



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jacks.
Orchidaceae**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÍCOLA

PRESENTA:

SILVIA SERRANO JIMÉNEZ

ASESOR: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA

**COASESOR: DRA. MARÍA DEL ROCÍO AZCÁRRAGA
ROSETTE**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



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 ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES
DE LA FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Cultivo in vitro de Vanilla planifolia (Orchidaceae)

Que presenta la pasante: **SILVIA SERRANO JIMÉNEZ**
Con número de cuenta: **40709494-3** para obtener el Título de la carrera: Ingeniería Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de enero de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Victor Manuel Chávez Avila	
VOCAL	Dra. Rosa Navarrete Maya	
SECRETARIO	Biol. Abel Bonfil Campos	
1er. SUPLENTE	Ing. Edgar Ornelas Díaz	
2do. SUPLENTE	Biol. Maria Victoria Hernández Pimentel	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Avila y la co-dirección de la Dra. María del Rocío Azcárraga Rosette.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a su FESC por su educación, conocimientos y formación tanto académica como personalmente.

A la carrera de Ingeniería Agrícola por todo lo que me ha ayudado, entre ello, crecer profesionalmente.

Al Jardín Botánico y al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del IBUNAM; por permitirme el acceso a sus instalaciones.

A mis asesores:

A la Dra. María del Rocío Azcárraga Rosette muchas gracias por compartir su conocimiento, su confianza y amistad. Por creer en mí, por su motivación, disposición a guiarme y apoyarme.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, le agradezco por haberme ayudado a alcanzar este sueño, por la confianza, enseñanzas que me ha transmitido y más aún, su amistad.

Al M. en C. Octavio González, agradezco infinitamente el tiempo y apoyo para la realización de este trabajo. Por confiar en mí, por compartir tus conocimientos y ser un gran amigo.

Al Biól. Ángel Jiménez por tus recomendaciones, conocimientos y valiosas aportaciones durante la realización de este trabajo. Por su motivación.

A los sinodales: Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, Dra. Rosa Navarrete, Biol. Abel Bonfil Campos, Ing. Edgar Ornelas Díaz y la Biol. María Victoria Hernández Pimentel; por todos sus comentarios y observaciones que permitieron enriquecer este trabajo.

A Lydia Edith de Marcos Hernández por contactarme con la familia Acosta Recio, además de motivarme siempre.

A la profesora Patricia Jacquez de quien he aprendido tanto.

A la familia Acosta Recio, en especial a la Sra. Inocencia y al Sr. Miguel; por todas las atenciones prestadas para iniciar esta Tesis. Por su motivación, enseñanzas así como el cariño a la Vainilla que fueron sin lugar a dudas, fuente de inspiración para lograr culminar este trabajo.

A la Dra. Estela Sandoval Zapotitla, por haberme invitado a las salidas al campo y por el material biológico donado para la realización de este trabajo. Así como, a los momentos gratos, la confianza, apoyo y conocimientos que me ha transmitido. Al Dr. Jorge Campos Contreras y al Dr. Víctor Manuel Salazar Rojas; por todo el apoyo, amabilidad y aprendizaje durante las salidas al campo.

A la Biól. Bárbara Estrada; por ser siempre una buena y excelente persona conmigo, por tu apoyo, amistad y motivación. Por todos los conocimientos que me transmitiste.

A la Dra. Olivia Adams por todo su apoyo, entusiasmo y motivación que siempre me brinda.

A mis amigos: Angel, Miguel, Guadalupe R., Brenda, Marisol, América y Paola; agradezco su sincera amistad, por todos los momentos felices y por coincidir en este mundo.

A mis amigas: Irma, Lucy, Martha, Paty, Tere y Vicky por compartir una de las mejores etapas de mi vida, así por sus consejos, conocimientos y risas.

A mis amigos del Laboratorio de Cultivo Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM: Alejandra, Alejandro, Ester, Fátima, Fernando, Héctor, Isabel, Mariana, Marlene, Oscar, Paulina, Saray Ch., Saray J. y Wendy. Gracias por compartir su tiempo, alegría, sonrisas, pláticas, conocimientos y sobre todo su amistad.

A los productores de Vainilla de la región del Totonacapan.

A mis alumnos, por permitirme aprender de ustedes e inspirarme a seguir superándome.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme seguir respirando.

A mis papás (Alberto, Adelaida, Trinidad y Leonor) por ser mis mejores ejemplos de vida y de las personas más importantes para mí; a quienes les agradezco su convivencia, cariño, afecto, consejos, apoyo a lo largo de mi vida, por alegrar y hacer feliz mi existencia.

A mis Bebés Leo y Demián, quienes me enorgullecen y hacen que me siga superando todos los días, por toda la felicidad que me dan; gracias por endulzar mi vida, los amo.

A mis tíos Pablo, Viviano, Ebodio, Andrés, Fermín y Martín; por todo el apoyo y por enseñarme a que los días son bellos aunque estén nublados.

A mis sobrinos Ariana, Betito, Luis, Demián, Naomi, Iker, Yarezi y la peque Jenifercita; quienes agradezco cada sonrisa que me regalan.

A mis hermanos Beto, Ofe, Toño y Daniel; por compartir momentos y grandes alegrías.

A mis primos.

A Homero, Jessie, Magie, Paloma, Doroteo y Domingo; por su cariño y compañía. Por ser las mascotas que han estado conmigo en los mejores y peores momentos de mi vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 ANTECEDENTES	6
2.1.1 Biodiversidad.....	6
2.1.2 Generalidades de la familia Orchidaceae.....	7
2.1.3 Importancia de las Orquídeas.....	8
2.1.4 Características y descripción botánica del género <i>Vanilla</i>	9
2.1.5 Descripción botánica y clasificación taxonómica.....	10
2.1.6 Distribución.....	11
2.1.7 Importancia y situación actual de <i>Vanilla planifolia</i>	13
2.1.8 Cultivo.....	14
2.1.9 Cultivo <i>in vitro</i> de Orquídeas.....	21
2.1.10 Métodos de desinfección y propagación en Orquídeas.....	22
2.1.10.1 Desinfección de semillas maduras.....	22
2.1.10.2 Germinación <i>in vitro</i> de semillas maduras.....	24
2.1.10.3 Desinfección de semillas inmaduras.....	24
2.1.10.4 Germinación <i>in vitro</i> de semillas inmaduras.....	25
2.1.11 Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales de vainilla (yemas, brotos, nudos y hojas).....	27
2.1.12 Cultivo de tejidos vegetales.....	29

2.2 JUSTIFICACIÓN	31
2.3 OBJETIVOS	32
2.3.1 Objetivo general	32
2.3.2 Objetivos particulares.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 Propagación <i>in vitro</i>	33
3.1.1 Material biológico	33
3.1.1.1 Semillas	33
3.1.1.2 Secciones apicales de plantas adultas.....	33
3.1.1.3 Medio de cultivo	34
3.2 Desinfección y establecimiento	34
3.2.1 Semillas de cápsula madura	34
3.2.2 Semillas de cápsula inmadura.....	35
3.2.3 Secciones apicales de tallos.....	35
3.3 Condiciones de incubación	36
3.4 Cultivo de ápices y bases de tallos	36
3.5 Individualización	36
3.6 Aclimatización	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 Desinfección del material biológico	39
4.1.1 Semillas maduras	39
4.1.2 Semillas inmaduras.....	39
4.1.3 Secciones apicales	40

4.2 Germinación asimbiótica de <i>V. planifolia</i>.....	41
4.3 Inducción de ápices y bases de tallos	44
4.4 Cultivo de nudos apicales y basales de plántulas de semillas maduras. Organogénesis directa	45
4.5 Cultivo de nudos apicales y basales de plántulas de semillas inmaduras. Organogénesis directa	50
4.6 Fase de individualización	58
4.7 Aclimatización.....	59
5. CONCLUSIONES	62
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalenacético
BA	6-Benciladenina
BAP	6-Bencilaminopurina
IBA	Ácido indolbutírico
MS	Murashige y Skoog (1962)-Medio de cultivo
2, 4-D	Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
TDZ	Tidiazurón 1-fenil-3-(1, 2, 3-tiadiazol-5-il) urea
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
MS (50/100)	Medio de cultivo MS reducido al 50% de la concentración de los compuestos inorgánicos y 100% de la concentración de los compuestos orgánicos.
AC	Agua de coco
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
dds	Días después de la siembra
ddc	Días después de su cultivo
v/v	Volumen/volumen

1. RESUMEN

Vanilla planifolia Jacks es una orquídea endémica de México que se distribuye naturalmente en los estados de: Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, San Luis Potosí, Quintana Roo y Yucatán. Dentro de la familia Orchidaceae es una de las especies con mayor importancia cultural, ornamental, alimenticia, económica, social y biológica del trópico mexicano. Esta especie está expuesta a una fuerte erosión genética, debido a la destrucción de su hábitat natural (bosque húmedo tropical), la sobreexplotación y la clonación de materiales con una estrecha base genética. Otros factores que afectan a este cultivo son las plagas y enfermedades, así como la caída prematura de frutos. La propagación por lo regular no se lleva a cabo mediante germinación en forma natural, o es muy baja (1.2%); debido al endurecimiento de la testa y a la secreción de aceites que inhiben la germinación. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) puede ser una alternativa eficiente para obtener un alto porcentaje de germinación y para permitir la expresión de la variación genética presente en las semillas.

Se establecieron condiciones para la germinación *in vitro* de semillas de frutos maduros e inmaduros y para el cultivo de segmentos de tallo en medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) a la concentración 50/100. Los tallos de las plántulas tenían al menos 5 nudos de los cuales se eligieron sólo los explantes basales y apicales; después se cultivaron en medio MS (50/100) con reguladores de crecimiento vegetal 6-bencilaminopurina (BAP) con ácido naftalenacético (ANA) 2/0, 2/1, 1/0.5 y 0/1 mg/L y agua de coco (AC) 10, 20 y 40% v/v. Se cultivó 1 explante por frasco, haciendo un total de 10 repeticiones; los cuales se incubaron bajo fotoperíodo de 16 h, 25±2°C. De las semillas inmaduras la germinación inició a los 83 días, con un 70% de germinación; mientras que en las semillas maduras fue a los 175 días con un 90% respectivamente. El cultivo de nudos después de dos meses de inducción, arrojó resultados eficientes en explantes basales de plántulas provenientes de semillas inmaduras: 23 brotes/explante con reguladores de crecimiento (ANA/BAP) y 5.4 brotes/explante con AC 20%. Las plántulas obtenidas a partir de explantes basales y apicales de tallos procedentes de semillas inmaduras con los diferentes

tratamientos de agua de coco sobrevivieron el 100% en condiciones de invernadero. El CTV es la alternativa viable a la solución de la problemática de *V. planifolia* y la conservación de otras especies amenazadas y del medio ambiente.

Palabras clave: germinación asimbiótica, cultivo de nudos, agua de coco, variabilidad genética.

2. INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura son la base de la seguridad alimentaria mundial, comprenden la diversidad del material genético contenido en las variedades tradicionales, los cultivares modernos, parientes silvestres de cultivos y otras especies silvestres (Kameswara, 2004). Lo cual toma relevancia, en este mundo con necesidades y presiones medioambientales cambiantes, en el que la producción intensiva juega un papel fundamental, se hace necesario el conocimiento y la conservación de los recursos genéticos (Toribio y Celestino, 2000). La diversidad genética proporciona a los agricultores y a todos los dedicados a cultivar plantas opciones a desarrollar, a través de la selección y producción de cultivos con resistencia a plagas, enfermedades virulentas y que están adaptadas a entornos cambiantes (Kameswara, 2004).

De manera paralela, la demanda mundial de productos vegetales se incrementará en las próximas décadas así como las necesidades ecológicas de reforestación por lo que es necesario producir plantas en suficiente cantidad y con características que respondan a tal demanda (Chávez *et al.*, 2012). Puesto que la población mundial será alrededor de ocho mil millones en el año 2020; por lo que producir granos alimenticios se tiene que duplicar desde el nivel actual que es alrededor de cinco mil millones de toneladas por año (Kameswara, 2004).

Para satisfacer la necesidad de más alimentos, será necesario hacer un mejor uso de una gama más amplia de diversidad genética de las plantas del mundo. Sin embargo, los recursos genéticos están desapareciendo a un ritmo sin precedentes (Kameswara, 2004; Celestino *et al.*, 2005 y Chávez *et al.*, 2012). La creciente demanda de productos forestales, unida al incremento en la necesidad de tierras arables para satisfacer las necesidades de la agricultura en muchas partes del mundo, está llevando a una presión intensa y en aumento sobre los recursos naturales (Celestino *et al.*, 2005).

En el período 1996-2004, un total de 8 321 especies vegetales se sumaron a la IUCN, Red List of Threatened Species; durante este tiempo, se incrementó en más

de 60% el número de plantas registradas como críticamente en peligro de extinción (Chávez *et al.*, 2012). Actualmente en México, la flora fanerogámica se calcula en 54 órdenes, 250 familias, 2 854 géneros y 23 314 especies (Villaseñor, 2016). Tal diversidad se registra en gran medida en Chiapas, Oaxaca y Veracruz; en forma análoga, estos estados albergan la mayor riqueza de orquídeas (Téllez, 2011).

Asimismo, el país presenta un alto endemismo con más de 11 600 especies vegetales mexicanas (Villaseñor, 2016), diversidad que se ve directamente afectada por una alta deforestación equivalente a 1 a 2 ha/min, a lo que debe sumarse la colecta ilegal de individuos de poblaciones silvestres (Chávez *et al.*, 2012). Entre los grupos vegetales en mayor riesgo se encuentran las orquídeas pues además de ser colectadas de manera dirigida, crecen en ambientes donde existen altos niveles de deforestación y no obstante que tienen un alto valor biológico, ecológico, cultural, social, ornamental y económico, los esfuerzos para su conservación son limitados y su crítica situación se agudiza debido a sus largos ciclos de vida (Chávez *et al.*, 2012).

El cultivo de tejidos vegetales ofrece una rápida e importante ayuda para la propagación del material vegetal resultando en la producción de un gran número de individuos en un periodo corto de tiempo con un mínimo de impacto para las poblaciones naturales amenazadas, por lo que se plantea como una alternativa viable para la conservación de especies y su rescate del riesgo de extinción (Rubluo, 1990 citado por González, 2008).

La presente investigación tuvo la finalidad de generar un protocolo para la propagación de *V. planifolia*, a través de explantes basales y apicales de plántulas provenientes de semillas maduras e inmaduras; utilizando el cultivo de tejidos vegetales. Esta biotecnología proporciona una alternativa para que esta especie se pueda regenerar y propagar a gran escala; lo cual reduciría las probabilidades de extinción en un futuro no muy lejano.

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Biodiversidad

El Capital (patrimonio) natural se encuentra amenazado por la pérdida de hábitats, la expansión de la frontera agrícola, el uso de pesticidas y contaminantes, el cambio climático, la quema de bosques, la sobreexplotación de los recursos, los cambios de uso de suelo y comercio ilegal de especies (Rivas, 2002; Toledo, 1994). Ante esta problemática, los seres humanos se enfrentan a una crisis ecológica a nivel mundial, cuyo componente es la pérdida de “variedad de la vida” (Toledo, 1994).

Se estima que tan solo en los ecosistemas boscosos del planeta cada año 13 500 especies se extinguen. Las selvas tropicales, que contienen la mayoría de los organismos vivos, están siendo devastadas a una tasa anual del 1%, de lo que equivale a 17 millones de hectáreas al año (Rivas, 2002). Algunas causas que propician la deforestación en los trópicos son: la pobreza de la población, debilidad institucional y una legislación (aplicación) insuficiente (Díaz *et al.*, 1998).

Cerca del 70% de la biodiversidad del planeta se localiza en 15 países, distribuidos en América, Asia, Oceanía y África (Rivas, 2002). México es uno de estos países megadiversos, puesto que alberga alrededor del 10% de la biodiversidad terrestre del planeta (Mittermeier y Goettsch, 1992). Sin embargo, vive una situación que demanda la conservación de tal biodiversidad; ya que sus bosques y selvas están amenazados por la destrucción irracional o han sido ya devastados en gran parte, esto quizá se deba a que sus políticas hasta ahora realizadas lamentablemente han fracasado (Guzmán, 2013). Más de 15 millones de hectáreas de bosques tropicales se pierden cada año (Kameswara, 2004). Mientras que para México, las cifras de deforestación alcanzaron 534 707 ha en el período de 1976-2007 (Rosete *et al.*, 2014).

A nivel global existen más de 250 mil especies de plantas con flores (Villaseñor y Ortiz, 2014). México es un territorio que cuenta con una extrema variedad de condiciones climáticas, geológicas y biológicamente hablando, que van desde las regiones sumamente áridas y desérticas del norte del país, hasta las húmedas y

exuberantes selvas del sureste mexicano y la vertiente del Golfo de México (Téllez, 2011); albergando ca. 10 a 12% de la biodiversidad del planeta (plantas y animales), con unas 23 mil especies vegetales (Mittermeier y Goettsch, 1992), con 11 001 de plantas con flores endémicas (Villaseñor y Ortiz, 2014). Entre los grupos de plantas mayormente representados y utilizados en México se encuentran: Cactáceas, Asteráceas, Agaváceas, Cícadas y Orquídeas, entre otros.

2.1.2 Generalidades de la familia Orchidaceae

Es una de las familias más evolucionadas dentro del grupo de fanerógamas, más numerosas y representativas a nivel mundial con cerca de 750 a 900 géneros y 25 mil a 30 mil especies (Nash y La Croix, 2008; De la Cruz *et al.*, 2009). En México está representada por 1 260 especies en 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005). Es una de las más diversas, pero también una de las más vulnerables, por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha estado sujeta, por el gran interés comercial que ha despertado desde hace muchos años, lo que ha favorecido un extenso mercado, en el que tanto las plantas como las flores de corte se cotizan en precios elevados (Ávila y Salgado, 2006).

Las orquídeas son plantas poco frecuentes y de difícil reproducción natural; los periodos para su establecimiento, desarrollo y floración, son largos, por lo menos 5 años. Adicionalmente, son recolectadas para su comercialización sin control y todo ello las pone en riesgo de extinción. Es posible disminuir el tiempo de regeneración e incrementar las poblaciones a través de técnicas de propagación *in vitro*, para ello es elemental realizar estudios relacionados con su capacidad de germinación y regeneración, en donde la respuesta depende de la especie y de las condiciones de cultivo (Francisco *et al.*, 2011).

Por lo anterior, resulta de vital importancia tomar acciones que conlleven a un manejo sustentable de las orquídeas mexicanas, entre las que se tiene el establecer sistemas de micropropagación, para conseguir la reproducción de orquídeas en

forma masiva a partir de semillas o tejidos vegetativos y desarrollarlas en grandes invernaderos (Ávila y Salgado, 2006).

2.1.3 Importancia de las Orquídeas

La familia Orchidaceae cuenta con características muy avanzadas desde el punto de vista evolutivo, exhibe notable especialización de polinización, presenta una particular complejidad floral y establece estrechas relaciones simbióticas con ciertos hongos (Téllez, 2011). Este grupo de plantas, está constituida por 17 000 a 35 000 especies, aproximadamente (40% de las monocotiledóneas) y es la más extensa de las angiospermas, ocupan un amplio rango de los hábitats ecológicos, es de las más evolucionadas debido a que han desarrollado gran potencial morfogénico, fisiológico y estructural, debido a muchas estructuras reproductivas condicionadas por la alta totipotencialidad de sus células (Condemarín *et al.*, 2007), es una de las familias más ricas en endemismos entre los países de América tropical (Flores *et al.*, 2008).

