

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y**

**ARTES DE CHIAPAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**T E S I S**

Efectos de retardantes de crecimiento en el cultivo *in vitro* de Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews; Orchidaceae)

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN **CIENCIAS EN  
BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN  
DE ECOSISTEMAS TROPICALES**

PRESENTA

**INGRID VIRIDIANA CISNEROS MARRERO**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Febrero de 2023



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y  
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**T E S I S**

Efectos de retardantes de crecimiento en el cultivo *in vitro* de Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews; Orchidaceae)

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN **CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y  
CONSERVACIÓN DE ECOSISTEMAS  
TROPICALES**

PRESENTA  
**INGRID VIRIDIANA CISNEROS MARRERO**

Directora

Dra. Clara Luz Miceli Méndez

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH**

Asesores

Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro

Mtra. Ana Guadalupe Rocha Loredo

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH**





**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**  
**SECRETARÍA ACADÉMICA**  
**DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 13 de febrero de 2023

Oficio No. SA/DIP/145/2023

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. Ingrid Viridiana Cisneros Marrero  
CVU 1105872  
Candidata al Grado de Maestra en Ciencias en Biodiversidad y  
Conservación de Ecosistemas Tropicales  
Instituto de Ciencias Biológicas  
UNICACH  
Presente

Con fundamento en la opinión favorable emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado Efectos de retardantes de crecimiento en el cultivo *in vitro* de Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews; *Orchidaceae*) cuya Directora de tesis es la Dra. Clara Luz Miceli Méndez (CVU 288394) quien avala el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección a mi cargo autoriza la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección de un ejemplar empastado.

**Atentamente**  
**"Por la Cultura de mi Raza"**

**Dra. Carolina Orantes García**  
**Directora**



**DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN  
Y POSGRADO**

C.c.p. Mtro. Ricardo Hernández Sánchez, Director del Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.  
Dr. José Antonio De Fuentes Vicente, Coordinador del Posgrado, Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH. Para su conocimiento.  
Archivo/minutario.

RJAG/COG/ceofiga/yr

**2023 AÑO DE FRANCISCO VILLA**  
**EL REVOLUCIONARIO DEL PUEBLO**

**Dirección de  
Investigación  
y Posgrado**

**Dirección de Investigación y Posgrado**  
Libramiento Norte Poniente No. 1150  
Colonia Lajas Maciel C.P. 29039  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México  
Tel: (961) 6170440 EXT. 4360  
investigacionyposgrado@unicach.mx

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (*CONACYT*), por la beca otorgada con número de apoyo: 788729, a la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas y al posgrado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales.

A mi directora de tesis, Dra. Clara Luz Miceli Méndez, por su apoyo y enseñanza desde la Licenciatura, por todo el tiempo invertido en la ejecución y revisión de esta tesis, por siempre tener una actitud positiva y sobre todo por brindarme su amistad. A mis asesores, la Mtra. Ana Guadalupe Rocha Loredo y al Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro, por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis y por su amabilidad. Gracias por formar parte de mi Comité Tutorial y ayudarme a seguir formándome como estudiante e investigadora.

A los miembros de la Comisión Revisora y examen de grado.

Al Biólogo Mario Alberto López Miceli.

A todos los doctores que me impartieron clases durante la maestría y cursos, gracias.

A Mis padres por el apoyo moral durante toda mi formación académica, GRACIAS.

## DEDICATORIA

A Dios por escucharme siempre que lo necesito, darme sabiduría y paciencia para concluir la tesis.

**A mis padres:** Lic. Ana Alicia Marrero López y C. P. Juan Antonio Cisneros Balboa.

**A mi hermano** (Médico familiar. Juan Antonio Salvador Cisneros Marrero) por motivarme siempre y ser cómplices, I love you, jaja.

A mi abuelito Dimas Marrero Tapia. Así como a los que no son por consanguinidad, pero si por amor Rosa López Gonzales y José Fernando Sánchez Toledo que en paz descansen.

A Guillermo Pérez Pérez, por siempre apoyarme incondicionalmente.

A mis mejores amigos: CP. Stefanie Castillejos Arreola, Ing. Melissa Escobar Díaz, Lic. Mireya Gómez Hernández e Ing. Francisnet Domínguez Méndez.

Personas especiales: Lic. Leydi Judith López Pérez, Dra. Dolores Vidal López, señora Ana Villatoro Cancino, tía Rocio Guadalupe Sánchez López y María del Carmen Girón Pérez.

A mi comité tutorial: Dra. Clara Luz Miceli Méndez, Mtra. Ana Guadalupe Rocha Loredó y al Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro.

Por último, a la Gorda en paz descansen y Stitch por estar despierto mientras hacía tarea y redactaba la tesis, amarme incondicionalmente y volverse parte de la familia.



# ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. ORIGEN.....	4
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	5
2.3. CARACTERES MORFOLÓGICOS DE <i>Vanilla planifolia</i> Andrews .....	5
2.3.1. Tallo, hojas y raíces .....	5
2.3.2. Flor.....	7
.....	7
2.3.3. Fruto y semilla.....	8
2.4. REQUERIMIENTOS PARA SU CULTIVO .....	9
2.4.1. Clima y temperatura.....	9
2.4.2. Suelo.....	10
2.4.3. Árboles tutores.....	10
2.5. POLINIZACIÓN.....	11
2.6. CONSERVACIÓN .....	12
2.6.1. Conservación <i>in situ</i> .....	13
2.6.2. Conservación <i>ex situ</i> .....	13

2.7. BANCOS DE GERMOPLASMA.....	13
2.8. CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	15
2.9. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	16
2.9.1. Conservación a corto plazo .....	16
2.9.2. Conservación a mediano plazo.....	16
2.9.3. Conservación a largo plazo .....	18
2.10. REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	21
2.10.1. Cloruro de cloromequat (CCC) .....	22
2.10.2. Ácido abscísico (ABA) .....	22
2.11. ORGANOGÉNESIS .....	24
III. ANTECEDENTES .....	26
3.1. SUSTANCIAS EMPLEADAS EN EL CRECIMIENTO VEGETAL <i>IN VITRO</i> ...	26
3.2. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EMPLEADOS EN EL CULTIVO <i>EX VITRO</i> .....	30
IV. HIPÓTESIS.....	32
V. OBJETIVOS.....	33
5.1. GENERAL.....	33
5.2. PARTICULARES.....	33
VI. MÉTODO .....	34
6.1. MATERIAL VEGETAL.....	34
6.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MADRE (MACROELEMENTOS, MICROELEMENTOS Y QUELATOS).....	34
6.3. PREPARACIÓN DE MEDIO MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) AL 75 % ..	36
.....	37
6.4. CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> A MEDIANO PLAZO.....	38
6.5. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES .....	38

