



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

MICROPROPAGACIÓN DE *Vanilla planifolia* Y EFECTO A
LA COLCHICINA PARA ESTANDARIZAR UN
PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE POLIPOIDÍA

TESIS

PRESENTA

ING. KAREN ALEJANDRA PADRÓN SALVADOR

Como requisito para obtener el título de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS

Uruapan Michoacán, México, Septiembre de 2023





Programa Institucional
de Maestría en
**Ciencias
Biológicas**

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "MICROPROPAGACIÓN DE *Vanilla planifolia* Y EFECTO A LA COLCHICINA PARA ESTANDARIZAR UN PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE POLIPOIDÍA" presentado por la ING. Karen Alejandra Padrón Salvador con Número de Matrícula I430455J, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, a 10 de agosto de 2023

COMITÉ SINODAL



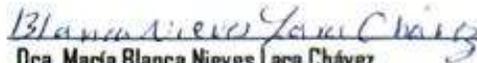
Dra. Martha Elena Pedraza Santos
Directora de Tesis



Dr. José Luciano Morales García
Vocal 1



Dra. María Teresa González Arnao
Presidente



Dra. María Blanca Nieves Lara Chávez
Vocal 2



Dr. Ulices Iván Santos Pérez
Vocal 3

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
I INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	5
Estructura de la tesis.....	6
III LITERATURA CITADA.....	7
CAPÍTULO I. PROPAGACIÓN ASIMBIÓTICA DE SEMILLAS DE <i>Vanilla planifolia</i>	
RESUMEN.....	10
SUMMARY.....	11
I INTRODUCCIÓN.....	12
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Concentración de sales minerales.....	15
Intensidad de luz.....	17
Concentración de citocininas y auxinas.....	17
Variables evaluadas.....	18
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
V CONCLUSIONES.....	29
VI LITERATURA CITADA.....	30

CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN *in vitro* DE SECCIONES NODALES DE *Vanilla planifolia*

RESUMEN.....	36
SUMMARY.....	37
I INTRODUCCIÓN.....	38
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Variables evaluadas.....	42
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
V CONCLUSIONES.....	49
VI LITERATURA CITADA.....	50

CAPÍTULO III. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA *in vitro* EN PROTOCORMOS DE *Vanilla planifolia*

RESUMEN.....	523
SUMMARY.....	54
I INTRODUCCIÓN.....	55
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
Variables a evaluar.....	58
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
V CONCLUSIONES.....	62
VI LITERATURA CITADA.....	63
IV APÉNDICE.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO I. GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA DE SEMILLAS INMADURAS DE *Vanilla planifolia*

Cuadro		Página
1.	Concentraciones de sales minerales Murashige y Skoog en semillas inmaduras de <i>Vanilla planifolia</i>	19
2.	Concentraciones de medio Murashige Skoog en distintas intensidades de luz para la incubación de semillas inmaduras de <i>Vanilla planifolia</i>	20
3.	Concentraciones de citocininas y auxinas probadas en germinación <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	22
4.	Porcentaje de generación de callo en la germinación de <i>Vanilla planifolia</i>	22
5.	Niveles de oxidación en la germinación de <i>Vanilla planifolia</i>	22
6.	Registro de semillas inmaduras de <i>Vanilla planifolia</i> germinadas en medio Murashige y Skoog a distintas concentraciones totales de sales minerales.	23
7.	Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto de la concentración de sales minerales e intensidad de luz sobre el nivel de oxidación y la generación de callo a los 90 y 175 dds en protocormos de <i>Vanilla planifolia</i>	23
8.	Número total de protocormos y plántulas registradas a los 320 dds de exposición a diferentes concentraciones de BAP y AIB.	24
9.	Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto del balance citocinina/auxina sobre el número total de protocormos y número total de plántulas de <i>Vanilla planifolia</i>	25
10.	Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto de la concentración de citocininas y auxinas sobre la morfogénesis de <i>Vanilla planifolia</i>	25

CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN *in vitro* DE SECCIONES NODALES DE *Vanilla planifolia*

- 1** Tipo y concentración de citocininas en secciones nodales de plántulas de *Vanilla planifolia* para su propagación *in vitro*. 36
- 2** Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto del tipo y concentración de citocinina sobre el crecimiento de plántulas de *Vanilla planifolia*. 38

CAPÍTULO III. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA *in vitro* EN PROTOCORMOS DE *Vanilla planifolia*

- 1** Aplicación de colchicina 0.1 % con colorante. 52
- 2** Análisis de variancia (cuadrados medios y significancia) del efecto de la dosis y número de aplicaciones de colchicina 0.1 % con colorante en el número de brotes, longitud de brote, número de hojas y número de raíces *in vitro* de *Vanilla planifolia*. 56

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA DE SEMILLAS INMADURAS DE *Vanilla planifolia*

Figura		Página
1.	Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de <i>Vanilla planifolia</i> . a): Lavado de cápsula; b) desinfección de cápsulas con hipoclorito de sodio; c) triple enjuague de cápsulas en campana de flujo laminar; d, e y f) cortes para apertura de cápsulas; g) extracción de semillas y h) siembra de semillas.	16
2.	Etapas fenológicas en la germinación <i>in vitro</i> de semillas inmaduras de <i>Vanilla planifolia</i> . a) Imbibición, b) Protocormos fotosintéticos, c) Protocormo en diferenciación y d) Desarrollo de promeristemas.	21
3.	a) Influencia de la concentración de sales minerales en el nivel de oxidación; b) influencia de la intensidad de luz y generación de callo de protocormos de <i>Vanilla planifolia</i>	23
4.	Influencia de la concentración de auxina y citocinina en la obtención de protocormos plántulas <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	25
5.	Influencia de la concentración de citocinina en la obtención de brotes <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	26
6.	Influencia de la concentración de citocinina: a) longitud de plántula; b) número de hoja; c) número de raíz y d) longitud de raíz <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	27

CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN *in vitro* DE SECCIONES NODALES DE *Vanilla planifolia*

1.	Establecimiento y subcultivo de plántulas de <i>Vanilla planifolia</i> : a y b) material vegetal, c) corte de secciones nodales, d y e) subcultivo de secciones nodales, f) secciones nodales subcultivados.	39
----	--	----

2.	Influencia del tipo de citocininas: a) número de brotes y b) longitud de brotes <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	42
3.	Influencia del tipo de citocinina: a) longitud de brote axilar y b) número de entrenudos de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	43
4.	Influencia del tipo de citocinina: a) número de hojas y b) número de hojas extendidas de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	44
5.	Influencia del tipo de citocinina: a) número de raíces y b) longitud de raíces de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	44
6.	Influencia de la concentración de citocinina en: a) longitud de brotes axilares, b) número de raíces, c) longitud de raíces, d) número de entrenudos de <i>Vanilla planifolia</i>	45
7.	Influencia del tipo y concentración de citocinina en la longitud de raíces de <i>Vanilla planifolia</i>	46
8.	Influencia del tipo y concentración de citocinina en número de brotes de <i>Vanilla planifolia</i>	47

CAPÍTULO III. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA *in vitro* EN PROTOCORMOS DE *Vanilla planifolia*

1.	Establecimiento de técnica de poliploidía. a) Aplicación de colchicina con colorante rojo; b) comparación de tinción en protocormos de <i>Vanilla planifolia</i> ; c) extracción de protocormos expuestos a colchicina y d) subcultivo de protocormos de <i>Vanilla planifolia</i>	57
2.	Desplazamiento de la colchicina con colorante en protocormo y plántulas <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i> : a) protocormo expuesto a colchicina, b, c y d) zona apical teñida con colorante.	58

3.	Influencia de la dosis y número de aplicaciones de colchicina con colorante en: a) número de brotes, b) longitud de brotes, c) número de hojas y d) número de raíces de <i>Vanilla planifolia in vitro</i>	59
4.	Respuestas morfológicas de protocormos de <i>Vanilla planifolia in vitro</i> expuestos a colchicina 0.1 % con colorante rojo: a) plántula con raíz; b) brotes; c) protocormo con tinción roja; d) PLB sobre protocormo escamoso y e) tejido vegetal necrótico.	60

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

CAPITULO I. GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA DE SEMILLAS INMADURAS DE *Vanilla planifolia*

Cuadro		Página
1A.	Registro de semillas inmaduras de <i>Vanilla planifolia</i> germinadas en medio Murashige y Skoog a distintas concentraciones totales de sales minerales. . . .	66
2A.	Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto de la concentración total de sales minerales Murashige y Skoog en la germinación de semillas inmaduras de <i>Vanilla planifolia</i>	66

CAPÍTULO III. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA *in vitro* EN PROTOCORMOS DE *Vanilla planifolia*

1A	Tasa de supervivencia de protocormos y generación de PLB's <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i> expuestos a la colchicina 0.1 %.	70
----	--	----

ÍNDICE DE FIGURAS DEL APÉNDICE

CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN *in vitro* DE SECCIONES NODALES DE *Vanilla planifolia*

Figura		Página
1A.	Influencia de la concentración de citocinina: a) número total de protocormos; b) número total de plántulas de <i>Vanilla planifolia</i>	67

CAPÍTULO III. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA *in vitro* EN PROTOCORMOS DE *Vanilla planifolia*

1A	Influencia de la dosis de colchicina en: a) número de brotes, b) longitud de brote, c) número de hojas y d) número de raíces de <i>Vanilla planifolia in vitro</i>	68
2A	Influencia del número de aplicaciones de colchicina con colorante en el: a) número de brotes y b) longitud de brote.	69
3A	Influencia del número de aplicaciones de colchicina con colorante en el número de hojas de <i>Vanilla planifolia in vitro</i>	69

ACLIMATACIÓN DE *Vanilla planifolia*

1A	Aclimatación de <i>Vanilla planifolia</i>	71
2A	Plantas aclimatadas de <i>Vanilla planifolia</i>	72

RESUMEN

Vanilla planifolia es una de las plantas aromática más importante para la producción de vainilla natural de la industria alimenticia y cosmética. Es originaria de las zonas tropicales de México y como recurso genético es considerada uno de los legados agrobiológicos más importantes de Mesoamérica. Dado a las limitantes en su germinación, tradicionalmente se propaga por multiplicación vegetativa a través de esquejes de tallo de plantas maduras, que producen un genotipo idéntico susceptible a enfermedades y plagas. En consecuencia, los productores y procesadores de vainilla luchan por satisfacer la creciente demanda mundial del extracto de vainilla y enfrentan el desafío de prácticas de producción ineficiente e insostenible. Es por ello que aumentar la diversidad genética y generar nuevas variantes para reducir los riesgos de producción es fundamental. A través de técnicas de cultivo *in vitro* se aumenta el porcentaje de germinación y estimula la propagación en orquídeas; además, estas técnicas permiten generar variabilidad genética. El mejoramiento genético mediante la inducción de poliploidía *in vitro* en orquídeas permite expandir el potencial genético del material vegetal y desarrollar variedades. Con base a lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo propagar y estandarizar un protocolo para la inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *Vanilla planifolia*. Para ello, la metodología se desarrolló en tres fases: 1) Germinación asimbiótica de semillas inmaduras, 2) Propagación *in vitro* de secciones nodales, y 3) Estandarización de un protocolo de inducción de poliploidía *in vitro*. La fase de germinación consistió de tres ensayos para evaluar el efecto de la concentración total de sales minerales, adición de fitohormonas y condiciones de incubación lumínica bajos en semillas inmaduras de *V. planifolia*. En la fase de micropropagación se evaluó el efecto de diferentes tipos y concentración de citocininas para la proliferación de brotes. Y en la estandarización, se realizaron frecuencias de aplicación con distintas dosis de colchicina en protocormos *in vitro* para evaluar el efecto de exposición al antimitótico y optimizar un protocolo de inducción de poliploidía *in vitro*.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, *in vitro*, poliploidía, colchicina.

SUMMARY

Vanilla planifolia is one of the most important aromatic plants for the production of natural vanilla for the food and cosmetic industry. It is native to the tropical zones of Mexico and as a genetic resource it is considered one of the most important agrobiological legacies in Mesoamerica. Given the limitations in its germination, it is traditionally propagated by vegetative propagation through stem cuttings from mature plants, which produce an identical genotype susceptible to diseases and pests. Consequently, vanilla growers and processors are struggling to meet the growing global demand for vanilla extract and are challenged by inefficient and unsustainable production practices. That is why increasing genetic diversity and generating new variants to reduce production risks is essential. Through *in vitro* culture techniques, the germination percentage is increased and propagation in orchids is stimulated; In addition, these techniques allow generating genetic variability. Genetic improvement through the induction of *in vitro* polyploidy in orchids allows expanding the genetic potential of plant material and developing varieties. Based on the above, this research aimed to propagate and standardize a protocol for the induction of polyploidy *in vitro* in *V. planifolia* protocorms. For this, the methodology was developed in three phases: 1) Asymbiotic germination of immature seeds, 2) *In vitro* propagation of nodal sections, and 3) Standardization of an *in vitro* polyploidy induction protocol. The germination phase consisted of three trials to evaluate the effect of the total concentration of mineral salts, addition of phytohormones and low light incubation conditions on immature seeds of *V. planifolia*. In the micropropagation phase, the effect of different types and concentrations of cytokinins on shoot proliferation was evaluated. And in the third phase, application frequencies were carried out with different doses of colchicine in protocorms *in vitro* to evaluate the effect of exposure to the antimetabolic and to standardize an *in vitro* polyploidy induction protocol.

Key words: *Vanilla planifolia*, *in vitro*, polyploidy, colchicine

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Vanilla planifolia es una de las especies más importantes de la industria alimenticia, es originaria de las zonas tropicales de México y se utiliza principalmente como saborizante natural en la industria farmacéutica y de cosméticos (Greule *et al.*, 2010). La importancia de *V. planifolia* no solo radica en su potencial económico, sino también como recurso genético al ser considerada uno de los legados agrobiológicos más importantes de Mesoamérica (Bory *et al.*, 2008).

El cultivo comercial de *V. planifolia* enfrenta un importante riesgo por la susceptibilidad de las plantas a patógenos que se originan por la limitada variabilidad genética de la especie, ya que tradicionalmente las plantas se propagan de forma asexual a partir de segmentos de tallos (esquejes). Este método ocasiona que no haya recombinación genética entre individuos (Divakaran *et al.*, 2006); además, el número de plántulas producidas por esquejes es reducido y difícilmente satisface la demanda nacional de materiales con calidad de plantación (Giridhar *et al.*, 2001).

Una de las alternativas para la propagación masiva de *V. planifolia* es a través de las técnicas de cultivo *in vitro*, que se han utilizado para germinar y propagar con éxito otras especies de orquídeas; terrestres, epífitas y rupícolas. Sin embargo, la propagación de *V. planifolia* por medio de semillas presenta limitantes por la tasa de germinación baja, ya que la cubierta de la semilla es lignificada y espesa lo cual impide una germinación oportuna y sincrónica (Chambers *et al.*, 2019).

Estos protocolos de propagación incluyen germinación simbiótica y asimbiótica de semillas, que promueven la variación genética, o métodos asexuales que emplean secciones de raíces como explantes (Picolotto *et al.*, 2017), protocormos (Pérez y Castañeda, 2016) y hojas (Díaz y Álvarez, 2009; Goswami, 2015) para la propagación clonal de la especie. En ambos casos, propagación sexual y asexual *in vitro*, se usan medios de cultivo con cantidades óptimas de macro y micronutrientes, diversas hormonas sintéticas de crecimiento vegetal y condiciones de incubación (temperatura, fotoperiodo, longitud de onda e intensidad de luz) para inducir la morfogénesis (de Wit *et al.*, 2016). Además de la micropropagación, el cultivo *in vitro* proporciona enfoques alternativos para la conservación y mejoramiento genético de las especies vegetales (Cardoso *et al.*, 2020; da Silva, 2013; Mushimiyimana *et al.*, 2011; Pence, 2010).

La propagación *in vitro* de semillas de orquídeas es una herramienta clave en los estudios de conservación de biodiversidad, ya que mantiene la variabilidad genética y produce un porcentaje de germinación alto sin relaciones simbióticas (Cristea *et al.*, 2010; Olivera-Gonzalez *et al.*, 2017). Así mismo, permite generar las bases del establecimiento de líneas variantes con potencial para mejorar la producción y calidad de plantas con mayor resistencia a enfermedades, plagas, virus, mayor resistencia al estrés ambiental como la salinidad, temperatura o sequía y a gran escala, en un tiempo relativamente corto (Fray, 2018; Cardoso, 2014; Kumar y Reddy, 2011). Si las técnicas *in vitro* se combinan con otros métodos de fitomejoramiento como la poliploidía la diversidad genética se incrementa.

La poliploidía es un método de mejoramiento genético que puede ocurrir de forma natural o también puede ser el resultado de una inducción artificial con agentes antimitóticos. Los poliploides naturales se forman lentamente a través de la hibridación entre especies con diferentes niveles de ploidía o unión de gametos no reducidos y gametos de interespecies o intraespecies (Sattler *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2016).

La forma más rápida y fiable para inducir poliploidía artificialmente, es con la exposición de tejido vegetal a agentes antimitóticos como colchicina, orizalina, trifluralina, pronamida y amiprofosmetilo (Germanà, 2012). Esta es una estrategia importante en el mejoramiento de plantas, ya que implica la mutación del genoma y como resultado una variación de fenotipos mayor (Eng y Ho, 2019). Sin embargo, el éxito de la obtención de un organismo poliploide *in vitro* depende del tipo de explante, la concentración, exposición y tipo de tratamiento antimitótico (Kermani *et al.*, 2003).

Dado la importancia y problemáticas de producción de *V. planifolia*, es fundamental aumentar la diversidad genética y generar nuevas variantes para reducir los riesgos de producción. Por lo que en la presente investigación se planteó una metodología para la obtención de protocormos a partir de germinación *in vitro* de semillas inmaduras de *V. planifolia*, la micropropagación de secciones nodales de *V. planifolia* para la proliferación de brotes y se propone una estandarización de un protocolo para la inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *V. planifolia*.

Con base a lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Propagar y estandarizar un protocolo para la inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *Vanilla planifolia*.

Objetivos específicos

Establecer el protocolo de cultivo *in vitro* para el desarrollo de protocormos y plántulas a partir de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia*.

Evaluar el efecto del tipo y concentración de citocininas en la inducción de brotes en secciones nodales *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Estandarizar un protocolo para la inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *Vanilla planifolia*.

Estructura de la tesis

La tesis se presenta en tres capítulos, en el Capítulo I: germinación asimbiótica de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia*, se optimizó la estrategia de un protocolo para aumentar la tasa de germinación de semillas mediante modificaciones en la concentración total de sales minerales del medio de cultivo, adición de fitohormonas y condiciones de incubación lumínicas bajas. Los resultados indican que la germinación asimbiótica de *V. planifolia* se promueve con concentración total de sales minerales baja (MS 20 %) con el balance de auxina y citocinina (0.5 μM de AIB y 1 μM de BAP, respectivamente) en condiciones de incubación con intensidad de luz de 21 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$. En el Capítulo II: propagación *in vitro* de secciones nodales de *Vanilla planifolia*, se estudió la participación de los diferentes tipos y dosis de citocininas en la micropropagación clonal de plántulas de vainilla. En los resultados se muestra que el tipo de citocinina influye en el desarrollo del explante ya que la proliferación y la longitud de brotes aumentan hasta 67.2 % y 86.7 %, respectivamente con el tipo de citocinina BAP, mientras que la cinetina aumentó 50.1 % la longitud del brote axilar y la zeatina incrementó 52 % la longitud de raíces. El balance de 5 y 3 μM de BAP fue óptimo para la proliferación de brotes. En el Capítulo III: efecto a la colchicina en protocormos *in vitro* de *Vanilla planifolia*, se estandarizó un protocolo para la inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de vainilla. La metodología se realizó con diferentes frecuencias de aplicación de distintas dosis de colchicina 0.1 % con colorante rojo en protocormos *in vitro* de *V. planifolia*. Los resultados determinaron que 2 aplicaciones de 1 mL de colchicina 1 % en un intervalo de 15 días puede utilizarse como protocolo de inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *V. planifolia*. Con ello, es posible propagar y estandarizar un protocolo para la inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *Vanilla planifolia* y así optimizar la variabilidad genética de la vainilla.

