



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regeneración *in vitro* de *vanilla planifolia* G. Jackson, en Andrews
(Orchidaceae), especie endémica mexicana.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA :

**JESÚS FERNANDO ROJAS
BRISEÑO.**

TUTOR:

DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA.



2007



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.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
"Regeneración in vitro de Vanilla planifolia G. Jackson, en Andrews
(Orchidaceae), especie endémica mexicana".

realizado por Jesús Fernando Rojas Briseño

con número de cuenta 9453490-4 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Dr. Víctor Manuel Chávez Avila
Propietario

Propietario M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano

Propietario M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

Suplente M. en C. María de los Angeles Aída Téllez Velasco

Angela Aída Téllez V.

Suplente M. en C. Ana Claudia Sánchez Espinosa

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 16 de Noviembre
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE

del 2006.

Dr. Zenón Cano Santana



AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, por su paciencia y gran apoyo durante el desarrollo de este difícil proyecto.

A la M en C. Ma. De los Ángeles Aída Téllez Velasco, por sus observaciones y por proporcionar el material biológico para esta investigación.

Al Biol. Octavio Gonzáles Caballero por su gran ayuda en la toma de fotografías de plántulas *ex vitro* de vainilla.

A todos y cada uno de mis asesores y sinodales, por la revisión de esta tesis con lo cual se pudo mejorar en muchos detalles el trabajo original.

A mis Maestras sinodales por sus consejos en la elaboración y detalles técnicos de esta tesis.

A los buenos maestros de la facultad de ciencias, por sus múltiples enseñanzas

A la naturaleza por la grandeza de su biodiversidad.

A mi familia por su apoyo en esta difícil empresa.

A mis Amigos y compañeros de laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, que me ayudaron a disfrutar de muchas maneras esta experiencia, haciéndola mas divertida y humana.

INDICE.

RESUMEN

1. - INTRODUCCIÓN

2. – ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la familia *Orchidaceae*

2.2 Importancia económica

2.3 Importancia etnobotánica

2.4 Importancia ecológica de las orquídeas.

2.5 Amenazas para las poblaciones silvestres de orquídeas

2.6 Clasificación taxonómica de *Vanilla planifolia*.

2.7 Descripción botánica de *Vanilla planifolia*.

2.8 Importancia económica de *Vanilla planifolia* como especia.

2.8.1 Distribución de la vainilla en México.

2.9 Situación de *Vanilla planifolia* en México.

2.10 Generalidades de cultivo.

2.11 Propagación de *Vanilla planifolia*.

2.12 La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación de las orquídeas.

2.12.1 La desinfección.

2.13 Cultivo de nudos.

2.13.1 Ventajas del cultivo de nudos

2.14 Aclimatización

3. - JUSTIFICACIÓN

4.- OBJETIVOS

5. - MATERIALES Y MÉTODOS

a) medio de cultivo

b) material biológico

5.1 Proceso de desinfección de explantes.

5.2 Siembra de nudos.

5.3 Inducción morfogénica en nudos de *Vanilla planifolia*.

5.4 Proceso de aclimatización.

6. - RESULTADOS.

6.1 Proceso de desinfección de explantes.

6.2 Desarrollo de los nudos.

6.3 Inducción morfogénica en nudos de *Vanilla planifolia*.

6.4 Aclimatización

7. – DISCUSIÓN.

8. - CONCLUSIONES.

9. – APÉNDICE

9.1 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 1962

9.2 Solución de vitaminas BPTA.

9.3 Índice de figuras

10. - BIBLIOGRAFÍA.

RESUMEN

En el presente trabajo, se logro la regeneración de *Vanilla planifolia*, por medio del cultivo *in vitro* de nudos. Se utilizó el medio MS modificado(MST) adicionado con distintas concentraciones de ácido α -naftalen acetico (ANA) (0, 0.5 mg/l) y 6-Bencil Amino Purina (BAP) (0, 0.5, 1,2 mg/l) La respuesta obtenida, fue la formación de brotes y su posterior desarrollo en plántulas. Sin embargo las combinaciones que mostraron los mejores resultados, fueron (1/0, 2/0 y 2/0.5 mg/l) de BAP/ANA; formando de 2.75 a 3.83 brotes promedio por explante

Las plántulas obtenidas a partir de nudos, fueron aclimatizadas exitosamente, obteniéndose un porcentaje de sobrevivencia del 100%.

Con la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro*, fue posible establecer un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Vanilla planifolia*, especie endémica mexicana. Con lo cual podemos contribuir a su conservación al formar bancos de germoplasma *in vitro*.

1. - INTRODUCCIÓN.

Vanilla planifolia es una orquídea trepadora nativa de México, dentro de sus frutos, se produce la esencia saborizante que es la vainilla; este producto natural, es considerado de mayor calidad que la vainillina sintética.(Philip and Nainar, 1985; Romeu, 1995).

A pesar de que la vainilla natural tiene gran demanda a nivel mundial por la industria alimenticia, la *Vanilla planifolia* como cultivo presenta algunos problemas para su propagación; las semillas germinan con dificultad y la propagación vegetativa tradicional es lenta; además de producir un número muy limitado de nuevas plantas.

Aunado a lo anterior, algunos cultivadores colectan plantas de la naturaleza para incrementar sus cultivos, con lo cual ponen en entre dicho la sobrevivencia de esta especie en la naturaleza (Miguel Angel Soto Arenas, comunicación personal).

La vainilla en la naturaleza, está seriamente amenazada de extinción, pues sólo existen 30 "individuos genéticos "(Hágsater *et al.*, 2005).

Sin embargo, a través de las múltiples técnicas de cultivo *in vitro*, se ha comprobado que es posible reproducir esta especie (Kononowicz and Janick, 1984; Philip and Nainar, 1985; Gu, Arditti and Nyman, 1987; Davidonis and Knor, 1991; George and Ravishankar, 1997)

En este trabajo se ha estudiado la regeneración de plantas completas, a partir del cultivo *in vitro* de nudos de *V. planifolia*; así como su aclimatización a condiciones *ex vitro*.

2.- ANTECEDENTES.

2.1 Generalidades de la familia *Orchidaceae*

Las orquídeas conforman la familia más grande de plantas con flor, conteniendo 800 géneros y más de 25,000 especies (Arditti, 1992).

Dressler (1993) menciona que las orquídeas, son probablemente la más grande familia de plantas con flor, estima que existen entre 17,000 a 35,000 especies. Atwood (1986) estima que existen 19,000 especies pero indica que se requieren mas trabajos taxonómicos que ratifiquen estas cifras.

Se distribuyen en todo el planeta; pero la mayoría de ellas (el 85%) se desarrolla en las regiones subtropicales y tropicales de todo el mundo (Zimmerman, 1959). También se les encuentra en las regiones templadas en América y Europa, incluso crecen cerca del círculo polar ártico.

Debido a que varias de ellas habitan en sitios poco accesibles o peligrosos, muchas especies permanecen desconocidas o están poco estudiadas.

Por su afinidad a crecer en un tipo de sustrato, las orquídeas se clasifican en:

Epifitas.- son aquellas que crecen sobre otro vegetal, ya sean las ramas de un árbol, su tronco, sobre una liana o arbusto; están ampliamente distribuídas en las regiones tropicales cálidas y húmedas, donde la humedad atmosférica relativamente alta permite que sus raíces se desarrollen sin necesidad de suelo. Por ejemplo *Laelia spp.*, *Cattleya spp.*, *Catasetum spp.* entre otras (Zimmerman, 1959).

Atwood (1986) estima que el 73% de las especies de orquídeas, son epífitas.

Rupícolas.- son aquellas que habitan preferentemente en sustratos rocosos, sobre laderas rocosas o peñones; a veces soportando condiciones bastante secas o de alta exposición luminosa por ejemplo *Schomburgkia tibicinis*, *Brassavola nodosa*, *Bulbophyllum sp*; (Arditti, 1992).

Terrestres.- son aquellas que habitan en el suelo de los bosques, selvas o praderas; se distribuyen tanto en regiones tropicales como en zonas templadas, Por ejemplo *Bletia urbana*, *Cypripedium spp*, *Orchis spp.* *Calanthe spp.*, *Spiranthes spp* (Zimmerman, 1959). Incluso llegan a habitar en zonas alpinas o semi-polares como *Platanthera volcanica*, *Dichromanthus aurantiacus*, *Corallorhiza macrantha* (Hágsater et al., 2005).

Dentro de las orquídeas terrestres, se encuentra *Vanilla planifolia*, ésta inicia su vida en el suelo del bosque tropical y va creciendo horizontalmente hasta encontrar un árbol que le sirva de soporte, de ahí en adelante, la viña trepa por la corteza hasta alcanzar las alturas, donde finalmente, al conseguir las condiciones de luz adecuadas puede florecer y formar frutos (Fouché y Jouve, 1999)

Micótrofas .- son aquellas que su nutrición depende de hongos formando con ellos una simbiosis (micorriza); los hongos son los que proveen de alimento casi o en su totalidad a la orquídea como a *Corallorhiza macrantha* (Hágsater et al., 2005). Cabe mencionar que hay orquídeas que son totalmente subterráneas como *Rhizantella gardneri* que vive bajo tierra en Australia y sólo emerge ligeramente en época de floración (Arditti, 1992).

Las preferencias de hábitat no siempre son rígidas, algunas orquídeas pueden crecer igualmente como epifitas, terrícolas o litófitas (Arditti, 1992).

2.2 Importancia económica de las orquídeas.

Las orquídeas son un grupo de plantas económicamente muy importantes; más allá de las múltiples especies de flores deslumbrantes que se utilizan como plantas de ornato (Tabla A). Existen muchas otras que son utilizadas por sus hojas para confeccionar cestería rústica (ejem. *Dendrobium faciferum*, *Vanilla ovallis*), o aquellas cuyos cormos (ejem. *Cynorchis spp*, *Eulophia spp.*) o sus flores (ejem. *Stanhopea tigrina*) son consumidos como alimentos; algunas otras son utilizadas para preparar medicina tradicional, tal es el caso de *Angraecum fragans*, cuyas hojas son usadas como remedio contra enfermedades pulmonares o como el

salep, que se extrae de los tubérculos de *Orchis tridentatum*, *O. mascula* y *O. morio* y se usa para tratar trastornos digestivos. Algunas más se usan para preparar bebidas como *Angraecum fragans*, cuyas flores son hervidas para preparar Té *Bourbon* o en el caso de *Disa spp.* y *Habenaria spp.* cuyos cormos se utilizan para preparar jugos tonificantes.

También se conocen especies que se utilizan como saborizantes, tal es el caso de *Vanilla planifolia* de cuyas vainas se extrae la esencia de vainilla, sus componentes aromáticos conforman una mezcla altamente apreciada por la industria alimenticia. Otros ejemplos son *Tetramicra bicolor*, *Anacamptis spp.* y *Ophrys spp.*; cuyos tubérculos se usan para dar sabor a los helados.

Existen varios géneros de orquídeas que son cultivados comercialmente para la obtención de flor cortada. Las *Cattleyas* y sus híbridos son usados para hacer elegantes corsages de alto precio (Arditti, 1992). Las inflorescencias de *Cymbidium* híbrido se venden en todo el mundo, al igual que las inflorescencias de *Dendrobium*, ambas son producidas en lugares como Singapur, Tailandia, Australia, Hawaii, Malasia (Larson, 1988).

El género *Oncidium* es económicamente importante debido a la amplia gama de atractivos híbridos y variedades, su uso consiste en que son plantas que producen flor de corte o bien se venden como plantas de maceta (Cheng y Chang, 2000).

La industria floral de orquídeas, es multimillonaria. Por ejemplo en 1974, Singapur obtuvo por concepto de venta de plantas y flores \$2,300,000 dólares; Estados Unidos en 1977 obtuvo al cierre de la pre-venta por concepto de venta de plantas y flores \$ 60,000,000 dólares (Arditti, 1992).

Toda esta industria se basa en la propagación masiva que se realiza en laboratorios comerciales bajo condiciones de cultivos *in vitro*. En dichos laboratorios se realizan prácticas de germinación de semillas híbridas, propagación clonal masiva a partir de meristemos, protocormos y desarrollan plantas genéticamente mejoradas o transgénicas (Yang *et al.*, 1999; Kuehnle y Suggi, 1992).

También existe una constante producción de plantas para abastecer los centros de jardinería que se dedican a la venta de plantas de orquídea para los cultivadores aficionados y coleccionistas (Larson, 1988).

2.3 Importancia etnobotánica de las orquídeas.

En varias partes del mundo, las orquídeas son utilizadas como fuentes de alimento, medicinas o como remedios espirituales en el folklor de las distintas etnias (Arditti, 1992).

a) Las orquídeas como alimento.- En África, las raíces tuberosas de *Cynorchis* spp. y de *Eulophia* spp. son consumidas. También se preparan jugos a partir de las raíces tuberosas de *Disa*, *Habenaria* y *Satyrium* spp.

En algunas regiones de México se consumen las flores de *Stanhopea tigrina*. (Arditti, 1992)

Los antiguos indígenas de México, extraían el mucílago de los bulbos de *Prosthecheas*, *Laelias*, *Bletias*; y lo utilizaban para hacer un pegamento, el "tzauhtli", dicho pegamento se utilizaba en el arte plumario, en pinturas y para preparar pastas con las que se moldean calaveritas y alfeñiques para las fiestas religiosas (Hágsater *et al.*, 2005).

En Norteamérica los bulbos y tubérculos de *Asplectrum hyemale*, *Bletia veracunda*, *Habenaria dilatata* y *Calypso borealis* son consumidos como alimento.

En la Grecia antigua se consumía el salep, elaborado a partir de las raíces tuberosas de *Orchis morio*, *O. macula*, *O. papilionacea*, *O. tridentata* y *O. longicruris*. Estas raíces una vez cocidas, se usaban como alimento, tónico vigorizante, medicina o afrodisíaco (Arditti, 1992).

b) Las orquídeas en el folklor y la medicina.- Las orquídeas están muy relacionadas con los usos y costumbres de las sociedades del mundo, cada cultura les da una utilidad y un significado especial relacionando las orquídeas con la magia y lo sobrenatural.

Por ejemplo; en México una especie de *Laelia* era usada para prevenir el aborto (Arditti, 1992).

La vainilla (*V. planifolia*) aún en el presente es recolectada por los indígenas como remedio casero y para artesanías (Hartmann, 1992).

Las propiedades medicinales de la vainillina científicamente probadas son :

Anti-convulsivo en conejillos de indias y ratas.

Asiste en la síntesis de proteínas y regeneración de músculos.

Es de utilidad en estados postoperatorios y postraumáticos.

Inhibe a las bacterias *Micrococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Tiene propiedades androgénicas demostradas en ratas castradas (Arditti, 1992).

La *Vanilla pompona*, es colectada por las mujeres zoques de Chimalapa, ellas la mezclan con aceite para perfumarse el cabello (Hágsater *et al.*, 2005).

En la Europa antigua se utilizaba *Orchis morio* y *Orchis latifolia* para protegerse de la brujería.

En la antigua China se usaban orquídeas para protegerse y ahuyentar a los malos espíritus.

Está escrito en sánscrito que la orquídea *Eria muscicola* puede prevenir calamidades, infortunios y puede atraer la prosperidad.

En las islas Solomon una especie de *Cryptostylis* era utilizada para prevenir que el alma de un difunto regresara a asustar en su propia casa.

En Papua, Nueva Guinea, una especie de *Dendrobium* es usada para curar una dolorosa enfermedad sexual producida supuestamente por el espíritu femenino "Duruagle" que trata de seducir a los hombres.

En Samoa, *Dendrobium dactyloides* se usa para curar enfermedades del oído enviadas por malos espíritus.

En Indonesia *Agrostophyllum glumaceum* es considerada como la morada de los fantasmas.

En Perak, Malasia, las hojas de *Cymbidium finlaysonianum* se atan para hacer escobas que se usan para salpicar agua en la casa de un difunto; para evitar que su alma regrese.

En las islas Andaman se hacen collares y cinturones de *Dendrobium secunda* para prevenir o curar enfermedades.

En Sudáfrica, *Corycium nigrescens* se usa para protegerse del mal.

En Norteamérica se usaba *Cypripedium humile* para hacer hechizos de amor. Los Cherokees usaban *Spiranthes lucida* para correr más rápido y ser más saludables, también usaban *Platanthera ciliaris* para hacer que los peces mordieran el anzuelo (Arditti, 1992).

