultivo de células en suspensión de <i>Vanilla planifolia</i>	47
5.3.10	Cinética de crecimiento de callos de <i>Vanilla planifolia</i>	48
5.3.11	Producción de vainillina y compuestos relacionados en callos de <i>Vanilla planifolia</i>	49
6.-	Discusión.	
6.1	Desinfestación del material vegetal y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Vanilla planifolia</i>	51
6.2	Micropropagación de <i>Vanilla planifolia</i>	55
6.3	Estudios con el cultivo de callos.....	57
7.-	Conclusiones.....	75
8.-	Recomendaciones para Investigaciones Futuras.....	76
9.-	Tablas y Figuras.....	77
10.-	Bibliografía.....	107

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA.

I.- Metabolitos secundarios de plantas de mayor uso industrial.....	78
II.- Composición de las vainas de vainilla.....	79
III.- Constituyentes de la fracción volátil obtenidas de las vainas de <i>Vanilla planifolia</i>	80
IV.- Propiedades físicas de la vainillina.....	81
V.- Logros del Cultivo de Tejidos Vegetales en el problema de la vainilla.....	82
VI.- Composición de los medios de cultivo utilizados para el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	83
VII.- Matriz experimental y número de tratamientos, utilizados para estudiar el efecto del balance de los reguladores de crecimiento Acido 2,4-Diclorofenoxiacético/Cinetina sobre la inducción de callo en explantes de tallo y hoja de planta adulta de <i>Vanilla planifolia</i> , en los medios de cultivo MS y/o SH.....	84
VIII.- Efecto del proceso de acondicionamiento y desinfestación de semillas de <i>Vanilla planifolia</i> sobre su frecuencia de contaminación y germinación <i>in vitro</i>	85
IX.- Efecto del balance de la relación AIA/CIN en la inducción de callo a partir de explantes de tallo, hoja y raíz de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i> en el medio SH.....	86
X.- Efecto del Tipo y Posición del explante en la inducción de callo de <i>Vanilla planifolia</i>	87

FIGURA.

1.- Plan de trabajo.....	7
2.- Procedimiento para la inducción de callo.....	88
3.- Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales....	89
4.- Esquema de algunas de las partes de la planta de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews).....	90
5.- Diferentes partes del esqueje de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews).....	91
6.- Biotransformación de glucovainillina y vainillina du-	

- rante el beneficio de las vainas de vainilla.....92
- 7.- Inducción de brotes en explantes de tallo de *Vanilla planifolia* a partir de planta adulta crecida en condiciones naturales y de plántulas *in vitro*, cultivadas en los medios MS y SH suplementados con 1 mg/l de BAP como regulador de crecimiento.....93
- 8.- Efecto de la relación AIA/CIN en la inducción de brotes, en explantes de tallo, de plántulas obtenidas *in vitro*, desarrollados en el medio de cultivo SH. En cada tratamiento se emplearon 9 explantes.....94
- 9.- (A) Efecto del balance de los reguladores de crecimiento 2,4-D/CIN sobre de explantes de tallo de *Vanilla planifolia* desarrollados en el medio SH-M y (B) Formación formación de brotes. Con 9 explantes por tratamiento.....95
- 10.- Efecto del balance del 2,4-D/CIN sobre explantes de tallo de *Vanilla planifolia*, crecidos en el medio Bs. (A) Formación de estructuras organoides y (B) Número de brotes totales presentes en cada tratamiento. Con 9 explantes por tratamiento.....96
- 11.- (A) Efecto del balance de los reguladores de crecimiento 2,4-D/CIN en la morfogénesis de explantes de tallo de *Vanilla planifolia*, en el medio MS y (B) Número de brotes totales formados en cada tratamiento....97
- 12.- Efecto del balance de los reguladores de crecimiento ANA/BAP en la organogénesis, (A) durante la inducción de callo, en explantes de tallo de *Vanilla planifolia* crecidos por 7 meses en el medio Bs; (B) Formación de brotes y (C) Formación de callo.....98
- 13.- Efecto del balance ANA/BAP en la formación de callo. (A) Callos crecidos y mantenidos en el medio Bs durante un período de 16 meses de cultivo. (B) Número de callos totales en cada tratamiento después de 16 meses de cultivo.....99
- 14.- Efecto del balance p-CPA/CIN en la formación de brotes, durante la inducción de callo, en explantes de tallo de vainilla, crecidos en los medios SH (A), Bs (B) y MS (C), cada tratamiento con 9 explantes.....100
- 15.- Efecto del balance de los reguladores de crecimiento ANA/BAP, en la inducción de callo y la formación de

brotes a partir de explantes tallo de <i>Vanilla planifolia</i> , crecidos en el medio Bs (A-B) y MS (C-D), durante un período de 6 meses.....	101
16.- Representación esquemática de la plántula y posición de los explantes utilizados para la inducción de callo. Los números representan los tipos de explantes usados en la experimentación.....	102
17.- Respuesta del efecto de la luz sobre la inducción de callo y formación de brotes, en explantes de tallo de vainilla, crecidos en los medios MS (A-B), Bs (C-D) y SH (E-F), con 9 explantes por tratamiento.....	103
18.- Cinética de crecimiento de callos de <i>Vanilla planifolia</i> crecidos en el medio Bs suplementado con 10 μ M de BAP y 0.1 μ M de ANA.....	104
19.- Análisis por CLAR de callos de <i>Vanilla planifolia</i> . (A) Cromatograma de los estándares de varios de los componentes del sabor de vainillina, para cuantificar la producción en callos de <i>Vanilla planifolia</i> . (B) Cromatograma del perfil del sabor de vainilla producido en callos de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	105
20.- Cinética de crecimiento de callos de <i>Vanilla planifolia</i> y su producción de (A) V: Vainillina, AV: Acido vainillínico, BA:p-hidroxibenzaldehído, BZ: Ac.p-hidroxibenzoico, (B) DHZ: Ac. 3,4-dihidroxibenzoico, ApC:Acido p-cumárico, ACf: Acido cafeico.....	106

ABREVIATURAS

- AIA** = Acido-3-Indolacético.
- ANA** = Acido Naftalenacético.
- B5** = Medio de Gamborg, Miller & Ojima, 1968.
- BAP** = 6-Bencilaminopurina.
- CCTV** = Cultivo de Células y Tejidos Vegetales.
- CIN** = Cinetina.
- CLAR** = Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- p-CPA** = Acido p-Clofenoxiacético.
- 2,4-D** = Acido 2,4-Diclorofenoxiacético.
- IC** = Índice de Crecimiento.
- mM** = Concentración milimolar.
- MS** = Medio de Murashige & Skoog, 1962.
- PF** = Peso de la Biomasa Fresca.
- PS** = Peso de la Biomasa Seca.
- RCV** = Reguladores de Crecimiento Vegetal.
- SH** = Medio de Schenk & Hildebrandt, 1972.
- SH-M** = Medio de Schenk & Hildebrandt Modificado.
- t_d** = Tiempo de duplicación celular
- μ** = Velocidad de crecimiento específica (días⁻¹).
- μM** = Concentración micromolar
- $\mu\text{g/g}$ de PS** = microgramos por gramo de Peso Seco.
- g/l** = gramos por litro.
- mg/l** = miligramos por litro.
- (v/v)** = Concentración porcentual (volumen/volumen).
- cm** = centímetros.
- mm** = milímetros.
- lb/plg²** = libras por pulgada cuadrada.

RESUMEN

La técnica de cultivo de tejidos vegetales se ha considerado como una alternativa potencial en la producción de metabolitos secundarios, donde queda comprendida la vainillina y los compuestos relacionados responsables del sabor vainilla de amplio uso en las industrias de saborizantes y farmacéutica.

En este trabajo se estudió el efecto que ejercen los reguladores de crecimiento auxinas, citocininas y medios de cultivo sobre la germinación de semillas, propagación masiva de la planta, inducción de callo a partir de diferentes fuentes de explantes y la producción de vainillina y otros componentes del sabor natural de vainilla, en cultivos *in vitro*.

Después de diferentes preacondicionamientos de tipo físico y químico, se favoreció la germinación de las semillas de vainilla. Estas germinaron en los medios MS y SH bajo regímenes de luz y obscuridad, doce semanas después de inoculadas, reduciéndose el tiempo de germinación comparado con el que se reporta en la literatura. Las plántulas obtenidas *in vitro*, sirvieron como fuente de explantes para la propagación de la planta y la inducción de callo. La propagación se llevó a cabo de esquejes de planta adulta y de plántulas *in vitro*, las cuales formaron 460 nuevos brotes en los esquejes de plántulas *in vitro* y 220 de los de planta adulta en el medio SH suplementado con 1 mg/l de BAP, en 5-6 semanas.

Los explantes de planta adulta no respondieron a los efectos de los reguladores de crecimiento, ya que no se diferenciaron o desdiferenciaron, además dichos tejidos estaban contaminados por la presencia de bacterias sistémicas, limitando esto su establecimiento *in vitro*.

Con los reguladores AIA y CIN en el medio SH, los explantes formaron nódulos amarillentos, alargamiento de raíz y brotes múltiples. Mientras que con el 2,4-D y CIN en los medios de cultivo SH, MS y Bs, se propició principalmente organogénesis. Por otra parte al emplear 0, 0.1 y 10 μM de ANA y 10, 100 μM de BAP el tejido formó callo en el medio Bs, pero, a bajas concentraciones de ANA y BAP el tejido se diferenció formando brotes múltiples. Ahora bien, al utilizar p-CPA y CIN en los medios MS, SH y Bs, en general el tejido se diferenció formando una gran cantidad de brotes múltiples en cada uno de los medios respectivamente.

La mejor posición del explante para la inducción de callo fue el primer nudo de la planta (esqueje de la parte baja), sin que se observara alguna capacidad organogenética por parte de los callos, y aunque otras posiciones lograron desarrollar callo, estos mostraron un alto grado de regeneración organogenética.

La mayor formación de callo, se presentó bajo los regímenes de luz de 0-5400 lux, con 0.1 μM de ANA y 10 μM de BAP en el medio MS, siendo muy baja la frecuencia de formación de callo en los medios SH y Bs, volviéndose a presentar una cantidad alta de brotes múltiples.

La cinética de crecimiento de callos tuvo una duración de 68 días, presentando una $\mu = 0.037 \text{ d}^{-1}$, $t_d = 19.05$ y un $\text{IC} = 4.04$ para el peso fresco, mientras que para el peso seco se obtuvo una $\mu = 0.036 \text{ d}^{-1}$, $t_d = 18.25$ y un $\text{IC} = 3.82$.

El análisis del cultivo de callos mediante CLAR mostró que produjeron vainillina (11.52 $\mu\text{g/g}$ de PS), ácido vainillínico (160 $\mu\text{g/g}$ de PS), p-hidroxibenzaldehído (113.06 $\mu\text{g/g}$ de PS), ácido p-hidroxibenzoico (196.07 $\mu\text{g/g}$ de PS), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (1879.48 $\mu\text{g/g}$ de PS), ácido caféico (288.74 $\mu\text{g/g}$ de PS) y ácido

p-cumárico (492.41 $\mu\text{g/g}$ de PS). Sin embargo, a lo largo de la cinética, dicha producción no fue un proceso continuo, sino que ésta se presentó interrumpidamente con incremento y disminución de los compuestos, hecho que no estuvo relacionado de una manera clara con el crecimiento celular.

1. INTRODUCCION

El renovado interés en años recientes por la planta de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews), fuente natural del complejo sabor vainilla, ha llevado a mejorar las técnicas de cultivo y propagación. Considerando que el principal problema técnico del cultivo de la vainilla en México son las enfermedades radicales difíciles de controlar con productos químicos (Parra 1984) y que la obtención de las plántulas de vainilla por la técnica tradicional es un proceso largo, que dificulta el desarrollo de los programas de fitomejoramiento genético, al alargar el ciclo de evaluación del material proveniente de cruza, ya sea en campo o en invernadero (Parra,1987), se plantea su estudio *in vitro*.

Actualmente el cultivo de tejidos vegetales ha sido una de las herramientas de investigación clave para la Biotecnología Vegetal particularmente para la propagación *in vitro* de cosechas valiosas y la biosíntesis de metabolitos secundarios de alto valor (Parr,1989). La demanda de compuestos naturales de alto valor tales como saborizantes, colorantes, antimicrobianos y otros fármacos han estimulado las actividades de investigación en este campo (Knorr, y col.,1990). Por ejemplo, Moshy (1986) y Hong y Harlander (1989), plantean que el suministro mundial de vainas de vainilla no satisface la demanda para el sabor de vainilla y que la biosíntesis *in vitro* de dicho sabor puede aliviar este problema, ya que existe la posibilidad de que sea económicamente producido vía cultivo de tejidos vegetales.

La mayor parte de las investigaciones en que se emplea dicha técnica, se han enfocado principalmente a la producción de metabolitos secundarios (Tabla 1 y Figura 3), estudiando sobre todo el efecto de factores físicos (luz, temperatura, etc.), o

bien la manipulación de los nutrimentos de los medios de cultivo y reguladores de crecimiento, sobre el metabolismo de la célula.

Los estudios con cultivos *in vitro* de vainilla para la obtención de vainillina, principal componente y responsable del sabor de vainilla, en México y en el mundo se cuenta con muy pocos estudios, utilizando la manipulación del medio de cultivo y de los reguladores de crecimiento vegetal, enfocados a la producción de vainillina empleando dicha técnica.

A pesar de los estudios realizados sobre la producción del sabor de la vainilla por cultivos *in vitro*, los resultados actuales aún no son suficientes para hacer al proceso económicamente viable, en este estudio se presenta una alternativa para reducir el tiempo de germinación de las semillas, propagación masiva *in vitro* de la planta y un proceso para la obtención de callos organogénéticos productores de vainillina y otros componentes del sabor natural de la vainilla, de acuerdo al objetivo y plan de trabajo que se dan a continuación.

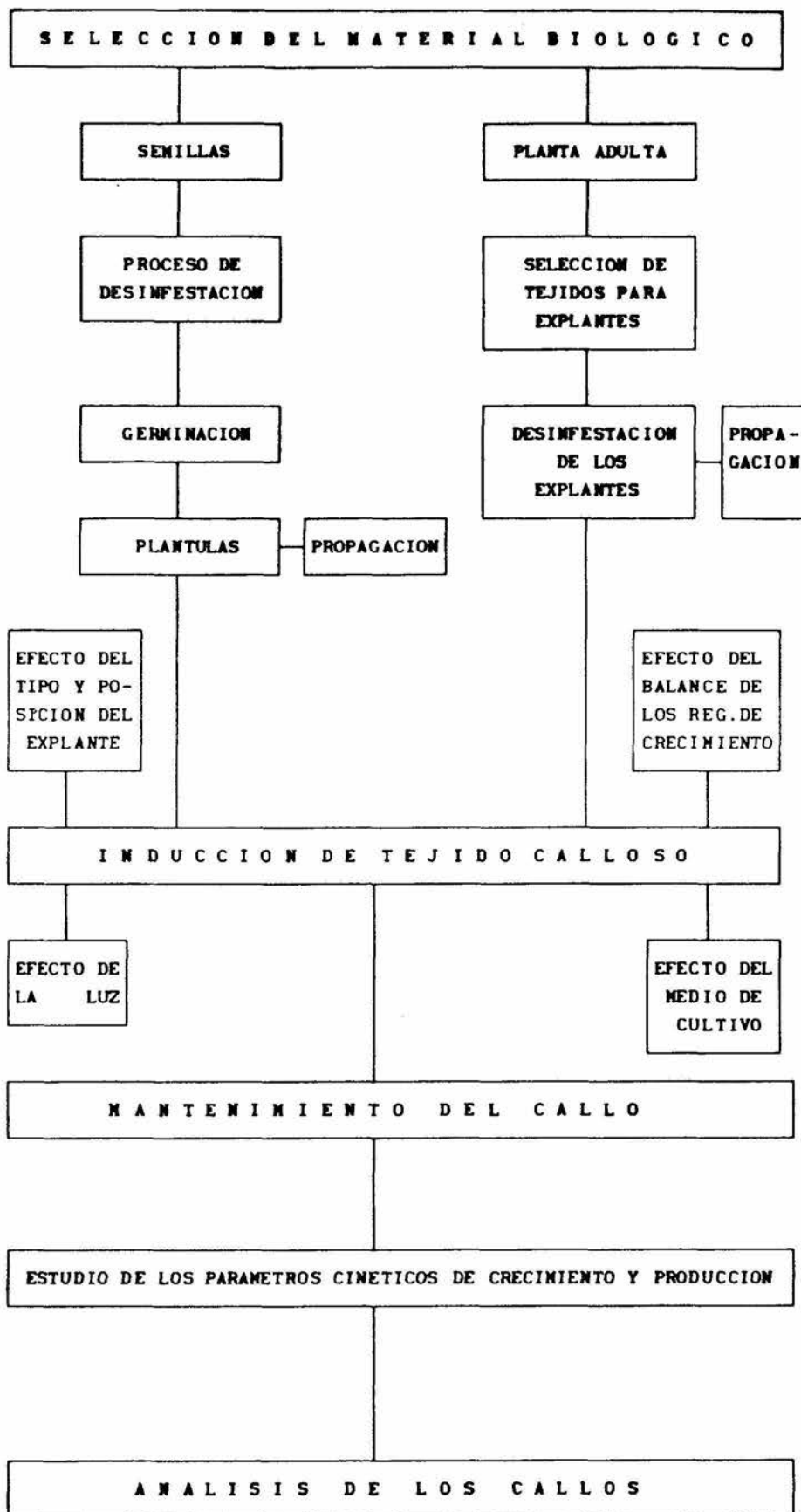
OBJETIVO

EVALUAR LA INFLUENCIA DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO Y DE LOS MEDIOS MINERALES EN LOS CULTIVOS in vitro DE Vanilla planifolia, PARA LA PRODUCCION DE VAINILLINA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- GERMINACION DE SEMILLA Y OBTENCION DE PLANTULAS in vitro.
- OBTENCION DE CALLOS.
- ESTUDIOS CON LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO Y MEDIOS MINERALES.
- MANTENIMIENTO DEL CALLO.
- ESTUDIO DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE LOS CALLOS.
- DESARROLLO DE UNA TECNICA PARA EL ANALISIS DE LOS COMPUESTOS PRODUCIDOS POR LOS CALLOS.
- ANALISIS DE LOS CALLOS PARA LA CUANTIFICACION DEL PRODUCTO.

PLAN DE TRABAJO



2.ANTECEDENTES

2.1.- DESCRIPCION BOTANICA DE *Vanilla planifolia* (L) ANDREWS.

La vainilla (Figura.4), es originaria de la parte Norte de la zona costera del Estado de Veracruz (en Liahut,1985). Es una Monocotiledónea, pertenece al Superorden: Liliiflorae; Orden: Liliales; Familia: Orchidaceae; Subfamilia: Epidendroideae Lindley; Tribu: Vanilleae Blume; Subtribu: Vanillinae Lindley; Género: *Vanilla* Swartz. En éste género, se han consignado 50 o más especies, distribuidas en las regiones trópicas del mundo (en Parra,1984; McVaugh,1985); Especie: *Vanilla planifolia* (L) Andrews, sinominia *Vanilla fragrans* (Salisbury) Ames. (Correll,1953; Rasmussen,1985; Castillo,1989). Siendo *Vanilla planifolia* Andrews y *Vanilla fragrans* (Salisbury) Ames, especies botánicamente idénticas (Riley y Kleyn,1989).

La especie *Vanilla planifolia* es una planta trepadora gruesa, epífita; trepa a los ápices o extremos superiores de los árboles llamados tutores u otros soportes, a una altura de 10-15 metros, necesita sombra para poderse desarrollar. Sus tallos son simples o ramificados, monopodiales, carnosos cilíndricos, con un diámetro de 1 a 2 centímetros, largos, flexibles, frágiles, de color verde oscuro y fotosintético con estomas, formado por entrenudos de 5-15 centímetros en longitud, donde se desarrollan un par de raíces adventicias o aéreas, largas blanquiscas, de aproximadamente 2 mm de diámetro, son producidas individualmente opuestas a las hojas y con las cuales se adhiere a los árboles tutores u otros soportes en los cuales la planta crece. Sus hojas son alternas, largas, planas, suculentas, subsésiles, oblongas-elípticas a lanceoladas, de 8-25 cm de largo y 2-8 cm de ancho; las puntas agudas a acuminadas, su superficie es

lustrosa y cutinizada en el haz, la base es algunas veces redondeada, peciolo corto, grueso, canalizado; numerosas venas, paralelas, indistintas. Los racimos axilares o inflorescencias son cortos, generalmente son simples, de 5-8 cm de longitud, de 15 a 20 botones florales, pero generalmente de 6-15, de los cuales abren de uno a dos al mismo tiempo, primero los de la base y los siguientes en forma ascendente, de color verde amarillento e inconspicuos. Las flores son largas, fragantes, de color verde amarillento pálido, compuestas de tres sépalos, tres pétalos y un órgano central conocido como columna, el cual contiene el estambre, pistilo y el rostelo, con líneas verrugosas longitudinales o con papilas en los discos y un penacho de pelos cerca de la mitad de los discos retusos como los ápices y los flecos en el margen, los vellos de la columna en la superficie, tienen aproximadamente tres centímetros de longitud. Los frutos son cápsulas o vainas que presentan tres costados en forma cilíndrica, miden aproximadamente de 15-20 cm. de largo y de 8-15 mm de diámetro, son tricarpelares y contiene en su interior numerosas semillas de color negro. Las semillas consisten de un embrión indiferenciado, rodeado de una testa muy gruesa (integumento) propia. Este contrasta con el integumento transparente y libre, característico de las otras orquídeas (Harrison y Arditti, 1972). Existen algunas variaciones en el tamaño de las semillas, pero en promedio la longitud es de 312 μ y de un promedio de anchura de 260 μ . La forma de las semillas es algunas veces cónica (Knudson, 1950). Esta especie generalmente florece por primera vez a los tres años de plantada y después florece anualmente por un período aproximado de dos meses. Las raíces de la base de la planta se ramifican en el humus, sin

profundizar en el suelo y extendiéndose en él superficialmente a varios metros de distancia. (Correll, 1944, 1953; Parra, 1984, Liahut, 1985; Purseglove, 1988).

La propagación de la vainilla se puede llevar a cabo por medio de la germinación de las semillas, pero este método es lento y complicado, además el porcentaje de germinación es muy bajo, apenas el 1-2% germinan en condiciones naturales aún después de un periodo de latencia prolongado de 1 a 2 años (Philip y Nainar, 1988 a). También se puede injertar mediante acodos como algunos frutales, pero tarda meses en crecer. Así, lo que está comprobado como medida práctica, es la reproducción vegetativa, mediante la utilización de tallos, llamados esquejes o bejucos (Figura.5), que deben de ser tomados de plantas sanas y vigorosas; y pueden ser cortados de cualquier parte de la planta. (Liahut, 1985; Purseglove, 1988).

Inmediatamente después de cosechadas las vainas de vainilla son inodoras y tienen un desagradable sabor amargo (Romagnoli y Knorr, 1988; Riley y Kleyn, 1989). El subsecuente proceso de fermentación (beneficio), es necesario para adquirir los componentes clave del aroma y sabor característicos de la vainilla. Las vainas verdes contienen un 80% de agua, el cual es reducido a un 20% durante el proceso de beneficio, por el secado al sol (Liahut, 1985; Purseglove, 1988), además de que éstas absorben calor y exudan grasas, que se mezclan con las resinas naturales presentes y proporcionar el sustrato para las enzimas en las vainas (Riley y Kleyn, 1989). Durante el proceso de beneficio, se suceden una serie de reacciones enzimáticas sobre los glucósidos presentes en dichas vainas (Purseglove, 1988) [Fig.6]. Existen tres glucósidos presentes en las vainas: glucovainillina (aveneína),

estudios espectrales indican que la estructura de la glucovainillina es 4-(β -D glucopiranosiloxi)3-Metoxibenzaldehído (Leong, y col.,1989); alcohol glucovainillinico y un glucósido no aislado, que produce por hidrólisis, un éter fuerte y de suave aroma. (Claus y Teyler,1965; Rasmussen,1985; Romagnoli y Knorr,1988). Se ha encontrado que las glucosidasas, peroxidadas y polifenoxidasas, alcanzan su máxima concentración cerca del estado de madurez y juegan un papel significativo en la formación de vainillina y compuestos aromáticos relacionados durante el beneficio de las vainas (Nakasawa,1987; Riley y Kleyn,1989). La composición general de las vainas de vainilla beneficiadas se da en la Tabla II de acuerdo a Ishiguro y col. (1986). De los constituyentes volátiles sólo 26 se encuentran en concentraciones mayores de una parte por millón, como se muestra en la Tabla III de acuerdo con Ishiguro y col.(1986), Vidal y col.(1989). Los cuatro componentes más importantes son la vainillina, el p-hidroxibenzaldehído, el p-hidrobencilmetil éter y el ácido acético (Klimes y Lamparsky,1976).

El principal componente del sabor de vainilla, es la vainillina (Guarino y Brown,1985; Brodelius,1990 a; Funk y Brodelius,1990 a y b), nombre común para el compuesto 3-metoxi- 4-hidroxibenzaldehído, que no existe en forma libre en las vainas al momento de cosecharlas y es producida durante el beneficio por la acción enzimática sobre los glucósidos (Purseglove,1988). La biosíntesis de éste compuesto relativamente simple todavía no ha sido bien caracterizada, pero se piensa que se deriva a partir de la ruta general de los fenilpropanoides. Se ha sugerido que el ácido ferúlico, un intermediario central de la ruta general de los fenilpropanoides, vía feruloil-CoA, es convertido a vainillina por

una reacción análoga de la β -oxidación de los ácidos grasos (Zenk,1965; Brodelius,1990 a ; Funk y Brodelius,1990 a y b). Otros estudios han indicado que la reacción no procede vía ésteres cimanoil-CoA (French, y col.,1976; Brodelius,1990 a). Además, las especies, el origen, las prácticas de cultivo y de beneficio, aunado a las condiciones climáticas, afectan la formación de los componentes característicos del sabor y aroma de la vainilla (Guarino y Brown,1985; Castillo,1989; Riley y Kleyn,1989). La Tabla IV Muestra algunas de las propiedades físicas de la vainillina.

Debido al alto costo, involucrado en el crecimiento, cosecha, beneficio y extracción de las vainas, muchos extractos de este sabor vendidos en el mercado, son de vainilla sintética, obtenida a partir de la lignina coniferil, glucósido presente en el cambium de los pinos (Claus y Teyler,1965) y del eugenol, un fenol presente en el aceite de clavo (Lampman y Sharpe,1983). El sabor sintético es de 4-8 veces más fuerte que el natural, pero incluye ingredientes que no se encuentran en la naturaleza, por ejemplo, etilvainillina (Guarino y Brown,1985). Sin embargo, ésta carece de muchos de los componentes, que contribuyen a la calidad del sabor y aroma del extracto natural (Purseglove,1988; Castillo,1989). Aunque el compuesto sintético es más barato que el natural, frecuentemente se mezcla con la vainilla natural para mejorar la calidad del sabor. (Purseglove,1981; Castillo,1989).

USOS.

Aún cuando este producto no es de primera necesidad, tiene una alta demanda nacional e internacional. Tiene uso en la industria alimentaria, especialmente en la de saborizantes, para

la preparación de helados, confitería, panificación y preparación de bebidas. Además en la industria farmacéutica, para la síntesis de fármacos tales como: Aldomet, un antihipertensivo, L-Dopa y Trimetaprim. Las hidrazonas de vainillina tienen acción herbicida similar a la del 2,4-D. La vainillina misma tiene algunas propiedades bacterostáticas y se le ha usado en formulaciones para el tratamiento de la dermatitis. Un nuevo uso potencial para la vainillina, es como un agente madurador, para incrementar la producción de sacarosa en la caña de azúcar. (Van Ness, 1983). Es un potente agente antioxidante en alimentos complejos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (Burri, y col., 1989). Otros usos incluyen, la prevención de espuma en aceites lubricantes, atrayente en insecticidas y como agente solubilizante para la riboflavina. (Van Ness, 1983).

2.2. CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS VEGETALES (C.C.T.V).

El término cultivo de células y tejidos vegetales se usa para referirse al cultivo *in vitro* de cualquier parte de una planta, ya sea células, tejidos u órganos para obtener el crecimiento y la multiplicación ilimitada de éstos bajo condiciones asépticas y controladas (Seabrook,1980; Biondi y Thorpe,1981; Pétiard y Bariaud-Fontanel,1985; Torres,1989).

El C.C.T.V. se basa en el concepto de totipotencia que establece que cada célula de una planta tiene la información genética para crecer y regenerar en una nueva planta completa (Aitchison,y col.,1977; Seabrook,1980).

Por conveniencia la técnica de C.C.T.V., ha sido dividida en cinco clases, de acuerdo al tipo de material vegetal utilizado: a).- cultivo de callos; b).- cultivo de células; c).- cultivo de órganos; d).- cultivo de meristemos y e).- cultivo de protoplastos (Gamborg y Shyluk,1981; Teutonico y Knorr,1984; Ochoa,1985).

El éxito de la tecnología de los métodos *in vitro* depende principalmente del conocimiento de los requerimientos nutricionales del cultivo (Gamborg, y col.,1976; Murashige,1974), y de los parámetros ambientales en el que se desarrolló (López,1985). En general los medios de cultivo de encuentran constituidos por los siguientes componentes (Gamborg y col.,1976; Seabrook,1980; Gamborg y Shyluk,1981):

1.- Sales inorgánicas se agrupan en:

a).- Macronutrientes. Son los requeridos en cantidades milimolares e incluyen: N, K, P, Ca, S y Mg. La concentración de cada nutriente para conseguir un crecimiento máximo varía considerablemente en cada variedad vegetal empleada.

b).- Micronutrientes. Son requeridos en concentraciones

micromolares e incluyen: Fe, Bo, Cu, Co, I y Zn.