LITERATURA CITADA

- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M. F., & Besse, P. (2008)** Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571.
- Cardoso, J. C. (2014)** Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. *Horticultura Brasileira*, 32, 383-384.
- Cardoso, J. C., Zanello, C. A., & Chen, J. T. (2020)** An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 985.
- Chambers, A., Moon, P., Edmond, V., Bassil, E., y Valdes, D. (2019)** Cultivo de vainilla en el sur de Florida. *EDIS*, 2019(6), 8.
- Cristea, V., Brummer, A. T., Jarda, L., & Miclăuș, M (2010)** *In vitro* culture initiation and phytohormonal influence on *Dianthus henteria* Romanian endemic species. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(1), 25-33.
- da Silva, J. T. (2013)** Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 7(1), 1-52.
- de Wit, M., Galvão, V. C., & Fankhauser, C. (2016)** Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual review of plant biology*, 67, 513-537.
- Díaz, M. D. S. S., & Álvarez, C. C. (2009)** Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(2), 162-170.
- Divakaran, M., Babu, K. N., Ravindran, P. N., & Peter, K. V. (2006)** Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*, 108(4), 414-422.
- Eng, W. H., & Ho, W. S. (2019)** Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Scientia horticulturae*, 246, 604-617.

- Fay, M. F. (2018)** Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century?. *Botanical studies*, 59(1), 1-6.
- Germanà, M. A. (2012)** Use of irradiated pollen to induce parthenogenesis and haploid production in fruit crops. *Plant mutation breeding and biotechnology*, 411-421.
- Giridhar, P., Reddy, B. O., & Ravishankar, G. A. (2001)** Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. *Current Science*, 81(9), 1166-1170.
- Goswami, K., Yasmin, S., Nasiruddin, K. M., Khatun, F., & Akte, J. (2015)** *In vitro* regeneration of *Dendrobium* sp. of orchid using leaf tip as explant. *Journal of Environmental Science and Natural Resources*, 8(2), 75-78.
- Greule, M., Tumino, L. D., Kronewald, T., Hener, U., Schleucher, J., Mosandl, A., & Keppler, F. (2010)** Improved rapid authentication of vanillin using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values. *European Food Research and Technology*, 231(6), 933-941.
- Guo, W.W., Liang, W.J., Xie, K.D., Xia, Q.M., Fu, J., Guo, D.Y., Xie, Z.Z., Wu, X.M., Xu, Q., Yi, H.L. and Deng, X.X. (2016)** Exploitation of polyploids from 39 citrus seedling populations. *Acta Horticulture 1135* pp, 11-16.
- Kermani, M. J., Sarasan, V., Roberts, A. V., Yokoya, K., Wentworth, J., & Sieber, V. K. (2003)** Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(7), 1195-1200.
- Kumar, N., & Reddy, M. P. (2011)** *In vitro* plant propagation: a review. *Journal of forest and environmental science*, 27(2), 61-72.
- Mushimiyimana, I., Asiimwe, T., Dusabe, C., Gatunzi, F., Ndahimana, J., Ahishakiye, V. Kahia J. & Gahakwa, D. (2011)** *In vitro* propagation of *Vanilla* in Rwanda. *Rwanda Journal*, 24.
- Olivera-Gonzales, P., Yldefonzo, E. M., Mestanza, E. M., & Tamariz-Angeles, C. (2017)** *In vitro* propagation of *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., a medicinal threatened plant. *Annual Research & Review in Biology*, 1-9.

- Pence, V. C. (2010)** The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *Kew Bulletin*, 65(4), 539-547.
- Pérez-Martínez, B. A., y Castañeda-Garzón, S. L. (2016)** Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. *Biotecnología Vegetal*, 16(3).
- Picolotto, D. R. N., Paiva, V. B. D., Barros, F. D., Padilha, D. R. C., Cruz, A. C. F. D., & Otoni, W. C. (2017)** Micropropagation of *Cyrtopodium paludicolum* (Orchidaceae) from root tip explants. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 17, 191-197.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016)** The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281-296.

CAPÍTULO I. GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA DE SEMILLAS INMADURAS DE *Vanilla planifolia*

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo para la obtención de protocormos y plántulas a partir de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia*. El material vegetal utilizado para la germinación asimbiótica de semillas se obtuvo a partir de cápsulas de *V. planifolia*. Se establecieron tres ensayos: 1) Evaluación de la concentración total de sales minerales (10, 20, 30, 40 y 50 %), 2) Efecto de la concentración de 6-bencilaminopurina (BAP) (0, 1, 2, 3, y 4 μM) en combinación con ácido indol-butírico (AIB) (0 y 0.5 μM) y 3) Influencia de la intensidad de luz (21, 44 y 51.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) en medio MS (10 y 20 %). El material vegetal se incubó a 25 ± 1 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad e intensidad de 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (con excepción del ensayo tres) proporcionadas por lámparas diodo emisor de luz (LED). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial entre los tratamientos. Para el análisis estadístico, se confirmó la normalidad y homogeneidad de varianza con las pruebas de Shapiro Wilk, Barlett y Levene para después someterse a un análisis de varianza y prueba de separación de medias de Tukey (≤ 0.05) entre tratamientos con el paquete estadístico SAS[®] OnDemand for Academic. Los resultados mostraron el mayor número de semillas germinadas al ser expuestas a baja concentración total de sales minerales MS. A mayor concentración de sales minerales MS e intensidad de luz, el nivel de oxidación y formación de callo incrementó. El balance de una dosis baja de auxina y dosis alta de citocinina generó mayor número de protocormos y plántulas. Sin embargo, la citocinina de manera independiente influyó en el desarrollo de las plántulas y la proliferación de brotes.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, germinación, fitohormonas, *in vitro*.

SUMMARY

The objective of this research was to establish a protocol for obtaining protocorms and seedlings from immature seeds of *Vanilla planifolia*. Plant material used for asymbiotic germination of seeds was obtained from *V. planifolia* capsules. Three tests were established: 1) Evaluation of the total concentration of mineral salts (10, 20, 30, 40 and 50%), 2) Effect of the concentration of 6-benzylaminopurine (BAP) (0, 1, 2, 3, and 4 μM) in combination with indole-butyric acid (IAB) (0 and 0.5 μM) and 3) Influence of light intensity (21, 44 and 51.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) in MS medium (10 and 20%). Plant material was incubated at 25 ± 1 °C with a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness and an intensity of 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (with the exception of trial three) provided by light-emitting diode (LED) lamps. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement between the treatments. For the statistical analysis, the normality and homogeneity of variance were confirmed with the Shapiro Wilk, Barlett and Levene tests, to then undergo an analysis of variance and Tukey's mean separation test (≤ 0.05) between treatments with the SAS[®] OnDemand for Academics statistical package. The results showed the highest number of germinated seeds when exposed to a low total concentration of MS mineral salts. At a higher concentration of MS mineral salts and light intensity, the level of oxidation and callus formation increased. The balance of a low dose of auxin and a high dose of cytokinin generated a greater number of protocorms and seedlings. However, cytokinin independently influenced seedling development and shoot proliferation.

Keywords: *Vanilla planifolia*, germination, phytohormones, *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

Vanilla planifolia se propaga convencionalmente mediante métodos de propagación vegetativa, como el corte del tallo o la regeneración del cultivo de callos (Palama *et al.*, 2010; Havkin-Frenkel y Belanger, 2018). En consecuencia, existe una diversidad genética intraespecífica limitada debido a la propagación masiva del número limitado de clones y la falta de recombinación genética (Hasing *et al.*, 2020). Lo que ocasiona que la producción de vainilla enfrente muchos desafíos en la producción de plantas que cumplan los estándares oficiales y producir suficiente material vegetal para satisfacer la demanda creciente de las plantas de vainilla (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012; Soto-Arenas, 2006).

La propagación de semillas puede producir descendencia con diferentes genotipos, lo que es importante para generar rasgos novedosos en los programas de mejoramiento genético. La técnica de cultivo *in vitro* es ampliamente utilizada con éxito para la propagación comercial de muchas orquídeas (Knudson, 1922; Yam y Arditti, 2017).

Para la germinación *in vitro* de semillas de especies de orquídeas se han formulado diversos tipos de medio de cultivo. Sin embargo, el medio Murashige y Skoog (MS) es el más utilizado, ya que proporciona cantidades óptimas de macro y micronutrientes necesarios para el desarrollo de las plántulas, lo cual es importante para la producción comercial de muchas especies e híbridos de orquídeas (Salazar-Mercado, 2012; de Wit *et al.*, 2016).

La adición de hormonas de crecimiento vegetal en el medio de cultivo, como auxinas, promueven la formación y elongación del tallo, así como la división celular en callos (células no diferenciadas), sin embargo, en conjunto con citocininas los tejidos tienen la capacidad de inducir la producción de raíces. Aunque el desarrollo del tejido depende de la especie de la planta, así como de la composición del medio de cultivo (George *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008; Idowu *et al.*, 2019).

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta donde en concentraciones muy bajas, produce una respuesta fisiológica específica (Hartmann, 1992). La concentración de reguladores de crecimiento vegetal como las citocininas y auxinas en los procesos involucrados en el suministro de minerales *in vitro*, sugieren una compleja red de interacciones durante la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas (Yeung *et al.*, 2018).

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales especializadas que se producen en partes de las plantas activas de crecimiento. Su principal función se lleva a cabo a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en procesos de elongación celular, diferenciación celular y al mismo tiempo promueven la división celular (Garay-Arroyo *et al.*, 2014).

El ácido indol-3-acético (AIA) es un tipo de auxina que se utiliza frecuentemente en cultivo *in vitro*. Sin embargo, se utilizan algunas sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido de manera sintética, como lo son; ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) (Vega-Celedón *et al.*, 2016). Las citocininas por su parte, interrumpen la dominancia apical, promueven la inducción y proliferación de yemas axilares *in vitro*. El tipo y uso de concentraciones adecuadas de citocininas como son benciladenina (BA), 6-benzilaminopurina (BAP), 6-furfurilaminopurina (cinetina o KIN) influyen en el éxito de la micropropagación *in vitro* (George *et al.*, 2008).

En técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, la luz es un factor que influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas y es esencial para diversos procesos fisiológicos como la fotosíntesis, así como en la morfogénesis. Así bien, la intensidad de luz constituye una importante función que afecta la inducción y desarrollo de embriones. Las fuentes de luz generalmente utilizadas para cultivo *in vitro* son lámparas fluorescentes las cuales emiten luz de amplio espectro que va de 350 a 750 nm, que contiene longitudes de onda de calidad baja innecesarias para promover el crecimiento de las vitroplantas (Kim *et al.*, 2004). Los diodos emisores de luz (por sus siglas en inglés *Light-Emitting Diode* LED) son una fuente de luz alternativa potencial para el cultivo *in vitro* ya que pueden eliminar las longitudes de onda de la luz que están inactivas para la fotosíntesis, lo que provoca un crecimiento y desarrollo mayor en las plantas (Dutta y Jatothu, 2013).

Dado que las semillas de vainilla muestran una tasa reducida de germinación, la cual se le atribuye a la impermeabilidad de la cubierta de la semilla durante la maduración o la acumulación de sustancias inhibitoras de la germinación (Lee *et al.*, 2015; Lee, 2018) y la propagación a través de esquejes de tallo produce un número insuficiente de individuos, el cultivo *in vitro* es la única salida para una rápida propagación masiva de vainilla. No obstante, la germinación asimbiótica exitosa y posterior desarrollo de protocormos de *V. planifolia*, están influenciados por la madurez de la capsula, componentes del medio de cultivo como nutrientes orgánicos,

fuente de carbono, reguladores de crecimiento vegetal, así como luz y temperatura (Lo *et al.*, 2004; Gayatri y Kavyashree 2005).

Por tal motivo, lograr metodologías con porcentajes altos de germinación *in vitro* es de gran importancia no sólo para la propagación masiva de vainilla, sino para contribuir al aumento de la variabilidad genética existente en la especie.

Con base a lo anterior, en esta investigación se planteó el siguiente objetivo:

Objetivo

Establecer el protocolo de cultivo *in vitro* para el desarrollo de protocormos y plántulas a partir de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en Uruapan Michoacán.

El material vegetal (semillas) se obtuvo a partir de cápsulas de *V. planifolia* procedentes de plantaciones de la Sierra del Totonacapan, Veracruz, México.

El establecimiento del cultivo *in vitro* de semillas de *V. planifolia* se realizó en tres ensayos para determinar la influencia de la concentración de sales minerales, la intensidad lumínica y la concentración de auxinas y citocininas en semillas inmaduras de *V. planifolia*.

Concentración de sales minerales

El medio Murashige y Skoog (MS) (1962) se preparó a cinco concentraciones totales de sales minerales (10, 20, 30, 40 y 50 %) con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}). El pH del medio se ajustó en 5.7 con NaOH y H_2SO_4 1N, se colocó en autoclave a 1.5 kg cm^{-2} de presión durante 15 min para su esterilización y posteriormente se sirvió en cajas Petri con 20 mL bajo condiciones asépticas.

Para la siembra, las cápsulas de *V. planifolia* se lavaron con agua de grifo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) (6 % de i.a) al 70 % (v/v) durante 30 min y en la campana de flujo laminar se realizó un triple enjuague. Después, las cápsulas se secaron con papel absorbente esteril y posterior a ello se realizó la esterilización por flameo. En las orillas de las vainas se realizaron cortes de forma longitudinal con un bisturí y se seccionó en tres para después se realizó un corte transversal. Con ayuda de la espátula se tomó 95 mg de semilla en promedio y se colocó en las cajas Petri que contenían medio MS basal con las distintas concentraciones totales (Figura 1).

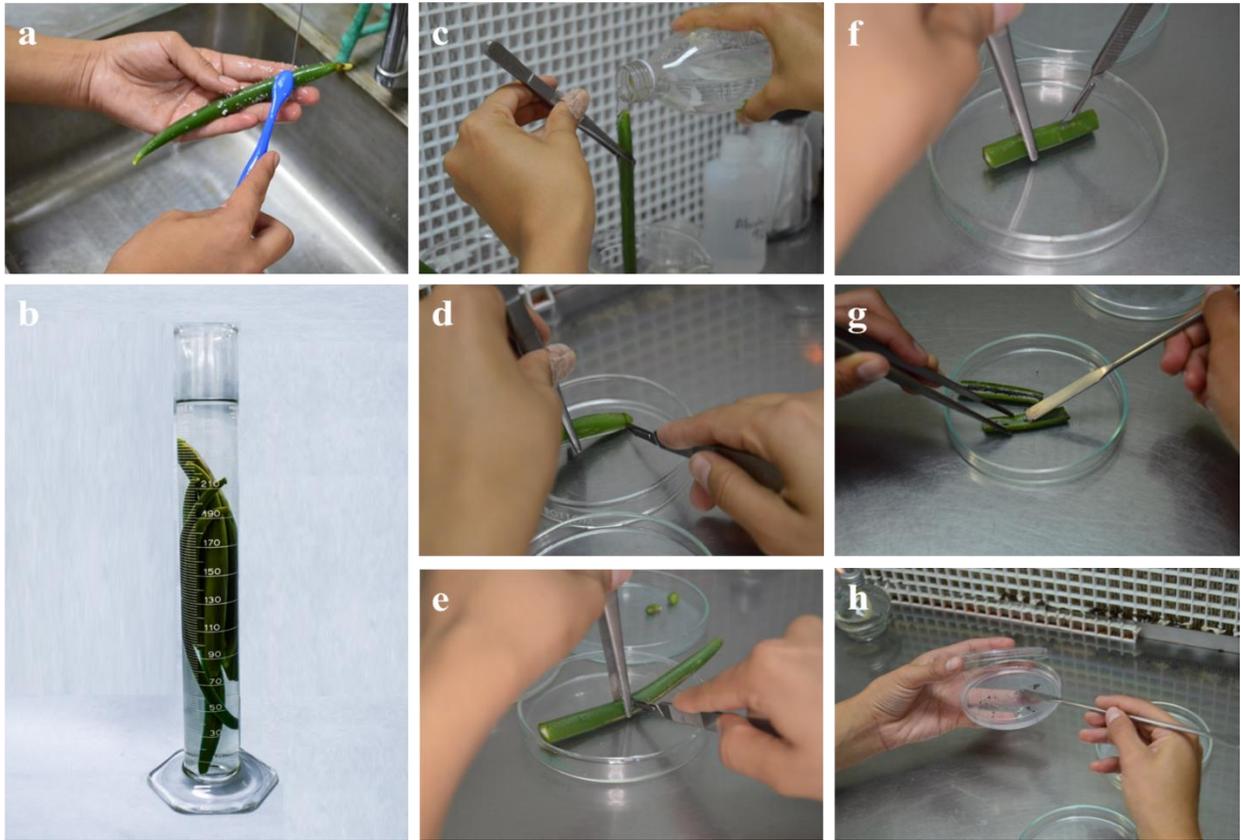


Figura 1. Establecimiento *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia*. a): Lavado de cápsula; b) desinfección de cápsulas con hipoclorito de sodio; c) triple enjuague de cápsulas en campana de flujo laminar; d, e y f) cortes para apertura de cápsulas; g) extracción de semillas y h) siembra de semillas.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue una caja Petri con 95 mg de semillas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentraciones de sales minerales Murashige y Skoog en semillas inmaduras de *Vanilla planifolia*.

Tratamiento	Concentración total de medio
	Murashige y Skoog (%)
1	10
2	20
3	30
4	40
5	50

Intensidad de luz

El medio MS se preparó a 10 y 20 % de la concentración total de sales minerales con tiamina (0.4 mg L⁻¹), mioinositol (100 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (6 g L⁻¹). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH y H₂SO₄ 1N, se esterilizó en autoclave a 1.5 kg cm⁻² de presión durante 15 min y se vertió en cajas Petri (20 mL) bajo condiciones asépticas.

La siembra se realizó de la misma manera que el ensayo 1. Las semillas sembradas se incubaron a 25 ± 1 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con tres intensidades de luz (21, 44 y 51.5 μmol/m²s⁻¹) proporcionadas por lámparas diodo emisor de luz blanca (LED).

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos, la unidad experimental fue una caja Petri con 95 mg de semillas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones de medio Murashige y Skoog en distintas intensidades de luz para la incubación de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia*.

Tratamiento	Concentración medio		Intensidad de luz (μmol/m²s⁻¹)
	Murashige	Skoog (%)	
1		10	21
2			44
3			51.5
4		20	21
5			44
6			51.5

Concentración de citocininas y auxinas

El medio MS reducido a 20 % se preparó con tiamina (0.4 mg L⁻¹), mioinositol (100 mg L⁻¹), cinco concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) (0, 1, 2, 3, y 4 μM) en combinación con dos concentraciones de ácido indol-3-butírico (AIB) (0 y 0.5 μM), sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (6 g L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH y H₂SO₄ 1N después se esterilizó en autoclave a

1.5 kg cm⁻² de presión durante 15 min y se vertió en cajas Petri (20 mL) bajo condiciones asépticas.

La siembra se realizó de la misma manera que los ensayos 1 y 2. Las semillas sembradas se incubaron a 25 ± 1 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad e intensidad de 45 μmol/m²s⁻¹ proporcionado por lámparas de luz fluorescentes blancas frías.

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (cinco y dos niveles) con cuatro repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una caja Petri con 95 mg de semillas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones de citocininas y auxinas probadas en germinación *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Tratamiento	6-Bencilaminopurina (μM)	Ácido inol-3-butírico (μM)
1	0	0
2		0.5
3	1	0
4		0.5
5	2	0
6		0.5
7	3	0
8		0.5
9	4	0
10		0.5

Variables evaluadas:

Concentración de sales minerales: A los 90 y 150 después de la siembra (dds), con ayuda de un microscopio estereoscópico se cuantificó el número total de protocormos en diferenciación de cada caja Petri.