2.4 Importancia ecológica de las orquídeas.

Las orquídeas son un grupo de plantas muy importante; las podemos encontrar en casi todos los climas y ecosistemas en donde interactúan con otras especies tanto de insectos, hongos, aves y mamíferos.

Algunas especies como *Caulanthron bilamellatum*, *Dinerandra* spp. y *Schomburgkia tibicinis*, los pseudobulbos actúan a manera de nidos, en cuyo interior habitan hormigas. Las orquídeas les proporciona refugio y alimento a cambio, las hormigas las protegen de los ataques de otros insectos (Hágsater *et al.*, 2005).

Algunas especies de *Vanillas*, son consideradas como orquídeas del jardín de las hormigas (las orquídeas crecen en el nido de las hormigas, pero éstas no habitan el interior de la orquídea). Este tipo de asociación es bastante común en los trópicos (Davison y Epstein, 1989).

Existen al menos 200 especies de orquídeas en el mundo que carecen de clorofila y por lo tanto no realizan fotosíntesis; su única fuente de nutrición son los hongos saprofitos con los que han establecido una relación simbiótica llamada micorriza.

Cabe mencionar, que las semillas de orquídeas son micoheterótrofas obligadas, esto quiere decir que al momento de su germinación, requieren asociarse con un hongo para que éste les proporcione los nutrientes necesarios para su desarrollo (Hágsater *et al.*, 2005).

Algunas especies de vainillas, producen frutos carnosos y perfumados, con los que atraen murciélagos, éstos al comer los frutos, se encargan de dispersar las semillas, y éstas sólo germinarán después de haber pasado por el tracto digestivo de los murciélagos (Hágsater *et al.*, 2005).

En otros casos, las orquídeas terrestres forman parte de la dieta de los animales que ramonean el suelo de los bosques. Sin olvidarnos de los múltiples insectos que comen sus hojas y que son a su vez presas de animales mayores como aves y roedores.

Por citar un caso muy particular *Angraecum sesquipedale*, una orquídea epífita que crece en las selvas de Madagascar. Sus grandes flores blancas, tienen forma de estrella, textura cerosa y presenta un nectario de color verde, muy largo y colgante, de hasta 11.5 pulgadas de longitud, el cual está lleno de néctar hasta la mitad.

Darwin al estudiar la flor, dedujo que su polinizador debía ser una polilla nocturna, con una proboscis igualmente larga, para poder ser capaz de alcanzar el néctar, a la vez que realizaba la polinización de la flor (Darwin, 1984).

La visita del polinizador, va consumiendo el néctar, por lo cual el insecto debe introducir su proboscis más adentro del nectario, para poder alcanzar la última gota de néctar. Al hacerlo, los polinios se adhieren a la base de la proboscis.

La polilla repite la operación en su siguiente visita a otra flor, al hacerlo deposita los polinios de la flor anterior en el estigma de una nueva flor y al mismo tiempo retira los polinios de la nueva flor

La razón de que el nectario sea tan largo es evitar que otras polillas pequeñas, tomen el néctar sin fertilizar a la flor; de esta forma la orquídea se asegura de que sólo las grandes polillas que posean una proboscis lo bastante larga, logren alcanzar el néctar y los polinios de la orquídea.

Desde el punto de vista evolutivo, los *Angraecums* y las polillas han co-evolucionado a través de la selección natural que modela a cada generación.

Por una parte el *Angraecum* ofrece una reserva de néctar segura para las polillas que puedan tomarlo; si esta orquídea se extinguiese, podría ser una pérdida considerable para esas polillas; y por otra parte, si las polillas se extinguiesen, los *Angraecums* podrían extinguirse también (Darwin, 1984).

Darwin predijo las características del polinizador de *Angraecum sesquipedale*.

Sólo 41 años después fué descubierta una polilla nocturna ahora llamada *Xanthopan (macrosila) morgani preadicta*, que se presume es el polinizador de esta especie (Arditti, 1992).

Podemos concluir que las flores de las orquídeas están en íntima relación con los demás seres vivos. Aunque no siempre son la principal fuente de alimentación de muchos de ellos, contribuyen de diversas formas a mantener la diversidad de los ecosistemas.

Las orquídeas son organismos que han co-evolucionado junto con insectos de tal forma que en algunos casos la sobrevivencia de uno puede afectar la sobrevivencia del otro organismo.

Tabla A.-Importancias de las orquídeas.

Importancia	Descripción	Géneros	Referencias
Ecológica	Refugio de insectos. Alimento para otras especies. Interacciones planta-animal (co-evolución). Simbiosis con algunos hongos (micorrizas)	<i>Schomburkia, Dinerandra, Vanilla, Stanhopea, Angraecum</i>	Davison and Epstein, 1989. (Darwin, 1984).
Etnobotánica	Medicina, Bebidas, Alimentos, Artículos domésticos, Rituales	<i>Angraecum, Bletia, Disa, Habenaria, Eulophia, Calypso, Dendrobium, Orchis, Spiranthes Stanhopea, Cymbidium, Cypridium, Cryptostylis, Eria...</i>	Arditti, 1992.
Económica	Ornato, Alimento,	<i>Cattleya, Oncidium, Dendrobium, Phalaenopsis, Angraecum, Vanilla, Orchis, etc.</i>	Arditti, 1992. Larson, 1988.

2.5 Amenazas para las poblaciones silvestres de orquídeas

Muchas especies de orquídeas están consideradas en peligro de extinción debido principalmente a dos factores, uno es la destrucción total o alteración de su hábitat por efecto de las actividades de tala y desmonte de selvas.

La tasa de deforestación estimada de 1981 a 1990 en 87 países tropicales fue en promedio anual de 0.9 hectáreas, lo que significa que se están perdiendo anualmente 170,000 kilómetros cuadrados de bosque tropical (World Conservation Monitoring Center 1992 en <http://elib.cs.berkeley.edu/iucn/docs/orchids/toc.html>)

En el caso particular de México, la tasa anual de pérdida de vegetación natural es de 1.5 millones de hectáreas; esto indica, que si en los años setentas teníamos 80 millones de hectáreas no perturbadas, en el 2010 sólo tendremos 35 millones de éstas, lo cual significa, que la vegetación natural, será reducida a sólo el 17.5% en tres décadas (Toledo, 1988).

Es importante considerar que ciertas especies sólo se distribuyen en parches de vegetación muy reducidos o en poblaciones locales muy pequeñas.

Por ejemplo el extremadamente raro *Mexipedium xerophyticum*, fue recientemente descubierto en 1990, sólo se encontró una localidad con únicamente siete plantas (Hágsater *et al.*, 2005). Esta especie vive en un hábitat muy especializado de matorral seco con *Agave*, *Beaucarnea*, cactus y otras xerófitas en montículos de caliza de un bosque tropical húmedo.

Este hábitat es muy escaso dentro del bosque tropical, por lo que sí se destruye o altera, el riesgo de extinción de esta orquídea es muy alto.

Las orquídeas son muy sensibles a las perturbaciones de su hábitat, muchas de ellas viven en condiciones de bosque primario (sombreadas y húmedas), y éstas desaparecen al cambiar las condiciones micro ambientales de su entorno.

Sólo algunas orquídeas, pueden sobrevivir en los parches de vegetación que han quedado intactos y aun así la sobrevivencia a largo plazo de las mismas

está en entredicho; debido a varios factores, entre ellos el tamaño del parche (hábitat disponible), el ataque de depredadores o enfermedades y el número mínimo de individuos que necesita tener una población para mantener su banco de genes.

Este último factor está relacionado con el decaimiento genético más frecuente en poblaciones pequeñas y con la frecuencia de éxitos reproductivos, que a su vez están relacionados con las visitas de sus polinizadores. Los éxitos reproductivos, se ven afectados negativamente al reducirse el hábitat lo que repercute en la sobrevivencia de una población o especie en particular .

El segundo factor principal que amenaza la sobrevivencia de las poblaciones de orquídeas es la colecta excesiva e ilegal que sufren algunas especies de orquídeas que tienen flores muy llamativas o que son de interés comercial por producir alimento o especias.

Las orquídeas de todo México, generan gran interés, debido a la belleza de las flores silvestres que primordialmente se usan con fines comerciales y religiosos, como flores de corte y para determinadas festividades locales. Año con año son recolectados miles de ejemplares para su venta, estos al ser arrancados vivos de los árboles, muchos se marchitan y mueren lo cual afecta la sobrevivencia de múltiples especies y géneros de orquídeas (Hartmann, 1992).

En repetidas visitas al mercado negro "mercado de Jamaica"; ciudad de México, se comprobó que son muchos los ejemplos de plantas que han sido sobrecolectadas en México, entre ellas *Laelia speciosa*, *Laelia autumnalis* y *Laelia anceps*.

Laelia speciosa ha sido sobrecolectada por muchos años de su hábitat de origen; en mayor medida en los meses de abril a julio y trasladada al Distrito Federal para su venta en cantidades importantes (miles); el precio por planta es realmente bajo, en 1992 una planta con flor costaba 5 pesos. La colecta era enorme pues se podía fácilmente encontrar al menos un vendedor en casi todos los mercados y no faltaban estas plantas en los puestos de flores.

Para *Laelia autumnalis* y *L. anceps* la situación es muy parecida, se han colectado cantidades importantes (desde cientos hasta miles) de estas plantas para después

venderlas en los mercados de flores al mayoreo; estas orquídeas florecen en noviembre y han sido ideales para la venta de flores en los “Días de muertos” (observación personal directa).

Existen muchas otras orquídeas que han corrido con la misma suerte, entre ellas están *Encyclia citrina*, *Prosthechea vitellina*, *Lycaste skinneri*, *Laelia superbiens* *Oncidium sphacelatum*, entre otras.

En su caso particular, la vainilla esta amenazada por varios factores, uno de ellos es la colecta de plantas realizada por los cultivadores, que la colectan directamente de la naturaleza y al colectar las plantas, ponen en entre dicho la sobrevivencia de sus poblaciones naturales (Soto Arenas, com. pers).

Actualmente se sabe que la vainilla no es una especie propiamente domesticada, que existen pocos individuos (30) genéticos en la naturaleza y que su polinización, fructificación y germinación son eventos raros en la naturaleza. (Soto Arenas, com. pers.) lo cual puede conducir a esta especie a una reducción en la variabilidad genética y con ello al decaimiento genético de la especie.

Por todo esto, la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) clasificó a la *Vanilla planifolia* como una especie endémica de México que está sujeta a protección especial.

En los países tropicales, las orquídeas están reduciendo rápidamente sus poblaciones naturales; debido en gran medida a la destrucción de las áreas naturales en donde viven. Es fundamental tomar medidas para su conservación (*ex-situ*) y la propagación de aquellas especies de orquídeas amenazadas o en peligro de extinción (Sheelavantmath *et al.*, 2000).

Con respecto a la reintroducción de especies de orquídeas, sólo 2 especies de orquídeas (*Epidendrum ilense* y *Bletia urbana*) cultivadas por medio de cultivo de tejidos vegetales, han sido reintroducidas en la naturaleza (Christenson, 1989; Rubluo, Chávez, y Martínez, 1989; Dra. Pilar ortega com. pers.).

2.6 Clasificación taxonómica de *Vanilla planifolia*. Según Portères en 1954.

Familia . - Orchidaceae

Subfamilia . - Orchidoideae

Sección . - Acrotonae

Tribu . - Neottieae (polychondrae)

Subtribu . - Vanillae

Género . - *Vanilla*

Especie . - *V. planifolia* (G. Jackson en Andrews)

2.7 Descripción botánica de *Vanilla planifolia* Andrew, Bot. Repos. 8538.1808 *Vanilla fragans* (Salisb.) Ames, Sched. Orch. 7:36. 1924.

Planta trepadora, ramificada, frondosa. Tallo largo tipo terete, alrededor de 1 cm de diámetro. Hojas subsésiles, oblongo elípticas a angostamente laceoladas, agudas a cortamente acuminadas, suculentas a carnosas, alrededor de 23 cm de largo y 8 cm de ancho; generalmente más pequeñas. Racimos florales axilares con 20 o más flores de más de 8 cm de largo. Brácteas florales ovalado a oblongas, obtusas a subagudas, de 5 a 10 mm de longitud a diferencia de las hojas.

Flores amarillo verdosas con ovarios pedicelados que miden cerca de 2.5 cm de largo. Sépalos y pétalos sublineares a oblongos a oblongo-lanceolados, obtusos a sub-agudos. Sépalos de 4 a 5.5 cm (rara vez de 7 cm) de longitud, con 1 a 1.5 cm de ancho en su parte media. Pétalos algo más cortos y angostos que los sépalos. Labelo unido a la columna casi hasta el ápice para formar un tubo extendido y reflexo en el ápice, al expandirlo mide de 4 a 5 cm de longitud y 1.5 a 3 cm de ancho en su punto más ancho.

Lámina confusamente trilobulada, cuneada a ovalada en el contorno, achatado e irregularmente fringelado en los márgenes revolutos; disco con una retrorsa cresta

de cabellos cerca del centro, con varias líneas de verrugas extendidas desde la cresta hasta el ápice engrosado del labelo. Columna arqueada, barbada en la superficie ventral, aproximadamente de 3 cm de largo. Cápsula angostamente cilíndrica, aromática, de cerca de 25 cm de largo y 8 mm de diámetro.

2.8 Importancia de *Vanilla planifolia* como especia.

Debido a que la vainilla natural (orgánica) es de un sabor y calidad inigualable, en el ámbito internacional existe una gran demanda de vainas producidas de manera tradicional por medio del beneficio. El beneficio de la vainilla, es una técnica artesanal que incluye una serie de procesos de fermentación, secado al sol y sudado de la vaina.

La vainilla se usa en todo el mundo para dar sabor a pasteles, helados y confituras, el sabor único de las vainas naturales, está muy por arriba de los extractos sintéticos y es por esta razón que se mantiene una gran demanda internacional de este producto natural (Romeu, 1995).

La producción de vainilla, genera a los países exportadores, divisas por cerca de los 80 millones de dólares anuales (Hágsater *et al.*, 2005). El kilogramo de vainas de vainilla alcanza un alto precio en dólares; el precio fue de 85 dólares en el año de 1994; debido a que siempre es mayor la demanda; el precio tiende a fluctuar año con año dependiendo de la producción mundial anual (Romeu, 1995).

Los Estados Unidos, son el mayor consumidor de vainilla en todo el mundo. Cada año este país consume más de 2 millones de libras de vainas secas; lo cual equivale a más de la mitad de la producción mundial de vainilla (Sheehan and Farence, 2003).

Lista de precios para vainilla en raja(cápsula) en febrero del 2007.

Cotizado en : <http://www.amadeusvanillabeans.com/>

<i>Vanilla tahitensis</i>	45 .00	dólares la libra
<i>Vanilla planifolia</i>	49.50	dólares la libra
Madagascar vainilla bourbon gourmet	72.25	dólares la libra
Indonesia vainilla gourmet	41.75	dólares la libra
organic vainilla bourbon gourmet	145.35	dólares la libra

Actualmente, la principal producción de vainilla, se hace en las islas del océano Indico; principalmente en Madagascar, las islas Reunión, las islas Comoros y las Seychelles, al igual que en Indonesia. Desgraciadamente la producción de vainilla en México aunque de buena calidad, ha disminuido con los años (Sheehan and Farence, 2003).

2.8.1 Distribución de la vainilla en México.

En todo el mundo existen 110 especies de vainilla descritas por Bouriquet (1954) pero sólo tres de ellas son utilizadas principalmente para la producción de vainas; estas son *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona* y *Vanilla tahitensis*.

Existen otras especies de vainilla en México, en las selvas de Chiapas, encontramos a *Vanilla insignis* creciendo en las sabanas, a *Vanilla hartii* que crece en condiciones de bosque denso y húmedo, mientras que a *Vanilla cribbiana* se le encuentra al borde de los bosques de palmeras. La *Vanilla planifolia*, *V. odorata* y *V. inodora* se les encuentra cerca de ríos y arroyos dentro de la misma región.

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es el fruto de una orquídea trepadora que crece en el bosque tropical húmedo de México. Nativa del sureste mexicano (Oaxaca y Veracruz). También crece de forma silvestre en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Chiapas.