La propagación de plántulas de orquídeas incluye métodos asexuales y sexuales. En los primeros, el agricultor puede dividir los cormos y raíces de las plantas para generar dos o más clones, mientras que en el proceso de propagación vía semillas (sexual) es bastante complejo, las semillas son de tamaño pequeño y de endosperma carente o reducido, por lo tanto la morfología de las semillas dificulta el proceso de germinación. La germinación simbiótica no es necesaria si las semillas son traspasadas a un medio estéril provisto de nutrientes y una fuente de carbono (Menezes *et al.*, 2016). Una de las especies de mayor importancia e interés es *Vanilla planifolia*, mejor conocida como la vainilla.

2.1.4 Características y descripción botánica del género *Vanilla*

Vanilla es un género pantropical que comprende cerca de 110 especies (Cameron y Soto, 2003; Suryanarayana, 1996). En México y Centroamérica existen 15 especies reconocidas (Soto y Dressler, 2010). A nivel mundial, las tres especies comercialmente cultivadas son: *Vanilla planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitensis* (Cameron y Soto, 2003). *V. planifolia* (también conocida como *V. fragans* Salisb. Ames) es la más importante y la más estudiada (De la Cruz *et al.*, 2009).

Vanilla Plumier ex Miller, nombre que se desprende de la forma latinizada del español, pequeña vaina, ya que dan alusión a que los frutos se parecen a las vainas de *V. planifolia* cultivada (Cameron y Soto, 2003).

La siguiente descripción botánica de *Vanilla* se retomó de Cameron y Soto, 2003:

Son lianas herbáceas.

Las **raíces** se producen en cada nudo del tallo, generalmente son aplanadas, delgadas y suaves cuando están libres o adjuntas a la corteza del árbol, o gruesas, cilíndricas, y vellosas cuando están en el suelo (**Fig. 1a**).

Tallos escasamente ramificados, cilíndricos o cuadrangulares, delgados a gruesos. Las hojas no articuladas, dísticas o dispuestas en espiral, membranosas, coriáceas o carnosas, raramente con un pecíolo próximo.

Las **Inflorescencias** por lo regular se produce en racimos axilares a paniculadas, rara vez una cima compleja, con escala similar a las brácteas del denso raquis, a veces intermedia entre ambos extremos; brácteas algunas veces caducas.

Flores vistosas por lo general, de corta duración, producidas en serie, resupinada; perianto caducifolio una vez que la flor es fecundada; a veces fuertemente fragante.

Sépalos libres, planos a contorsionados y ondulados; rara vez granuloso o verrugoso.

Pétalos libres, a menudo con quilla dorsal, extensos, reflexos o retorcidos u ondulados.

Labelo completamente libre (raro) o completamente fusionado a los márgenes de la columna, formando una abertura, profundamente sacciforme o en forma de embudo; sencillo a lobulado de diversas maneras, por lo general largo en forma de garras, disco con quillas longitudinales, tricomas, verrugas o venas engrosadas-rugosas, a menudo con un callo penicelado formado por un grupo fimbriado, escalas retrorsas.

Columna semi-cilíndrica o triangular, de forma arqueada, por lo regular pubescente en la superficie ventral, y en ocasiones con quillas basales.

Estigma variable, forma una cavidad transversal con márgenes engrosados, pegajosos, por lo regular lóbulos laterales emergentes; a veces el lóbulo medio del estigma con una estrecha banda de material pegajoso a lo largo del margen (una especie primitiva de rostelo), anteras versátiles, terminales, semi-erectas, frecuentemente sostenidas por un filamento distinto; a veces con forma de cuernos; el ápice de la columna con alas.

Polen en mónadas, que no forma polinios distintos, de aspecto pegajoso.

Ovario articulado al perianto, unilocular rara vez granuloso.

El **fruto** es una cápsula dehiscente, a veces fuertemente fragante.

Semillas relativamente grandes con una cubierta esclerótica, la superficie suele ser lisa a ligeramente verrugosa.

2.1.5 Descripción botánica y clasificación taxonómica

Vanilla planifolia G. Jacks., ex Andrews, la mayor parte de la siguiente descripción botánica se obtuvo de Castillo y Engleman, 1993.

Tallo de coloración verde, cilíndrico, flexible y succulento. Los entrenudos son más cortos y delgados en plantas jóvenes.

Las **hojas** son de color verde oscuro, acuminadas, dorsiventrales, ligeramente conduplicadas en su extremo adaxial, gruesas, carnosas, lisas (**Fig. 1a**), con vena

media poco diferenciada (Martínez *et al.*, 2016). En plantas jóvenes son más pequeñas que las adultas.

Las **Inflorescencias** se disponen en racimos axilares (**Fig. 1c**) con raquis cilíndrico, grueso y raramente ramificado; con cuatro o cinco brácteas dísticas, en pocas ocasiones tres o más de cinco, en la base de la misma. Las brácteas dísticas son persistentes y cóncavas.

Flor. Son flores perfectas, de simetría bilateral; ovario ínfero, verde, cilíndrico, tricarpelar, de 4 a 8 cm de longitud, y de 3 a 5 mm de diámetro.

Presenta tres sépalos oblongo-lanceolados, ligeramente cóncavos y de apariencia cerosa; el sépalo superior es un poco más largo y estrecho que los dos inferiores.

Los pétalos superiores se diferencian poco de los sépalos, son menos cerosos, más estrechos y delgados que estos últimos, y tienen una quilla en la superficie externa. El pétalo inferior modificado en un labelo, el labelo es más corto y más ancho que los dos pétalos superiores, está adherido a la columna casi hasta el ápice. El margen libre del labelo es revoluto, dentado y ligeramente trilobado. Tiene en la superficie interna un disco con hileras longitudinales de papilas verrucosas y en el centro un haz de membranas con márgenes fimbriados.

La superficie de la columna que está orientada hacia el labelo es densamente vilosa (vellosa). Presenta una antera apical que contiene los granos de polen agrupados en dos máculas más o menos compactas, denominadas polinios. En la zona ventral, debajo de la antera, está el estigma cóncavo y pegajoso. Una membrana denominada rostelo se interpone entre los polinios y el estigma.

El **fruto** es una cápsula verde, succulenta, ligeramente trigonal (**Fig. 1b**).

Las **semillas** son de color negro y con forma subglobosas. Las semillas en el ápice del fruto maduran primero, y la dehiscencia también se realiza paulatinamente del ápice hacia la base. Cuando madura es aromático.



Fig. 1. *Vanilla planifolia*. a) Hojas y raíces b) Cápsulas c) Inflorescencia

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la especie.

Reino	Vegetal
Tipo	Fanerogamae
Clase	Monocotyledonae
Orden	Microspermae
Familia	Orchidaceae
Tribu	Vanilleae Blume
Genero	Vanilla Swartz
Especie	<i>Vanilla planifolia</i>

(Mabberley *et al.*, 1997 citado por De la Cruz *et al.*, 2009).

2.1.6 Distribución

La vainilla naturalmente se distribuye en los estados de: Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, San Luis Potosí, Quintana Roo y Yucatán (Cibrián, 2000). En cuanto a su cultivo, el principal estado productor es Veracruz, que aporta el 70% de la producción nacional; seguido de Oaxaca y Puebla, que en conjunto aportan alrededor del 30% de la producción total, y en pequeñas cantidades, se produce en San Luis Potosí, Hidalgo, Chiapas y Quintana Roo (Hernández, 2011).

No obstante su alta importancia, la sobrevivencia de esta especie se encuentra amenazada, por lo que está en la categoría de Protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2010).

2.1.7 Importancia y situación actual de *Vanilla planifolia*

Es una especie de la cual se obtiene un extracto que se utiliza para añadir sabor y aroma a diversos productos alimenticios, aunque también tiene aplicaciones en otras industrias, incluyendo farmacéutica, de cosméticos y tabacalera (Luna *et al.*, 2016). Desde tiempos prehispánicos, la vainilla jugaba un papel importante, puesto que era requerida a los totonacas como parte del pago tributario; ya que las primicias de los frutos del campo eran consideradas como tributo religioso de primera clase (Gordillo, 1988).

Es nativa de México y de América tropical (Hágsater *et al.*, 2005; Nayar *et al.*, 1976). En México al ser centro de origen de esta especie, existe cierta variación genética y fitoquímica; fundamental para el diseño de un programa de mejoramiento genético que puede permitir optimizar los beneficios del cultivo a sus usuarios y contribuir con la conservación de la diversidad del pool genético primario (Herrera *et al.*, 2016).

Es uno de los recursos más importantes del trópico mexicano; su cultivo representa un factor importante en el desarrollo económico, social, cultural y biológico de gran parte de las comunidades de Veracruz y Puebla (Totonacapan) así como de Oaxaca (Salazar, 2011; Paniagua *et al.*, 2013); dado el clima favorable para su desarrollo, y

el alto precio que adquiere la vaina en el mercado (Chenout, 1987). El valor biológico y ecosistémico se debe a que provee de otros recursos naturales para ciertos organismos silvestres; puesto que participa en la regulación de la humedad así como clima en general.

2.1.8 Cultivo

El cultivo de la vainilla es una actividad agrícola que depende del comportamiento del comercio internacional dado el tamaño pequeño del mercado doméstico, que se concentra en la industria artesanal y de extractos (Barrera *et al.*, 2010). México pasó de ser el mayor centro de producción a nivel mundial, a ocupar el quinto lugar, equivalente a 4% del volumen neto anual (Luna *et al.*, 2016), esto quizás se deba a que hoy en día la producción ha sido reemplazada, en gran parte, por el impacto petrolero, la citricultura y la expansión ganadera (Chenout, 1987). Se estima que la superficie cultivada de temporal en México para el año 2015 fue de 1 024 ha con 481 toneladas de frutos (vainas) verdes (SIAP, 2018). El cultivador totonaca lleva la mayor parte de los riesgos de la empresa y no recibe una parte moderada de los beneficios; ya que no benefician su vainilla, y terminan vendiéndola a un intermediario (Bruman, 1948).

Otros factores que se le atribuyen a este descenso es la baja participación de México, en cuanto a la producción de vainilla; es que los productores de ciertas regiones se caracterizan por tener pequeñas superficies dedicadas al cultivo, que oscilan entre un cuarto y una hectárea, bajos rendimientos de vainilla en verde, y baja equivalencia de ésta en vainilla beneficiada, cinco por un kilo (Barrera *et al.*, 2010). Lo anterior, quizás se deba a que gran parte de las organizaciones de productores en la región del Totonacapan desde el año 2006 a 2014, han disminuido en más de 70%, atribuido a que no cuentan con estrategias de proveeduría consolidadas que permitan contar con materia prima de calidad y volumen que requieren para atender la demanda de sus canales de comercialización (Barrera *et al.*, 2016).

Nutrición

La nutrición de la planta es uno de los aspectos más críticos para su exitosa producción comercial, ya que el sistema radicular de la vainilla es superficial y se desarrolla sobre la capa de materia orgánica del suelo (Álvarez *et al.*, 2014). La aplicación de materia orgánica va de los 10 a 20 cm de espesor; mientras que la superficie a cubrir, dependerá del área de crecimiento de las raíces, siendo menor al inicio de la plantación y mayor conforme crece la planta. En lugares con mucha humedad y deficiente drenaje, el espesor de la cobertura debe ser menor, para impedir las condiciones favorables al desarrollo de hongos, que pueden causar pudriciones de raíz. La materia orgánica se aplica de dos a tres veces por año, principalmente en los meses calurosos y secos, para evitar la deshidratación de las raíces (Hernández, 2011). Este tipo de nutrición vegetal orgánica es muy apreciada por los consumidores internacionales de vainilla y puede generar un valor agregado adicional para la producción de esta especia en países latinoamericanos (Álvarez *et al.*, 2014).

Patógenos y enfermedades

Puccinia sinamononea (Honguillo o roya). Causa ampollas pequeñas a prominentes color amarillo oscuro que se presentan en la parte inferior de las hojas; cuando este tipo de ampollas se unen, se forman grandes manchas oscuras y regularmente muere la planta (De la Cruz *et al.*, 2009).

Colletotrichum vanillae (Antracnosis). Este patógeno ataca a hojas, frutos, tallos y flores; se identifica por la aparición de pequeñas manchas hundidas, irregulares, de color café oscuro. El daño se aprecia en las primeras cinco hojas jóvenes de la parte apical, sin infectar las hojas maduras. Los frutos infectados se caen prematuramente antes de alcanzar la madurez; provocando un bajo rendimiento, el cual disminuye hasta en un 50%. (Hernández, 2011).

Fusarium oxysporum. Este hongo es uno de los mayores problemas que enfrenta la producción de vainilla; ya que ocasiona la pudrición de la raíz, causando la muerte

de las plantas. Ataca las raíces adventicias e impide que la planta absorba agua y nutrientes (Jiménez *et al.*, 2015).

Usos

La vainilla es uno de los productos más recomendados como: saborizante (tabaco, licores, comida, bebidas, confituras), potenciador de sabor (mezclas, frutas, cítricos, chocolate, salados y productos lácteos), disimulador de amargor, aromaterapia, tranquilizante, fragancia (perfumes, velas, incienso etc.), medicinal (reduce niveles de estrés y repelente contra insectos). Los residuos de las vainas; actúan como reguladores intestinal y laxante, previene el cáncer de colon, absorbe sales biliares, retrasa y disminuye la absorción de la glucosa y el colesterol. (De la Cruz *et al.*, 2009).

Beneficio o curado de vainas

La planta requiere de 3 a 4 años para florecer y para obtener la primera cosecha (Havkin *et al.*, 2004; Chenout, 1987). Las vainas de vainilla están listas para cosecharse en 6 a 9 meses después de la polinización; son cosechadas una por una cuando se han desarrollado completamente y comienzan a madurar; en esta etapa las vainas cambian del color verde oscuro a verde claro con matices amarillos (Havkin *et al.*, 2004; De la Cruz *et al.*, 2009). Las vainas sin sabor se someten a un proceso de curado (despezonado, marchitado, sudado y secado) que va de 3 a 6 meses o más dependiendo de los diferentes protocolos de curado en las diferentes regiones de producción (Havkin *et al.*, 2004), los frutos de la planta van adquiriendo su característico color negro conforme maduran, por lo que los mexicas la llamaban Tlilxóchitl (Reyes y González, 1993) este proceso se ha realizado en México durante siglos, el cual se conoce como curado o beneficio que permite el desarrollo de sabor y aroma característico de la vainilla (Xochipa *et al.*, 2016).

La vainilla veracruzana ha conservado desde entonces un lugar preeminente debido a su calidad no igualada por la producción de otras latitudes. Con el paso del tiempo ha logrado sobrevivir a toda clase de altibajos en su precio, como el provocado a mediados del siglo pasado por la elaboración de vainillina artificial, y ha conservado un nivel de producción suficiente para surtir el mercado doméstico, e incluso permitirse el lujo de realizar algunas modestas exportaciones (Reyes y González, 1993). Dentro de las cuatro características que identifican la calidad de la vainilla están el aroma, cantidad de vainillina, tamaño de la vaina y contenido de humedad, y los mejores frutos de la vainilla son aquellos con alta flexibilidad y de aspecto brillante, lo cual indica un adecuado contenido de humedad (25 y 38%) y al menos un mínimo de vainillina (Zamora *et al.*, 2016).

Sistemas de producción en vainilla

La crisis por la que atraviesa el cultivo de la vainilla en México responde a una serie de factores de índole socio-económico y técnico-productivo que están frenando el desarrollo de su cadena productiva en la región del Totonacapan (Barrera *et al.*; 2010).

La vainilla se cultiva en armonía con los recursos forestales, ya que requiere de árboles llamados “tutores vivos” que le dan sostén, materia orgánica y sombra; por lo tanto, este cultivo propicia la reforestación (Azofeifa *et al.*, 2014; Hernández, 2011). Por lo que se puede considerar una alternativa económica y ecológicamente adecuada de conservación del patrimonio natural (Azofeifa *et al.*, 2014). Además genera una gran cantidad de empleos, que comúnmente es mano de obra familiar que se utiliza principalmente para la polinización manual de las flores (Hernández, 2011).

Las características morfológicas y las necesidades de agua y nutrimentos de la planta, determinan que el suelo ideal para el cultivo de vainilla sea fértil, con abundante materia orgánica y buen drenaje. El primer paso para preparar el terreno de cultivo es la selección de tutores de la vainilla, los cuales forman parte del huerto y son importantes (Elorza *et al.*, 2007).

En la región del Totonacapan existen cuatro sistemas de producción de vainilla: acahual (tradicional), bajo naranjo, bajo pichoco y malla sombra, que se diferencian por el nivel de tecnificación y uso de conocimiento tradicional en el manejo del cultivo (Barrera *et al.*, 2009).

Sistema tradicional o acahual. Consiste en limpiar el espacio para el establecimiento de la plantación; el deshierbe se utiliza como fuente de materia orgánica; ya que sirve como composta para suministrar al mismo cultivo (Vargas y Gámez, 2014). Para este tipo de sistema se emplean alrededor de 6, 600 plantas (tutores) por hectárea en doble fila (De la Cruz *et al.*, 2009). Los acahuales o vegetación secundaria leñosa (**Fig. 2**) pueden funcionar como reservorios de especies nativas; ya que restauran la capacidad productiva del sistema y amortiguan el efecto de fragmentación al permitir el paso de algunos organismos (Morera *et al.*, 1993). Los tutores se seleccionan de la vegetación secundaria con un diámetro similar, considerando altura y cantidad de sombra que ofrece este tipo de vegetación. Para facilitar un buen manejo en cuanto a la polinización manual y sombra natural (Vargas y Gámez, 2016).



Fig. 2. a) y b) Sistema de acahual, Ejido Primero de Mayo, Papantla; Veracruz. a) Cubierta vegetal. b) Vegetación secundaria como tutores vivos.

Bajo naranjo. En este sistema de producción se utilizan naranjos como tutores (**Fig. 3**), aquí se aprovechan los huertos cítricos, donde los árboles ofrecen una buena condición de sombra para la vainilla (Vargas y Gámez, 2016).



Fig. 3. Sistemas de producción de vainilla. a) y b) Sistema de producción en tutores de naranjo. a) Comunidad de Puntilla Aldama. b) Sierra Norte de Puebla.

Tutores de pichoco (*Erythrina* sp.) y cocouite (*Gliricidia sepium*). Este tipo de árboles se recomiendan para lugares deforestados en una proporción del 50% de cada uno; ya que los pichocos ya no son muy abundantes. La siembra de estas dos especies debe ser alternada (De la Cruz *et al.*, 2009). La altura de este tipo de tutores es de 2 m, con una distancia de plantación de 2x2 m aproximadamente. La importancia de este tipo de tutores, es que son especies nativas del lugar; además, son árboles que al darles un buen manejo de podas, brindan buena sombra a la vainilla. Al tener una altura de 2m o menos; facilitan la polinización y la cosecha, entre otras labores de cultivo (**Fig. 4a**).