Intensidad de luz: A los 90 y 175 dds se evaluaron las variables: generación de callo y nivel de oxidación. Se seleccionó 1 cm² por cuadrante de cada caja Petri y se observó el tejido vegetal a

través de un microscopio estereoscópico. Se consideró el porcentaje de generación callo por rangos de 0, 25, 50 y 100 % (Cuadro 4); el nivel de oxidación se asignó en: nada, poco, fuerte y muy fuerte con valores de 1, 2, 3 y 4 respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 4. Porcentaje de generación de callo en la germinación de *Vanilla planifolia*

Nivel de oxidación		
1	=	 Nada
2	=	 Poco
3	=	 Fuerte
4	=	 Muy fuerte

Cuadro 5. Niveles de oxidación en la germinación de *Vanilla planifolia*

Generación de callo		
1	=	 0%
2	=	 25%
3	=	 50%
4	=	 100%

Concentración de citocininas y auxinas: La evaluación se realizó en dos partes; La primera se efectuó a los 320 dds, se registraron las variables respuestas número total de protocormos y número total de plántulas de cada caja Petri. La segunda evaluación se realizó a los 470 dds, se registraron las variables respuesta; longitud de plántula, número de hojas, número de raíces, longitud de raíz, número de brotes y longitud de brote. Ambas tomas de datos se realizaron en la campana de flujo laminar y en condiciones aséptica.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de sales minerales

Los datos obtenidos no permitieron generar una distribución normal ni una homogeneidad de varianza en el análisis estadístico. De acuerdo al análisis estadístico no existió ningún efecto significativo en las distintas concentraciones de medio MS con respecto a la germinación de semillas. Sin embargo, se registró el mayor número total de protocormos en el medio MS 30 % (Cuadro 6).

Cuadro 6. Registro de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia* germinadas en medio Murashige y Skoog a distintas concentraciones totales de sales minerales.

Tratamiento	Concentración total de sales minerales Murashige Skoog (%)	Número total de protocormos
1	10	23
2	20	22
3	30	25
4	40	19
5	50	19

n= 3

Durante el desarrollo de la germinación, las semillas de las orquídeas pasan por estadios llamados protocormos, donde comienza con forma esférica a periforme, se desarrollan los ápices foliares y posteriormente las raíces hasta alcanzar el estadio de plántula. (Lestari, 2014).

En esta investigación, las semillas inmaduras de *V. planifolia* no germinaron a los 90 dds. Sin embargo, después de los 120 dds las semillas germinaron de manera asincrónica; es decir, se observaron las diferentes etapas de germinación y desarrollo *in vitro* de la especie: Imbibición, inició con la ruptura de la testa y formación de una estructura globular (Figura 2a); la formación de protocormos fotosintéticos se identificó por la transición de color blanco a color amarillo claro y desarrollo de pelos absorbentes (Figura 2b); la formación de protocormos diferenciados comenzó a los 120 dds con el aumento de tamaño, cambio de coloración a verde (Figura 2c); y el desarrollo de promeristemas en los protocormos inició con formación de células meristemáticas que dio origen al ápice radicular y ápice foliar (Figura 2d).

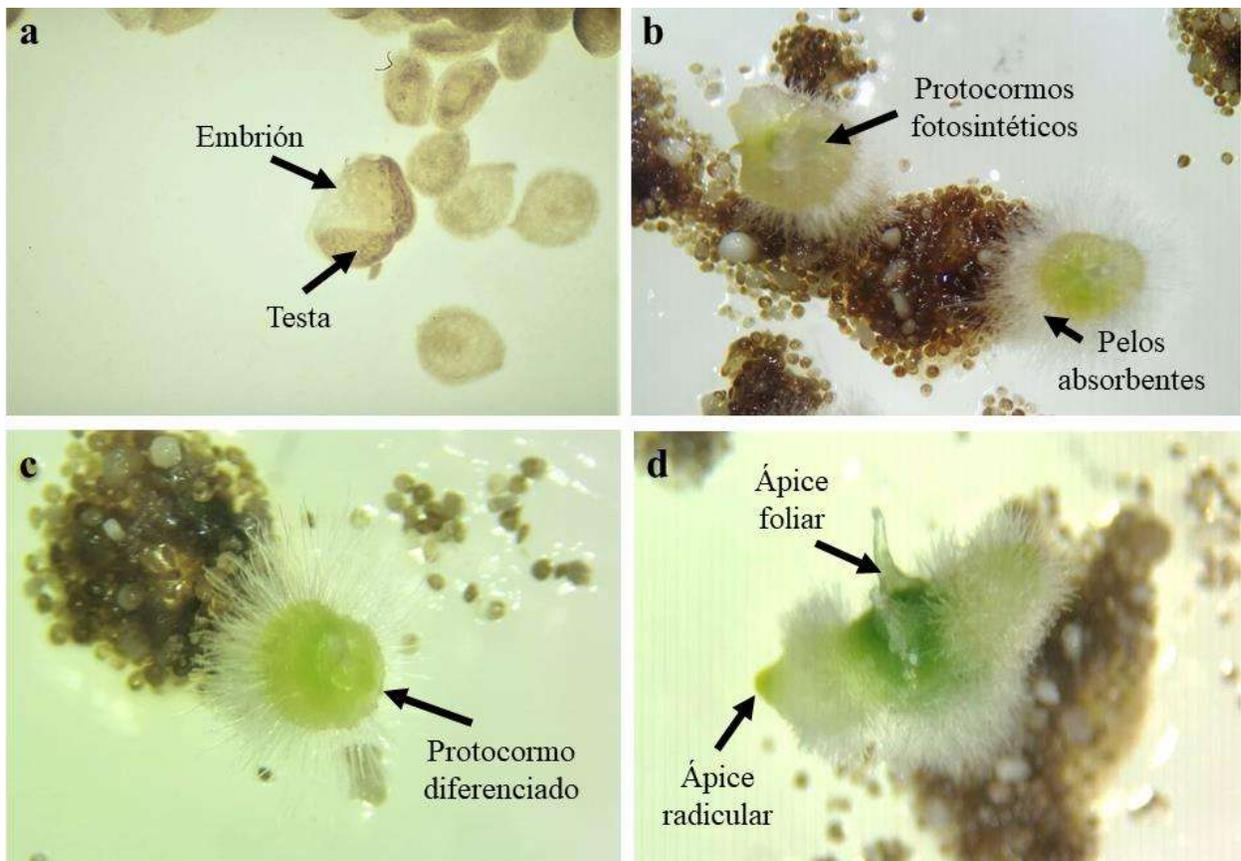


Figura 2. Etapas fenológicas en la germinación *in vitro* de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia*. a) Imbibición, b) Protocormos fotosintéticos, c) Protocormo en diferenciación y d) Desarrollo de promeristemas.

En esta investigación, el mayor número de protocormos (25) se registró con la concentración total del medio MS 30 %, sin embargo, la tasa de germinación aún es baja, lo que se le atribuye a diversos factores como la impermeabilidad de la cubierta de la semilla. En muchas orquídeas, la cubierta exterior de la semilla se desarrolla a partir de dos capas de células (Yam *et al.*, 2002), mientras en *V. planifolia*, la cubierta exterior de la semilla se deriva de cuatro capas de células. También se puede deber a la acumulación de sustancias inhibitoras de la germinación, así como el momento de la recolección de las semillas (Lee *et al.*, 2015), componentes del medio de cultivo, como nutrientes orgánicos, fuentes de carbono, reguladores de crecimiento vegetal, intensidad lumínica y rangos de temperatura y pretratamientos de semillas (Dutra *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2012; Lee, 2005).

A pesar de que se ha determinado que la formulación de medio de cultivo estándar es óptimo para la mayoría de las especies de orquídeas. Las sales minerales en los medios de cultivo varían en sus concentraciones y en las formas disponibles de los macro y micronutrientes (Stewart y Kane, 2006). La disponibilidad del nitrógeno inorgánico en la composición del medio de cultivo MS puede limitar la germinación de las orquídeas, debido a la baja actividad de la nitrato reductasa durante la germinación de la semilla y al desarrollo temprano del protocormo (Jhonson *et al.*, 2007; Kauth *et al.*, 2008; Stewart y Kane, 2006). Por lo que algunos autores sugieren la reducción de concentración de sales minerales en el medio de cultivo para optimizar la germinación, el desarrollo del protocormo e inducir el crecimiento vigoroso de las plántulas durante el cultivo de semillas en orquídeas terrestres, como *V. planifolia* (Rännbäck, 2007; Huh, *et al.*, 2016; Dutra *et al.*, 2008).

Intensidad de luz

La concentración de sales minerales y la intensidad de luz tuvieron un efecto estadístico significativo en la formación de callos y nivel de oxidación en las semillas inmaduras de *V. planifolia* a los 175 dds (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto de la concentración de sales minerales e intensidad de luz sobre el nivel de oxidación y la generación de callo a los 90 y 175 dds en protocormos de *Vanilla planifolia*.

Fuente	GL	Oxidación		Callo	
		90 dds	175 dds	90 dds	175 dds
Concentración de Sales	1	0.624 ^{NS}	3.555**	0.390 ^{NS}	1.388 ^{NS}
Intensidad de luz	2	0.468 ^{NS}	0.722 ^{NS}	1.898 ^{NS}	2.055**
Concentración*Intensidad de luz	2	0.642 ^{NS}	0.722 ^{NS}	0.642 ^{NS}	1.388 ^{NS}

dds: días después de la siembra, NS: No significativo, (*): P≤ 0.05, (**): P≤ 0.01.

Se registró un aumento de 27 % el nivel de oxidación de los protocormos de *V. planifolia* en la concentración de sales minerales 20 % (Figura 3a). Así mismo se observó que al incrementar la intensidad de luz, la formación de callo aumentó 35 % (Figura 3b).

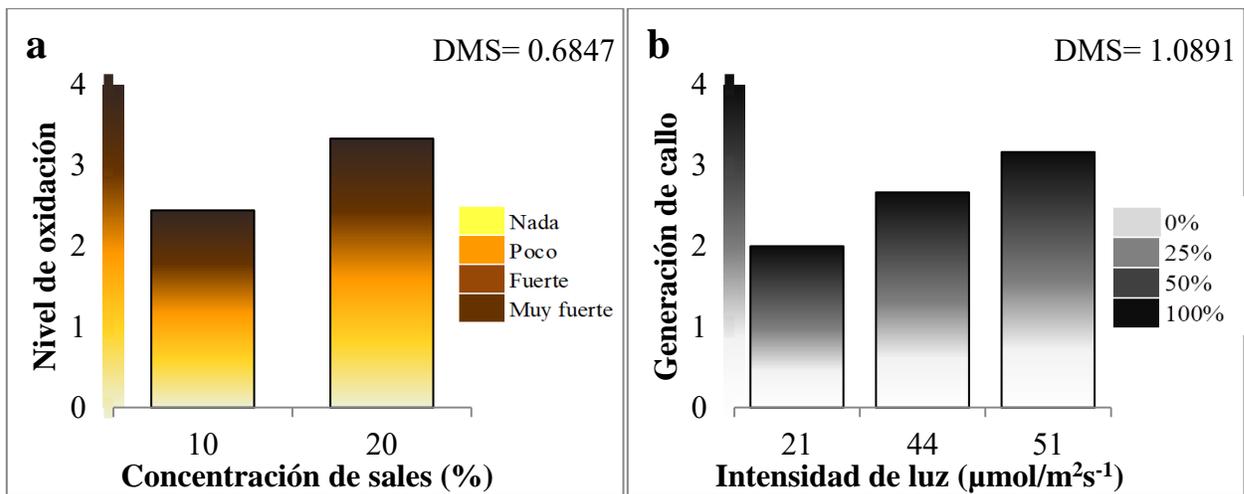


Figura 3. a) Influencia de la concentración de sales minerales en el nivel de oxidación; b) influencia de la intensidad de luz en la generación de callo de protocormos de *Vanilla planifolia*.

La oxidación en los protocormos puede ser causa de la alta cantidad de sales que contiene el medio MS (Frausto *et al.*, 2019). Por lo que algunos autores recomiendan el uso de antioxidantes en el medio de cultivo para disminuir el estrés oxidativo (Lukatkin *et al.*, 2019).

La condición de luz es otro factor crítico para la germinación exitosa de semillas de orquídeas, y aunque el efecto de la luz sobre la germinación de semillas de orquídeas no está generalizada, se ha determinado el efecto que ocasiona la calidad lumínica en el desarrollo de las plantas mediante el uso de luz LED roja, azul y blanca (Godo *et al.*, 2011; Baque *et al.*, 2011; Kaewjampa y Shimasaki, 2012; Lin *et al.*, 2011; Mengxi *et al.*, 2011).

Si bien, la intensidad de luz mayormente utilizada en cultivo *in vitro* fluctúa entre 11 y 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, en plantas maduras de *V. planifolia* se ha reportado que al ser expuestas a una radiación superior a 1, 285 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ se inhibe la fotosíntesis y el crecimiento (Díez *et al.*, 2017), ya que carece de mecanismos eficientes para tolerar y disipar el exceso de radiación (Graham y Andrade, 2004).

En especies de orquídeas terrestres la intensidad de luz inhibe la germinación de semillas. Sin embargo, también es crucial para la inducción y el desarrollo de callo, pero su efecto depende de la especie, lo que podría estar asociada con el tipo y número de fotorreceptores de cada especie (Godo *et al.*, 2010; Stewart y Kane 2006; Nhut *et al.*, 2003).

Concentración de citocininas y auxinas:

En esta investigación, se registró mayor número de protocormos (40) y plántulas (60) en presencia de combinaciones de auxina y citocinina (Cuadro 8).

Cuadro 8. Número total de protocormos y plántulas registradas a los 320 dds de exposición a diferentes concentraciones de BAP y AIB.

Tratamiento	Concentración (μM)		Número total	
	BAP	AIB	Protocormos	Plántulas
1	0	0	4	3
2		0.5	3	0
3	1	0	23	22
4		0.5	49	21
5	2	0	18	1
6		0.5	18	18
7	3	0	40	41
8		0.5	4	6
9	4	0	35	39
10		0.5	37	60

n = 5, BAP: Bencil-6 aminopurina, AIB: Ácido indolbutílico.

El análisis estadístico determinó que la fuente concentración de citocinina tuvo un efecto altamente significativo en la obtención de protocormos y plántulas totales, así como la interacción de la citocinina y auxina (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto del balance citocinina/auxina sobre el número total de protocormos y número total de plántulas de *Vanilla planifolia*.

Fuente	GL	Número total de protocormos	Número total de plántulas
Concentración de citocinina	4	93.025**	166.4**
Concentración de auxina	1	2.025 ^{NS}	0.025 ^{NS}
Citocinina*auxina	4	61.275**	61.4**

NS: No significativo; (*): $P \leq 0.05$; (**): $P \leq 0.01$.

Si bien, la citocinina influyó de manera independiente en el desarrollo de protocormos y plántulas de *V. planifolia*. El balance de 1 μM de BAP con 0.5 μM de AIB fue óptimo para obtener mayor número de protocormos (12.25) por caja Petri (Figura 4a). El mayor número de plántulas (15) por caja Petri se obtuvo al adicionar 4 μM de BAP y 0.5 μM de AIB al medio de cultivo (Figura 4b).

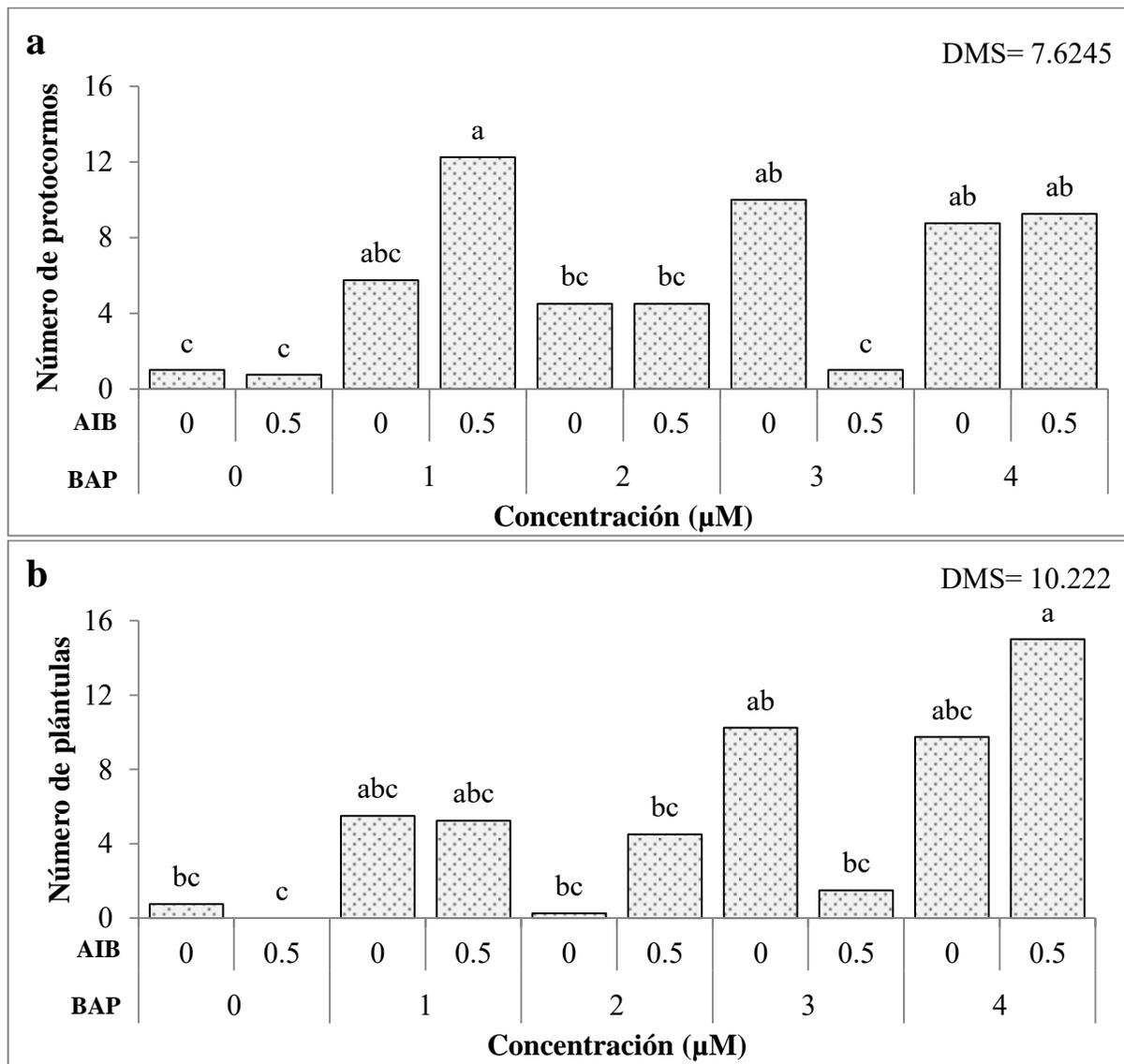


Figura 4. Influencia de la concentración de auxina y citocinina en la obtención de: a) protocormos y b) plántulas *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Aunque generalmente las auxinas estimulan la formación de raíces y las citocininas mejoran el desarrollo de los brotes y la división celular. Se ha determinado un efecto positivo para el desarrollo de protocormos al agregar citocininas (benciladenina o cinetina) en el medio de cultivo (Vejsadova, 2006).

A los 420 dds, el análisis de varianza del desarrollo de las plántulas de *V. planifolia* mostró que la fuente citocinina obtuvo respuesta estadística significativa y altamente significativa en todas las variables analizadas con excepción de la variable longitud de brote (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto de la concentración de citocininas y auxinas sobre la morfogénesis de *Vanilla planifolia*.