Aunque a *V. planifolia* parece estar ampliamente distribuida en América tropical, es posible que sea sólo nativa de Mesoamérica (Hágsater *et al.*, 2005).

2.9 Situación de *Vanilla planifolia* en México.

La producción de vainilla mexicana fué del orden de las 30 toneladas por año(1995); se calcula que se producían de 200 a 250 Kg de vainas verdes por hectárea (Romeu, 1995).

La historia de la vainilla en México se relaciona originalmente con la cultura totonaca, de la región de Papantla, Veracruz. Los aztecas llamaban "tlilxóchitl" al fruto que en náhuatl significa "tlil" negra y "xochitl" Flor. Era uno de los tributos que exigían los aztecas a pueblos conquistados en los territorios del Este. (Romeu, 1995).

En el siglo XVIII un francés realizó las primeras exportaciones de vainilla desde México al mundo. Hacia finales del siglo XIX las técnicas de cultivo y manejo de este producto habían sido perfeccionadas, al punto que en la exposición de París de 1889, la vainilla producida en Papantla contaba con el reconocimiento de medalla de oro a la calidad (Romeu, 1995).

Desgraciadamente entre la década de 1960 y 1970 decayó la exportación de ésta y llegó a niveles casi nulos y en la década de los 80s con el alza de los precios comenzó el rescate de los cultivos (Romeu, 1995).

Uno de los factores principales que limitan la producción de vainas, es la susceptibilidad de las plantas a las enfermedades fúngicas como la pudrición de las raíces, que es causada por hongos del género *Fusarium oxisporum* y *F. vainillae var. bulbigenum*; también las plantas pueden ser atacadas por virus como el virus del mosaico del *Cymbidium*, el virus de las manchas anulares del *Odontoglossum* o el potyvirus de la vainilla; todos ellos causan patrones cloróticos sobre las hojas y/o deformación de las mismas (Fouché et Jouve, 1999).

Por esto, actualmente se busca producir nuevos híbridos que sean resistentes a plagas y enfermedades (Arditti, 1992).

2.10 Generalidades de cultivo.

Las plantas de vainilla pueden crecer en un invernadero, el interior de una casa o en jardines subtropicales y tropicales. Las viñas al crecer treparán hasta formar una gran enredadera, por lo que requieren de un amplio espacio para su desarrollo futuro. Los factores que se deben considerar para el desarrollo de esta especie son:

Luz . – La vainilla requiere de abundante luz brillante pero indirecta, pues el sol directo podría quemar sus hojas.

Temperatura . – Las plantas de vainilla pueden crecer a una temperatura entre los 20°C y 30°C; las plantas no deben exponerse a temperaturas menores de 10°C, ni mayores de 33°C.

Riego . – Las plantas deben regarse con regularidad, lo suficiente para mantener el suelo húmedo pero no anegado, el exceso de riego puede producir pudrición de la raíz y matar a la planta; de ahí la importancia de un buen drenaje.

Suelo . – El sustrato debe ser orgánico y presentar buen drenaje, algunos sugieren una mezcla de peat-moss (*Sphagnum* sp.), carbón y raíces de helecho arborescente los cuales proveen un drenaje adecuado. La planta puede llegar a ser muy grande por lo que requiere un recipiente acorde a su tamaño.

Fertilización . – Al plantar se agrega al sustrato un poco de abono y/o harina de hueso; la vainilla requiere de una buena provisión de nutrientes, es importante aplicar fertilizante 20:20:20(N: P: K) regularmente.

Hábito de crecimiento. – Las vainillas crecen vigorosamente y requieren de amplio espacio para desarrollarse, las viñas deben sujetarse a algún material de soporte para darles dirección. El soporte ideal debe permitir que las raíces aéreas se adhieran en él; en jardines tropicales las plantas pueden crecer apoyadas en el tronco de un árbol de naranjo (*Citrus sinensis*) o aguacate (*Persea americana*).

Floración. – La vainilla es capaz de florecer una vez que alcanza la talla adulta (4.5 m. aproximadamente), La época de floración de *Vanilla planifolia* se presenta generalmente en primavera, pero en otras especies se presenta durante todo el año (Fouché y Coumans, 1992 ; Fouché et Jouve, 1999).

2. 11 Propagación de *Vanilla planifolia*.

El cultivo en plantaciones comerciales de vainilla, se realiza en múltiples regiones alrededor del mundo. La lista de los países productores de vainilla la encabeza Madagascar, le siguen Indonesia, Islas Comores, Isla Reunión y México (Fouché et Jouve, 1999).

Dentro de México los 3 estados productores de vainilla son Veracruz, Oaxaca y Puebla; siendo Veracruz el estado que produce casi el 95% de la producción nacional de vainilla (Romeu, 1995).

El método tradicional de propagación de *Vanilla planifolia*, consiste en tomar secciones de hasta 1.5 metros de plantas adultas que están bajo cultivo, y que han sido seleccionadas por su vigor u otra cualidad deseable. Las secciones son colocadas a la sombra por 15 días; para permitir que las heridas producidas durante el corte cicatricen del todo y con ello reducir el riesgo de putrefacción debido a algún patógeno bacterial o fúngico.

Posteriormente las secciones son enraizadas en un sustrato orgánico tal como “tierra de hoja” o musgo húmedo de *Sphagnum*, la aplicación de hormonas de enraizamiento no es necesaria. Bajo condiciones de alta humedad atmosférica, las secciones pueden producir raíces dentro de 20 días a un mes. Una vez que las secciones empiezan a mostrar signos de crecimiento, las plantas pueden ser trasplantadas al campo. Sin embargo, este método tiene la gran desventaja de ser muy lento debido a que algunas plantas sólo pueden dividirse cada 2 ó 3 años y el número de nuevas plantas obtenidas es muy limitado.

El lote de producción de nuevas plantas es muy reducido, debido a la longitud de las secciones y a la velocidad de crecimiento de las plantas madres.

Las plantas obtenidas por este método, tardan hasta 4 años para poder florecer en campo. Un vainillero es productivo por 10 a 12 años (Fouché et Jouve, 1999).

2.12 Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación de orquídeas.

La necesidad de propagar plantas selectas de forma masiva, ha conducido al desarrollo de varios métodos de cultivo de tejidos (CTV)(Arditti y Ernst, 1993).

El cultivo de tejidos vegetales es una rama de la biotecnología, que se basa en la totipotencialidad de las células vegetales; utilizando esta capacidad, es posible cultivar asépticamente *in vitro*, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas (Rangel,1995).

Con la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*, es posible dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de un tejido o de un grupo de células en particular (Rangel,1995).

Las técnicas de CTV son una alternativa muy poderosa que permite a especies de lento desarrollo o escasa germinación, generar un gran número de plántulas en un tiempo relativamente corto o al menos, mejora las posibilidades de germinación; en algunos casos se acelera el crecimiento , se favorece la brotación múltiple o la formación de múltiples protocormos, a través del proceso de embriogénesis somática (Tablas B y C).

Además de lo anterior, la conservación *in vitro* de células, tejidos, embriones o plántulas, puede ser una alternativa eficiente para realizar conservación *ex situ* de especies amenazadas (Rangel,1995).

Tabla B.- Orquídeas propagadas por las técnicas de cultivo *in vitro* (Rubluo et al., 1989 ;1993).

Especie y estatus	Hábito	Explante	Medio de cultivo	Respuesta	Referencias
<i>Bletia urbana</i> (A)	Ter.	Semillas y protocormos	KC + BA 3.0 mg/L	Plántulas, Cuerpos protocórmicos y Brotes múltiples.	Chávez, 1980. Martínez, 1985.
<i>Encyclia citrina</i> (Pr)	Epi.	Semillas y protocormos	KC + Vitaminas B5	Plántulas	
<i>Laelia anceps</i> (P)	Epi.	Semillas y protocormos	KC + Vitaminas B5	Plántulas	Martínez, 1991.
<i>Lemboglossum ehrenbergii</i> (A)	Epi.	Semillas y protocormos	KC + Vitaminas B5	Plántulas, Cuerpos protocórmicos	
<i>Lycaste aromática</i>	Epi.	Semillas y protocormos	KC + Vitaminas B5	Plántulas, Cuerpos protocórmicos	Martínez, 1991.
<i>Lycaste skinneri</i> var. <i>Alba</i> (P)	Epi.	Semillas y protocormos	KC + Vitaminas B5	Plántulas, Cuerpos protocórmicos	Martínez, 1991.
<i>Lycaste skinneri</i> var. <i>skinneri</i> (P)	Epi.	Semillas y protocormos	KC + Vitaminas B5	Plántulas, Cuerpos protocórmicos	Martínez, 1991.
<i>Oncidium stramineum</i> (A)	Epi.	protocormos	KC + Vitaminas B5	Plántulas, Cuerpos protocórmicos	Martínez, 1991.
<i>Rhyncholaelia glauca</i>	Epi.	Semillas y protocormos	KC + Vitaminas B5	Plántulas	Martínez, 1991.
<i>Vanilla planifolia</i> (Pr)	Ter.	nudos	MS +BAP 0.5 mg/l	nudos	(Kononowicz and Janick, 1984; Philip and Nainar, 1985; Gu, Arditti and Nyman, 1987; Davidonis and Knor, 1991; George and Ravishankar, 1997)

Notas: B5 = medio Gamborg, KC = medio Knudson (1946), BA = 6-bencil amino purina , Epi. = epifita, Ter. = terrestre. A = amenazada, P = protegida, Pr = protección especial

Tabla C.- Trabajos de cultivo *in vitro*, realizados en *Vanilla planifolia* .

Explante	Desinfectante	Medio Nutritivo	Respuesta	Referencias
Puntas de raíces	HgCl ₂ al 0.5% por 10 min.	MS+ IAA(0-10)mg/l + KN 0.2mg/l	Transformación raíz a brote.	Philip and Nainar, 1988;
Nudos y puntas de raíz	HgCl ₂ al 0.5% por 10 min.	MS, SH, KC+ 2,4-D, IAA, IBA, ANA(0-10)mg/l +KN (0-10)mg/l	Protocormos y plántulas	Philip and Nainar, 1985;
Meristemos, hojas jóvenes, tallos y raíces	Hipoclorito de sodio al 50% por 20 min.	LS + KN, BA (0.1,0.5,1)mg/l + ANA, IAA, 2,4-D(0.2 mg/l)	Callo, plántulas	Gu, Arditti and Nyman, 1987;
Nudos	Hipoclorito de sodio al 0.5% por 20 min.	MS + BA(0.5, 1,5)mg/l	Brotación múltiple, plántulas	(Kononowicz and Janick,1984;;
Secciones de brotes	H ₂ O ₂ por 30 min. y Hipoclorito de sodio 20% por 30 min.	MS + BA(0.4, 1)mg/l + ANA (2mg/l)	Callo, protocormos	Davidonis and Knor, 1991
nudos	HgCl ₂ al 0.15% por 5 min.	KC, MS + BA, IAA, IBA (1,2,5,10 1mg/l) +ANA(1mg/l)	Brotación múltiple, plántulas	George and Ravishankar, 1997)

Notas: MS = Murashige and Skoog(1962), KC = Knudson C (1946), SH = Schenk and Hildebrandt (1972) LS= Linsmaier and Skoog(1965).

2.12.1 La desinfección.

Las condiciones ambientales y la composición del medio de cultivo, son muy propicios para la proliferación de hongos y bacterias; los cuales pueden destruir rápidamente y en su totalidad los cultivos de tejidos vegetales, de ahí surge la importancia de evitar la contaminación con microorganismos en el establecimiento de un cultivo *in vitro*.

El proceso de desinfección superficial de los explantes, debe permitir eliminar los organismos patógenos con el menor daño posible hacia los explantes; el protocolo a seguir en este proceso, varía mucho dependiendo de la especie de planta a tratar, de la edad del explante y de la concentración del desinfectante.

Existe una amplia gama de compuestos químicos que pueden utilizarse para desinfectar explantes, pero en general está más difundido el uso de etanol al 70% (v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3%, contenido en el cloro comercial. También se utiliza el cloruro de mercurio (HgCl₂) del 0.1% al 1.5%, pero este último es altamente tóxico (Roca y Mroginski, 1991).

Los agentes tenso-activos como el Tween-20 u 80, se agregan en la solución desinfectante, éstos disminuyen la tensión superficial, lo cual facilita la penetración del desinfectante sobre los tejidos (Roca y Mroginski, 1991; Pierik, 1990)

Existen actualmente varias soluciones desinfectantes; tales como el Microdine™ que es un desinfectante para alimentos de uso doméstico (0.08% nitrato de plata coloidal), el Isodine™ que es un antiséptico de uso médico (8g/100ml de iodopovidona) y el agua oxigenada (peróxido de hidrógeno); aun que sólo esta última ha sido probada como auxiliar en la desinfección de nudos de *V. planifolia* por Davidonis and Knorr, 1991.

2.13 Cultivo de nudos.

Se denomina cultivo de nudos, al aislamiento de una yema, generalmente junto con una porción de tallo, que es cultivada *in vitro* para obtener su desarrollo y con ello, la regeneración de plántulas a partir de esa yema. El proceso (micropropagación) se repite, cada plántula obtenida es nuevamente dividida en secciones de nudo, hasta obtener el número de plantas deseadas, posteriormente éstas son enraizadas y transferidas a suelo (*ex vitro*).

La técnica del cultivo de nudos, se ha aplicado con éxito para muchas plantas diferentes tales como: la patata, el peral, la mandioca, la rosa, la hiedra y el sauce, entre muchas otras. Esta técnica es útil en particular para clonar plantas con entrenudos largos, tales como el pepino, el tomate, la berenjena, todas ellas son eficazmente propagadas mediante el cultivo de nudos (Pierik ,1990).

2.13.1 Ventajas del cultivo de nudos.

- 1.- Es una técnica relativamente sencilla.
- 2.- Dependiendo de la cantidad de yemas que se disponga, la velocidad de multiplicación es relativamente alta (exponencial).
- 3.- Regenerar plantas a partir de nudos, mantiene cierta estabilidad genética, salvo algunas excepciones.
- 4.- El crecimiento de las plántulas es bueno, quizás debido al rejuvenecimiento del material, o a la falta de organismos patógenos que afecten el desarrollo.
- 5.- Se puede obtener plántulas a partir de primordios de yemas florales, de yemas basales u otras yemas latentes.

Existen algunas cuestiones a considerar antes de aplicar la técnica del cultivo de nudos, no es práctica para propagar plantas en roseta, debido a los problemas de esterilización del material que este tipo de plantas presenta. Algunas yemas presentan latencia, en especial las de plantas leñosas. Se recomienda utilizar material juvenil para mejorar la velocidad de respuesta. La velocidad de

propagación de esta técnica, depende del número de yemas disponibles; con pocas yemas, la velocidad de multiplicación es lenta y con muchas yemas la velocidad de multiplicación es rápida, esto debido a que la tasa de crecimiento ocurre de manera exponencial.

El cultivo de nudos en orquídeas, se aplica principalmente en plantas que presenten yemas latentes (nudos), en las inflorescencias o en tallos alargados.

Orquídeas tales como *Vanda*, *Phaius*, *Vanilla*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Oncidium*, *Epidendrum*, etc., son susceptibles a ser utilizadas como fuentes de explantes para la regeneración de nuevas plántulas (Pierik, 1990).

Con la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*, podemos aislar un grupo de nudos, desinfectarlos y cultivarlos con el fin de regenerar numerosas plántulas.

El cultivo de nudos de *V. planifolia*, ha sido ensayado por varios autores (Kononowicz and Janick, 1984; Philip and Nainar, 1985; George and Ravishankar, 1997). Cada equipo de investigación ha propuesto su propia metodología de desinfección, tipo de medio de cultivo y de tratamientos hormonales. También se han propuesto varios procesos de desinfección para nudos de *V. planifolia*, algunos investigadores sugieren utilizar blanqueador doméstico (solución de hipoclorito de sodio) al 30%v/v (Kononowicz and Janick, 1984); otros usaron hasta el 50% para realizar la desinfección (Gu, Arditti and Nyman, 1987). Hay algunos reportes que incluso proponen pre-tratamientos con agua oxigenada al 30% (Davidonis and Knorr, 1991).

En cada experimento reportado en la literatura, los resultados presentan diversos grados de éxito; (Kononowicz and Janick, 1984; Philip and Nainar, 1985; George and Ravishankar, 1997) sin embargo, no se puede afirmar que exista de manera comprobada un protocolo optimizado para el aislamiento, cultivo y propagación de *V. planifolia* a partir de nudos.