Malla sombra. Este sistema de producción trata de asemejar las condiciones que requiere la vainilla en forma natural, la regulación de sombra se logra colocando

malla color negro al 50% de sombra, la humedad se satisface con un sistema de riego ya sea por goteo o aspersión (**Fig. 4b**). Esto permite un microclima ideal semejante a la que ofrece el dosel de los árboles para el manejo de vainilla en áreas pequeñas. (Vargas y Gámez, 2016).



Fig. 4. a) Polinización manual en sistema de producción en tutores de pichoco, en la localidad de Puntilla Aldama, Mpio. San Rafael; Veracruz b) Sistema de producción en malla sombra. Rancho Veinte Soles, Papantla, Veracruz.

Las plantaciones comerciales se han limitado ya que gran parte del material cultivado se originó a partir de clones, por lo que la variabilidad no se encuentra disponible en los programas de mejoramiento (Divakaran *et al.*, 1997). La propagación es a través de esquejes, la germinación en forma natural regularmente no se da o es muy baja (1.2%), incluso después de un extenso período de reposo vegetativo (Philip y Nainar, 1988; Parra, 1987); debido al endurecimiento de la testa, y a la secreción de aceites se inhibe la germinación (Parra, 1987). Otro factor que limita la germinación de este tipo de semillas es que carecen de endospermo (Kumar *et al.*, 2009).

A pesar de que existen procedimientos definidos para lograr la germinación de semillas mediante el cultivo *in vitro*, por lo regular no se practican. El cultivo de

tejidos vegetales (CTV) puede ser una buena alternativa para obtener un alto porcentaje de germinación y cierta variación genética presente en las semillas.

Esta especie está expuesta a una fuerte erosión genética, debido a la destrucción de su hábitat natural (bosque húmedo tropical), la sobreexplotación y la clonación de materiales con una estrecha base genética (Paniagua *et al.*, 2013). Otros factores que afectan a este cultivo son plagas y enfermedades (Santa *et al.*, 2012). Así como la caída prematura de frutos (Iglesias *et al.*, 2014).

Ante esta problemática, una de las soluciones a la erosión genética de *Vanilla planifolia*, es implementar estrategias de conservación *ex situ* (colecciones *in vitro* y jardines botánicos) convirtiéndose en alternativas viables para preservar genotipos (Azofeifa *et al.*, 2014).

Se estima que el mayor problema que enfrenta la producción de vainilla en México es la pudrición de la raíz ocasionada por el hongo *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, que puede causar hasta un 67.4% de la muerte de plantas (Hernández, 2004 citado por Hernández, 2011).

En un país megadiverso como el nuestro, se vuelve necesaria la conservación de recursos genéticos de plantas no solo con actual importancia económica; por lo que conservar la variación genética, se traduce en proteger la materia prima para los procesos evolutivos y con ello mantener la posibilidad de que los organismos se adapten al ambiente (Cibrián, 2000). Por lo que los métodos de propagación y almacenamiento *in vitro* pueden ser empleados como herramientas muy eficientes en programas de conservación *ex situ* de diferentes especies incluyendo las que se encuentran en peligro de extinción (González, 2008).

2.1.9 Cultivo *in vitro* de Orquídeas

Se considera que es de vital importancia tomar acciones que conlleven a un manejo sustentable de las orquídeas mexicanas, entre las que se tienen que establecer sistemas de micropropagación, para conseguir la reproducción de orquídeas en forma masiva a partir de semillas o tejidos vegetativos (Ávila y Salgado, 2006). Una

buena medida, para preservar especies de orquídeas que se encuentran en alguna categoría de riesgo; es el cultivo *in vitro* de semillas, puesto que ha resultado una vía favorable para la propagación a gran escala. Ejemplo de ello ha sido *Bletia urbana* (Chávez, 1980) y *Laelia anceps* (Romero *et al.*, 2007).

2.1.10 Métodos de desinfección y propagación en Orquídeas

2.1.10.1 Desinfección de semillas maduras

Una forma eficiente para desinfectar semillas maduras de vainilla es mantenerlas en una solución de hipoclorito de calcio (10g/140mL de agua destilada) durante 20 minutos; como lo reportado por Lugo (1955).

Salazar y Orlando (2012), emplearon el método de la jeringuilla, el cual consistió en colocar una porción pequeña de semillas de *Prosthechea vespa* y *Sobralia klotzcheana* en una jeringa estéril de 5 mL con filtro de tela, las semillas se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 30 segundos, luego fueron sometidas a una solución de hipoclorito de sodio al 0.39% con dos gotas de Tween 20, durante 5 minutos en agitación constante, seguidamente realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, para posteriormente retirar el filtro de la jeringa para realizar la siembra.

Villafuerte (2013), logró la desinfección de semillas de una cápsula dehiscente de *Barkeria whartonianana*, mediante la utilización de una solución de hipoclorito de sodio 30% (v/v) durante 10 minutos en agitación y tres enjuagues de agua estéril. Romero *et al.*, 2007, desinfectaron semillas de cápsulas dehiscentes de *L. anceps* subsp. *anceps*, las cuales colocaron en papel filtro, para posteriormente sumergirlas en etanol al 70% durante 5 minutos finalmente en una solución de hipoclorito de sodio al 0.55% por 10 min; para luego sembrarlas.

Carmona (2016), desinfectó semillas de cápsulas abiertas de *Oncidium unguiculatum*; primero en una solución de hipoclorito de sodio (clorox) al 0.6 (v/v), adicionada con una gota de dispersante (Tween 20) agitándolas constantemente

durante 15 minutos. Posteriormente, bajo condiciones asépticas (dentro de una campana de flujo laminar) se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Padrón, 2006, logró desinfectar semillas de *Govenia capitata*, las cuales se colocaron en sobres de papel filtro, para luego sujetarlas con un clip para evitar la salida de las semillas. Posteriormente, se colocaron en una solución con etanol al 70% durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se decantó el etanol y se agregó a una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% v/v (marca clorox) durante 15 minutos en constante agitación. Se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces.

Sierra (2006), llevó a cabo la desinfección de *Laelia autumnalis*; sumergiendo paquetes de semillas en solución de alcohol etílico (70%) durante 5 minutos, para posteriormente introducir las en una solución de hipoclorito de sodio con tres gotas de jabón líquido. (0.6 v/v) por 5 minutos. Finalmente bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar, se realizaron 3-4 enjuagues con agua destilada estéril.

Castillo (2002), desinfectó semillas maduras a través de introducir semillas en paquetes de papel filtro de semillas para luego sumergirlas y agitarlas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 15 minutos. Para luego enjuagarlas en agua destilada estéril en condiciones de asepsia para su previa siembra.

Rodríguez (2000), desinfectó semillas maduras de *Paphiopedilum exstaminodium* y *Paphiopedilum caudatum*, provenientes de frutos dehiscentes, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de calcio al 7% (30-35% de cloro disponible), más 1-2 gotas/100mL de emulsificante Tween 80 durante 20-30 minutos en agitación. La solución se decantó y se preparó cada vez que se utilizaba, en la campana de flujo laminar, con una coladera, las semillas se sometieron a tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

2.1.10.2 Germinación *in vitro* de semillas maduras

Domingo (1954), citado por Parra (1987), germinó semillas maduras de *Vanilla planifolia* en tres meses; los tres medios que utilizó fueron a base de extractos naturales: (a) agua de coco, b) extracto de vainilla (hojas, tallos y raíces) y c) jugo de tomate, a todos se les adicionó agar. El medio con extracto de vainilla fue el más efectivo; con 16% de germinación en 89 días.

Lugo (1955), trabajó con semillas maduras de *V. planifolia* en medio Knudson B² (10, 25 y 100%). En la primera fase, las condiciones de incubación fueron en oscuridad a 32°C por un lapso de tres meses; las observaciones definitivas se llevaron a cabo a los cinco meses después de iniciado el experimento. El medio al 10% tuvo el mayor porcentaje de germinación (49%).

2.1.10.3 Desinfección de semillas inmaduras

Divakaran *et al.* (1997), lograron la desinfección de cápsulas inmaduras de vainilla (120 a 270 días después de la polinización) al ser asperjadas con alcohol al 95% para después flamearlas. Parra (1987), consiguió establecer el cultivo *in vitro* de semillas inmaduras de *V. planifolia*, desinfectando las cápsulas con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 4%, así como 3 a 4 enjuagues con agua destilada estéril. Mientras que Philip y Nainar (1988), utilizaron cloruro de mercurio al 0.5% y 4 lavados con agua esterilizada para desinfectar semillas inmaduras de esta misma especie.

Para el caso de *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis* y *Brassavola nodosa*; Damon *et al.* (2004), desinfectaron cápsulas inmaduras con hipoclorito de sodio al 50% con dispersante (Tween 20) al 0.1% durante 5 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en condiciones asépticas. Posteriormente, también utilizaron etanol, pero al 70% durante un minuto, para luego usar hipoclorito de sodio al 80% con dispersante (Tween 20) al 0.1% durante 10 minutos en agitación

constante y finalmente con agua destilada. Suárez (2006), logró establecer la germinación *in vitro* de semillas inmaduras de *Euchile mariae*, la cápsula la desinfectó en una solución jabonosa, así como varios enjuagues con agua corriente, seguido de una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) al 30% v/v y tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

Rodríguez (2000), logró la desinfección de frutos verdes de *Paphiopedilum exstaminodium* y *Paphiopedilum caudatum*, la cápsula se lavó con agua y jabón tallándose con un cepillo suave; se desinfectó con hipoclorito de sodio doméstico (6% de cloro activo) al 50% (v/v) más 2-3 gotas de Tween 80 /100mL y se mantuvo en agitación durante 15-20 minutos. En condiciones asépticas la cápsula se enjuagó y sumergió de 3-5 minutos en agua destilada esterilizada. De igual manera, ellos utilizaron etanol, pero al 70% para flamearla posteriormente.

Mientras que Michelangeli (2010), usó cápsulas indehiscentes de *Masdevallia towarensis*, la desinfección la inicio con agua corriente jabonosa. Seguidamente, y bajo cámara de flujo laminar; las cápsulas se sumergieron en etanol 70%, y luego en cloro comercial al 20% (hipoclorito de sodio al 5.25% como componente activo) por 5 min, para finalmente enjuagarlas cuatro veces con agua destilada estéril.

Rodríguez (2013), logró establecer la desinfección de semillas de cápsulas cerradas de *Epidendrum radicans*, se lavó la cápsula cepillándola con jabón y enjuagándola al chorro corriente. Dentro de la campana de flujo laminar se colocó dentro de un vaso de precipitados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% de cloro con una gota de jabón líquido. Posteriormente se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos, para luego decantar la solución de cloro y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril para eliminar los restos de la solución; para luego sumergirlas en etanol al 70% y con ayuda de unas pinzas se retiró y se flameó.

2.1.10.4 Germinación *in vitro* de semillas inmaduras

Withner (1955), citado por Parra (1987), utilizó el medio Burgeff N₃F para germinar semillas de *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. phaeantha*, y algunos híbridos

interespecíficos procedentes de Puerto Rico. En sus experimentos utilizó cápsulas inmaduras de 45, 30, 60, 70 y 180 días después de la polinización; obteniendo buena germinación en las de 30 días. El autor consideró que el endurecimiento de la testa de la semilla empieza a los 60 días después de la polinización. Además, recomienda que el tiempo para obtener una buena germinación es a partir de cápsulas de 40 días; ya que la germinación disminuye con la edad, dado que la dureza de la testa aumenta.

Parra (1987), empleó semillas de 10, 24, 39, 40, 50, 52, 65 y 80 días después de la polinización; utilizó tres medios de cultivo: Knudson (1950), Murashige & Skoog (1962) y Knop; complementados con 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 mg/l de 2, 4-D, así como 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 mg/l de BA y 200 ml de agua de coco. Los tratamientos se incubaron en una cámara de crecimiento controlado a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo condiciones de oscuridad así como de luz. Obtuvo buenos resultados de germinación en semillas inmaduras entre 39 y 52 días después de la polinización; después de 108 días de incubación en medio MS (sin reguladores de crecimiento y compuestos orgánicos).

Philip y Nainar (1988), germinaron semillas inmaduras de *V. planifolia* en medio Burgeff N₃f complementado con 10 g de sacarosa, 12 mg/L de arginina y 10 mg/L de lisina. Cabe mencionar, que las condiciones de incubación fueron a una temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ en continua iluminación. Obteniendo primeros datos de germinación a las dos semanas de realizarse los cultivos.

Divakaran *et al.* (1997) lograron la germinación de semillas provenientes de cápsulas de 4 a 9 meses después de la polinización; utilizaron medio MS líquido y semisólido adicionándole 0.5 mg/L de IBA y 1 mg/L de BAP. Con un fotoperiodo de 14 horas y una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Kumar *et al.* (2009) trabajaron con cápsulas de 7 a 9 meses, en medio MS (50%) adicionado con 0.5 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de KIN tuvieron buenos resultados; la germinación se presentó a los 35 días. Al término de 4 meses se obtuvo el mayor número de semillas germinadas en comparación con los otros tratamientos.

Menchaca *et al.* (2011), emplearon cápsulas inmaduras de 44 días después de la polinización de cruces de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*; *V. planifolia* ♀ x *V. pompona* ♂; *V. planifolia* ♂ x *V. pompona* ♀; *V. pompona*) en 4 medios de cultivo: BM1 (Terrestrial orchid medium), BM2 (Terrestrial orchid medium+0.2 mg/L de BA), KC y MS (+400 mg/L de glutamina y 80 mg/L de sulfato de adenina). El porcentaje de germinación se registró a partir de los 100 días después de la siembra, presentando buenos resultados en el medio MS, con los siguientes porcentaje de germinación: *V. planifolia* ♂ x *V. pompona* ♀ (85%) y *V. planifolia* ♀ x *V. pompona* ♂ (57.9%), mientras que en semillas de *V. pompona* (10.8%) y *V. planifolia* (0%).

2.1.11 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de vainilla (yemas, brotes, nudos y hojas)

El cultivo de tejidos vegetales en vainilla ha resultado una eficiente opción para obtener y conservar plantas a gran escala en corto tiempo. La mayoría de los autores han estudiado explantes nodales y hojas.

George y Ravinshakar (1997), trabajaron con yemas axilares en medio MS adicionado con 2 mg/L de BAP y 1 mg de ANA; registraron un promedio de 5.7 brotes por explante. Posteriormente los brotes obtenidos se transfirieron a medio MS líquido durante 2 a 3 semanas, para luego hacer subcultivos en MS semisólido; teniendo como resultado 42 brotes en 134 días.

Divakaran *et al.* (1997) utilizaron ápices de brotes y segmentos nodales en medio MS, utilizando reguladores de crecimiento como: KIN, BAP, ANA, IBA. Obteniendo buenos resultados con la combinación de IBA (0.5 mg/L) y BAP (1 mg/L) con la cual se obtuvieron 7 brotes por segmento nodal a los 90 días de cultivo. Todos los tratamientos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 14 horas y una temperatura de 25±2°C.

Geetha y Shetty (2000), emplearon ápices de brotes y nudos en medio MS basal con 1 mg/L de BAP; obteniendo de 6 a 8 brotes por explante, después de 12 semanas.

Giridhar y Ravishankar (2004), usaron brotes en medio MS con 2.38 mg/L de BAP y 2.039 mg/L de KIN alcanzando un promedio de 9.3 brotes por explante pasados 75 días. Posteriormente se subcultivaron a medio MS adicionado con 1 mg/L de TDZ, 2 mg/L de BA, 0.5 de ANA y 10% de leche de coco; teniendo como respuesta un promedio de 17 y 30 brotes por explante en un periodo de 45 días.

Kalimuthu *et al.* (2006), emplearon nudos en medio MS basal adicionado con 1mg/L de BA y 150 mL/L de agua de coco; obteniendo alrededor de 9.43 brotes por explante después de 20 días.

Rojas (2007), trabajó con nudos de secciones terminales en medio MS modificado (MST) con 2 mg/L de BAP y 0.5 de ANA; teniendo como respuesta mayor proliferación de múltiples brotes y un grosor de tallo mayor a 3 mm; formando de 2.75 a 3.83 brotes promedio por explante en un lapso de 60 días.

Lee *et al.* (2008), usaron yemas apicales jóvenes (primero al cuarto nudo) y maduras (quinto al octavo nudo) en medio MS basal en combinación de 2.15 mg/L de BAP y 0.83 mg/L de ANA; obteniendo mejores resultados en yemas apicales jóvenes con más de 18 brotes por explante cada tres meses.

Abebe *et al.* (2009), emplearon nudos en medio MS adicionado con 1 mg/L de BA y 1.5 mg/L de KIN; consiguiendo un promedio de 3.12 a 4.17 brotes por explante después de 45 días.

Chin *et al.* (2010), utilizaron explantes nodales; logrando buenos resultados en el tratamiento con medio MS basal con 3% de sacarosa, 1 g/L de caseína hidrolizada, 0.5 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA; cuantificando hasta 35% de callo.

Chin *et al.* (2011), usaron nudos en medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 15% de agua de coco; regenerando 9.6 brotes por explante.

A partir de explantes de hoja Janarthanam y Seshadri (2008), obtuvieron callo del cual regeneraron plántulas completas de vainilla, en medio MS basal, adicionado con reguladores de crecimiento 2 mg/L de 2, 4 D y 1 mg/L de BA.

Chin y Foan (2010), trabajaron con hojas juveniles en medio MS basal (3% de sacarosa, 1 g/L de caseína hidrolizada, 2 mg/L de ANA y 2 mg/L de BA). Obteniendo 10% de callo.

Chin *et al.* (2011), usaron nudos en medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 15% de agua de coco; regenerando 9.6 brotes por explante.

A partir de explantes de hoja Janarthanam y Seshadri (2008), obtuvieron callo del cual regeneraron plántulas completas de vainilla, en medio MS basal, adicionado con reguladores de crecimiento 2 mg/L de 2, 4 D y 1 mg/L de BA.

2.1.12 Cultivo de tejidos vegetales

Con el CTV se pueden propagar plantas en forma masiva, adicionalmente es una buena alternativa para seguir preservando los recursos genéticos, elemento importante para conservar y aprovechar esta especie.

Mediante el CTV se puede aislar y cultivar asépticamente células, tejidos u órganos de plantas madre, en medios artificiales y condiciones ambientales controladas (George *et al.*, 2008). Esta ciencia que tiene múltiples aplicaciones biotecnológicas se basa en la totipotencialidad de las células diferenciadas y especializadas para formar plantas completas (Bhojwani y Dantu, 2013).

Debido a la destrucción del hábitat, las prácticas de cosecha y la sobreexplotación con fines comerciales en los países tropicales, la población de orquídeas está disminuyendo de manera acelerada. Los métodos *in vitro* se están utilizando para la conservación y la propagación de especies de orquídeas en peligro de extinción (Cuadro 2) y con fines medicinales (Lo *et al.*, 2004).