6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	39
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
7.1. INTERACCIÓN DE LOS RETARDANTES DE CRECIMIENTO ABA Y CCC EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Vanilla planifolia</i> Andrews .....	40
7.1.1. Efecto de los retardantes de crecimiento en el fenotipo de las plántulas de vainilla.....	40
7.1.2. Efecto de los retardantes de crecimiento en la longitud total de las plántulas de <i>V. planifolia</i> .....	41
7.1.3. Efecto de los retardantes de crecimiento en la longitud de la raíz mayor .	43
7.1.4. Efecto de los retardantes de crecimiento en la longitud de la hoja mayor	44
7.2. EFECTO DEL ABA Y CCC EN LA ORGANOGÉNESIS DE LAS MICROESTACAS DE VAINILLA.....	46
7.2.1. Efecto de los retardantes de crecimiento en el número de brotes .....	46
7.2.2. Efecto de los retardantes de crecimiento en el número de raíces .....	47
7.2.3. Efecto de los retardantes de crecimiento en el número de hojas .....	48
.....	50
7. 3. PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE PLÁNTULAS DE VAINILLA BAJO EFECTOS DE RETARDANTES DE CRECIMIENTO DURANTE 200 DÍAS .....	51
VIII. CONCLUSIONES .....	55
IX. RECOMENDACIONES.....	56
X. REFERENCIAS DOCUMENTALES.....	57
XI. ANEXOS .....	70

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Reactivos para la preparación de soluciones madres.....	35
Cuadro 2. Matriz de combinaciones para retardantes de crecimiento.....	36
Cuadro 3. Efecto de la interacción de diferentes concentraciones de ABA y CCC en la morfogénesis de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tallo trepador de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	6
Figura 2. Hoja de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	6
Figura 3. Estructura floral de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	7
Figura 4. Frutos inmaduros de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	8
Figura 5. A) Semilla, B) Embrión de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	9
Figura 6. Germinación <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	9
Figura 7. Abeja del género <i>Euglossa</i> , posada en un fruto maduro de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	12
Figura 8. <i>Augochloropsis</i> sp., reportada como posible polinizador de orquídeas.....	12
Figura 9. Clasificación de reguladores del crecimiento de acuerdo con su acción en la planta.....	21
Figura 10. Biosíntesis del ácido abscísico (ABA).....	23
Figura 11. Microestacas de <i>Vanilla planifolia</i> .....	34
Figura 12. Plántulas de <i>Vanilla planifolia</i> cultivadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la UNICACH .....	34
Figura 13. Solución de microelementos.....	35
Figura 14. Preparación de medios de cultivo para la siembra de microestacas de <i>Vanilla planifolia</i> .....	37
Figura 15. Frascos con 20 ml de medio MS al 75 %, con retardantes de crecimiento (ABA, CCC y ABA/CCC).....	37
Figura 16. Autoclave para esterilización de medios.....	37
Figura 17. Siembra de una microestaca de <i>Vanilla planifolia</i> por frasco.....	38
Figura 18. Cuarto de crecimiento, bajo condiciones controladas.....	38
Figura 19. Medición de las variables evaluadas, con un vernier digital.....	39
Figura 20. Efecto de concentraciones de dos retardantes de crecimiento, sobre la conservación <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	41

Figura 21. Promedio de la longitud total (cm) de las plántulas con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.....	42
Figura 22. Promedio de la longitud de la raíz mayor (cm), con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.....	43
Figura 23. Promedio de la longitud de la hoja mayor (cm), con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.....	44
Figura 24. Promedio del número de brotes con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.....	47
Figura 25. Promedio del número de raíces con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.....	48
Figura 26. Promedio del número de hojas con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.....	49
Figura 27. Porcentaje de supervivencia y mortalidad de plántulas de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> ) con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.....	53
Figura 28. Plántulas de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> ) muertas por la contaminación de hongos en el medio de cultivo.....	54
Figura 29. Plántulas de <i>Vanilla planifolia</i> , cultivadas <i>in vitro</i> , muertas por fenolización.....	54

## RESUMEN

La especie *Vanilla planifolia* Andrews, es originaria de las selvas tropicales del sureste de México y América Central; siendo de importancia económica a nivel mundial. Sin embargo, su polinización y germinación es baja, sumado a que las poblaciones naturales han sido afectadas por la recolecta excesiva e ilegal, han provocado que se encuentre en vía de extinción en su hábitat natural, razón por la que es considerada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 “Sujeta a Protección Especial”, además, está incluida en el apéndice II de la CITES y en la Lista Roja de Especies Amenazadas de UICN como “En Peligro”.

El empleo de retardantes de crecimiento en cultivos, es considerada una estrategia de conservación *in vitro* a mediano plazo, para aumentar los intervalos entre subcultivos, suministro constante de plantas libre de patógenos y disminución de costo. En México son escasos los trabajos dedicados al cultivo y conservación *in vitro* a mediano plazo de la vainilla, mediante retardantes de crecimiento, como ácido abscísico (ABA) y, en particular el uso de cloruro de cloromequat (CCC) no ha sido reportado para estos fines.

En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la interacción de diferentes concentraciones de los retardantes de crecimiento ácido abscísico (ABA) y cloruro de cloromequat (CCC) en el cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia* Andrews sobre la organogénesis y porcentaje de supervivencia de microestacas. Se empleó medio de cultivo Murashige & Skoog al 75 % con diferentes concentraciones de ABA y CCC, con un total de 14 tratamientos, cada uno con 25 microestacas de 1.5 cm. Después de 200 días de incubación, se evaluó la longitud total de las plántulas, longitud de la raíz mayor, longitud de la hoja mayor, número de brotes, número de raíces, número de hojas y porcentaje de supervivencia, se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn.

Los tratamientos aplicados y evaluados no tuvieron efecto negativo en el fenotipo de las plántulas. Además, las plántulas del tratamiento con 3.0:6.0 mg/l de ABA/CCC, presentaron una reducción significativa en su crecimiento, obteniendo los promedios más bajos en las variables longitud total de las plántulas ( $0.30 \pm 0.34$  cm), longitud de

la raíz mayor ( $1.51 \pm 0.84$ ), longitud de la hoja mayor ( $0.48 \pm 0.37$ ), número de brotes ( $0.27 \pm 0.46$ ), número de raíces ( $1.50 \pm 0.78$ ) y número de hojas ( $1.83 \pm 0.61$ ); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con 3.0: 2.0 y 3.0: 4.0 mg/l ( $p=1.0$ , prueba de Dunn) en las variables evaluadas. Los tratamientos con 3.0: 2.0, 3.0: 4.0 y 3.0: 6.0 de ABA/CCC mg/l, reflejaron porcentajes de supervivencia de 100, 84 y 72 % respectivamente. Por lo que, el tratamiento con 3.0: 2.0 ABA/CCC mg/l, tuvo un efecto sinérgico que permitió la conservación *in vitro* a mediano plazo de *Vanilla planifolia* Andrews, con subcultivos cada 200 días, por lo tanto, puede considerarse como una estrategia para el establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro*.

Palabras claves: ácido abscísico, cloruro de cloromequat, conservación *in vitro*, crecimiento reducido.