2.14 Aclimatización.

La aclimatización es una etapa crítica dentro del proceso de micropropagación de plantas, y es de manera general la etapa donde se generan mayores dificultades debido al elevado porcentaje de pérdidas de plantas por diversas causas (Kozai, 1991; Van Huylbroeck and De Riek, 1995; Van Huylbroeck and Debergh, 1996; Van Huylbroeck *et al.*, 1998).

La aclimatización de una plántula cultivada *in vitro*, es un proceso no del todo estudiado, siendo que es una etapa crucial en la micropropagación de plantas.

Muchas plantas cultivadas *in vitro*, requieren de un proceso de aclimatización, encaminado a asegurar el mayor porcentaje de sobrevivencia de las mismas cuando éstas son transferidas a suelo (Hazarica, 2003).

Dicho proceso requiere de cambios graduales en las condiciones ambientales para evitar la pérdida de plantas por marchitez o fotoinhibición (Pospisilova *et al.*, 1999; Pierik ,1990).

Es esencial que la planta en proceso de aclimatización, pierda la menor cantidad de agua posible, mientras se adapta a las condiciones *ex vitro* (Pierik ,1990).

Aunque varios investigadores han estudiado las técnicas de micropropagación *in vitro* para *Vanilla planifolia* (Kononowicz and Janick , 1984; Philip and Nainar, 1985; George and Ravishankar, 1997), poco se ha escrito al respecto de su aclimatización *ex vitro*; El proceso ha sido explorado y descrito por Kononowicz and Janick en 1984; en sus ensayos se modificó la composición del sustrato para mejorar el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas *ex vitro*; al final de sus ensayos, el mayor porcentaje de sobrevivencia obtenido fue de 96%.

Hay varios aspectos anatómicos y fisiológicos en los cuales una planta cultivada *in vitro*, difiere de una planta que ha crecido bajo condiciones naturales:

- 1.- la cutícula de una planta *in vitro*, es generalmente muy delgada, por estar acostumbrada a una elevada humedad relativa (90-100%), a la vez que sus estomas son poco funcionales y tienden a mantenerse abiertos, lo cual puede

causar una severa deshidratación cuando estas plantas son transferidas a condiciones *ex vitro*.

2.- Las hojas producidas por las plantas *in vitro*, son más pequeñas, delgadas y fotosintéticamente poco activas, debido en gran parte a la gran disponibilidad de azúcares presentes en los medios nutritivos. Su comportamiento *in vitro* es casi totalmente heterótrofo; de ahí surge la necesidad de tratarlas para que estas plantas comiencen a producir sus propios azúcares de manera natural.

3.- La planta crecida *in vitro*, puede poseer una conexión vascular escasamente desarrollada, lo cual dificulta la conducción del agua a través de todo el cuerpo de la planta y con ello provocar estrés hídrico en la misma (Pierik ,1990).

3 .- Justificación.

La *Vanilla planifolia*, es una planta de larga tradición histórica, desde tiempos antiguos fue muy apreciada y se cree era cultivada desde antes de la conquista. Actualmente la vainilla orgánica es un producto altamente apreciado que se cotiza en más de cien dólares el kilogramo.

Las poblaciones naturales de *V. planifolia*, están compuestas por solo 30 individuos genéticos; si a esto agregamos que en la naturaleza, solo una flor entre varios cientos, es polinizada por una abeja euglossina, por lo tanto, la producción de frutos es muy baja y el reclutamiento de nuevos individuos a partir de semillas, es muy escaso.

Además de eso, todos los cultivos de vainilla establecidos en los trópicos del viejo mundo, provienen de una sola planta, que ha sido clonada miles de veces. Todos estos factores colocan a *Vanilla planifolia* como una especie en serio riesgo de extinción en su hábitat natural.

En su historia evolutiva, la vainilla ha interactuado con hongos micorrízicos para su germinación, árboles que son su forófito, insectos para su polinización(abejas euglossinas) y mamíferos(murciélagos) para la dispersión de sus semillas; por todo esto forma parte importante de la red ecológica y debe ser preservada para las futuras generaciones (Hágsater *et al.*, 2005).

Debido a que la propagación de *Vanilla planifolia* a partir de semillas presenta varios problemas, entre ellos una germinación muy lenta, más aún, esta ocurre de manera escasa con un muy bajo porcentaje de germinación (menos del 1%). Se optó por explorar la propagación a través del cultivo de nudos, que es una técnica ya probada con diversos porcentajes de éxito (Kononowicz and Janick, 1984; Philip and Nainar, 1985; Gu, Arditti and Nyman, 1987; Davidonis and Knor, 1991; George and Ravishankar, 1997).

El cultivo *in vitro* de nudos, es una técnica que nos permite acelerar la proliferación de plántulas de vainilla de manera exponencial, y con ello contribuir a la creación de bancos de germoplasma para intercambio o futuras investigaciones.

4 .- OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Establecer condiciones *in vitro* para la regeneración de plantas completas de *V. planifolia*.

Objetivos particulares

- Establecer cultivos asépticos de nudos de *V. planifolia*.
- Lograr el desarrollo de brotes a partir del cultivo *in vitro* de nudos de *V. planifolia*.
- Comparar el presente estudio con los protocolos de propagación para la especie.
- Obtener un protocolo de aclimatización para establecer en condiciones de invernadero, las plántulas regeneradas *in vitro*.

5. - MATERIALES Y METODOS.

a) Medio de cultivo.

Para preparar el medio de cultivo Murashige and Skoog (MS, 1962), (Apéndice 1) previamente se prepararon soluciones concentradas (soluciones stock) de las sales minerales y de las vitaminas, que se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

Se eligió usar el medio MS con algunas modificaciones que pudieran mejorar el desarrollo de los explantes de vainilla.

El medio MS usado en esta investigación (MST), fue modificado como se muestra en el Apéndice 2. Las sales químicas del medio MS al 50% adicionado con la solución de vitaminas BPTA, constituida por Biotina 1mg/l, Piridoxina 1mg/l, Tiamina 1mg/l y Ácido Nicotínico 1mg/l (Apéndice 2), 1.0 g/l de carbón activado, sacarosa 30g/l (3%) viene incluida en la formula original del MS; se agregaron 4.0g (0.40%)de gelrite y se ajustó el pH a 5.3

En un vaso de precipitados de un litro, se disolvieron cada una de las soluciones stock que componen a un medio (MS). Se agregó un poco de agua destilada para facilitar la dilución de los componentes y se agregaron los elementos sólidos (sacarosa, carbón activado) con excepción del gelrite que siempre se agrega hasta el final del proceso, posterior al ajuste del pH.

Una vez mezclados todos estos elementos, se procedió a aforar la solución hasta alcanzar el volumen de un litro. Después de eso se ajustó el pH hasta 5.3 con ayuda de un potenciómetro. Para alcanzar el valor del pH adecuado, se utilizaron soluciones de NaOH y HCl a distintas concentraciones (1 N, 0.5 N y 0.1N).

Como paso final, se adicionó gelrite(4.0 g/l).

El medio fue entonces agitado y calentado para facilitar la disolución e integración del gelificante, una vez disuelto se procedió a vaciar el medio en frascos tipo gerber(marca comercial). En cada frasco se agregaron 30 ml del medio, los cuales se midieron con ayuda de una probeta graduada.

Una vez terminado el proceso de vaciado, se procedió a esterilizar el medio en un autoclave vertical a 1.5 Kg/cm², (20 Lb/in²), 120 C° durante 15 minutos. Las cajas de petri y el agua destilada que se utilizaron para sembrar, también fueron esterilizadas en autoclave.

b) Material biológico.

Se utilizaron 5 secciones terminales de tallos de una planta adulta, de más 9 años de *Vanilla planifolia* cultivada en el invernadero del area de Colección de orquídeas del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM. El material fue donado por la M. en C. Ma. de los Ángeles Aída Téllez V., encargada de dicha colección.

5.1 Proceso de desinfección de explantes

A partir de las 5 secciones terminales (120cm aprox. cada una) de tallos de una planta adulta de *V. planifolia*, se seleccionaron 44 nudos como explantes para establecer los cultivos asépticos (Diagrama General 1).

A los tallos se les removieron todas las hojas, después fueron disectados en secciones de 5 a 8 cm; posteriormente, fueron lavadas con agua corriente y detergente para eliminar posibles restos de tierra.

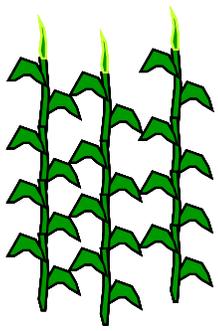
Para la desinfección, se utilizaron soluciones de hipoclorito de sodio 30, 40 y 50% (v/v), preparada a partir de cloro comercial "cloralex"; la solución junto con los explantes, se mantuvo en agitación constante por varios minutos como se especifica en la Tabla 1.

En los casos específicamente indicados, se aplicaron los pre-tratamientos de la Tabla 1 previamente a aplicar la desinfección.

Dentro de la campana de flujo laminar, las secciones fueron enjuagadas con 3 cambios de agua destilada esterilizada (Diagrama 2), antes de ser disectadas para su siembra en el medio de cultivo.

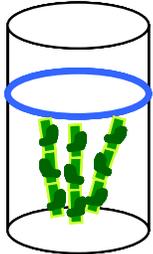
Diagrama 1.- Proceso general

Diseño y elaboración:
Rojas Briseño J. Fernando
Oct. 2005

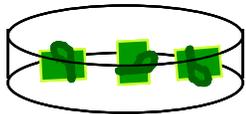
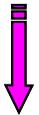


Plantas adultas.

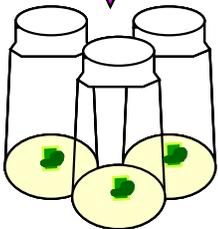
↓ Poda de hojas, lavado y aplicación de pre-tratamientos a nudos



Tratamientos de desinfección con hidróxido de sodio.



Disección, aislamiento de los nudos y siembra en medio MST sin hormonas

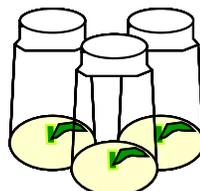


Siembra *in vitro* de nudos en medio MST. 1.8 cm de diámetro por 2 cm de altura.

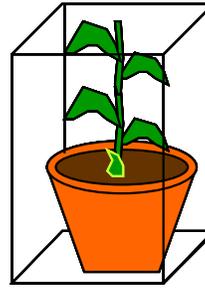


Plántula de 2 meses.

Dissección de los nudos y sub-cultivo en distintos tratamientos hormonales



Siembra *in vitro* de nudos en medios con hormonas(BAP y ANA).

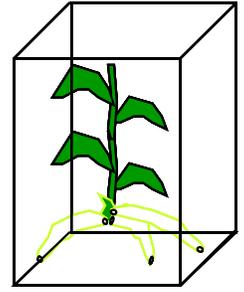


Siembra de la plántula en peat_moss.

↓ Plántulas cultivadas en invernadero.



Plántulas de 1 mes de aclimatizadas, una yema axilar se desarrolla para tomar la función del ápice.



Plántula en cámara de Aclimatización (cámara húmeda semi-abierta) por 7 días.

↑ Lavado para retirar el agar de las raíces.

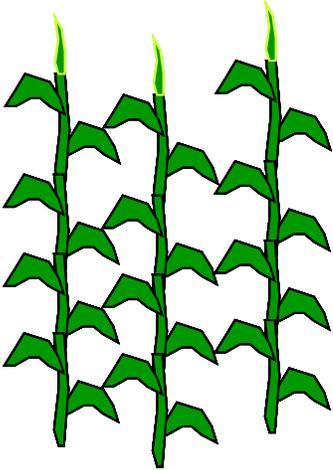


Plántula de 2 meses, lista para el proceso de aclimatización

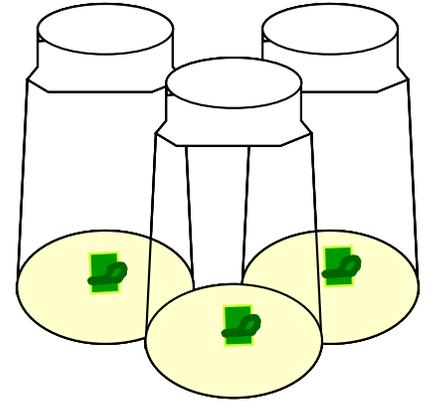


Regeneración de plántulas (2 meses), algunas presentan brotación múltiple.

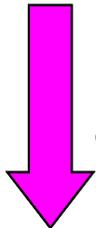
Diagrama 2.-Aislamiento de nudos de *V. planifolia*.



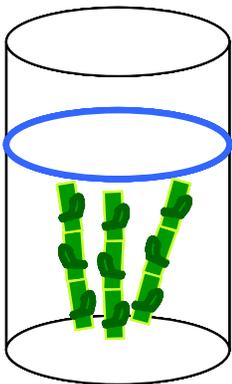
Plantas adultas.



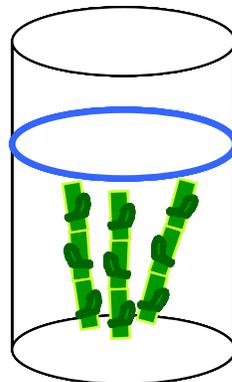
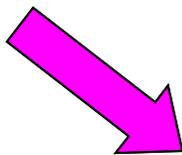
Siembra *in vitro* de nudos
(1.8 cm de diámetro por
2 cm de altura) en medio MST.



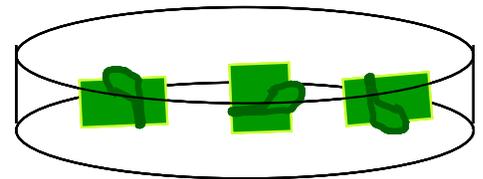
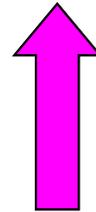
Poda de hojas, lavado y aplicación
de pre-tratamientos a nudos



Tratamientos de desinfección
con hidróxido de sodio(30, 40,
50)%v/v



Enjuagues (3) con agua
destilada esterilizada



Disección, aislamiento de los nudos.

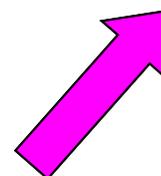


Tabla 1 .- Tratamientos de desinfección.

Pre-tratamientos	Hipoclorito de sodio (v/v)	Tiempo de desinfección	Explantes tratados .
(Testigo) Sin pre-tratamiento	30%	30 min.	16
Isodine al 1% por 24 h.	30%	30 min.	6
Isodine al 1% por 24 h.	30%	40 min.	6
Nitrato de plata (Microdine) al 0.5% por 5 h.	40%	30 min.	8
Nitrato de plata (Microdine) al 0.5% por 5 h.	50%	30 min.	8

Nota: El Isodine™ contiene 8g/100ml de iodopovidona, equivalente a 0.8g de yodo, el Microdine™ (0.08% nitrato de plata coloidal) ; explantes totales 44.

5.2 Siembra de nudos.

Los nudos previamente desinfectados, fueron disectados, eliminando la mayor cantidad de tallo posible sin dañar los meristemos. Cada explante (nudo) tenía 5 mm de tallo en cada uno de sus extremos.

Después fueron sembrados en el medio MST sin hormonas, cuya formulación esta descrita en el Apéndice 2

Sólo se sembró un nudo por frasco, para aislar lo más posible a los explantes contaminados de los no contaminados.

Todas las siembras fueron realizadas bajo condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar horizontal; la cual se encendía previamente 20 minutos para después desinfectar toda la superficie de trabajo, el material e instrumental

con etanol industrial 96°. Todo fué limpiado con etanol antes de introducirlo a la campana; así como las manos y antebrazos antes de realizar las siembras. Los cultivos se revisaron cada 2 días para descartar los explantes contaminados por micro-organismos, después sólo cada 15 días para registrar los progresos del explante.

5.3 Inducción morfogénica en nudos de *Vanilla planifolia*.

Después de 3 meses de iniciados los cultivos asépticos, se tomaron brotes obtenidos de la regeneración *in vitro* de los explantes iniciales.