Cuadro 2. Algunas de las especies de plantas propagadas empleando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

Especie	Tipo de explante	Medio + RCV	Vía de regeneración	Autor (es)
<i>Euchile mariae</i> (Orchidaceae)	Semillas germinadas <i>in vitro</i> (secciones basales y apicales de protocormos)	MS+BA/ANA	Embriogénesis somática directa (PLB's)	Suárez, 2006
<i>Vanilla planifolia</i> (Orchidaceae)	Secciones nodales	MS+ANA/BAP	Organogénesis directa (brotes)	Rojas, 2007
<i>Dendrobium tosaense</i> (Orchidaceae)	Semillas germinadas	MS+ Homogenizado de plátano/ jugo de papa o agua de coco	Embriogénesis somática directa (PLB's)	Lo <i>et al.</i> , 2004
<i>Solanum tuberosum</i> (Solanaceae)	Segmentos nodales de plantas de invernadero e <i>in vitro</i>	MS+ diferentes niveles de agar	Organogénesis directa (plántulas)	Gopal <i>et al.</i> , 2008
<i>Indigofera tinctoria</i> L. (Leguminosae)	Brotes de meristemos axilares de plántulas germinadas	MS+BA/AIA/KIN/Ácido giberélico	Embriogénesis somática directa (brotes)	Nair y Reghunath, 2009
<i>Lycaste aromatica</i> (Orchidaceae)	Secciones de pseudobulbos: basal, medio y apical	MS+KIN/mT/BA/TD Z	Embriogénesis somática directa (PLB's) y organogénesis directa (plántulas)	Mata <i>et al.</i> , 2010
<i>Barkeria whartonianana</i> , <i>Barkeria scandens</i> (Orchidaceae)	Semillas germinadas (Secciones longitudinales de protocormos, hojas, tallo y raíz)	MS+ANA/BAP	Embriogénesis somática (PLB's)	Villafuerte, 2013
<i>Backebergia militaris</i> (Cactaceae)	Plántulas germinadas (<i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>), areolas y secciones (apicales, laterales)	MS+Ácido giberélico (A ₄ +A ₇)+ANA/BA/KIN/ mT/+PVP+Carbón activado	Organogénesis directa (brotes)	Fernández, 2014
<i>Mammillaria hernandezii</i> (Cactaceae)	Plántulas Secciones basales y apicales	MS+ANA/BAP	Organogénesis directa e indirecta (brotes)	Pérez, 2015

Abreviaturas: BA: 6-Benciladenina; BAP: 6-Bencilaminopurina; ANA: Ácido α -naftalenacético; PLB's: Protocorm like bodies (Cuerpos parecidos a protocormos); AIA: Ácido indol-3-acético; KIN: Kinetina; mT: Metapolina 6-(3-Hydroxibencilamino); TDZ: Tiazurón 1-fenil-3-(1, 2, 3-tiadiazol-5-il) urea; PVP: Polivinil pirrolidona

2.2 JUSTIFICACIÓN

Vanilla planifolia, es una especie endémica de México, escasa en la naturaleza y ya en categoría de Protección Especial (NOM-059-SEMARNAT-2010) (SEMARNAT, 2010), no solamente porque los ambientes naturales que alguna vez habitó han sido destruidos (totalmente transformados) y las poblaciones silvestres ocupan ambientes alterados y en continua degradación. Por otro lado, los individuos cultivados no podrán sobrevivir fuera de las áreas que ocupan como monocultivo, porque en el aprovechamiento de esta especie, por muchos años y hasta la fecha, la producción de miles de individuos para establecer y abastecer plantaciones comerciales ha sido mediante la propagación clonal, de un escaso número de ejemplares, lo que ha representado una base genética (similar) muy limitada. El manejo en cuanto al cultivo, así como a las condiciones socio-económicas han sido algunos de tantos factores que han provocado esta erosión de la variabilidad genética, que hoy la hace altamente vulnerable, a enfermedades, plagas, contaminación y variaciones del clima.

Un manejo integral de factores en la reproducción de la especie podría incrementar la variabilidad genética de los individuos; y paralelo a la protección del hábitat, se propiciaría la conservación de la especie, su propagación y sería base para su aprovechamiento sostenible. Un paso inicial es explorar, estimular y establecer un control de la germinación de semillas, así como lograr el desarrollo de plantas a partir de secciones de estructuras somáticas de las plántulas obtenidas de las semillas para incrementar el número de plantas genéticamente diferentes. El cultivo de tejidos vegetales ha probado su reconocimiento como una útil herramienta biotecnológica en la propagación, conservación y aprovechamiento de especies cultivadas y en peligro de extinción y es la alternativa viable para contribuir a la solución de la problemática de *V. planifolia* y la conservación del medio ambiente.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

Establecer condiciones *in vitro* para lograr plantas de *Vanilla planifolia* a partir del cultivo *in vitro* de semillas y segmentos de tallos de plantas adultas procedentes de plantaciones; así como su aclimatización.

2.3.2 Objetivos particulares

Establecer asépticamente el cultivo *in vitro* de semillas y de estructuras somáticas (nudos).

Comparar el tiempo de germinación y crecimiento entre semillas de cápsula madura e inmadura.

Contrastar el efecto de distintas concentraciones de agua de coco en el cultivo de nudos.

Comparar el efecto de distintas concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal en el cultivo de nudos.

Determinar el tipo de explante con mayor potencial de regeneración.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Propagación *in vitro*

3.1.1 Material biológico

3.1.1.1 Semillas

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, IB-UNAM. El material que se empleó al inicio del experimento fueron semillas de *Vanilla planifolia* de cápsulas maduras (**Fig. 5a y b**) e inmaduras (**Fig. 6a**). Todas las cápsulas fueron donadas por el Sr. Miguel Ángel Acosta; se colectaron en la localidad de Tres encinos, Municipio de San Rafael; Veracruz.

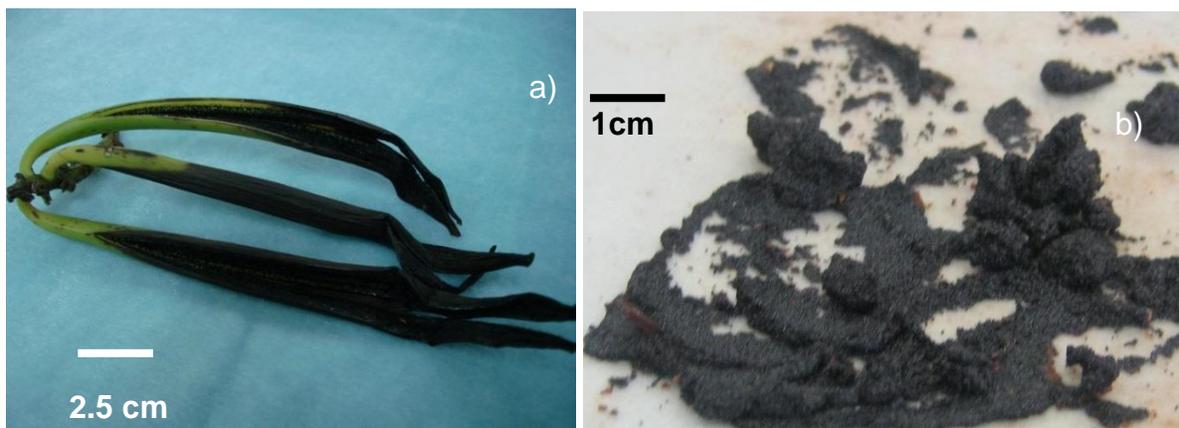


Fig. 5. a) Cápsulas cosechadas de 270 días aproximadamente después de su polinización. b) Semillas con exceso de aceites extraídas de las cápsulas maduras.

3.1.1.2 Secciones apicales de plantas adultas

Se utilizaron 5 secciones apicales de plantas adultas (**Fig. 6b**) provenientes de plantaciones comerciales: Primero de Mayo y Rancho 20 soles del municipio de Papantla, Veracruz; fueron donadas por la Dra. Estela Sandoval Zapotitla. Estas secciones tenían de 4 a 5 nudos.

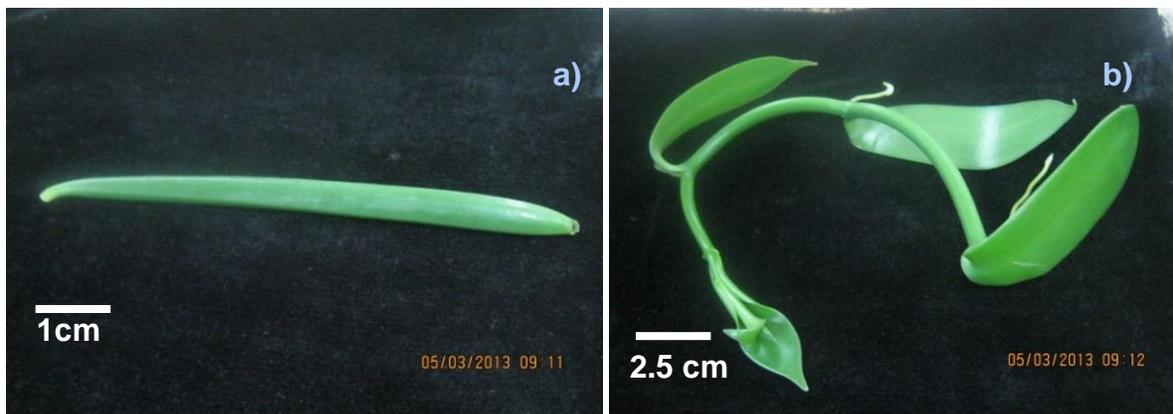


Fig. 6. a) Cápsula inmadura de 40 días después de su polinización. b) Sección apical de planta adulta proveniente de plantaciones comerciales.

3.1.1.3 Medio de cultivo

Para el establecimiento de todo el material biológico; se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% de la concentración de compuestos inorgánicos y 100% de la concentración de compuestos orgánicos, así como una fuente de carbono de 30 g/L de sacarosa. Se ajustó el pH a 5.7 empleando NaOH ó HCl, una vez medido el pH se le adicionó el gelificante (Gellan gum 3.5 g/L), se agitó, disolvió y calentó hasta que comenzó a dar un hervor. Una vez disuelto, se procedió a verter 25 mL en frascos gerber para luego esterilizarlos en un autoclave a 120°C (1.5 kg/cm²) por 17 minutos.

3.2 Desinfección y establecimiento

3.2.1 Semillas de cápsula madura

Estas semillas (**Fig. 5b**) se extrajeron de las cápsulas dehiscentes (abiertas), se realizaron varios enjuagues con agua corriente procurando eliminar los residuos grasos que pudiesen haber quedado en la cápsula. Se agitaron en una solución jabonosa durante 5 minutos y se dieron varios enjuagues para quitar el exceso de jabón. Se sumergieron en alcohol etílico al 70% por 1 minuto. Bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar se pasaron a una caja Petri que contenía una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) 30% v/v con agua

destilada estéril durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron 3-5 enjuagues con agua destilada estéril. La decantación se llevó a cabo con la ayuda de una jeringa. Finalmente las semillas se esparcieron homogéneamente en el medio de cultivo MS (50/100), (Salazar y Orlando, 2012; Villafuerte, 2013), con modificaciones sugeridas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, IB-UNAM.

3.2.2 Semillas de cápsula inmadura

La manipulación de la cápsula inmadura (**Fig. 6a**) se llevó a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones asépticas, flameándose 2 veces con alcohol etílico al 96%, posteriormente se colocó en cajas Petri, para hacer un corte transversal seguido de cortes longitudinales para extraer las semillas con una espátula. Para esparcirlas uniformemente en el medio de cultivo MS (50/100), (Parra, 1987; Damon *et al.*, 2004; Michelangeli, 2010), con modificaciones sugeridas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, IB-UNAM.

3.2.3 Secciones apicales de tallos

Las secciones apicales se lavaron con agua corriente. Posteriormente se consideraron sólo las partes nodales, retirando partes muertas, hojas, raíces y entrenudos. Estos nudos se agitaron en una solución jabonosa alrededor de 5 minutos. Se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 1 minuto. Se desinfectaron con una solución de benomil (1 g/L) por 2 horas y se enjuagaron en agua corriente. Una vez transcurrido el tiempo, bajo condiciones asépticas y directo en una campana de flujo laminar, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) 30% v/v con agua destilada estéril por 30 minutos. Consecutivamente se realizaron enjuagues (3-4) con agua destilada estéril. Por último, se desinfectó con antibiótico (250 mg/L de cefotaxima) durante 1 hora, para luego pasarlos directo a frascos con medio de cultivo MS (50/100); cada nudo se colocó en un solo frasco (Rojas, 2007; Chin *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008), con

modificaciones sugeridas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, IB-UNAM.

3.3 Condiciones de incubación

Los frascos que contenían las semillas inmaduras así como la mitad de los frascos de las semillas maduras se colocaron bajo condiciones de obscuridad a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. En cuanto a los frascos restantes de semillas maduras y todos los frascos que contenían las secciones nodales se mantuvieron en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.4 Cultivo de ápices y bases de tallos

A partir de la germinación de los dos tipos de semillas, se obtuvieron protocormos con estructuras llamadas rizoides; los cuales fueron creciendo hasta alcanzar el tamaño de plántulas. Las cuales sirvieron como fuente de explantes para la fase de inducción; sólo se consideraron las que alcanzaron una altura de 5 nudos o más. Posteriormente en una campana de flujo laminar, en condiciones de asepsia, y en cajas Petri; se les realizó un corte transversal en la parte apical y basal del tallo, retirando raíces y nudos centrales. Estas secciones (apicales y basales) se colocaron por separado en medio MS (50/100) en combinación de 5 tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal y 3 con agua de coco (**Tabla 1**). En el caso de los controles, fue el mismo medio de cultivo (MS 50/100) sin la adición de reguladores de crecimiento ni agua de coco. Para hacer un total de 10 repeticiones por tratamiento, controles y tipo de semilla. Al finalizar dos meses de inducción en el medio utilizado para todos los tratamientos incluidos los controles, se procedió a registrar el número total de brotes regenerados por cada explante.

3.5 Individualización

Al finalizar la fase de inducción se realizó la individualización de los brotes regenerados. Esto se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia y en una campana

de flujo laminar. Con la ayuda de unas pinzas de disección, se tomaron los explantes y se colocaron en una caja Petri para separar los brotes, para luego subcultivarlos en frascos de medio MS (50/100), con la finalidad de promover el enraizamiento para la obtención de plántulas completas y lograr su aclimatización. Esta fase se concluyó en 30 días posteriores.

Tabla 1. Combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento y agua de coco utilizados en el cultivo *in vitro* de nudos de *V. planifolia*.

ANA (mg/L)	BAP (mg/L)	AC (%)
0	0	0
0	2	10
0.5	1	20
1	0	40
1	2	

Abreviaturas: ANA: ácido naftalenacético; BAP: 6-Bencilaminopurina; AC: agua de coco.

3.6 Aclimatización

Para esta fase, se tomaron todos los brotes individualizados de los tratamientos de semillas inmaduras con agua de coco; ya que estos presentaban una altura mínima de 10 cm y con 4 a 7 nudos. La cual consistió en extraer las plántulas de los frascos; para luego enjuagarlas con agua corriente y retirarles el medio de cultivo que estaba adherido en las raíces y en la parte basal.

Después cada plántula se transfirió individualmente a una maceta, que contenía una mezcla 1:1:1:1 de peat moss, corteza de pino, agrolita y tepojal; todos previamente esterilizados. Cabe mencionar, que para mantener un alto nivel de humedad, se les colocaron vasos de plástico transparentes a cada una de las macetas.

En los dos meses de aclimatización, las plantas se mantuvieron en el cuarto de aclimatización del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico

del Instituto de Biología de la UNAM. El cual alcanzaba una temperatura de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Los riegos se realizaron una vez a la semana, para mantener húmedo el sustrato. La sobrevivencia de las plantas se evaluó al término de dos meses de adaptación al nuevo ambiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Desinfección del material biológico

4.1.1 Semillas maduras

En cuanto, a la desinfección de las semillas maduras de *Vanilla planifolia*; resultó efectiva, ya que los frascos obtenidos de la siembra no presentaron contaminación. La aplicación del producto jabonoso favoreció el manejo de las semillas, puesto que liberó a las mismas de la sustancia grasa presente en el fruto. La aplicación del hipoclorito de sodio y alcohol etílico llevaron a cabo el proceso de desinfección; debido a que ésta resulta complicada, a pesar de que las semillas de vainilla pueden observarse a simple vista, por presentar una coloración oscura en comparación con semillas de otras especies de orquídeas, las cuales son diminutas semejantes a polvo.

Existen diversos trabajos de semillas maduras de orquídeas; los cuales, han conseguido establecer una desinfección exitosa, como son: Salazar y Orlando (2012), Villafuerte (2013) y Carmona (2016), entre otras investigaciones, con las cuales el presente trabajo comparte similitudes; observándose que utilizaron principalmente sustancias jabonosas, soluciones a base de hipoclorito de sodio y alcohol en diferentes proporciones y concentraciones.

4.1.2 Semillas inmaduras

Para semillas inmaduras, se empleó únicamente alcohol etílico al 96% para asperjar la vaina de *V. planifolia* y flamear en dos ocasiones; la desinfección superficial resultó efectiva, puesto que los frascos que se obtuvieron de la siembra no presentaron contaminación. El resultado de la desinfección superficial, resultó efectiva; dado que el fruto estaba cerrado debido a su inmadurez y en su interior las semillas se mantuvieron asépticas, compartiendo resultados con Divakaran *et al.* (1997). No obstante, para vainilla y otras especies de orquídeas, se han realizado desinfecciones minuciosas, en las cuales, además de la desinfección superficial,

han empleado otras sustancias en distintas concentraciones como Tween, y soluciones de hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio y alcohol etílico o etanol, considerando por los investigadores que resulta necesaria una desinfección exhaustiva; ya que la forma, textura y maduración del fruto no es homogénea para todas, tales son los casos de Parra (1987), Damon *et al.* (2004), Suárez (2006) y Rodríguez (2000), por mencionar algunos.

4.1.3 Secciones apicales de tallos

La desinfección de las partes nodales provenientes de secciones apicales de plantaciones comerciales; no fue efectiva ya que hubo contaminación por hongos y bacterias en un 90%. Aunque se realizaron varias desinfecciones para lograr su establecimiento, fue imposible; ya que el tejido de los mismos se oxidó, hasta llegar a un daño tan severo, de tal manera que no pudieron sobrevivir. Lo anterior se puede deducir, dado a que uno de los problemas fundamentales en el cultivo de la vainilla, es la infestación de las plantas en el campo por diversos hongos, entre ellos *Fusarium oxysporum* (Jiménez *et al.*, 2015). El patógeno se incorpora a tejidos de la planta y contrarresta su desinfección.

Los explantes que no presentaron contaminación sobrevivieron (**Fig. 7**), y pudieron colocarse en medio MS (50/100), no se les pudo establecer en los tratamientos y repeticiones previstos; puesto que era un pequeño porcentaje que no cubría con las expectativas.