## ABSTRACT

The species *Vanilla planifolia* Andrews, is native to the rainforests of southeastern Mexico and Central America; being of global economic importance. However, its pollination and germination is low, in addition to the natural populations have been affected by the excessive and illegal collects, have caused that is in danger of extinct in its natural habitat, for this reason, it is considered "Subject to Special Protection" in NOM-059-SEMARNAT-2010, and is also included in Appendice II of the CITES and in the IUCN Red List of Threatened Species as "Endangered".

The use of growth retardants in cultives, is considered a medium-term *in vitro* conservation strategy to increase intervals between subcultures, increase the steady supply of pathogen-free plants and reduce costs. In Mexico there are few studies on the cultivation and medium-term *in vitro* conservation of vanilla using growth retardants such as abscisic acid (ABA), and in particular the use of chlormequat chloride (CCC) has not been reported for these purposes.

In this sense, the present study has as objective evaluate the effect of the interaction of different concentrations of the growth retardants abscisic acid (ABA) and chlormequat chloride (CCC) in the *in vitro* culture of *Vanilla planifolia* Andrews on organogenesis and percentage survival of microstakes. Culture medium Murashige & Skoog 75 % was used with different concentrations of ABA and CCC, with a total of 14 treatments, each with 25 microstakes of 1.5 cm. After 200 days of incubation, the total length of the seedlings was evaluated, length of the major root, length of the major leave, shoot numbers, root numbers, leaves numbers and survival percentage, besides, the Kruskal Wallis test and the Dunn test were used.

The treatments applied and evaluated had no negative effect on the phenotype of the seedlings. In addition, the seedlings of the treatment with 3.0:6.0 mg/l of ABA/CCC, presented a significant reduction in their growth, obtaining the lowest averages in the variables total length of the seedlings ( $0.30 \pm 0.34$  cm), length of the major root ( $1.51 \pm 0.84$ ), length of the major leave ( $0.48 \pm 0.37$ ), shoot numbers ( $0.27 \pm 0.46$ ), root numbers ( $1.50 \pm 0.78$ ) and leaves numbers ( $1.83 \pm 0.61$ ), however, no significant

differences were found with 3.0: 2.0 and 3.0: 4.0 mg/l ( $p=1.0$ , Dunn test) in the variables evaluated. The treatments with 3.0: 2.0, 3.0: 4.0 and 3.0: 6.0 of ABA/CCC mg/l, reflected survival percentage of 100, 84 and 72 %, respectively. Therefore, the treatment with 3.0: 2.0 ABA/CCC mg/l, had a synergistic effect that allowed medium-term *in vitro* conservation of *Vanilla planifolia* Andrews, with subcultures every 200 days, without negative effects on the phenotype, therefore, it can be considered as a strategy for the establishment of *in vitro* germplasm banks.

Keys words: abscisic acid, chlormequat chloride, conservation *in vitro*, reduced growth.

# I. INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) es una especie originaria de las selvas tropicales del sureste de México y América Central, donde se ha cultivado desde tiempos prehispánicos en la región Totonaca del norte de Veracruz y Puebla (Soto-Arenas, 2003 y Bello-Bello *et al.*, 2015), perteneciente a la familia Orchidaceae, grupo botánico con aproximadamente 800 géneros y 25,000 especies (Bory *et al.*, 2008). Siendo de importancia económica a nivel mundial, debido a que cerca del 95 % de los frutos comercializados proceden de dicha especie, empleándose como saborizante y aromatizante en el mercado internacional y, considerándose como la segunda especia más cara (Bory *et al.*, 2008; Soto-Arenas y Dressler, 2010; Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014; Lozano-Rodríguez *et al.*, 2015).

Sin embargo, su polinización y germinación es baja, sumado a que las poblaciones naturales han sido afectadas por la recolecta excesiva e ilegal para el establecimiento de plantaciones con fines económicos, han provocado que se encuentre en vía de extinción en su hábitat natural, razón por la que es considerada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 como una especie “Sujeta a Protección Especial (Pr)”, además, está incluida en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES; Bello-Bello *et al.*, 2015; Bonilla *et al.*, 2015; Lozano-Rodríguez *et al.*, 2015) y actualmente categorizada en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como “En Peligro (EN)” (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, 2021).

Además, en México son escasos los trabajos dedicados al cultivo y conservación *in vitro* a mediano plazo de la vainilla, mediante retardantes de crecimiento, como ácido abscísico (ABA), y en particular el uso de cloruro de cloromequat (CCC), no ha sido reportado para estos fines. Con base a lo anterior, es necesario realizar nuevos estudios de conservación *in situ* y *ex situ* de la vainilla.

Actualmente, la conservación *ex situ* es considerada como la mejor estrategia, dado el deterioro del hábitat por la tala inmoderada y el cambio de uso de suelo (Menchaca y Lozano, 2018). Por ello, la conservación *in vitro* debe considerarse como parte de una estrategia general de conservación y recuperación de esta especie y de los recursos genéticos, con un enfoque biotecnológico (Reed *et al.*, 2011).

Algunas de las técnicas de conservación *in vitro* más empleadas, son las técnicas de crecimiento reducido, este conjunto de técnicas emplea mecanismos que reducen la velocidad de crecimiento mediante la manipulación de factores ambientales, hormonales y nutricionales, generando así condiciones que permitan retardar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ejemplo: la reducción en la temperatura en los cuartos de crecimiento y las modificaciones en el medio de cultivo, tal como la disminución de la concentración del contenido mineral, aumento en la concentración de sacarosa, mayor concentración de gelificante y la adición de agentes osmóticos como el manitol o sorbitol y recientemente el uso de retardantes de crecimiento como el ácido abscísico (ABA) y cloruro de cloromequat (CCC) (García-Águila *et al.*, 2007; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010; Bello-Bello *et al.*, 2015; Bonilla *et al.*, 2015).

El ácido abscísico o ABA ( $C_{15}H_{20}O_4$ ), es un sesquiterpenoide, sintetizado desde un precursor carotenoide C<sub>40</sub>, el cual es escindido por una enzima localizada en plastidios. Este regulador de crecimiento inhibe varios procesos y actúa como un antagonista de las hormonas del crecimiento, bloqueando la acción de la auxina. Influye en aspectos importantes del desarrollo de la planta, incluyendo la síntesis de proteínas y lípidos de almacén en semillas, la adquisición de la tolerancia de semillas a la desecación y la inhibición de la transición a germinación y crecimiento reproductivo. También estimula respuestas a estrés ambiental regulando el balance de agua en plantas en condiciones de estrés (sequía, frío, salinidad u osmótico) activando el cierre estomático y con la manutención de absorción de agua por la raíz; induciendo tolerancia a sequía, salinidad, hipoxia, bajas temperaturas y patógenos (Flórez y Pereira, 2009 y Jordán y Casaretto, 2016).