Fuente	GL	Longitud de plántula	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíz	Número de brotes	Longitud de brote
Citocinina	4	8.832**	6.328*	6.581**	6.190*	7.755*	0.126 ^{NS}
Auxina	2	0.035 ^{NS}	1.300 ^{NS}	1.614 ^{NS}	1.460 ^{NS}	2.068 ^{NS}	0.108 ^{NS}
Citocinina*auxina	8	0.241 ^{NS}	1.204 ^{NS}	0.742 ^{NS}	0.726 ^{NS}	2.484 ^{NS}	0.100 ^{NS}

NS: No significativo; (*): $P \leq 0.05$; (**): $P \leq 0.01$.

Se observó que la adición de citocinina en el medio de cultivo tuvo un efecto sobre la morfogénesis de las plántulas de *V. planifolia*, la cual muestra que la concentración de 1 a 4 μM de citocinina estimuló la proliferación de brotes. Sin embargo la exposición de 2 μM de citocinina obtuvo mayor número de brotes por explante (5.15) (Figura 5).

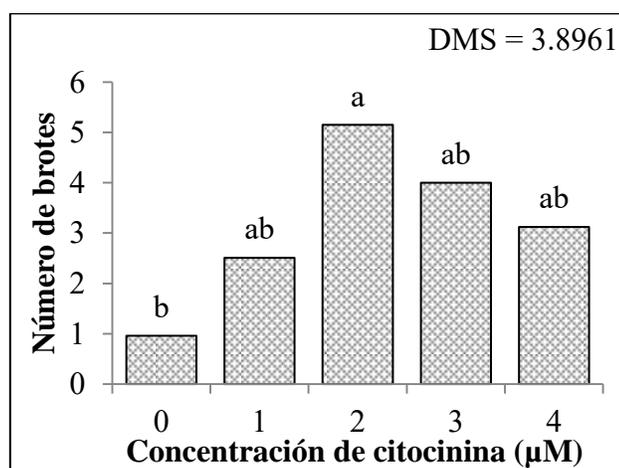


Figura 5. Influencia de la concentración de citocinina en la obtención de brotes *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Al aumentar la concentración a partir de 2 μM disminuyó la longitud de las plántulas, número de raíces, hojas y longitud de raíz (Figura 6). La concentración baja de BAP (1 y 2 μM) en el medio de cultivo estimuló el crecimiento de la plántula y el número de hojas al igual que el tratamiento testigo (Figura 6a y b). La exposición a citocinina de 1 a 3 μM estimuló el número y longitud de

raíces. El mayor número de raíces (3.4) se generó con 2 μM de citocinina (Figura 6c) y los tratamientos con 1 y 2 μM obtuvieron mayor longitud de raíz (3.93 y 3.83 cm respectivamente) (Figura 6d).

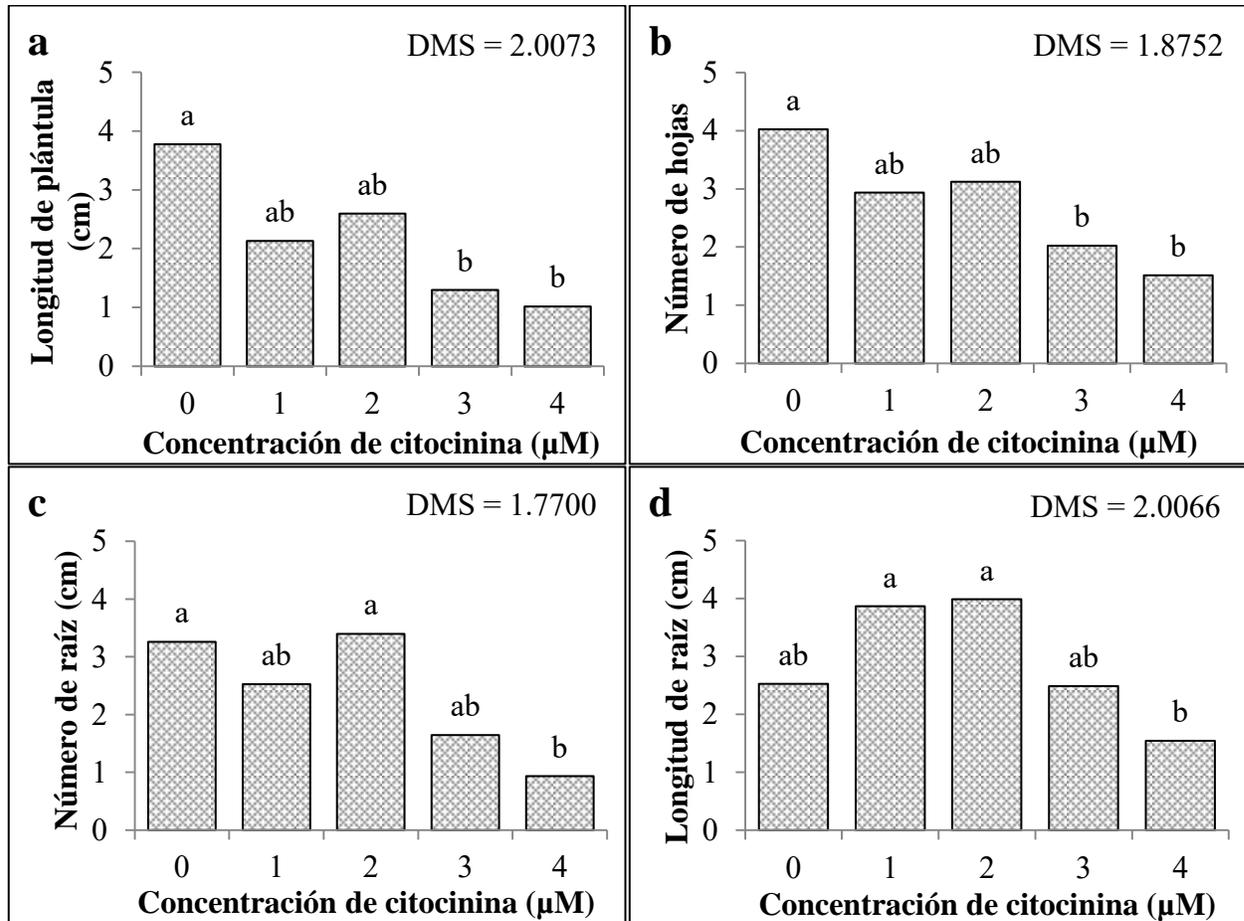


Figura 6. Influencia de la concentración de citocinina: a) longitud de plántula; b) número de hoja; c) número de raíz y d) longitud de raíz *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

La auxina y la citocinina promueven el crecimiento de forma independiente en las diferentes fases de desarrollo de las plántulas de orquídeas. Sin embargo, tienen un efecto crítico en la germinación de semillas y la formación de protocormos. Para ello, se ha implementado el medio de cultivo con varios tipos y concentraciones de fitohormonas. En *Aerides ringens* se obtuvo un efecto positivo en la tasa de germinación al añadir 0.57 μM de auxina AIA al medio de cultivo (Pyati, 2019). Sin embargo, la germinación se inhibió a partir de una concentración mayor a 5.71 μM de AIA en *Orchis coriophora* (Bektaş *et al.*, 2013).

La combinación de 0.57 μM IAA y 0.55 μM BAP desencadenó la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas y también se observó la acción sinérgica de la combinación de auxina-citocinina, algunos de los PLB's se dividieron y formaron múltiples cuerpos como protocormos (MPLB por sus siglas en inglés, multiple protocorm like bodies) (Pyati, 2019).

Se ha determinado que la combinación de AIB y BA mejoró la recuperación de protocormos de orquídeas y estimuló la formación de protocormos en *Serapias vomeracea* (Bektaş y Sökmen, 2016). Además, el desarrollo temprano de plántulas de especies de *Dactylorhiza* también mejoró mediante una combinación de citocinina con auxina (Wotavová *et al.*, 2007). Se ha informado que las fitohormonas son efectivas para mejorar la germinación de semillas de orquídeas inmaduras; las citocininas promueven la división celular de los embriones en desarrollo, mientras que las auxinas influyen en la formación de hojas y la morfogénesis del protocormo (Pierce y Cerabolini, 2011; De *et al.*, 2006). La presente investigación confirma el beneficio de la adición de concentraciones bajas de auxina y citocinina en las etapas iniciales de la germinación de semillas de *V. planifolia*, mientras que las citocininas favorecen el desarrollo de plántulas, así como en *Orchis militaris* (Nabieva, 2021).

La biosíntesis, el metabolismo, la distribución, las vías de señalización y las funciones de las citocininas se han investigado y caracterizado intensamente (Wu *et al.*, 2021). Ya que las citocininas influyen en muchos aspectos de los procesos biológicos que afectan el crecimiento y el desarrollo de las plantas, como la división celular, la dominancia apical, la iniciación y el crecimiento de los brotes, la filotaxis, los haces vasculares, la senescencia de las hojas, la ramificación y el desarrollo de nodos, la germinación de las semillas, la absorción de nutrientes, así como respuestas al estrés biótico y abiótico (Kieber y Schaller, 2018).

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

La concentración total de sales minerales no pareció tener un impacto significativo en la tasa de germinación, aunque se observó que una concentración máxima de 20% podría favorecer la germinación para obtener un mayor número de protocormos.

El aumento tanto de la concentración de sales minerales MS como de la intensidad de luz conlleva un incremento en los niveles de oxidación y la formación de callo. Estos hallazgos podrían utilizarse si el objetivo es la obtención de mayor porcentaje de tejido indiferenciado (callo) como vía de micropropagación por organogénesis.

El balance adecuado entre dosis bajas de auxina y dosis alta de citocinina puede generar un mayor número de protocormos y plántulas. Esto sugiere que una combinación de fitohormonas auxina y citocinina en concentraciones bajas es óptima para las etapas iniciales de la germinación de semillas. Y la aplicación de citocininas podría optimizar el desarrollo de plántulas a partir de protocormos. Ya que influyó en el desarrollo de las plántulas y la proliferación de brotes *in vitro* de *V. planifolia*.

Para generar una alternativa prometedora para aumentar la tasa de germinación *in vitro* de manera efectiva, se sugiere el uso de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia* expuestas a una concentración total de sales MS 20% con 1 μM de BAP y 0.5 μM de AIB, incubadas a una intensidad lumínica de 21 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

VI. LITERATURA CITADA

- Baque, M. A., Shin, Y. K., Elshmari, T., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2011)** Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong'×'Hyesung'and'Chunkwang'×'Hyesung'). *Australian Journal of Crop Science*, 5(10), 1247-1254.
- Bektaş, E., Cüce, M., & Sökmen, A. (2013)** *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 37(2), 336-342.
- de Wit, M., Galvão, V. C., & Fankhauser, C. (2016)** Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual review of plant biology*, 67, 513-537.
- De, K. K., Sudipta, M., Ramnath, S., & Bibaychana, S. (2006)** Green pod culture and rapid micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall.-a horticultural and medicinal orchid. *Folia Horticulturae*, 18(1), 81-90.
- Díez, M. C., Moreno, F., & Gantiva, E. (2017)** Effects of light intensity on the morphology and CAM photosynthesis of *Vanilla planifolia* Andrews. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 70(1), 8023-8033.
- Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Richardson, L. (2008)** Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(1), 11-21.
- Dutta Gupta, S., & Jatothu, B. (2013)** Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant biotechnology reports*, 7, 211-220.
- Frausto J, K. A., Ojeda Z, M. D. C., Alvarado G, O. G., García Z, E. A., Rodríguez F, H., & Rodríguez P. G. (2019)** Inducción de brotes de orquídeas de tallo floral *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 10 (6), 1207-1218.

- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R. y Gutiérrez, C. (2014)** La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22.
- Gayatri, M. C., & Kavyashree, R. (2005)** Influence of carbon sources on *in vitro* seed germination, protocorm and shoot formation in *Vanilla planifolia*. *J Curr Sci*, 7, 43-48.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008)** Plant tissue culture procedure-background. *Plant propagation by tissue culture* (pp. 1-28). Springer, Dordrecht.
- Godó, T., Fujiwara, K., Guan, K., & Miyoshi, K. (2011)** Effects of wavelength of LED-light on *in vitro* asymbiotic germination and seedling growth of *Bletilla ochracea* Schltr.(Orchidaceae). *Plant Biotechnology*, 1106240038-1106240038.
- Godó, T., Komori, M., Nakaoki, E., Yukawa, T., & Miyoshi, K. (2010)** Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(3), 323-328.
- Graham, E. A., & Andrade, J. L. (2004)** Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in a tropical dry forest. *American journal of Botany*, 91(5), 699-706.
- Hartmann, W. (1992)** *Orchids of Chiapas*. Gobierno del Estado de Chiapas, Consejo Estatal de Fomento a la Investigación y Difusión de la Cultura, DIF-Chiapas, Instituto Chiapaneco de Cultura.
- Hasing, T., Tang, H., Brym, M., Khazi, F., Huang, T., & Chambers, A. H. (2020)** A phased *Vanilla planifolia* genome enables genetic improvement of flavour and production. *Nature Food*, 1(12), 811-819.
- Havkin-Frenkel, D., & Belanger, F. C. (2018)** *Handbook of vanilla science and technology*. John Wiley & Sons 499 p.
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras, C., & Cervantes-Vargas, J. (2012)** Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1).

- Huh, Y. S., Lee, J. K., Nam, S. Y., Hong, E. Y., Paek, K. Y., & Son, S. W. (2016).** Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. *Journal of Plant Biotechnology*, 43(1), 132-137.
- Idowu, P. E., Ibitoye, D. O., & Ademoyegun, O. T. (2009)** Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*, 8(16).
- Johnson, T. R., Stewart, S. L., Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, L. (2007).** Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 90(3), 313-323.
- Kaewjampa, N., & Shimasaki, K. (2012)** Effects of green LED lighting on organogenesis and superoxide dismutase (SOD) activities in protocorm-like bodies (PLBs) of *Cymbidium* cultured *in vitro*. *Environmental Control in Biology*, 50(3), 247-254.
- Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T. R., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Vendrame, W. (2008)** Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 5, 375-391.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018)** Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145(4), dev149344.
- Kim, S. J., Hahn, E. J., Heo, J. W., & Paek, K. Y. (2004)** Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 101(1-2), 143-151.
- Knudson, L. (1922)** Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical gazette*, 73(1), 1-25.
- Knudson, L. (1950)** Germination of seeds of Vanilla. *American Journal of Botany*, 241-247.
- Lee, Y. I. (2018)** Vegetative propagation of orchids. In *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses methods and protocols* (pp. 403-425). Humana Press, New York, NY.
- Lee, Y. I., Chung, M. C., Yeung, E. C., & Lee, N. (2015)** Dynamic distribution and the role of abscisic acid during seed development of a lady's slipper orchid, *Cypripedium formosanum*. *Annals of botany*, 116(3), 403-411.

- Lee, Y. I., Lee, N., Yeung, E. C., & Chung, M. C. (2005)** Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(5), 747-753.
- Lestari, N. K. D. (2014)** Determining accurate harvesting times of *Coelogyne asperata* Lindl. Seed capsules for propagation using tissue culture technique. In *II International Orchid Symposium 1078* (pp. 49-52).
- Lin, Y., Li, J., Li, B., He, T., & Chun, Z. (2011)** Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(3), 329-335.
- Lo, S. F., Nalawade, S. M., Kuo, C. L., Chen, C. L., & Tsay, H. S. (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(5), 528-535.
- Lukatkin, A. S., Mokshin, E. V., Bolshakova, E. V., & Da Silva, J. A. T. (2019)** Effects of inorganic salts concentration and alternative plant growth regulators on the *in vitro* organogenesis of a new hybrid *Cymbidium*. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 100(3).
- Mengxi, L., Zhigang, X., Yang, Y., & Yijie, F. (2011)** Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(1), 1-10.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nabieva, A. Y. (2021)** Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Orchis militaris*, an endangered orchid in Siberia. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-11.
- Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Okamoto, K., & Tanaka, M. (2003)** Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(1), 43-52.

- Palama, T. L., Menard, P., Fock, I., Choi, Y. H., Bourdon, E., Govinden-Soulange, J., ... & Kodja, H. (2010)** Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC plant biology*, 10(1), 1-18.
- Pierce, S., & Cerabolini, B. E. L. (2011)** Asymbiotic germination of the White Mountain Orchid (*Pseudorchis albida*) from immature seed on media enriched with complex organics or phytohormones. *Seed Science and Technology*, 39(1), 199-203.
- Pyati, A. N. (2019)** *In vitro* seed germination, protocorm formation and plantlet regeneration in *Aerides ringens* Fisher. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29(1), 49-62.
- Rännbäck L (2007)** Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium* spp. Dept of Crop Science, SLU, Bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme, 1.
- Salazar-Mercado, S. A. (2012)** Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling formation of *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 61, 67-76.
- Soto-Arenas, M. A. (2006)**. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. *Biodiversitas*, 66(2).
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006)** Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 147-158.
- Suzuki, R. M., Moreira, V. C., Pescador, R., & de Melo Ferreira, W. (2012)** Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 500-511.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., ... & Yamaguchi, S. (2008)** Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195-200.
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., y Seeger, M. (2016)** Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.

- Vejsadova, H. A. N. A. (2006)** Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48(1), 109-113.
- Wotavová-Novotná, K., Vejsadová, H., & Kindlmann, P. (2007)** Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia plantarum*, 51, 198-200.
- Wu, W., Du, K., Kang, X., & Wei, H. (2021)** The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development. *Horticulture Research*, 8.
- Yam, T. W y Arditti, J. (2017)** *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons. Vol. I, 695 p.
- Yam, TW, Yeung, EC, Ye, XL, Zee, SY, Arditti, J., Kull, T. y Arditt, J. (2002)** Embriones de orquídeas. *Biología de las orquídeas: revisiones y perspectivas* , 287-385.
- Yeung, E. C., Li, Y. Y., & Lee, Y. I. (2018)** Understanding seed and protocorm development in orchids. *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols*, 3-26.

CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN *in vitro* DE SECCIONES NODALES DE *Vanilla planifolia*

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del tipo y concentración de citocininas en la inducción de brotes de secciones nodales *in vitro* de *Vanilla planifolia*. Los explantes se establecieron en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 50 % con tres citocininas (zeatina, 6-benciladeninopurina y cinetina) en cinco concentraciones cada una (1, 2, 3, 4 y 5 μM). Los explantes se incubaron a 25 ± 1 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad e intensidad de $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionadas por lámparas LED. Se realizó un análisis de varianza y prueba de separación de medias de Tukey (≤ 0.05) entre tratamientos con el paquete estadístico SAS® OnDemand for Academic. Las secciones nodales tratadas con BAP produjeron mayor número de brotes promedio por explante (1.4) comparados a los tratados con cinetina y zeatina (0.68 y 0.46 brotes por explante, respectivamente). Sin embargo, los brotes más largos (5.7 cm) se obtuvieron al incubarse en cinetina. Las secciones nodales expuestas a zeatina presentaron raíces de 5.2 cm. La interacción del BAP y concentración de 5 y 3 μM generó mayor número de brotes por explante (8.5 y 8.2, respectivamente). La longitud de brote, número y longitud de raíces se redujo al incrementar la concentración de citocinina. Se concluye que la cinetina promovió en el crecimiento de brotes, la zeatina indujo la formación de raíces mientras que el BAP estimuló la proliferación de brotes. Además, se observó una reducción en el crecimiento y desarrollo de brotes al aumentar la concentración de cualquier citocinina.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, secciones nodales, *in vitro*, citocininas.