2.- Vitaminas. Las más utilizadas son las del grupo B o hidrosolubles como la tiamina, piridoxina y ácido nicotínico.

3.- Fuente de carbono y energía. Como la mayoría de los cultivos vegetales *in vitro* son heterotróficos, requieren de la adición de carbohidratos que le sirvan para síntesis de constituyentes celulares para su crecimiento y mantenimiento celular. Para tales fines se han utilizado la sacarosa y la glucosa, entre otros azúcares (Fowler,1982; Fowler y Stepan-Sarkissian,1985).

4.- Reguladores de crecimiento. Las células vegetales cultivadas *in vitro* comúnmente requieren un medio suplementado con reguladores de crecimiento. Estos compuestos juegan un papel dominante en la regulación intercelular de los procesos morfogénéticos, pueden afectar la diferenciación de las células y tejidos (Kurz y Constabel,1979). Los más importantes en el cultivo de células y tejidos vegetales son: auxinas y citocininas.

A).- Auxinas (por ejemplo, ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB)). Su principal característica es promover la elongación celular, formación de raíz y desarrollo de brotes. Afectan la formación y acumulación de metabolitos secundarios. (Kurz y Constabel,1979; Krikorian,1991).

B).- Citocininas. Estimulan la división celular, promueven la formación de brotes y la diferenciación de tejidos cultivados. Las más empleadas son la cinetina, bencilaminopurina (BAP), la zeatina y la isopentiladenina (IPA). (Kurz y Constabel,1979; Horgan,1987).

La proporción requerida de estos reguladores, varía con el estado de desarrollo del tejido cultivado (Murashige,1974). Se ha

observado que la relación auxina/citocinina tiene efectos muy pronunciados sobre el desarrollo y establecimiento de los cultivos (Skoog y Miller, 1957; AboEl-Nil, y col., 1976; Narayanaswamy, 1977).

5.- Aminoácidos. El más utilizado en el cultivo de tejidos vegetales es la glicina.

6.- Complejos naturales no definidos. Algunos de los extractos para suplementar el medio son: de levadura, malta, hidrolizado de caseína, junto con una variedad de preparaciones vegetales que incluyen el endospermo de coco, maíz, nuez y jugos de frutas (por ejemplo, tomate, naranja).

7.- Agentes solidificantes. En la preparación de medios semisólidos se han empleado el agar, gelrite y gelatina como soporte (Szabados, y col., 1991).

pH y esterilización del medio de cultivo.

Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* toleran pH's de 5.2 a 5.8. El ajuste de pH es con un ácido (por ejemplo, HCl) y/o una base (por ejemplo, NaOH), a una concentración de 1N o 1M, antes de esterilizarlo. Existen reportes de cambio del pH del medio de cultivo por efecto de la esterilización, provocando una turbidez o un precipitado, lo cual puede dar resultados negativos en el crecimiento de las células y tejidos que se cultiven en dicho medio. Para esterilizar el medio nutritivo, se utiliza un autoclave a 15 lb/plg² ó a una temperatura de 121°C, durante un tiempo de 15-20 minutos. Otro procedimiento, es através de filtros con membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 45 µ. (Vyskot y Bezdek, 1984; Skirvin, y col., 1986; Narayanaswamy, 1977).

FUENTE VEGETAL

La fuente inicial del material vegetal es determinante para

el éxito en el establecimiento de los cultivos. Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas (Hammerschalag y Bottino,1981; Ochoa,1985), de las cuales se seleccionan aquellas partes que se encuentran en división activa, que por el gran número de células meristemáticas presentes en el explante aumentan la probabilidad de obtener un cultivo viable (Yeoman y Macleod,1977; Evans, y col.,1981; Dixon,1985; Torres,1989). Además estos deben presentar una alta relación de superficie/volumen, con el fin de facilitar el intercambio gaseoso y la toma de nutrimentos (Yeoman y Macleod,1977; Constabel,1984).

DESINFESTACION DEL MATERIAL VEGETAL

Una dificultad general en el cultivo de tejidos es la desinfestación del material vegetal que se va a utilizar como explante, ya que normalmente las plantas crecidas en el campo se encuentran contaminadas por un elevado rango de microorganismos, de tal suerte que cuando el tejido entra en contacto con un medio nutritivo, se inicia un crecimiento acelerado de esos microorganismos, afectando seriamente el crecimiento y desarrollo de las células (Yeoman y Macleod,1977; Villegas,1985; Merino,1987).

Existen una gran variedad de agentes químicos de uso común para la desinfestación superficial del material vegetal. La elección del agente y el tiempo de tratamiento dependen de la sensibilidad del tejido a ese compuesto (Sweet y Bolton,1979; Yeoman y Macleod,1977; Bhojwani y Razdan,1983). Dentro de estos se encuentran el Hipoclorito de sodio o calcio, los cuales liberan cloro activo como agente desinfestante (Adbul-Baki,1974; Biondi y Thorpe,1981). Su efectividad puede ser mejorada si se adiciona una

pequeña cantidad de un agente tensoactivo (detergentes líquidos, como el Teepol o Tween 20), que rompe la tensión superficial y permite una mejor penetración en las superficies rugosas del material vegetal (Seabrook, 1980; Skirvin,1981; Bhojwani y Razdan,1983).

CULTIVO DE CALLOS

Una vez teniendo el material vegetal seleccionado, el medio de cultivo, el tipo y balance hormonal adecuado, es posible obtener de los explantes material celular que induzca y mantenga un crecimiento y una división celular continua (Yeoman y Macleod,1977), produciendo un tejido celular de apariencia amorfa, al cual se le denomina callo. (Fig. 2). Este tipo de tejido se encuentra en las plantas crecidas en el campo, como una respuesta a daños mecánicos sufridos por la influencia del medio ambiente o por la invasión de ciertos microorganismos (Yeoman,1970; Yeoman y Forche,1980; Torres,1989).

En los cultivos *in vitro*, los cállos, se inducen mediante la influencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, adicionadas al medio de cultivo (Seabrook,1980). Con respecto al uso de los reguladores de crecimiento y su respuesta en el tejido, para la inducción de callos, estas pueden dividirse en cuatro categorías: el primer grupo sólo requiere de una auxina o regulador de crecimiento; en el segundo los tejidos sólo requieren de una citocinina; el tercero requiere de una auxina y una citocinina y en el cuarto grupo, los tejidos no requieren de ningun regulador (Yeoman,1970; Yeoman y Macleod,1977; Dodds y Robert,1982).

Para la formación de un callo, los tejidos u órganos

diferenciados son inducidos a una desdiferenciación celular (pérdida de la especialización bioquímica y fenotípica de las células), presentando éstas una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a la masa celular amorfa de tejido (Yeoman y Macleod,1977). Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, que varían según su apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras con células íntimamente unidas, mientras que otros forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares (Aitchison, y col.,1977). La coloración de este tejido varía también, aún derivando de la misma especie; se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras que otros pueden ser de diferente tono de verde, amarillo, café o rojo. El grado y tipo de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y medio ambientales.(Dodds y Roberts,1982; Barba,1987; Narayanaswamy,1977).

Estudios microscópicos han demostrado que los tejidos de tipo calloso generalmente son heterogéneos en su composición celular. La diversidad celular presente en el callo depende de muchos factores como son, entre otros el origen del tejido, la edad de los cultivos y la composición de los medios de cultivo (Yeoman, 1970; Aitchison, y col.,1977; Barba,1987).

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células, ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, se pueden obtener células aisladas o también lograr una división organizada para dar lugar a un órgano de la planta, ya sea una raíz, un tallo o una hoja (organogénesis), o embriones (embriogénesis), que pueden llegar a

formar una plántula completa, o simplemente seguir proliferando como callo, dependiendo esta orientación de las cantidades relativas de auxinas y citocininas suministradas al medio de cultivo (Robert,1985).

Modelo de crecimiento de los callos.

El crecimiento, cambios regresivos, diferenciación y los patrones de desarrollo, son los cuatro procesos que contribuyen al desarrollo de un callo típico. Dentro de este marco el curso del desarrollo de un callo a partir de un explante puede dividirse en las siguientes etapas: inducción, división y diferenciación. Estos tres estadios de desarrollo se caracterizan por los cambios en el promedio del tamaño celular, así como en la estructura y condición metabólica del tejido. Primero hay una fase de inducción y comprende desde la inoculación hasta el momento en que se presenta un aumento en el número de las células. Durante la inducción, no todas las células del explante responden de igual forma a los estímulos del nuevo ambiente, solo las de la periferia del tejido son inducidas a la división y esto provoca una división activa de las células de la periferia rodeando un núcleo o corazón que no se divide. La división en las capas periféricas del tejido, pueden ser debidas a factores tales como; respuesta a la herida en la superficie, disponibilidad de oxígeno, rápida liberación de CO_2 , disponibilidad de nutrimentos y rápida liberación de los compuestos volátiles y a la luz (Yeoman,1970; Davidson, y col.,1976; Aitchison, y col.,1977; Evans, y col.,1981). En la segunda fase hay una síntesis activa, el tamaño celular disminuye y se inicia con la división de las capas más externas del explante. Después de cierto tiempo el tejido continua en división

en forma desdiferenciada (cambios regresivos). El desarrollo celular se prolonga y se presenta la tercera etapa que está determinada por un aumento de la diferenciación celular, a través de la maduración de las células y la expansión de otras, es durante ésta etapa que aparecen estructuras anatómicas, que pueden convertirse más tarde en órganos (Yeoman,1970; Aitchison, y col.,1977). Por último se da el envejecimiento y la pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado (Barba,1987), debido al agotamiento de los nutrimentos del medio; inhibición de la difusión de los nutrimentos, evaporación, que en el caso del medio líquido, aumenta la concentración de sus constituyentes por el mismo efecto y, por la acumulación de metabolitos de desecho celular, que puede ser tan alta que se vuelven tóxicos para el tejido. (Yeoman y Macleod,1977; Constabel,1984; Barba,1987; Torres,1989).

Un serio problema con el uso del cultivo de callos para propósitos de investigación, es el daño o modificación de la citología nuclear durante un cultivo prolongado (Sunderland,1977). Estas modificaciones pueden ser aberraciones cromosómicas, mutaciones y endoreplicaciones, produciendo poliploidías, aneuploidías, cambios estructurales y aberraciones mitóticas (Bayliss,1980). Se ha observado que la frecuencia de éstas anomalías nucleares, generalmente se incrementan con la edad del cultivo, por lo que debe ser frecuentemente renovado el material biológico, aunque los cambios cromosómicos pueden ocurrir desde el principio del cultivo (Bayliss,1980).

Esta inestabilidad cromosómica, es un obstáculo para la utilización del callo en estudios de genética y fitomejoramiento vegetal (Dodds yRobert,1982), pero también se ha logrado utilizar

el callo en la investigación de la organogénesis (Thorpe,1978,1980), embriogénesis (Evans, y col.,1981; Lozoya,1985 a) y propagación de plantas (Murashige,1974; Lozoya,1985 b; Giles y Morgan,1987).

METABOLITOS SECUNDARIOS

Una característica de las plantas superiores es su capacidad para producir un gran número de sustancias orgánicas, que acumulan en cantidades suficientes para ser económicamente útiles en aplicaciones comerciales, científicas y tecnológicas (Balandrin, y col.,1985; Wink,1987).

Las sustancias vegetales se pueden clasificar como: a) metabolitos primarios y b) metabolitos secundarios (Luckner,1972; Balandrin, y col.,1985).

a).- Metabolitos primarios:

Estas sustancias están en una u otra forma en todos los vegetales (Balandrin, y col.,1985). Esencialmente proveen las bases para el crecimiento y la reproducción y son indispensables para el desarrollo fisiológico, debido a su papel en el metabolismo.

b).- Metabolitos secundarios:

Son compuestos que parecen no tener un papel fundamental en los procesos metabólicos básicos, sino más bien papeles secundarios no esenciales (Parr,1988,1989) [Tabla I]. Su distribución y ubicación, quedan restringidos a un grupo taxonómico particular, ya que cada compuesto aparece solo en un pequeño rango de géneros y especies (Vining,1986; Balandrin, y col.,1985). Muchos metabolitos secundarios juegan papeles ecológicos y fisiológicos como atrayentes de polinizadores,

adaptaciones químicas, defensa química o para favorecer la capacidad de sobrevivencia de la planta (aleloquímicos). (Whitaker y Fenny,1971; Harbone,1977; Rosenthal,1986; Rhodes,1987; Wink,1990; Parr,1989).

En las plantas, los metabolitos secundarios pueden ser acumulados dentro de las células biosintéticas, en lugares diferentes de sus sitios de biosíntesis o ser excretados. Esto último implica su translocación a través de membranas y su retención en células especializadas para su almacenamiento. El desarrollo de células de biosíntesis y de depósito, está ligado a la diferenciación de la planta. (Renaudin y Guern,1988; Brodelius,1990 b). Tienden a acumularse en aquellas partes de la planta donde no hay crecimiento activo, por ejemplo, hojas senescentes, frutos y semillas. Las partes con crecimiento activo de la planta, meristemas, regiones de alargamiento y primeros estadios de desarrollo de frutos y semillas, contienen solo trazas de dichos compuestos. Esto por lo tanto nos indica que los cultivos celulares con crecimiento activo, no son una buena fuente de dichos compuestos y que éstas sustancias tiendan a acumularse en los tejidos próximos a la senescencia (Yeoman, y col.,1980).

En cultivos de células *in vitro* los metabolitos secundarios frecuentemente se almacenan en vacuolas, pero hay también un número de ejemplos de excreción de los metabolitos secundarios al medio de cultivo. (Renaudin y Guern,1988; Brodelius,1990 b). Se ha encontrado que la acumulación de productos secundarios en cultivos *in vitro*, ocurre principalmente cuando el crecimiento disminuye o es lento y muestran cierto grado de diferenciación celular. Por lo anterior se ha llegado a especular que existe una relación inversa

entre la velocidad de crecimiento, la diferenciación y la producción o acumulación de metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro* (Yeoman, y col.,1980; Lindsey y Yeoman,1983; Stafford, y col.,1986; Vining,1986; Heinstein y Emery,1988).

La producción de metabolitos secundarios por medio de la técnica de C.T.V., se ha estudiado tanto en callos como en cultivo sumergido, siendo el cultivo sumergido el más adecuado, ya que al tener pequeños agregados celulares inmersos en una matriz acuosa en movimiento facilita el intercambio gaseoso, eliminan los gradientes de polarización en el tejido y se homogeniza la distribución de los nutrimentos (Yeoman y Macleod,1977), además que el cultivo de callos no apropiado para la producción de éste tipo de sustancias a gran escala (Parr,1988). Actualmente se utilizan raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*, sistema propuesto para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* (Berlin, y col.,1990; Wilson, y col.,1990).

Las mayores ventajas del sistema de cultivos *in vitro* sobre los cultivos convencionales para la producción de metabolitos secundarios son: a) Los compuestos útiles son producidos bajo condiciones controladas, independientemente de las condiciones medio ambientales como el clima, plagas, etc.; b) los cultivos están libres de microorganismos; c) las células de cualquier planta pueden ser multiplicadas para producir metabolitos secundarios específicos; d) el crecimiento celular está regulado racionalmente; hay una mayor consistencia en la producción, tanto en cantidad como en calidad y quizás la más importante, el tiempo de producción es menor (Tabata,1977; Fowler,1983; Parr,1989).

Todos los hechos anteriores, indican que el cultivo de células

y tejidos vegetales, tienen un gran potencial industrial para la producción de metabolitos secundarios, sin embargo aún existen algunos problemas que impiden, su explotación comercial, como son: el lento crecimiento de los cultivos; inestabilidad genética, agregación celular, el control de la diferenciación celular, la incapacidad de crecer autotróficamente y factores morfológicos (Shuler,1981).

En contraposición con las desventajas antes mencionadas, los avances logrados permiten asumir un futuro promisorio a la aplicación industrial del cultivo de células y tejidos vegetales. Los principales intentos se han dirigido a incrementar la productividad de los cultivos por medio de: manipulación del medio de cultivo y de los reguladores de crecimiento, la optimización de los factores ambientales, la selección de líneas altamente productoras (Shuler,1981), permeabilización de la membrana celular para mejorar la liberación de los productos, el uso de precursores (Romagnoli y Knorr,1988) y de promotores (elicitors) y cultivo en dos fases (Brodeluis,1990 a,b).

En la Figura 3, se esquematizan algunos de los propósitos y aplicaciones en las que el cultivo de células y tejidos vegetales se ha empleado en las últimas décadas.

3.- ANTECEDENTES DEL CULTIVO in vitro DE Vanilla planifolia.

La vainilla, uno de los sabores naturales más importante presenta varias dificultades en su producción. Uno de los principales es precisamente la propagación de la planta. Esta se propaga por medio de semillas o por medios vegetativos (Gutiérrez,1987). Apenas el 1-2% de las semillas germinan bajo condiciones naturales, aún después de un período de dormancia prolongado (Philip y Nainar,1988 a). La germinación de las semillas es de considerable importancia económica, por lo que no es sorprendente que muchos investigadores trabajen para desarrollar métodos prácticos, los cuales puedan ser usados en los programas de propagación y de hibridación (Arditti,1982). Las técnicas de germinación aséptica han sido usadas para muchas semillas de orquídeas, incluyendo vainilla (Knudson,1950; Withner,1955; Lugo-Lugo,1955 a y b; Hegarty,1955), además del uso de los reguladores de crecimiento vegetal para acelerar dicho proceso *in vitro* (Jinyu y Hong,1987), como propósito de propagación y trazar el curso del desarrollo de la plántula, han proporcionado una considerable cantidad de información sobre la germinación de embriones y los caracteres xeromórficos de los protocormos y plántulas, los cuales son característicos de ciertos grupos (Philip y Nainar,1988 a y b). En vainilla, los métodos asépticos podrían asegurar un buen porcentaje de germinación de las semillas, las cuales se han utilizado para obtener variedades híbridas resistentes a la enfermedad de la pudrición de la raíz causada por *Fusarium*. (Knudson,1950; Withner,1955).

Reanudado el interés económico en años recientes en la vainilla, se ha intentado cultivar la planta bajo condiciones más progresivas, por las cuales se pueda incrementar la producción por

hectárea (Parra,1984; Liahut,1985). Ello ha llevado a mejorar las técnicas de cultivo y propagación tradicionales y a la aplicación de los métodos de cultivo de tejidos vegetales y de propagación clonal (Tabla V). Philip y Nainar (1986), lograron obtener plántulas *in vitro* a partir de puntas de raíces aéreas, así como también evaluando la transformación de meristemos de raíces aéreas a brotes y plántulas durante la morfogénesis (Philip y Pedikkala, 1989). Por otra parte, Kononowicz y Janick (1984), lograron establecer brotes enraizados *in vitro* en un invernadero, usando astillas de corteza de secoya como medio orgánico. Existen reportes usando el cultivo de tejidos vegetales para una rápida propagación de brotes de vainilla. La propagación *in vitro* de la vainilla ha sido empleada para producir esquejes libres de microorganismos (Cervera y Madrigal,1981; Gutiérrez, 1987), y las plántulas así obtenidas pueden ser establecidas en un suelo rico en materia orgánica dentro de un invernadero (Gutiérrez,1987), o bien esta técnica puede ser adaptable para el almacenamiento de germoplasma de vainilla (Jarret y Fernández,1984). Otros autores han intentado obtenerla vía cultivo de células y tejidos vegetales, en un estadio de desdiferenciación, como el callo y establecer un proceso para la producción de sus metabolitos secundarios (Romagnoli y Knorr,1988), además de la regeneración de brotes a partir del callo (Davidonis y Knorr,1991). También se han logrado establecer cultivos de células en suspensión en el medio MS suplementado con 1 mg/l de ANA, para estudiar la ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de vainillina en los cultivos *in vitro* de *Vanilla planifolia* (Brodelius, 1990 a; Funk y Brodelius,1990 a,b,c).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió en nuestro

laboratorio seguir otra estrategia, tomando en cuenta las concentraciones de los reguladores empleados en la literatura, y probando otros regulares de crecimiento, ampliando los rangos de las concentraciones de los reguladores de crecimiento junto con otros medios de cultivo diferentes a los reportados.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

A) Tallos y hojas de planta adulta de vainilla crecida en condiciones naturales en Papantla, Veracruz.

B) Plántulas asépticas, obtenidas por germinación *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia*, recolectadas en Papantla, Veracruz; además por la propagación *in vitro* de esquejes.

4.2. DESINFESTACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

4.2.1. DESINFESTACION DE SEMILLAS.

Las semillas junto con material graso y residuos placentales adheridas a ellas fueron sometidas a varios métodos de pretratamiento antes de su desinfestación, con el propósito de acondicionarlas para reblandecer sus testas. Se aplicaron los siguientes tratamientos:

A).- Las semillas se colocaron en agua destilada durante 60 minutos, con agitación y cambios del agua ocasionales. Posteriormente se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 20 minutos, seguido de varios lavados con agua destilada estéril.

B).- Las semillas se colocaron en agua destilada por 60 minutos, con agitación y cambios del agua ocasionales, luego se pusieron con alcohol etílico al 70% (v/v) durante 30 segundos, se lavaron y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 20 minutos, después se hicieron varios lavados con agua destilada estéril para eliminar el agente desinfestante.

C).- Tratamiento propuesto por Tonnier (1951) (en Withner, 1955) ligeramente modificado. Consistió en remojar las semillas en agua desionizada estéril durante 60 minutos, con agitación y cambios

del agua ocasionales, luego se colocaron en tolueno-etanol (3:1) por 10 minutos, se enjuagaron con agua desionizada estéril y se sumergieron en alcohol etílico al 90% (v/v) durante 30 minutos, con agitación y cambios de alcohol ocasionales. Se lavaron con agua estéril y se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 5% más 0.2 ml de Tween 20, durante 30 minutos, con agitación ocasional. Para terminar se hicieron varios lavados con agua desionizada estéril para eliminar el hipoclorito restante.

4.2.2. DESINFESTACION DEL TEJIDO (PLANTA).

Los órganos y tejidos de las plantas se lavaron con agua corriente seguido de una inmersión en alcohol etílico al 70% (v/v) por 30-60 segundos, con agitación constante, se enjuagaron y posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% más 0.2 ml de Tween 20 durante 20 minutos con agitación ocasional, seguido de varios lavados con agua destilada estéril.

4.3. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS.

4.3.1. GERMINACION DE SEMILLAS.

Medio A: Se emplearon los medios de Murashige & Skoog (1962) (MS) y el de Schenk & Hildebrandt (1972) (SH) [Tabla VI], suplementados con 30 g/l de sacarosa y 1.6 g/l de Gelrite (Kelco Division of Merck & Co., Inc.), como agente solidificante.

Medio B: Se utilizaron los medios mencionados en A, pero suplementados con CIN en concentraciones de 0-100 mg/l y 30 g/l de sacarosa, empleando gelrite como soporte.

El pH de los medios se ajustó entre 5.7-5.8, empleando para ello una solución de NaOH o de HCl 1N, posteriormente se

esterilizaron en un autoclave a 15 lb/pulg² de presión, por 15 minutos.

Para la germinación, se pusieron en promedio 100 semillas en vasos de cultivo de 125 ml con 25-30 ml de medio. Los vasos se mantuvieron en un cuarto de incubación a 25-28 °C en la obscuridad o bajo iluminación constante (8400 lux según cada experimento), por medio de lámparas fluorescentes (blanco frío) de 30 watts.

4.3.2. PROPAGACION DE MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron los medios MS y SH suplementados con 1 g/l de hidrolizado de caseína, 1 mg/l de BAP, y 30 g/l de sacarosa empleando como soporte 1.6 g/l de gelrite.

4.3.3. INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO.

4.3.3.1. A).- PLANTA ADULTA.

Se emplearon explantes de tallo y hoja de la planta adulta (7 años de edad) y se colocaron en los medios MS o SH, suplementados con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 0-80 mM y CIN en concentraciones de 0-80 mM, solas o en combinación, de acuerdo a un diseño experimental factorial de dos factores con cinco niveles cada uno y completamente al azar. Cada tratamiento con 4 frascos con tres explantes cada uno (Tabla 7).

4.3.3.2. B).- PLANTULAS *in vitro*.

Los explantes de tallo, hoja y raíz de plántulas obtenidas *in vitro* por germinación de semillas, se colocaron en los siguientes medios:

A).- SH suplementado con Acido Indolacético (AIA) y CIN en concentraciones de 0-100 µM.

B).- MS, SH y Bs (Tabla VI) suplementados con 2,4-D y CIN, en concentraciones de 0-100 μM .

C).- MS, SH y Bs, suplementados con Acido p-Clorofenoxiacético (p-CPA) en concentraciones de 0-1.0 μM y CIN a concentraciones de 0-10 μM .

D).- Bs suplementado con Acido Naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) a concentraciones de 0-100 μM .

E).- Bs y MS suplementados con ANA en concentraciones de 0-20 μM y BAP a concentraciones de 5-15 μM .

Los reguladores de crecimiento se emplearon sólo o en combinación de acuerdo a diseños experimentales factoriales de dos factores. En A-D con 5 niveles cada uno, en E con 4 X 3 niveles y completamente al azar. Cada tratamiento se realizó con tres frascos y cada frasco con 3 explantes cada uno. En A y B se usaron explantes de tallo, hoja y raíz, pero en C, D y E se usó solamente tallo como explante.

Los medios SH y MS, además se suplementaron con 30 g/l de sacarosa, mientras que el medio Bs contenía 20 g/l, se empleó 1.6 g/l de gelrite como agente solidificante en todos los casos. El pH de los medios MS y SH se ajustó entre 5.7-5.8 y para el Bs fue de 5.5. Todos los medios se esterilizaron en un autoclave a 15 lb/plg² de presión durante 15 minutos.

Los frascos de cultivo con 25-30 ml de medio se mantuvieron en un cuarto de incubación a una temperatura de 25 ± 2 °C a una intensidad luminosa continua de 5400 lux, proporcionada por lámparas fluorescentes (Solar 30W/T38/A1/LD Slimline 30).

4.4. CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION.

Para obtener cultivos en suspensión, se inocularon de 5-6

gramos de peso fresco de callo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio Bs suplementado con 10 μM de BAP y 0.1 μM de ANA.

Estos cultivos se incubaron en una agitadora orbital (New Brunswicks Scientific Co., Inc. Modelo 653), a 90 rpm, con una amplitud de giro de 2 plg. La temperatura se mantuvo a 25 ± 2 °C a través de un sistema de aire acondicionado y una iluminación de 2800 lux.

4.5. CINETICA DE CRECIMIENTO CALLO-CALLO.

Se pesaron aproximadamente 0.75 g de callo fresco y se colocaron en vasos de cultivo con 25 ml de medio Bs suplementado con 10 μM de BAP y 0.1 μM de ANA, incubándolos a 25 ± 2 °C y una iluminación de 5400 lux. Se determinaron cada cuatro días los siguientes parámetros: Peso fresco, peso seco, producción de vainillina y compuestos relacionados.

4.6. ENSAYOS.

4.6.1. Determinación del Peso Fresco de callos (PF).

La biomasa producida por un callo se colocó en charolas de papel aluminio, previamente llevadas a peso constante en una estufa de vacío (Lab-line duo-Vac Oven Instruments, Inc.) a 0.5 atm., durante 24 horas a 65°C. La diferencia entre el peso de la charola vacía y el de la misma conteniendo la biomasa dió el peso que corresponde al peso fresco del callo.

4.6.2. Determinación del peso seco de los callos (PS).

Para el peso seco, el tejido calloso utilizado para determinar el PF, se colocó en la estufa de vacío, bajo las mismas

condiciones antes mencionadas para la determinación del peso fresco, hasta alcanzar un peso constante y se pesaron en una balanza analítica (Bush-S 200). La diferencia entre los pesos constantes con la biomasa y el de las charolas correspondió al peso seco de los callos.

4.6.3. Determinación de parámetros cinéticos.

La velocidad específica de crecimiento (μ), se calculó mediante el método gráfico. (Aiba, y col., 1973; Pirt, 1975).

La μ se relacionó con el tiempo de duplicación de la biomasa (t_d), que se calculó por la expresión:

$$t_d = 0.693 / \mu$$

que indica el tiempo requerido para que se duplique la biomasa de una población celular.

El Índice de Crecimiento (IC) se calculó mediante la fórmula:

$$IC = (P_f - P_i) / P_i$$

donde:

IC = Índice de crecimiento, utilizando el peso fresco o el peso seco.

P_f = Peso de la biomasa en un tiempo dado (t) (g/l).

P_i = Peso de la biomasa inicial (g/l).

4.7. TECNICAS ANALITICAS.

4.7.1. DETERMINACION DE VAINILLINA Y COMPUESTOS RELACIONADOS.

El método para la extracción de vainillina empleado para los callos de vainilla fue modificado de Romagnoli y Knorr (1988) y de Archer (1989). El tejido calloso seco o fresco, se maceró y se extrajo con 20 ml de agua desionizada caliente a 80 °C por diez minutos, éste se filtró sobre papel Whatman # 1, y el extracto se

concentró a sequedad. Del callo macerado se hizo otra extracción con 20 ml de metanol a 40 °C por 20 minutos, se filtró la mezcla por papel Whatman # 1 y se concentró a sequedad a 50 °C con un rotavapor. Los dos concentrados se redisolviéron con 1 ml de metanol grado HPLC, se filtró a través de un cartucho Sep-pak C18, del filtrado se tomaron 20 µl y se analizaron por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), en un cromatógrafo Tracor 951, con detector UV de longitud de onda variable (Tracor 970 A) a 280 nm. La columna fue una Spherisorb ODS 2 de acero inoxidable de 250 X 4.6 mm. La fase móvil consistió de Metanol grado HPLC (Baker), agua desionizada y ácido acético (grado reactivo, Baker), 3:9:1. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1.6 ml/min.