Se realizó un barrido hormonal con los siguientes reguladores de crecimiento; 6-Bencil Amino Purina (BAP) y Acido Naftalén Acético(ANA) como se especifica en la Tabla 2. Se incluyeron algunas combinaciones propuestas por otros investigadores como George and Ravishankar (1997) y también por Kononowicz and Janick (1984).

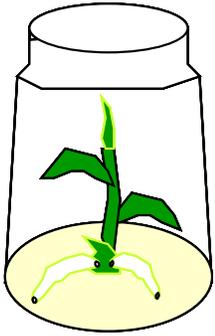
Debido a lo escaso del material, se sembraron únicamente un explante por frasco, con 3 repeticiones por tratamiento(Diagrama 3).

Tabla 2. - Barrido hormonal para la inducción morfogénica en nudos de *Vanilla planifolia*

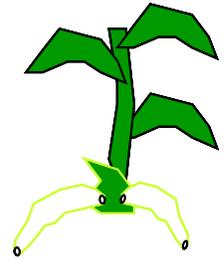
BAP	BAP(0)	BAP(0.5)	BAP(1.0)	BAP(2.0)
ANA (mg/l)				
ANA (0)	0	1Ω	2Ω	3
ANA (0.5)	4	5*	6	7

Nota: Combinaciones exploradas por George and Ravishankar (*)en 1997, Kononowicz and Janick (Ω) en 1984.

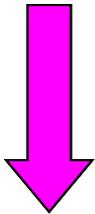
Diagrama 3.-Tratamientos hormonales en nudos de *V. planifolia*.



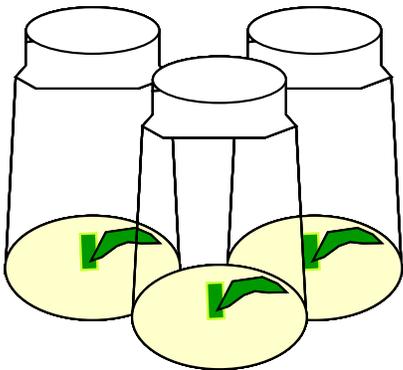
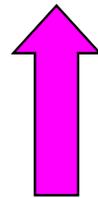
Plántula de 2 meses.



Plántula de 2 meses,
lista para el proceso
de aclimatización



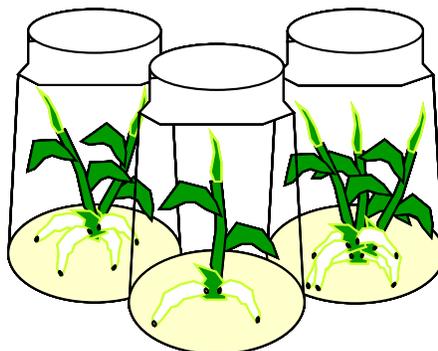
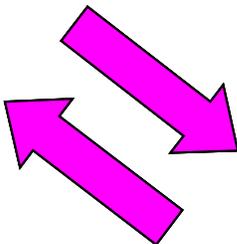
Diseción de los nudos y sub-cultivo
en distintos tratamientos hormonales



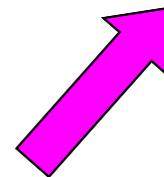
Siembra *in vitro* de nudos en medios
con hormonas (BAP y ANA).



Subcultivo *in vitro* e
Individualización de
plantulas.



Regeneración de plántulas (2 meses),
algunas presentaron brotación múltiple.



5.4 Proceso de aclimatización.

Seis meses después del periodo de (inducción) experimentación del barrido hormonal, todas las plántulas fueron sub-cultivadas en medio MST; se mantuvieron creciendo en el medio hasta que formaron 3 nudos y un ápice. Cuando éstas presentaron una altura aproximada de 10 cm y al menos 3 ó 4 raíces, se procedió a realizar el proceso de aclimatización.

Dicho proceso inició, al extraer las plántulas del frasco; se lavaron sus raíces para retirar de todo resto del medio de cultivo.

Las plántulas fueron separadas en 2 lotes, el primer lote (n=5) no recibió pre-tratamiento, fueron plantadas directamente en macetas con peat-moss (musgo canadiense), y se les colocó bajo condiciones de alta humedad atmosférica en una caja de plástico.

Al segundo lote (n=8) se le aplicó el siguiente pre-tratamiento antes de ser plantado. Con la finalidad de que las plántulas de este segundo lote perdieran humedad lenta y gradualmente; se les resguardó durante una semana (sin ser plantadas), dentro de una caja plástica tapada con aberturas que permitían cierta ventilación.

El objetivo de hacer esto, fue que las plántulas perdieran humedad lenta y gradualmente mientras se adaptaban a las nuevas condiciones atmosféricas.

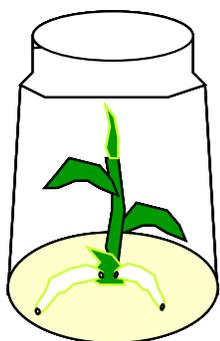
Una vez terminado el pre-tratamiento, se procedió a transferir las plántulas a suelo en macetas con peat-moss (musgo canadiense), cuidando de cubrir principalmente las raíces más desarrolladas (Diagrama 4).

Todas las plántulas al inicio del proceso de aclimatización, fueron medidas en su diámetro para obtener datos respecto a la relación diámetro/ sobrevivencia y/o crecimiento.

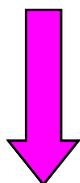
Las plántulas en maceta, fueron guardadas en cajas de plástico transparentes, para evitar la deshidratación excesiva y para conservar una humedad relativa alta. Se aplicaron riegos sólo cuando el sustrato comenzaba a secarse.

Al termino de 45 días, las plántulas mostraron señales de nuevo crecimiento, por lo cual fueron transferidas a un invernadero de cristal en el Jardín Botánico IB-UNAM.

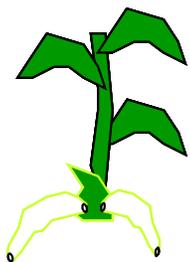
Diagrama 4.-Proceso de aclimatización para *V. planifolia*.



Plántula de 2 meses,
con 3 hojas y 4 raíces.



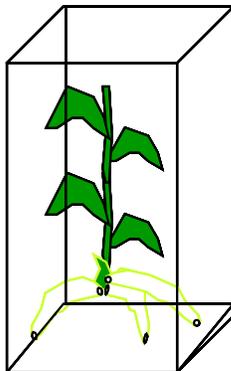
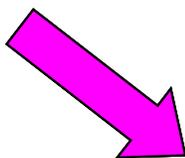
Disección y subcultivo del ápice
bajo condiciones *in vitro*.



Plántula de 2 meses,
sin ápice (*ex vitro*).



Lavado para retirar el
agar de las raíces.

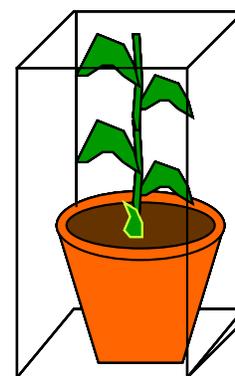


Plántula en cámara de aclimatización
(cámara húmeda semi-abierta) por 7 días.



Plántulas de 1 mes de aclimatizadas,
una yema axilar se desarrolla para
tomar la función del ápice.

Plántulas cultivadas
en invernadero.



Siembra de la plántula
en peat_moss.

6. - RESULTADOS.

6.1 Proceso de desinfección de explantes.

Los explantes (nudos) cultivados *in vitro* como testigos, mostraron señales de contaminación por hongos y/o bacterias en su primera semana; dichas señales, fueron más evidentes a los 15 días (Tabla 3). Todos los explantes testigos, presentaron contaminación de tipo bacteriana o fúngica; sin embargo, un único explante en particular, que estaba contaminado con una bacteria de color rosado logró continuar su desarrollo aparentemente sin problemas.

De los 16 explantes (testigos) sembrados, sólo uno de ellos (Fig. 1), sobrevivió y formó una plántula después de 2 meses en cultivo. El resto de los explantes de este mismo tratamiento, fueron destruidos por bacterias endógenas de color blanco mate, y en algunos casos por hongos que emergieron de los explantes. Los explantes presentaron oxidación y murieron.

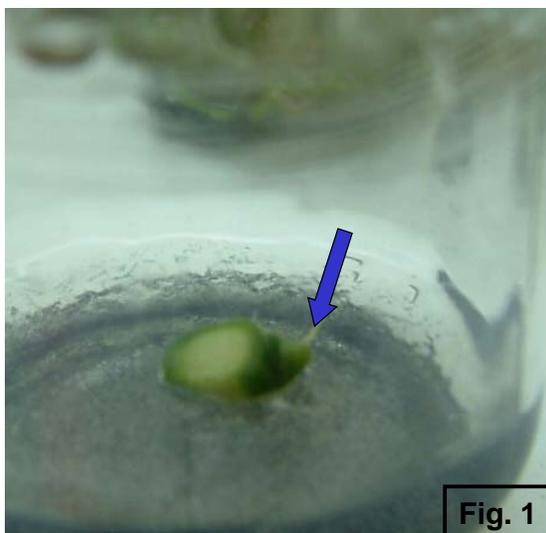


Fig.1. Nudo libre de bacterias u hongos a los 15 días de iniciados los cultivos, proveniente de nudos pre-tratados con Isodine. Notese yema latente

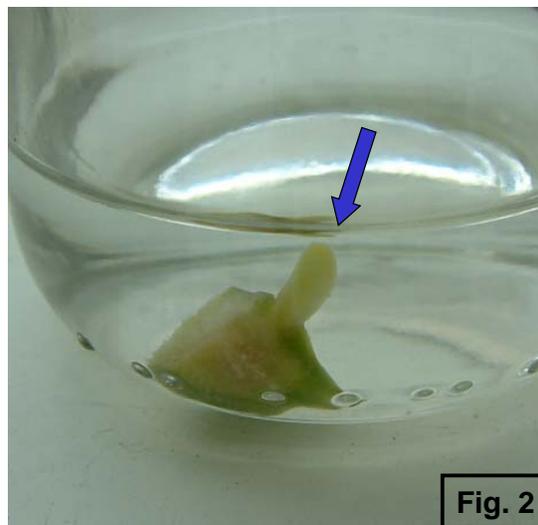


Fig. 2. Nudo a los 15 días de iniciados los cultivos, mostrando una raíz que se ha formado

El único brote sobreviviente, aunque estaba contaminado con una colonia de bacterias de color rosado, continuó su desarrollo hasta formar una plántula completa, de la que después se obtuvieron nuevos explantes.

Posteriormente, se trató de eliminar la contaminación con gentamicina (8mg/2ml) inyectable, aplicándola directamente en los explantes a manera de enjuague, antes de sembrarlos en nuevo medio de cultivo; pero aun así, no se logró eliminar la contaminación bacteriana en cuestión. Pues re-apareció a los 3 días de efectuado el sub-cultivo.

Los dos lotes experimentales pre-tratados con isodine, mostraron respuestas de desinfección muy distintas (Tabla 3). Entre ambos tratamientos, la única diferencia fué el tiempo de aplicación del desinfectante. Sin embargo, el pre-tratamiento que dio mejor resultado fué aquel cuya desinfección duró 40 minutos, la asepsia de explantes fue del 100% a los 15 días.

La contaminación que se presentó en el tratamiento cuya desinfección fue de 30 minutos, estaba formada por colonias de bacterias de color beige, éstas crecieron en todo el medio de cultivo, a la vez que los explantes se oxidaron.

Los dos lotes experimentales pre-tratados con nitrato de plata, mostraron altos índices de contaminación de hasta 25% en la primera semana. Estos explantes estaban contaminados principalmente por colonias bacterianas de color blanco (Tabla 3).

A los 15 días, los niveles de contaminación alcanzaron el 75% en los dos lotes, las bacterias degradaron y oxidaron los explantes contaminados.

Los explantes sobrevivientes (25%), presentaron desarrollo de colonias bacterianas blancas, no murieron pero su desarrollo se detuvo casi totalmente; sólo generaron una o dos raíces cortas (2cm), su desarrollo fue mucho menor que el de los demás tratamientos

Tabla 3.- Resultados de las técnicas de desinfección a los 15 días de la siembra *in vitro*.

Pre-tratamientos	Hipoclorito de sodio (clorox) (v/v)	Tiempo de desinfección	Explantos tratados (n=44).	Explantos sobrevivientes (%)
(Testigo) Sin pre-tratamiento	30%	30 min	16	1(6.25%)
Isodine al 1% por 24 h	30%	30 min	6	4(66.6%)
Isodine al 1% por 24 h	30%	40min	6	6(100%)
Nitrato de plata (microdine)al 0.5% por 5 h	40%	30min	8	2(25%)
Nitrato de plata (microdine)al 0.5% por 5 h	50%	30min	8	2(25%)

Debido a la presencia de contaminación en la mayoría de los explantes testigos, se realizó un ensayo preliminar con Gentamicina (8mg/2ml, solución inyectable, Garamicina, Scherin-Plough) para eliminar las bacterias contaminantes, sin embargo no se logró eliminar la contaminación por bacterias que formaron colonias de color rosa.

Por otra parte, algunos explantes experimentales, después de 20 días, presentaron una colonia bacteriana de color blanco translúcido cuyo origen fue posiblemente endógeno; a estas bacterias se les aplicó Brupen, (Ampicilina 500mg en cápsulas) en una dosis de 50 mg por frasco (aprox.) se les subcultivó en medio líquido para mejorar la acción del antibiótico, manteniendo bañados a los explantes por la solución del antibiótico durante 30 días.

En los explantes testigo que presentaron colonias de bacterias rosa, no se logró eliminar la contaminación al aplicar Gentamicina. Pero en los explantes experimentales (desinfección) que presentaban colonias blancas de bacterias, se logró eliminar la contaminación al aplicar Ampicilina.

6.2 Desarrollo de los nudos .

En el medio basal (MST), la vainilla resultó una planta de crecimiento lento; como se observa en la Gráfica 1; los explantes (testigo) respondieron lentamente, a partir de la segunda semana de iniciados los cultivos, dos explantes comenzaron a mostrar (hinchazón) crecimientos de la yema axilar otras dos empezaron su desarrollo generando una raíz (Fig. 2).

El resto de los explantes, inició su desarrollo hasta después de 4 semanas de iniciados los cultivos.

En los explantes cuyo meristemo se desarrolló, este se convirtió en brote hasta regenerar una plántula completa a los 2 meses de iniciados los cultivos (Figs. 1-5)

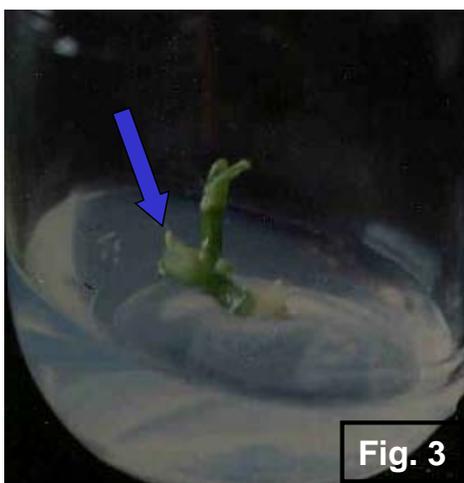


Fig. 3. Brote obtenido por brotación múltiple BAP 0.5mg/l a los 30 días, mostrando hojas escamosas.



Fig. 4. Crecimiento de un brote en presencia de BAP 2mg/l / ANA 0.5mg/l a los 30 días de iniciados los cultivos en medio MST.



Fig. 5. Plántulas de 2 meses (BAP 1mg/l / ANA 0.5mg/l) lista para ser subcultivada o aclimatizada, con 8cm de altura, presenta de 3-5 nudos y al menos 3 raíces desarrolladas.



Fig. 6

Fig. 6 Brotación múltiple en la base de una plántula de *V. planifolia*, con 2mg/l BAP a los 30 días . Notense los Brotes basales.



Fig. 7

Fig. 7. Raíces de una plántula de *V. planifolia* BAP0.5mg/l / ANA 0.5mg/l. A los 6 meses de iniciados los cultivos.

Los explantes fueron revisados semanalmente, sin embargo las respuestas más desarrollaron, se registró el número de nuevos brotes por explante, así como el número de nuevas raíces **Gráfica 1 y 2, Tabla 4.**

En los explantes testigo el número de brotes desarrollados desde el inicio hasta los 60 días, fue de sólo uno por explante **Gráfica 1 y 2, Tabla 4.**

Aunque en un principio los explantes carecían de raíces evidentes, fueron precisamente las raíces, la primera respuesta morfogénica en aparecer en la base de los nudos testigo (a los 15 días). A los 45 días, cada explante tenía 1 ó 2 raíces formadas, y para los 60 días de iniciado el cultivo, las raíces ya medían más de 10cm aproximadamente. (Figs. 6-8).