Por otra parte, el cloruro de cloromequat o cloruro de clorocolina (cloruro de 2-cloroetiltrimetilamonio) es un compuesto orgánico empleado como regulador del crecimiento de las plantas, presenta cargas positivas del tipo sulfonio, amonio o fosfonio, que bloquean directamente la síntesis del ent-kaureno, por lo que interfieren en una etapa temprana en la ruta de biosíntesis de giberelinas, con lo que se produce la detención de la elongación celular de los órganos vegetativos y una más precisa utilización de las sustancias nutritivas por parte de los órganos productivos. Reduciendo la altura de la planta, acortando los tallos, y produciendo plantas más compactas: fortaleciendo los tallos, el desarrollo de las raíces además de mejorar las capacidades en resistencia a la sequía, a enfermedades, plagas y salinización (Rademacher, 2000; Lázaro *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2017).

En particular, los retardantes de crecimiento, brindan diversas ventajas: no hay una detención total de los procesos celulares, pero sí una disminución en la velocidad en que ocurren, aumenta los intervalos entre subcultivos disminuyendo el tiempo invertido para el personal técnico en este proceso, la cantidad de reactivos empleados y el costo, además de la obtención de material vegetal libre de patógenos y suministro constante de plantas sin cambios genéticos, epigenéticos o enfermedades carenciales (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010; Iriondo, 2011; Masuelli y Marfil, 2011; Pérez *et al.*, 2012; Andrade-Díaz *et al.*, 2013; Bello-Bello *et al.*, 2015; Bonilla *et al.*, 2015; Alcántara *et al.*, 2017).

Por lo tanto, el presente estudio fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto de la interacción de diferentes concentraciones de los retardantes de crecimiento ácido abscísico (ABA) y cloruro de cloromequat (CCC) en el cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia* Andrews sobre la organogénesis y porcentaje de supervivencia de microestacas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ORIGEN

El género *Vanilla* se deriva del español vainilla, que significa "pequeña vaina" y se refiere al largo y grosor del fruto de esta especie. El epíteto específico *planifolia*, hace referencia a la forma plana de las hojas. El nombre actual de esta especie fue establecido en 1808 por Andrews (Pastelín, 2018).

El origen de la vainilla se localiza en las selvas tropicales del sureste de América Central y México, país donde fue descubierta por el pueblo totonaca, quienes la utilizaban antes de la llegada de los españoles, sin poder precisar en qué momento el pueblo totonaco incorpora la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) a la preparación de algunos alimentos, convirtiéndose en una de las plantas más importantes y extendiéndose a otros lugares del país. La llamaban Xhanat, mientras que los aztecas la nombraron Tlilxochitl. Antes de la conquista, la bebida conocida como Xocoalt (chocolate) entre los Mexicas, era condimentada con vainilla, apreciada no solo por su sabor sino por su valor estimulante. Los nobles mexicanos en los tiempos de Moctezuma Xocoyotzin (1466-1520) cocían el cacao en agua, miel de abeja silvestre y un poco de vainilla, bebida a la que consideraban estimulante y afrodisíaca. Hernán Cortés, en una de sus cartas a Carlos V, describe los efectos, asegurando que bastaba una taza de esa bebida para que un hombre tuviese energía durante todo el día (Félix, 2007 y Universidad Autónoma del Estado de México, 2015).

Por otra parte, el auge vainillero se establece de 1840 a 1950, dada su calidad y cantidad, siendo el principal mercado de la vainilla la ciudad de Papantla, donde existían las grandes casas beneficiadoras exportadoras y el conocimiento más avanzado de la época en todas las fases productivas de cultivo; teniendo declive en 1962 por diversos factores. Fue en Kachikin (Papantla, Veracruz), que la vainilla fue por primera vez cultivada y beneficiada, nombrándola como "La Ciudad que perfuma al mundo", por la fragancia de la vainilla tan exquisita (Félix, 2007).

## 2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Vegetal

Subreino: Tracheobionta

Division: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Vanilloidea

Tribu: Vanilleae

Subtribu: Vanillinae

Género: *Vanilla*

Especie: *Vanilla planifolia* Andrews

(Hernández-Hernández *et al.*, 2010)

## 2.3. CARACTERES MORFOLÓGICOS DE *Vanilla planifolia* Andrews

### 2.3.1. Tallo, hojas y raíces

Esta orquídea hemiepífita de hasta 12 m de alto, posee tallos trepadores cilíndricos con un grosor de entre 6.5 a 13 mm y 12 m de largo, carnosos, flexibles, de color verde oscuro y lisos, los cuales tienen entrenudos de 10 hasta 15 centímetros de largo (Figura 1), con hojas alternas a cada lado del tallo, elípticas-oblongas, paralelinervas, gruesas y carnosas, peciolo corto acanalado, con haz color verde intenso a pálido, lustroso, mientras que en el envés es de color más pálido, miden desde 15 hasta 18

cm de largo y desde 5 hasta 7 cm de ancho (Figura 2; Miceli *et al.*, 2015; Villanueva-Viramontes, 2017). Tiene dos tipos de raíces: las primeras son terrestres pubescentes, que miden desde 1.4 hasta 1.6 mm de grosor; mientras que las segundas son raíces aéreas libres terrestres, glabras, café verdosas, desde 2.5 hasta 3 mm de grosor; raíces aéreas fijadoras semiterrestres, planas en la superficie en contacto con el substrato, café-verdosas, de 3 mm de ancho (Miceli *et al.*, 2015 y Soto y Solano, 2007).



Figura 1. Tallo trepador de *Vanilla planifolia* Andrews (Miceli *et al.*, 2015).



Figura 2. Hoja de *Vanilla planifolia* Andrews (Villanueva- Viramontes, 2017).

### 2.3.2. Flor

Presenta flores hermafroditas que miden aproximadamente 5 centímetros, compuesta por tres sépalos y tres pétalos de color verde pálido, blanco amarillento, amarillo hasta crema (Figura 3), posee una columna en la sección transversal, de 15 a 25 centímetros de longitud, formada por el estambre y el pistilo soldados, envueltos por un pétalo modificado y alargado al que se le da el nombre de “labelo”. Existe una pieza floral denominada “Rostelo” que se interpone entre los sacos de polen y el estigma limitando la polinización. Además, forman entre 10 y 20 racimos, que brotan de las axilas de las hojas, con 10 o hasta 20 flores. Su floración es gregaria, regularmente en los meses de marzo-abril y cada flor permanece abierta aproximadamente desde las 7:00 hasta las 15:00, tiempo en el que podrían ser polinizadas de forma natural o manual (Miceli *et al.*, 2015 y Soto-Arenas *et al.*, 2009).



Figura 3. Estructura floral de *Vanilla planifolia* Andrews (Miceli *et al.*, 2015).