La concentración de vainillina y de compuestos relacionados se determinó mediante la comparación con el área obtenida mediante el uso de un patrón estándar de vainillina (Sigma de México), p-hidroxibenzaldehído (Baker), ácido p-hidroxibenzoico (Baker), ácido vainillínico (Baker), ácido cumárico (Sigma Chemical Company), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Sigma), ácido ferúlico (Sigma), ácido caféico (Sigma), a una concentración de 0.01 mg/ml dado por un integrador Hewlett Packard 3392A, adaptado al equipo de cromatografía.

4.8. MODELO ESTADISTICO.

El análisis de los datos se hicieron de acuerdo al siguiente modelo estadístico (Peng, 1967):

$$Y_{\iota j \kappa} = \mu + \alpha_{\iota} + \beta_j + \gamma_{\iota j} + \varepsilon_{\iota j \kappa}$$

($\iota = 1, 2, \dots, a$; $j = 1, 2, \dots, b$; $\kappa = 1, 2, \dots, k$).

donde:

$Y_{\iota j \kappa}$ = valor de la k-ésima observación para el i-ésimo nivel de A y el j-ésimo nivel de B. (Variable de respuesta a un tiempo).

μ = media general.

α_{ι} = efecto medio del i-ésimo nivel debido al factor de la auxina.

β_j = efecto medio del j-ésimo nivel debido al factor de la citocinina.

$\gamma_{\iota j}$ = efecto medio del i-ésimo nivel de auxina/j-ésimo nivel de citocinina, debido al factor de interacción auxina/citocinina.

$\varepsilon_{\iota j \kappa}$ = error experimental (variación debido al azar).

ι = niveles de auxina ($i= 1,2,\dots,I$). donde $I= 5$.

j = niveles de citocinina ($j= 1,2,\dots,J$). donde $J= 5$.

κ = k-ésima replica ($k= 1,2,\dots,r$). donde $r= 3$.

5. RESULTADOS.

5.1. DESINFESTACION Y GERMINACION DE LAS SEMILLAS DE VAINILLA.

5.1.1. Efecto del tiempo de exposición y concentración del agente desinfectante en la germinación de semillas de vainilla.

En este experimento las semillas de vainilla fueron sometidas a diferentes métodos de acondicionamiento físico y químico antes y durante su desinfección para lo cual se utilizó hipoclorito de sodio al 5% y dos tiempos de exposición (20 y 30 minutos). Las condiciones experimentales y los resultados se muestran en la Tabla VIII.

Con el primer tratamiento de acondicionamiento y desinfección existió el 100% de contaminación, en detrimento para obtener plántulas asépticas. En el segundo tratamiento al incluir el alcohol etílico al 70% (v/v), además del agente desinfectante, la contaminación disminuyó, pero no germinaron aún las semillas. Así, las mejores condiciones fueron con el tercer tratamiento, tanto para el acondicionamiento como para la desinfección de las semillas. Con ese tratamiento se abatió la contaminación totalmente y además las semillas germinaron. En otros intentos para hacer germinar las semillas de vainilla *in vitro*, las testas de las semillas se fracturaron por medios mecánicos pero, mostraron una dormancia más prolongada que con los tratamientos químicos empleados en el tercer tratamiento de la Tabla VIII. (datos no reportados).

Con lo que respecta a la germinación de las semillas, los resultados mostraron que fue mejor en el medio SH en la obscuridad (27% de las semillas germinadas). Las semillas germinaron doce semanas después de inoculadas en los medios de cultivo empleados. Además, se observó que las plántulas presentaban diferencias en

cuanto a sus características morfológicas, según el rango de luz a que estuvieron expuestas, bajo condiciones de obscuridad las plántulas fueron incoloras en su mayoría, mientras que las que se desarrollaron en condiciones de iluminación constante presentaron pigmentación verde.

5.2. MICROPROPAGACION DE *Vanilla planifolia*.

Para la propagación de plantas adultas de vainilla recolectadas en Papantla, Veracruz y de las plántulas de 3 meses de edad obtenidas en el laboratorio, se utilizaron como inóculo aproximadamente 50-60 segmentos de tallo (1-2 cm) con una yema axilar de cada una de las fuentes vegetales y se colocaron en los medios de cultivo citados en el inciso 4.3.2. de materiales y métodos. Los resultados se muestran en la Figura 7, observándose que en el medio SH y con la concentración de BAP empleada, indujo la formación de 5-6 brotes por yema axilar, en promedio, y en otros casos hasta 10 brotes (en total se obtuvieron 460 nuevos brotes para los segmentos de las plántulas *in vitro*, 220 para los de planta adulta), mientras que en medio MS se inducen 3-5 brotes por segmento en promedio, obteniéndose 400 nuevos brotes totales en los esquejes de plántulas *in vitro* y 160 para los de planta adulta, además los brotes son más largos en el medio SH y forman más raíces aéreas. La formación de los brotes se dió entre las 5-6 semanas después de inoculados los segmentos.

5.3. ESTUDIOS CON CULTIVOS DE CALLOS DE VAINILLA.

5.3.1. Efecto del balance del 2,4-D y CIN sobre la inducción de callos de *Vanilla planifolia* adulta.

En este experimento se emplearon los medios de cultivo del apartado 4.3.3.1 A de materiales y métodos utilizando explantes de

tallo internodal y de hoja a partir de planta adulta de 7 años de edad, crecida bajo condiciones naturales en la región de Papantla, Veracruz.

Los resultados mostraron que no hubo formación de tejido calloso o algún indicio de diferenciación del tejido en cualquiera de los tratamientos empleados. Por otra parte existió un serio problema de contaminación dentro de éste sistema, después de un periodo de seis meses de experimentación, por la presencia de bacterias sistémicas encontradas en los tejidos de los tallos empleados. Este problema se fué presentando mientras los tejidos se iban envejeciendo o necrosando en el medio de cultivo y, al tener contacto éstos microorganismos con el medio de cultivo proliferaron impidiendo por una parte una respuesta adecuada del tejido a las nuevas condiciones.

Por otro lado, los explantes de hoja de planta adulta, tampoco presentaron formación de callo o alguna diferenciación del tejido. Sin embargo, en el medio SH con 20 mM de CIN sólo o con 80 mM de 2,4-D/80 mM de CIN, los explantes perdieron totalmente su color, tornándose transparentes, mientras que con el medio MS existió poca o nula pérdida de color en los explantes.

5.3.2. Efecto del balance del AIA/CIN sobre la inducción de callo de *V. planifolia* obtenida *in vitro*.

Para llevar a cabo este experimento se tomaron explantes de tallo internodal, hojas y raíces de plántulas asépticas de seis meses, obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas, se inocularon en el medio de cultivo (A) del inciso 4.3.3.2. B de materiales y métodos empleando como fuente de carbono glucosa. Los resultados se muestran en la Tabla IX, y muestra que no se formó tejido calloso en ninguno de los tratamientos empleados. Sin

embargo, el tejido se diferenci6, en algunos casos formando estructuras organoides tales como n6dulos amarillentos, formaci6n y desarrollo de brotes, mientras que en otros casos cuando se utiliz6 la raiz como explante, 6sta se desarrollo m6s, es decir sigui6 creciendo como raiz en concentraciones por arriba de 20 μM de AIA, mientras que por debajo de estas concentraciones, aperecieron en sus puntas granos de meristemas que en un momento dado podrían convertirse en brotes.

Los efectos de la relaci6n AIA/CIN se pueden observar en la Figura 8 en la que la formaci6n de brotes m6ltiples se di6 principalmente empleando 20 μM de AIA y todas las concentraciones empleadas de CIN, algo similar paso con 50 μM de AIA con algunas de CIN. Las combinaciones empleadas de estos reguladores de crecimiento no indujeron callo, sino m6s bien producci6n de brotes m6ltiples. Esto se utiliz6 posteriormente para la propagaci6n del material vegetal *in vitro* para otros experimentos.

5.3.3. Efecto del balance 2,4-D y CIN en la inducci6n de callo en explantes de tallo de *Vanilla planifolia* obtenidos *in vitro*

En esta serie de experimentos se prob6 el efecto que ejerce la relaci6n 2,4-D/CIN a concentraciones de 0-100 μM , empleando los medios (B) del inciso 4.3.3.2.B de materiales y m6todos. El medio SH se modific6 con el doble de la concentraci6n de vitaminas, disminuci6n a una d6cima de la concentraci6n normal de mio-inositol y como fuente de carbono glucosa (30 g/l), denominado (SH-M).

Los resultados obtenidos en el medio SH-M despu6s de 6 meses de experimentaci6n se muestran en la Figura 9A, en la que se puede observar que con el 2,4-D como 6nico regulador de crecimiento y en bajas concentraciones (0, 0.1, 1.0 μM), el tejido se diferenci6

formando brotes múltiples, pero a concentraciones mayores, los explantes se necrosaron y murieron. Sin embargo cuando se encontraba la CIN sólo en el medio de cultivo, esta promovió la formación y desarrollo de la organogénesis, formando estructuras tales como raíces y brotes múltiples, pero a 100 μM los tejidos se necrosaron y murieron. En cuanto a la interacción de los reguladores de crecimiento, se observó que el tejido presentó diferentes respuestas; la formación de tejido calloso, pero este se revirtió formando brotes, que se desarrollaron hasta formar plántulas bien definidas; y la organogénesis directa (formación de brotes múltiples sin pasar por un estadio de callo). Pero en combinaciones altas el tejido se necrosó y murió. En la Figura 9B se muestran los efectos del medio de cultivo SH-M en la inducción de brotes a partir de explantes de tallo. Se observa que hay un punto en el que la formación de brotes es alta (un total de 60), cuando se empleó CIN como único regulador de crecimiento, además en ese mismo nivel es donde se dió la mayor producción de brotes múltiples.

En cuanto al medio B5 se observó que los explantes no desarrollaron callo en ninguno de los tratamientos empleados (Figura 10A). A bajas concentraciones de 2,4-D (0, 0.1 μM) se formaron brotes múltiples, pero a concentraciones altas el tejido se necrosó rápidamente. Al utilizar la cinetina sólo, la respuesta fué igual; formación de brotes múltiples y explantes necrosados en concentraciones altas. En la interacción de los dos reguladores, en algunas combinaciones se observó la presencia de tejido calloso, sin embargo éste no perduró, en algunos casos se necrosó pero en otros se formaron estructuras organoides. A combinaciones altas de los dos reguladores el tejido se necrosó y

murió. En la Figura 10B se dan los resultados del efecto del balance 2,4-D/CIN sobre la formación de brotes a partir de explantes de tallo, en la cual se asemeja a lo ocurrido con el medio Bs, en el nivel de 10 μM de CIN se dió la máxima formación de brotes múltiples con 38 brotes en total.

Con el medio MS, en la Figura 11A se observó, que a concentraciones de 100 μM de ambos reguladores los explantes se necrosaron y murieron, pero a concentraciones bajas el tejido se diferenció formando brotes múltiples ó en algunos casos los explantes no dieron respuesta alguna, es decir permanecieron sin algún cambio en su morfología. En cuanto se combinaron los reguladores de crecimiento se obtuvieron respuestas diferentes; formaron en algunos casos tejido calloso pero este se diferenció a brotes ó bien desarrolló raíces. En la Figura 11B se ve la influencia del balance 2,4-D/CIN en la inducción de brotes. Esto se presentó en la mayoría de los niveles, encontrando un máximo con 25 brotes. La duración de los experimentos fue de 6-8 meses, resembrando periódicamente cada 4 semanas a medio nuevo.

5.3.4. Efecto del balance ANA/BAP en la inducción de callo de *V. planifolia* obtenida *in vitro*.

En este experimento se empleó el medio de cultivo D de la sección 4.3.3.2 B de materiales y métodos, utilizando explantes de tallo de plántulas obtenidas *in vitro*, con edad de 6-12 meses.

La formación de callo dependió de la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo y los explantes mostraron diferente respuesta, como se observa en la Figura 12A. Cuando se empleó ANA como único regulador, en todas las concentraciones empleadas (0, 0.1, 1.0, 10 y 100 μM), el tejido se diferenció formando una gran cantidad de brotes múltiples (Figura 12B).

También cuando se empleó BAP sólo a concentraciones de 0, 0.1 y 1.0 μM , el tejido se diferenció formando brotes múltiples, pero a concentraciones de 10 y 100 μM los explantes formaron callo (Figura 12A), con formación de estructuras organoides como pelos absorbentes, raíces y tallos. Con respecto a la interacción de ambos reguladores, a bajas concentraciones de BAP (0-1.0 μM) con todas las de ANA, el tejido se diferenció formando brotes múltiples. Mientras que con los balances BAP/ANA: 10/0; 10/0.1; 10/10; 100/0; 100/1.0; 100/10, desarrollaron callos (Figura 12A y 12C). Este tejido con el tiempo formó estructuras organoides como pelos absorbentes, raíces, tallos y a veces plántulas. Estas observaciones se hicieron por 7 meses. El callo se propagó y mantuvo por resiembras periódicas cada 4 semanas, durante más de 12 meses. Se observó que a partir de la segunda resiembra, la presencia de las estructuras organoides fue disminuyendo poco a poco, hasta obtener callos bien definidos (Figura 13A), mientras que los brotes se desarrollaron hasta formar plantas. Los callos así mantenidos tuvieron las siguientes características morfológicas: en el nivel 10 μM de BAP y sus combinaciones de ANA los callos son grandes, esponjosos de color amarillo paja claro, sin embargo conforme la concentración de ANA aumentó el callo se hizo más compacto y duro, al igual que con 100 μM de BAP el tejido formado era muy compacto y de color amarillo-café, además tendía a necrosarse más rápido. En la Figura 13B se muestra la producción de callos totales obtenidos al final del experimento de mantenimiento de los mismos.

5.3.5. Efecto del balance p-CPA/CIN y del medio de cultivo en la inducción de callo de *V. planifolia* obtenida *in vitro*.

En este experimento se emplearon los medios de cultivo (C)

del inciso 4.3.3.2 B de materiales y métodos empleando explantes de tallo a partir de plántulas *in vitro*.

En general, en ninguno de los tres medios de cultivo empleados (MS, SH y B5) y sus respectivos tratamientos se indujo la formación de un callo. Con lo que respecta a la influencia del balance p-CPA/CIN, los resultados que se muestran en la Figura 14, indican que se formaron brotes múltiples en todos los tratamientos de los medios de cultivo empleados.

5.3.6. Efecto del balance ANA/BAP en la inducción de callos de *V. planifolia* obtenida *in vitro*.

Se emplearon los reguladores de crecimiento que produjeron callo anteriormente (ANA/BAP), tomando en cuenta la(s) concentración(es) encontradas en 5.3.4 y disminuyendo el rango para observar si en concentraciones cercanas se mantenía la formación de callo. Se utilizaron los medios (E) del inciso 4.3.3.2 B de materiales y métodos.

El experimento se llevó a cabo durante seis meses. Los resultados encontrados con el medio B5 se muestran en la Figura 15A. Al emplear 10 μM de BAP sólo, se formó callo; mostrando reproducibilidad con el experimento anterior (5.3.4). A bajas concentraciones de BAP (5 μM) con todas las de ANA (0, 5, 10, 20 μM) los explantes se diferenciaron formando brotes múltiples (Figura 15B), que se desarrollaron hasta formar plántulas bien definidas. Empleando 15 μM de BAP y algunas de ANA (0, 5, 20 μM) el tejido presentó ambas respuestas; inducción de callo con baja frecuencia y la formación de brotes múltiples (Figura 15 A y B).

Los resultados encontrados en el medio MS indicaron que hubo formación de callo con 10-15 μM de BAP sólo y en combinación de 5 μM de BAP/ 5 μM de ANA; y con 15 μM de BAP con algunas

combinaciones de ANA (0, 5, 20 μM), pero en muy baja frecuencia (Figura 15C). En la Figura 15D se muestra la influencia del balance BAP/ANA en el medio MS sobre la organogénesis, observandose que se desarrollaron brotes múltiples en casi todos los tratamientos empleados.

5.3.7. Efecto del tipo y posición del explante en la inducción de callos de *Vanilla planifolia* obtenida *in vitro*.

Se utilizaron plántulas obtenidas *in vitro* con una edad de 6-12 meses. Las plántulas fueron divididas en tres secciones (Figura 16): baja, media y alta. Los explantes se tomaron de acuerdo con la posición que guardaban en el cuerpo de la planta de la siguiente forma:

- 1.- Esqueje de la parte baja. Segmento de tejido con una yema axilar.
- 2.- Esqueje de la parte alta. idem.
- 3.- Explante de tallo de la parte media con el corte en el entrenudo pero con la orientación hacia abajo (\downarrow).
- 4.- Explante de tallo de la parte media con el corte en el entrenudo pero con la orientación hacia arriba (\uparrow).
- 5.- Explante de tallo de la parte alta con el corte en el entrenudo pero con la orientación hacia abajo (\downarrow).
- 6.- Explante de tallo de la parte alta con el corte en el entrenudo pero con la orientación hacia arriba (\uparrow).
- 7.- Explante de hoja de la parte media.
- 8.- Explantes de hoja de la parte alta.
- 9.- Explantes de hoja de la parte baja.
- 10.- Explantes de tallos internodales de las tres partes.

Los explantes de raíz basal y aérea no se utilizaron en este experimento ya que en experimentos previos se encontró que sólo se

alargaban como raíz. Los explantes de tallos internodales no se tomaron en cuenta porque no dieron ninguna respuesta y se necrosaron rápidamente.

Los explantes se inocularon en el medio Bs, suplementado con BAP (10 μM) y ANA (0, 0.1, 10 μM). Cada tratamiento se llevó a cabo con 9 repeticiones.

Los resultados mostrados en la Tabla X, indican que hubo inducción de callo y la formación de brotes múltiples, siendo el esqueje de la parte baja, y los explantes de tallo de la parte alta con la orientación hacia abajo (\downarrow) [Figura 16], los que mejores resultados produjeron en la formación de callos, los cuales eran grandes de color amarillo claro y friables. Los explantes de la parte media con orientación hacia arriba (\uparrow), produjeron callos no muy grandes, de color amarillo cafecito y poco compactos. Con respecto a los demás tipos de explantes que llegaron a formar callo, estos se desarrollaron más lentamente. Y además también se formaron brotes múltiples. En cuanto a los explantes de hoja, algunos perdieron sólo el color verde tornándose blancos, los otros se necrosaron y murieron, sin formación alguna de estructuras organoides u otro indicio de dediferenciación.

5.3.8. Efecto de la intensidad de la luz sobre la inducción y crecimiento de callos de *Vanilla planifolia*.

Para evaluar el efecto que tiene la luz en la inducción de callo, se varió la intensidad luminosa de 0 a 8400 lux, empleando para ello lámparas fluorescentes de 32 watts blanco frio. Los explantes utilizados fueron segmentos de tallo de diferente parte de la plántula e inoculados en los medios MS, SH y Bs suplementados con las concentraciones de los reguladores de

crecimiento determinadas previamente para la inducción de callo (BAP 10 μM y ANA 0, 0.1, 10 μM).

Los resultados encontrados para el medio MS (Figura 17A), mostraron que en las intensidades de 0 a 5400 lux es donde se desarrollaron el mayor número de callos, los cuales presentaron características similares en cuanto a color y friabilidad, mientras que en el medio Bs (Figura 17C) y SH (Figura 17E) se obtuvieron callos pequeños y compactos, pero en menor frecuencia. En cuanto a la respuesta organogénica de los explantes, el medio Bs es donde hubo mayor número de brotes formados (Figura 17D), los cuales se desarrollaron hasta formar plántulas completas, pero con características de poco desarrollo foliar, gran desarrollo de las raíces, en la intensidades de 0 a 5400 lux. Sin embargo, para el medio MS es donde se vió disminuida la formación de brotes múltiples (Figura 17B), tal vez por la formación de callos, pero en la intensidad de 5400 lux es donde se desarrollaron más brotes. Mientras que en el medio SH, aunque hay formación de brotes múltiples en casi todas la intensidades de luz empleadas ésta es fluctuante en los tratamientos (Figura 21F).

Por otra parte los explantes que estuvieron expuestos a la intensidad de 8400 lux, algunos perdieron el color, otros se necrosaron y murieron rápidamente, cabe señalar que ésta intensidad de luz elevaba la temperatura la cual secaba el medio de cultivo muy rápido impidiendo el desarrollo de los explantes.

5.3.9. Cultivo de células en suspensión de *Vanilla planifolia*.

Para iniciar cultivos en suspensión se pasaron callos a suspensión empleando el mismo medio de cultivo en que se mantenían los callos (Bs). Después de varios intentos se observó que los

cultivos no progresaban después de 45 días de inoculados, y que con 10 μM de BAP como único regulador de crecimiento, el tejido calloso se obscurecía rápidamente disminuyendo considerablemente su viabilidad. A concentraciones de 10 μM de BAP con 0.1 μM de ANA el tejido calloso formó grandes agregados de 5-10 mm de diámetro, sin que existiera alguna disgregación para formar suspensiones finas, aunque se siguieran resembrando periódicamente. Posteriormente estos agregados se regresaron a medio semisólido, empleando el mismo medio de cultivo en el que se mantenían como células en suspensión. De esta manera se logró establecer cultivos de callos friables y adecuados para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de callo-callos y su producción de metabolitos secundarios.

5.3.10. Cinética de crecimiento de callos de *Vanilla planifolia*.

Los callos con que se iniciaron estas cinéticas de crecimiento y de producción de vainillina y compuestos relacionados, fueron los que se indujeron previamente en 5.3.4. y que formaban grandes agregados celulares en suspensión, que se regresaron a medio semisólido para la reinducción de callos. El perfil de las curvas de crecimiento de los callos se presentan en la Figura 18, en la que se observan sus cinco fases de crecimiento características: fase lag entre los 8-10 días, exponencial (12-24 días), lineal o logarítmica muy larga (24-48 días), estacionaria (48-54 días) y la desaceleración (60-68 días), la duración total de la cinética fue de 68 días, obteniéndose una biomasa final de 3.60 g para el peso fresco y 0.20 g para el peso seco. Para el peso fresco, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.037 d^{-1} , con tiempo de duplicación (t_d) de 19.05 d y un Índice

de crecimiento (IC) de 4.04. Mientras que para el peso seco se obtuvo una $\mu = 0.036 \text{ d}^{-1}$, un $t_d = 18.25 \text{ d}$ y un $IC = 3.82$.

Al término de la cinética se procedió a analizar muestras de callo (peso seco) para cuantificar su producción de vainillina y compuestos relacionados empleando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

5.3.11. Producción de Vainillina y Compuestos relacionados en callos de *Vanilla planifolia*.

En la Figura 19 se muestra un cromatograma en el que se compara una muestra de callos de vainilla contra un estándar de varios de los componentes del sabor natural que sirvieron para cuantificar la producción en callos.

Como se observa en la Figura 20A, que durante la fase lag de crecimiento, la producción de la vainillina disminuye hasta el inicio de la fase exponencial en la que la concentración empezó a incrementarse, alcanzando su máximo con $11.52 \mu\text{g/g}$ de PS, en la fase lineal. La producción del ácido vainillínico, aumentó desde la misma fase lag, alcanzando su máxima producción en la fase exponencial con $160 \mu\text{g/g}$ de PS. Durante la fase lineal llegó hasta $100.72 \mu\text{g/g}$ de PS, permaneciendo casi constante hasta el final de la cinética (durante las fases estacionaria y de desaceleración). Para el ácido p-hidroxibenzoico, el comportamiento parece ser cíclico; aunque disminuye a la mitad de la fase lag, su concentración aumenta al final de la misma llegando hasta $139.28 \mu\text{g/g}$ de PS, pero casi al finalizar de la fase exponencial es donde alcanza su mayor producción con $196.07 \mu\text{g/g}$ de PS, volviendo a disminuir al final de esta misma fase y principios de la fase lineal, donde nuevamente se incrementa hasta alcanzar $120.57 \mu\text{g/g}$ de PS.

En cuanto a la producción del p-hidroxibenzaldehído, fue a la mitad de la fase estacionaria donde alcanzó su máxima producción con 113.06 $\mu\text{g/g}$ de PS, pero decayó y se mantuvo constante al final de la cinética.

En la figura 20B se muestra el comportamiento de la producción de los ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, p-cumárico y cafeíco que se identificaron en callos de vainilla. Así se tiene que el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, aunque empezó con una producción muy alta (1829.80 $\mu\text{g/g}$ de PS) en la fase lag disminuyó, hasta el principio de la exponencial donde llegó a alcanzar su máxima producción con 1879.48 $\mu\text{g/g}$ de PS y con 1714.46 $\mu\text{g/g}$ de PS, disminuyendo drásticamente al final de dicha fase, siempre con una producción más alta con respecto a los demás componentes encontrados. Por otro lado, para el ácido cafeíco, en la fase lag la producción se incrementó alcanzando en ésta su mayor producción con 288.74 $\mu\text{g/g}$ de PS, disminuyendo al inicio de la fase exponencial en la cual nuevamente volvió a incrementarse hasta 169.32 $\mu\text{g/g}$ de PS y 162.89 $\mu\text{g/g}$ de PS.

En cuanto a el ácido p-cumárico, durante la fase lag tuvo una producción de 415.79 $\mu\text{g/g}$ de PS; y es en la fase exponencial donde dió su mayor producción con un valor de 492.41 $\mu\text{g/g}$ de PS, seguido de 404.76 $\mu\text{g/g}$ de PS, en esta misma fase.

6. DISCUSION.

6.1 DESINFESTACION DEL MATERIAL VEGETAL Y GERMINACION *in vitro* DE SEMILLAS DE *Vanilla planifolia*.

Una dificultad general en la aplicación de la técnica de Cultivo de tejidos Vegetales es la desinfestación del material vegetal que se va a utilizar como fuente de explantes para el establecimiento de cultivos *in vitro* (Yeoman y Macleod, 1977; Biondi y Thorpe, 1981).

Durante la experimentación se detectó que con un preacondicionamiento sencillo (remojo en agua) y empleando sólo hipoclorito de sodio al 5% como único agente desinfestante, existió el 100% de contaminación. Con el segundo tratamiento siguió el mismo comportamiento, aunque se abatió el porcentaje de contaminación, no existió indicio alguno de germinación de las semillas. Por lo que es evidente que un tratamiento de desinfestación superficial sencillo, no siempre tiene buen éxito en producir plántulas asépticas de todas las especies vegetales a utilizar (Sweet y Bolton, 1979). Así, se observó que las mejores condiciones de preacondicionamiento y de desinfestación, se obtuvieron con el tratamiento C (Tabla VIII), logrando erradicar completamente la contaminación y además se llevó a cabo la germinación de las semillas. Las semillas de vainilla utilizadas en este trabajo, presentaban una superficie seca, las cuales no se humedecían con facilidad, por lo que el remojo en agua y el lavado con tolueno-etanol ayudaron a reblandecer la testa y además a eliminar las grasas o materia orgánica adherida a éstas. La solución de tolueno-etanol probablemente escarificó la testa de las semillas o bien pudo haber inducido la formación de pequeños poros, como se ha observado que se forman al emplear dicha

solución en membranas celulares de plantas superiores (Lerner, y col.,1978), esto permitió de una forma el paso del agua y de nutrimentos al embrión y que así se estimulará la germinación. Por otra parte al utilizar el etanol al 90%, este permitió liberar a las semillas de las oleoresinas y de las partículas placentales pegajosas, las cuales mantienen unidas a las semillas, formando racimos que impiden y dificultan su desinfestación (Knudson,1950; Withner,1955). Al aumentar el tiempo de exposición del agente desinfestante no existió ya contaminación, permitiendo la germinación de las semillas. Resultados similares fueron encontrados por Tonnier (1951) el cual encontró que regímenes severos no alteran la germinación de las semillas de vainilla, además de que probó la dureza y la impermeabilidad de la testa de dichas semillas. Por otra parte Sweet y Bolton (1979) recomiendan que para una buena desinfestación utilizar etanol al 70-90% por un período de 20-30 minutos, al igual que el hipoclorito de sodio al 5% durante un tiempo de contacto de 25-30 minutos, dependiendo de la especie vegetal.

En relación a otro aspecto desarrollado en este trabajo, la germinación *in vitro* de las semillas de *Vanilla planifolia*, aunque las semillas germinaron en ambos medios de cultivo (MS y SH) empleados y tanto en condiciones de obscuridad y de iluminación constante (Tabla VIII), fue notorio que las plántulas obtenidas presentaban diferencias morfológicas, de tal forma que aquellas que se desarrollaron en la obscuridad fueron incoloras, es decir no presentaron pigmentación alguna y además presentaron desarrollo foliar escaso, sin embargo las raíces tanto basales como aéreas o adventicias se desarrollaron más. Por otra parte las que se obtuvieron bajo el régimen de iluminación, presentaron

pigmentación, con desarrollo foliar mayor, pero el desarrollo de las raíces tanto basal como adventicias fue muy pobre. En cuanto a tamaño o altura de las plántulas se observó que en la obscuridad eran mas altas, mientras que en la luz eran mas pequeñas, presentando un tallo delgado las que se desarrollaron en la obscuridad comparado con el tallo engrosado que presentaron las plántulas bajo el régimen de iluminación. Sin embargo, la germinación y el desarrollo de las plántulas fue irregular y variable en ambos medios. Aunque muchas semillas iniciaron la germinación y formaron pequeños protocormos, no todos fueron más allá de este estadio, muchos se tornaron café y murieron. Resultados similares fueron encontrados en la germinación de semillas de *Cypripedium* y *Vanilla* por Hegarty (1955). De aquellos que se desarrollaron y crecieron, se observan variaciones en vigor, indicando esto que existen variaciones o diferencias fisiológicas o genéticas entre plántulas. Estas diferencias entre plántulas de una misma especie, pueden ser debidas a factores tales como la constitución genética, que puede afectar la fertilidad y la viabilidad; las condiciones ambientales luz, humedad, aireación y temperatura; o por factores biológicos y químicos contenidos en el medio de germinación (Hegarty, 1955).