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the effect of the type and concentration of cytokinins on the induction of shoots of nodal sections *in vitro* of *Vanilla planifolia*. The explants were established in 50% Murashige and Skoog (MS) culture medium with three cytokinins (zeatin, 6-benzyladeninopurine, and kinetin) at five concentrations each (1, 2, 3, 4, and 5 μM). The explants were incubated at 25 ± 1 °C with a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness and an intensity of 45 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ provided by LED lamps. An analysis of variance and Tukey's mean separation test (≤ 0.05) between treatments were performed with the statistical package SAS[®] OnDemand for Academic. Nodal sections treated with BAP produced a higher average number of shoots per explant (1.4) compared to those treated with kinetin and zeatin (0.68 and 0.46 shoots per explant, respectively). However, the longest shoots (5.7 cm) were obtained when incubated in kinetin. The nodal sections exposed to zeatin presented roots of 5.2 cm. The interaction of BAP and concentration of 5 and 3 μM generated a greater number of shoots per explant (8.5 and 8.2, respectively). Shoot length, root number and length decreased with increasing cytokinin concentration. It is concluded that kinetin promoted shoot growth, zeatin induced root formation while BAP stimulated shoot proliferation. In addition, a reduction in shoot growth and development was observed with increasing concentration of any cytokinin.

Keywords: *Vanilla planifolia*, nodal sections, *in vitro*, cytokinins

I. INTRODUCCIÓN

De manera tradicional la propagación de *Vanilla planifolia* se realiza por multiplicación clonal a partir de segmentos de tallos (esquejes) de plantas adultas (Divakaran *et al.*, 2006). No obstante, el número de plántulas producidas por este método es reducido ya que el exceso de poda de tallos conduce a la interrupción del crecimiento de la planta madre, lo que ocasiona reducción en el rendimiento. Por esto, la reproducción por esquejes difícilmente puede satisfacer la demanda nacional de materiales de plantación de calidad. Sin embargo, la multiplicación masiva de genotipos sobresalientes puede efectuarse mediante la técnica de cultivo *in vitro* (Giridhar *et al.*, 2001; Hasing *et al.*, 2020).

El cultivo *in vitro* una técnica caracterizada por manejar condiciones de esterilidad, disminuir el tiempo de propagación, además de la exclusión de patógenos y potencial para conservación a largo plazo, en comparación a los métodos convencionales (Erawati *et al.*, 2020), se utiliza para satisfacer la demanda del mercado de vainilla y para superar las dificultades de los métodos alternativos de propagación. La propagación *in vitro* de *V. planifolia* se realiza a través ápices meristemáticos, brotes y yemas axilares, ya que son altamente totipotentes, además acumulan la cantidad requerida de sustancias endógenas conocidas como hormonas vegetales producidas por diferentes vías metabólicas esenciales que regulan la expresión de factores de transcripción y genes específicos para su crecimiento, desarrollo y reproducción, estos compuestos generalmente son activos en concentraciones bajas (Idowu *et al.*, 2009; George *et al.*, 2008).

Existen productos químicos sintéticos con actividades fisiológicas similares a las hormonas vegetales que tienen la capacidad de modificar el crecimiento de las plantas, por ejemplo, las poliaminas llamadas “reguladores del crecimiento vegetal”. Las cuales se clasifican principalmente en; auxinas, citocininas, giberelinas (George *et al.*, 2008).

Las citocininas producen varios efectos, en particular, estimulan la síntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular; interrumpen la dominancia apical, además promueven la inducción y proliferación de yemas axilares *in vitro*, el uso de concentraciones adecuadas y el tipo de citocinina como son benciladenina (BA), 6-benzilaminopurina (BAP), 6-furfurilaminopurina (cinetina o KIN) influyen en el éxito de la micropropagación *in vitro* (George *et al.*, 2008).

El efecto de las citocininas es notorio en cultivos de tejidos *in vitro* donde se utilizan en conjunto con auxinas para estimular la división celular y controlar la morfogénesis. La adición de citocininas a los medios de cultivo genera la multiplicación de brotes ya que estos compuestos inducen la dominancia apical y liberan las yemas laterales de latencia. Las citocininas más utilizadas en cultivo *in vitro* son: kinetin, bencil-6-adeninopurina y zeatin (Hartmann, 1992; Salisbury, 2000; George *et al.*, 2008).

Estos reguladores de crecimiento han permitido potencializar la propagación *in vitro* de especies vegetales, además comprende la funcionalidad del metabolismo en los organismos vegetales desde el control hormonal vegetal, lo que genera conocimiento básico acerca de la fisiología vegetal en el campo científico, que se requiere para poder desarrollar de manera controlada diferentes procesos bioquímicos y mejorar el tiempo que requieren para su desarrollo (Cortes *et al.*, 2019).

Se han desarrollado diferentes metodologías de micropropagación para *V. planifolia* y están enfocadas principalmente a la producción de brotes y PLBs (por sus siglas en inglés *Protocorm Like Bodies*) a partir de ápices, segmentos nodales y yemas axilares (Jadid *et al.*, 2015, Biradar *et al.*, 2016; Ayele *et al.*, 2017), por medio de microestacas (Geetha y Shetty, 2000), o bien a partir de ápices radicales (Zuraida *et al.*, 2013). Sin embargo, los protocolos de micropropagación que se han desarrollado en este cultivo tienen una tasa de multiplicación baja (Janarthnam y Seshadri 2008; Velankar y Heble 2004).

Por lo tanto en la presente investigación se planteó el siguiente objetivo

Objetivo

Evaluar el efecto del tipo y concentración de citocininas en la inducción de brotes de secciones nodales *in vitro* de *Vanilla planifolia* para la micropropagación de vainilla.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se efectuó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en Uruapan, Michoacán.

El material vegetal se obtuvo de plántulas de *V. planifolia* propagadas *in vitro* proporcionadas por la Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba, Universidad Veracruzana.

En cada plántula se realizaron cortes de las secciones nodales de 1 cm en promedio con una yema axilar y se colocaron cuatro segmentos (Figura 1) por frasco de cristal con capacidad de 120 mL, con 30 mL de medio de sales minerales de Murashige y Skoog (MS) reducido 50 % con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), y tres tipos de citocininas (zeatina, 6-benciladeninopurina y cinetina) con cinco concentraciones cada una (1, 2, 3, 4 y $5 \text{ }\mu\text{M}$), sacarosa (30 g L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH y H_2SO_4 1N y se esterilizó en autoclave a 1.5 kg cm^{-2} de presión durante 15 min.

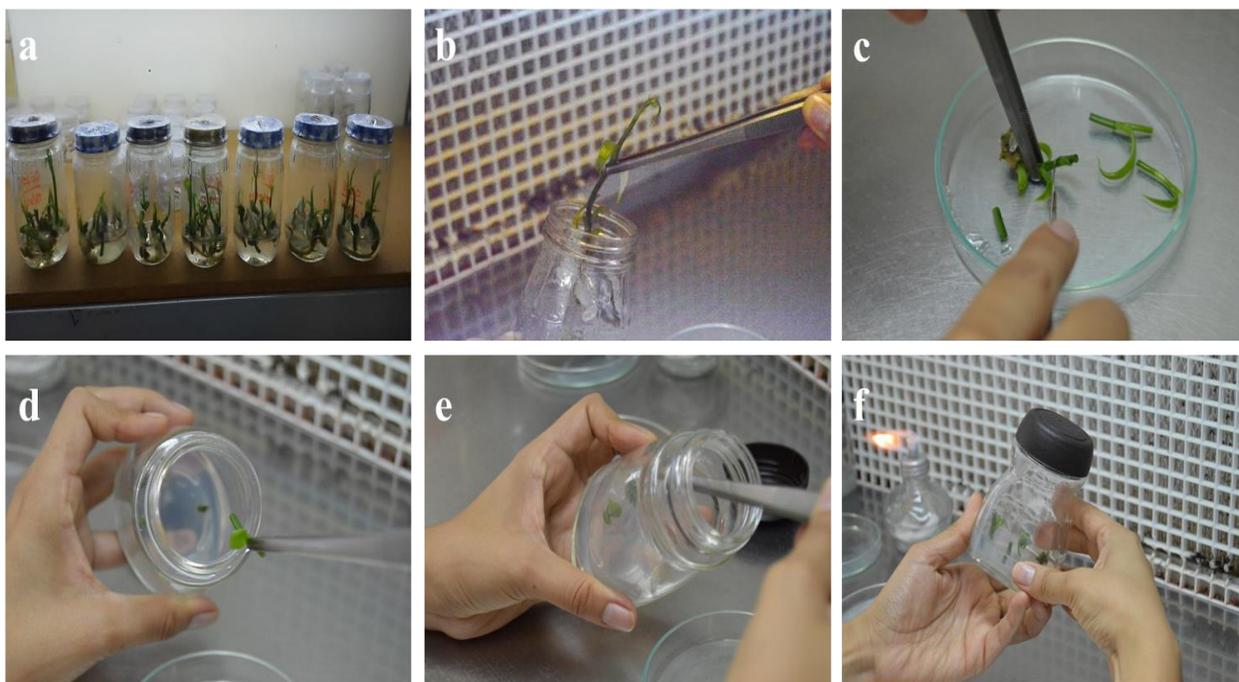


Figura 1. Establecimiento y subcultivo de plántulas de *Vanilla planifolia*: a y b) material vegetal, c) corte de secciones nodales, d y e) subcultivo de secciones nodales, f) secciones nodales subcultivados.

Las secciones nodales subcultivadas se incubaron a 25 ± 1 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad e intensidad de $45 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionado por lámparas de luz fluorescentes blancas frías.

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial entre los tratamientos que se generaron por la combinación de dos factores (tres tipos de citocininas y cinco distintas concentraciones) con cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue cinco secciones nodales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tipo y concentración de citocininas en secciones nodales de plántulas de *Vanilla planifolia* para su propagación *in vitro*.

Tratamiento	Tipo de Citocinina	Concentración (μM)
1	6-bencilaminopurina	1
2		2
3		3
4		4
5		5
6	Cinetina	1
7		2
8		3
9		4
10		5
11	Zeatina	1
12		2
13		3
14		4
15		5

n = 5

Variables evaluadas

A los 90 días después del subcultivo se evaluó; longitud del brote axilar, número de hojas, número de hojas plegadas, número de hojas extendidas, número de raíces, longitud de raíces, número y longitud de brotes.

Los datos de las variables evaluadas se analizaron mediante la prueba descrita por Shapiro Wilk, Barlett y Levene para determinar la normalidad y homogeneidad de varianza (estadística paramétrica) respectivamente, las cuales cumplieron en las variables longitud del brote axilar, número de hojas y longitud de raíces. Los datos de número de hojas, número de hojas plegadas, número de hojas extendidas, número de raíces y longitud de brotes se normalizaron mediante la transformación a potencia dos. Estas cinco variables se procesaron a través de un análisis de varianza ANDEVA con el procedimiento GLM, se utilizó la separación de medias de Tukey (≤ 0.05) para la comparación de medias entre tratamientos. Los análisis estadísticos de cada etapa de la investigación se efectuaron con el programa SAS[®] OnDemand for Academic.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tipo de citocinina influyó en todas las variables evaluadas con excepción al número de hojas plegadas. En cuanto la concentración, solo las variables longitud de plántula, número de entrenudos, número de raíces y longitud de raíces fueron altamente significativas. Sin embargo, la interacción del tipo y concentración de citocinina solo fue estadísticamente significativo en la variable longitud de raíces (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto del tipo y concentración de citocinina sobre el crecimiento de plántulas de *Vanilla planifolia*.

Fuente	GL	Número					Longitud			
		Entrenudos	Hojas	Hojas plegadas	Hojas extendidas	Raíces	Brotos	Plántula	Raíz	Brotos
Tipo de citocinina	2	23.52**	900.9**	23.3 ^{Ns}	321.1**	19.3*	523.9**	231.0**	177.9**	57.6**
Concentración	4	7.8*	120.7 ^{Ns}	11.2 ^{Ns}	28.8 ^{Ns}	22.6**	82.3 ^{Ns}	47.9**	28.3*	1.8 ^{Ns}
Tipo*Concentración	8	2.7 ^{Ns}	88.9 ^{Ns}	13.5 ^{Ns}	11.2 ^{Ns}	4.9 ^{Ns}	105.3 ^{Ns}	3.3 ^{Ns}	21.5*	2.2 ^{Ns}

n= 5, No significativo; (*): P≤ 0.05; (**): P≤ 0.01.

En nuestra investigación, las citocininas promovieron diferentes respuestas en el desarrollo y proliferación de brotes de *V. planifolia*. Las plántulas tratadas con la citocinina BAP generaron más número de brotes, comparadas con aquellas tratadas con cinetina y zeatina (67.2 y 51.5 % respectivamente) (Figura 2a). De igual forma, los explantes expuestos con citocinina BAP presentaron de brotes 86.7 % más largos que con las citocininas cinetina y zeatina (Figura 2b).

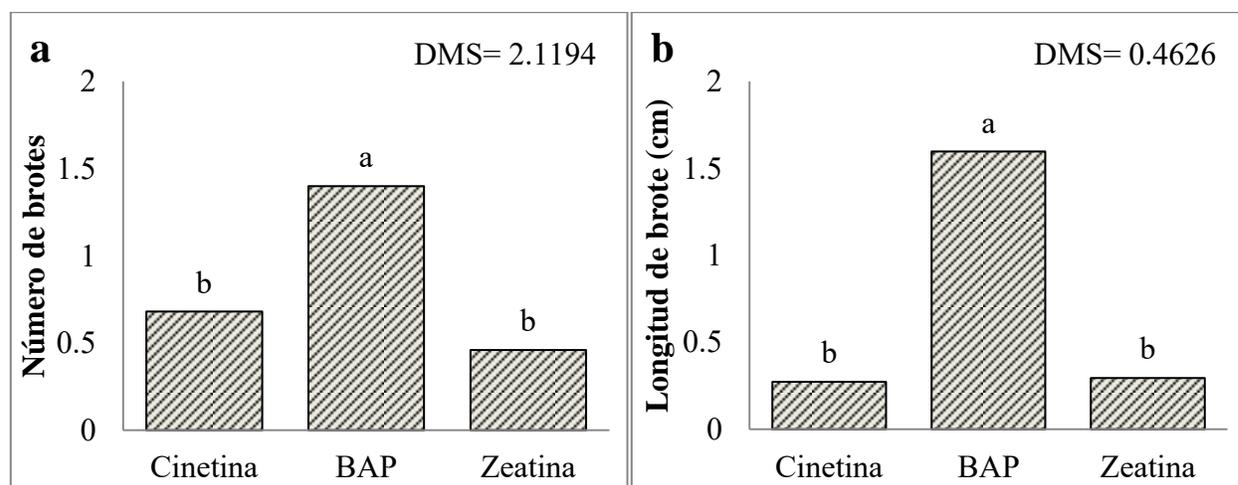


Figura 2. Influencia del tipo de citocininas: a) número de brotes y b) longitud de brotes *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

En cultivo *in vitro* los tipos y niveles de reguladores de crecimiento como las citocininas son un componente crítico en el medio de cultivo para determinar la vía de desarrollo del explante, ya que, las citocininas reducen la dominancia del meristemo apical e inducen la formación de brotes axilares y adventicios (Sipayung *et al.*, 2018). Sin embargo, cada especie tiene una capacidad de respuesta distinta, por lo que es necesario optimizar el tipo y concentración de citocininas para la multiplicación de brotes (Sukarnih *et al.*, 2021; Sreedhar *et al.*, 2007).

En nuestra investigación, la mayor longitud de brotes axilares se observó (5.76 cm) con la exposición de cinetina, comparados con los explantes expuestos a zeatina y BAP que fueron 50.1 y 40.4 % más cortos respectivamente (Figura 3a). Del mismo modo, el número de entrenudos de las plántulas expuestas a la citocinina cinetina superó en 35.8 y 21.5 % a los entrenudos de las plántulas expuestas a zeatina y BAP respectivamente (Figura 3b).

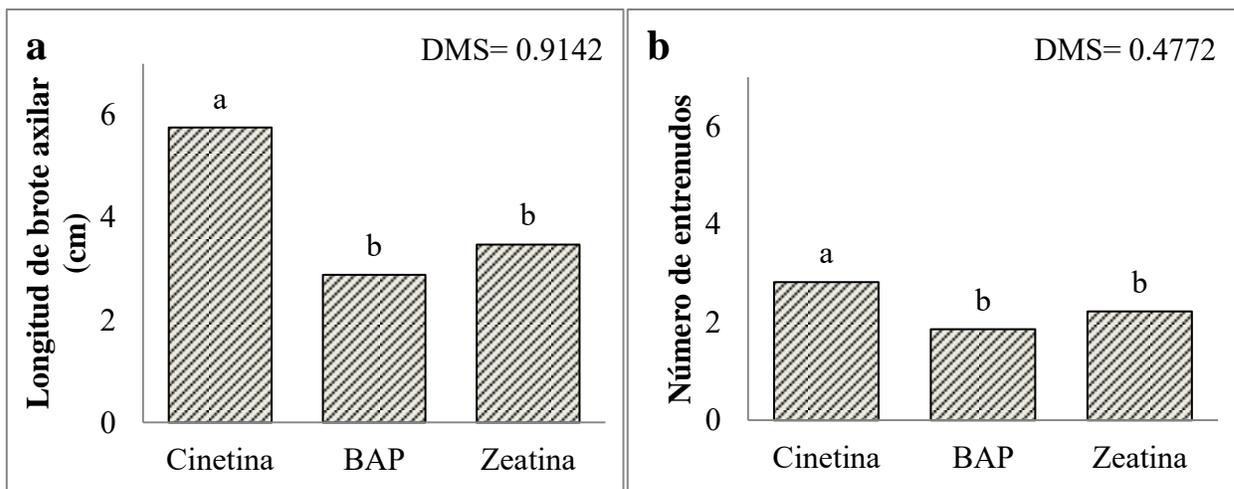


Figura 3. Influencia del tipo de citocinina: a) longitud de brote axilar y b) número de entrenudos de plántulas *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

En la micropropagación de vainilla, la utilización de citocininas como N6-(2-isopentenil) adenina (2iP), 4-hidroxi-3-metil-términos-2-butenil aminopurina (zeatina) y 6-furfurilaminopurina (cinetina o KIN) rara vez se ha informado (Gantait y Kundu, 2017). La citocinina más utilizada para la multiplicación de brotes de vainilla es BAP (George *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha observado que el uso prolongado de citocininas como el BAP induce la hiperhidricidad, (Sreedhar *et al.*, 2007).

En nuestra investigación, las yemas axilares tratadas con cinetina incrementaron 39 y 37.5 % el número total de hojas (Figura 4a) y 70.3 y 61.8 % el número de hojas extendidas (Figura 4b) comparadas con las secciones nodales expuestas a zeatina y BAP respectivamente.

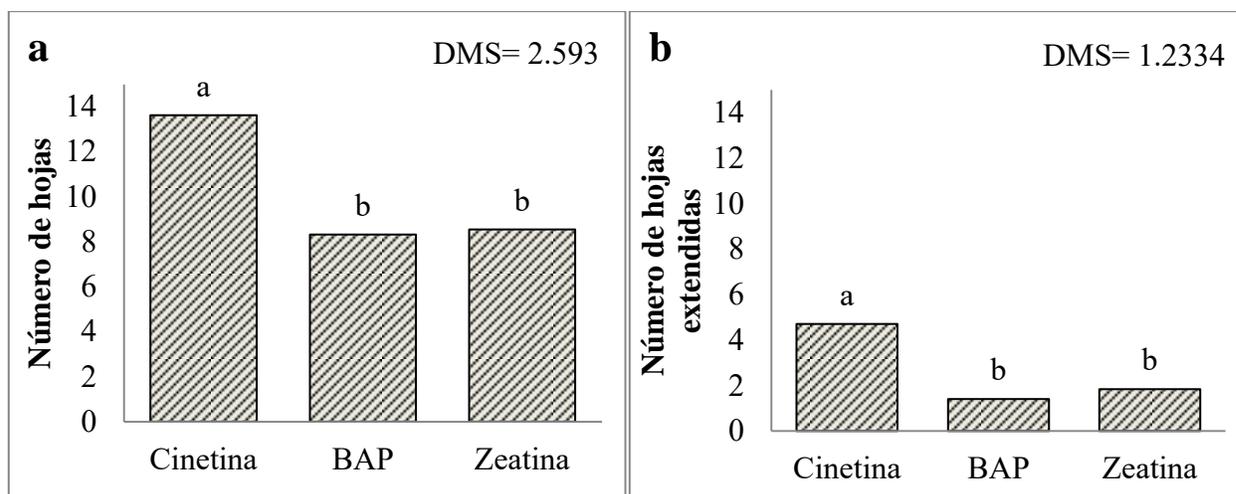


Figura 4. Influencia del tipo de citocinina: a) número de hojas y b) número de hojas extendidas de plántulas *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Si bien, la cinetina influyó en el número de raíces y superó con 28 y 22 % a los tratados con zeatina y BAP, respectivamente (Figura 5a). Sin embargo, los tratamientos con zeatina presentaron 52 y 48 % mayor longitud de raíces que los que fueron tratadas con cinetina y BAP, respectivamente (Figura 5b).