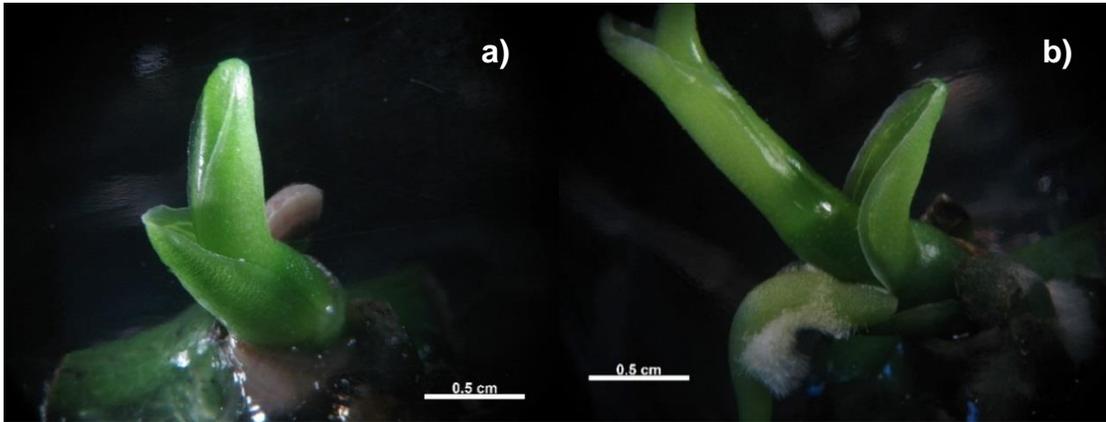


Fig. 7. Brotes obtenidos a partir de nudos de secciones apicales de vainilla de plantaciones comerciales; en medio MS (50/100) a) Brote con emergencia de hojas de 180 ddc. b) Brote con emergencia de hojas y raíces a los 209 ddc. **Abreviaturas: ddc: días después de su cultivo.**

4.2 Germinación asimbiótica de *V. planifolia*

Se logró la germinación asimbiótica de *V. planifolia* tanto en semillas inmaduras como maduras, en medio MS (50/100). Registrando las primeras un 70% de germinación a los 187 días después de la siembra y para las maduras un 90% a los 600 días.

En los primeros 85 días después de la siembra las semillas inmaduras en condiciones de oscuridad; mostraron cambios en las semillas. Dentro de los factores que se consideraron para la germinación estuvieron el rompimiento de la testa e incremento del tamaño del embrión. Se pudo observar que el tiempo de germinación reportado por Parra (1987), se asemeja con el presente estudio, ya que él obtuvo resultados en semillas inmaduras a los 108 días en condiciones de oscuridad en medio MS sin reguladores de crecimiento. Pedroso *et al.* (2012), lograron la germinación de vainilla en semillas inmaduras de 6 meses después de su polinización a los 120 días después de su cultivo, mediante la escarificación con ácido sulfúrico concentrado por 60 segundos y un pre-remojo con agua destilada por 24 horas en medio MS con 25% de nitrógeno. Mientras que Vivar (2004), reportó la germinación de semillas inmaduras de 154 días después de la polinización,

iniciándose esta etapa a las 21 semanas después de haber sido establecidas *in vitro*.

Cabe mencionar, que la germinación en semillas maduras no se dio bajo condiciones de oscuridad. Sin embargo, los tratamientos que se colocaron en condiciones de luz; germinaron a los 175 días después de la polinización. Otro trabajo en el que reportan una germinación tardada es el de Romero *et al.* (2007), quienes registran la germinación en *Laelia anceps* subsp. *anceps*, a los 270 días después de la siembra, en medio MS al 50 y 100%.

El embrión tenía tonalidades blanquecinas; las cuales fueron cambiando con el transcurso de los días desde un verde muy tenue hasta un verde un poco más oscuro, lo anterior concuerda con Arditti (1967), quien menciona que un aspecto fisiológico importante de la germinación de semillas de orquídeas es el desarrollo de protocormos con coloración verde, Flores *et al.* (2008) consideraron la germinación cuando el embrión absorbió agua e incrementó su circunferencia y longitud, llegando a romper la testa.

El crecimiento en MS (50/100) de los protocormos de semillas maduras e inmaduras fue diferente, ya que hubo notable crecimiento de plántulas en las inmaduras, en un menor tiempo. Mientras que con las maduras el tiempo de crecimiento fue prolongado así como su crecimiento.

Los cambios notorios en la fase de germinación fueron: semillas hinchadas, rompimiento de la testa, crecimiento de embrión, presencia de rizoides y coloración blanquecina a verde tenue hasta llegar a un verde intenso (**Fig. 8**).

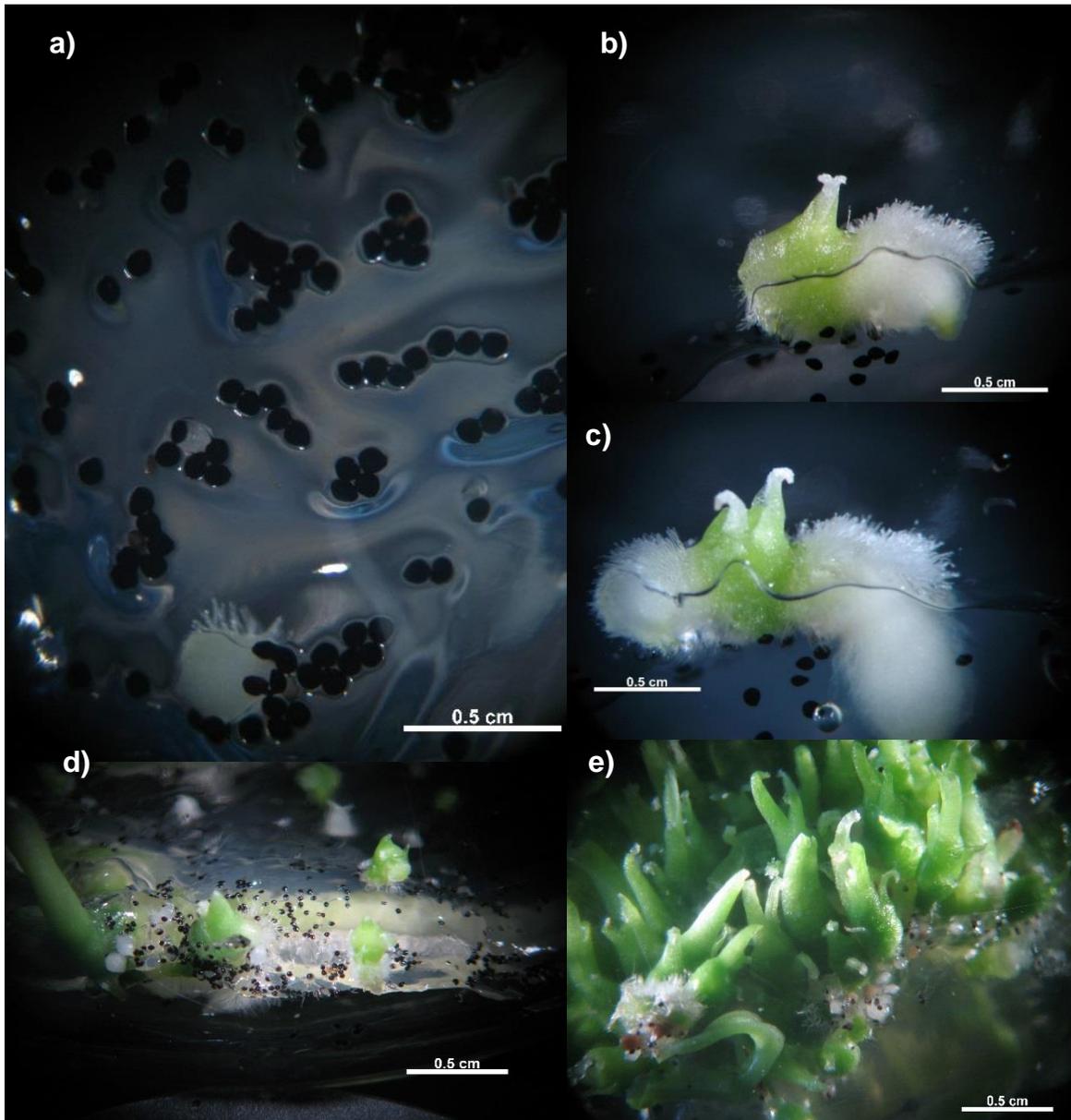


Fig. 8. Germinación de semillas maduras de *V. planifolia* en medio MS (50/100) a) Semillas hinchadas, algunos protocormos de coloración blanquecina y con presencia de rizoides (175 días después del cultivo). b) Protocormo de coloración verde, crecimiento de primordio foliar y emergencia de primera raíz (201 ddc). c) Elongación y emergencia de raíces y hojas (210 ddc). d) Plántulas y protocormos en diferentes etapas de crecimiento, y aumento del porcentaje de germinación (545 ddc). e) Proliferación de plántulas y protocormos con emergencia de raíces y hojas (678 ddc). **Abreviaturas: ddc: días después de su cultivo.**

4.3 Inducción de ápices y bases de tallos

El utilizar reguladores de crecimiento puede jugar un papel importante en el cultivo *in vitro*, ya que permiten maximizar el potencial de crecimiento y desarrollo del tipo de explante o material vegetativo. Las auxinas y las citocininas son los principales reguladores de crecimiento en las plantas; ya que están involucradas en la regulación de la diferenciación celular (Lee *et al.*, 2007). Se requiere de un balance apropiado entre auxinas y citocininas en el medio de cultivo para lograr la formación de plantas a partir del explante utilizado (Suárez, 2006).

Por otro lado, a pesar de que el uso de reguladores es una técnica mayormente reproducible y exacta (Menezes *et al.*, 2016); la adición de compuestos orgánicos es de suma importancia para el desarrollo y aclimatización de muchas orquídeas. Además, tienen efectos que potencializan el medio de cultivo (Salazar y Orlando, 2012); estos agregados favorecen en gran medida el crecimiento así como la formación de raíces y pseudobulbos por la alta concentración de azúcares, aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento que contienen (Moreno y Menchaca 2007; Martínez y Chávez, 2012; Espinosa, 2002 y Flores *et al.*, 2008). El agua de coco en un medio de cultivo simula los efectos de citocininas, influyendo en el desarrollo de brotes y hojas (Menezes *et al.*, 2016; Espinosa, 2002) y permite a plantas obtenidas *in vitro*, sobreponerse a pérdidas de deshidratación entre el cambio del ambiente, *in vitro* a invernadero y campo (Martínez y Chávez, 2012). Dentro de las ventajas que se encuentran al agregar compuestos orgánicos al medio es su bajo costo comparado con el de los reguladores de crecimiento como las auxinas y citocininas (Moreno y Menchaca, 2007; Menezes *et al.*, 2016). La composición del AC ha resultado tener buenos beneficios en protocolos de micropropagación y crecimiento *in vitro*, así como el desarrollo de diferentes especies de orquídeas (Chin *et al.*, 2011).

En la presente investigación se logró inducir brotes múltiples mediante nudos apicales y basales de plántulas de semillas maduras e inmaduras de *V. planifolia* en medio MS (50/100), adicionándole distintas combinaciones de ANA y BAP, así como de Agua de coco (AC).

Es importante mencionar, que para los dos tipos de explantes (basales y apicales); la respuesta morfogénica fue la misma, así como para todos los tratamientos. En las dos primeras semanas posteriores al cultivo se obtuvieron las primeras respuestas; en las que se pudo observar la emergencia de raíces, crecimiento de un nuevo brote en la parte axilar del explante, aparición de nuevos nudos y crecimiento de hojas.

Después de 2 meses de inducción, la mayoría de los tratamientos que formaron brotes mostraron cambios eventualmente en su tamaño; ya que en algunos era visible el alargamiento de entrenudos. Asimismo, la coloración de los brotes en los tratamientos con RCV fue cambiando con el paso del tiempo, puesto que al inicio de su emergencia eran de tonalidades blanquecinas; pero fueron cambiando a un color verde claro.

A los 60 días de cultivo, era evidente el crecimiento de brotes en tratamientos con AC en comparación con los de RCV, así como hojas, raíces y entrenudos bien definidos. Se observó en la mayoría de los explantes con AC, crecimiento de raíces y hojas vigorosas.

4.4 Cultivo de nudos apicales y basales de plántulas de semillas maduras. Organogénesis directa

La evaluación del crecimiento de brotes fue a partir de los 60 días después de la disección de los explantes y cultivo en los diferentes tratamientos de RCV y AC (**Tabla 2**).

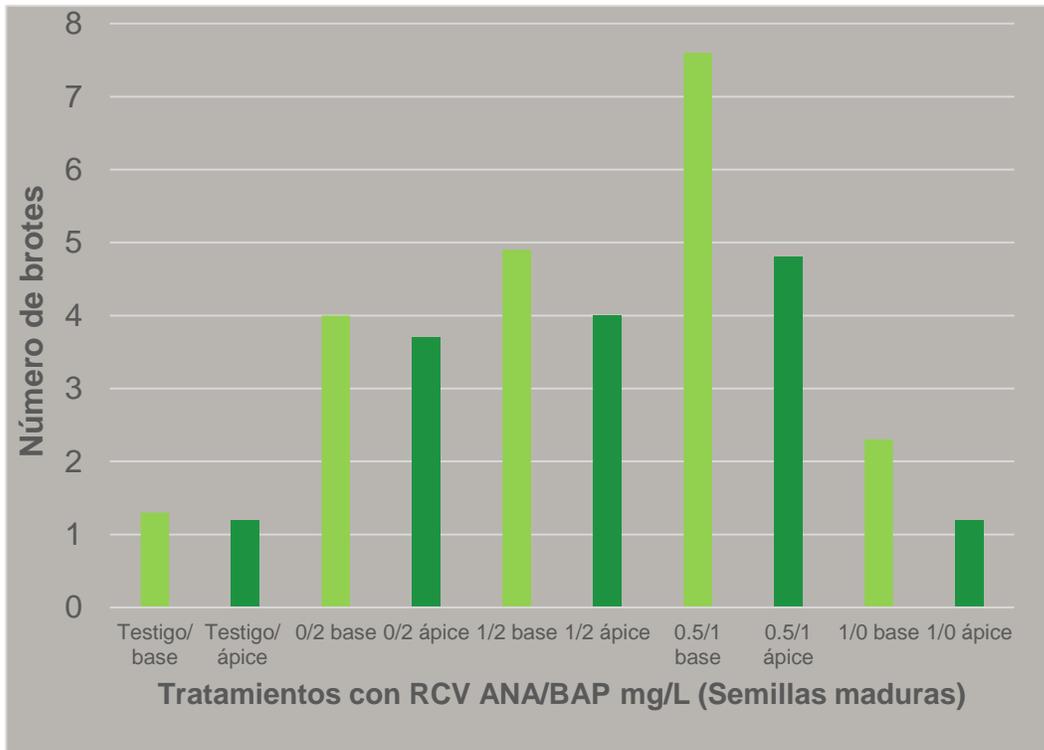
Aunque hubo buenos resultados en todos los tratamientos en cuanto a la regeneración de brotes (**Gráfica 1**), en lo referente a respuestas organogénicas como: raíces, hojas, brotes y nudos. Los mejores resultados en vigor, se obtuvieron en los tratamientos con agua de coco en los dos tipos de explante. Puesto que presentaban buen sistema radicular, los brotes de mayor tamaño (mayor número de nudos y mayor longitud) y de color verde intenso, las hojas más anchas y largas.

La proliferación de brotes en los explantes basales se reactivó en la periferia del nudo (**Fig. 9c**); mientras que en los explantes apicales se fue reactivando en la mayoría de los nudos que iban creciendo en el explante inicial (**Fig. 9b**). Esto quizá se deba, a que en este tipo de tejido hay actividad celular.

Tabla 2. Promedio de brotes obtenidos de explantes apicales y basales de plántulas de *V. planifolia* (provenientes de semilla madura) en medio MS con reguladores de crecimiento y agua de coco. Después de 60 días de cultivo.

Tratamiento		Promedio de brotes (explantes basales de tallo)	Promedio de brotes (explantes apicales de tallo)
ANA (mg/L)	BAP (mg/L)		
0	0	1.3	1.2
0	2	4	3.7
1	2	4.9	4
0.5	1	7.6	4.8
1	0	2.3	1.2
AC (%)			
0		1.3	1.2
10		2.2	1.7
20		2.2	1.9
40		2.5	1.9

Abreviaturas: ANA: ácido naftalenacético; BAP: 6-Bencilaminopurina; AC: agua de coco.



Gráfica 1. Brotes obtenidos de secciones apicales y basales de plántulas de semillas maduras en medio MS (50/100) y RCV, después de 60 días de inducción. **Abreviaturas: RCV: reguladores de crecimiento vegetal.**

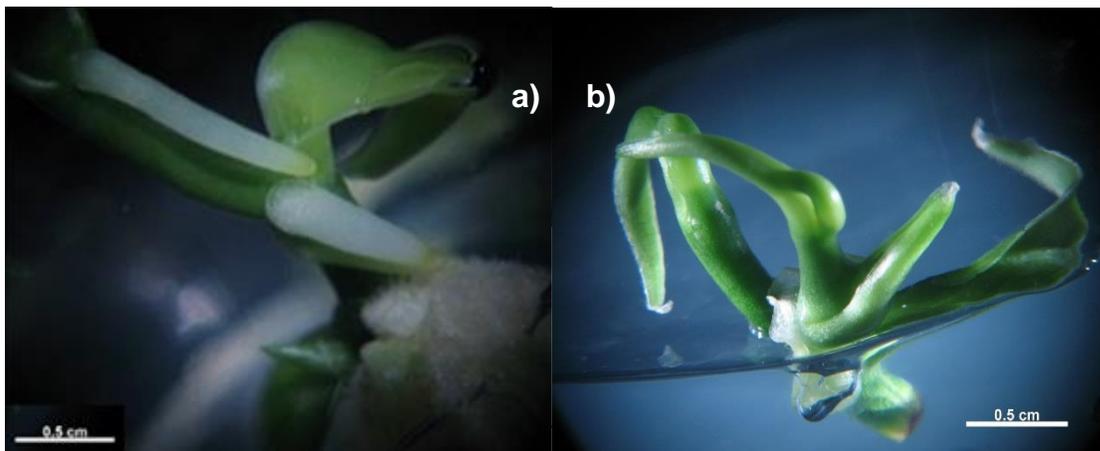


Fig. 9. Brotes regenerados vía organogénesis directa en explantes apicales y basales de plántulas de semillas maduras de los tratamientos RCV. **Explantes apicales:** a) ANA/BAP 0/1 brotes elongados, hojas de buen tamaño y raíces extensas y numerosas. b) ANA/BAP 0/2 crecimiento de brotes múltiples sin emergencia de raíces. 30 días de inducción.