Ahora bien al comparar los resultados del tiempo de germinación obtenidos en este trabajo que fue de doce semanas, con respecto a los reportados en la literatura, que son de un período de 4-12 meses (Knudson, 1950; Withner, 1955; Lugo-Lugo, 1955 a, b; Jinyu y Hong, 1987; Knuth y Sahai, 1988), y en algunos casos excepcionales de 4-8 semanas empleando procesos combinados (Hegarty, 1955, Philip y Nainar, 1988a), aquí se logró disminuir este tiempo de germinación para obtener plántulas en el menor

tiempo, aunque debe de tomarse en cuenta que existen varios factores limitantes para una comparación directa tales como condiciones de cultivo (calidad de la luz, fotoperíodo, temperatura de incubación, humedad, etc), medio de cultivo (composición química, medio semisólido o líquido), estado de madures del fruto de donde se tomaron las semillas, regímenes hormonales. Si tomamos en cuenta que el fruto tarda de 210 a 270 días para madurar (Parra 1984), más el tiempo para germinar las semillas, suma de 310 a 570 días para obtener plántulas completas en el laboratorio (Parra,1987).

Con lo que respecta al número de semillas germinadas, es un poco difícil de precisar con exactitud, ya que las semillas son muy pequeñas en tamaño, y por esta razón, fue casi impráctico el intentar sembrar un número exacto de semillas en cada frasco, aproximadamente se sembraron entre 100-150 semillas/frasco. Los resultados nos muestran que el número de semillas germinadas es muy bajo (Tabla VIII), esto pudo ser debido a que dentro de un mismo lote de semillas, sólo una porción germina, mientras que el resto puede permanecer latente hasta por varios años (Knudson,1950). Aunque al utilizar el método del tetrazolio, agente indicativo por coloración de viabilidad, mostró que del lote de semillas utilizado para la germinación, el 90% de ellas eran viables (datos no reportados), sin que exista una relación entre la viabilidad y la germinación de las semillas de vainilla. Por otra parte, Van Waes y Debergh (1986) reportan en un estudio realizado para obtener el máximo porcentaje de germinación en 23 especies de orquídeas europeas, que no existe una correlación directa entre el porcentaje de germinación de las semillas y el método del

tetrazolio, ya que este puede mostrar un porcentaje de viabilidad muy alto pero el porcentaje de germinación muy bajo o viceversa, algo similar sucedió en el presente trabajo. Además Hartman (1980) menciona que existen diferentes factores que pueden en un momento dado impedir la germinación dentro de los cuales destacan: la impermeabilidad al agua y nutrimentos, presencia de embriones rudimentarios, formación de sustancias inhibitoras. Alguna de estas suposiciones debe de tomarse en cuenta en este trabajo, dadas las proporciones obtenidas al realizar la germinación de las semillas de vainilla. Aspectos similares a los encontrados en este trabajo fueron reportados al tratar de hacer germinar semillas de 29 especies de orquídeas, dentro de las cuales destacaban *Cipripedium*, *Goodyera*, *Platanthera*, *Spiranthes*. Estas germinaron en seis meses, con porcentajes muy bajos, siendo su germinación y desarrollo variable con el medio utilizado. Además, semillas de 13 especies no germinaron permaneciendo así por dos años (Henrich, y col.,1981). Cabe recordar que la germinación de las semillas de vainilla bajo condiciones naturales no se ha llegado a observar en algunos lugares (Parra,1987; Menchaca,1990) ó apenas el 1-2% logra germinar (Philip y Nainar,1988a), debido a un endurecimiento de la testa y a la secreción de aceites que inhiben la germinación (Parra,1987).

6.2 MICROPROPAGACION DE *Vanilla planifolia*.

Aunque la vainilla puede ser crecida a partir de semillas, ésta siempre es propagada en las plantaciones por medio de esquejes, que son tomados de plantas sanas y vigorosas. La longitud del esqueje esta determinado por la cantidad de material vegetal disponible (Correll,1953; Purseglove,1988).

Para la propagación en este estudio se empleó como inóculo segmentos de tallo (2-3 cm) con una yema axilar, a partir de dos fuentes, una de las plantas crecidas en condiciones naturales y la segunda a partir de las plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de las semillas. En los resultados encontramos que se produjeron por segmento de 5-6 nuevos brotes en los segmentos de plántulas *in vitro* y de 4-5 brotes en los segmentos de plantas adultas, en ocasiones hasta diez o más brotes eran formados. La formación de los nuevos brotes se pudo observar de dos formas, una por medio de la formación directa y segunda por la formación de una masa de protocormos que se desarrollaron hasta plántulas. La baja formación de nuevos brotes a partir de planta adulta (Figura 7), pudo ser debido a que en este sistema existió contaminación en ambos medios ya avanzada la experimentación, esto debido a que los tejidos se encontraban contaminados por bacterias sistémicas, las cuales no pueden ser eliminadas en la desinfección superficial. La otra forma es que el tejido ya no era muy vigoroso y tenía aspecto de tejido viejo, por lo que no desarrollo muchos brotes nuevos. Ahora bien al emplear los tejidos jóvenes, que aún presentaban muy poca diferenciación, permitió que se desarrollaran fácilmente nuevos brotes, directamente o bien la formación de una masa de protocormos, lo que originó que se obtuvieran más brotes en ambos medios de cultivo (Figura 7).

Nuestros resultados concuerdan con aquellos reportados usando este método de cultivo de tejidos, usando igualmente segmentos nodales para llevar a cabo la propagación a partir de plantas crecidas en un invernadero, obteniendo una cantidad de nuevos brotes de 5-8 por yema (Cervera y Madrigal,1981; Kononowicz y Janick,1984; Gutiérrez,1987). La proliferación de brotes fue

llevada a cabo por medio del crecimiento de yemas axilares o por la formación de protocormios (Kononowicz y Janick,1984; Philip y Nainar,1986; Jarret y Fernandez,1984). Además concordaron con que al emplear BAP como único regulador de crecimiento se obtuvo multiplicación de brotes, ya que esta citocinina es empleada para la proliferación de brotes a partir de yemas axilares en especies vegetales que tienen una capacidad organogenética (Gamborg y Shyluk,1981; Bhojwani y Razdan,1983). Por otra parte las plántulas o protocormos formados de los segmentos nodales, pueden ser dependientes de la composición del medio de cultivo o del tamaño del explante, o de ambos, para su desarrollo (Philip y Nainar,1986).

La propagación *in vitro* de la vainilla, puede ser empleada como un medio efectivo para producir esquejes libres de patógenos (Gutiérrez,1987) ó bien esta técnica puede ser adaptable para el almacenamiento de germoplasma de vainilla, a plazo medio y puede contribuir a facilitar el intercambio internacional de germoplasma de esta planta (Jarret y Fernandez,1984).

6.3. ESTUDIOS CON EL CULTIVO DE CALLOS.

En muchos sistemas de cultivo de células y tejidos vegetales, el medio basal nutritivo es suplementado con reguladores de crecimiento vegetal, principalmente una auxina o una citocinina solas o una combinación de ambos (Neumann,1988). El efecto de las auxinas y de las citocininas sobre las células y tejidos vegetales en condiciones *in vivo* como *in vitro* está interrelacionado (Yeomam,1970; Aitchison, y col.,1977). La proporción de estos reguladores de crecimiento que es requerida para los tejidos vegetales, varía con el estado fisiológico del tejido

(Murashige,1974). Se ha observado que una relación auxina/citocinina tiene efectos muy pronunciados sobre el desarrollo y establecimiento de cultivos *in vitro* (Skoog y Miller, 1955; AboEl-Nil, y col.,1976; Narayanaswamy,1977). Es por ello conveniente encontrar una relación auxina/citocinina adecuada para la inducción y desarrollo de callos de cualquier especie vegetal que se quiera trabajar, en este trabajo para la especie *Vanilla planifolia*.

El efecto del balance de los reguladores de crecimiento 2,4-D/CIN, sobre los explantes de tallo a partir de plantas maduras (adultas) crecidas bajo condiciones naturales, no se pudo observar a lo largo de los 8 meses de experimentación, por varias razones; primera, porque el tejido era muy viejo o diferenciado y no influyeron en él ni el medio de cultivo ni los reguladores de crecimiento empleados para inducir la formación de callos u organogénesis; segundo, el tejido se encontraba contaminado por la presencia de bacterias sistémicas, las cuales proliferaron al entrar en contacto con el medio de cultivo. No debemos olvidar que aunque la mayoría de los microorganismos se encuentran en la superficie de los órganos vegetales, existen evidencias de su presencia también en la parte interna de los tejidos de las plantas. Merino (1987) ha reportado también la presencia de bacterias sistémicas en las yemas florales de vainilla, además de la infestación por el virus de mosaico de las orquídeas (virus de mosaico de *Cymbidium*) o por el potivirus de manchas en anillo de *Odontoglossum* (Wisler, y col.,1987; Pearson,1990). Este tipo de contaminación fue también encontrado a partir de explantes de hoja, tallo, peciolo y rizoma de algunas especies de valeriana (*Valeriana edulis ssp procera*) en forma silvestre, limitando su

establecimiento *in vitro* (Sánchez,1991. Comunicación personal). Tomando en cuenta esos factores, es evidente que el cultivo *in vitro* de vainilla se ve limitado a partir de planta adulta crecida bajo condiciones naturales. Esto hace necesario y recomendable utilizar plantas obtenidas *in vitro*, debido a que presentan menor grado de diferenciación, mayor homogeneidad celular y una fuente aséptica de plántulas (Yeoman y Macleod,1977).

En la siguiente serie de experimentos, se empezaron a utilizar las plántulas crecidas *in vitro*, ya sea a partir de la germinación de las semillas o bien de la micropropagación.

Aunque los reguladores de crecimiento AIA/CIN no influyeron para la formación de callos, se obtuvieron estructuras organoides tales como: nódulos amarillentos en las puntas de los explantes, lo que también fue reportado por Kononowicz y Janick (1984), además de la formación de brotes múltiples (Figura 8). Es decir se obtuvo organogénesis directa a partir de las partes excisadas de los explantes, como ha ocurrido para otras especies vegetales (Krikorian,1991). Ahora bien, al utilizar el explante de raíz como única fuente vegetal, se observó que al tener presentes concentraciones mayores de 20 μM de AIA, ésta solo seguía creciendo como raíz, pero cuando era colocada en concentraciones menores de 20 μM de AIA, en sus puntas se podían observar meristemas, que en un momento dado podrían convertirse a brotes u otra estructura. Resultados similares fueron reportados por Philip y Pedikkala (1989), quienes encontraron que al utilizar la raíz en un medio conteniendo concentraciones mayores de 5 mg/L de AIA, continuaba creciendo y desarrollándose como raíz, pero además encontraron que se formaban meristemas que en un medio conteniendo de 1-5 mg/L de AIA, se desarrollaron hasta formar brotes y

plántulas (Philip y Nainar,1988 b). Sin embargo Knuth y Sahai,1988, mencionan la formación de callo a partir de raíces de la planta de vainilla, mientras Philip y Nainar (1986), encontraron sólo el desarrollo de las raíces e hinchamiento de éstas en sus puntas, de las cuales se formaron plántulas directamente de la zona meristemática sin una interfase de callo. La nula o baja inducción de tejido calloso en los explantes de raíz, confirma que cada tejido u órgano requiere de cierta concentración y tipo de regulador de crecimiento para que se origine una respuesta en presencia de estas sustancias (Beach y Smith,1979).

Con plántulas *in vitro*, teniendo como reguladores de crecimiento al 2,4-D/CIN, se encontró que existieron diferentes respuestas por parte de los explantes, primero, cuando se encontraba la cinetina como único regulador y en bajas concentraciones el tejido se diferenció formando brotes múltiples, de igual forma, estando el 2,4-D sólo y en bajas concentraciones, se obtuvo la misma respuesta, esto ocurrió en los tres medios de cultivo empleados (Figuras 9B,10B,11B). La formación de los brotes múltiples pudo ser por varias rutas: primero, por organogénesis directa; segundo por la formación de callo, el cual se revirtió a la organogénesis y formar estos brotes. Por otro lado, cuando existió una combinación de ambos reguladores de crecimiento, en algunos se formaron brotes y en otros la formación de tejido calloso (Figura 9A,10A,11A), pero este era más bien un callo organogenético. Pero al emplear estos reguladores en altas concentraciones el tejido se necrosó y murió (Figuras 9A,10A,12A). Estos resultados concuerdan con los reportados por Kononowicz y Janick (1984), quienes intentaron la formación de callo con los

mismos reguladores de crecimiento, sin que se les formara un callo bien definido, sino la formación de brotes múltiples o estructuras organoides amarillentas. Además, concuerdan con la función de los reguladores de crecimiento empleados, a bajas concentraciones el 2,4-D desarrolla brotes (Kurz y Constabel, 1979; Krikorian, 1991), pero en altas concentraciones es perjudicial a las plantas herbáceas ya que es también utilizado como un herbicida (Larqué-Saavedra y Reyes, 1988).

Así las respuestas morfogenéticas son frecuentemente determinadas por el tipo de auxina y citocinina usadas y la concentración de éstas en el medio al inicio del cultivo. Los tejidos cultivados *in vitro* son capaces de diferenciarse y formar órganos *de novo*, tales órganos incluyen raíces, brotes, flores, etc. (Thorpe, 1980).

En este estudio se observó que cuando el medio contenía como único regulador de crecimiento al ácido naftalenacético, en todas las concentraciones empleadas, los explantes se diferenciaron formando brotes múltiples (Figuras 12A y 12B). Esto concuerda con los resultados encontrados por Smulders, y col., (1988), quienes al emplear la auxina sintética ANA, como único regulador de crecimiento en el medio de cultivo, éste indujo la formación de un alto número de brotes o yemas florales en explantes de tallo de tabaco. De igual forma cuando se empleó la citocinina BAP sólo en el medio de cultivo a bajas concentraciones también forma un gran número de brotes múltiples (Figuras 12A y 12B). BAP fue el más efectivo en inducir la formación de brotes múltiples directamente a partir de los explantes o de los callos de *Lens culinaris* (Polanco, y col., 1988), al igual que se encontró en este estudio para *V. planifolia*. Las combinaciones involucrando al ANA y BAP

también han sido exitosamente empleadas en inducir la regeneración de plantas en otras especies (Polanco, y col.,1988). Esto concuerda con los resultados encontrados en este trabajo (Figuras 12A y 12B), en la cual observamos que al interactuar estos dos reguladores se obtiene una formación muy alta de brotes múltiples. La regeneración por medio de organogénesis y la formación de brotes en pepino fue previamente reportado en una combinación de AIA/CIN y ANA/BAP a partir de explantes de cotiledón e hipocotilo. Pero la alta frecuencia de organogénesis en ese estudio se presentó con la combinación ANA/BAP (Punja, y col.,1990).

Ahora bien la formación de los brotes múltiples en explantes de vainilla pudieron ser originados a partir de meristemas pre-existentes en el explante original, estimulado éste por el grado del efecto de los reguladores de crecimiento, que es dependiente de la concentración de éstos en el medio de cultivo, o bien de la dosis acumulada por el tejido sobre un cierto periodo de tiempo (Thorpe,1980; Smulders, y col.,1988; Litz y Jarret, 1991), también en un momento dado se formó un callo organogenético a partir del cual se regeneraron estos brotes bajo varias concentraciones de estos reguladores de crecimiento, tal y como lo encontraron Davidonis y Knorr (1991), al regenerar brotes a partir de callos de vainilla empleando dichos reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

Pero no solo, en este trabajo se encontró la formación de brotes múltiples, sino que además al emplear altas concentraciones de BAP (10 y 100 μM) como único regulador en el medio, los explantes formaron callos (Figura 12C y 13A), nuestros resultados son similares a los reportados por Davidonis y Knorr (1991), al tratar explantes de vainilla con BAP antes de ser transferidos a

un medio de proliferación de callo. Aunque sobre algunas piezas de callo de vainilla inducidas en el presente trabajo, en su superficie fue compuesto de parches de pelos unicelulares (Figura 12A), semejantes a los rizoides encontrados en los protocormios al iniciar la germinación de las semillas de vainilla. Esto nos indica que los callos tienen tendencia organogenética y por ello estructuras organizadas fueron producidas, que no se asemejen a raíces o brotes y han sido llamadas organoides. Este efecto también fue reportado por Davidonis y Knorr (1991), explicando por una parte la alta frecuencia organogenética encontrada aquí. También se formó callo con la combinación de dichos reguladores (Figuras 12A y 12C), pero también se formaron las estructuras organoides, además de una respuesta organogenética como brotes, tallos y a veces hasta plántulas. Aunque con el tiempo de duración del experimento y sus posteriores resiembras para su mantenimiento, estas estructuras se fueron perdiendo (Figura 13A). Esto puede ser explicado de la siguiente manera: se ha observado que muchos de los tejidos cultivados exhiben un alto potencial para la organogénesis o embriogénesis cuando son primeramente iniciados, pero gradualmente hay un decline en una serie de subcultivos con la eventual pérdida de la respuesta organogenética (morfogenética), la pérdida de un requerimiento de los reguladores para el crecimiento o bien la aparición espontánea de tejido con una textura alterada. La pérdida del potencial organogenético puede ser debido a cambios genéticos o fisiológicos inducidos por las condiciones de un cultivo prolongado. Por lo tanto, los explantes a partir de una misma especie varía tremendamente en su capacidad para sufrir una organogénesis. Además, un callo no es homogéneo y está sujeto de cambios con la edad del cultivo

(Narayasnawamy, 1977; Reinert, y col., 1977; Yeoman y Forche, 1980; Thorpe, 1980). Esto nos permitió tener callos bien definidos o verdaderos, así como los brotes se desarrollaron hasta formar plantas bien definidas (Figura 13A).

En el siguiente experimento se utilizaron las concentraciones que formaron callo anteriormente, pero se cambiaron los reguladores de crecimiento siendo ahora p-CPA (0, 0.1, 1.0 μM y CIN (0, 1.0, 10 μM), y observar si este tipo de reguladores de crecimiento y dichas concentraciones tenían efectos en la formación de tejido calloso.

Los resultados encontrados (Figura 14 A,B,C) nos muestran que en general el tejido se diferenció formando una gran cantidad de brotes múltiples. De esta forma es correcto esperar que a bajas concentraciones del p-CPA y en presencia de la cinetina ocurra una diferenciación celular. El efecto de la cinetina se vió reflejado en la formación de brotes, es decir indujo la diferenciación y formación de órganos en los explantes de vainilla, como menciona Szweykowska (1974), que uno de los aspectos de la acción de la citocinina sobre el proceso de diferenciación en células vegetales cultivadas *in vitro*, es su efecto en la orientación de la división celular y la inducción de órganos o el desarrollo de organoides. Por lo tanto las citocininas inducen la formación de brotes, con lo que concuerda esta idea con lo reportado en este trabajo, con la formación de brotes múltiples en forma directa sin pasar por un estadio de callo, sin embargo no se descarta la posibilidad de la formación de un callo organogénico el cual reversionó muy rápido a la organogénesis formando dichos brotes, como lo reportan Skoog y Miller (1955), quienes observaron que las citocininas inducen la formación de yemas de brotes en muchos cultivos de tejido calloso.

Cabe mencionar que para cada tipo de tejido existe una concentración de auxina óptima para la inducción de la división celular, por debajo o encima de la cual no ocurre éste fenómeno. En este trabajo, con el ácido p-clorofenoxiacético, desarrollaron brotes múltiples en presencia de la cinetina, en los tres medios de cultivo empleados.

Al tomar en cuenta las concentraciones de los reguladores de crecimiento que influenciaron para la formación de callos del experimento 5.3.4, que fue la BAP (10 μM) y de ahí partir de forma ascendante y descendente con nuevas concentraciones de esta citocinina, además de probar nuevas concentraciones de ANA, incluso probar otro medio de cultivo (MS) con esta combinación de reguladores de crecimiento. Los resultados nos mostraron que con estos mismos reguladores, hay formación de callo con 10 μM de BAP como único regulador tanto en el medio Bs y MS (Figuras 15A y 15C) respectivamente, lo cual nos indica que hay reproducibilidad con respecto al experimento 5.3.4. en que se usó este tipo de citocinina y concentración de la misma y que formó callo. Además se formó callo también con 15 μM de BAP. Lo que confirma lo expresado anteriormente. También el tejido presenta ambas respuestas, formación de callo y formación de brotes múltiples en ambos medios de cultivo empleados (Figura 15B y 15D) respectivamente, considerando los mismos argumentos planteados anteriormente para explicar este patrón de desarrollo de los explantes con el experimento 5.3.4., además de que se toma en cuenta la utilización de otros medios de cultivo para la obtención de la respuesta deseada como es el caso de la inducción de callo.

Virtualmente todas las partes de una planta se han utilizado como explantes para la inducción de callo de las especies

vegetales ensayadas (Murashige,1974; Evans, y col.,1981), no obstante, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad *in vitro* (Hammerschalag y Bottino,1981).

Los resultados encontrados en este trabajo nos indican que es posible inducir callos a partir de sistemas juvenes (plántulas obtenidas *in vitro*) de una edad de 6-12 meses, concordando con lo mencionado por Hammerschalag y Bottino (1981), y que la mejor localización para la iniciación con subsecuente proliferación de callo, fue el primer nudo (esqueje de la posición baja) [Tabla X], además se observó muy poca respuesta regenerativa. Estos resultados concuerdan con los reportados por Romagnoli y Knorr (1988) y por Davidonis y Knorr(1991), quienes obtuvieron callo a partir de explantes del primer nudo, además de que los brotes fueron regenerados a partir del tejido calloso. Por otra parte al utilizar el mismo tipo de explante (Tallo) pero de diferente posición (↓ Parte alta y ↑ Parte media) también se obtuvo una buena producción de callo, con muy poca diferenciación, ya sea a partir del callo o por la formación directa. Ahora bien, en las otras posiciones, aunque hay respuesta a la formación de callo, la diferenciación es muy grande, ya sea por la regeneración a partir del callo ó por la organogénesis directa por parte de los explantes, principalmente al emplear altas concentraciones de ANA (10 μ M). Esta respuesta de organogénesis pudo ser debida a dos razones; la primera, el explante se diferenció directamente (organogénesis directa) sin pasar por un estadio de callo (tallos ↑ parte alta); segundo en algún momento se formó un callo el cual se reversionó a la organogénesis rápidamente, explicando de esta forma la alta formación de brotes múltiples, como lo reportado por

Davidonis y Knorr (1991). Por lo tanto en este experimento encontramos diferentes tipos de respuestas, varias partes de una planta pueden responder de diferente forma a idénticas condiciones de cultivo y tales diferencias reflejan el estado fisiológico de la fuente del explante (Murashige y Skoog,1962; Litz y Jarret,1991). Además existen reportes donde se observa que callos obtenidos de diferentes órganos a partir de la misma planta pueden ser completamente diferentes o presentar alguna característica que los otros no tienen. Por otra parte, hay callos que proceden de un mismo tipo de explante y que difieren de su morfología, por ejemplo, color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación. (Durzan,1984; Pétiard y Fontanel-Bariud,1985; Holden, y col.,1988; Miller y Drew,1990). Además que la influencia de los reguladores de crecimiento exógenos sobre los niveles endógenos de otras hormonas, es indicativo de la complejidad de la interacción hormonal en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Cuando se aplican reguladores del crecimiento al tejido vegetal *in vivo* o *in vitro*, la interpretación de los efectos deben de considerar la evidencia de la toma, metabolismo, rango de efectos secundarios y magnitud de los efectos directos de la hormona, los cuales sean dependientes sobre la presencia de otras hormonas (Evans,1984), ya que al tener el tejido ciertas hormonas ya sean auxinas o citocininas de acuerdo al estado fisiológico en el cual se encuentre, y al aplicar reguladores de crecimiento exógenos estos, probablemente alteren el metabolismo, y la regulación hormonal se vea afectada y cambiar los patrones de desarrollo, es decir, si un grupo de células estaban destinadas a la formación de brotes, se pueden desviar a la formación de callo u otra estructura, ya que no existe una regulación hormonal rápida

en contra de los reguladores de crecimiento exógeno al momento de penetrar al tejido, permitiendo desencadenar alguna de las respuestas antes mencionadas.

La luz es un factor principal del medio ambiente del cultivo y ha sido demostrado claramente que tiene un efecto sobre el desarrollo organizado *in vitro* (Thorpe,1980). Como se sabe, la luz tiene un papel importante para las plantas y/o tejidos vegetales en diferentes aspectos como son el crecimiento, desarrollo y patrones bioquímicos, y dependiendo de la cantidad de luz recibida, se llevaran a cabo o no sus procesos metabólicos. Las características de radiación, las cuales influyen el desarrollo vegetal en general, son también aquellas las cuales afectan a los tejidos vegetales en cultivo (Seibert y Kadkade,1980). Estos aspectos son generalmente clasificados como intensidad de luz, calidad del espectro (longitud de onda) y período de exposición diaria (Murashige,1974).

Dado que los requerimientos de luz no son iguales para todos los cultivos fue necesario detectar bajo que intensidad luminosa se obtenía un callo friable y de crecimiento rápido, en vista de que existe una relación fitocromo-luz y de acuerdo a la intensidad de luz, el tejido se incrementa o reduce la síntesis de proteínas y la división celular (Seibert y Kadkade,1980), y esto puede influir para que se obtenga un buen crecimiento del callo. Esta evaluación se hizo en forma cualitativa y de acuerdo a las características morfológicas del tejido calloso.

En el presente estudio con *Vanilla planifolia* se pudo observar, que aunque los resultados nos indican que en las intensidades de luz de 0-5,400 hay formación de tejido calloso, los mejores resultados se dan en el medio MS (Figura 17A), siendo

con menos frecuencia en los medios Bs (Figura 17C) y SH (Figura 17E). La baja producción de callos en los medios Bs y SH puede ser debido a que la luz afecta un número de células que se pueden dividir en el explante durante la formación de tejido calloso o bien que puede inhibir la división en una fracción de la población celular del explante, y estimular otras respuestas como la diferenciación para formar brotes o yemas (Yeoman,1970). Las diferencias obtenidas en la inducción de callo, nos muestra que las respuestas de los cultivos son afectados por los regímenes de luz bajo los cuales fueron crecidos y por lo tanto se observa que existen diferencias entre los cultivos, con respecto a su textura, ya que los que crecieron en 1600 lux eran más disgregables, que los que crecieron en 0, 190 y 5,400 lux que eran más compactos y duros, siendo prácticamente nulo su crecimiento en 190 lux en los medios Bs y SH. Por otra parte, no se observó respuesta alguna al emplear la intensidad de 8,400 lux en los tres medios empleados, indicandonos que altos niveles de luz pueden afectar negativamente el desarrollo del cultivo de tejidos vegetales (Seibert, y col., col,1975).

En otras investigaciones han comprobado que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis (Villalobos, y col.,1984). Al respecto se ha observado, en el caso de *Pinus radiata*, que la luz interacciona con una citocinina durante la diferenciación de brotes y que la organogénesis no ocurre cuando falta uno de los componentes.

En este trabajo se encontró además una gran formación de brotes múltiples en cada uno de los medios empleados y en cada una de las intensidades de luz a las cuales fueron expuestas (Figuras 17B, 17D, 17F), esta formación puede ser explicada de la

siguiente manera, primero existió una organogénesis directa por parte de los explantes, debido a la presencia de meristemas pre-existentes en el explante original o bien la formación de un callo que revertió a la organogénesis por la formación de nódulos meristemáticos, que es una característica común en el cultivo de callos desarrollándose, estos finalmente emergen como brotes o raíces completamente diferenciados (Yeoman, 1970; Aitchison, y col., 1977).

Para poder incrementar la producción de metabolitos secundarios a partir de células y tejidos vegetales, es requisito indispensable conocer el comportamiento cinético del crecimiento celular y de la producción del metabolito secundario deseado.

En el caso de *Vanilla planifolia*, el perfil de las curvas de crecimiento (Figura 18) en base al peso seco y peso fresco, presentó el comportamiento típico de los sistemas biológicos, es decir una curva tipo sigmoideal, en la cual se observan sus diferentes fases de crecimiento: lag, exponencial, logarítmica, estacionaria y desaceleración, su duración fué de 68 días, obteniéndose una biomasa final de 3.60 g de Peso fresco y 0.20 g de Peso seco.

Cuando comparamos los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados con la literatura existente, encontramos que es difícil hacerlo directamente, ya que, por ejemplo, Romagnoli y Knorr (1988) aunque toman el parámetro de peso fresco para medir el crecimiento, este no es muy significativo con referencia al crecimiento, ya que el tejido fresco almacena grandes cantidades de agua (aproximadamente 90-95%), y no nos muestra el crecimiento real. Por otra parte, el crecimiento está dado en porciento, lo cual nos puede indicar que en el sistema no existió un buen

crecimiento, aunque dichos autores reportan que hubo incremento en el peso, como se mencionó anteriormente, este crecimiento puede ser atribuido a la toma de agua que cubre a los callos. Ahora bien, tampoco podemos comparar con los reportados por Funk y Brodelius (1990 a), ya que su sistema, son células en suspensión y en estas las condiciones son más homogéneas que en un sistema estático.

In vitro el comportamiento de producción de metabolitos secundarios varía muchas veces, dependiendo de las condiciones de cultivo, reguladores de crecimiento, especie vegetal, línea celular (De-Eknamkul y Ellis, 1985; Stafford, y col., 1986).