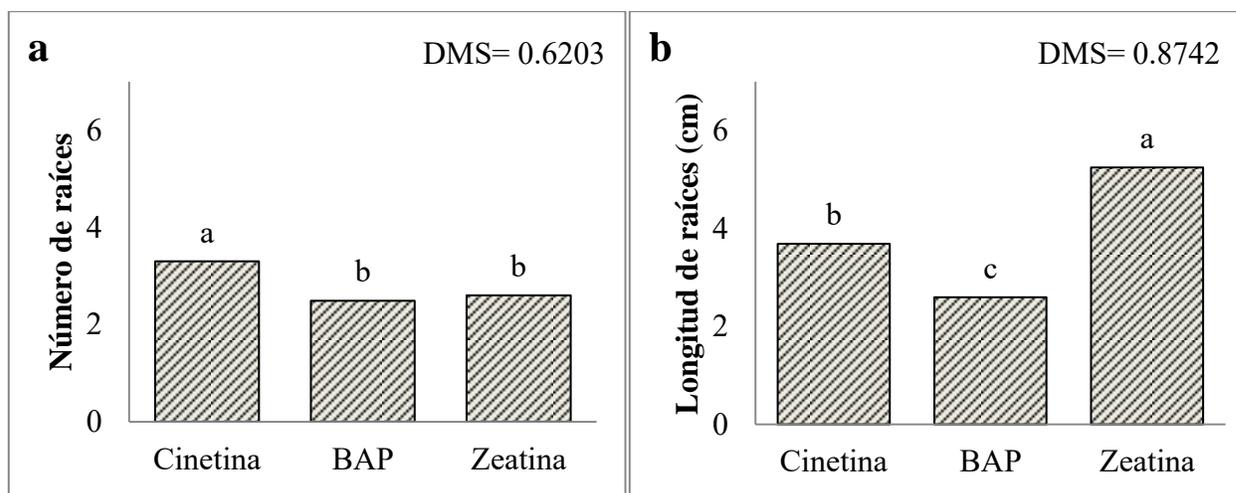


Figura 5. Influencia del tipo de citocinina: a) número de raíces y b) longitud de raíces de plántulas *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

En *V. planifolia* para la generación de brotes, la concentración de la citocinina es un factor que obtiene diferentes respuestas en el número de brotes; al adicionar 1 mg L de BAP al medio de cultivo generó un promedio de 6.8 brotes por explante (Erawati *et al.*, 2020), Tan *et al.*, 2013 obtuvieron 10 brotes en promedio y 6.1 brotes en promedio al utilizar 8.88 μM de BAP mientras que al adicionar 3 mL^{-1} se adquirió 3-4 brotes (Renuga y Saravara-Kumar, 2014).

En nuestra investigación, la concentración de citocinina redujo la longitud de brote axilar (Figura 6a), número de raíces (Figura 6b), longitud de raíces (Figura 6c) y número de entrenudos (Figura 6d) conforme se incrementó la concentración de esta fitohormona.

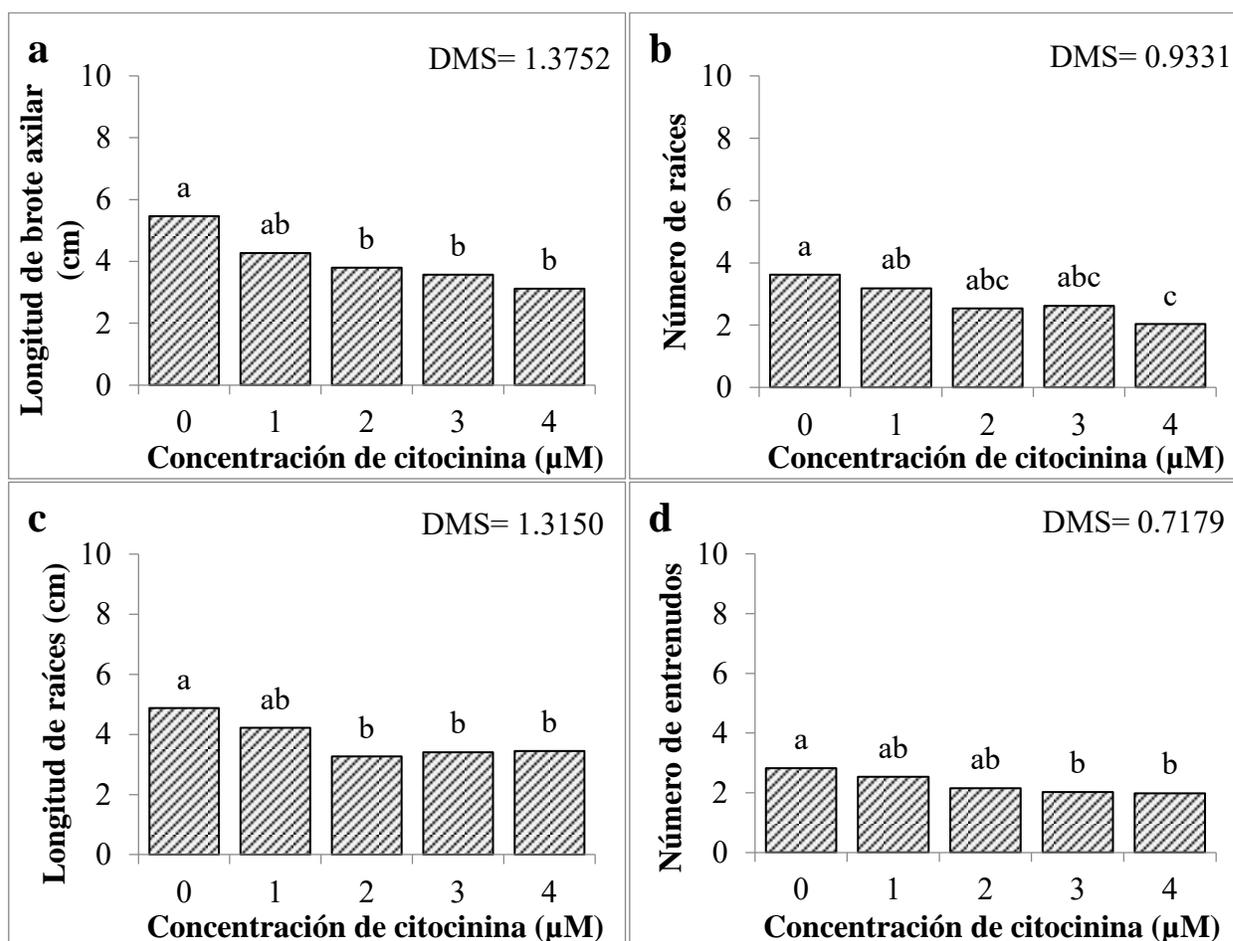


Figura 6. Influencia de la concentración de citocinina en: a) longitud de brotes axilares, b) número de raíces, c) longitud de raíces, d) número de entrenudos de *Vanilla planifolia*.

Mientras que en nuestra investigación el uso de la zeatina en el medio de cultivo a concentración de 1 μM incrementó la longitud de raíces (6.8 cm promedio) en comparación con el BAP a una concentración de 4 μM , la cual presentó una longitud de raíz promedio de 1.2 cm (Figura 7). Sin

embargo, se ha reportado la inducción de brotes con éxito en, *Vaccinium myrtillus* con la adición de 0.5 mg L obtuvieron 8.6 brotes en promedio (Hang *et al.*, 2022). Esto se debe a que existen factores que controlan la capacidad de regeneración de brotes de los explantes como los reguladores de crecimiento endógenos que juegan un papel crucial en la formación de brotes adventicios e *in vitro* (Lee *et al.*, 2020), así como la edad de la planta, la posición, orientación y la densidad del explante (Yildiz, 2012).

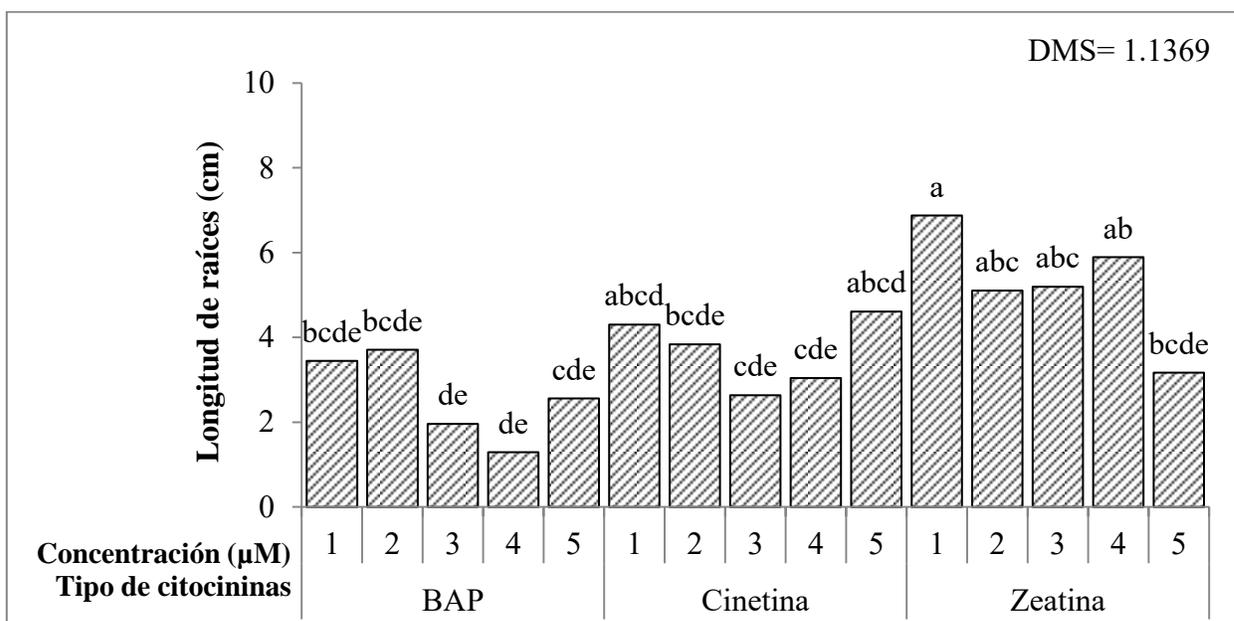


Figura 7. Influencia del tipo y concentración de citocinina en la longitud de raíces de *Vanilla planifolia*.

En *V. planifolia* se ha reportado la proliferación de 2 brotes al adicionar 2 mg L⁻¹ de cinetina al medio de cultivo (Inderiati *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha registrado la inducción de brotes de 4 brotes en promedio al utilizar una concentración de 6.97 µM de cinetina en *Ipsea malabarica* (Martin, 2003). En la presente investigación los explantes cultivados con BAP a concentración de 5 y 3 µM mostraron mayor número de brotes promedio (8.5 y 8.2 respectivamente) en comparación con los tratados con zeatina a 1 µM de concentración que obtuvo un promedio de 0.1 brotes (Figura 8).

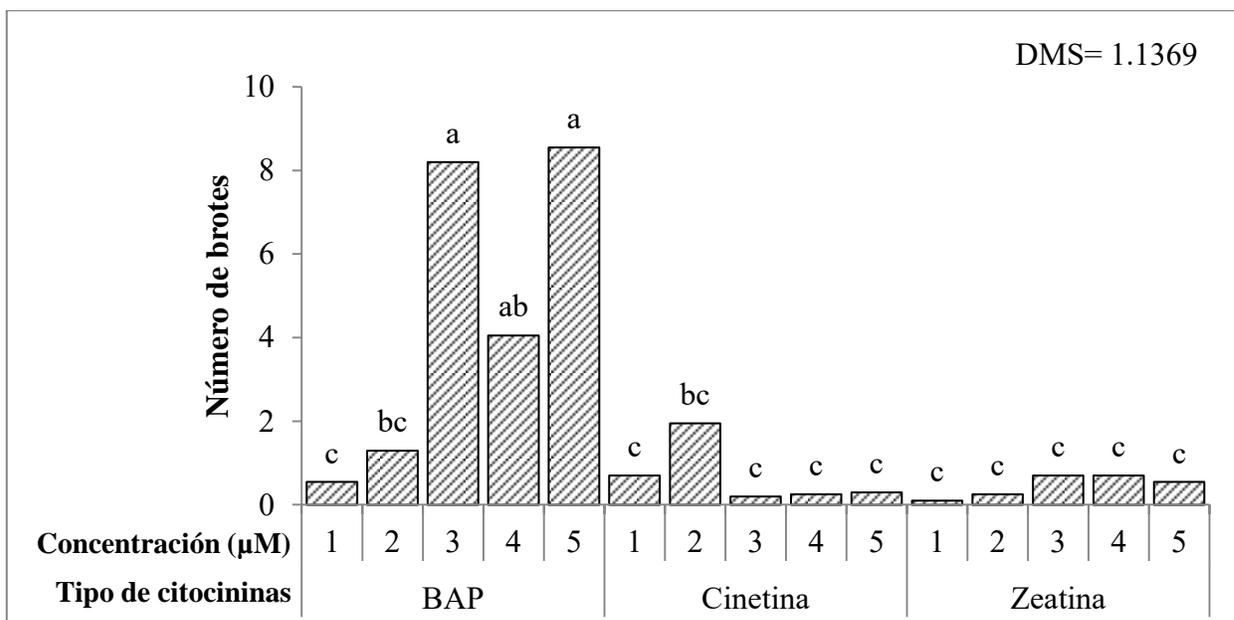


Figura 8. Influencia del tipo y concentración de citocinina en número de brotes de *Vanilla planifolia*.

El número reducido de brotes al adicionar cinetina al medio de cultivo se puede atribuir a la dificultad que la cinetina ocasiona en el crecimiento de brotes axilares, así como adventicios (Jadid *et al.*, 2015). Pese al número limitado de brotes, otros autores sugieren el uso de cinetina en *V. planifolia* para acelerar la inducción de la biosíntesis de ácido vanílico, compuesto aromático de la vainilla de interés comercial (Renuga y Saravana-Kumar, 2014).

V. CONCLUSIONES

Los resultados de nuestra investigación revelan que las citocininas tuvieron diferentes efectos en el crecimiento y desarrollo de los brotes de *V. planifolia*. Mientras que la cinetina promovió el crecimiento de los brotes, la zeatina indujo la formación de raíces y el BAP estimuló la proliferación de brotes. Sin embargo, se observó que un aumento en la concentración de cualquier tipo de citocinina utilizada en el estudio resultó en la inhibición del crecimiento y desarrollo de los brotes.

Con el objetivo de optimizar la micropropagación clonal de *V. planifolia*, se sugiere emplear 3 o 5 μM de BAP para la proliferación de brotes, cinetina para aumentar la longitud del brote axilar y 1 μM de zeatina para la inducción de raíces. Estas concentraciones específicas de citocininas podrían ser clave para mejorar el proceso de propagación clonal y obtener resultados óptimos en la multiplicación de *V. planifolia*. Con esta información, se abre la posibilidad de impulsar la producción y conservación de *V. planifolia* de manera más eficiente y sostenible, lo que podría tener un impacto significativo en la industria y en la conservación de esta especie.

VI. LITERATURA CITADA

- Ayele, Y. B., Tefera, W., & Bantte, K. (2017)** Enhanced Protocol Development for *in vitro* Multiplication and Rooting of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) Clone (Van. 2/05). *Biotechnology Journal International*, 1-11.
- Biradar, V., Inamdar, A., Shamse, A., & Patil, M. S. (2016)** *In vitro* Studies on the influence of different concentrations of growth regulators on economically important orchid, *Vanilla planifolia*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 5(9), 311-323.
- Cortes, J. S. A., Godoy, J. A., Cortés, J. D. A., y Mora, R. M. S. (2019)** Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Divakaran, M., Babu, K. N., Ravindran, P. N., & Peter, K. V. (2006)** Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*, 108(4), 414-422.
- Erawati, D. N., Wardati, I., Humaida, S., & Fisdiana, U. (2020)** Micropropagation of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Andrews) with Modification of Cytokinins. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 411, No. 1, p. 012009). IOP Publishing.
- Gantait, S., & Kundu, S. (2017)** *In vitro* biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9), 1-19.
- Geetha, S., & Shetty, S. A. (2000)** *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current science*, 79(6), 886-889.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008)** Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. *Springer, Dordrecht, The Netherlands*, 1, 501.
- Giridhar, P., Reddy, B. O., & Ravishankar, G. A. (2001)** Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. *Current Science*, 81(9), 1166-1170.
- Hang, N. T. T., Hoang, N. T. P., Van Khiem, D., & Huyen, P. X. (2022)** Study on *in vitro* propagation of *Vaccinium myrtillus* Linn. via nodal culture method. *Academia Journal of Biology*, 44(2), 53-64.
- Hartmann, W. (1992)** *Orchids of Chiapas*. Gobierno del Estado de Chiapas, Consejo Estatal de Fomento a la Investigación y Difusión de la Cultura, DIF-Chiapas, Instituto Chiapaneco de Cultura.

- Hasing, T., Tang, H., Brym, M., Khazi, F., Huang, T., & Chambers, A. H. (2020)** A phased *Vanilla planifolia* genome enables genetic improvement of flavour and production. *Nature Food*, 1(12), 811-819.
- Idowu, P. E., Ibitoye, D. O., & Ademoyegun, O. T. (2009)** Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*, 8(16).
- Inderiati, S., & Ratnawati, R. (2019)** *In vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) on different concentration of cytokinins. *Agroplanta: Jurnal Ilmiah Terapan Budidaya dan Pengelolaan Tanaman Pertanian dan Perkebunan*, 8(1), 14-17.
- Jadid, N., Nurhidayati, T., & Priyono, P. (2015)** *In Vitro* Clonal Propagation of *Vanilla planifolia* Andrews Using Microshoot-derived Node Explants. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 5(6).
- Janarthanam, B., & Seshadri, S. (2008)** Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(2), 84-89.
- Lee, M. H., Lee, J., Jie, E. Y., Choi, S. H., Jiang, L., Ahn, W. S., ... & Kim, S. W. (2020)** Temporal and spatial expression analysis of shoot-regeneration regulatory genes during the adventitious shoot formation in hypocotyl and cotyledon explants of tomato (cv. Micro-Tom). *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5309.
- Martin, K. P. (2003)** Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipea malabarica* (Reichb. f.) JD Hook., an endangered orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(3), 322-326.
- Renuga, G., & Saravana-Kumar, S. N. (2014)** Induction of vanillin related compounds from nodal explants of *Vanilla planifolia* using BAP and kinetin. *Asian J. Plant Sci. Res*, 4(1), 53-61.
- Salisbury B. F y Ross W. C. (2000)** Fisiología de las plantas; Trad. por Alonso J. ed. Thomson. España, editorial Paraninfo S.A. 987 p.
- Sipayung, P., Matanari, J., Lafau, M. B., Sulastri, Y. S., Ginting, B. B., Sihombing, D. R., ... & Giawa, T. (2018)** The effect of activated charcoal dose and benzyl amino purine concentration on the growth of orchid plantlets in murashige and skoog media *in vitro*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 205, No. 1, p. 012025).