### 2.3.3. Fruto y semilla

El fruto es una cápsula alargada, dehiscente y carnosa. Tiene un tamaño de 15 a 25 centímetros de largo, de color verde oscuro brillante (Figura 4), el cual madura gradualmente (desde 10 hasta 12 meses), cambiando su color a verde amarillento opaco, despidiendo un fuerte aroma y conteniendo miles de semillas de tamaño microscópico, de color café oscuro o negro, de forma globosa (Figura 5); además, presentan un embrión indiferenciado (Figura 5) (Soto-Arenas, 2006; Soto y Solano, 2007; Miceli *et al.*, 2015), tegumentos muy duros y cerosos que contienen inhibidores de germinación (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014), por lo que requieren asociarse con un hongo del género *Rhizoctonia*, que les proporcione los nutrientes necesarios para su germinación y desarrollo. Además, Miceli *et al.* (2015), reporta que mediante técnicas de cultivo *in vitro* puede inducirse la germinación (Figura 6).



Figura 4. Frutos inmaduros de *Vanilla planifolia* Andrews (Miceli *et al.*, 2015).

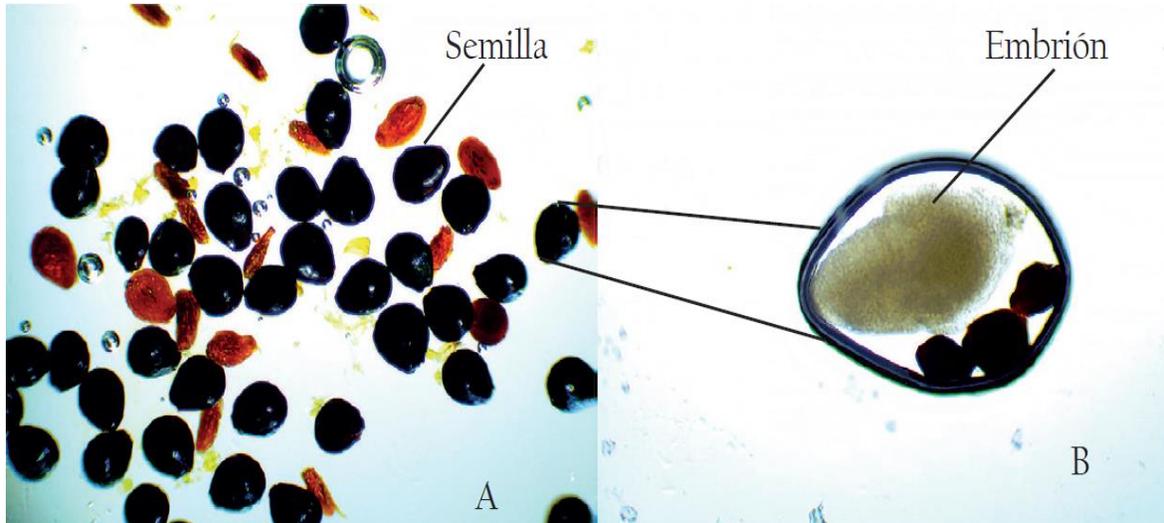


Figura 5. A) Semilla, B) Embrión de *Vanilla planifolia* Andrews (Miceli et al., 2015).



Figura 6. Germinación *in vitro* de *Vanilla planifolia* Andrews (Miceli et al., 2015).

## 2.4. REQUERIMIENTOS PARA SU CULTIVO

### 2.4.1. Clima y temperatura

La especie *Vanilla planifolia*, para su adecuado desarrollo y cultivo requiere clima cálido y húmedo, una altitud de 600 m.s.n.m., con temperaturas medias de 25°C, con mínimas de 5 a 7 °C condición que favorece la floración, precipitaciones de 1500 a 2500 mm anuales y humedad relativa cercana al 80 % (Elorza et al., 2007 y Miceli et al., 2015).

### 2.4.2. Suelo

La selección de un buen sitio de plantación constituye el primer paso para tener éxito en la producción de vainilla (Hernández, 2011). En este sentido, el suelo propicio para su crecimiento debe ser rico en materia orgánica (humus), fértil, libres de encharcamientos, con un excelente drenaje (Elorza *et al.*, 2007) y un pH de 6 a 7 (Augstburger *et al.*, 2000). Lo ideal es que el área de cultivo reciba la luz del sol en la mañana, porque el exceso de sol puede llegar a quemar la planta (Soto, 2003). Además de estar libres de plagas como la chinche roja (*Tenthecoris confusus*), el gusano peludo (*Plusia aurífera*) y hongos como *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora* sp. (Miceli *et al.*, 2015). Desde la plantación de los esquejes hasta la floración, transcurren de dos a tres años y a partir de entonces, la floración se presenta cada año regularmente en función del tipo de manejo y de las condiciones ambientales (Uchida, 2011).

### 2.4.3. Árboles tutores

Uno de los requerimientos más importantes para el cultivo de vainilla, son árboles llamados tutores, porque le brinda sostén y sombra. Para que un árbol sea considerado un buen tutor necesita tener las siguientes características: estar adaptados a la región, que no tenga dificultades para propagarse, crecimiento rápido, de preferencia que su follaje dure todo el año, ser resistente a plagas y enfermedades, corteza resistente, rectos sin espinas y con una altura aproximadamente de 1.8 a 2 metros. Por consiguiente, las especies empleadas son: *Gliricidia sepium*, *Erythrina* sp.e *Inga* sp, especies de cítricos, por ejemplo: *Citrus sinensis* (naranja), palmas nativas o especies maderables entre otras. Además, la especie elegida como tutor suele variar en los diversos países que cultivan vainilla por el medio ambiente de cada región y el interés del productor (Augstburger *et al.*, 2000; Barrera-Rodríguez *et al.*, 2009; Miceli *et al.*, 2015).

## 2.5. POLINIZACIÓN

La especie presenta problemas de polinización natural debido a que posee una membrana llamada rostelo que separa los órganos masculinos y femeninos de la flor, lo que impide o dificulta el paso del polen y al escaso número de insectos polinizadores, los cuales han disminuido por el excesivo uso de plaguicidas (Coro-Arizmendi, 2009 y Miceli *et al.*, 2015), aunque rara vez es visitada por insectos, su polinización es llevada a cabo por abejas del género *Euglossa* (Figura 7) y *Eulaema* (Hernández-Apolinar *et al.*, 2016), así también Rivera *et al.* (2015), han reportado como posible polinizador a la especie *Augochloropsis* sp. (Figura 8), por lo que su baja visitación y la escasa producción de frutos y flores, sugieren la existencia de un mecanismo de polinización por engaño lo cual ha sido planteado como característico de poblaciones con muy bajas densidades (Cozzolino y Widmer, 2005), mientras que, Soto-Arenas *et al.* (2009), sugieren que las semillas de las diversas especies de vainillas son probablemente dispersadas por murciélagos.