En este trabajo se encontró que la producción de vainillina, ácido vainillínico, p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxibenzoico (Figura 20A), ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido caféico y ácido cumárico (Figura 20B); presentan un comportamiento cíclico, es decir un incremento y una disminución en la formación del producto. Este comportamiento puede ser debido a que en las células de vainilla exista un recambio y/o degradación de los compuestos en cada una de las fases de crecimiento. Este tipo de comportamiento ha sido observado por autores tales como Lindsey y Yeoman (1984) al trabajar con células inmovilizadas de *Capsicum frutescens*, para la producción de capsaicinoides.

Por otra parte, es interesante observar que muchos de los compuestos inicia con una concentración alta al inicio de la fase lag o una disminución durante la misma, y alcanzar su máxima producción en la fase exponencial. Sin embargo otros siguen el comportamiento inicial y alcanzan su producción más alta en la fase lineal (vainillina) y otro en la estacionaria (p-hidroxibenzaldehído). Todo el comportamiento anterior nos lleva

a establecer que la producción de los compuestos obtenidos en los callos de *Vanilla planifolia*, relacionados con el complejo sabor de vainilla, fue combinado, es decir asociado y no asociado al crecimiento celular. Ahora bien, la aparición de los compuestos en la fase lag puede deberse a varios factores tales como: 1) la alteración del medio ambiente que rodea al callo, al transferirlo de un medio al cual estaba bien adaptado (en suspensión) a otro que se tiene que adaptar (medio estático); 2) o bien puede deberse al contenido de los compuestos presentes en el tejido al momento de las resiembras. Ogino, y col., (1978) menciona que al momento de la resiembra puede existir una liberación de sustancias intracelulares, como fenoles y otros metabolitos, en el medio de cultivo que rodea al tejido. Debido a esto y en corto tiempo y como respuesta al cambio del ambiente original del que estaba adaptado el tejido, sus células pueden desencadenar la producción de metabolitos secundarios. Por lo anteriormente dicho, nuestros datos concuerdan con esto ya que al tener los callos en medio líquido y en agitación al cual estaban adaptados y al pasarlos a un medio estático, tuvieron un estrés y probablemente desencadenara las reacciones antes mencionadas.

Por otra parte al comparar los resultados encontrados para la producción de los compuestos relacionados con el complejo sabor de vainilla, tenemos que los callos producen vainillina con una máxima producción de 11.52 $\mu\text{g/g}$ de PS., aunque su cantidad es basal, también fueron encontradas por Romagnoli y Knorr (1988) y por Knuth y Sahai (1988), que en sus cultivos se producía vainillina. Pero no concuerdan con los reportados por Funk y Brodelius (1990 a) quienes reportan que en todos sus ensayos con células de vainilla ninguna vainillina extractable fue detectada,

es decir no fue producida en cultivos *in vitro*.

Por otra parte, Romagnoli y Knorr (1988), solo reportan cuatro compuestos que son producidos por cultivo de tejidos que son: Vainillina, ácido vainillínico, ácido p-hidroxibenzoico y p-hidroxibenzaldehído. Al comparar nuestra producción con varios autores, tenemos que se produjo vainillina con 11.52 $\mu\text{g/g}$ de PS (5.11 $\mu\text{g/g}$ de PF), siendo que Romagnoli y Knorr encontraron 9.33 $\mu\text{g/g}$ de PF pero alimentando a los callos con un tratamiento de ácido ferúlico 10 mM. Sin embargo Funk y Brodelius (1990a, 1990b) mencionan que no encontraron vainillina en sus cultivos. Ahora bien Romagnoli y Knorr, (1988) reportan para el ácido p-hidroxibenzoico una producción de 3.0 $\mu\text{g/g}$ de PF; 16.15 $\mu\text{g/g}$ de PF para el p-hidroxibenzaldehído. Mientras que Funk y Brodelius (1990 a) únicamente reportan la producción del ácido vainillínico con 6.4 $\mu\text{g/g}$ de PF y 5.2 $\mu\text{g/g}$ de PF para el ácido p-hidroxibenzoico, aunque después de un tratamiento con la enzima 3,4-metilenedióxido ácido cumárico, la producción de ácido vainillínico aumenta hasta 75 $\mu\text{g/g}$ de PF. Los resultados encontrados en este trabajo para dichos compuestos son: ácido vainillínico 160.65 $\mu\text{g/g}$ de PS (117.45 $\mu\text{g/g}$ de PF); ácido p-hidroxibenzoico 196.07 $\mu\text{g/g}$ de PS (143.35 $\mu\text{g/g}$ de PF) y para el p-hidroxibenzaldehído 113.06 $\mu\text{g/g}$ de PS. (Figura 20A). En otro trabajo se reportan otros compuestos identificados por HPLC, pero sin mencionar la producción obtenida.

Además de los compuestos mencionados anteriormente también se produjo: ácido cumárico con 492.41 $\mu\text{g/g}$ de PF (423.65 $\mu\text{g/g}$ de PF), ácido caféico con 288.74 $\mu\text{g/g}$ de PS (362.49 $\mu\text{g/g}$ de PF) y ácido 3,4-dihidroxibenzoico con 1879.48 $\mu\text{g/g}$ de PS (1617.03 $\mu\text{g/g}$ de PF), (Figura 20B) siendo este el de mayor producción de todos los

compuestos identificados hasta el momento. Estos concuerdan con los compuestos encontrados por Knuth y Sahai (1988), además de que reportan otros isómeros de los compuestos encontrados. Esto se puede visualizar en el cromatograma correspondiente (Figura 19) en el cual faltan por identificar algunos picos, los cuales podrían corresponder a algunos compuestos isomerales, alcoholes, etc. Cabe aclarar que la producción de ácido ferúlico no se detectó en el análisis de los callos en este trabajo, tales vez el hecho de no detectar ciertos compuestos en las células puede ser el resultado de una de dos cosas, primero la falta de enzimas involucradas en la biosíntesis de tales compuestos o segundo para el encauzamiento del sustrato hacia material leñoso (Brodelius, 1990 a).

Estos y otros estudios sugieren que la producción de metabolitos secundarios en los cultivos de células y tejidos vegetales *in vitro*, puede estar íntimamente relacionada con la presencia y tipo de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal en el medio de cultivo. como se encontró en este trabajo que al tener en el medio ANA y BAP hay formación de los principales componentes del sabor de vainilla, como lo encontraron Funk y Brodelius (1990 a), ANA mejora la producción de fenólicos extractables y que la combinación ANA y BAP resulta en la producción de grandes cantidades de dichos compuestos. Pero además las citocininas favorecen la biosíntesis de material leñoso en las células de vainilla (Brodelius, 1990 a).

A partir de estos experimentos, es claro que el metabolismo secundario en los cultivos de *Vanilla planifolia* está fuertemente influenciado por los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo.

7. CONCLUSIONES

- El mejor proceso de desinfección fue cuando se adicionó una solución de tolueno-etanol, etanol al 90% (v/v) y un tiempo de exposición del agente desinfectante de 30 minutos. Bajo estas condiciones se redujó el tiempo de germinación a 12 semanas comparado con el reportado en la literatura (16-52 semanas).
- La combinación de los reguladores de crecimiento 2,4-D/CIN no influyeron en la respuesta de diferenciación o dediferenciación en los explantes de tallo a partir de planta adulta. Además el problema de contaminación de la planta adulta crecida en condiciones naturales, por bacterias sistémicas en sus tejidos limitó el establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de esta fuente vegetal. Por ello, es primordial establecer los cultivos *in vitro* a partir de explantes de plántulas asépticas.
- Los reguladores de crecimiento AIA/CIN indujeron la formación de nodulos amarillentos, estructuras organoides, alargamiento de la raíz y desarrollo de brotes, en explantes de plántulas asépticas, empleando el medio SH. Mientras, la combinación del 2,4-D y CIN en los medios MS, SH y Bs, desarrollaron brotes múltiples a bajas concentraciones, a concentraciones altas el tejido murió. Con pCPA/CIN en los medios MS, SH y Bs, los explantes repondieron formando organogénesis en cada medio.
- Se desarrolló callo en las concentraciones de 10 y 100 μM de BAP combinadas con 0, 0.1 y 10 μM de ANA en el medio Bs, mientras que a bajas concentraciones el tejido se diferenció formando brotes múltiples, en explantes de tallo de vainilla. Por otra parte, la mejor combinación para la inducción de callo fue al emplear concentraciones de 10 y 15 μM de BAP en el medio Bs y MS. A bajas concentraciones de ANA y BAP se indujó organogénesis.
- La mejor posición del explante para la inducción de callo fue el esqueje de la parte baja del tallo, inducido en el medio Bs con 0.1 μM de ANA y 10 μM de BAP.
- Bajo intensidades de luz de 0-5,400 fue donde mayor número de callos se desarrolló. Incubados a 0-5,400 lux la organogénesis también se vió favorecida. Altas intensidades de luz provocan la muerte de los explantes.
- La cinética de crecimiento de los callos fue de 68 días, presentando una $\mu=0.037 \text{ d}^{-1}$, $t_d=19.05$ y un $IC=4.04$ para el peso fresco, mientras que para el peso seco se obtuvo una $\mu=0.036 \text{ d}^{-1}$, $t_d=18.25$ y un $IC=3.82$.
- Los callos produjeron vainillina (11.52 $\mu\text{g/g}$ de PS), ácido vainillínico (160 $\mu\text{g/g}$ de PS), ácido p-hidroxibenzoico (196.07 $\mu\text{g/g}$ de PS), p-hidroxibenzaldehído (113.06 $\mu\text{g/g}$ de PS), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (1879.48 $\mu\text{g/g}$ de PS), ácido caféico (288.74 $\mu\text{g/g}$ de PS) y ácido p-cumárico (492.41 $\mu\text{g/g}$ de PS). Sin embargo, a lo largo de la cinética, dicha producción no fue un proceso continuo, ésta se presentó interrumpidamente con incremento y disminución de los compuestos que no estuvieron relacionados de una manera clara al crecimiento celular.

8. RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS

- Evaluar el efecto de los medios de cultivo, reguladores de crecimiento y factores físicos, en la germinación de las semillas, utilizando un proceso combinado.
- Utilizar explantes principalmente de la parte baja de la planta, para la inducción de callo.
- Evaluar el efecto sobre el crecimiento y producción de otros reguladores de crecimiento.
- Manipular el medio de cultivo, reguladores de crecimiento y factores físicos para evaluar la producción de vainillina y otros compuestos, en cultivos *in vitro*.
- Evaluar el efecto de precursores (por ejemplo, ácido ferúlico) en la producción de vainillina.
- Evaluar el efecto de los inductores (elicitors) bióticos y abióticos en la producción de vainillina.
- Establecer los estudios para la obtención de células en suspensión finas de vainilla.
- Establecer sistemas de células inmovilizadas para la producción de vainillina y compuestos relacionados.
- Establecer estudios comparativos para la producción de vainillina y otros compuestos en diversos tipos de biorreactores.
- Establecer estudios sobre la regulación y enzimología de la ruta metabólica para la biosíntesis de vainillina.
- Establecer el cultivo de raíces transformadas de *Vanilla planifolia* para la producción de vainillina.
- Establecimiento del cultivo de brotes para la producción de vainillina.
- Establecer un banco de germoplasma de *Vanilla planifolia* y contribuir a facilitar el intercambio internacional de germoplasma de esta planta.

9. TABLAS Y FIGURAS

TABLA I
METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS CON MAYOR USO INDUSTRIAL.

METABOLITOS SECUNDARIOS	COMPOSICION	USOS
Aceites esenciales	Mezcla de Terpenoides.	Agentes saborizantes, Perfumes y Solventes.
Glucósidos	Flavonoides, Saponinas, Fenoles, Taninos, Glucósidos cianogénicos y Aceites de mostaza.	Tintes, Medicamentos (Hormonas esteroidales, antibióticos y digitalis), Colorantes para alimentos.
Alcaloides	Formado por un diverso grupo de compuestos de más de 4,000 estructuras conocidas. La mayoría son compuestos muy activos fisiológicamente en el humano. Algunos ejemplos son: morfina, nicotina, cocaína y la atropina.	En la elaboración de medicamentos y precursores de fármacos.

Fuente: Shuler, 1981.

TABLA II
COMPOSICION DE LAS VAINAS DE VAINILLA.

COMPOSICION	%
HUMEDAD	23.39
PROTEINA CRUDA	3.71
GRASA CRUDA	8.19
ACEITES VOLATILES	0.62
AZUCARES	7.72
FIBRA CRUDA	17.34
CENIZAS	4.78

Fuente: Ishiguro, y col., 1986.

TABLA III
CONSTITUYENTES DE LA FRACCION VOLATIL OBTENIDAS DE LAS VAINAS
DE *Vanilla planifolia*.

COMPUESTO	%	COMPUESTO	%
<u>HIDROCARBUROS</u>		<u>ALDEHIDOS Y CETONAS</u>	
B.H.T.	0.05-0.5	Furfural	0.37
<u>ALCOHOLES</u>		Bencilaldehído	> 0.01
Bencilalcohol	0.24	5-Metilfurfural	
n-Octilalcohol	0.11	Fenilacetaldehído	0.01
1-Octen-3-ol	0.01	Anisaldehído	0.09
n-Oxil-alcohol	0.01	Cinámico aldehído	0.19
Anisilalcohol	0.21	p-Hidroxibenzaldehído	0.50
3-Fenilpropilalcohol	.01	Metilvainillina	0.01
2-Fenitilalcohol	0.07	Vainillina	86.79
<u>FENOLES</u>		<u>ESTERES</u>	
Fenol	0.01	Metilcinamato (cis)	0.01
p-Cresol	0.23	Metilcinamato (trans)	0.50
Guaicol	0.63	Metilanisato	0.01
Creosol	0.50	Metilvainillato	0.01
p-Vinilguaicol	1.02	Etilvainillato	0.01
<u>ACIDOS</u>		<u>LACTONAS</u>	
Acido anísico	0.01	γ -Nonalactona	0.01
Acido butírico	0.01	γ -Undelactona	0.01
Acido vainillínico	0.50	γ -Butirolactona	0.01
<u>ACETAL</u>			
Acetal	0.01		

Adaptada de Ishiguro, y col.,1986; Vidal, y col.,1989.

TABLA IV
PROPIEDADES FISICAS DE LA VAINILLINA.

PROPIEDAD	VALOR
Punto de Fusión (°C)	81-83
Punto de Ebullición (°C)	
a 103.3 kPa (1 atm)	214.0
a 133.0 Pa (1 mm Hg)	127.0
Densidad d_4^{20} (g/cm ³)	1.056
Calor de Solución en H ₂ O en dilución infinita (J/mol)	21.76
Calor de Neutralización (J/mol)	38.74
Calor de Combustión (J/mol)	3.83
Solubilidad (% de peso)	
agua 14°C	1.0
agua 75°C	5.0
glicerol 25°C	4.5
propilenglicol 25°C	23.0

Fuente: Van Ness, 1983.

LOGROS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN EL PROBLEMA DE LA VAINILLA.

TABLA V

Especie	Explant	Resultados	Medio A/L	pH	Sac	RCV	Autor
			g/l		g/l	mg/l	
V. planifolia	Semillas	Protocormos y plántulas	KB	12	5.5	20	Knudson, (1950).
Híbridos de V	Semillas	Protocormos y plántulas	BN3F	A	5.0	0	1 IBA Witthner, (1955).
Híbridos de V	Semillas	Protocormos y plántulas	WT	A	5.0	0	Witthner, (1955).
V. planifolia	Semillas	Protocormos y plántulas	0.1xKB	A	-	20	Lugo-Lugo, (1955 A,B).
V. planifolia	Semillas	Protocormos y plántulas	MKB	L	6.0	20	Hegarty, (1955)
V. planifolia	Semillas	Protocormos y plántulas	VW	A	-	-	Jinyu & Hong, 1967.
V. planifolia	Semillas	Protocormos y plántulas	BN3F	A	5.0	-	Menchaca, (1990)
V. Planifolia	Yema axilar	5 brotes X yema en 6 sem.	KC	8	-	30	1 CIN Cervera & Madrigal, 1981
V. planifolia	Brotes	6 raíces X brote (40 mm)	KC	8	5.0	30	0.3-1 CIN Cervera y Madrigal, 1981
V. planifolia	Tallo nodal	Estab. y Prolif. de Brotes	MS	5	5.7	30	1 BAP Kemenowicz & Jeanlch, 1964
V. planifolia	M. de Brote	Prolif. de brotes y raíz	MS	5	5.7	30	0.5BAP Kemenowicz & Jeanlch, 1964
V. planifolia	Tallo nodal (3.0 mm)	10-15 plantas en el 30% de los explantes.	KC	L	5.8	20	1 2, 4-D+
V. planifolia	Punta de raíces aéreas	Hinchamiento de las puntas de la raíz	MS	L	5.8	30	0.1CIN Phillip & Mainar, 1986
V. Planifolia	Apice de raíces aéreas	Múltiples plantas a partir del 90% de las puntas.	MS	8	5.8	30	2 IAA+ 0.2CIN Phillip & Mainar, 1986
V. Planifolia	Tallo con yema axilar	Proliferación y Formación de 5-6 brotes por yema	MS	20	5.7	20	0.2CIN Phillip & Mainar, 1986 0.5-1 BAP Gutierrez, 1987
V. planifolia	Tallo con yema axilar	Enraizamiento de brotes, raíz con pelos absorbentes	MS	20	5.7	20	- Gutiérrez, 1987
V. planifolia	Semillas	Protocormos	BN3F	8	5.8	10	- Phillip & Mainar, 1988a
V. planifolia	Punta de raíces aéreas	Hinchamiento de las puntas de las raíces aéreas.	MS	L	5.8	20	0-10AIA +0.2CIN Phillip & Mainar, 1988b
V. planifolia	Punta de raíces aéreas	Desarrollo normal de la raíz	MS	M	5.8	20	" Phillip & Mainar, 1988b
V. planifolia	Punta de raíces aéreas	Desarrollo normal de la raíz	MS	L8	5.8	30	>5 IAA Phillip & Padikkala, 1969
V. planifolia	Punta de raíces aéreas	Formación de brotes y plántulas	MS	L8	5.8	30	1-5IAA Phillip & Padikkala, 1989
V. planifolia	Punta de brotes.	Inducción de callo	MS	M	5.8	30	? Romagnoli & Knorr, 1988
V. planifolia	Callo	Células en suspensión	MS	L	5.8	30	1 2, 4-DFunk & Brodehlus, 1990
V. planifolia	Punta de brotes.	Inducción de callo y regeneración de brotes.	MS	M	5.8	30	BAP + Davidonis & Knorr, 1991 AMA

Modificado de George, y col., 1967.

TABLA VI
COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL
CULTIVO *in vitro* DE *Vanilla planifolia*.

Sales Componentes	F O R M U L A C I O N		
	Concentración en el medio de cultivo (mg/l)		
	SH (1)	MS (2)	B5 (3)
KNO_3	2500.0	1900.0	2500.0
NH_4NO_3	-	1650.0	-
$NH_4H_2PO_4$	300.0	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	134.0
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	400.0	370.0	250.0
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	200.0	440.0	150.0
KH_2PO_4	-	170.0	-
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	-	150.0
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10.0	-	10.0
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	-	22.3	-
KI	1.0	0.83	0.75
H_3BO_3	5.0	6.2	3.0
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	1.0	8.6	2.0
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.2	0.025	0.025
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0.1	0.25	0.25
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0.1	0.025	0.025
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	15.0	27.8	27.8
$Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$	20.0	37.3	37.3
Mio-inositol	1 000.0	100.0	100.0
Tiamina-HCl	5.0	0.1	10.0
Acido nicotínico	5.0	0.5	1.0
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	1.0
Glicina	-	2.0	-
Sacarosa	30 000.0	30 000.0	20 000.0
Agar	6 000.0	10 000.0	8 000.0
pH	5.8	5.7	5.5

1. SH (Schenk & Hildebrandt, 1972).
2. MS (Murashige & Skoog, 1962).
3. B5 (Gamborg, Miller & Ojima, 1968).

TABLA VII
MATRIZ EXPERIMENTAL Y NUMERO DE TRATAMIENTOS¹, UTILIZADOS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DEL BALANCE DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO ACIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETICO/CINETINA, SOBRE LA INDUCCION DE CALLO EN EXPLANTES DE TALLO Y HOJA DE PLANTA ADULTA DE *Vanilla planifolia*, EN LOS MEDIOS DE CULTIVO MS Y/O SH.

		Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (mM)					
C i n e t i n a (mM)		0	10	20	40	80	
	0	1	2	3	4	5	
	10	6	7	8	9	10	
	20	11	12	13	14	15	
	50	16	17	18	19	20	
	80	21	22	23	24	25	

1. Los tratamientos se desordenan posteriormente para obtener un diseño experimental factorial completamente al azar de dos factores con cinco niveles cada uno.

TABLA VIII
EFFECTO DEL PROCESO DE ACONDICIONAMIENTO Y DESINFESTACION DE
SEMILLAS DE *Vanilla planifolia*, SOBRE SU FRECUENCIA
DE CONTAMINACION Y GERMINACION *in vitro*.

MATERIAL VEGETAL.	PREACONDICIONAMIENTO	DESINFESTACION	MEDIO DE CULTIVO.	FREC. DE CONTAMINACION (%)	FRECUENCIA DE GERMINACION (%)	
					LUZ	OBS
SEMILLAS	- REMOJO EN AGUA DESTILADA POR 60 MINUTOS	HIPOCLORITO DE SODIO AL 5 % POR 20 MIN	MS ¹	100	NO	NO
			SH ²	100	NO	NO
SEMILLAS	- REMOJO EN AGUA 60 MIN - REMOJO EN ETANOL 70% POR 30 SEG	HIPOCLORITO DE SODIO AL 5 % POR 20 MIN	MS+CIN ³	90	NO	NO
			SH+CIN	90	NO	NO
SEMILLAS	- REMOJO EN AGUA 60 MIN - REMOJO EN TOLUENO:ETANOL 10 MIN - ETANOL 90 % POR 30 MIN.	HIPOCLORITO DE SODIO AL 5 % + 0.2 ML DE TWEEN 20 POR 30 MINUTOS.	MS	0	4	14
			SH	0	17	27

1.- Medio de Murashige & Skoog, 1962; 2.- Medio de Schenk & Hildebrandt, 1972
3.- Cinetina. Para cada tratamiento se usaron 10 frascos de cultivo de 125 ml con 25-30 ml de medio de cultivo que se inocularon con 100 semillas.

TABLA IX
EFFECTO DEL BALANCE DE LA RELACION AIA/CIN EN LA INDUCCION DE
CALLO A PARTIR DE EXPLANTES DE TALLO, HOJA Y RAIZ DE
PLANTULAS OBTENIDAS *in vitro* DE *Vanilla planifolia*
EN EL MEDIO SH.

Acido Indolacético (μM)						
		0	10	20	50	100
C i n e t i n a μM		DR ¹	PC ²	DB ³ DR	PC AC ⁴	DB AC
	0	DR	PC	DB	DB	PC
	10	DR	PC	DB	DB	PC
	20	PC	PC	PC DB FN ⁵	PC	PC DB FN
	50	PC	DB FN AC	PC DB AC	PC DB AC	PC
	100	PC	PC AC	DB FN	PC	PC FN

1. Desarrollo de raíz; 2. Pérdida del color de los explantes; 3. Desarrollo de brotes hasta plántulas; 4. Apariencia callosa; 5. Formación de nódulos amarillentos. Se usó glucosa como fuente de carbono.

TABLA X
EFEECTO DEL TIPO Y POSICION DEL EXPLANTE EN LA
INDUCCION DE CALLO DE *Vanilla planifolia*.

POSICION DEL EXPLANTE ^o TIPO		R E S P U E S T A (X/9 EXPLANTES)					
		C A L L O			B R O T E S		
		0	0.1	10	0	0.1	10
Esqueje parte alta	Tallo	2	3	0	8	6	14
Esqueje parte baja	Tallo	8	8	0	0	0	4
↑ Parte Media	Tallo	4	2	2	4	0	0
↓ Parte Media	Tallo	2	2	0	3	0	18
↑ Parte Alta	Tallo	3	2	0	1	4	25
↓ Parte Alta	Tallo	2	2	9	4	0	0
Parte Alta	Hoja	0	0	0	0	0	0
Parte Media	Hoja	0	0	0	0	0	0
Parte Baja	Hoja	0	0	0	0	0	0

* Para el tipo y posición del explante consultar la Figura 16. Cada tratamiento se realizó por triplicado, colocando 3 explantes por frasco con 25 ml de medio B5 suplementado con 10 μM de BAP y la concentración de ANA indicada.

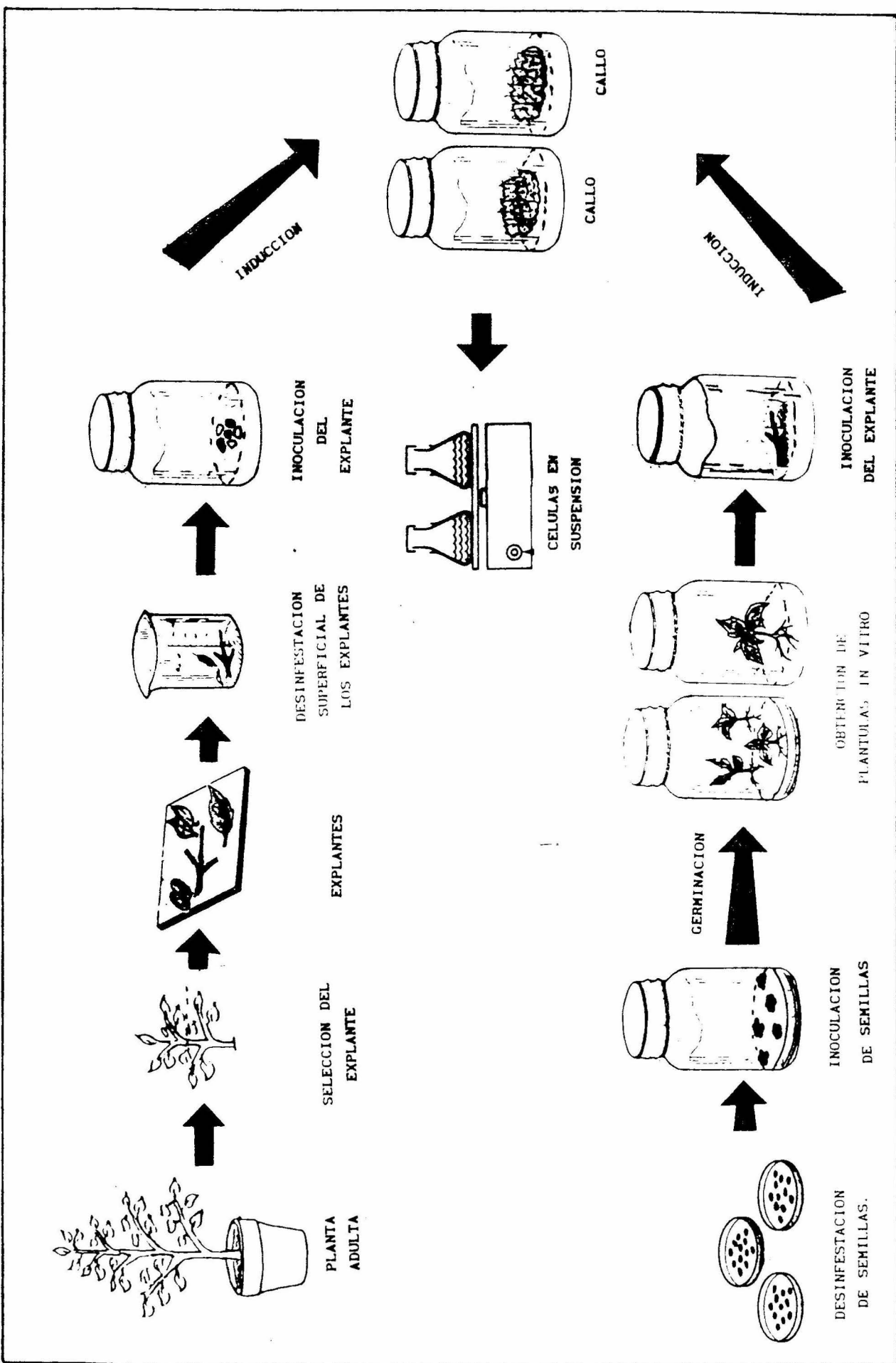


Figura 2. Procedimiento para la inducción de callo.