Fig. 8 Plántulas *in vitro*, regeneradas a partir de nudos, mostrando brotación múltiple de nudos que fueron tratados con reguladores de crecimiento (BAP/ ANA) 2,0; 1,0 y 2,0.5 mg/l con más de 2 meses.

Las plántulas generadas a partir de este cultivo, fueron seccionadas y los 3 ó 4 explantes obtenidos por planta, fueron utilizados para investigar las respuestas morfogénéticas. Para ello, se aplicaron las concentraciones de BAP y ANA (Tabla 4). Con el fin de observar el desarrollo de brotes a partir de nudos

6.3 Inducción morfogénética en nudos de *Vanilla planifolia*.

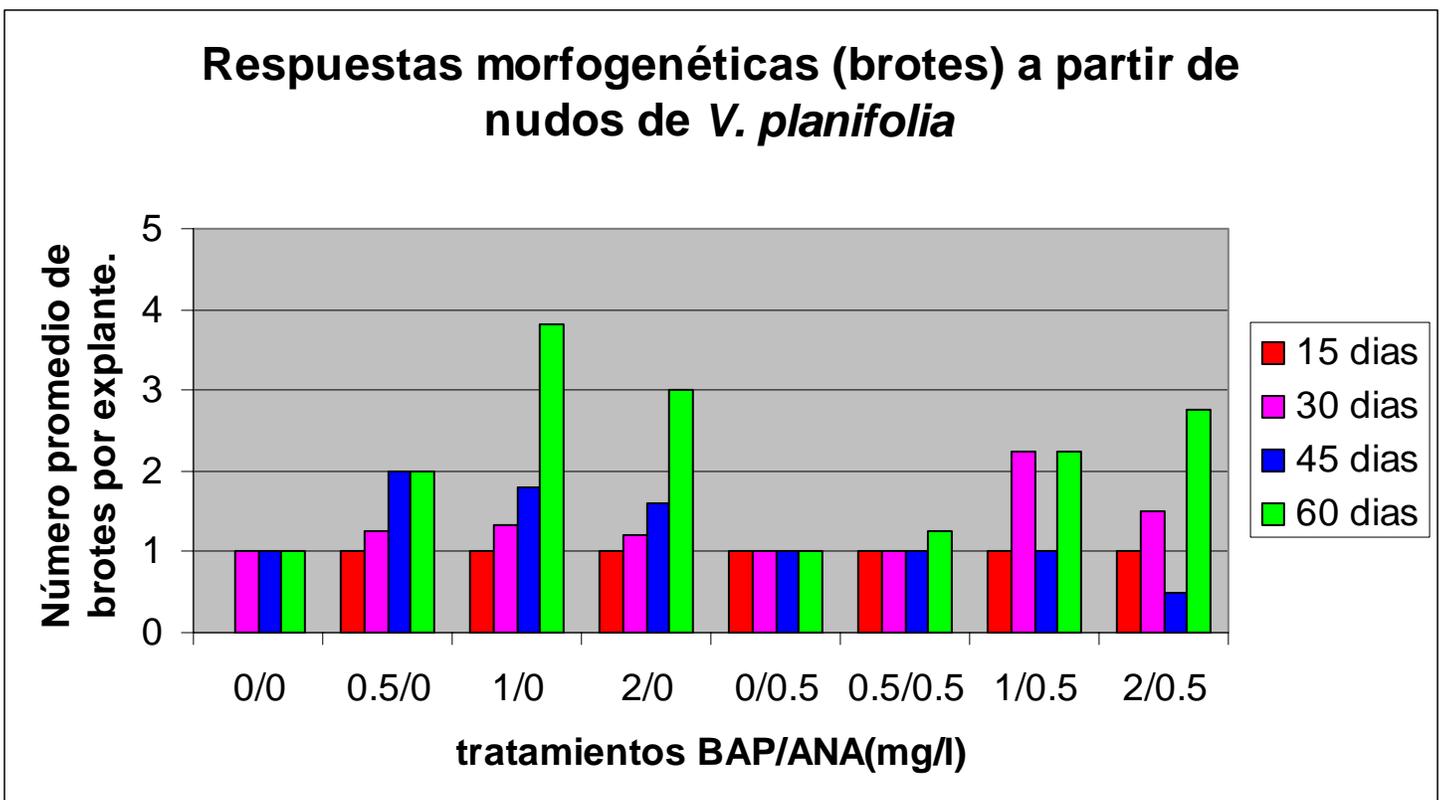
Los explantes de *V. planifolia* que fueron sometidos al barrido hormonal, no mostraron cambios en los primeros 15 días de cultivo; no ocurrió oxidación, ni muerte en ninguno de los casos, ni señales de hiperhidratación; a los 30 días de cultivo, mostraron cambios evidentes; desarrollo de raíces, brotación, en algunos casos múltiple, crecimiento y engrosamiento perceptible del explante (Tabla 4).

Después de 45 días de cultivo, los explantes mostraron un desarrollo más evidente en las estructuras previamente diferenciadas, en algunos casos continuó

aumentando el número de brotes por explante, también aumentó el número de raíces y la longitud de dichas estructuras (Tabla 4).

Los explantes de *V. planifolia* fueron registrados hasta 60 días, tiempo en el cual, ya era muy evidente en cuales tratamientos se habían generado más brotes por explante (Tabla 4)

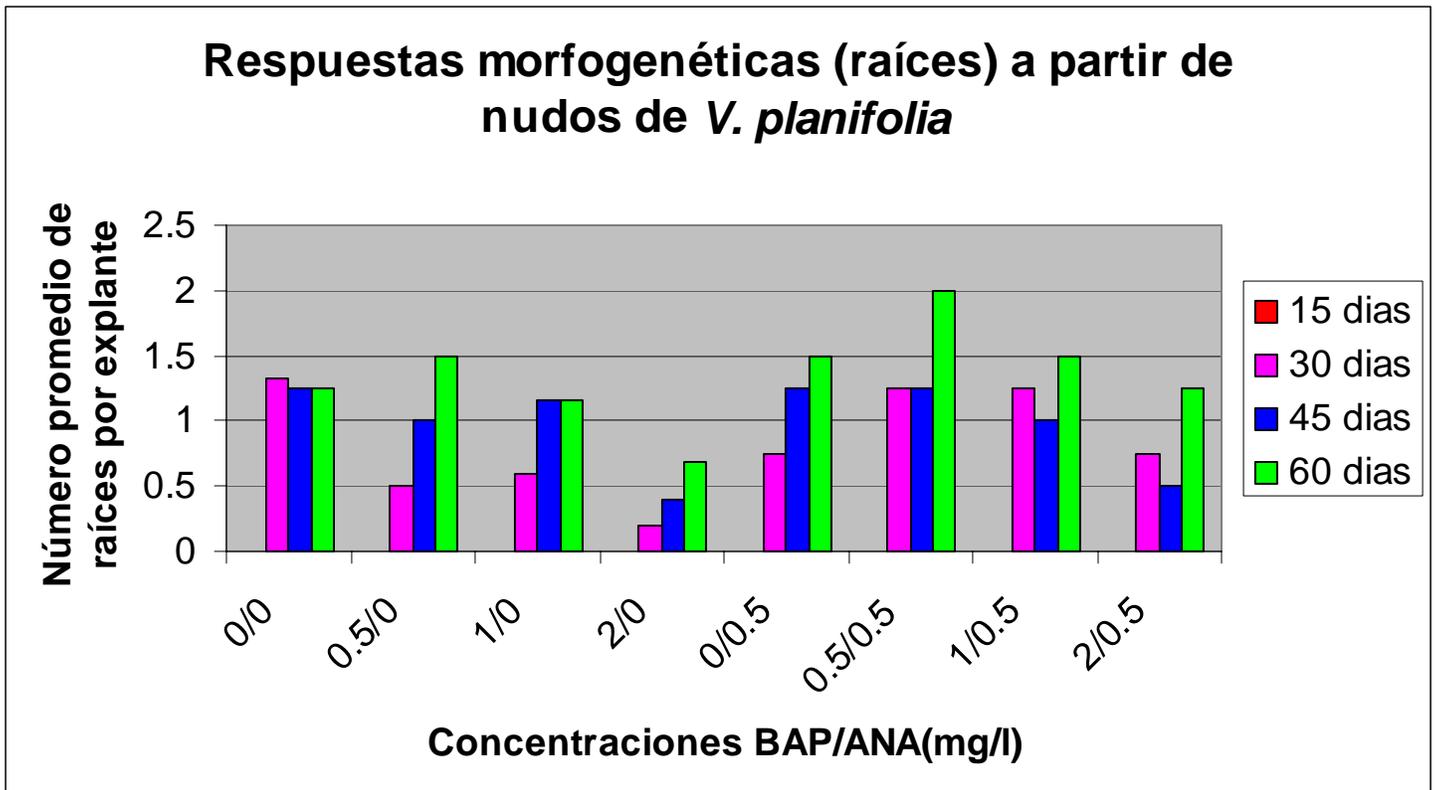
A los 60 días, el tratamiento de 1mg/l de BAP en ausencia de ANA, produjo el máximo promedio de brotes (3.8) por explante, le siguió el tratamiento de 2mg/l de BAP sin ANA, con un promedio de 3 brotes por explante (Graf. 1) .



Gráfica 1 .- Respuestas morfogénicas (brotes) a partir de nudos de *V. Planifolia*. Temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz, intensidad luminosa 300 –500 lux. Nudos de 1 cm de longitud; (X) = promedio.

El desarrollo radicular en los explantes, fue más evidente a los 30 días (Graf. 2); se observó que en presencia de BAP (0.5 a 2 mg/l) y ausencia de ANA, hubo menor crecimiento radicular presentando una o ninguna raíz por explante. Esto

comparado con el testigo (Graf.2) donde se observó la presencia de más de una raíz por explante. De manera inversa, se observa un mayor desarrollo en el número de raíces en el tratamiento (0.5/0.5) de BAP/ANA a los 30 y 60 días.



Grafica 2 .- Respuestas morfogénicas (raíces) a partir de nudos de *V. Planifolia*
 Temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz, intensidad luminosa 300 –500 lux. Nudos de 1 cm de longitud; (X) = promedio.

Tabla 4. - Respuestas morfogénicas a partir de nudos de *Vanilla planifolia* cultivados *in vitro*.

Tiempo (días)	15		30		45		60	
Tratamiento BAP/ANA (mg/l)	Brotos χ	Raíces χ						
0/0	0.0	0.5	1.0	1.33	1.0	1.25	1.0	1.25
0.5/0	1.0	0	1.25	.5	2.0	1.0	2.0	1.5
1/0	1.0	0	1.33	0.6	1.83	1.16	3.83	1.16
2/0	1.0	0	1.2	0.2	1.6	0.4	3.0	0.66
0/0.5	1	0	1	0.75	1.0	1.25	1.0	1.5
0.5/0.5	1	0	1	1.25	1.0	1.25	1.25	2.0
1/0.5	1	0	2.25	1.25	2.25	1.0	2.25	1.5
2/0.5	1	0	1.5	0.75	3.0	0.5	2.75	1.25

Nota: χ = Promedio

Los explantes continuaron creciendo en el mismo medio hasta alcanzar los 90 días, en esta etapa las plántulas presentaban de 2 a 4 raíces, de 3 a 4 hojas con sus nudos.

Posteriormente se optó por dividir las plántulas en 2 lotes para seguir las siguientes opciones:

- 1) A las plantas les fueron disectados los nudos y fueron sembrados en nuevo medio nutritivo, con o sin reguladores de crecimiento, según las necesidades experimentales.
- 2) Las plántulas obtenidas, fueron preparadas para iniciar su aclimatización, dicho proceso se inició al remover el ápice de la planta para subcultivarlo en medio nutritivo fresco con reguladores. El resto de la planta se utilizó para llevar a cabo la aclimatización. Cabe mencionar que las plántulas

presentaron de 3 a 4 raíces (Fig 7), algunas midieron hasta 20 cm de longitud, razón por la cual no requirieron de un tratamiento posterior para inducir el enraizamiento.

6.4 Aclimatización

Las plántulas del lote 1 (n=5) ensayadas sin pre-tratamiento previo a su siembra en sustrato, sobrevivieron la primera semana; en la segunda semana, mostraron señales de putrefacción presentando una apariencia acuosa en sus tejidos, el ápice murió por deshidratación. Posteriormente las plántulas murieron en su totalidad (100%), lo cual ocurrió posiblemente debido al ataque de bacterias (Tabla 5).

Posteriormente en un segundo ensayo de aclimatización, las plántulas *in vitro*, fueron previamente podadas bajo condiciones asépticas, sus ápices fueron removidos y subcultivados en MST libre de hormonas; este procedimiento se aplicó debido a que los ápices mueren (a los 2 -3 días) durante el proceso de aclimatización por exceso de deshidratación.

Las plántulas así tratadas, conformaron un segundo lote o lote 2 (n=8), a estas se les aplicó el pre-tratamiento en cámara húmeda por una semana.

Todas las plantas de este lote2 (n=8), fueron separadas por su diámetro del tallo en dos grupos de 4 individuos cada uno. Aquellas que presentaron un diámetro del tallo mayor a 3 mm (lote 2a) y otras con un diámetro del tallo menor a 3 mm (lote 2b). Después fueron sembradas en sustrato de sphagnum y al mes de aclimatización, su porcentaje de sobrevivencia fué del 100% (Tabla 5; Figs.9 -10).



Fig. 9. Plántula obtenida después de 2 meses de aclimatación altura 15 cm (aprox.).



Fig. 10. Plántulas aclimatizadas.

Sin embargo la diferencia en el diámetro del tallo, mostró resultados distintos como se cita a continuación (Tabla 5).

Al parecer las 4 plantas que presentaron un diámetro menor a 3.0 mm, parecieron tener dificultades en adaptarse y crecer, pues su crecimiento fue más lento, y tuvieron un retraso de 2 semanas para formar nuevos ápices, además de ser más susceptibles a los ataques por hongos (Fig. 12).



Fig. 12. Plántulas obtenidas por cultivo de nudos, cuyo diámetro fue menor a 3mm; se observa su menor desarrollo a los 2 meses de aclimatación debido a un retraso de 15 días en su crecimiento.

Por otro lado las 4 plántulas que presentaron diámetro mayor a 3.0 mm, mostraron mayor adaptabilidad y un rápido crecimiento del ápice (Fig.11).



Fig. 11. Plántulas obtenidas por cultivo de nudos, cuyos diámetros fueron mayores a 3mm, se observa su desarrollo a los 2 meses de aclimatación.

Tabla 5.- Resultados de aclimatización.

	Pre-tratamiento	Sobrevivencia de plántulas a los 30 días.	% Mortalidad, causada por bacterias:	Inicio de nuevo desarrollo (días)
Lote 1	ninguno	5(0%)	100%,	0
Lote2a ($\Phi > 3\text{mm}$)	Cámara húmeda semi abierta (7 días)	4(100%)	0%	45
Lote2b ($\Phi < 3\text{mm}$)	Cámara húmeda semi abierta (7 días)	4(100%)	0%	60

Las plantas aclimatizadas continuaron su desarrollo; a los 45 días se presentó el desarrollo de un nuevo ápice. Con el crecimiento de éste, se concluyó que las plántulas se habían aclimatizado.

Las plántulas aclimatizadas fueron colocadas bajo condiciones de invernadero (Fig 13).

7. - DISCUSION.

Con respecto al medio de cultivo elegido, se optó por modificar la base química del medio Murashige and Skoog(1962) (Apéndice 1); para manejarlo al 50% de su concentración original, ésto debido a que la formula original del mismo es muy rica en sales.

Esta reducción(Apéndice 2), se aplicó como una medida preventiva para reducir la posibilidad de proliferación celular excesiva(callos); y para observar el desarrollo adecuado de los explantes. La adición de carbón activado a la formula, se debió principalmente a que este actúa como un agente adsorbente de los compuestos fenólicos dañinos que liberan los explantes.

Desinfección.