Por lo tanto, el ser humano ha reemplazando a los agentes polinizadores, para realizar plantaciones de vainilla, mediante polinización artificial (Miceli *et al.*, 2015), en la que cada flor tiene que ser polinizada manualmente, para esto es necesario mover la membrana del rostelo para que la antera tenga contacto con el estigma, posteriormente, utilizando el dedo pulgar e índice, se presiona suavemente la antera para que la masa de polen se adhiera al estigma de la flor, con el objetivo de formar frutos, sin embargo, el período para llevar a cabo la fecundación artificial es relativamente corto debido a que la vida de la flor es de 24 horas (Soto-Arenas *et al.*, 2009), además su floración abarca solo los meses de marzo a mayo requiere de una mayor inversión en mano de obra para efectuarla (Soto-Arenas, 1999; Lugo- Castillo, 2012; Moreno, 2019).



Figura 7. Abeja del género *Euglossa*, posada en un fruto maduro de *Vanilla planifolia* Andrews (Lozano-Rodríguez *et al.*, 2022).



Figura 8. *Augochloropsis* sp., reportada como posible polinizador de orquídeas (Rivera *et al.*, 2015).

## 2.6. CONSERVACIÓN

La riqueza biológica de México es reconocida a nivel mundial por sus recursos fitogenéticos, como el maíz, el frijol, la calabaza, el chile, la papaya, el algodón, la vainilla, entre otros, que han servido como alimento y aportado en el desarrollo de la humanidad. Por lo que, es importante conservarla y utilizar de forma sostenible, debido a que el mundo se enfrenta a numerosos desafíos y esa diversidad es la base de la seguridad alimentaria (Reyes-López *et al.*, 2014).

En este sentido, Reyes-López *et al.* (2014), mencionan que la estrategia que el gobierno mexicano está realizando para la conservación de sus recursos fitogenéticos nativos, responde a las acciones del primero y segundo plan de acción mundial, para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, de acuerdo con FAO (2011).

En el caso particular de la vainilla crearon en el 2008 la Red Vainilla, con el objetivo de rescatar, conservar, investigar y utilizar la biodiversidad de *Vanilla* spp., en

México. Considerando las siguientes estrategias: conservación *in situ*, conservación *ex situ*, uso sostenible y potenciación (*idem*).

### **2.6.1. Conservación *in situ***

La conservación *in situ* (en el sitio) se basa en mantener un reservorio de germoplasma dentro del hábitat natural o domesticado de la especie e incluye la conservación en parques nacionales, sitios patrimonio de la humanidad, áreas silvestres protegidas, refugios de vida silvestre, reservas forestales y biológicas (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014 y Bello-Bello *et al.*, 2014), este tipo de conservación tiene como limitante que requiere de un considerable espacio físico y una cuantiosa cantidad de dinero para el mantenimiento basado en agrotécnicas, control de plagas y enfermedades (Ortiz, 2000). Además, las plantas se encuentran expuestas a las severidades del cambio climático, desastres naturales como inundaciones, sequías, huracanes e incendios (Bello-Bello *et al.*, 2014). Es por ello, que el desarrollo de nuevas técnicas de conservación, han permitido preservar mejor los recursos genéticos importantes para muchos países (Ortiz, 2000).

### **2.6.2. Conservación *ex situ***

La conservación *ex situ*, se realiza en sitios especiales fuera del centro de origen de la especie, estos sitios deben proveer las condiciones adecuadas para la conservación del material propagativo (Engelmann, 2012). Tiene como objetivo el mantenimiento de poblaciones viables de especies amenazadas, a fin de apoyar a los programas de conservación *in situ*, asegurando a largo plazo la propagación de especies raras y en peligro de extinción. Existen diversas estrategias de conservación *ex situ*, tal es el caso de los bancos de germoplasma, conservación *in vitro*, crioconservación y centros de flora (jardines botánicos, viveros y herbarios) (Rao, 2004; Quirós *et al.*, 2008; Soengas *et al.*, 2009; Reyes-López *et al.*, 2014).

## **2.7. BANCOS DE GERMOPLASMA**

De acuerdo con Soto-Arenas (2006) y Cerna *et al.* (2014) la familia Orchidaceae, es una de las más grandes y diversas del planeta, pero también tiene un número

significativo de especies en peligro de extinción, en particular las probabilidades de conservación *in situ* de la especie *Vanilla planifolia* son bajas, porque ningún área protegida tiene, más de cinco clones, por lo tanto, se necesita una estrategia de conservación *ex situ*, como es el caso de los bancos de germoplasma.

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la seguridad alimentaria es un derecho humano universal; sin embargo, el incremento de la población mundial, los efectos del cambio climático y sistemas de producción deficientes han provocado el aumento de la inseguridad alimentaria (Delgadillo, 2022).

Como estrategia para afrontar el futuro cada vez más cercano donde la escasez de alimento es recurrente, así como el desarrollo de sistemas de producción sostenibles, eficientes y competitivos se crearon los bancos de germoplasma, los cuales son lugares en donde las plantas (en forma de semillas bulbos, polen, esporas o plántulas en tubos de ensayo) son catalogadas, conservadas a largo plazo fuera de su ambiente natural y puestas a disposición para su futura producción, para evitar que se pierda para siempre la diversidad genética de plantas cultivadas y silvestres a causa de factores ambientales, físicos, biológicos, o como consecuencia de las actividades humanas (Iriondo, 2011). Sin embargo, el establecimiento de bancos de germoplasma a partir de semillas no se recomienda para la vainilla, debido a su germinación errática (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014).

Por lo tanto, los bancos de germoplasma no son simplemente repositorios de la biodiversidad; desempeñan un papel fundamental para la conservación porque, en poco espacio físico, se alberga una considerable cantidad de variabilidad genética, enfocando sus esfuerzos a especies consideradas de interés prioritario para nuestra sociedad, o que se ha observado que su población está en proceso de disminución, asegurando la disponibilidad continua de los recursos fitogenéticos para la investigación, la reproducción y la mejora del suministro para un sistema agrícola “sostenible y resiliente” (Delgadillo, 2022).

Algunos bancos de germoplasma en México son los siguientes: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), el Banco Nacional de

Germoplasma Vegetal (Bangev), el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y Laboratorio Regional para el Estudio y Conservación de Germoplasma en el Parque Científico Tecnológico de Yucatán (PCTY). Además, diversas instituciones como la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), la facultad de estudios superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Universidad Autónoma de Querétaro y la Universidad Autónoma de Chapingo cuentan con bancos de germoplasma (*ídem*).

Soto-Arenas (2006), señala que en Tahití se han establecido bancos de germoplasma modernos de vainilla, donde realizan cultivos de campo e *in vitro*, escrutinio genético de los individuos, análisis de las propiedades aromáticas de los cultivares y la detección de virus.

## **2.8. CONSERVACIÓN *IN VITRO***

Esta técnica parte de las estrategias para la conservación de los recursos genéticos (Annapurna *et al.*, 2015), se fundamenta en el uso de distintas técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, las cuales consiste en tomar una porción de una planta (explante), por ejemplo: el ápice, un segmento de hoja o de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, entre otros, y sembrarlo asépticamente en un medio nutritivo estéril gelificado o semisólido, compuesto por macroelementos, microelementos, quelatos, sacarosa, gelificantes, al cual se le puede agregar compuestos orgánicos, tales como: hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos, reguladores del crecimiento o retardantes de crecimiento, bajo condiciones controladas de laboratorio (luz, temperatura y humedad), para que las células expresen su potencial de regenerar una o muchas plantas nuevas (Albarrán *et al.*, 2011).