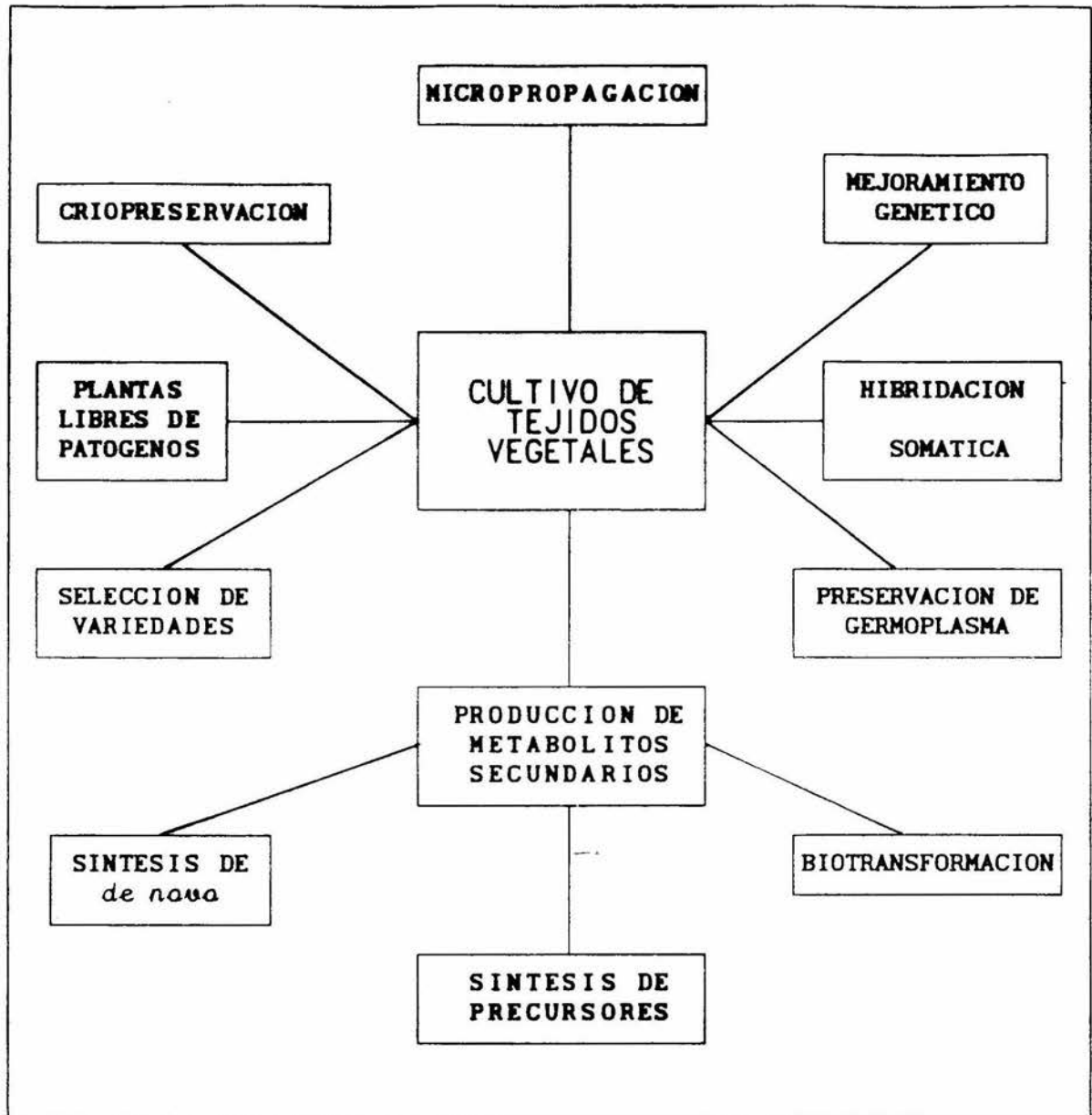


Figura 3. Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales.
(modificado de Brodelius, 1983 y 1988).

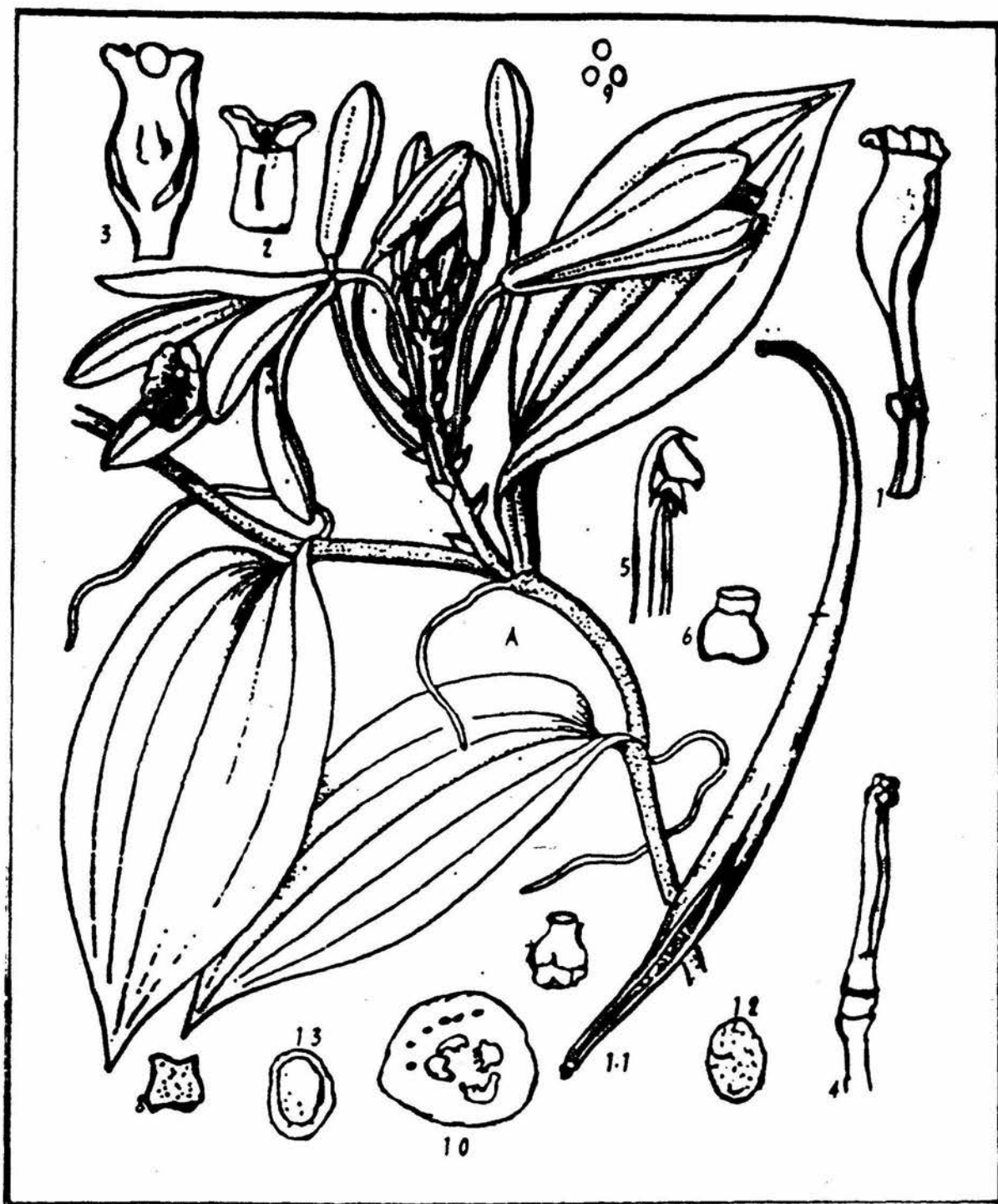


Figura 4. Esquema de algunas de las partes de la planta de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews).

- A. Rama florida, 1. Labelo, 2,3. Parte superior del labelo, 4. Columna, 5. Porción superior de la columna, 6. Etamina cerrada, 7. Etamina abierta, 8. Sección vertical de la etamina, 9. Polen, 10. Sección transversal del ovario, 11. Fruto (vainas), 12. semillas, 13. Sección de la semilla.

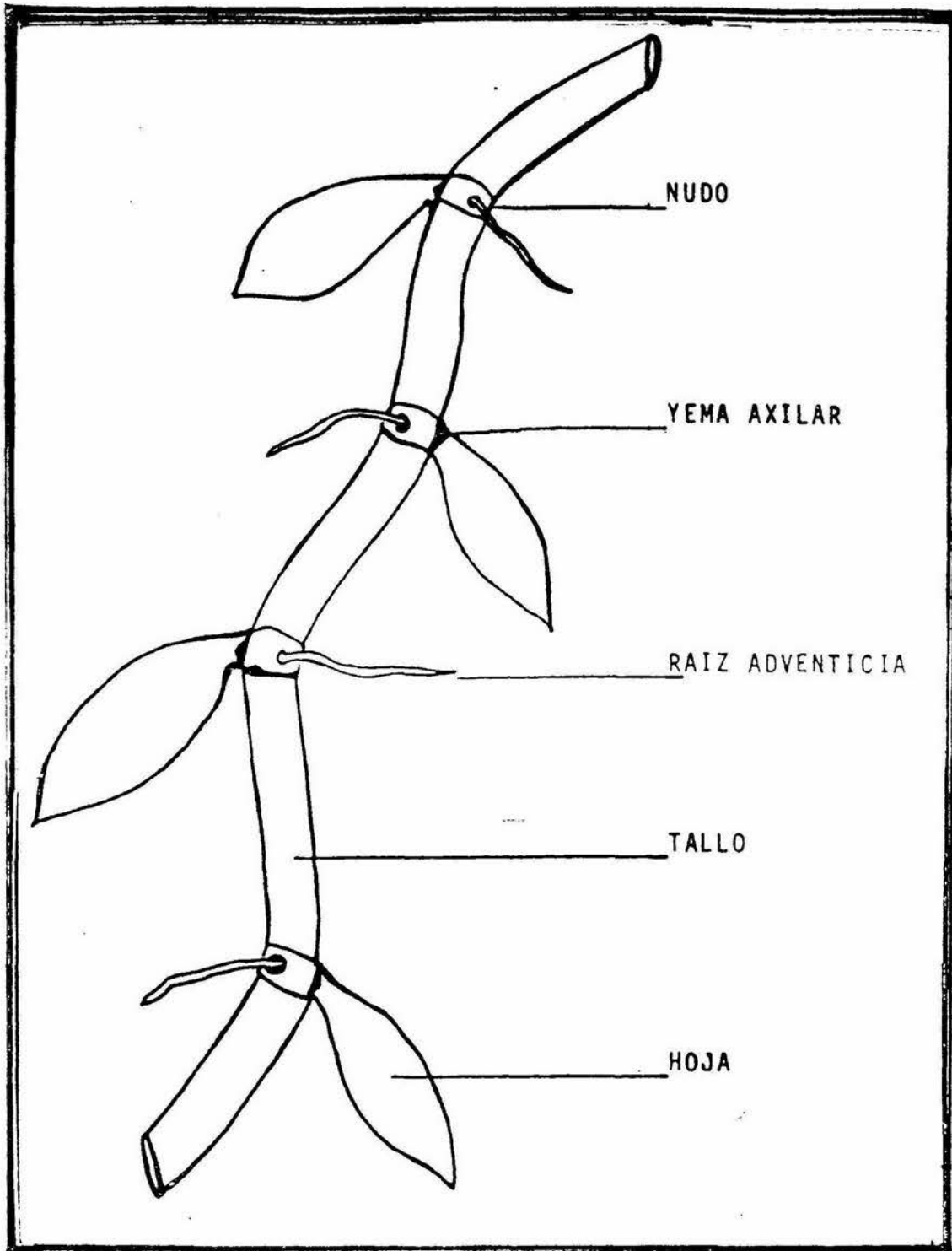


Figura 5. Diferentes partes del esqueje de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews).

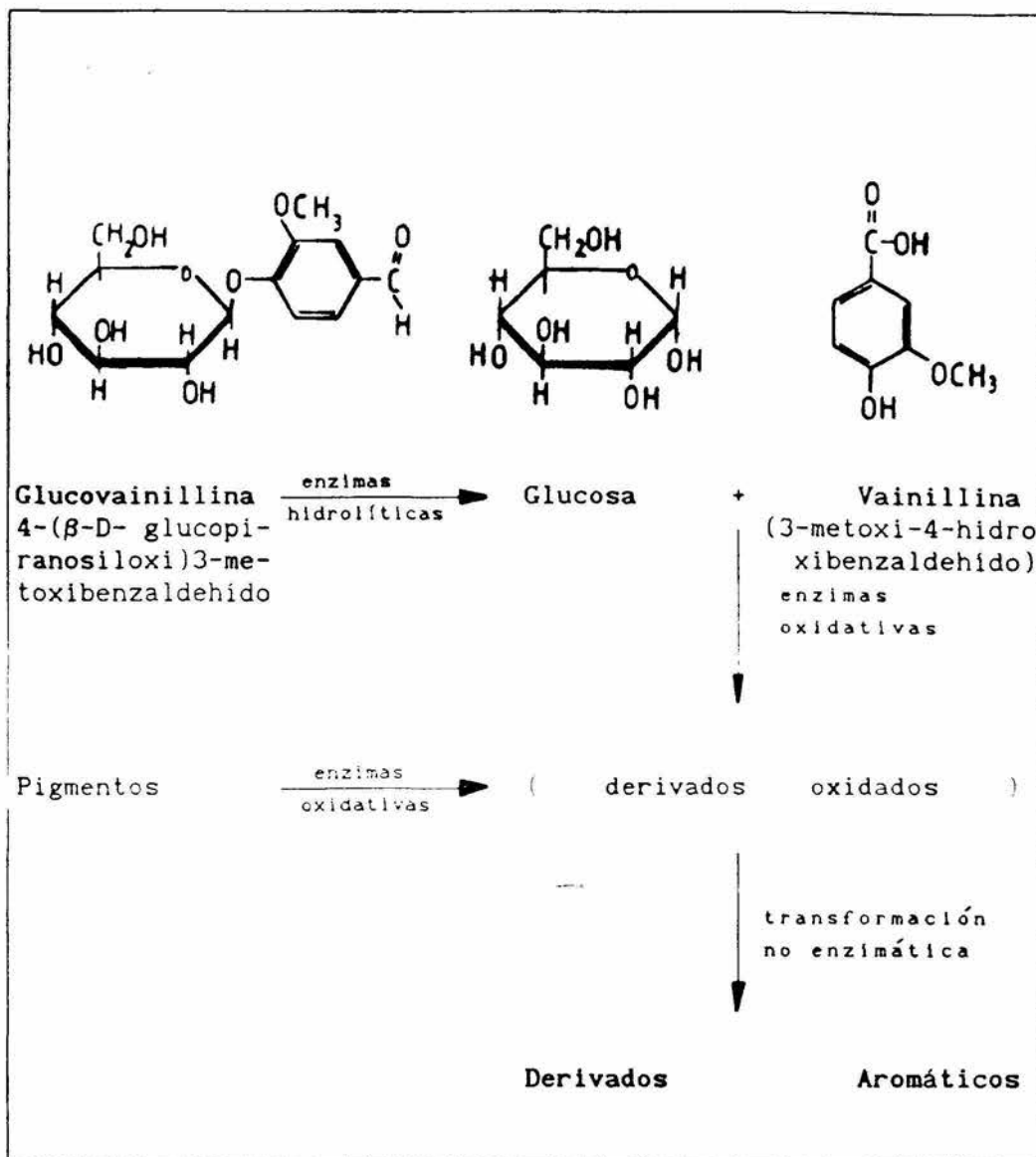


Figura 6. Biotransformación de glucovanillina y vainillina durante el beneficio de las vainas de vainilla. (Modificado de Purseglove, y col., 1981).

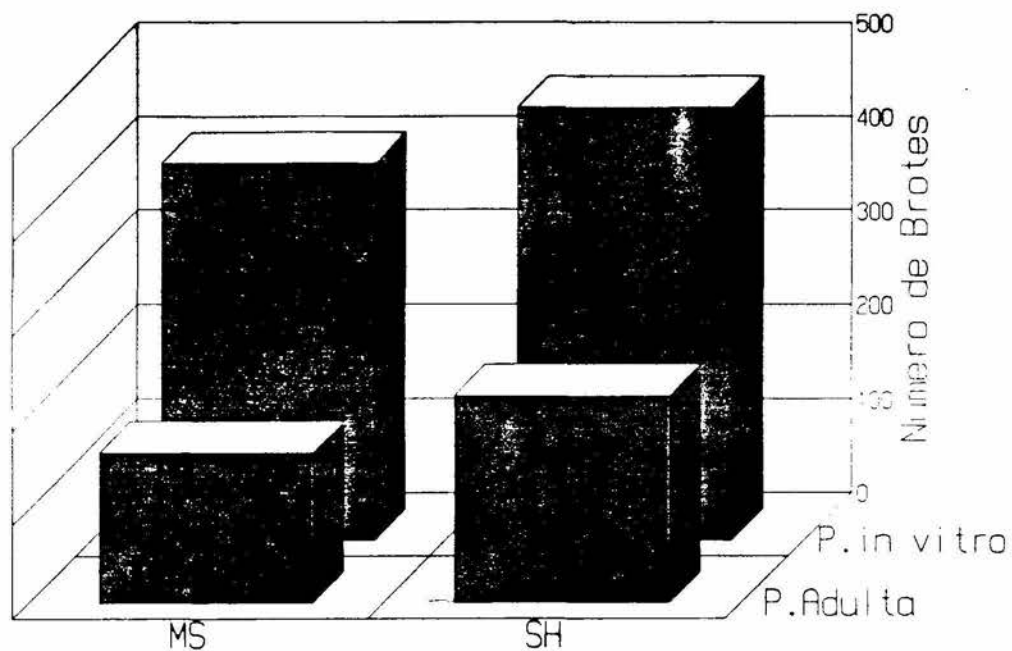


Figura 7. Inducción de brotes en explantes de tallo de *Vanilla planifolia* a partir de planta adulta crecida en condiciones naturales y de plántulas obtenidas *in vitro*, cultivadas en los medios MS y SH suplementados con 1 mg/l de BAP como regulador de crecimiento.

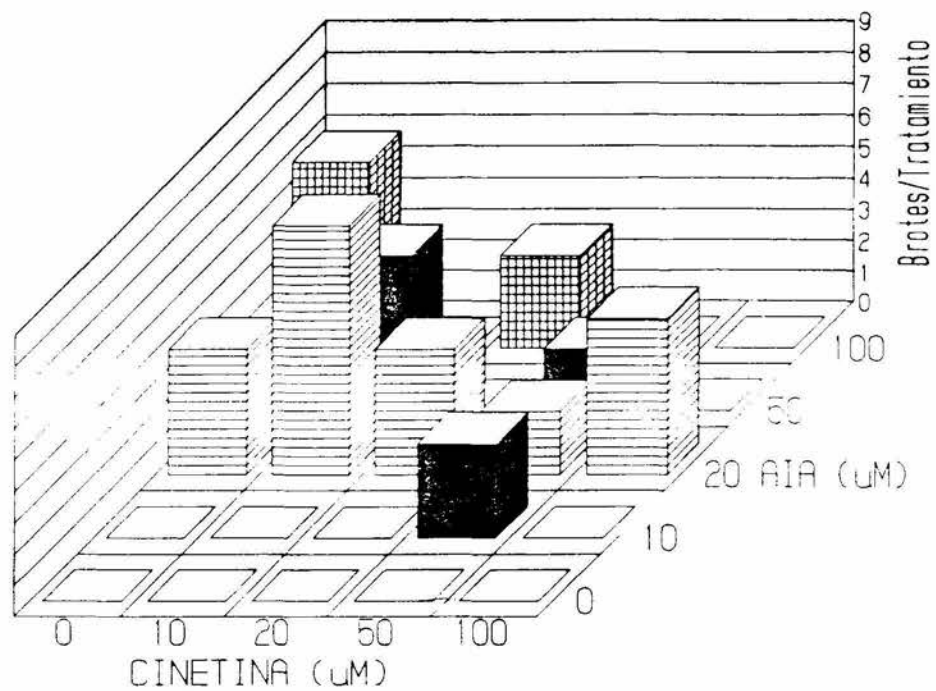


Figura 8. Efecto de la relación AIA/CIN en la inducción de brotes, en explantes de tallo, de plántulas obtenidas *in vitro*, desarrollados en el medio de cultivo SH. En cada tratamiento se emplearon 9 explantes.

(A)

2,4-D uM \ CIN uM	0	0.1	1.0	10	100
0	BROTES	BROTES	BROTES	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS
0.1	BROTES	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS
1.0	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	BROTES	EXPLANTES NECROSADOS
10	EXPLANTES NECROSADOS	BROTES	BROTES	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS
100	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS

(B)

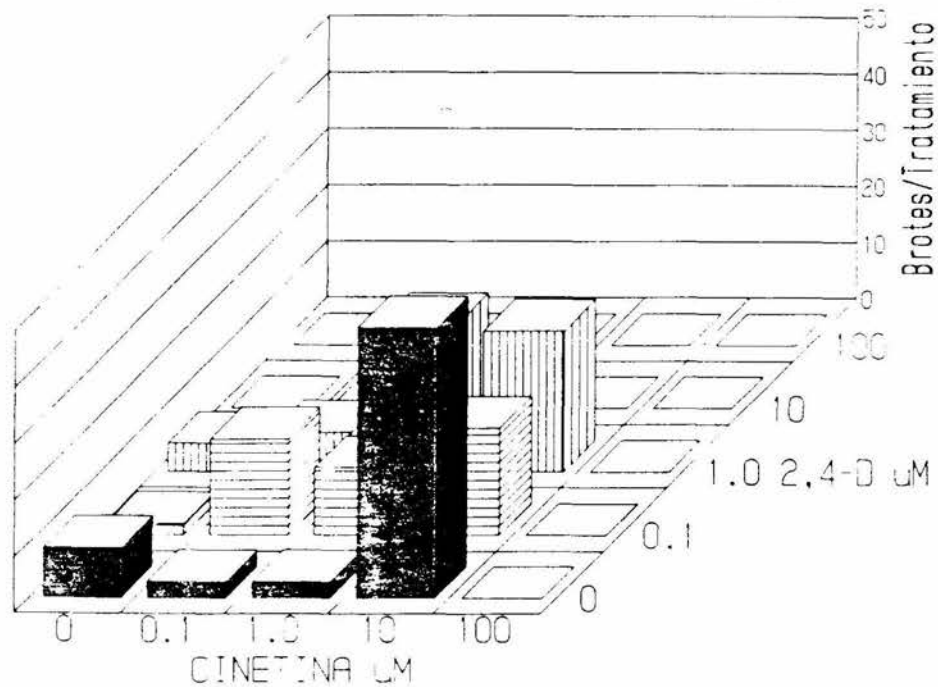


Figura 9. (A) Efecto del balance de los reguladores de crecimiento 2,4-D/CIN sobre explantes de tallo de *Vanilla planifolia* desarrollados en el medio SH-M y (B) Formación de brotes. Con 9 explantes por tratamiento.

(A)

2,4-D µM CIN µM	0	0.1	1.0	10	100
0	BROTES	BROTES	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS
0.1	EXPLANTES VERDES			EXPLANTES VERDES	EXPLANTES NECROSADOS
1.0	BROTES	BROTES	BROTES	EXPLANTES BLANCOS	EXPLANTES NECROSADOS
10		BROTES		BROTES	EXPLANTES NECROSADOS
100	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS

(B)

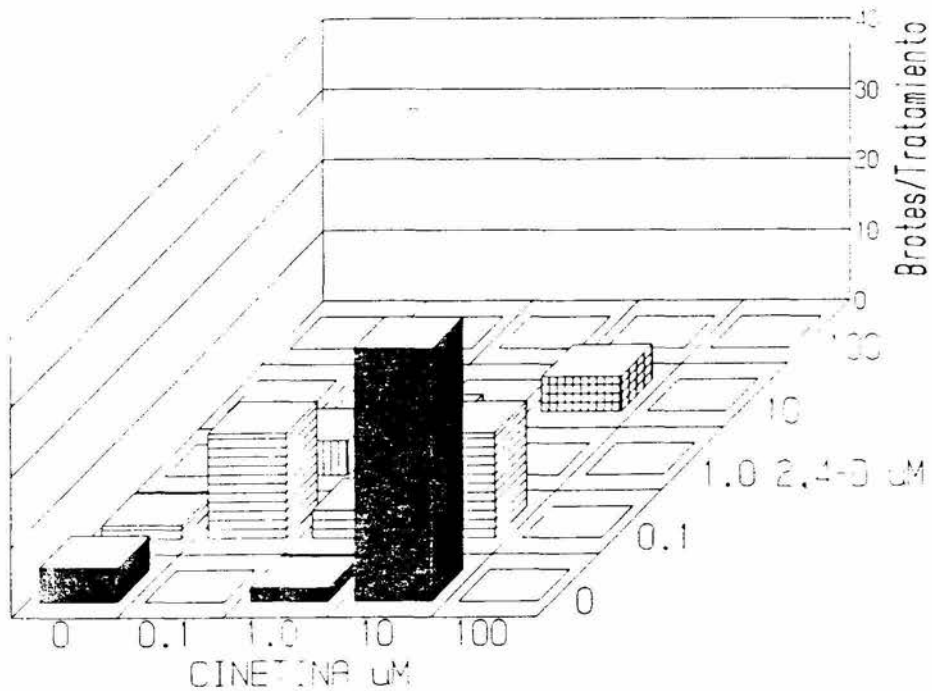


Figura 10. Efecto del balance del 2,4-D/CIN sobre explantes de tallo de *Vanilla planifolia*, crecidos en el medio B5. (A) Formación de estructuras organoides y (B) Número de brotes totales presentes en cada tratamiento. Con 9 explantes cada tratamiento.

(A)

2,4-D µM \ CIN µM	0	0.1	1.0	10	100
0	BROTES	BROTES			
0.1					
1.0					EXPLANTES NECROSADOS
10			BROTES	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS
100	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS	EXPLANTES NECROSADOS

(B)

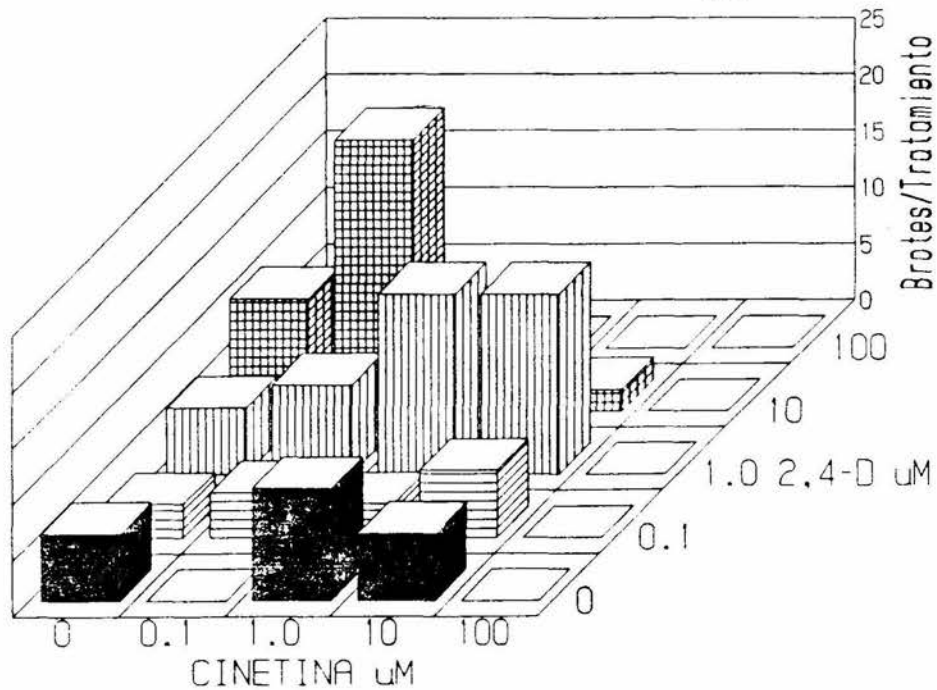


Figura 11. (A) Efecto del balance de los reguladores de crecimiento 2,4-D en la morfogénesis de explantes de tallo de *Vanilla planifolia* en el medio MS y (B) Número de brotes totales formados en cada tratamiento.

(A)

ANA/BAP (μM)	0	0.1	1.0	10	100
0	BROTOS	BROTOS	BROTOS		BROTOS
0.1	BROTOS			BROTOS	BROTOS
1.0					BROTOS
10					BROTOS
100	BROTOS	EXPLANTES VERDES.			BROTOS

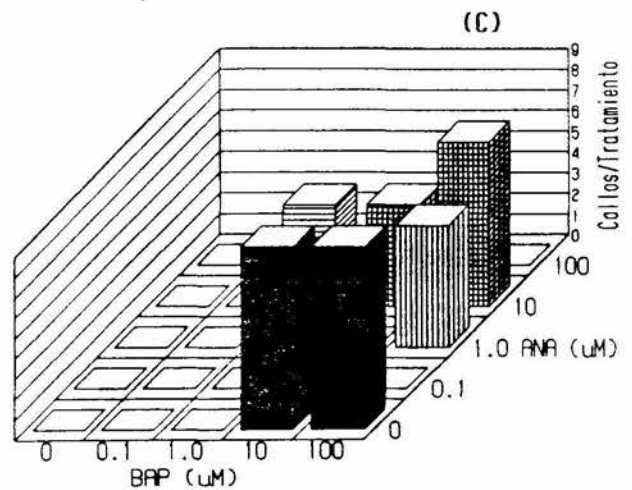
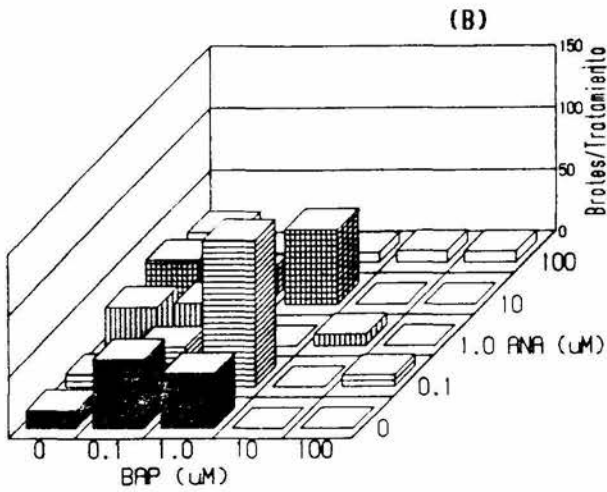


Figura 12. Efecto del balance de los reguladores de crecimiento ANA/BAP en la organogénesis, (A) durante la inducción de callo, en explantes de tallo de *Vanilla planifolia*, crecidos por 7 meses en el medio Bs; (B) Formación de brotes y (C) Formación de callo.