- Sreedhar, R. V., Venkatachalam, L., Roohie, K., & Bhagyalakshmi, N. (2007)** Molecular analyses of *Vanilla planifolia* cultivated in India using RAPD and ISSR markers. *Orchid Sci. Biotech*, 1, 29-33.
- Sukarnih, T., Rudiyan, Y., Hanifah, N. F., & Sa'adah, N. (2021)** Micropropagation of red ginger (*Zingiber officinale* Rosc. Var. rubrum) using several types of cytokinins. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1751, No. 1, p. 012051).
- Tan, B. C., Chin, C. F., & Alderson, P. (2013)** Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5), 626-630.
- Velankar, M. H., & Heble, M. R. (2004)** Biotransformation of externally added vanillin related compounds by multiple shoot cultures of *Vanilla planifolia* L. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 13(2), 153-156
- Yildiz, M. (2012)** The prerequisite of the success in plant tissue culture: high frequency shoot regeneration. *Recent advances in plant in vitro culture. Intech, Rijeka*, 63-90.
- Zuraida, A.R., Liyana, K.H.F., Nazreena, O.A., Wan, W.S., Che, C.M.Z., Zamri, Z., Sreeramanan, S., (2013)** A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Vanilla planifolia*. *American Journal of Plant Sciences* 4, 1685–1692.

CAPÍTULO III. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA *in vitro* EN PROTOCORMOS DE *Vanilla planifolia*

RESUMEN

Con el objetivo de estandarizar un protocolo para la inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *Vanilla planifolia*, en la presente investigación se preparó medio MS 20 % adicionado con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}), agar (6 g L^{-1}) y BAP (1 mg), se colocaron 10 protocormos obtenidos a partir de germinación *in vitro* y se realizaron aplicaciones cada 15 días (1, 2 y 3 veces) con tres distintas cantidades de colchicina (0.1 %) con colorante rojo (1, 2 y 3 mL) y se incubaron a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad e intensidad de $45 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionadas por lámparas LED. Se utilizó un diseño experimental completamente el azar con tres repeticiones, la unidad experimental consistió en un protocormo. Para el análisis estadístico, se realizó un análisis de varianza y prueba de separación de medias de Tukey (≤ 0.05) entre tratamientos con el paquete estadístico SAS® OnDemand for Academic. Los resultados determinan que la aplicación de 2 mL de colchicina 0.1 % en intervalos de 15 días fue óptima para obtener un mayor número y longitud de brotes, así como un mayor número de hojas. Por otro lado, una aplicación con 1 mL de colchicina 0.1 % generó mayor número de raíces, similar al aplicar 2 mL de colchicina 0.1 %. Se observó que la exposición de protocormos con 3 mL de colchicina 0.1 % con intervalos de 15 días generó tejido necrótico escamoso y presentó alteraciones morfológicas. Con ello, es posible realizar una estandarización para un protocolo de inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *V. planifolia*.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, poliploidía, colchicina, protocormos, *in vitro*.

SUMMARY

In order to standardize a protocol for the induction of *in vitro* polyploidy in *Vanilla planifolia* protocorms, in the present investigation 20% MS medium was prepared, added with thiamine (0.4 mg L⁻¹), myo-inositol (100 mg L⁻¹), sucrose (30 g L⁻¹), agar (6 g L⁻¹) and BAP (1 mg), 10 protocorms obtained from *in vitro* germination were placed and applications were made every 15 days (1, 2 and 3 times) with three different amounts of colchicine (0.1 %) with red dye (1, 2 and 3 mL) and incubated at 25 ± 1 °C with a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness and an intensity of 45 μmol m⁻²s⁻¹ provided by LED lamps. A completely randomized experimental design with three repetitions was used, the experimental unit consisted of a protocorm. For the statistical analysis, an analysis of variance and Tukey's mean separation test (≤ 0.05) were performed between treatments with the statistical package SAS[®] OnDemand for Academic. The results determine that the application of 2 mL of colchicine 0.1 % at intervals of 15 days was optimal to obtain a greater number and length of shoots, as well as a greater number of leaves. On the other hand, an application with 1 mL of 0.1 % colchicine generated a greater number of roots, similar to applying 2 mL of 0.1 % colchicine. It was observed that exposure of protocorms with 3 mL of 0.1% colchicine at 15-day intervals generated squamous necrotic tissue and presented morphological alterations. With this, it is possible to carry out standardization for an *in vitro* polyploidy induction protocol in *V. planifolia* protocorms.

Key words: *Vanilla planifolia*, polyploidy, colchicine, protocorms, *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético de plantas ornamentales, especialmente en orquídeas, ha aumentado en términos de cantidad y valor, lo que ha generado una competencia entre los negocios de producción por lo que es fundamental la generación de nuevas variedades de calidad. Para el fitomejorador es esencial la generación de flores más grandes, por lo que la poliploidía es una técnica donde se aumenta el número cromosómico mediante el uso de agentes antimitóticos, que pueden modificar las características de las plantas a rasgos deseables (Choopeng *et al.*, 2019).

Así, la poliploidía juega un papel importante en el mejoramiento de muchas plantas hortícolas, en particular de las orquídeas (Sattler *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2017; Pham *et al.*, 2019). Puesto que la poliploidización tiene el papel más importante en la hibridación, mejora y producción de plantas y variedades en la industria florícola de orquídeas (Miguel y Leonhardt, 2011; Azmi *et al.*, 2016; Huy *et al.*, 2019; Zakizadeh *et al.*, 2020).

En las plantas, de manera natural ocurre la poliploidización, pero es un proceso lento y gradual por lo que se puede inducir en un período más corto mediante el uso de colchicina y otros agentes antimitóticos que interfieren con la mitosis de las células (Eng y Ho, 2019). Las plantas poliploides exhiben un crecimiento vigoroso con órganos más grandes, mejor calidad y mejor resistencia al estrés biótico y abiótico (Shi *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016; Corneillie *et al.*, 2018; Huy *et al.*, 2019; Zakizadeh *et al.*, 2020).

Para la inducción de plantas poliploides se puede realizar mediante la exposición a sustancias químicas que inhiben la formación de fibras del huso, en donde la cromátida hermana no puede dirigirse hacia el polo opuesto de la célula durante la etapa de anafase en la división celular. Algunas de las sustancias químicas para inducir poliploidía son; la colchicina, orizalina, trifluralina, amiprofosetil y óxido nítrico. La colchicina es un alcaloide extraído de las semillas y cormos de *Colchicum autumnale* L. y se utiliza con éxito para inducción de ploidía en plantas (Choopeng *et al.*, 2019).

El éxito en la inducción de poliploidía depende del método de aplicación de los agentes antimitóticos, la concentración, tiempo de exposición, el explante utilizado, la especie y el tipo de cultivo (Eng y Ho, 2019). A pesar de que la colchicina ha sido ampliamente utilizada para orquídeas o poliploidización de varios cultivos, un protocolo adecuado de inducción de poliploidía con alta producción de plantas mutantes de poliploidía deseadas aun es limitado. En

orquídeas se han establecido sobre diversos materiales vegetales, sin embargo, destaca el uso de protocormos, cuerpos similares a protocormos (PLB) y la inmersión de plántulas en solución acuosa de colchicina, (Sarathum *et al.*, 2010; Miguel y Leonhardt, 2011; Kerdsuwan y Te-chato 2012; Atichart 2013).

Sin embargo, los protocormos en orquídeas son las partes de las plantas mayormente utilizadas para inducir poliploidía (Miguel y Leonhardt, 2011; Zakizadeh *et al.*, 2020). Los géneros de orquídeas más importantes que se han mejorado mediante técnicas de poliploidización con la exposición a colchicina son: *Phalaenopsis*, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Vanda* y *Cattleya* (Huy *et al.*, 2019; Hwang *et al.*, 2015).

Se ha observado que la concentración y la duración del tiempo de exposición en la colchicina para la inducción de poliploidía es específica para cada especie; la concentración de colchicina comúnmente utilizada está entre el 0,01% y el 1,00% (Huy *et al.*, 2019) y la identificación de organismos poliploides se realizó mediante conteo de cromosomas (Chen y Tang, 2018).

Objetivo

Propagar y estandarizar un protocolo para la inducción de poliploidía *in vitro* en protocormos de *Vanilla planifolia*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

En medio basal con sales minerales de Murashige y Skoog (MS) 20 % adicionado con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}), agar (6 g L^{-1}) y BAP (1 mg), se colocaron 10 protocormos obtenidos a partir de germinación *in vitro* y se realizaron aplicaciones cada 15 días (1, 2 y 3 veces) con tres distintas cantidades de colchicina (0.1 %) con colorante rojo (1, 2 y 3 mL). Los protocormos se incubaron a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad e intensidad de $45 \text{ } \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ proporcionado por lámparas de luz fluorescentes blancas frías. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aplicación de colchicina 0.1 % con colorante.

Tratamiento	Frecuencia y dosis de aplicación		
	(días/mL)		
	15	30	45
1	0	0	0
2	1	0	0
3	1	1	0
4	1	1	1
5	2	0	0
6	2	2	0
7	2	2	2
8	3	0	0
9	3	3	0
10	3	3	3

Después de 60 días de incubación, en la campana de flujo laminar se extrajeron los protocormos, y se colocaron en medio basal con sales minerales de Murashige y Skoog (MS) 20 % adicionado con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}), agar (6 g L^{-1}) y BAP (1 mg L^{-1}). Se realizaron cinco subcultivos cada 30 días hasta su evaluación (Figura 1).

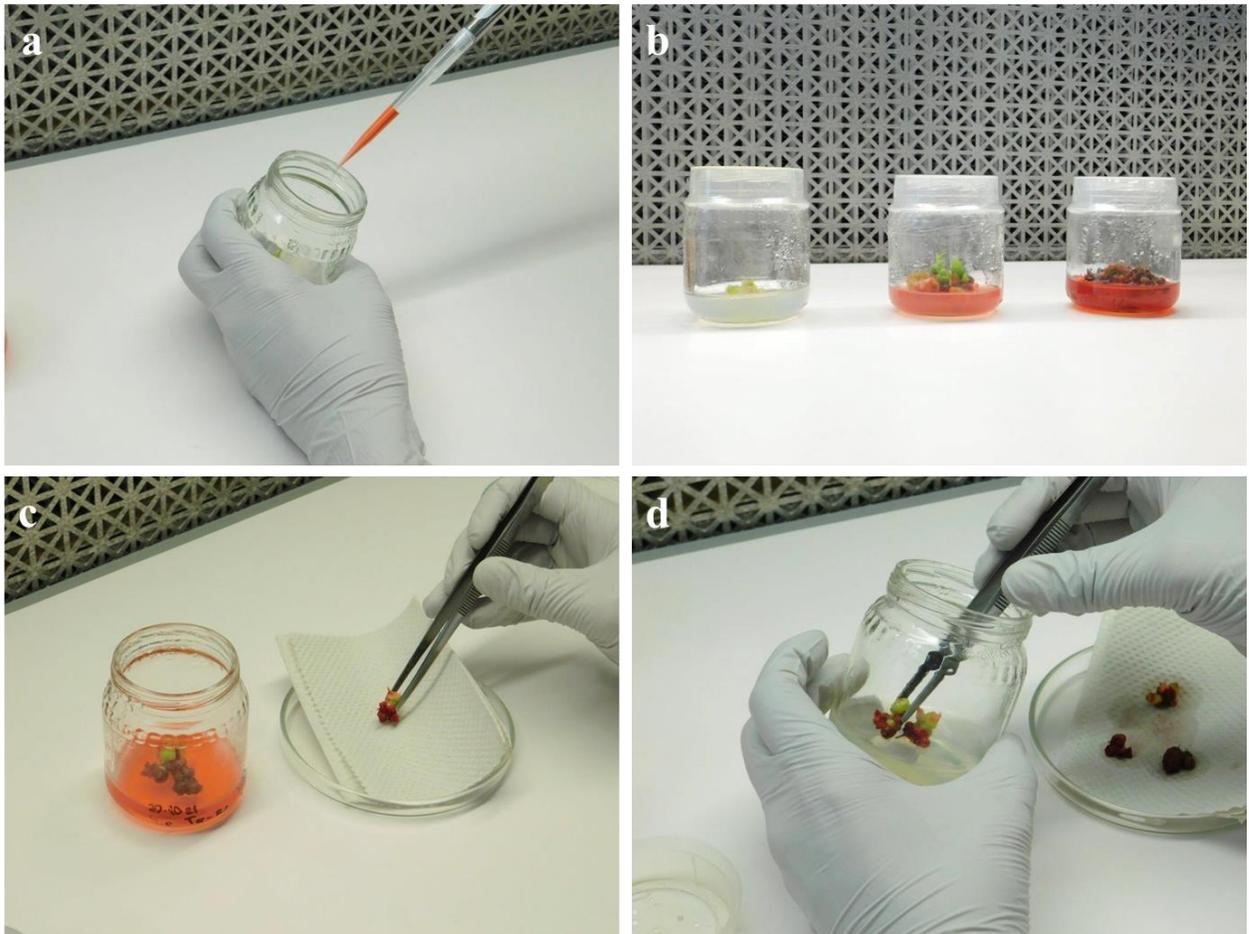


Figura 1. Establecimiento de técnica de poliploidía. a) Aplicación de colchicina con colorante rojo; b) comparación de tinción en protocormos de *Vanilla planifolia*; c) extracción de protocormos expuestos a colchicina y d) subcultivo de protocormos de *Vanilla planifolia*.

VARIABLES A EVALUADAS

A los 180 días después del subcultivo, en campana de flujo laminar, con ayuda de una hoja milimétrica se evaluó el número de brotes, longitud de brotes, número de hojas y número de raíces.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, la unidad experimental consistió en un protocormo. Los datos de las variables se procesaron a través de un análisis de varianza ANDEVA con el procedimiento GLM, se utilizó la separación de medias de Tukey (≤ 0.05) para la comparación de medias entre tratamientos. Los análisis estadísticos de cada etapa de la investigación se efectuaron con el programa SAS[®] OnDemand for Academic.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó el desplazamiento de la colchicina con colorante rojo principalmente en la zona apical del desarrollo de los protocormos, así como el aumento de dimensión del protocormo (Figura 2).

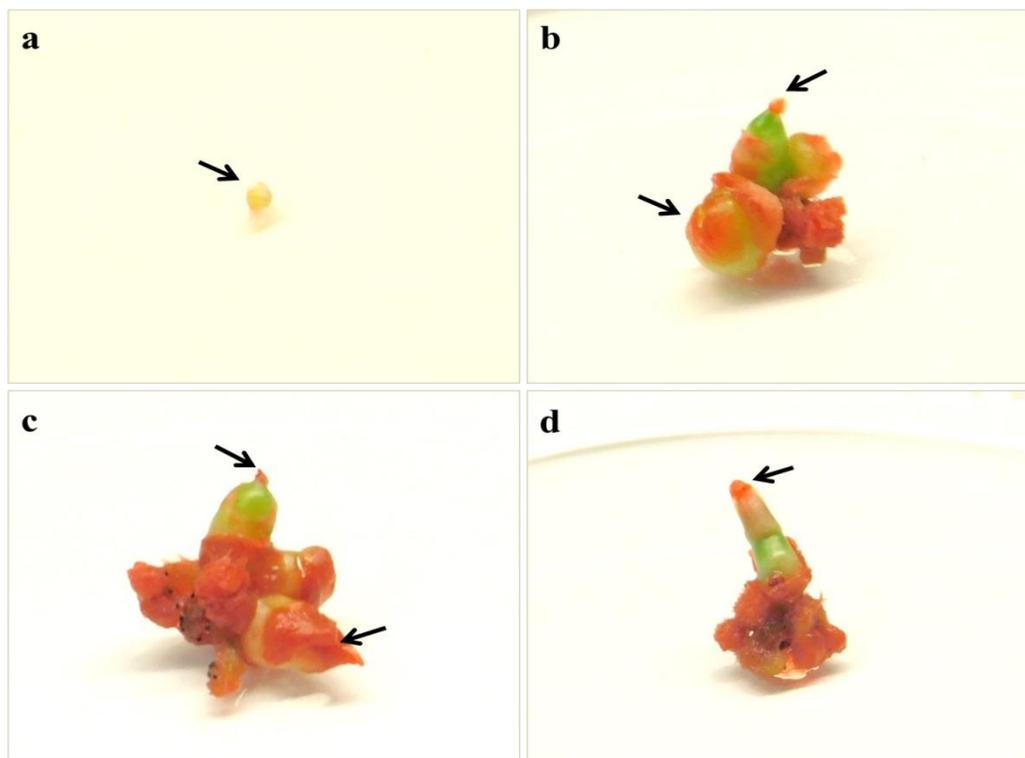


Figura 2. Desplazamiento de la colchicina con colorante en protocormo y plántulas *in vitro* de *Vanilla planifolia*: a) protocormo expuesto a colchicina, b, c y d) zona apical teñida con colorante.

La fuente dosis, aplicación y la interacción de dosis y aplicaciones mostraron respuesta estadística altamente significativa y significativa en todas las variables analizadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de variancia (cuadrados medios y significancia) del efecto de la dosis y número de aplicaciones de colchicina 0.1 % con colorante en el número de brotes, longitud de brote, número de hojas y número de raíces *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Fuente	Número de brotes	Longitud de brote	Número de hojas	Número de raíces
Dosis	13.606**	2.078**	2.939**	7.439**
Aplicación	25.356**	2.013**	1.506**	5.539*
Dosis*aplicación	18.114**	1.201**	0.922*	3.606*

(*): $P \leq 0.05$; (**): $P \leq 0.01$.

En nuestra investigación, se observó un efecto significativo al combinar una dosis en un intervalo de aplicación de colchicina. El cual mostró un efecto positivo al realizar dos aplicaciones de 1 mL de colchicina 0.1% en intervalo de 15 días, ya que aumentó el número y longitud de brotes (Figura 3a y b), así como el número de hojas (Figura 3c). De igual forma, la aplicación de 1 mL de colchicina 0.1 % generó mayor número de raíces (Figura 3d).

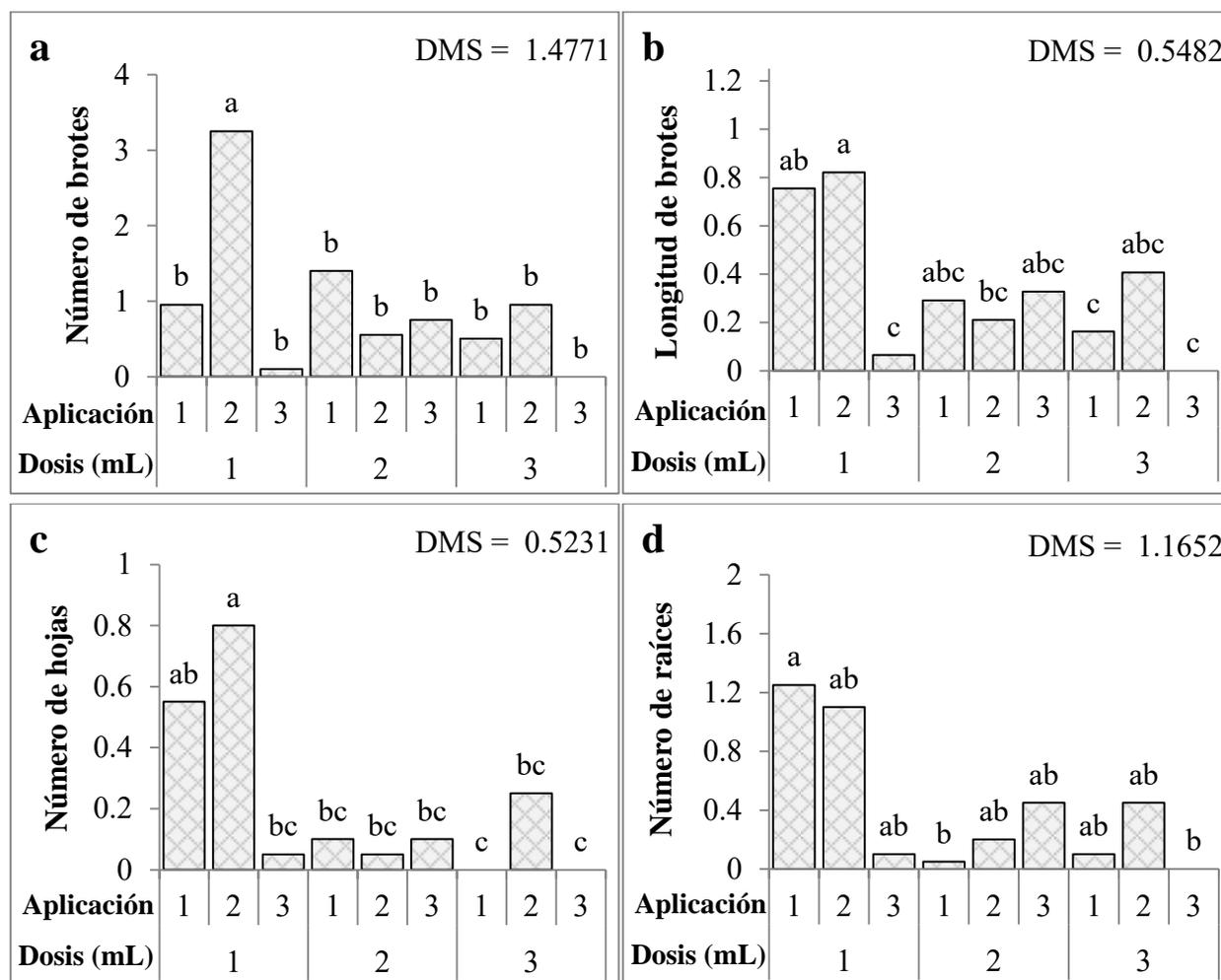


Figura 3. Influencia de la dosis y número de aplicaciones de colchicina con colorante en: a) número de brotes, b) longitud de brotes, c) número de hojas y d) número de raíces de *Vanilla planifolia in vitro*.