En este sentido, se tiene como objetivos de la conservación *in vitro* los siguientes:

(1) Salvaguardar la diversidad de ejemplares recolectados de poblaciones en campo o en su centro de origen, (2) reducir la pérdida de especies, (3) mantener la estabilidad genética (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010, Annapurna *et al.*, 2015), (4) facilitar la recolección, multiplicación y almacenamiento del germoplasma vegetal en

condiciones de esterilidad, (5) permitir la obtención de plantas o explantes libres de patógenos o enfermedades, (6) permitir la propagación a gran escala, (7) facilitar la posibilidad de intercambiar material vegetal con otros bancos de germoplasmas en otros Estados o países y (8) desarrollar una tecnología económica y sencilla que disminuya la cantidad de trabajo (conservación a mediano plazo) (Engelmann, 2012 y González-Arno y Engelmann, 2013).

## **2.9. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN *IN VITRO***

La conservación puede ser a corto, mediano y largo plazo (Normah *et al.*, 2011; Pence, 2011), esto dependerá del tiempo que se desee resguardar los recursos fitogenéticos. Para lograr una conservación a corto plazo se necesita estar subcultivando el material vegetal cada 15 días o hasta tres meses, tomando en cuenta la especie (Bello-Bello *et al.*, 2014), mientras que, a mediano plazo, se emplea el método de crecimiento reducido (García-Águila *et al.*, 2007), con el objetivo de reducir el crecimiento de los explantes e incrementar los intervalos de subcultivo (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). En el caso del almacenamiento a largo plazo, se utiliza la crioconservación (Engelmann, 2011).

### **2.9.1. Conservación a corto plazo**

Esta técnica se basa en realizar subcultivos constantes del material vegetal, por un periodo indefinido, con el inconveniente de una mayor probabilidad de contaminación de los medios al realizar la siembra (Bello-Bello *et al.*, 2014).

### **2.9.2. Conservación a mediano plazo**

Los explantes permanecen por 6 meses o hasta por 12 meses en cultivo *in vitro* (Rayas *et al.*, 2002 y Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010), por medio del empleo del método de crecimiento reducido, basado en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta, con los objetivos de incrementar el plazo de tiempo entre subcultivos, para disminuir los riesgos del subcultivo constante (contaminación), sin que se produzcan cambios genéticos y lograr mantener la diversidad genética de una especie bajo condiciones estériles sin poner en peligro la estabilidad de la planta (Shibli *et al.*, 2006).

Para disminuir el crecimiento de los explantes y aumentar los intervalos entre subcultivos. Se utiliza una o varias de las siguientes estrategias:

Reducción de las concentraciones de azúcar, sales o minerales: la relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrogenados del medio de cultivo pueden tener efectos importantes en la reducción del crecimiento y la morfogénesis de los explantes (Rayas *et al.*, 2002; García-Águila *et al.*, 2007; Sánchez-Chiang, 2010).

La adición de agentes osmóticos: los agentes osmóticos son materiales que reducen el potencial hídrico de las células. Esta condición de estrés puede inhibir tanto el crecimiento de callos como la formación de brotes. La adición de osmóticos al cultivo ha demostrado su eficacia en la reducción del crecimiento e incrementa la vida de almacenamiento de muchos tejidos crecidos *in vitro* de diferentes especies de plantas. El manitol, la sacarosa, el sorbitol, principalmente se han reportado como osmóticos que aumentan la vida de almacenamiento de tejidos *in vitro* (Espinosa *et al.*, 2002 y Shibli *et al.*, 2006).

Temperatura: se produce una reducción en la actividad metabólica, lo que repercute, en el crecimiento de los explantes, al disminuir la temperatura a la que están expuestos los cultivos (esta temperatura depende de los requerimientos de cada especie) (Sánchez-Chiang, 2010). Sin embargo, si se mantienen los explantes a temperaturas bajas regularmente a 4 °C o a temperaturas inferiores, por períodos prolongados, pueden sufrir daños fisiológicos, debido a la exposición al frío, provocando cambios en el metabolismo, en el contenido de proteínas, en la composición y funcionamiento de las membranas, pero si los explantes están expuestos a esta condición por un periodo no prolongado, los daños pueden ser reversibles (*ídem*).

Variando el régimen de luz: la intensidad y calidad de la luz, son otros factores importantes en el control de la velocidad de crecimiento, especialmente en su interacción con la temperatura (García-Águila *et al.*, 2007).

Tamaño del recipiente de cultivo: el volumen del recipiente de cultivo puede ser determinante para definir la frecuencia de subcultivos y el almacenamiento óptimo de los explantes. Por ejemplo: si se desea almacenar por un periodo de tiempo mayor se utilizan frascos de vidrio con mayor capacidad, según las necesidades de crecimiento del explante (Sánchez-Chiang, 2010).

La incorporación de retardantes o inhibidores de crecimiento: cloruro de cloromequat, ácido abscísico, paclobutrazol, uniconazol, propiconazol, prohexadione, trinexapac, entre otros (Hernández, 2001; Bañón-Arias y Martínez-López, 2010; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010; Bello-Bello *et al.*, 2015; Bonilla *et al.*, 2015).

### **2.9.3. Conservación a largo plazo**

Este tipo de conservación permite almacenar diversos explantes: semillas, semillas sintéticas, meristemos, ápices, polen, callos y suspensiones celulares, siendo eficaz, sin provocar variaciones somaclonales en plantas con propagación vegetativa, además, permite su mantenimiento sin alteración alguna bajo estas condiciones, permitiendo su conservación por tiempo de almacenamiento indefinido (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010).

Para el almacenamiento por largo plazo, generalmente utilizan la estrategia de crioconservación (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010 y Engelmann, 2011). La cual consiste en el almacenamiento de células, tejidos u órganos vegetales vivos a temperaturas extremadamente bajas (-80 °C).

Esta técnica permite el almacenamiento durante un periodo de más de un año, en nitrógeno líquido, a una temperatura de -196 °C, o a veces se combina con otros gases inertes (helio y el argón) (Benson *et al.*, 2006 y García-Águila *et al.*, 2007). La justificación de usar nitrógeno líquido, es porque detiene todas las actividades metabólicas, de forma inmediata al hacer contacto con el explante y a su vez permite que los tejidos conserven la viabilidad sin que ocurran alteraciones fisiológicas durante el almacenamiento, manteniendo sus características genéticas (García-Águila *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2008 Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010; Krishnan, Decruse y Radha, 2011; Guo, Stiles y Liu, 2013; Tavazza *et al.*, 2015).