El protocolo de desinfección arrojó resultados muy diversos, al parecer aplicar un pre-tratamiento con isodine antes de proceder a la desinfección con solución de NaOCl, mejoró notablemente la desinfección de los explantes. Es posible que la duración del pre-tratamiento influya en los resultados obtenidos, pues el tratamiento con nitrato de plata, sólo duró 5 horas , mientras que el pre-tratamiento con isodine duró 24 horas (Tabla 3).

Sólo Davidonis and Knorr en 1991, incluyeron un pre-tratamiento agua oxigenada por 30 minutos, antes de realizar la desinfección de los nudos con NaOCl al 20% (v/v) al parecer con buenos resultados, pues los autores no hacen mayor referencia al respecto.

Los explantes de vainilla parecieron estar muy contaminados superficialmente y/o presentar contaminación interna, razón por la cual la desinfección superficial con las soluciones de NaOCl no fueron suficientemente efectivas para asegurar la total asepsia de los explantes.

En todos los trabajos hechos anteriormente con nudos de vainilla, el NaOCl se aplicaron en concentraciones que van del 20% al 50% v/v (Davidonis and Knorr, 1991; Gu, Arditti, and Nyman, 1987; Kononowicz and Janick, 1984).

Las bajas concentraciones de NaOCl (1% - 3%) que se usan en otras especies vegetales (Roca y Mroginski, 1991), no son efectivas para lograr la desinfección. Aún cuando algunos investigadores (George and Ravishankar, 1997; Philip and Nainar, 1986) sugieren utilizar cloruro de mercurio del 0.15 al 0.5 % para esterilizar los nudos de *V. planifolia*, en este estudio no se utilizó por seguridad, debido a su alta toxicidad, la dificultad para detener su acción sobre el tejido y la dificultad para eliminar posteriormente el mercurio del mismo.

La presencia de bacterias en el interior de los tejidos de *Vanilla*, podría indicar que la especie es susceptible a la colonización por organismos endófitos; más aún si estos organismos establecen algún tipo de simbiosis, eso es algo que aún está por ser estudiado. Aunque por otra parte, la presencia de bacterias endofíticas, podría relacionarse con las condiciones de cultivo húmedas y frescas en las cuales creció el ejemplar (*ex situ*) utilizado en este estudio.

Pierik (1990) menciona que la contaminación interna presente en algunas especies vegetales, puede constituir un problema importante; esta contaminación es causada por microorganismos que habitan en el interior de los tejidos de la planta.

Este tipo de contaminación no se elimina con la desinfección superficial, para tratar este problema suele agregarse antibióticos al medio de cultivo; sin embargo, aún esta medida puede resultar poco efectiva para eliminar los microorganismos contaminantes (Pierik, 1990).

Cabe mencionar que en ninguno de los estudios presentados por otros investigadores (George and Ravishankar, 1997; Philip and Nainar, 1986; Gu, Arditti, and Nyman, 1987; Kononowicz and Janick, 1984), se menciona la aplicación de algún antibiótico para tratar los explantes de *V. planifolia*; esto quizás esté relacionado con la toxicidad del cloruro de mercurio que es un compuesto sumamente tóxico.

Pierik (1990) menciona que la aplicación de antibióticos puede resultar poco efectiva y por otro lado, la adición excesiva de los mismos, puede causar un efecto fitotóxico, en el cual las plántulas pueden presentar inhibición en su crecimiento y desarrollo.

Los ensayos con antibióticos, fueron realizados en distintos tiempos, con distintos tipos de antibióticos y con distintas especies de bacterias.

La Gentamicina se usó para tratar la colonia bacteriana de color rosa; y la Ampicilina se usó para tratar la colonia de bacterias blancas.

Observamos que la concentración de ambos antibióticos fué muy diferente. La Gentamicina estuvo en una concentración de 8mg/2ml mientras que la Ampicilina se aplicó en una dosis de 50mg en 25ml de medio líquido (aprox.)

Es posible que aunque la Gentamicina estaba más concentrada, no fuera el antibiótico más adecuado para eliminar las colonias bacterianas de color rosa; o quizás se debió a que no fue aplicada en la dosis letal.

El hecho de que la Ampicilina tuviera cierto éxito para eliminar las colonias bacterianas de color blanco, podría deberse a que el antibiótico tiene un efecto mas efectivo sobre esta cepa de bacterias en particular.

Cultivo de nudos.

El protocolo experimental para el desarrollo de brotes a partir de nudos, fue diseñado tomando en cuenta algunos puntos de la metodología propuesta por George and Ravishankar (1997), debido a que en sus datos experimentales reportaron haber obtenido brotación múltiple a partir de un solo nudo. Se optó por experimentar con yemas laterales (nudos) de una planta madura para obtener brotes juveniles.

Para el cultivo de nudos, se exploró la inducción del desarrollo de brotes utilizando distintas concentraciones de BAP y ANA (Tabla 2).

En los explantes testigo, observamos que a partir de un explante de nudo de vainilla, se generó una plántula (con raíces) que presentó un promedio de 3 nudos nuevos a los 2 meses en el medio MST testigo. Un explante sembrado en MST testigo y sub-cultivado cada 2 meses sería capaz de producir aproximadamente 243 explantes después de 10 meses de cultivo *in vitro*, estos datos están estimados según los cálculos de crecimiento vs tiempo (Tabla 6).

Tabla 6.-Producción estimada de brotes a partir de nudos, en medio MST cada 2 meses (no experimental)

Tiempos	meses	nudos testigo (calculado) $T_{n+1} = ET_n(3)$	nudos con 1mg/l BAP (calculado) $T_{n+1} = E_{tn}(3.83)$
T0	0	1	1
T1	2	3	3.83
T2	4	9	14.66
T3	6	27	56.18
T4	8	81	215.17
T5	10	243	824.12
T6	12	729	3156.40

Nota: el valor de T_n = tiempo, ET_n = explantes al tiempo n, 3 = número promedio de nudos producidos por unidad de tiempo (2 meses) en testigos; 3.83= número promedio de nudos producidos por unidad de tiempo (2 meses) con 1 mg/l BAP en experimentales. Los valores sólo son validos si y sólo si se aplican los subcultivos puntualmente cada 2 meses (teóricamente).

Latha and Seeni en 1994, obtuvieron brotación múltiple en segmentos nodales de *Nepenthes khasiana*, logrando a las 8 semanas, obtener de 6 a 12 brotes por nudo usando BAP 0.5 mg/l. Con ello demostraron, que aún en bajas concentraciones de citocinina, es posible lograr la brotación múltiple a partir de un solo nudo.

Para el caso de *V. planifolia*, los mejores resultados se obtuvieron con explantes cultivados en las concentraciones de BAP/ANA, 3.83 brotes por explante con 1/0mg/l; 3.0 brotes por explante con 2/0mg/l y 2.75 brotes por explante con 2/0.5mg/l. Todos ellos presentaron su máximo número de brotes por explante a los 60 días (Tabla 4).

Los resultados obtenidos en la presente investigación, son similares a aquellos presentados por Kononowicz and Janick en 1984. En su reporte mencionan haber obtenido de 4.9 a 8.9 brotes por explante al aplicar 1.0 mg/l de BAP en nudos de

V. planifolia (Kononowicz and Janick, 1984); pero no especifican el tiempo de cultivo.

Igualmente encontramos similitudes con los datos reportados por George and Ravishankar en 1997 para *V. planifolia*; ellos reportaron haber obtenido una brotación múltiple de 5.7 brotes por explante a los 90 días, utilizando 2.0mg/l de BAP con 1mg/l de ANA. En nuestros ensayos, la combinación 2.0 BAP/0.5 ANA (mg/l) produjo brotación múltiple de 2.75 brotes por explante a los 60 días.

Por otra parte, en un ensayo preliminar, utilizando la combinación 2.0 BAP/1.0 ANA (mg/l), observamos que las plantas producidas eran robustas con un diámetro mayor de 3mm, pero ninguno de los explantes presentó brotación múltiple.

Según nuestros datos (Tabla 4), los brotes se desarrollan primero que las raíces lo cual podría significar que en un nudo de vainilla, existe una concentración predominante de citoquininas endógenas, lo cual impulsa el desarrollo predominantemente hacia brote(s).

El tiempo es un factor a considerar dentro de este estudio; nuestros registros alcanzan únicamente hasta los 60 días, esto debido a que ocurrió un fallo en la cámara de incubación y todas las plantas *in vitro* murieron de sobrecalentamiento. Mientras que en otros estudios, los resultados abarcan hasta los 90 días de cultivo *in vitro* (George and Ravishankar, 1997).

Analizando los datos obtenidos (Tabla 4), pudimos observar que la mayor diferencia en respuestas, se dio en un periodo de 60 días, en los tratamientos de 1.0 a 2.0mg/l de BAP en ausencia de ANA.

Se presentaron diferencias notables en el número de brotes con 1.0mg/l de BAP se tuvo una diferencia de 2.5 brotes ($3.83 - 1.33 = 2.5$) en el periodo de 30 a 60 días y 2.0mg/l de BAP tuvo una diferencia de 1.8 brotes ($3.0 - 1.2 = 1.8$) en el periodo de 30 a 60 días (Tabla 4).

Sabemos que la *V. planifolia* tiene un crecimiento *in vitro* lento, y que el desarrollo de brotes no depende estrictamente de la presencia exógena de BAP/ANA; no obstante, la regeneración de un mayor número de brotes parece estar directamente relacionada con las concentraciones de BAP/ANA presentes

en el medio nutritivo. Aunque el número de nudos aumenta progresivamente con el paso del tiempo, no sabemos qué ocurre con los nudos mas allá de los 60 días de cultivo *in vitro*.

También se puede pensar que el menor número de brotes, quizás se debió a las modificaciones químicas del medio; sin embargo Cervera and Madrigal en 1981, utilizaron el medio Knudson para propagar y enraizar brotes de *V. planifolia*, el cual sabemos es un medio químicamente más simple que el medio nutritivo utilizado en este estudio. A su vez , Philip and Nainar en 1985, proponen el medio Knudson líquido como más efectivo que el MS para cultiva segmentos de tallo de *V. planifolia*, obteniendo en este de 10 a 15 protocormos por explante.

Por otra parte, varios investigadores han utilizado exitosamente el medio MS para cultivar explantes de *V. planifolia* (Kononowicz and Janick,1984; Philip and Nainar, 1987; Davidonis and Knor, 1991; George and Ravishankar, 1997).

Gu, Arditti and Nyman en 1987 sugieren que los brotes de *V. planifolia* pueden crecer en un amplio rango de concentraciones y combinaciones de compuestos nutritivos (MS, KC, LS y SH). Lo cual concluye que la composición química del medio de cultivo no es determinante para el desarrollo de los brotes de *V. planifolia*.

En los resultados experimentales y algunos ensayos, observamos que los nudos cultivados en los medios que contenían 2/0.5 y 2/1 mg/l de BAP/ANA, formaron plántulas que presentaban tallos más gruesos (>3mm) y entrenudos más cortos en comparación con los demás tratamientos hormonales.

Al parecer los nudos más gruesos tuvieron mayores probabilidades de formar una mayor cantidad de brotes por explante. Esta respuesta se relaciona posiblemente con la cantidad de reservas del explante (biomasa), sus hormonas endógenas y se relaciona directamente con la acción de las concentraciones de BAP y ANA (exógenas) presentes en el medio de cultivo. Esta observación hace cuestionarnos acerca del balance exacto entre ambas hormonas, que nos permita no sólo obtener brotación múltiple, sino además llegar a controlar la altura de la planta dentro del frasco, lo cual puede ser útil si no se dispone de mucho espacio.

El diámetro y la edad del explante, parecen ser factores determinantes para la capacidad de respuesta de un nudo; Seeni and Latha en el 2000, reportaron un mayor número de brotes por explante (9 –12), en nudos provenientes de plantas maduras de *Vanda coerulea*, comparado con los (4 – 3) brotes por explante obtenidos de nudos de plántulas generadas por germinación. Así mismo, Decruse y colaboradores en el 2003, reportaron en *Vanda spathulata* un mayor número de brotes por explante (12.6) al utilizar los nudos provenientes de plantas adultas como fuente de explantes, comparado con el número de brotes por explante (6.1) regenerados a partir de plántulas de semilla. Las diferencias en las respuestas, las adjudican a la diferencia de tamaños que existe entre los meristemas de las plantas adultas y los de las plántulas provenientes de semilla.

En nuestros resultados, la variación obtenida en nudos de *V. planifolia*, pudo deberse quizás al estado fisiológico inactivo por la estacionalidad invernal, la influencia de la dominancia apical o a la edad de la planta de la cual se tomaron los explantes. También podrían haberse generado variaciones en cada subcultivo, pues no todos los nudos en una misma plántula tienen el mismo diámetro. Por todo esto, es de esperar que hayan ocurrido variaciones en las respuestas fisiológicas observadas en cada planta y/o nudo en particular.

Rizogenesis *in vitro*.

Todos nuestros brotes, enraizaron, independientemente de la concentración de ANA en el medio. En los tratamientos donde el BAP estaba presente en mayor proporción que el ANA, se presentaron retrasos en el desarrollo radicular cuyos promedios fueron del 0.66 al 1.25 raíces por explante a los 60 días (Tabla 4).

Esto lo podemos apreciar en los tratamientos 1.0 BAP/0.0 ANA, 2.0 BAP/0.0 ANA y 2.0 BAP/0.5 ANA (mg/l).

Contrariamente a lo antes mencionado, donde se desarrollaron más raíces (2) por explante a los 60 días, fue el tratamiento 0.5 BAP/0.5 ANA (mg/l) (Tabla 4). Esto posiblemente se deba a la concentración de hormonas endógenas en el explante.

La concentración de ANA utilizada en este trabajo, fué de 0.5mg/l como máximo; aunque esta es relativamente baja, su influencia pareció ser determinante al momento de la diferenciación de las futuras raíces como se ve en la Grafica 2.

Todos nuestros medios, contenían 1.0 g/l de carbón activado, lo cual pudo beneficiar la rizogénesis al reducir la incidencia de compuestos fenólicos inhibidores de la misma.

Kononowicz and Janick, en 1984 utilizaron medio MS sin carbón activado y sin auxinas, esto posiblemente influyo en que algunas de sus plantas no presentaron raíces al momento de su aclimatización y por tanto no pudieron sobrevivir. De ahí surge la importancia de las mismas para la sobrevivencia de las plántulas.

Por otra parte, George and Ravishankar en 1997 corroboran en sus datos, el efecto del carbón activado, como promotor del aumento en el número de raíces al enraizar brotes en medio basal.

La rizogenesis, pareció ser independiente de la concentración de ANA en el medio. Al parecer estuvo más relacionada con la concentración interna de fitohormonas y tal vez fue promovida por la presencia de carbón en el medio nutritivo.

Con respecto al **proceso de aclimatización**, cabe mencionar que es en esta fase tan delicada donde se puede perder todo el trabajo de meses o años.

Existen varias técnicas para fortalecer las plántulas *in vitro*, antes de su aclimatización a condiciones *ex vitro*.

Las tres técnicas más utilizadas son: reducción de la humedad atmosférica, incremento a la exposición luminosa o el incremento en la concentración del CO² (Pospisilova *et al.*, 1999).

Para *V. planifolia*, se optó por utilizar la reducción de la humedad atmosférica, por ser la más accesible al no requerir equipo especial y es bastante simple.

El podar los ápices de las plántulas, previamente a su aclimatización, nos permitió obtener más material de propagación y así salvar un tejido que de otra manera

moriría irremediablemente (debido a su fragilidad) durante el proceso de aclimatización por deshidratación.

Short and Roberts(1986) sugieren que la aclimatización de plántulas en condiciones de baja humedad, incrementa la tasa de sobrevivencia cuando las plántulas son transferidas a suelo.

En el proceso de aclimatización, se hizo énfasis en incrementar la resistencia a la deshidratación de las plántulas. Se esperaba que en el proceso de aclimatización, las plántulas engrosaran su cutícula y con ello aumentarían su resistencia a los ataques de organismos patógenos.

Sutter and Hutzler en 1984, probaron el efecto de agentes protectores y anti-transpirantes, para disminuir la marchitez en plántulas de *Chrysanthemum morifolium* y *Dianthus caryophyllus* transferidos a condiciones *ex vitro*.