(A)

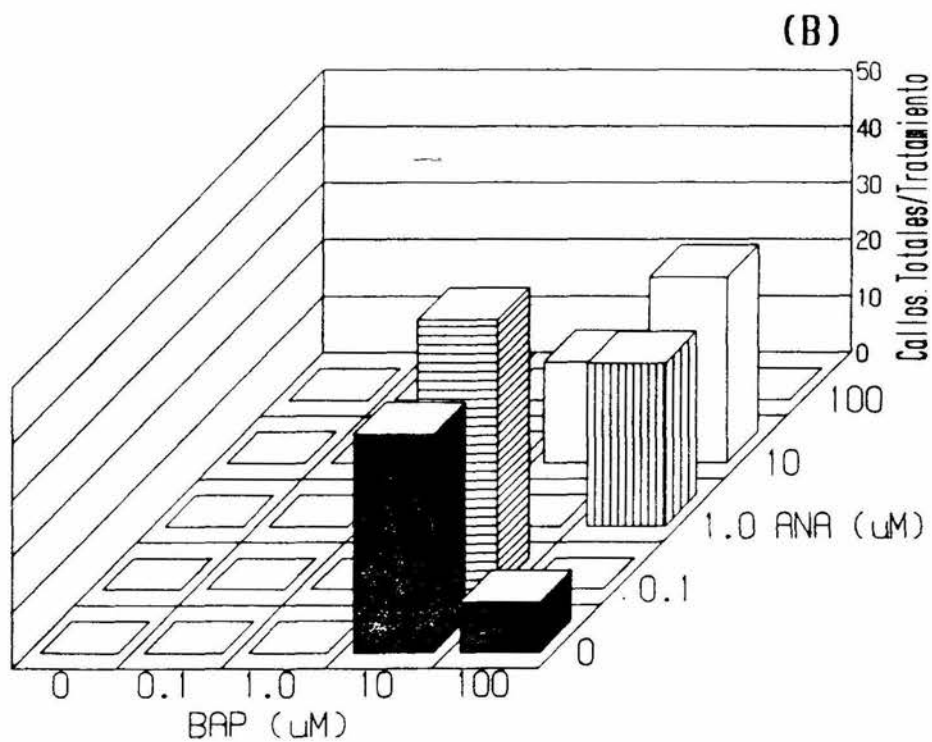


Figura 13. Efecto del balance ANA/BAP en la formación de callo.
(A) Callos crecidos y mantenidos en el medio Bs durante un período de 16 meses de cultivo. (B) Número de callos totales en cada tratamiento después de 16 meses de cultivo.

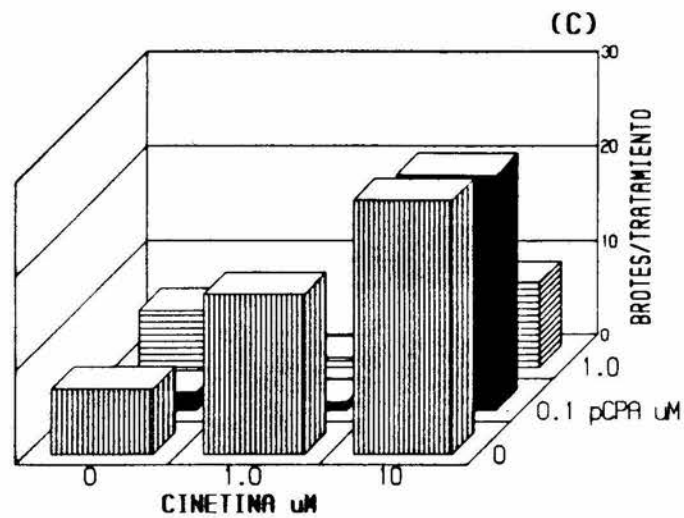
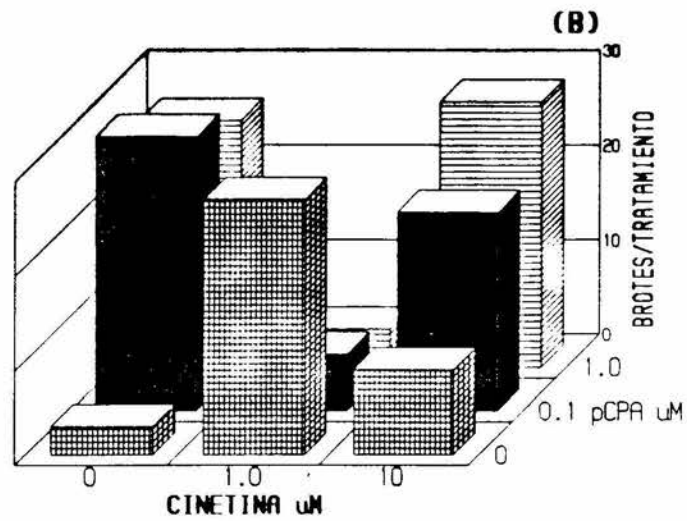
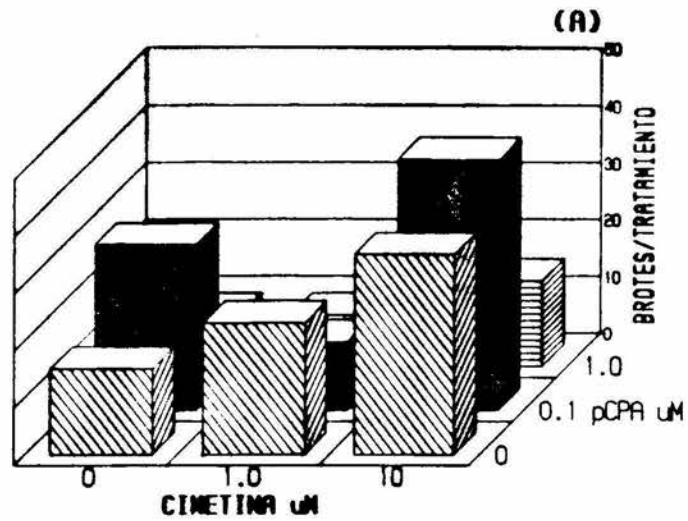


Figura 14. Efecto del balance p-CPA/CIN en la formación de brotes, durante la inducción de callo, en explantes de tallo de vainilla, crecidos en los medios SH (A), Bs (B) y MS (C), cada tratamiento con 9 explantes.

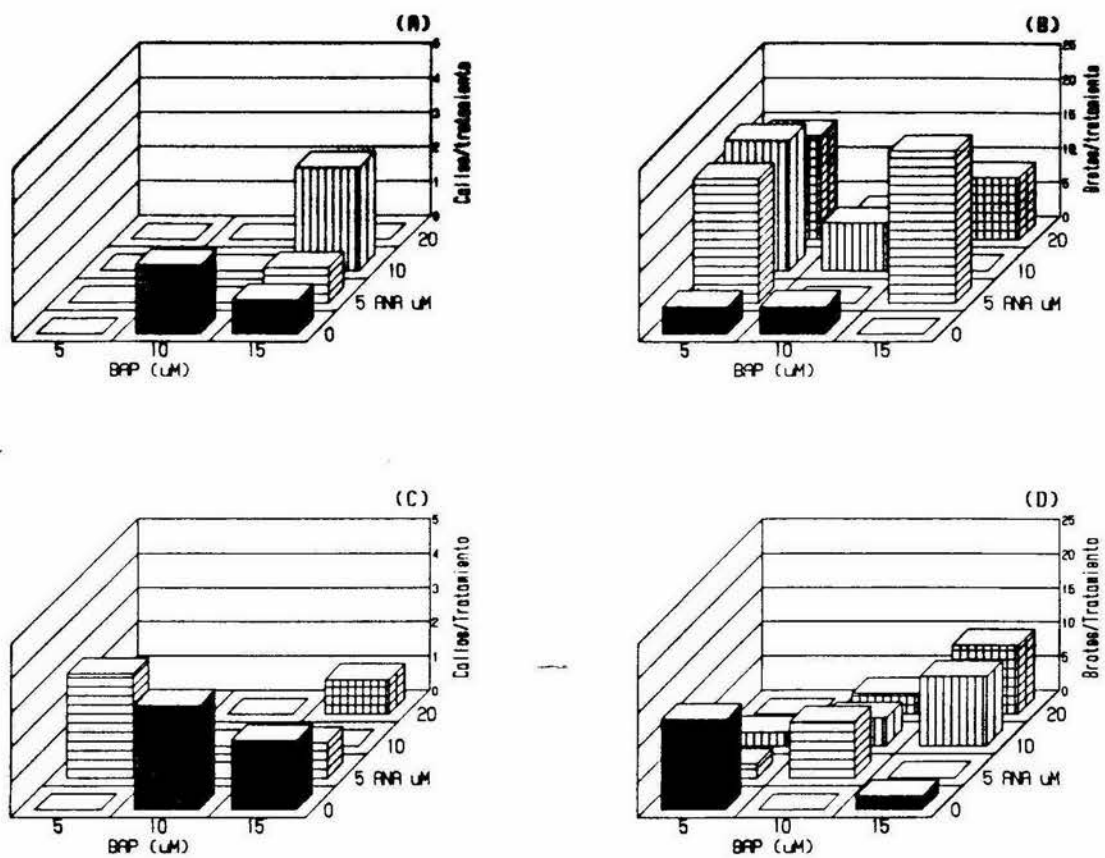


Figura 15. Efecto del balance de los reguladores de crecimiento ANA/BAP, en la inducción de callo y la formación de brotes a partir de explantes de tallo de *Vanilla planifolia*, crecidos en el medio Bs (A-B) y MS (C-D), durante un período de 6 meses.

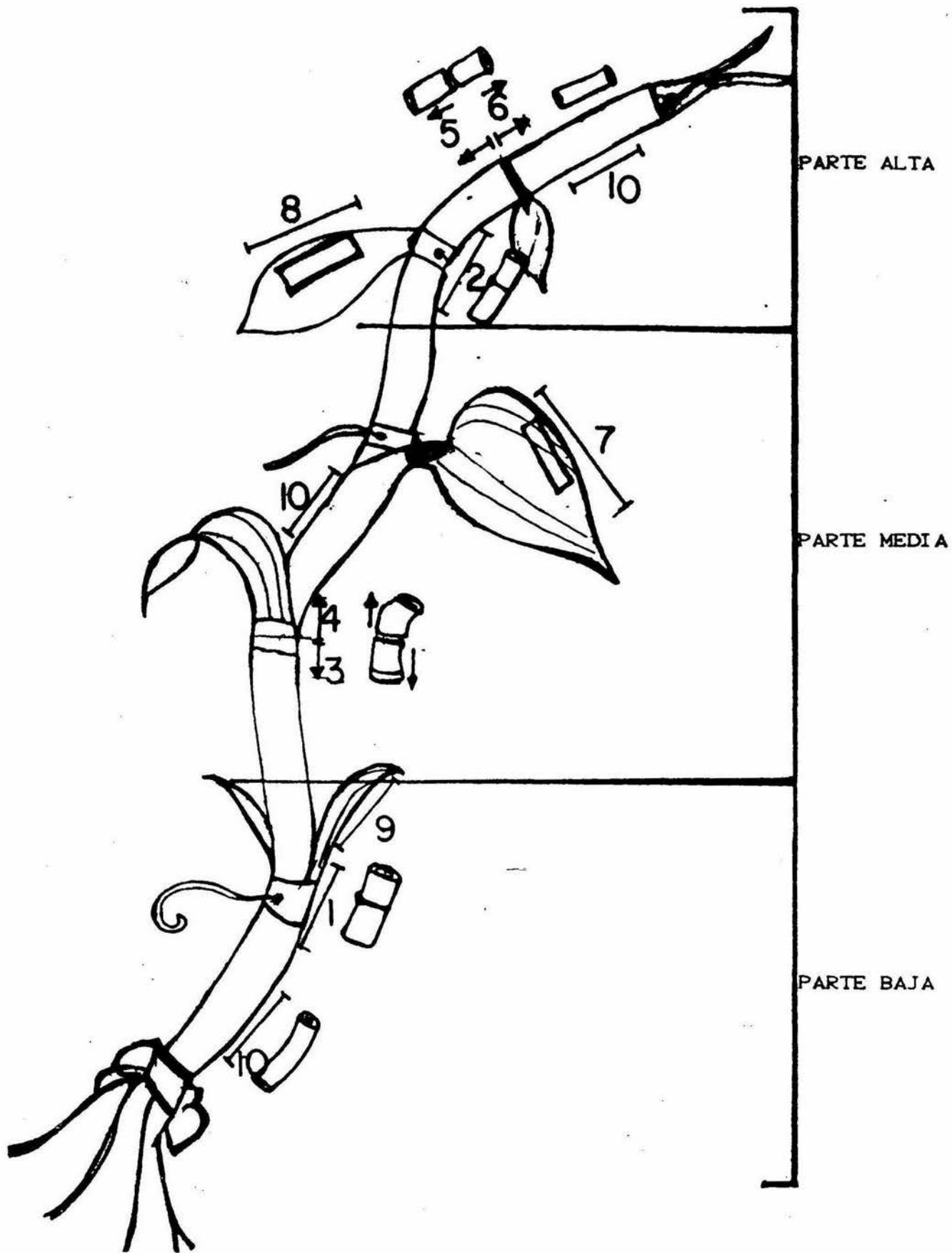


Figura 16. Representación esquemática de la plántula y posición de los explantes utilizados para la inducción de callo. Los números representan los tipos de explantes usados en la experimentación. (ver texto para su identificación)

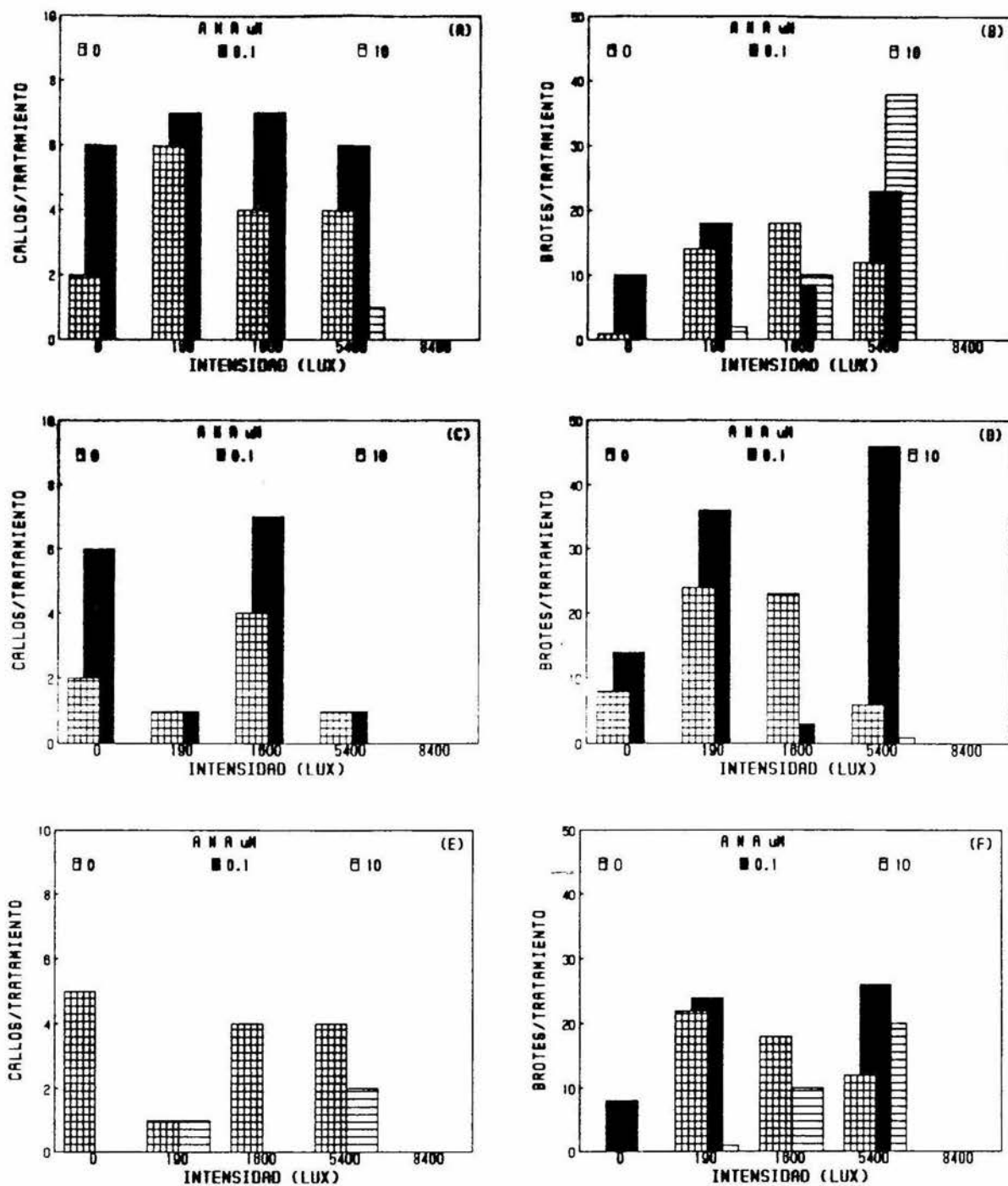


Figura 17. Respuesta del efecto de la luz sobre la inducción de callo y formación de brotes, en explantes de tallo de vainilla, crecidos en los medios MS (A-B), Bs (C-D) y SH (E-F), con 9 explantes por tratamiento.

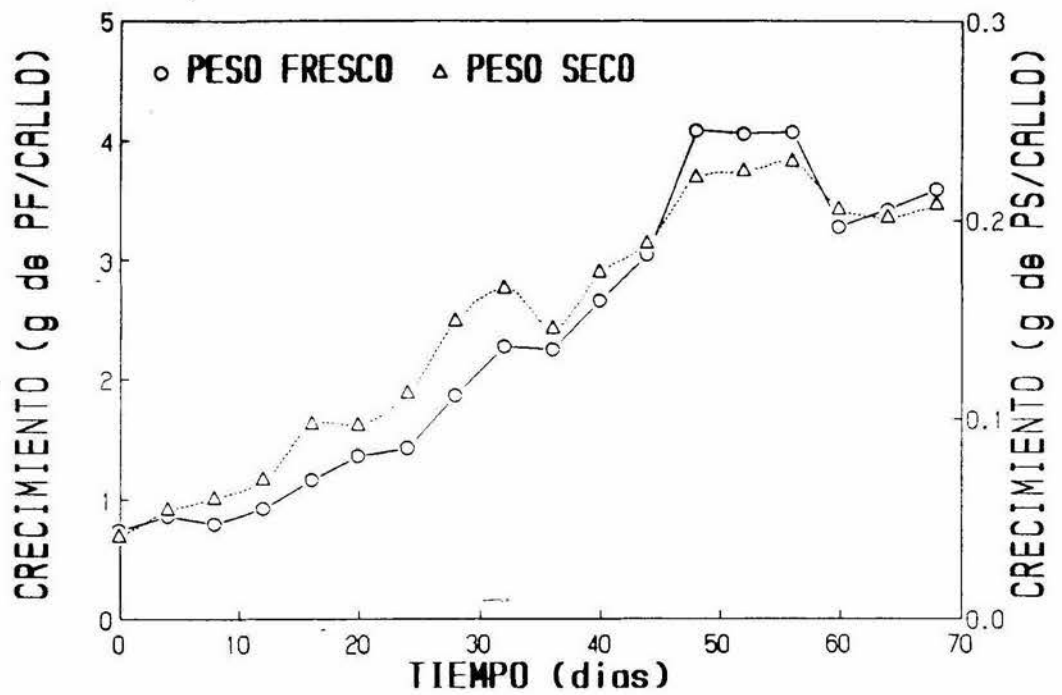


Figura 18. Cinética de crecimiento de callos de *Vanilla planifolia* crecidos en el medio Bs suplementado con $10 \mu\text{M}$ de BAP y $0.1 \mu\text{M}$ de ANA.

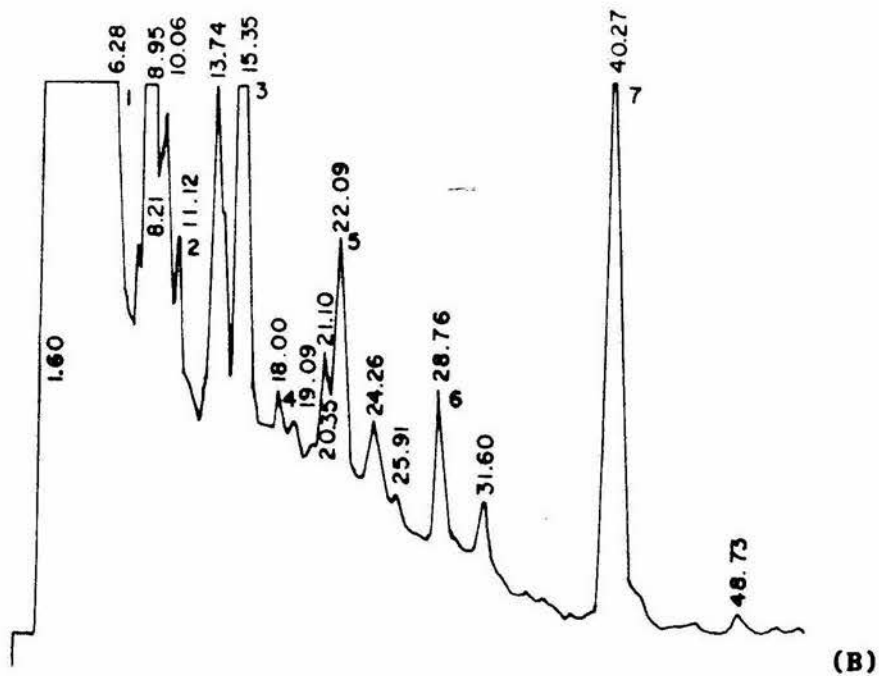
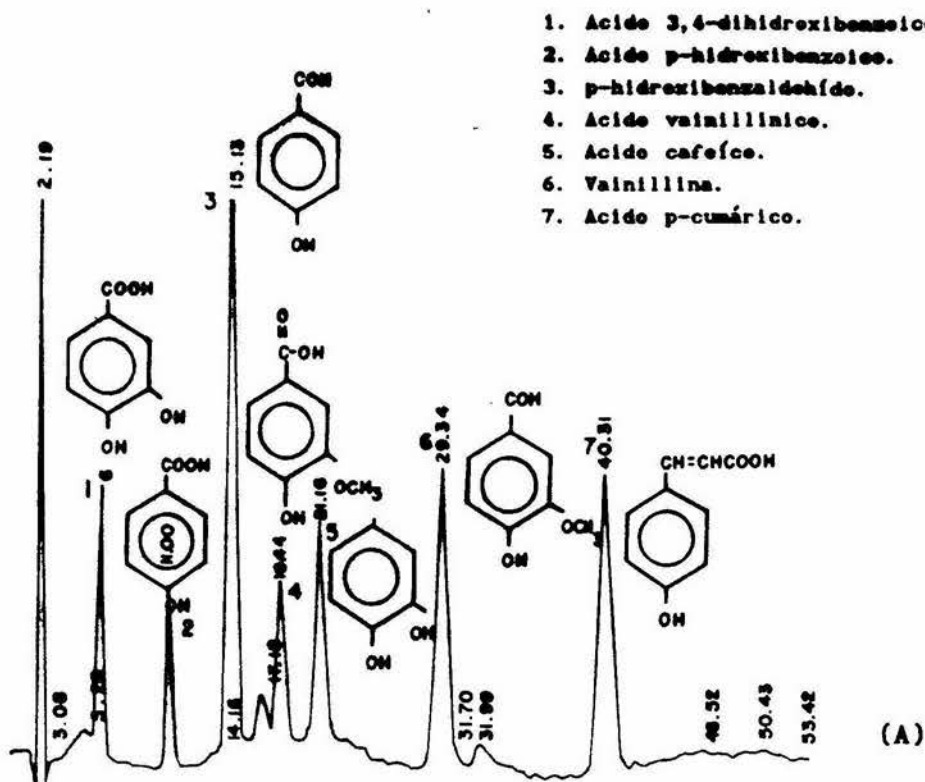


Figura 19. Análisis por CLAR de callos de *Vanilla planifolia* A.
 A) Cromatograma de los estándares de varios de los componentes del sabor natural de vainilla, para cuantificar la producción en los callos de *Vanilla planifolia*.
 B) Cromatograma del perfil del sabor de vainilla producido en callos de *Vanilla planifolia* Andrews.

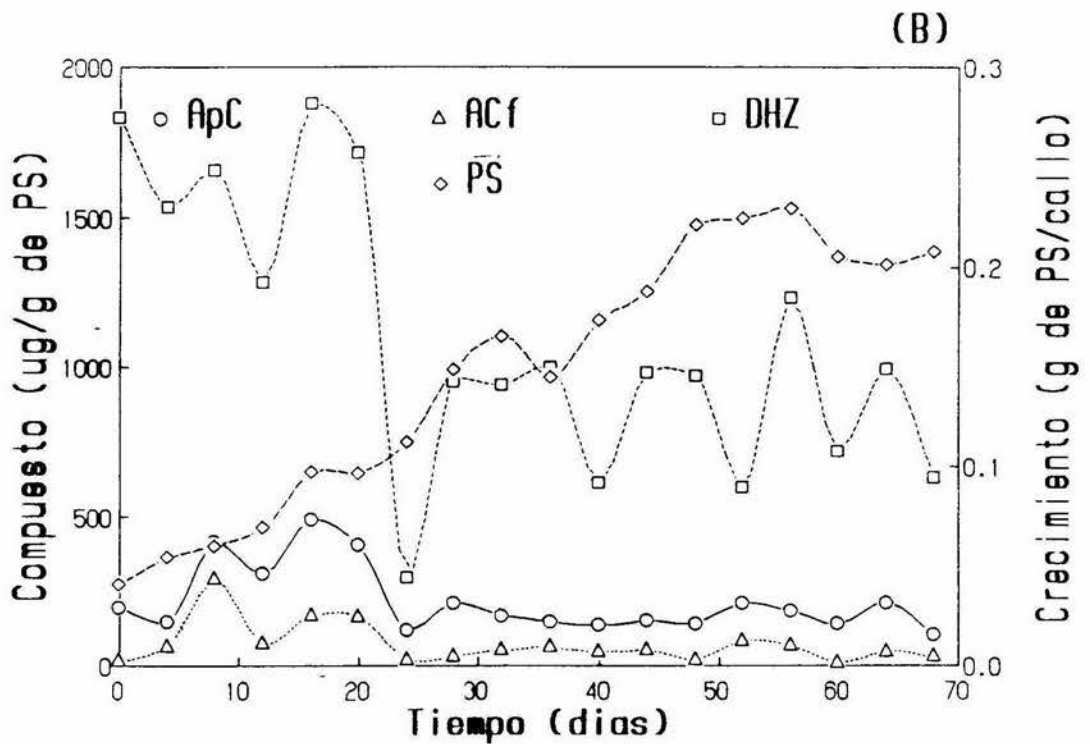
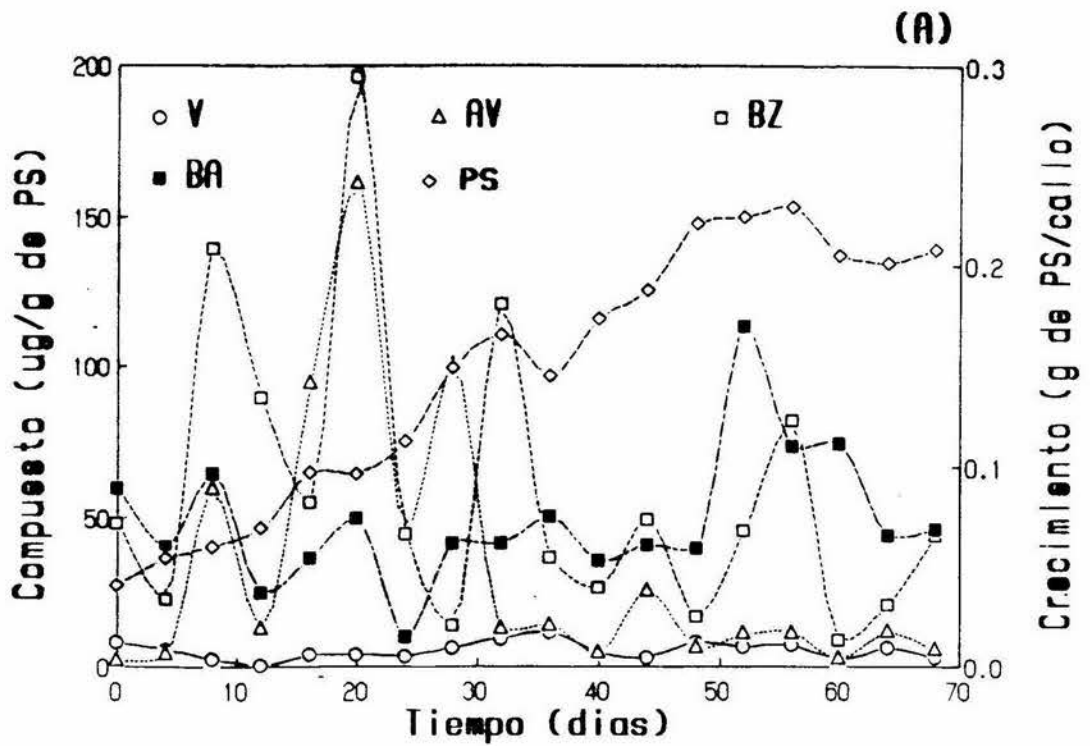


Figura 20. Cinética de crecimiento de callos de *Vanilla planifolia* y su producción de (A) V: Vainillina, AV: Acido vainillínico, BA: p-hidroxibenzaldehído, BZ: Acido p-hidroxibenzoico, (B) DHZ: Acido 3,4-dihidroxibenzoico, ApC: Acido cumárico, ACf: Acido caféico.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Baki, A.A.(1974) Hypochlorite and Tissue Sterilization. **Planta** 115:373-376.
- AboEl-Nil, M.M., A.C. Hildebrandt y R.F. Evert. (1976) Effect of Auxin-Cytokinin Interaction on Organogenesis in Haploid Callus of *Pelargonium hortorum*. **In Vitro** 12(8):602-604.
- Aiba, S., A.E. Humphrey, N.F. Millis. (1973) **Biochemical Engineering**. Academic Press. New York. pp.93-127.
- Aitchison, P.A., A.J. Macleod y M.M. Yeoman. (1977) Growth Patterns in Tissue (Callus) Cultures. In. **Plant Tissue and Cell Culture**. (H.E. Street, Ed). Second edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.267-306.
- Archer, A.W. (1989) Analysis of Vanilla Essences by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr.** 462:461-466.
- Arditti, J.(1982) Orchid Seed Germination and Seedling Culture- A Manual: Vanilla. In. **Orchid Biology: Reviews and Perspectives II**. (J. Arditti, Ed). Cornell University Press. Ithaca. pp.139-152.
- Balandrin, M.F., J.A. Klocke, E.S. Wurtele y Wm.H. Bollinger. (1985) Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. **Science** 228:1154-1160.
- Barba, A.A.(1987) Cultivo de Callos. En **Cultivo de Tejidos Vegetales**. (D.V. Hurtado y M.E. Merino, Eds.). Ed. Trillas, México. pp.111-121.
- Bayliss, M.W. (1980) Chromosomal Variation in Plant Tissues in Culture. In. **Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture**. (I.K. Vasil, Ed.). **Int. Rev Cytol. Suppl.** 11A:113-144.
- Beach, K.H. y R.R. Smith. (1979) Plant Regeneration from callus of Red and Crimson Clover. **Plant Sci. Lett.** 16:231-237.
- Berlin, J., C. Mollenschott, N. Greidiak, S. Erdogan, y I. Kuzovkina.(1990) Affecting Secondary Product Formation in Suspension and Hairy Root Cultures- A Comparison. In. **Progress in Plant Cellular and Molecular Biology**. (H.J.J. Nijkamp, L.H. W. Van der Plas, and J. Van Aartrijk, Ed.). Proceeding of the VIIth International Congress on the Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp.763-768.
- Biondi, S. y T.A. Thorpe. (1981) Requirements for a Tissue Culture Facility. In. **Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture**. (T.A. Thorpe. Ed.). Academic Press. New York. pp.1-20.
- Bhojwani, S.S. y M.K. Razdan. (1983) **Plant Tissue Culture: Theory and Practice**. Elsevier Science Publisher. Amsterdam, The Neatherlands. pp.25-41.