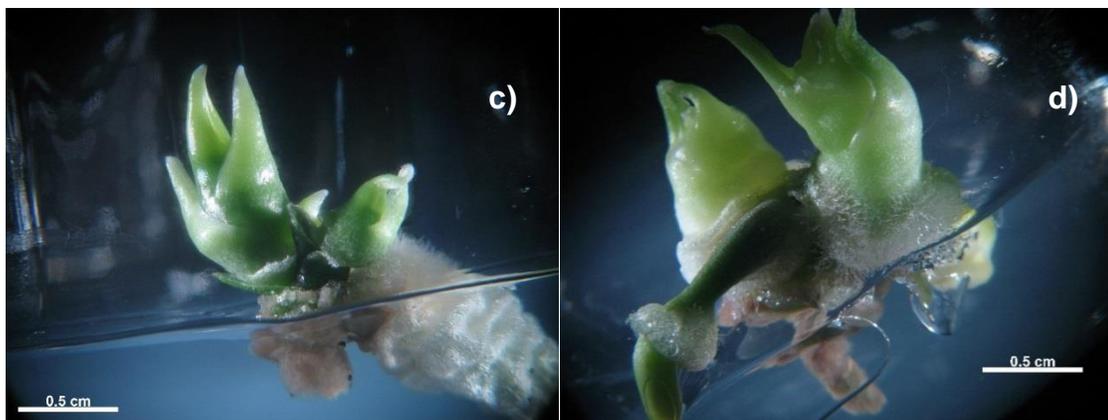
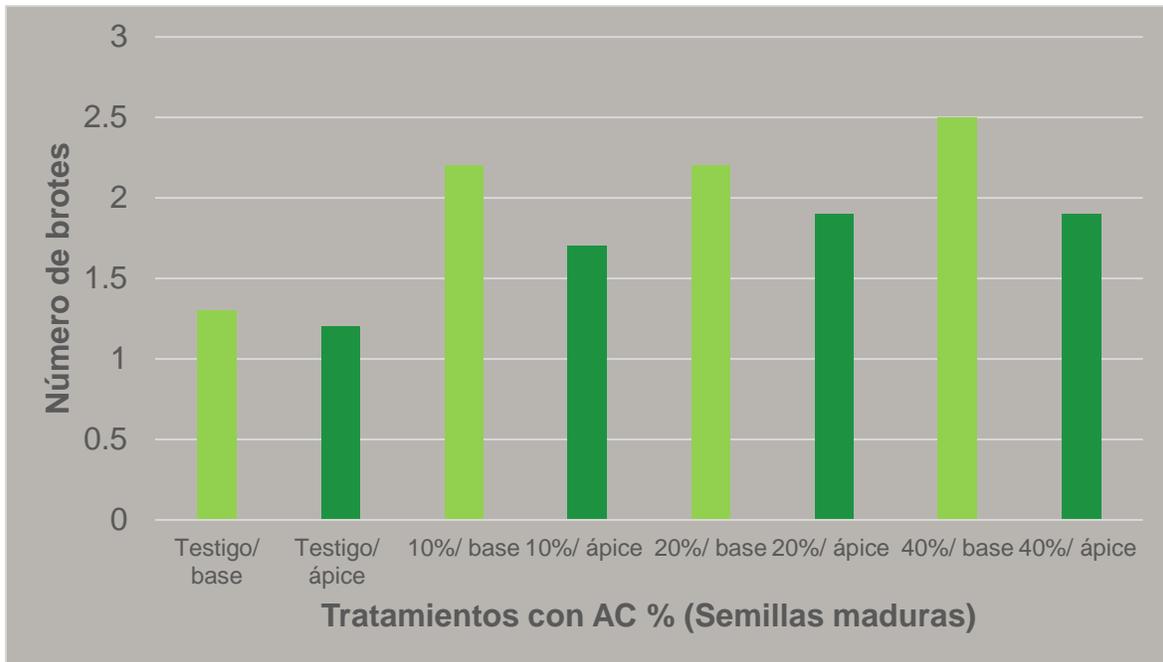


Fig. 9. Brotes regenerados vía organogénesis directa en explantes apicales y basales de plántulas de semillas maduras de los tratamientos RCV. **Explantes basales:** c) ANA/BAP 0.5/1 crecimiento de brotes y poca proliferación de raíces. d) ANA/BAP 1/2, proliferación de brotes múltiples, con escasas raíces. Después de 30 días de inducción.

En cuanto a la respuesta de los explantes basales; se observó que el tratamiento en ANA/BAP 0.5/1, generó 7.6 brotes por explante. Mientras que en los tratamientos con agua de coco hubo mayor número de brotes en la concentración al 40% con 2.5 brotes por explante (**Gráfica 2**).

En los brotes apicales de los tratamientos con reguladores de crecimiento, también se obtuvo buena respuesta en ANA/BAP 0.5/1, con 4.8 brotes por explante. En cuanto a los tratamientos con agua de coco, se obtuvo mayor número de brotes en las concentraciones de 20 (**Fig. 10c**) y 40% (**Fig. 10d**) respectivamente con 1.9 brotes por explante.

El tratamiento testigo tuvo menor proliferación de brotes por explante tanto basales como apicales, con 1.3 y 1.2 respectivamente.



Gráfica 2. Brotes obtenidos de secciones apicales y basales de plántulas de semillas maduras en medio MS (50/100) y AC, después de 60 días de inducción.

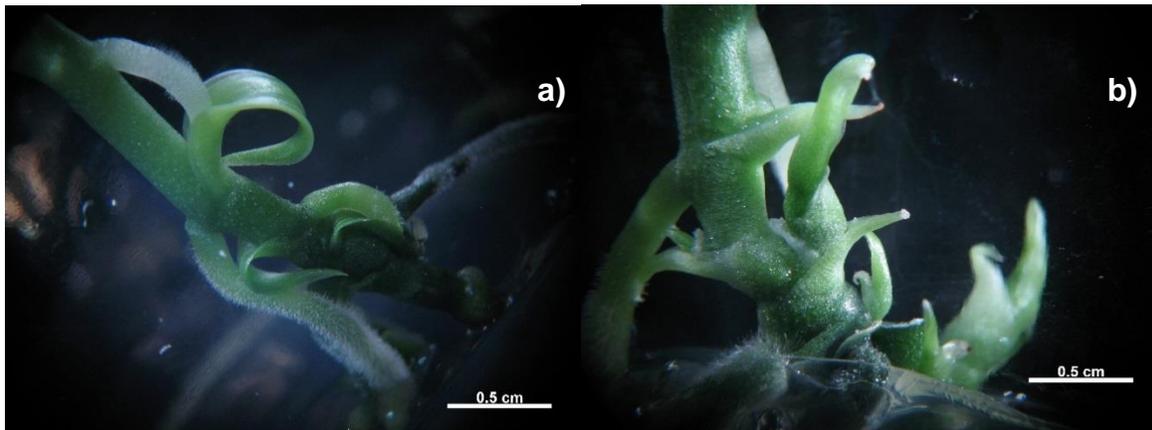


Fig. 10. Brotes regenerados vía organogénesis directa en explantes apicales y basales de plántulas de semillas maduras de los tratamientos con AC. **Explantes apicales:** a) 10% AC brotes elongados con emergencia de hojas y raíces extensas. Después de 60 días de inducción. **Explante basal:** b) 10% AC proliferación de brotes múltiples, con escaso número de hojas y buen crecimiento radicular

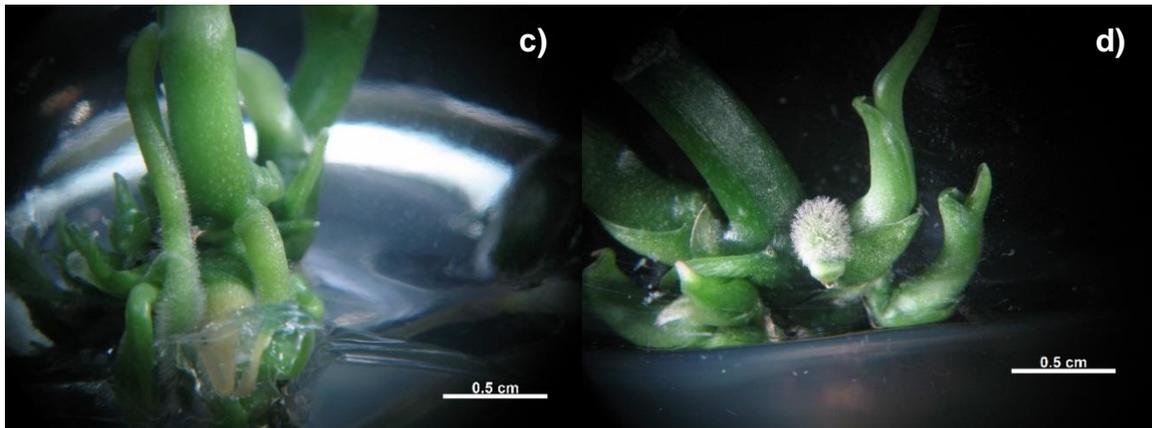


Fig. 10. Brotes regenerados vía organogénesis directa en explantes apicales y basales de plántulas de semillas maduras de los tratamientos con AC. **Explantes basales:** c) 20% AC formación de brotes múltiples, con abundantes raíces. d) 40% AC crecimiento de brotes múltiples, con poca emergencia de hojas y raíces. Después de 60 días de inducción. **Abreviaturas: AC: agua de coco.**

4.5 Cultivo de nudos apicales y basales de plántulas de semillas inmaduras. Organogénesis directa.

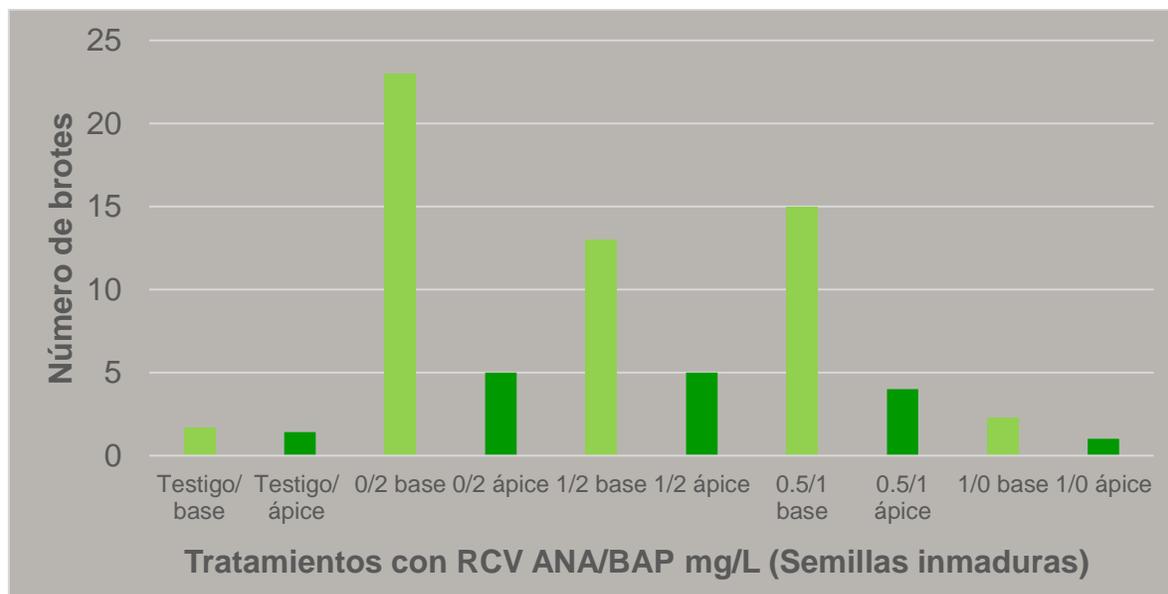
Los reportes en cuanto al número de brotes por explante, fue a partir de los 60 días después de la disección de los explantes y cultivo en los diferentes tratamientos de RCV y AC (**Tabla 3**). En el transcurso de una semana, se presentaron las primeras respuestas en todos los tratamientos; las cuales fueron la emergencia de raíces, así como de brotes.

Tabla 3. Promedio de brotes obtenidos de explantes apicales y basales de plántulas de *V. planifolia* (provenientes de semillas inmaduras) en medio MS con reguladores de crecimiento y agua de coco. Después de 60 días de cultivo.

Tratamiento		Promedio de brotes (explantes basales de tallo)	Promedio de brotes (explantes apicales de tallo)
ANA (mg/L)	BAP (mg/L)		
0	0	1.7	1.4
0	2	23	5
1	2	13	5
0.5	1	15	4
1	0	2.3	1
AC (%)			
0		1.7	1.4
10		1.9	1.7
20		5.4	1.7
40		3.1	2.4

1 explante/frasco con 10 repeticiones/tratamiento para un total de 10 explantes.

Abreviaturas: ANA: ácido naftalenacético; BAP: 6-Bencilaminopurina; AC: agua de coco.



Gráfica 3. Brotes obtenidos de secciones apicales y basales de plántulas de semillas inmaduras en medio MS (50/100) y RCV, después de 60 días de inducción.

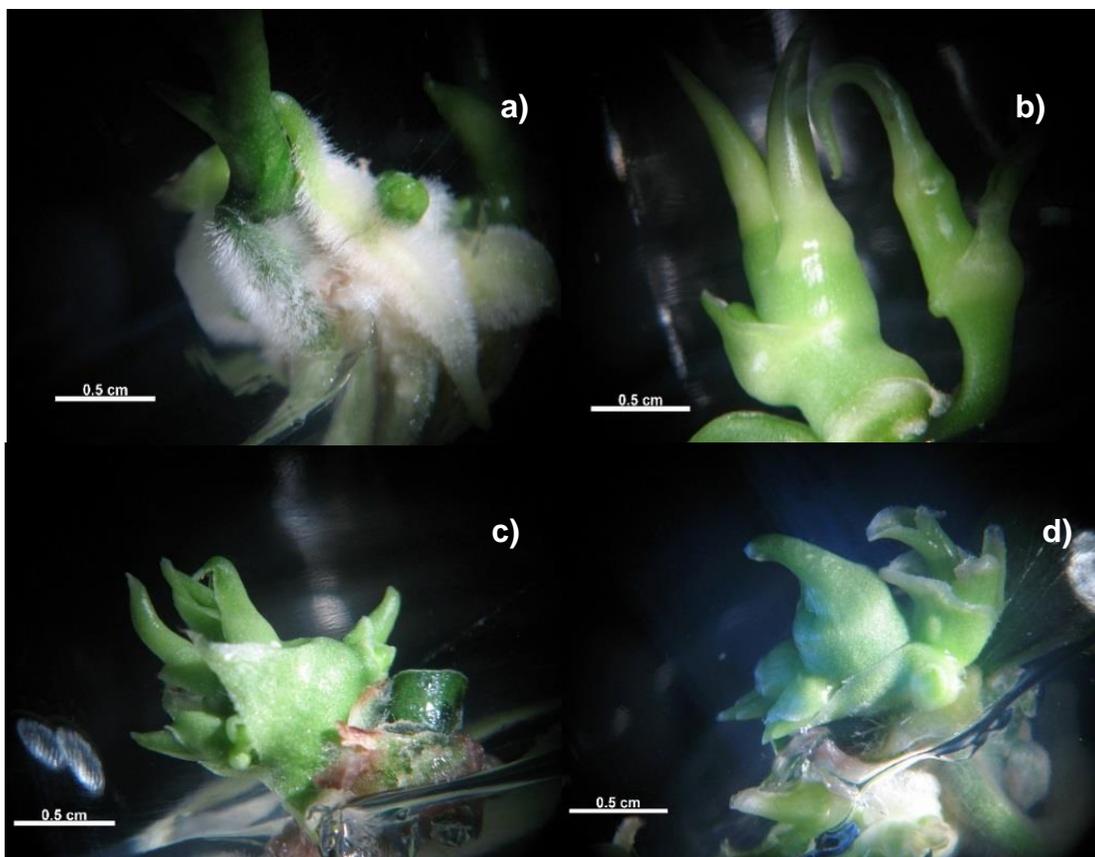


Fig. 11. Brotes regenerados vía organogénesis directa en explantes apicales y basales de plántulas de semillas inmaduras de los tratamientos RCV. **Explantes apicales:** a) ANA/BAP 0/1 brotes elongados con un extenso sistema radicular b) ANA/BAP 0.5/1 proliferación de brotes, con escasa emergencia de raíces y hojas de tamaño pequeño. Después de 60 días de inducción. **Explantes basales:** c) ANA/BAP 0.5/1 proliferación de brotes múltiples de tamaño pequeño, con nula emergencia de raíces y escasa presencia de hojas. d) ANA/BAP 0/2 crecimiento de brotes múltiples, escaso número de raíces. Después de 60 días de inducción.

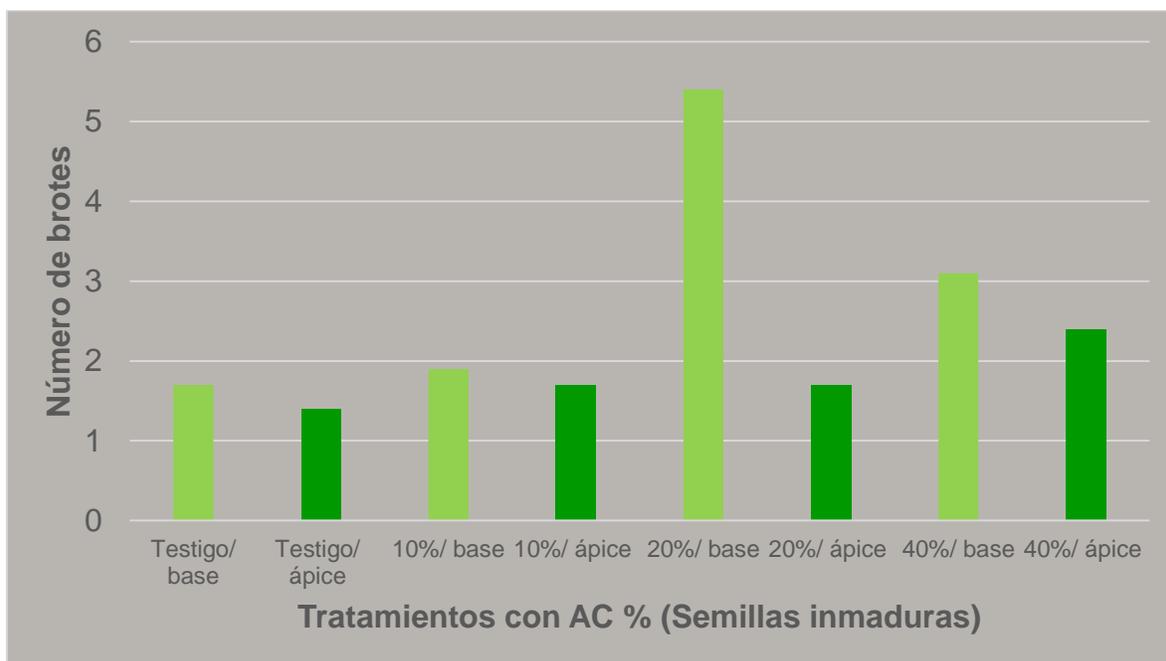
Como se muestra en los resultados anteriores, hubo buena respuesta en explantes basales en RCV (**Gráfica 3**), ya que la mayor proliferación de brotes en reguladores de crecimiento se dio en el tratamiento ANA/BAP 0/2 (**Fig. 11d**), con 23 brotes por explante. En los tratamientos con agua de coco, hubo buenos resultados en el tratamiento al 20% con 5.4 brotes en un período 60 días de cultivo.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en los explantes apicales, se puede observar que en los reguladores de crecimiento hubo mayor cantidad de brotes en

los tratamientos ANA/BAP 0/2 y ANA/BAP 1/2; con 5 brotes por explante. Mientras que en los tratamientos con agua de coco, los mejores resultados se obtuvieron en al 40% (**Fig. 12b**) con 2.4 brotes por explante, a los 60 días de cultivo.

En cuanto a los controles; éstos alcanzaron los índices más bajos de proliferación de brotes, tanto en explantes basales como apicales (**Gráfica 4**).

En cuanto a los explantes apicales que tuvieron baja respuesta fue en tratamiento ANA/BAP 1/0, con 1 brote por explante.



Gráfica 4. Brotes obtenidos de secciones apicales y basales de plántulas de semillas inmaduras en medio MS (50/100) y AC, después de 60 días de inducción.