Aunque la poliploidización está asociada con un aumento del tamaño celular, cambios morfológicos y anatómicos de la planta, la eficacia de la aplicación de colchicina y la inducción de poliploides depende de factores, como el tipo de explante, especie de planta, concentración de colchicina y la duración del tratamiento (Sattler *et al.*, 2016; Allum *et al.*, 2007; Hannweg *et al.*, 2013).

Se ha determinado que las plántulas tratadas con diferentes concentraciones de colchicina después de un mes, se inhibe el crecimiento al aumentar la concentración (Zakizadeh *et al.*, 2020). Una concentración alta de colchicina es tóxica para las células vegetales, causa un desequilibrio celular y afecta el proceso interno de las células, lo que provoca la muerte de las plantas (Atichart, 2013). Por lo que la mortalidad causada por la colchicina difiere entre las especies (Choopeng *et al.*, 2019; Huy *et al.*, 2019; Vichiato *et al.*, 2014).

A pesar de que los protocormos de *V. planifolia* expuestos en medio MS 20 % con 3 aplicaciones de 3 mL de colchicina 0.1 % cada 15 días tuvo un efecto morfológico perjudicial. Se observaron explantes aún teñidos con colorante (Figura 4a), pequeños brotes (Figura 4b) y se desarrollaron plántulas completas (Figura 4c), así como tejido necrótico escamoso (Figura 4d). Además, de los protocormos aparentemente necróticos se formaron PLB's (Figura 4e).



Figura 4. Respuestas morfológicas de protocormos de *Vanilla planifolia in vitro* expuestos a colchicina 0.1 % con colorante rojo: a) protocormo con tinción roja; b) brotes; c) plántula con raíz; d) tejido vegetal necrótico y e) PLB sobre tejido escamoso.

V. CONCLUSIONES

Se concluye que dos aplicación de 2 mL (cada una) de colchicina 0.1 % en protocormos de *V. planifolia* en un intervalo de 15 días fue óptimo para obtener mayor número de brotes, mayor longitud de brotes y hojas. El uso de una sola aplicación (1 mL) generó más raíces. Y la exposición con 3 mL generó tejido necrótico escamoso y presentó alteraciones morfológicas, sin embargo, algunos de estos tejidos sobreviven y logran generar plántulas completas a partir de PLBs de *V. planifolia*.

Esta investigación contribuye a la estandarización de un protocolo para la inducción de poliploidía en *V. planifolia*, por lo que, se recomienda realizar estudios adicionales para determinar el nivel de ploidía y establecer las concentraciones y frecuencias óptimas de aplicación de colchicina, y con ello obtener plantas con características agronómicas sobresalientes.

VI. LITERATURA CITADA

- Allum, J. F., Bringloe, D. H., & Roberts, A. V. (2007)** Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant cell reports*, 26(11), 1977-1984.
- Atichart, P. (2013)** Polyploid induction by colchicine treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. *Thai Journal of Agricultural Science*, 46(1), 59-63.
- Azmi, T. K. K., Sukma, D., Aziz, S. A., & Syukur, M. (2016)**. Polyploidy induction of moth orchid (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) by colchicine treatment on pollinated flowers. *Journal of Agricultural Sciences (Sri Lanka)*, 11(2), 62-73.
- Chen, W. H., & Tang, C. Y. (2018)** A protocol for the induction of polyploids in *Phalaenopsis* orchids by *in vitro* method without using anti-microtubule agents. In *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols* (pp. 317-330). Humana Press, New York, NY.
- Choopeng, S., Te-Chato, S., & Khawnium, T. (2019)**. Effect of colchicine on survival rate and ploidy level of hybrid between *Dendrobium santana* x *D. friedericksianum* orchid. *International Journal of Agricultural Technology*, 15(2), 249-260.
- Chung, H. H., Shi, S. K., Huang, B., & Chen, J. T. (2017)** Enhanced agronomic traits and medicinal constituents of autotetraploids in *Anoectochilus formosanus* Hayata, a top-grade medicinal orchid. *Molecules*, 22(11), 1907.
- Corneillie, S., De Storme, N., Van Acker, R., Fangel, J. U., De Bruyne, M., De Rycke, R., ... & Boerjan, W. (2019)** Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant Physiology*, 179(1), 74-87.
- Eng, W. H., & Ho, W. S. (2019)** Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Scientia horticultrae*, 246, 604-617.
- Hannweg, K., Sippel, A., & Bertling, I. (2013)** A simple and effective method for the micropropagation and *in vitro* induction of polyploidy and the effect on floral characteristics of the South African iris, *Crocasmia aurea*. *South African Journal of Botany*, 88, 367-372.

- He, Y., Sun, Y., Zheng, R., Ai, Y., Cao, Z., & Bao, M. (2016)** Induction of tetraploid male sterile *Tagetes erecta* by colchicine treatment and its application for interspecific hybridization. *Horticultural Plant Journal*, 2(5), 284-292.
- Huy, N. P., Luan, V. Q., Tung, H. T., Hien, V. T., Ngan, H. T. M., Duy, P. N., & Nhut, D. T. (2019)** *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. *Scientia horticultrae*, 252, 283-290.
- Hwang, S. H., Kim, M. S., & Park, S. Y. (2015)** Improvement of chromosome doubling efficiency in *Cymbidium* hybrids by colchicine and oryzalin treatment. *Horticultural Science & Technology*, 33(6), 900-910.
- Kerdsuwan, N., & Te-chato, S. (2012)** Effects of colchicine on survival rate, morphological, physiological and cytological characters of chang daeng orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) *in vitro*. *Journal of Agricultural Technology*, 8(4), 1451-1460.
- Miguel, T. P., & Leonhardt, K. W. (2011)** *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin. *Scientia horticultrae*, 130(1), 314-319.
- Pham, P. L., Li, Y. X., Guo, H. R., Zeng, R. Z., Xie, L., Zhang, Z. S., ... & Xia, Q. (2019)** Changes in morphological characteristics, regeneration ability, and polysaccharide content in tetraploid *Dendrobium officinale*. *HortScience*, 54(11), 1879-1886.
- Sarathum, S., Hegele, M., Tantivivat, S., & Nanakorn, M. (2010)** Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. *European Journal of Horticultural Science*, 75(3), 123-127.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016)** The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281-296.
- Shi, Q., Liu, P., Liu, M., Wang, J., Zhao, J., Zhao, Z., & Dai, L. (2016)** *In vivo* fast induction of homogeneous autopolyploids via callus in sour jujube (*Ziziphus acidojujuba* Cheng et Liu). *Horticultural Plant Journal*, 2(3), 147-153.
- Vichiato, M. R. D. M., Vichiato, M., Pasqual, M., Rodrigues, F. A., & Castro, D. M. D. (2014)**. Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl.(Orchidaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14, 154-159.

Zakizadeh, S., Kaviani, B., & Hashemabadi, D. (2020) *In vivo*-induced polyploidy in *Dendrobium* 'Sonia' in a bubble bioreactor system using colchicine and oryzalin. *Brazilian Journal of Botany*, 43(4), 921-932.

IV. APÉNDICE

CAPÍTULO I. GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA DE SEMILLAS INMADURAS DE

Vanilla planifolia

Cuadro 1A. Registro de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia* germinadas en medio Murashige y Skoog a distintas concentraciones totales de sales minerales.

Tratamiento	Concentración total de sales minerales Murashige Skoog (%)	Número total de protocormos
1	10	23
2	20	22
3	30	25
4	40	19
5	50	19

n= 3

Cuadro 2A. Análisis de varianza (cuadrados medios y significancia) del efecto de la concentración total de sales minerales Murashige y Skoog en la germinación de semillas inmaduras de *Vanilla planifolia*.

Fuente	GL	Germinación
Concentración de Sales	4	1.360 ^{NS}

NS: No significativo

CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN *in vitro* DE SECCIONES NODALES DE *Vanilla planifolia*

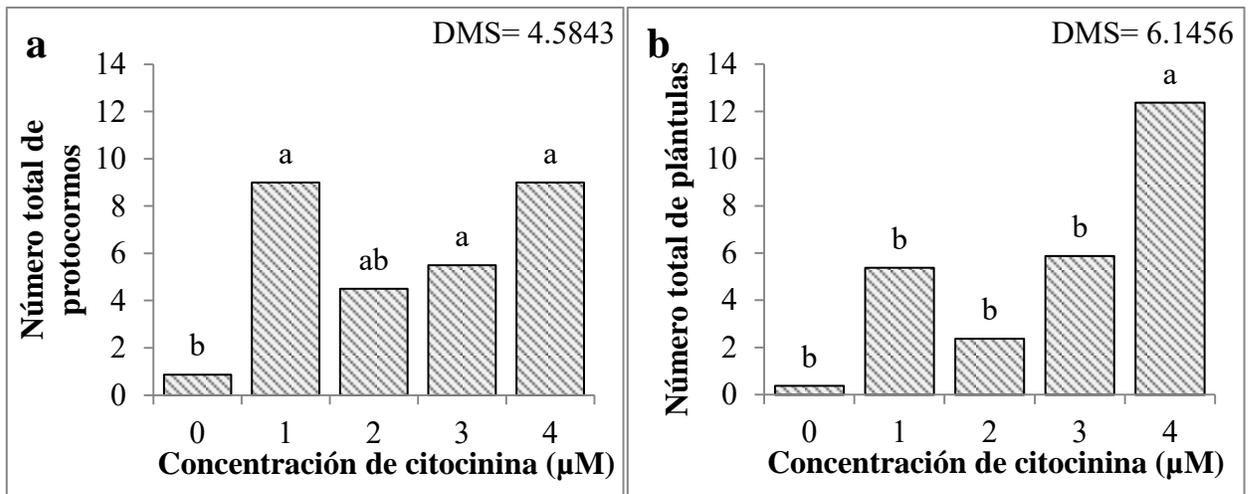


Figura 1A. Influencia de la concentración de citocinina: a) número total de protocormos; b) número total de plántulas de *Vanilla planifolia*.

CAPÍTULO III. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA *in vitro* EN PROTOCORMOS DE *Vanilla planifolia*

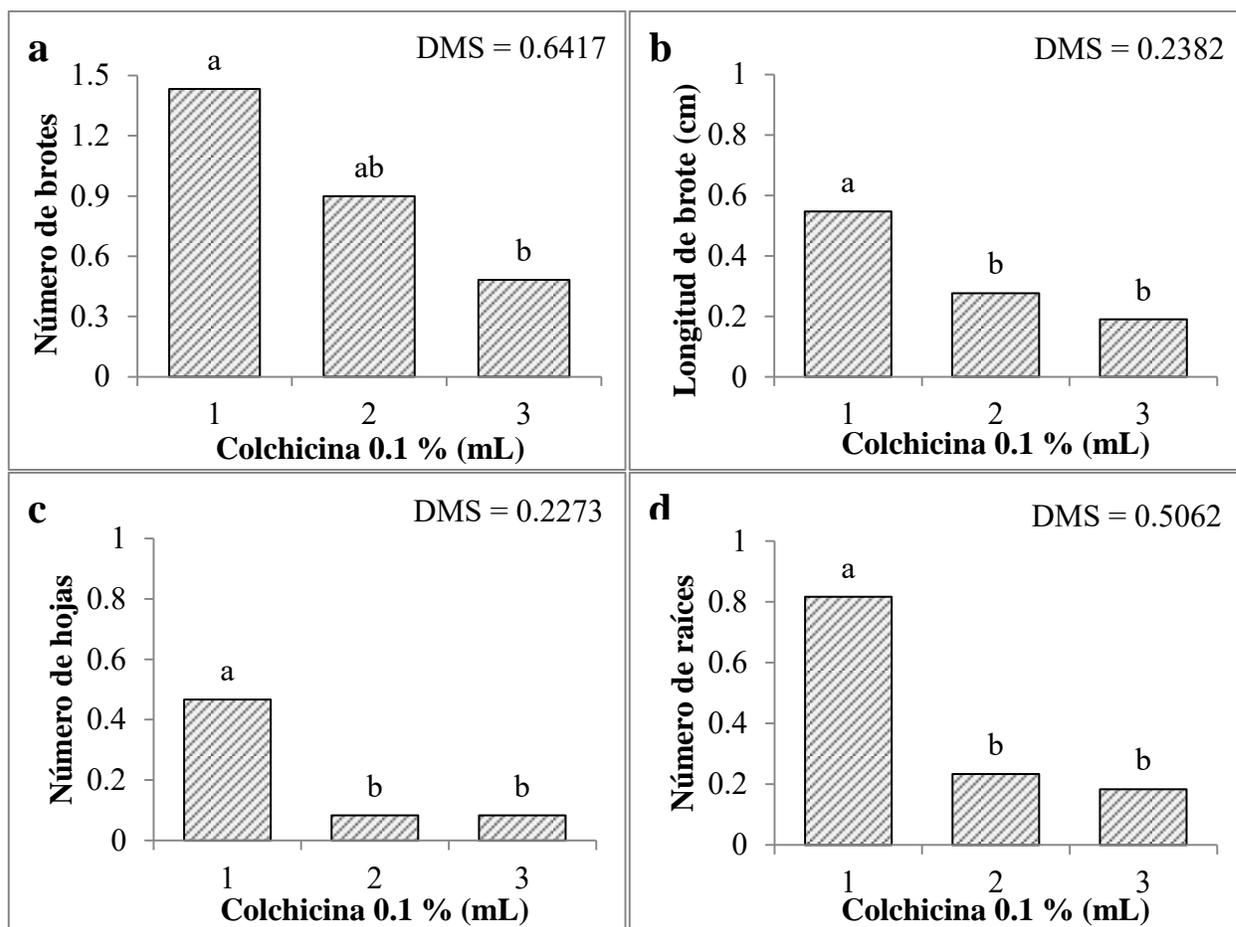


Figura 1A. Influencia de la dosis de colchicina en: a) número de brotes, b) longitud de brote, c) número de hojas y d) número de raíces de *Vanilla planifolia in vitro*.

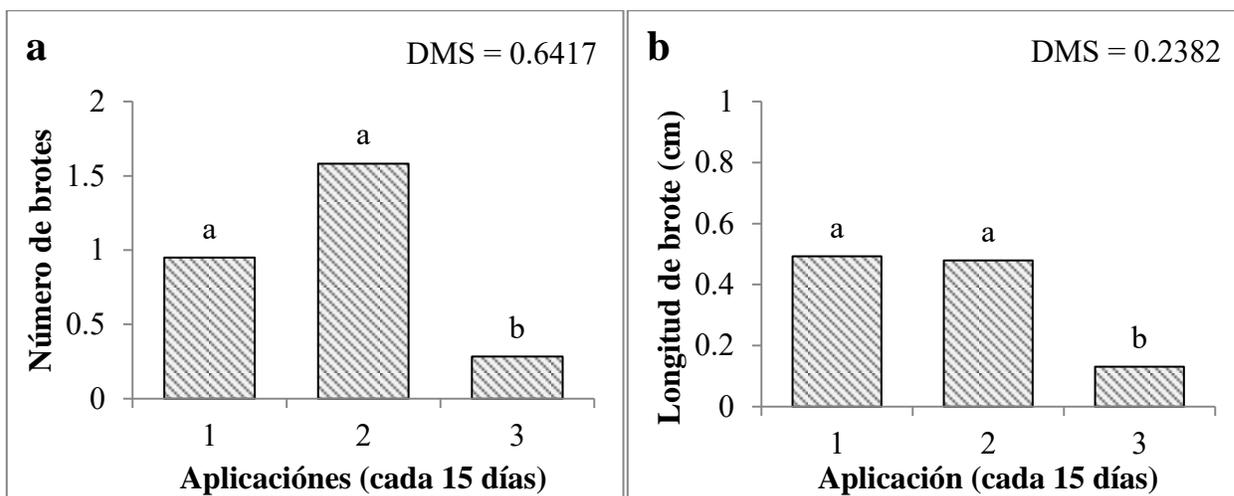


Figura 2A. Influencia del número de aplicaciones de colchicina con colorante en el: a) número de brotes y b) longitud de brote

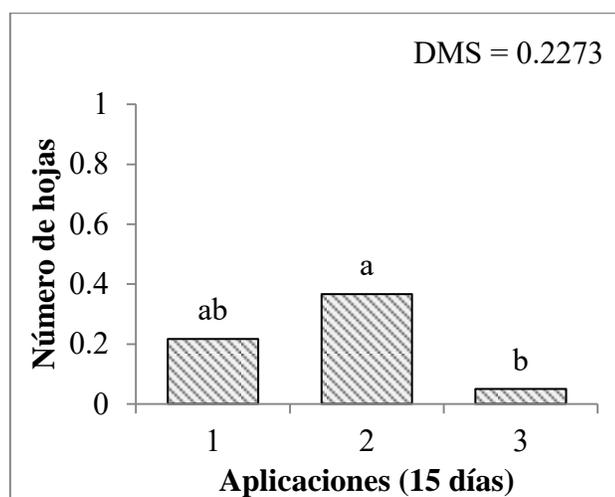


Figura 3A. Influencia del número de aplicaciones de colchicina con colorante en el número de hojas de *Vanilla planifolia in vitro*.

Cuadro 1A. Tasa de supervivencia de protocormos y generación de PLB's *in vitro* de *Vanilla planifolia* expuestos a la colchicina 0.1 %.

Colchicina 0.1 % con colorante rojo (mL)	N° de aplicaciones (cada 15 días)	N° de Protocormos inicial	N° de protocormos vivos a los 240 dde	Supervivencia (%)	N° de PLB's a los 420 dde
0	0	30	11	36.7	17
1	1	30	9	30	13
	2	30	18	60	11
	3	30	5	16.7	10
2	1	30	2	6.7	8
	2	30	6	20	10
	3	30	10	33.3	11
3	1	30	6	20	11
	2	30	12	40	15
	3	30	0	0	0

ACLIMATACIÓN DE *Vanilla planifolia*



Figura 1A. Aclimatación de *Vanilla planifolia*.



Figura 2A. Plantas aclimatadas de *Vanilla planifolia*.