Según nuestros resultados obtenidos con plántulas de *V. planifolia*, no fue necesario recurrir a estos productos. Esto posiblemente se debió a que las plántulas al salir a condiciones *ex vitro*, presentaban una cutícula suficientemente gruesa que les protegió de la desecación excesiva. Más aún, el proceso de pre tratamiento pudo ayudar a que las plántulas gradualmente engrosaran sus cutículas y posiblemente también promoviera la activación de la función estomática.

Todas las plántulas pre-tratadas, aclimatizadas en el laboratorio y cultivadas en el invernadero, tuvieron un porcentaje de sobrevivencia del 100% a los 45 días; Esto sin importar el diámetro de su tallo.

Todas las plántulas no pre-tratadas murieron de pudrición bacteriana; de manera muy similar a los resultados reportados por Kononowicz and Janick en 1984, en los que sólo 4 plántulas de *V. planifolia* sin raíz sobrevivieron de un lote de 30 plántulas.

Existe una mejora en el proceso de aclimatización, si lo comparamos con el proceso antes descrito por Kononowicz and Janick en 1984, el cual consta de una cámara húmeda cerrada, con la cual obtuvieron como máximo el 96% de sobrevivencia de plántulas (Kononowicz and Janick, 1984).

El pre-tratamiento parece ser esencial al momento de aclimatizar una plántula, porque al parecer ayuda a fortalecer las defensas de las plántulas (cutícula) ante los ataques microbianos. Sin embargo, en otros reportes (George and Ravishankar,1997; Philip and Nainar, 1986; Gu, Arditti, and Nyman, 1987) no mencionan la aplicación de ningún tipo de tratamiento para las plántulas de vainilla, previamente a ser plantadas en sustrato.

Se hace mención al tipo de sustrato que se ha utilizado para sembrar las plántulas, este puede ser desde arena (George and Ravishankar,1997) hasta mezclas de corteza y vermiculita. (Kononowicz and Janick, 1984).

En la presente investigación, se utilizó musgo canadiense (peat- moss) con buenos resultados, obteniendo una sobrevivencia del 100% a los 30 días en todos los explantes pre-tratados antes de ser sembrados en el sustrato.

Nuestra metodología de transferencia a suelo, concuerda con lo reportado por Pierik (1990), él menciona que la transferencia a suelo debe realizarse bajo condiciones de alta humedad relativa, en compartimentos recubiertos de plástico que mantengan dichas condiciones mientras las plantas inician su desarrollo *ex vitro*.

Por otra parte, las plántulas cuyo diámetro de tallo fue menor a 3 mm; aunque todas sobrevivieron, requirieron de 15 días más de tiempo de aclimatización para continuar su desarrollo. este inició con el crecimiento de un nuevo ápice, los tallos de estas plantas crecieron muy delgados casi del mismo diámetro original. Por lo que necesitarán mas tiempo para alcanzar la talla adulta

Este tipo de detalles pudo haber generado retrasos en un sistema de producción a gran escala. Por lo cual sería deseable que las plántulas presentaran tallos que tuviesen un diámetro mínimo de 3 mm, con al menos 2 nudos y 3 raíces de 10cm de largo; todo esto con el fin de que la planta pueda aclimatizarse *ex vitro* fácilmente y asegurar con ello el mayor número de plantas sanas disponibles.

Sin un adecuado proceso de aclimatización, todos los esfuerzos para propagar una especie vegetal por medio de cultivo de tejidos, resultarían inútiles al no ser capaces de asegurar la sobrevivencia y crecimiento de las plantas propagadas por

esta tecnología. En el presente estudio con *V. planifolia*, se logró una eficiencia del 100% al término de 45 días.

8. - CONCLUSIONES.

- No existe aún un proceso exitoso estándar para desinfectar explantes de *V. planifolia*. Debido principalmente a la presencia de bacterias endógenas.
- Los resultados al aplicar un antibiótico, variaron dependiendo del tipo de bacteria que presentaba el explante, el tipo de antibiótico aplicado y la concentración en la que se aplicó. En el caso particular de los explantes de *V. planifolia*, la aplicación de 50 mg de Ampicilina, fue efectiva para controlar las bacterias blancas.
- La concentración adecuada de 6-Bencil Amino Purina (BAP) para inducir brotación múltiple en *V. planifolia*, fue de 1.0 mg/l a 2 mg/l.
- Las condiciones fisiológicas del explante (origen, edad y grosor) influyeron en el tipo de respuesta que presentaron al ser cultivados bajo condiciones *in vitro*.
- La presencia de ANA en el medio, aceleró el proceso de enraizamiento, sin embargo no fué esencial agregarlo al medio, pues todas las plántulas cultivadas bajo condiciones *in vitro* enraizaron de manera espontánea. Sin embargo, la presencia de ANA en el medio de cultivo, en una concentración entre 0.5 y 1.0 mg/l, promovió el engrosamiento del tallo y redujo la longitud de los entrenudos.

- El balance hormonal de 2/0.5mg/l de BAP/ANA fue el más adecuado para obtener brotación múltiple y un grosor del tallo superior a 3mm.
- El pre tratamiento fue necesario, para optimizar el proceso de aclimatización y con ello alcanzar el 100% de sobrevivencia de las plántulas.
- El diámetro de las plántulas al momento de la aclimatización, influyó en su posterior desarrollo, siendo preferible que éste fuese mayor a 3 mm, a fin de evitar retrasos en el tiempo de crecimiento de las mismas.

9. – APÉNDICE.

9.1 Apéndice 1 Medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962 (medio básico).

Componente	gramos/ litro
(NH ₄)NO ₃	1.65
KNO ₃	1.9
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37
KH ₂ PO ₄	0.17
CaCl ₂	0.44
MnSO ₄ .H ₂ O	0.01689
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.0086
H ₃ BO ₃	0.0062
KI	0.00083
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.00025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.000025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.000025
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.0278
Na ₂ . EDTA	0.0373
Tiamina * HCl	0.0001
Ac. Nicotínico	0.0005
Piridoxina * HCl	0.0005
Inositol	0.10
Glicina	0.002
Sacarosa	30
bacto agar	8.5

Apéndice 2. Medio de Murashige y Skoog. Modificado para el cultivo de *V. planifolia* (MST).

Componente	gramos/ litro
(NH ₄)NO ₃	0.825
KNO ₃	0.95
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.185
KH ₂ PO ₄	0.085
CaCl ₂	0.22
MnSO ₄ .H ₂ O	0.008445
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.0043
H ₃ BO ₃	0.0031
KI	0.000415
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.000125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0000125
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.0000125
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0139
Na ₂ . EDTA	0.01865
Solución vit. BPTA *	10ml/L
Inositol	0.05
Glicina	0.001
Carbón activado	1.0
Sacarosa	30
Agar Gelrite	4.0

El pH fue ajustado a 5.3, antes de agregar el gelrite.

*vease la nota de la formula de las vitaminas BPTA.

9.2 Solución de Vitaminas BPTA.

Preparada en una solución Stock para 10 litros en 100 mililitros de agua destilada.

Vitamina	Cantidad (mg/l)	Cantidad para 10 l. Solución stock (10 l X100ml).
Biotina	1.0	10.0 mg
Piridoxina	1.0	10.0 mg
Tiamina	1.0	10.0 mg
Ac. Nicotínico	1.0	10.0 mg

9.3 Índice de figuras

Fig.1. Aislamiento de nudo a los 15 días de iniciados los cultivos, proveniente de nudos pre-tratados con Isodine, se encuentra libre de bacterias u hongos.(p. 39)

Fig. 2. Aislamiento de nudo a los 15 días de iniciados los cultivos, mostrando crecimiento de una raíz previamente formada. (p. 39)

Fig. 3. Brote obtenido por brotación múltiple, mostrando hojas escamosas. (p. 42)

Fig. 4. Crecimiento de un brote en presencia de BAP 2mg/l / ANA 0.5mg/l a los 30 días de iniciados los cultivos en medio MST. (p. 42)

Fig.5. Plántula de 2 meses lista para ser subcultivada o aclimatizada, con 8cm de altura, presenta de 3-5 nudos y al menos 3 raíces desarrolladas. (p. 42)

Fig. 6 Brotación múltiple en la base de una plántula de *V. planifolia*. (p. 43)

Fig. 7. Raíces de una plántula de *V. planifolia* a los 6 meses. (p. 43)

Fig. 8 Plántulas *in vitro*, regeneradas a partir de nudos, mostrando brotación múltiple de nudos que fueron tratados con reguladores de crecimiento 3 meses. (p. 43)

Fig. 9. Plántula obtenida por cultivo de nudos, después de 2 meses de aclimatización. (p. 48)

Fig. 10. Plántulas aclimatizadas. (p. 48)

Fig. 11. Plántulas obtenidas por cultivo de nudos, cuyos diámetros fueron mayores a 3mm, se observa su desarrollo a los 2 meses de aclimatización. (p. 49)

Fig. 12. Plántulas obtenidas por cultivo de nudos, cuyo diámetro fue menor a 3 mm; se observa su menor desarrollo a los 2 meses de aclimatización debido a un retraso de 15 días en su crecimiento. (p. 49)

10. - BIBLIOGRAFIA.

Andrew, 1952. *Vanilla planifolia* In: Oakes A. & Stewart D (Eds)., Orchids of Guatemala,

Bot. Repos. 8538.1808 *Vanilla fragans* (Salisb.) Ames, Sched. Orch. 7:36. 1924, Fieldiana : Botany vol. 26, Num. 1. Chicago Natural History Museum, fig. 16.

Arditti, J. 1992. **Fundamentals of orchid biology**, John Wiley and sons, E.U.A. New York, 618 p.

Arditti, J. and Ernst, R. 1993. **Micropropagation of orchids**. John Wiley and Son, New York.

Atwood, J. T. jr., 1986. The size of the orchidaceae and the systematic distribution of the epiphytic orchids, **Selbyana 9: 171 – 186**.

Bouriquet G, 1954. **Le vanillier et la vanille dans le monde**, (ed) Lechevalier, Paris.

Cervera, E and Madrigal, R. 1981, *In vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* A.), **Environ. Expt. Bot.** 21 : 441 (Abstr.).

Cheng T. J. and Chang C.W. 2000, Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower stalk explants of *Oncidium Sweet Sugar*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 62: 95 –100.

Christenson E. A., 1989, The Eric Young micropropagation center: an update. **American Orchid Society Bulletin** 58 :470 – 480.

Darwin C., 1984, **The various contrivances by which orchids are fertilized by insects**, The University of Chicago Press, Second Edition, Chicago, 300 p.

Davidonis, G. and Knorr, D., 1991, Callus formation and shoot regeneration in *Vanilla planifolia*, **Food Biotechnology**, 5(1): 59-66.

Davison, D. W. and Epstein, W.W., 1989, Epiphytic associations with ants. In :Luttge, U.(Ed), **Ecological studies: Evolution and ecophysiology of vascular plants as epiphytes**, Springer, Berlin, 200 – 233.

Decruse S. W., Gangaprasad A., Seeni S. and Sarojini Menon V., 2003 Micropropagation and eco restoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid, **Plant Cell, Tissúes and Organ Culture 72** : 199 - 202.

Dressler R. L., 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**, Dioscorides press, Portland Oregon, 314 p.

Fouché, J. G and Coumans M., 1992, Summarize four techniques for pollinating *Vanilla planifolia*, **American Orchid Society Bulletin**, November 1118 – 1122.

Fouché, J. G. et L. Jouve. 1999. **Vanilla planifolia : History, botany and culture in Réunion island**. Agronomie, Inra/ Elsevier, Paris 19 : 689 - 703.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K.,1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exptl Cell Res** 50, 151--158

George P.S. and Ravishankar G.A. 1997. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants, **Plant Cell Reports**, 16: 490-494.

Gu Z., Arditti, J. and Nyman, L.P., 1987, *Vanilla planifolia*: callus induction and plantlet production *in vitro*, **Lindleyana** 2(1): 48-52

Hágsater, E., Soto M. A., Salazar Chávez, G. A., Jiménez Machorro, R., López Rosas M. A., Dressler R. L. 2005, **Las Orquídeas de México**. Instituto Chinoín, México, 304pp.

Hartmann W. 1992, **Orquídeas de Chiapas**, Instituto chiapaneco de cultura, Chiapas, México.

Hazarika, B. N., 2003, Acclimatization of tissue-cultured plants, **Current Science**, 85(12): 1704-1712.

Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **Am. Orchid Soc. Bull.** 15: 214-217.

Kononowicz H. and Janick J. 1984. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, **HortScience** 19(1) : 58 –59.

Kuehnle A. R. and Suggi N. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. **Plant Cell Rep.** 11 : 484 – 488.

Kozai, T. 1991. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Y. P.S. Bajaj. **17** : 127 – 141.

Larson, R. A., 1988, **Introducción a la floricultura**, AGT Editor S.A., México, 551p.

Latha P. G. and Seeni S. 1994, Multiplication of the endangered indian pitcher plant (*Nepenthes khasiana*) through enhanced axillary branching *in vitro*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 38: 69 –71.

Martínez, P. A. 1985. Inducción *in vitro* de brotación múltiple de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) a partir de protocormos seccionados. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, U.N.A.M 66p.

Martínez, P. A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría, U.N.A.M., México 100p.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15 : 473 – 497.

Philip, V .J. and Nainar S. A. Z., 1985 Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. **J. Plant Physiol.** Vol 122: 211 –215.

Pierik ,R. L. M. 1990. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**, Mundi-Prensa, Version española., Madrid(España) 85 - 106.

Portères R. 1954. Le genre Vanilla et ses espèces, **In:** Lechevalier P. (Ed.) **Le vanillier et la vanille dans le monde**, Encyclopédie Biologique XLVII, Paris, pp. 94 – 290.

Pospisilova, J. Ticha I. Kadlecek P. Haisel, D. and Plzakova, S. 1999, Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions, **Biologia Plantarum** 42(4): 481 –497.

Roca , W. M. y Mroginski, L. A, 1991, **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones**; Centro internacional de agricultura tropical, Cali, Colombia, 969 p.

Rangel, G. L. M. 1995. Regeneración *in vitro* a partir del cultivo de ápices de tallo de *Oncidium stramineum* Batem. Ex Lindl (Orchidaceae), especie mexicana en peligro de extinción. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 66p.

Romeu E. 1995, La Vainilla, de Papantla a Papantla: el regreso de un cultivo, **Biodiversitas**, año 1 Núm. 1, Mayo: 10 –14 pp. México D.F.

Rubluo, A., Chávez, V and Martínez, A. 1989, *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. **Lindleyana**, 4(2), 68 - 73.

Rubluo, A., Chávez, V, Martínez, A and Martínez- Vázquez O. 1993, Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in-vitro* culture. **Biological Conservation** 63: 163- 169.

Seeni, S. and Latha P. G. 2000, *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of endangered Blue Vanda, **Plant Cell, Tissúes and Organ Culture** 61: 1-8.

Sheehan T. J. and Farence N., 2003, Vanilla the most versatil orchid, **Orchids**, December 2003: 936 -939.

Sheelavantmath, S.S., Murthy H.N., Pyati A.N. ,Ashok Kumar H.G. and Ravishankar B.V., 2000. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Geodrum densiflorum*(Lam.) Schltr. Through rhizome section culture, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 60: 151 – 154.

Short and Roberts,1986, Int. Cong., **Plant Tissue Cell Culture Abstr.**,6, 432.

Sutter, E. G. and Hutzler, M, 1984: Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimation of tissue cultured plants to the greenhouse, **Scientia Hort.** **23**: 303 – 312.

Toledo, V. M. 1988. La diversidad biológica de México. **Ciencia y desarrollo.** Vol XIV num. **81** : 17 – 30.

Van Huylenbroeck, J. M. and De Riek, 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* “petite” plantlets. **Plant Science**, **111**: 19 – 25.

Van Huylenbroeck, J. M. and P. C. Debergh, 1996.: Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. **Physiol. Plant**, **96**: 298 – 304.

Van Huylenbroeck, J. M. A. Piqueras and P. C. Debergh. 1998. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. **Plant Science**, **134**: 21 – 30.

Yang, J. Lee, H. J., Shin, D.H., Oh, S.K., Seon, J.H., Paek, K.Y. and Han, K.H., 1999, Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment, **Plant Cell Reports**, **18**: 978 – 984.

Zimmerman A. et Dougoud K. 1959. **Orchidées Exotiques**, Delachaux y Niestlé, Neuchatel Suiza, 325p.