- Brodelius, P. (1983) Production of Biochemicals with Immobilized Plant Cell: Possibilities and Problems. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **413:382-393.**
- Brodelius, P. (1988) Immobilized Plant Cell as a Source of Biochemicals. In. **Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamentals and Applications** (M. Moo-Young, Ed.). Elsevier Applied Science. London, England. pp.167-196.
- Brodelius, P.E. (1990 a) The Use of Elicitation to Study the Regulation and Enzymology of Secondary Metabolism. En. **Obtención de Metabolitos Secundarios a partir de Cultivo de Tejidos Vegetales y sus Perspectivas Biotecnológicas.** (V.M. Loyola-Vargas, Ed.). CICY. pp.91-109.
- Brodelius, P.E. (1990 b) Transport and Accumulation of Secondary Metabolites. In. **Progress in Plant Cellular and Molecular Biology.** (H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas, and J. Van Aartrijk, Eds.). Proceeding of the VIIth International Congress on the Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp.567-576.
- Burri, J., M. Graf, P. Lambelet y J. Loliger. (1989) Vanillin: More than a Flavouring Agent- A Potent Antioxidant. **J. Sci. Food Agric.** **48(1):49-56.**
- Castillo, M.R. (1989) Morfología y Fenología de *Vanilla planifolia* en Papantla, Veracruz. Tesis de Maestria. Colegio de Posgraduados. Montecillo. México. 88p.
- Cervera, E. y R. Madrigal. (1981) *In vitro* Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* A.). **Environ. Expt. Bot.** **21:441**
- Constabel, F. (1984) Callus Culture: Induction and Maintenance. In. **Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plant Vol. 1. Laboratory Procedures and their Applications.** (I.K. Vasil, Ed.). Academic Press, Inc. Harcourt Brace. Jovanovich, Publishers, Orlando, Florida. pp.27-35.
- Correl, D.S. (1944) Vanilla: Its History, Cultivation and Importance. **Lloydia** **7:236-263.**
- Correl, D.S.(1953) Vanilla-Its Botany, History, Cultivation and Economic Import. **Econ. Bot.** **7:291-358.**
- Claus, E.P. y V.E. Teyler Jr. (1965) **Pharmacognosy.** 5th. Edition. Lea & Febiger. Philadelphia, USA. pp.147-150.
- Davidonis, G. y D. Knorr. (1991) Callus Formation and Shoot Regeneration in *Vanilla planifolia*. **Food Biotechnol.****5(1):59-63**
- Davidson, A.W., P.A. Aitchison y M.M. Yeoman. (1976) Disorganized Systems. In. **Cell Division in Higher Plants.** (M.M. Yeoman, Ed.). Academic Press, London. pp.407-432.
- De-Eknamkul, W. y B.E. Ellis. (1985) Effects of Auxins and Cytokinins on Growth and Rosmaric Acid Formation in Cell

- Suspension Cultures of *Anchusa officinalis*. **Plant Cell Rep.** 4(2):50-53.
- Dixon, R.A. (1985) Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures. In. **Plant Cell Culture a Practical Approach**. (R.A. Dixon, Ed.). IRL Press, Oxford. pp.1-20.
 - Dodds, J.H. y L.W. Robert. (1982) **Experiments in Plant Tissue Culture**. Cambridge University Press, Cambridge. pp.36-49.
 - Durzan, D.J.(1984) Special Problems: Adult vs. Juvenile Explants. In. **Handbook of Plant Cell Cultures Vol. 2 Crop Species**. (W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato and Y. Yamada, Eds). Macmillan Publishing Company, Inc. New York. pp.471-503
 - Evans, M.L.(1984) Function of Hormones at the Cellular Level of Organization. In. **Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 10: Hormonal Regulation of Development II; The Functions of Hormones from the Level of the Cell to the Whole Plant**. (T.K. Scott, Ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp.23-79.
 - Evans, D.A., W.R. Sharp y C.E. Flinck. (1981) Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. In. **Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture**. (T.A. Thorpe, Ed.). Academic Press, N.Y. pp-45-52.
 - Fowler, M.W. (1982) Substrate Utilization by Plant Cell Cultures. **J. Chem. Tech. Biotech.** 32:338-346.
 - Fowler, M.W. (1983) Commercial Application and Economic Aspect of Mass Plant Cell Culture. In. **Plant Biotechnology**. (S.H. Mantell and H. Smith, Eds.). Soc. Exp. Biol. Series 18. Cambridge University Press. UK. pp.3-37.
 - Fowler, M.W. y G. Stepan-Sarkissian. (1985) Carbohydrate Source, Biomass Productivity and Natural Product Yield in Cell Suspension Cultures. In. **Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures**. (K.H. Neumann, W. Barz and E. Reinhard, Eds). Springer-Verlag, Berlin. pp.66-73
 - Funk, C. y P. Brodelius. (1990 a) Influence of Growth Regulators and an Elicitor on Phenylpropanoid Metabolism in Suspension Cultures of *Vanilla planifolia*. **Phytochem.** 29(3):845-848.
 - Funk, C. y P.E. Brodelius. (1990 b) Phenylpropanoid Metabolism in Suspension Cultures of *Vanilla planifolia* Andr. II. Effects of Precursor Feeding and Metabolic Inhibitors. **Plant Physiol.** 94(1):95-101.
 - Funk, C. y P.E. Brodelius. (1990 c) Phenylpropanoid Metabolism in Suspension Cultures of *Vanilla planifolia* Andr. III. Conversion of 4-Methoxycinnamic Acids into 4-Hydroxybenzoic Acids. **Plant Physiol.** 94(1):102-108.
 - French, C.L., C.P. Vance y G.H.N. Towers. (1976) Conversion of p-Coumaric Acid to p-Hydroxybenzoic Acid by Cell Free Extracts of Potato Tubers and *Polyporus hispidus*. **Phytochem.** 15:564-566

- Gamborg, O.L., R.A. Miller y K. Ojima. (1968) Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. **Exptl. Cell Res.** 50:151-158.
- Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe y I.K. Vasil. (1976) Plant Tissue Culture Media. **In Vitro** 12(7):473-478.
- Gamborg, O.L. y J.P. Shyluk. (1981) Nutrition, Media and Characteristics of Plant Cell and Tissue Cultures. In. **Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture**. (T.A. Thorpe, Ed.). Academic Press, New York. pp.21-42.
- George, E.F., D.J.M. Puttock y H.J. George (1987) Plant Culture Media. Vol. 1. Formulations and Uses. Exegetics Limited. London. pp.204.
- Giles, K.L. y W.M. Morgan. (1987) Industrial-Scale Plant Micropropagation. **TIBIOTECH.** 5(2):35-39.
- Guarino, P.A. y S.M. Brown. (1985) Liquid Chromatographic Determination of Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extract: Cooperative Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 68(6):1198-1201.
- Gutiérrez, E.M.A. (1987) Micropropagación de *Vanilla planifolia*. En. **III Reunión Nacional de Bioquímica y Cultivo de Tejidos Vegetales** (1987). Irapuato, Gto. p.49.
- Hammerschalag, F. y P. Bottino. (1981) Effect of Plant Age on Callus Growth, Plant Regeneration, and Anther Culture of Geranium. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 106(1):114-116.
- Harbone, J.B. (1977) **Introduction of Ecological Biochemistry**. Academic Press LTD. London.
- Harrison, C.R. y J. Arditti. (1972) Cultivo de la Orquídea por Semilla. **Orquídea (Mex)** 2(4):81-90.
- Hartman, T. y D. Kester. (1980) **Propagación de Plantas: Principios y Prácticas**. Ed. CECSA, México. pp.145-189.
- Hegarty, C.P. (1955) Observation on the Germination of Orchid Seeds. **Am. Orchid. Soc. Bull.** 24(7):457-464.
- Heinstein, P. y A. Emery. (1988) Processes with Plant Cell Cultures. In. **Biotechnology Vol. 6b. Special Microbial Processes**. (H.J. Rehm and G. Reed, Eds.). VCH, Germany. pp.213-248.
- Henrich, J.E., D.P. Stimart y D. Ascher (1981) Terrestrial Orchid Seed Germination *in vitro* on a Defined Medium. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 106(2):193-196.
- Holden, P.R., M. Aitken, K. Lindsay y M.M. Yeoman. (1988) Variability and Stability of Cell Culture of *Capsicum frutescens*. In. **Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures**. (P. Morris, A.H. Scragg, A. Stafford and M.W. Fowler, Eds). Cambridge University Press. London. pp.237-243.

- Hong, Y.C. y S.K. Harlander. (1989) Plant Tissue Culture Systems for Flavor Production. In. **Flavor Chemistry of Lipid Foods**. (D.B. Min and T.H. Smouse, Eds.). The American Oil Chemist's Society. Illinois. pp.348-367.
- Horgan, R. (1987) Plant Growth Regulators and the Control of Growth and Differentiation in Plant Tissue Cultures. In. **Plant Tissue and Cell Culture Plant Biology Vol. 3**. (C.E. Green, D.A. Sommers, W.P. Hackett and D.D. Biesboer, Eds.). Alan R. Liss., Inc., New York. pp.135-149.
- Ishiguro, M., S. Nanba y A. Nakatsu. (1986) Analysis of Vanilla Oleoresin. **Kanzei Chuo Benzeikishoho. No.26 pp.61-67**.
- Jarret, R.L. y R. Fernandez. (1984) Shoot-Tip Vanilla Culture for Storage and Exchange. **Plant Gen. Res. Newsletter 57:25-27**.
- Jinyu, D. y H. Hong. (1987) Aseptic Germination of Vanilla Seeds. **Acta Botanica Yunnanica 9(4):473-476**.
- Kononowicz, H. y J. Janick. (1984) *In vitro* Propagation of *Vanilla planifolia*. **HortScience 19(1):58-59**.
- Klimes, I. y D. Lamparsky. (1976) Vanilla Volatiles- A Comprehensive Analysis. **IFFA 7(7):272-291**
- Knorr, D., M.D. Beaumont, C.S. Caster, H. Dornenburg, B. Gross, Y. Pandya y L.G. Romagnoli. (1990) Plant Tissue Culture for the Production of Naturally Derived Food Ingredients. **Food Technol. 44(6):71-79**.
- Knudson, L. (1950) Germination of Seeds of Vanilla. **Amer. J. Bot. 37(3):241-247**.
- Knuth, M.E. y O.P. Sahai. (1989) Flavor Composition and Methods **PTC International Patent Application. WO 89/00820 A1 (1989)**.
- Krikorian, A.D. (1991) Medios de Cultivo: Generalidades, Composición y Preparación. En. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. (W.M. Roca y L.A. Mroginski, Eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp.41-77.
- Kurz, W.G.W. y F. Constabel. (1979) Plant Cell Suspension Cultures and their Biosynthetic Potential. In. **Microbial Technology: Microbial Processes Vol. 1**. (H.J. Peppler and D. Perlman, Eds.). Second Edition. Academic Press, New York. pp.389-416.
- Lampman, G.M. y S.D. Sharpe. (1983) A Phase Transfer Catalyzed Permanganate Oxidation: Preparation of Vanillin from Isoeugenol Acetate. **J. Chem. Educ. 60(6):503-504**.
- Larqué-Saavedra, A y R. Reyes. (1988) El Uso de las Hormonas Vegetales en la Agricultura Mexicana. **Ciencia y Desarrollo 14(82):49-63**.
- Leong, G., A. Archavlis y M. Derbesy. (1989) Research on the

- Glucoside Fraction on the Vanilla Bean. *J. Essent. Oil Res.* 1(1):33-41.
- Lerner, H.R., D. Ben-Bassat, L. Reinhold y A. Poljakoff-Mayber. (1978) Induction of "Pore" Formation in Plant Cell Membranes by Toluene. *Plant Physiol.* 61:213-217.
 - Liahut, A.R.P. (1985) El Sistema Agroindustrias Vainilla (*Vanilla planifolia* A.) en México. Tesis de Licenciatura. UACH. Chapingo, México. pp.18-40.
 - Lindsey, K. y M.M. Yeoman. (1983) The Relation between Growth Rate, Differentiation and Alkaloid Accumulation in Cell Cultures. *J. Exp. Bot.* 42(7):679-684.
 - Lindsey, K. y M.M. Yeoman. (1984) The Viability and Biosynthetic Activity of Cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum* Immobilized in Reticulate Polyurethane. *J. Exp. Bot.* 35(160):1684-1696.
 - Lizt R.E. y R.L. Jarret. (1991) Regeneración de Plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogénesis y Organogénesis. En. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.** (W.M. Roca y L.A. Mroginski, Eds). C.I.A.T. Cali, Colombia. pp.143-172.
 - López, P.C. (1985) Establecimiento de un Laboratorio de Cultivo de Tejidos. En. **Fundamentos Teóricos-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales.** (V.M. Villalobos, Ed.). Colegio de Postgraduados-FAO. Chapingo, México. pp.12.
 - Lozoya, S.H. (1985 a) Embriogénesis Somática. En. **Fundamentos Teóricos-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales.** (V.M. Villalobos, Ed.). CP-FAO. Chapingo, México. pp.79.
 - Lozoya, S.H. (1985 b) Micropropagación Vegetal. **Ciencia y Desarrollo** 11(65):63-70.
 - Luckner, M. (1972) **Secondary Metabolism in Plant and Animals.** Academic Press. New York.
 - Lugo-Lugo, H. (1955 a) The Effect of Nitrogen on the Germination of *Vanilla planifolia*. *Amer. J. Bot.* 42(7):679-684.
 - Lugo-Lugo, H. (1955 b) Effects of Nitrogen on the Germination of *Vanilla planifolia* Seeds. *Am. Orchid. Soc. Bull.* 24(5):309-312.
 - Menchaca, G.R.A. (1990) Germinación *in vitro* de Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). En. **V Congreso Latinoamericano de Botánica.** La Habana, Cuba. Junio, 1990. p.315.
 - Merino, M.E. (1987) Técnicas de Esterilización y Manipulaciones Asépticas. En. **Cultivo de Tejidos Vegetales.** (D.V. Hurtado y M.E. Merino, Eds.). Ed. Trillas, México. pp.44-67 y 68-85.
 - Miller, R.M. y R.A. Drew. (1990) Effect of Explant Type on Proliferation of *Carica papaya* L. *in vitro*. *Plant Cell Tissue Culture.* 21(1):39-44.

- Moshy, R. (1986) Biotechnology: Its Potential Impact on Traditional Food Processing. In. **Biotechnology in Food Processing**. (S.K. Harlander and T.P. Labuza, Eds). Noyes Publications, Park Ridge, NJ. pp.75.
- Murashige, T. (1974) Plant Propagation through Tissue Culture. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 25:135-166.
- Murashige, T. y F. Skoog. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiol. Plant.** 15:473-497.
- McVaugh, R. (1985) **Flora Nova-Galiciana. A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico. Vol.16. Orchidaceae.** An Arbor The University of Michigan Press. pp.351-353.
- Nakasawa, Y.(1987) Characteristic and Utilities of Vanilla Flavours Food Processing. **Koryo** 62(12):49-61.
- Narayanaswamy, S. (1977) Regeneration of Plants from Tissue Cultures. In. **Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture.** (J. Rienert and Y.P.S. Bajaj, Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp.179-206.
- Neumann, K.-H.(1988) Phytohormones in Cell and Tissue Cultures. In. **Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants Vol. 5 Phytochemicals in Plant Cell Cultures.** (F. Constabel and I.K. Vasil, Eds). Academic Press, Inc. San Diego. pp.587-599.
- Ochoa, A.N. (1985) Establecimiento de Cultivos *in vitro*. En. **Fundamentos Teóricos-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales.** (V.M. Villalobos, Ed.). CP-FAO. Chapingo, México. pp. 64-71.
- Ogino, T., N. Hiraoka, y M. Tabata. (1978) Selection of High Nicotine-Producing Cell Lines of Tobacco Callus by Single-Cell Cloning. **Phytochem.** 17:1907-1911.
- Parr, A.J. (1988) Secondary Products from Plant Cell Culture. In. **Biotechnology in Agriculture.** (A. Mizrahi, Ed.). **Advances in Biotechnological Processes Vol. 9.** Alan R. Liss, Inc., New York. pp.1-34.
- Parr, A.J. (1989) The Production of Secondary Metabolites by Plant Cell Cultures. **J. Biotechnol.** 10(1):1-26.
- Parra, Q.R.A. (1984) El Cultivo de la Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) en la zona de Papantla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. UACH. Cd. Delicias, Chihuahua, México. 89p.
- Parra, Q.R.A.(1987) Cultivo *in vitro* y Anatomía de Ovulos de Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México. 104p.
- Pearson, M.N., A.A. Brunt, y S.P. Pone. (1990) Some Host and Properties of a Potyvirus Infecting *Vanilla fragrans* (Orchidaceae) in the Kingdom of Tonga. **J. Phytopathol.**

- Pétiard, V. y A. Bariaud-Fontanel. (1985) El Cultivo de Células Vegetales. **Mundo Científico** 7(71):730-736.
- Pirt, S.J. (1975) **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. John Wiley & Sons, New York. pp.4-14.
- Philip, V.J. y S.A.Z. Nainar. (1986) Clonal Propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames Using Tissue Culture. **J. Plant Physiol.** 122:211-215.
- Philip, V.J. y S.A.Z. Nainar. (1988 a) Structural Changes during the *in vitro* Germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). **Annals of Botany** 61(2):139-145.
- Philip, V.J. y S.A.Z. Nainar. (1988 b) *In vitro* Transformation of Root Meristem to Shoot and Plantlets in *Vanilla planifolia*. **Annals of Botany** 61(2):193-199.
- Philip, V.J. y J. Pedikkala. (1989) The Role of Indoleacetic Acid in the Conversion of Root Meristem in *Vanilla planifolia*. **J. Plant Physiol.** 135(2):233-236.
- Polanco, M.C., M.I. Peláez, y M.L. Ruiz. (1988) Factors Affecting Callus and Shoot Formation from *in vitro* Cultures of *Lens culinaris* Medik. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 15(2):175-182.
- Punja, Z.K., N. Abbas, G.G. Sarmiento, y F.A. Tang. (1990) Regeneration of *Eucumis sativus* var. *sativus* and *E. sativus* var. *hardwickii*, *E. melo* and *E. metuliferus* from Explants through Somatic Embryogenesis and Organogenesis: Influence of Explant Source Growth Regulator Regime and Genotipe. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 21(1):93-102.
- Purseglove, J.W. (1988) **Tropical Crops. Monocotyledons**. Longman Scientific & Technical, Singapore. pp.403-415.
- Purseglove, J.W., E.G. Brown, C.L. Green y S.R.L. Robbins. (1981) Vanilla. In. **Species. Vol. 2**. (D. Rhind and G. Wrigley, Eds.). Longman Group, LTD., England. pp.644-735.
- Rasmussen, F.N. (1985) Orchids. In. **The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy**. (R.T.M. Dahlgren. H.T. Clifford and P.F. Yeo, Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp.249-274.
- Reinert, J., Y.P.S. Bajaj, y B. Zbell. (1977) Aspects of Organization-Organogenesis, Embryogenesis, Cytodeferentiation. In. **Plant Tissue and Cell Culture**. (H.E. Street, Ed). Second Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.389-428.
- Renaudin, J.P. y J. Guern. (1988) Transport of Secondary Compounds in Cell Cultures. In. **International Symposium on Secondary Products from Plant Tissue Culture**. London.
- Riley, K.A. y D.H. Kleyn. (1989) Fundamental Principles of

- Vanilla/Vanilla Extract Processing and Methods of Detecting Adulteration in Vanilla Extracts. **Food Technol.** 43(10):64-77.
- Robert, M.L. (1985) El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. En. **Perspectivas de la Biotecnología en México**. (R. Quintero, Ed.). Fund. Javier Barros Sierra A.C./CONACYT. pp.367-375.
 - Romagnoli. L.G. y D. Knorr. (1988) Effects of Ferulic Acid Treatment on Growth and Flavor Development of Cultured *Vanilla planifolia* Cells. **Food Biotechnol.** 2(1):93-104.
 - Rosenthal, G.A. (1986) The Chemical Defenses of Higher Plants. **Sci. Amer.** 254(1):94-99.
 - Rhodes, M.J.C., R.J. Robins, A.J. Parr y J. Hamill. (1987) Secondary Product Formation in Plant Cell Cultures. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 105S-114S.
 - Sánchez, R.M.M. (1991) Comunicación personal.
 - Seabrook, J.E.A. (1980) Laboratory Cultures. In. **Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals**. (E.J. Staba, Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp.1-20.
 - Seibert, M., y P.G. Kadkade. (1980) Environmental Factors. A. Light. In. **Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals**. (E.J. Staba, Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp.123-141.
 - Seibert, M., P.J. Wetherbee, y D.D. Job. (1975) The Effects of Light Intensity and Spectral Quality on Growth and Shoot Initiation in Tobacco Callus. **Plant Physiol.** 56(1):130-139.
 - Sunderland, N. (1977) Nuclear Cytology. In. **Plant Tissue and Cell Cultures**. (H.E. Steet, Ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp.177-205.
 - Schenk, R.U. y A.C. Hildebrandt. (1972) Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. **Can. J. Bot.** 50:199-204.
 - Shuler, M.L. (1981) Production of Secondary Metabolites from Plant Tissue Culture- Problems and Prospects. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 369:65-80.
 - Skirvin, R.M. (1981) Fruit Crops. In. **Cloning Agricultural Plants via *in vitro* Techniques**. (B.V. Conger, Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp.59-61.
 - Skirvin, R.M., M.C. Chu, M.L. Mann, H. Young, J. Sullivan y T. Fermanian. (1986) Stability of Tissue Culture Medium pH as a Function of Autoclaving Time, and Cultured Plant Material. **Plant Cell Rep.** 5:292-294.
 - Skoog, F. y C.O. Miller. (1957) Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultures *in vitro*. **Symp. Soc. Expt. Biol.** 11:118-131.
 - Smulders, M.J.M., G.F.E. Janssen, A.F. Croes, G.W.M. Barendse,

- y G.J. Wullems. (1988) Auxin Regulation of Flower Bud Formation in Tobacco Explants. *J. Exp. Bot.* 39(201):451-459.
- Stafford, A., P. Morris y M.W. Fowler. (1986) Plant Cell Biotechnology: A Perspectives. *Enzyme Microb. Technol.* 8(10):578-587.
 - Sweet, H.C. y W.E. Bolton. (1979) The Surface Decontamination of Seeds to Produce Axenic Seedlings. *Amer. J. Bot.* 66(6): 692-698.
 - Szabados, L., V.M. Núñez, L.M. Tello, G. Mafla, J. Roa y W.M. Roca. (1991) Agentes Gelatinizadores en el Cultivo de Tejidos. En. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.** (W.M. Roca y L.A. Mroginski, Eds). C.I.A.T. Cali, Colombia. pp.79-93.
 - Szweykowska, A. (1974) The Role of Cytokinins in the Control of Cell Growth and Differentiation in Culture. In. **Tissue Culture and Plant Science.** (H.E. Street, Ed.). Academic Press. London. pp.461-475.
 - Tabata, M. (1977) Recent Advances in the Production of Medicinal Substances by Plant Cell Cultures. In. **Plant Tissue Culture and It's Biotechnological Application** (W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk, Eds.). Springer-Verlag. Berlin. pp.3-16.
 - Teutonico, R. y D. Knorr. (1984) Plant Tissue Culture: Food Application and the Potencial Reduction of Nutritional Stress Factors. *Food Technol.* 38(2):120-127.
 - Torres, K.C. (1989) **Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops.** An AVI Book, Published by Van Nostrand Reinhold, New York. pp.1-17 y 73-79.
 - Thorpe, T.A. (1978) Physiological and Biochemical Aspects of Organogenesis *in vitro*. In. **Frontiers of Plant Tissue Culture 1978.** (T.A. Thorpe, Ed.). International Association for Plant Tissue Culture. University of Calgary, Alberta, Canada. pp.49-55.
 - Thorpe, T. A. (1980) Organogenesis *in vitro*: Structural, Physiological and Biochemical Aspects. In. Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. (I.K. Vasil, Ed.). *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11A:71-111.
 - Van Ness, J.H. (1983) Vanillin. In. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.** Vol. 23. 3th. Ed. John Wiley & Sons. pp.704-717.
 - Van Waes, J.M. y P.C. Debergh. (1986) *In vitro* Germination of some Western European Orchids. *Physiol. Plant.* 67:253-261.
 - Vidal, J.P., J.J. Fort, P. Gaultier y H. Richard. (1989) Vanilla Aroma Extraction by Dense Carbon Dioxide. *Sci. Aliments* 9(1):89-100.
 - Villalobos, A.V.M., D.W.M. Leung, y T.A. Thorpe. (1984) Light

- Cytokinin Interaction in Shoot Formation in Cultured Cotyledon Explants of Radiata Pine. **Physiol. Plant.** 61:497-504
- Villegas, M. A. (1985) Métodos Asépticos. En. **Fundamentos Teóricos-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales.** (V.M. Villalobos, Ed.). CP-FAO. Chapingo, México. pp.54-72.
 - Vining, L.C. (1986) Secondary Metabolism. In. **Biotechnology Vol. 4. Microbial Products II.** (H.J. Rehm and G. Reed, Eds.). VCH. Germany. pp.19-38.
 - Vyskot, B. y M. Bezdek. (1984) Stabilization of the Synthetic Media for Plant Tissue and Cell Cultures. **Biol. Plant. (PRAHA)** 26(2):132-143.
 - Wilson, P.D.G., M.G. Hilton, P.T.H. Meehan, C.R. Waspe, y M.J.C Rhodes. (1990) The Cultivation of Transformed Roots from Laboratory to Pilot Plant. In. **Progress in Plant Cellular and Molecular Biology.** (H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas, and J. Van Aartrij, Eds.). Proceeding of the VIIth International Congress on the Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp.700-705.
 - Wisler, G.C., W. Zetter, y L. Mu. (1987) Virus Infections of *Vanilla* and Other Orchids in French Polynesia. **Plant Disease.** 71:1125-1129.
 - Whittaker, R.H. y P.P. Fenny. (1971) Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. **Science** 171(3973):757-770.
 - Wink, M. (1987) Physiology of the Accumulation of Secondary Metabolites with Special Reference to Alkaloids. In. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant. Vol. 4. Cell Culture in Phytochemistry.** (F. Constabel and I.K. Vasil, Eds.) Academic Press. New York. pp.17-42.
 - Wink, M. (1990) Physiology of Secondary Product Formation in Plants. In. **Secondary Products from Plant Tissue Culture.** (B.V. Charlwood and M.J.C. Rhodes, Eds.). Clarendon Press, Oxford. pp.23-41.
 - Withner, C.L. (1955) Ovule Culture and Growth of Vanilla Seedlings. **Am. Orchid. Soc. Bull.** 24(6):380-392.
 - Yeoman, M.M. (1970) Early Development in Callus Cultures. **Int. Rev. Cytol.** 29:383-409.
 - Yeoman, M.M. y A.J. Macleod. (1977) Tissue (Callus) Cultures Techniques. In. **Plant Tissue and Cell Culture.** (H.E. Street, Ed.). Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.31-59.
 - Yeoman, M.M. y E. Forche. (1980) Cell Proliferation and Growth in Callus Cultures. In. **Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Int. Rev. Cytol. Suppl.** 11A:1-24.
 - Yeoman, M.M., M.B. Miedzybrodzka, K. Lindsey y W.F. Mclauchlan (1980) The Synthetic Potential of Cultured Plant Cells. In.

Plant Cell Cultures Results and Perspectives. (F. Sala, B. Parisi, R. Cella and O. Cefferi, Eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. New York. pp.327-343.

- Zenk, M.H. (1965) Biosynthese von Vanillin in *Vanilla planifolia* Andr. **Z. Pflanzenphysiol.** 53(5):404-414.