Fig. 12. Brotes regenerados vía organogénesis directa en explantes apicales y basales de plántulas de semillas inmaduras de los tratamientos con AC. **Explantes apicales:** a) 20% AC y b) 40% AC, crecimiento de brotes gruesos con coloración verde intenso, hojas vigorosas y raíces en plena emergencia. Al término de 60 días de inducción. **Explantes basales:** c) Control, brotes y raíces elongadas. d) 10% AC, crecimiento de brotes, raíces y hojas. e) 20% AC proliferación de brotes múltiples con escaso número de raíces. f) 40% AC proliferación de brotes múltiples gruesos de coloración verde intenso, con buen crecimiento de raíces. Al finalizar 60 días de inducción. **Abreviaturas: AC: agua de coco.**

Los resultados anteriores, tanto nudos de plántulas de semillas maduras como inmaduras en los tratamientos con RCV; indican que para promover la formación de brotes en la mayor parte de la zona de abscisión del nudo; se requiere incrementar la concentración de citocininas. Asimismo, cuando se incrementan las concentraciones de auxinas se induce la elongación de los brotes así como de raíces y hojas. Por lo que la adición de ácido naftalenácetico permite el enraizamiento de la plántula (Cahuantzi, 1998).

El remover el meristemo apical, rompe la dominancia apical, las células basales presentan un mayor grado de plasticidad morfogénica y a su vez, éstas presentan un menor grado de determinación genética, para sufrir un proceso de rediferenciación celular hacia la ruta de desarrollo y formar varios centros meristemáticos que den lugar al surgimiento de yemas laterales y por tanto, a la formación de nuevos brotes a partir del tejido (Suárez, 2006).

El mayor número de brotes se obtuvo de los explantes basales de los dos tipos de plántulas (semillas maduras e inmaduras) en los diferentes tratamientos (RCV y AC); esto coincide con los resultados que arrojó el trabajo de Suárez, 2006; en el que obtuvo un promedio de 11.4 ± 9.64 PLB's en explantes de secciones basales de protocormos en *Euchile mariae*.

Los explantes apicales formaron nuevos brotes y raíces. La emergencia de brotes y raíces en explantes apicales puede indicar un fuerte compromiso para continuar como individuo y rápidamente restablecer sus funciones (González, 2008).

Suárez *et al.*, 2007, al inducir respuestas morfogénicas en *Euchile mariae*, a partir del cultivo de mitades de protocormos (apicales y basales), obtuvieron una mayor formación de PLB's a partir de secciones basales de protocormos, en donde al término del periodo de inducción (165 días de cultivo) obtuvieron un promedio de 11.44 ± 9.64 PLB's por explante.

Mata *et al.*, 2010, obtuvieron buenos resultados en explantes basales en medio MS y TDZ (1.0 mg/L) con un promedio de 9.9/brotes por explante, respectivamente de *Lycaste aromatica*.

Jiménez y Guevara, 2006, reportaron la formación de brotes en *Phalaenopsis* a partir de secciones nodales de escapos florales maduros en medio MS, en adición con 0.5 mg/L de 2, 4-D, 3 mg/L de BAP, 0.86 mg/L de Kin y 200 mL de agua de coco; obteniendo buenos resultados en explantes mediales, los cuales formaron brotes. Torres *et al.*, 2012, obtuvieron altos índices de proliferación de brotes en secciones apicales de tallos jóvenes de inflorescencias de *E. longipetalum* con BAP (3 mg/L) en ausencia de auxinas. Cahuantzi, 1998, reportó que las porciones apicales de la inflorescencia joven son las idóneas para propagar *Oncidium cavendishianum*.

Rangel, 1995, logró la regeneración de plantas a partir de ápices de tallo de *Oncidium stramineum*, en medio de cultivo KC-E sólido y líquido, adicionado con 2, 4-Diclorofenoxiacético (2, 4-D) y 6-furfurilaminopurina (cinetina, K).

Alvarado, 2011, logró la formación de brotes y PLB's a partir de ápices de tallo cultivado en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en *Prosthechea chacaoensis*. Las mejores respuestas las obtuvo en las concentraciones de ANA (1 mg/L) y BAP (0.5 mg/L) con 27.1 ± 2.22 brotes por explante, en un período de 12 meses de cultivo.

Trabajos realizados en *V. planifolia* con RCV reportan efectos similares a los del presente trabajo. Por ejemplo, George y Ravishankar, 1997; Lee *et al.* 2008, consiguieron altos índices de proliferación de brotes al utilizar yemas (axilares y apicales) en concentraciones similares de citocininas (BAP 2 mg/L) que de auxinas (ANA 1 mg/L). Divakaran *et al.*, 1997, al emplear ápices de brotes y segmentos nodales con IBA (0.5 mg/L) y BAP (1 mg/L) obtuvieron 7 brotes/explante/90 días. Geetha y Shetty, 2000, con la regeneración de ápices de brotes y nudos con 1 mg/L de BAP; lograron un buen número de brotes (6 a 8 /explante/90 días). Mientras que Giridhar y Ravishankar, 2004, al trabajar con brotes en 2.38 mg/L de BAP y 2.039 mg/L de KIN obtuvieron 9.3 brotes/explante/75 días. Kalimuthu *et al.*, 2006, al inducir nudos con 1 mg/L de BA y 150 mL/L de agua de coco tuvieron un crecimiento de 9.43 brotes/explante/20 días. Rojas 2007, al trabajar con nudos de secciones terminales con 2 mg/L de BAP y 0.5 de ANA reportó 2.75 a 3.83 brotes/explante/60

días, finalmente Chin *et al.*, 2011, usaron nudos con BAP 1 mg/L con 15% de agua de coco; cuantificando 9.6/brotos/explante.

Los resultados anteriores, en nudos basales de plántulas de semillas maduras como inmaduras en los tratamientos con AC; se observó que al incrementar las concentraciones de AC (20 y 40%) en el medio, muestran una mayor capacidad organogénica (mayor número de brotes, hojas y raíces) en comparación con los nudos apicales. Asimismo, se puede observar que al disminuir las cantidades de AC (10%) sólo se induce la emergencia de raíces y brotes individuales vigorosos (con buen tamaño de color verde brillante y hojas ensanchadas). Esto coincide con Gómez, 2009, ya que al emplear segmentos de tallo de *Laelia gouldiana* con distintas combinaciones de agua de coco; obtuvo buena respuesta en formación de brotes en la concentración al 20%, después de 75 días de cultivo. Mientras que Santiago, 2013 reportó una mayor cantidad de PLB's en secciones basales de protocormos a una concentración de 10% para complejos orgánicos (agua de coco y pulpa de plátano). Otros efectos positivos del AC fue lo reportado por Espinosa, 2002, que al colocar protocormos enteros de *Rhynchosstele bictoniense* en medio K-4003 líquido, en combinación con kinetina 0.5 mg/L y agua de coco (20%), mostraron un notable crecimiento y desarrollo, al término de 45 días, eliminándose por completo la oxidación. Menezes *et al.*, 2016, obtuvieron buenas respuestas de producción de hojas, en el cultivo *in vitro* de plántulas de *Laeliocattleya* (germinadas *in vitro*) en medio KC suplementado con AC. Martínez y Chávez, 2012, observaron formación y desarrollo de cormos y presencia de abundantes raíces en *B. urbana*; en medio KC + 200 g/L de AC.

Moreno y Menchaca, 2007, obtuvieron buenos resultados al propagar plántulas de *Stanhopea tigrina* (obtenidas de semillas), en medio MS con un 12% de agua de coco, incluyendo 10% de pulpa de plátano; en un término de 90 días se obtuvieron plantas mayores a 7 cm, con suficientes raíces y pseudobulbos, lo que favoreció una alta tasa de sobrevivencia al trasplante. Gomes *et al.*, 2006, obtuvieron buenos resultados al utilizar AC (100 mL/L) en el cultivo de plántulas híbridas provenientes de la germinación de semillas *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Grande x *Cattleya loddigesii* Alba al utilizar 100 mL de AC, obteniendo como respuesta mayor

desenvolvimiento de hojas. Chin *et al.*, 2011, reportaron buenos resultados de regeneración *V. planifolia* al adicionar Agua de coco (15%) en medios MS líquido; ya que mostró una tasa de multiplicación más alta en comparación con un medio semisólido.

4.6 Fase de individualización

Después de concluir la etapa de inducción, los brotes obtenidos de las secciones apicales y basales de ambos tipos de plántulas (semillas maduras e inmaduras), de los diferentes tratamientos de RCV de *V. planifolia*, se individualizaron y subcultivaron en medio MS (50/100) sin RCV en un periodo de 30 días. Con la finalidad de inducir emergencia de nuevas raíces para favorecer la sobrevivencia en condiciones *ex vitro*.

En cuanto a los tratamientos con AC, así como los controles, no fue necesario subcultivarlos en medio MS (50/100); ya que todos los tratamientos tenían buen crecimiento de raíces, sólo se realizó la individualización de los brotes y se colocaron en el mismo medio. Al término de 30 días, los tratamientos con AC y los controles formaron plantas completas con una altura promedio de 10 cm, definiéndose bien el alargamiento de los nudos de todas las plantas, con un mayor crecimiento de raíces y ensanchamiento de hojas.

En lo que respecta a los tratamientos con RCV fue necesario individualizarlos y subcultivarlos en medio MS (50/100), puesto que la mayoría de los brotes presentaban poco crecimiento y escasas raíces; esto contribuyó al término de un mes, que los brotes ya presentaban un notorio crecimiento, así como proliferación de nuevas raíces. Esto coincide con lo reportado por Jiménez y Guevara, 1996, ellos transfirieron explantes de *Phalaenopsis* a un medio MS (50/100) desprovisto de reguladores de crecimiento; ya que no presentaban la formación de raíces o estaban muy pequeñas. Esto promovió el crecimiento satisfactorio de raíces, posteriormente todas las plantas se aclimatizaron satisfactoriamente.

Suárez, 2006, al finalizar la etapa de inducción en secciones basales y apicales de *Euchile mariae*; prosiguió con la individualización y subcultivo en medio MS modificado sin reguladores de crecimiento, al término de 90 días hubo desarrollo de plántulas completas, con buen crecimiento de hojas, raíces y pseudobulbos. Villafuerte, 2013, al individualizar protocormos de orquídeas (*Barkeria whartonia* y *Barkeria scandens*) en medio MS 50% sin RCV, después de 60 días, reportó la formación de plantas completas con una altura promedio de 4.5 cm, con hojas de 3-4 cm y raíces de 6-8 cm bien definidas. Castañeda, 2008, después de dos meses de inducción, previo su establecimiento *ex vitro* y finalizada la etapa de experimentación de 5 meses, individualizó y subcultivó plántulas de *Laelia anceps* Lindl. Subsp. *anceps* f. en medio MS basal adicionado con 1 g/l de carbón activado para que continuaran su crecimiento y después de dos meses fueron empleadas para realizar pruebas de aclimatización en invernadero. El medio MS al 100% en la mayoría de los casos, favorece el desarrollo de plántulas vigorosas, con dos o más raíces y mayor biomasa para germinación (Romero *et al.*, 2007).

4.7 Aclimatización

Para la fase de aclimatización de *Vanilla planifolia* se utilizaron 224 brotes individualizados con un aproximado de 10 cm de altura, con raíces de 5 cm de longitud, después de 90 días se tuvo el 100% de sobrevivencia (Tabla 4). Chin *et al.* (2011), para la misma especie a partir de nudos de plantas adultas obtuvieron el 85% de sobrevivencia, en un lapso de 30 días. Estudios como los de Billard *et al.* (2013) y Castañeda (2008); lograron aclimatizar a *Bletilla striata* y *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* f. en un 100% de sus brotes en 30 y 60 días respectivamente. Con los resultados anteriores, se puede apreciar que el crecimiento para *V. planifolia* es lento cuando es regenerado a partir de plántulas provenientes de semilla, comparado con otro tipo de explantes.

Con relación al sustrato para nuestra prueba se utilizó una mezcla de peat moss, corteza de pino, agrolita y tepojal en proporción 1:1:1:1 (Fig. 12), lográndose 100% de sobrevivencia. Al comparar con autores como Sierra (2006), Billard *et al.* (2013)

y Gómez (2009), se comparte gran parte de la composición del tipo de sustrato utilizado en este estudio; por lo que se evidencia que es un sustrato favorable para la sobrevivencia y crecimiento de las orquídeas. Con algunas excepciones como Castañeda (2008), que además adicionó carbón vegetal el que coadyuva a contrarrestar impurezas que pudiera tener el sustrato, así como estimula el crecimiento de la raíz, y Francisco *et al.* (2011), que utilizó como sustrato fibra de palma soyate (*Brahea dulcis*) teniendo tan sólo el 46.9% de sobrevivencia.



Fig. 13. Acclimatización de plantas de *V. planifolia* a) Brote individualizado en medio MS (50/100). b) Plántulas después de tres meses de aclimatización).

Tabla 4. Secuencia cronológica del crecimiento de *V. planifolia*, hasta obtener la formación de plantas completas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de plántulas en medio MS (50/100).

SIEMBRA DE SEMILLAS	DE	MADURAS	INMADURAS	MEDIO DE CULTIVO
Germinación		175 días	85 días	MS (50/100)
Protocormos con Primordios foliares		225 días	115 días	MS (50/100)
Formación de plántulas		600 días	168 días	MS (50/100)
CULTIVO DE SECCIONES BASALES Y APICALES DE PLÁNTULAS DE 5 NUDOS				
Inducción de brotes con compuestos orgánicos		60 días	60 días	MS (50/100)+AC
Inducción de brotes con RCV		60 días	60 días	MS (50/100)+ANA/BAP
INDIVIDUALIZACIÓN				
Brotos de tratamientos con AC		Indefinido	30 días	MS (50/100)+AC
Brotos de tratamientos con RCV		Indefinido	Indefinido	MS (50/100)
ACLIMATIZACIÓN				SUSTRATO
224 plántulas de tratamientos con AC y control			90 días	1:1 de peat moss, corteza de pino, agrolita y tepojal.
Sobrevivencia			100%	

Abreviaturas: AC: agua de coco; RCV: reguladores de crecimiento vegetal; BAP:

5. CONCLUSIONES

La propagación *in vitro* mediante secciones apicales de tallos de plantas adultas de plantaciones comerciales; no fue efectiva, ya que hubo contaminación por hongos y bacterias endógenas. Por lo que se recomienda un pre-tratamiento de desinfección ya sea en campo o en invernadero.

Por otro lado, en el presente trabajo fué posible obtener resultados satisfactorios de germinación con los dos tipos de cápsulas en medio MS (50/100), pero por el tiempo en que se presentó (85 días) es recomendable utilizar cápsulas inmaduras de 44 días después de su polinización para poder tener plántulas en un corto período.

Se lograron obtener altos porcentajes de germinación en los dos tipos de cápsulas; en las semillas inmaduras, reportaron un porcentaje menor de germinación con un 70%, pero en un menor tiempo (168 días), mientras que las semillas maduras, alcanzaron el 90% en 600 días. Por lo que es recomendable utilizar semillas inmaduras para la germinación *in vitro* de vainilla; ya que se reducen tanto los días de germinación como los de trasplante, lo que se traduce a obtener mayor producción de plántulas en un menor tiempo. La trascendencia que se tiene con la obtención de estas plántulas, es que contienen información genética diferente a la que con clonación replican continuamente en las plantaciones. Por lo que, la germinación *in vitro* es una práctica que debe continuar para entregar esta diversidad genética a los productores, lo que representará una posible protección contra factores ambientales adversos.

En cuanto al tipo de explante utilizados, los nudos basales de plántulas; reportaron una mayor respuesta morfogénica, en comparación con las secciones apicales.

La combinación de BAP, 2 mg/L en ausencia de ANA; en explantes basales de plántulas de semillas inmaduras regeneraron mayor cantidad de brotes, mostrando un promedio por explante de 23 brotes, mientras que en tratamientos con la adición de agua de coco, se obtuvieron buenas respuestas en el tratamiento de 20% AC con 5.4 brotes/promedio, en un tiempo de tres meses.

En los explantes apicales, los tratamientos que mostraron buenos resultados fueron también en nudos de plántulas de semillas inmaduras y en reguladores de crecimiento; puesto que en las combinaciones de ANA/BAP (0/2 y 1/2) se obtuvieron 5 brotes/explante/promedio y en tratamientos con agua de coco 2.4 brotes/explante/promedio en la concentración de 40% AC.

En los controles se pudo obtener nuevos brotes, pero fueron los que indujeron un menor número; ya que los explantes que presentaron el mayor número de brotes fueron los basales de semillas inmaduras con 1.7 brotes/explante/promedio, seguidos por los explantes apicales de semillas inmaduras con 1.4 brotes/explante/promedio. Mientras que en semillas maduras los explantes basales mostraron alrededor de 1.3 brotes/explante/promedio y en los explantes apicales 1.2 brotes/explante/promedio; estos resultados se obtuvieron en un período de 60 días de inducción. Cabe señalar, que se obtuvieron pocas plántulas de estos tratamientos; pero presentaron buen sistema radicular, lo que ayudó para su aclimatización.

El uso de complejos orgánicos mejoró considerablemente la emergencia y crecimiento de raíces, brotes y hojas.

En cuanto a la respuesta de brotes, hubo diferencias significativas en el número de brotes, habiendo resultados eficientes en los tratamientos con reguladores de crecimiento, sin embargo, aunque en los tratamientos con AC fueron menores, los brotes eran mucho más vigorosos, lo que favoreció la individualización de los brotes y por ende la aclimatización de todos estos tratamientos. Además, es una buena opción, para reducir tiempo en la fase de aclimatización y costos; en comparación con el uso de RCV.

Se logró la propagación *in vitro* de *V. planifolia* mediante la germinación de semillas y a través de plántulas a partir de 5 nudos.

Se pudieron regenerar 1350 brotes en total de los tratamientos (AC, RCV y Control) a los tres meses de inducción.

La aclimatización de las plantas completas se obtuvo a los 90 días al mantenerlas en condiciones de invernadero.

Se tuvo una sobrevivencia del 100% de las 162 plantas que fueron aclimatizadas al término de tres meses en condiciones de invernadero.

Se pudo establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de *V. planifolia*; el cual puede ser una alternativa viable y de gran utilidad para la obtención masiva de plantas y poder contribuir a su conservación, micropropagación y aprovechamiento de una manera sustentable.

El cambio climático se agrava, por lo que es una necesidad tener alternativas como lo es el CTV; para el rescate, conservación y micropropagación de ésta y otras especies que se encuentren en peligro de extinción. Puesto que facilita la producción de plantas a gran escala, libres de patógenos en períodos relativamente cortos en espacios reducidos, con bajos insumos, durante todo el año.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, Z., A. Mengesha, A. Teressa y W. Tefera. 2009. Efficient in vitro multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology* 8 (24):6817-6821.
- Lee, H. E., J. Murguía, B. García, A. L. Córdova, A. Laguna, J. O. Mijangos, L. F. Barahona, L. G. Iglesias, y N. Santana. 2008. In Vitro Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *HortScience* 43 (2):454-458.
- Alvarado, J. 2011. Regeneración *in vitro* de *Prosthechea chacaoensis* (Richb. f.) W. E. Higgins. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 125 págs.
- Álvarez, C., W. Osorio, M. C. Díez, M. Marín. 2014. Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de Vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana* 25(2): 225-241.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchids seeds. *The Botanical Review* 33 (1): 1-83.
- Ávila, I. y R. Salgado. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* 8:138-149.
- Azofeifa, J. B., A. Paniagua y J. A. García. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) en Costa Rica. *Agronomía mesoamericana* 25 (1): 189-202.
- Barrera, A., A. Espejel, B. E. Herrera y V. Cuevas. 2016. Asociatividad empresarial de organizaciones productoras de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews) en el Totonacapan. *Agroproductividad* 9 (1): 79-85.
- Barrera, A., B. E. Herrera, J. L. Jaramillo, J. S. Escobedo y A. Bustamante. 2009. Caracterización de los sistemas de producción de Vainilla (*Vanilla planifolia* A.) Bajo naranjo y en malla sombra en el

- Totonacapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10 (2): 199-212.
- Barrera, A., J.L. Jaramillo y B. E. Herrera. 2010. Competitividad de la vainilla en la región del Totonacapan, México. E. U. A. LAP LAMBERT Academic Publishig. 129 págs.
 - Bello, J.J., G. G. García y L. García. 2015. Conservación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Fitotecnia Mexicana* 38 (2): 165-171.
 - Bhojwani, S.S. & P. K. Dantu, 2013. *Plant tissue culture: an introductory text*. India: Springer. 309 págs.
 - Billard, C. E., C. A. Dalzotto y V. H. Lallana. 2013. Germinación de *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. en medio líquido y evolución en plantas en medio semisólido. *Investigación Agraria* 15 (1): 7-14.
 - Bruman, H. 1948. The Culture History of Mexican Vanilla. *The Hispanic American Historical Review* 28 (3): 360-376.
 - Cahuantzi, C. V. 1998. Propagación *in vitro* de *Oncidium cavendishianum* Batem (ORCHIDACEAE) a partir de explantes de la inflorescencia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 43 págs.
 - Cameron, K. y M. A. Soto. 2003. Vanilloideae. pp. 281-334. *En: Pridgeon, A. M., J. Phillip, M. W. Cribb y F. Rasmusse (ed.) Genera Orchidacearum. Volume 3: Orchidoideae (Part 2), Vanilloideae*. Oxford University Press, United Kingdom. 378 págs.
 - Carmona, J. C. 2016. Germinación y proliferación de *Oncidium unguiculatum* (ORCHIDACEAE), con fines de conservación *ex situ*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 49 págs.
 - Castañeda, M. 2008. Propagación y Conservación de Lirio de Todos Santos *Laelia anceps* Lindl. Subsp. *anceps* f. semialba (Orchidaceae) a través del Cultivo de Tejidos. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. México. 112 págs.

- Castillo, M. 2002. Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae) como una estrategia para su reintroducción. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 52 págs.
- Castillo, R. y E. M. Engleman. 1993. Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*. Acta Botánica Mexicana 25: 49-59.
- Celestino, C., I. Hernández, E. Carneros, D. López y M. Toribio. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales 14 (3): 345-357.
- Chávez, V. M. 1980. Cultivo asimbiótico de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Angel. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Chávez, V.M., O. González, A. Martínez, P. Ortega, M. Mata, M. Peña, V. Corona, R. Bye y A. Rublo. 2012. Conservación *in vitro* de plantas mexicanas en peligro de extinción. pp. 104-119. *En*: María de los Ángeles Aída Téllez Velasco (compiladora y escritora) Conservación de Orquídeas en México. UNAM. México. UNAM. México.
- Chenout, V. 1987. Primeras notas de campo, ejidos, vainilla y campesinos. pp. 25-63. *En*: Gatti, L.M. y V. Chenout (ed.) La costa Totonaca: cuestiones regionales II. Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social. México. 103 págs.
- Chin, B., C. Foan y P. Alderson. 2010. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. Plant Cell Tissue Organ Culture 105: 457-463.
- Chin, B., C. Foan y P. Alderson. 2011. An Improved plant regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. Plant Tissue Culture & Biotechnology 21 (1):27-33.
- Cibrián, A. 2000. Variación genética de *Vanilla planifolia* en México. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias. UNAM. México. 60 págs.
- Condemarín, C. E., J. Chico y C. Vargas. 2007. Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo *in vitro*

- de yemas axilares de *Encyclia microtos* (Rchb. F.) Hoehne (Orchidaceae). *Lankesteriana* 7(1-2): 247-254.
- Damon, I, E. Aguilar, L. Rivera y V. Nikolaeva. 2004. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Chapingo Serie Horticultura* 10 (2): 195-203.
 - De la Cruz, J., G. C. Rodríguez, H. S. García, T. L. Rosado, M. A. García y V. J. Robles. 2009. *Vanilla: Post-harvest Operations*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 50 págs.
 - Díaz, F., J. M. de Miguel y M. A. Casado. 1998. *Diversidad biológica y cultural rural en la gestión ambiental del desarrollo*. Mundi-Prensa. España. 205 págs.
 - Divakaran, M., A. Sajina, K. Nirmal and P.N. Ravindran. 1997. Ovule culture of vanilla and its potential in crop improvement. *Biotechnology of Spices, Medicinal & Aromatic Plants*. 112-118.
 - Elorza, P., M. López, A. D. Hernández, G. Olmedo, C. Domínguez y J. M. Maruri. 2007. Efecto del tipo de tutor sobre el contenido de vainillina y clorofila en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) en Tuxpan, Veracruz, México. *UDO Agrícola* 7 (1): 228-236.
 - Espinosa, A.M. 2002. Proliferación de *Rhynchostele bictoniense* (ORCHIDACEAE) a partir de explantes de material cultivado *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 57 págs.
 - Fernández, M. A. 2014. Regeneración *in vitro* de *Backebergia militaris*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 103 págs.
 - Flores, G., J.P. Legaria, I. Gil, M. T. Colinas. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Chapingo, Serie Horticultura* 14 (3): 347-353.
 - Francisco, J. F., A. R. Jiménez, A. De Jesús, M. L. Arenas, E. Ventura, S. Evangelista. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de

- plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*. Polibotánica 32: 107-117.
- Geetha, S. and Shetty, S. A., 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. Current Science 79(6):886–889.
 - George, E.F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure- Background. En George, E.F., M. A. Hall & G. J. De Klerk. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. 520 págs.
 - George, P. S. y G. A. Ravishankar. 1997. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. Plant Cell Reports 16:490-494.
 - Giridhar, P. y G A Ravishankar. 2004. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. Under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. Indian Journal of Biotechnology 3:113-118.
 - Gomes, A., M. Pascula, F. Villa y F. Carvalho. 2006. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* plântulas de orquídea. Revista Ceres 53 (310): 608-613.
 - Gómez, H. A. 2009. Cultivo *in vitro* de *Laelia gouldiana* Rchb. f. (Orchidaceae), especie endémica de México, extinta en la naturaleza. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 133 págs.
 - González, M.T., R. Gámez, Y. Martínez, S. Valdés, J. O. Mascorro, A. Osorio, M. Pastelín, M. Guevara y C. A. Cruz. 2013. Estado actual de la crioconservación vegetal en México. pp. 161-174. En González, M.T. y F. Engelmann. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. IICA, Costa Rica. Institut de recherche pour le développement. Universidad Veracruzana (México).
 - González, O. 2008. Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R. A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis de maestría. Instituto de Biología. UNAM. México. 106 págs.
 - Gopal, J., K. Iwama y Y. Jitsuyama. 2008. Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 44: 221-228.

- Gordillo, M. 1988. El cultivo de la vainilla en la República Mexicana: su situación actual y su futuro. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. UNAM. México. 120 págs.
- Guzmán, G. 2013. Devastación de los bosques y selvas de México: la urgencia de su conservación. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, México. 68 págs.
- Hágsater, E., M. A. Soto, G. A. Jiménez, M. A. Rosas y R.L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoin. México D. F. 304 págs.
- Havkin, D., J. C. French, N. M. Graft, D.M. Joel, F. E. Pak y C. Frenkel. 2004. Interrelation of Curing and Botany in Vanilla (*Vanilla planifolia*) Bean. Acta Horticulturae 629: 93-102.
- Hernández, J. 2011. Programa Estratégico para el Desarrollo Rural Sustentable de la Región Sur-Sureste de México: Trópico Húmedo 2011 (Paquete Tecnológico Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson)). Tlapacoyan, Veracruz. INIFAP. 24 págs.
- Herrera, B. E., J. Hernández, A. Delgado. 2016. Variación de aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews Silvestre y cultivada. Agroproductividad 9 (1): 10-17.
- Iglesias, L. G., A. Andrade, N. Flores, J. L. Giorgana, M. Luna, S. L. Nahuat, J. C. Noa, A. Ortiz, C. Reyes, L. Rodriguez y L.A. Saenz. 2014. Establecimiento de las bases biotecnológicas y ecológicas en la mejora genética de *Vanilla planifolia* Jacqs. (Orchidaceae). Cuadernos de Biodiversidad 45 (2014): 1-6.
- Janarthanam, B. y S. Seshadri. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* andr. In vitro Cellular & Developmental Biology Plant 44: 88-89.
- Jiménez, K., A. Schmidt, K. Quesada y L. Moreira. 2015. Aislamiento de una bacteria endófito de vainilla (*Vanilla planifolia*) con actividad biocontroladora *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. vanillae. Tecnología en marcha 28 (2): 116-125.

- Jiménez, V. M. y E. Guevara. 1996. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) mediante el cultivo de secciones de ejes florales después de la senescencia de las flores. *Agronomía Costarricense* 20 (1): 75-79.
- Kalimuthu, K., R. Senthikumar, y N. Murugalatha. 2006. Regeneration and mass multiplication on *Vanilla planifolia* Andr. a tropical orchid. *Current Science* 91 (10): 1401-1403.
- Kameswara, N. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. 3 (2): 136-145.
- Knudson, L. 1950. Germination of seeds of *Vanilla*. *American Journal of Botany* 37 (3): 241-247.
- Kumar, P., F. Stephen y S. Alex. 2009. Studies on *in vitro* seed culture in vanilla. *Indian Journal of Horticulture* 66 (4):547-548.
- Lee, H. E., A. Laguna, J. Murguía, P. Elorza, L. Iglesias, B. García, F. A. Barredo y N. Santana. 2007. Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista UDO Agrícola* 7 (1): 58-67.
- Lo, S. F., S. Manohar, C. L. Kuo, C.L. Chen y H.S.Tsay. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 40: 528-535.
- Lugo, H. 1955. The effect of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia*. *American Journal of Botany* 42 (7):679-684.
- Luna, J. J., M. L. Luna, G. G. Amador, B. E. Herrera, M. L. Arévalo y H. Ruiz. 2016. Caracterización fisicoquímica y sensorial de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews con diferentes esquemas de beneficiado. *Agroproductividad* 9 (1): 34-40.
- Martínez A. y V. M. Chávez, 2012. Cultivo asimbiótico de orquídeas y seguimiento de su reintroducción. pp. 137-147. *En: María de los*

- Ángeles Aída Téllez Velasco (compiladora y escritora) Conservación de Orquídeas en México. UNAM. México. UNAM. México.
- Martínez, D.M., E. Sandoval, J. Solís, D. E. Velázquez y E. B. Herrera. 2016. Caracterización anatómica y análisis de variación de epidermis foliar y caulinar entre dos genotipos de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews. *Agroproductividad* 9 (1): 26-33.
 - Mata, M., R. J. Baltazar, P. Moon, P. Hietz y V. L. Monterrojo. 2010. *In vitro* regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. *Plant Biotechnology Reports* 4:157-163.
 - Menchaca, R. A., J. M. Ramos, D. Moreno, M. Luna, M. Mata, L. M. Vázquez y M. A. Lozano. 2011. Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*, *Revista Colombiana de Biotecnología* 13 (1): 80-84.
 - Menezes, L., M.F. Machado, P. Ballesta, F. Mora, M. A. Milaneze, C. Aparecida. 2016. Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Revista de Agronomía de la Universidad de Tarapacá. Arica, Chile (IDESIA)* 34 (1): 47-54.
 - Michelangeli, C. 2010. Micropropagación sexual de *Masdevallia towarensis*, orquídea en peligro crítico de extinción en Venezuela. pp. 219-222. *En: De Olivera, R., J. Lessmann, A. Rodríguez y F. Rojas (eds.) Ciencia y conservación de especies amenazada en Venezuela: conservación basada en evidencias e intervenciones estratégicas, Venezuela. Provita. 234 págs.*
 - Mittermeier, R. y C. Goettsch. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. *En: Sarukhán, J. y Dirzo (comps.). México ante los retos de la biodiversidad. Conabio. México. 343 págs.*
 - Moreno, D. y R. A. Menchaca. 2007. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana* 9 (2): 27-32.

- Morera, J, C. Astorga, C. Umaña y V. Villalobos. 1993. Manual de recomendaciones sobre cultivos promisorios: zapote, pimienta, macadamia y vainilla. pp 195-207. *En*: Phillips, W. (ed.) Sombras y cultivos asociados con cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 221 págs.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nair, D. S. y B. R. Reghunath. 2009. Cryoconservation and regeneration of axillary shoot meristems of *Indigofera tinctoria* (L.) by encapsulation-dehydration technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 45: 565-573.
- Nash, N. e I. La Croix. (eds.) 2008. Orquídeas. España. Omega. 367 págs.
- Nayar, B. K., F. A. Sc, R. Rai y P. Vatsala. 1976. Dermal morphology of *Vanilla planifolia* Andr. and *V. wightii* Lindl. *Proceedings of the Indian Academic of Science* 84 B (5): 173-179.
- Padrón, S. 2006. Germinación asimbiótica *in vitro* de *Govenia capitata* (Orchidaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- Paniagua, A., B. Azofeifa y J. A. García. 2013. Cultivo de la vainilla orgánica en sistemas agroforestales. *Universidad en diálogo* 3 (1-2): 31-46.
- Parra, Q. R. 1987. Cultivo *in vitro* y anatomía de óvulos de Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 117 págs.
- Pedroso, C., T. De Souza, A. R. M. Claro. 2012. Efeitos da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae: Vanilloideae). *Acta Botanica Brasilica* 26 (3): 714-719.

- Pérez, F. 2015. Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii*, cactácea endémica de México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 68 págs.
- Philip, V. J. y S. A. Z. Nainar. 1988. Structural Changes During the *in vitro* Germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 61:139-145.
- Rangel, L. M. 1995. Regeneración *in vitro* a partir del cultivo de ápices de tallo *Oncidium stramineum* Batem. ex Lindl. (Orchidaceae), especie mexicana en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 66 págs.
- Rivas, G. 2002. Memoria de la primera reunión ministerial de países megadiversos afines sobre conservación y uso sustentable de la diversidad biológica. México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 187 págs.
- Reyes, N. y M. González. 1993. Los usos de la vainilla Tlilxóchitl. *Arqueología Mexicana* 1(5): 44-48.
- Rodríguez, A. B. 2013. Inducción de la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* radicans Pav. Ex Lindl. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 75 págs.
- Rodríguez, L. M. 2000. Germinación y desarrollo *in vitro* de *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum* (Castaño, Hágsater & Aguirre) V. A. Albert & Borge Pett. y *P. caudatum* (Rolfe) V. A. Albert & Borge Pett. (Orchidaceae), especies en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias-División de Estudios de Posgrado. UNAM. México. 65 págs.
- Rojas, J. F. 2007. Regeneración *in vitro* de *Vanilla planifolia* G. Jackson, en Andrews (Orchidaceae), especie endémica mexicana. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 79 págs.
- Romero, R., B. S. Luna y A. Barba. 2007. Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en

- la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. Lankesteriana 7 (1-2): 353-356.
- Rosete, F. A., J. L. Pérez, M. Villalobos, E. N. Navarro, E. Salinas y R. Remond. 2014. El avance de la deforestación en México 1976-2007. Madera y Bosques 20 (1): 21-35.
 - Salazar, S. A. y G. Orlando. 2012. Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología 14 (1): 53-59.
 - Salazar, V.M. 2011. Estrategia de uso y conservación del germoplasma de *Vanilla planifolia* Jack en la región Totonacapan Puebla-Veracruz. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados, Puebla, México. 135 págs.
 - Santa, C., M. Marín y M. Claudia. 2012. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en los cultivos bajo cobertizos en Colombia. Revista Mexicana de Micología 35: 23-34.
 - Santiago, T. 2013. Propagación *in vitro* de *Epidendrum falcatum* Lindl. Orquídea endémica de México. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad de la Sierra Juárez. Oaxaca, México. 64 págs.
 - SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna Silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, 30 de diciembre de 2010. México.
 - SIAP. 2018. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. México. SIAP.
 - Sierra, H. J. 2006. Germinación *in vitro* y adaptación a condiciones *ex vitro* de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lexarza) Lindl. (ORCHIDACEAE). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 117 págs.

- Soto, M. A. y R. L. Dressler. 2010. A revisión of the mexican and central american species of *Vanilla plumier* ex Miller with a characterization of their its region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana* 9 (3): 285-345.
- Suárez, I. 2006. Regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (ORCHIDACEAE), especie endémica de México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 143 págs.
- Suárez, I., M. Hernández, V. M. Chávez, E. Sandoval, A. Martinez. 2007. Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). *Lankesteriana* 7 (1-2): 388-393.
- Suryanarayana, M. 1996. Morpho-anatomical studies of the endemic orchid *Vanilla wightiana* Lindl. (Orchidaceae). *Phytomorphology* 46 (4): 371-375.
- Téllez, M. A. A. 2011. Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México (con énfasis en los géneros *Stanhopea* y *Rhynchostele* y en las especies *Prosthechea citrina*, *Prosthechea vitellina*, *Encyclia adenocaula*, *Laelia speciosa*, *Laelia gouldiana*). Universidad Autónoma Chapingo. 171 págs.
- Toledo, V. M. 1994. La diversidad biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventas. *Ciencias* 34: 43-57.
- Toribio, M. y C. Celestino. 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* 20: 249-260.
- Torres, M. M., E. Aguirre y E. Sandoval. 2012. Propagación *in vitro* de *Epidendrum longipetalum* A. Rich. & Galiotti (Orchidaceae) aplicable a su conservación. *En: María de los Ángeles Aída Téllez Velasco (compiladora y escritora) Conservación de Orquídeas en México. UNAM. México, pp. 176-185.*
- Vargas, J. y H. G. Gámez. 2016. Producción de Vainilla en tres sistemas de producción en la Sierra Huasteca Potosina. *Campo Experimental San Luis Potosí, S. L. P. INIFAP. SAGARPA. 19 págs.*

- Villafuerte, A. 2013. Micropropagación de *Barkeria whartonia* y *Barkeria scandens* (Orchidaceae), especies mexicanas en peligro de extinción. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 145 págs.
- Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87 (3): 559-902.
- Villaseñor, J. L. y E. Ortiz. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: S134-S142.
- Vivar, T. V. 2004. Germinación y propagación de *Vanilla planifolia*, Tesis de licenciatura. UAM-Iztapalapa. 42 págs.
- Xochipa, R. C., A. Delgado, B. E. Herrera, J. S. Escobedo y L. Arévalo. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad* 9 (1): 55-62.
- Zamora, A. L., L. Arévalo, C. García, M. R. Ramírez y S. Valle. 2016. Calidad de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) empacada bajo diferentes películas plásticas. *Agroproductividad* 9 (1): 18-25.