Han documentado dos grupos de técnicas de crioconservación: las técnicas clásicas basadas en la deshidratación química parcial con osmoprotectantes y congelamiento programado y las técnicas actuales (vitrificación, encapsulación-deshidratación, encapsulación-vitrificación, precrecimiento, precrecimiento-deseccación, desecación y la técnica de la microgota) (García-Águila *et al.*, 2007 y Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010).

Vitrificación: consisten en el cambio del estado líquido a un estado intermedio llamado vítreo que evita la formación de cristales de hielo intracelulares, causa principal del daño mecánico a las membranas durante la congelación (Benson *et al.*, 2006 y Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Es realizada previa al congelamiento por medio de una sustancia crioprotectante, compuesta por concentraciones altas de sacarosa a 0.4 M, glicerol y dimetil sulfóxido al 15 %, etilenglicol y/o polivinil alcohol (Wang *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010).

Esta técnica se utiliza principalmente, para la conservación de ápices de tallos, tejidos embriogénicos y cultivos de células (Zhao *et al.*, 2005 y Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Además del uso de crioprotectante, otros autores han adicionado proteínas anticongelantes como albúmina de suero bovino, epinefrina o aminoácido prolina para incrementar la sobrevivencia (Wang *et al.*, 2005 y Zhao *et al.*, 2005).

Encapsulación-deshidratación: se precultivan los explantes en una solución con una concentración molar de sacarosa de 0.5 a 0.75, para posteriormente ser encapsulados en alginato de calcio o polietilenglicol, después se deshidratan en la cámara de flujo laminar durante cuatro o cinco horas, se congelan con Nitrógeno líquido y se mantienen a una temperatura de menos 80 °C durante todo el período de almacenamiento. Para su descongelación se coloca a baño María a 40 °C por uno a dos minutos y, por último, se cultivan en un medio para lograr su adecuado crecimiento y regeneración (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010).

Encapsulación-vitrificación: se usa para precultivar meristemas, en una solución con crioprotectante a una temperatura de 0 °C por unas horas, para su posterior encapsulación en alginato de calcio. Se congelan de igual manera con Nitrógeno

líquido y se mantienen a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cuando se necesita descongelar se utiliza el mismo método de la técnica de encapsulación-deshidratación (*ídem*).

Precrecimiento: es la técnica ideal, para cultivar de manera *in vitro* embriones cigóticos y somáticos, con crioprotectantes durante varios días, para posteriormente, ser congelados con Nitrógeno líquido, luego son almacenados a una temperatura de menos  $80^{\circ}\text{C}$ . Cuando se requieren su descongelamiento se lleva a cabo por medio de baño María (*ídem*).

Precrecimiento-deshidratación: es útil, para conservar tallos o callos embriogénicos los cuales son cultivados en un medio alto en sacarosa, ácido abscísico o aminoácido prolina, después se deshidratan con flujo de aire y se congelan en nitrógeno líquido. El proceso de descongelamiento se produce a baño María y posteriormente son lavados con medio de cultivo suplementado con una concentración de sacarosa de 0.4 a 1.2 M (Sant *et al.*, 2008 y Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010).

Desecación: se ha utilizado sólo con semillas recalcitrantes y estructuras haploides como polen y óvulos. En ella se realiza primero la desecación de los tejidos o semillas en una cámara de flujo laminar o en un aparato con aire comprimido estéril o en sílica gel y, luego se congelan las estructuras con nitrógeno líquido (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Por último, en la técnica de la microgota, los ápices de tallos son puestos con una solución crioprotectante sobre papel aluminio, de manera que se formen gotas pequeñas de crioprotectante con el ápice en el centro y posteriormente son congelados con nitrógeno líquido (*ídem*).

## 2.10. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos naturales, que, a concentraciones pequeñas, fomentan, inhiben o modifican el crecimiento de las plantas ejerciendo una profunda influencia en los procesos fisiológicos. Clasificándose en dos grupos: los reguladores de crecimiento u hormonas naturales, que son aquellos que se encuentran en los vegetales, y los reguladores sintéticos, que son compuestos artificiales obtenidos por síntesis química. Otra forma de agruparlos es de acuerdo a su acción en la planta: aquellos que fomentan el crecimiento (promotores), aquellos que lo inhiben (inhibidores) y aquellos que lo retardan (retardantes) (Figura 9). Estos últimos son compuestos químicos que retrasan la activación del meristema subapical responsable de la elongación de los tallos, generalmente sin afectar al meristema apical, siendo su mecanismo de acción la inhibición de la síntesis de giberelinas, ejemplo: cloruro de clomequat (Bañón-Arias y Martínez-López, 2010 y Cossio, 2013).



Figura 9. Clasificación de reguladores del crecimiento de acuerdo con su acción en la planta (Cossio, 2013).

### **2.10.1. Cloruro de cloromequat (CCC)**

Se utiliza como regulador del crecimiento de plantas, absorbido por vía foliar y radical, provoca una disminución del contenido de giberelinas endógenas en los tejidos vegetales y por lo tanto un crecimiento más lento de los distintos órganos vegetales. Se ha reportado su uso en plantas ornamentales para promover la ramificación lateral y la floración en azaleas, fucsias, begonias, poinsettias, geranios y pelargonios cultivadas en invernaderos y viveros; en *Lilium* híbrido L/A var. Litouwen, su aplicación reduce la longitud de la vara floral, en el caso del trigo, centeno, avena y triticale aumenta el rendimiento, además de promover la formación de flores y mejorar el cuajado de los frutos en peras, almendras, aceitunas y tomates, para prevenir la caída prematura de los frutos en peras, albaricoques y ciruelas. También se utiliza en algodón, hortalizas, tabaco, caña de azúcar, mangos y otros cultivos (Rademacher, 2000; Bañón-Arias y Martínez-López, 2010; Maturana, 2012).

### **2.10.2. Ácido abscísico (ABA)**

El ácido abscísico (ABA) químicamente es un sesquiterpeno, que se sintetiza en los cloroplastos principalmente y otros plastidios mediante la ruptura oxidativa de los epoxicarotenoides neoxantina y violaxantina (Flórez y Pereira, 2009). El precursor es el ácido mevalónico del cual también se forman las giberelinas. Actualmente se conocen dos vías de síntesis: Por degradación de un precursor C40 (la violaxantina y otros), o por la formación directa a partir de un precursor primario C15: el farnesilpirofosfato (Figura 10) (Cossio, 2013).

La segunda vía es la principal formadora de ABA. La primera vía produce cantidades reducidas y solo en circunstancias específicas. Las xantofilas, zeaxantinas, anteraxantina, neoxantina y violaxantina son los precursores de la xantoxina que se oxida a ABA vía aldehído abscísico. Como consecuencia del desdoblamiento de las xantofilas, se forman la xantoxina cis y trans, pero únicamente la cis se convierte en ABA. Por lo tanto, en el momento de la ruptura de la molécula de xantofila deben estar en configuración 9-cis (Figura 10) (Cossio, 2013).

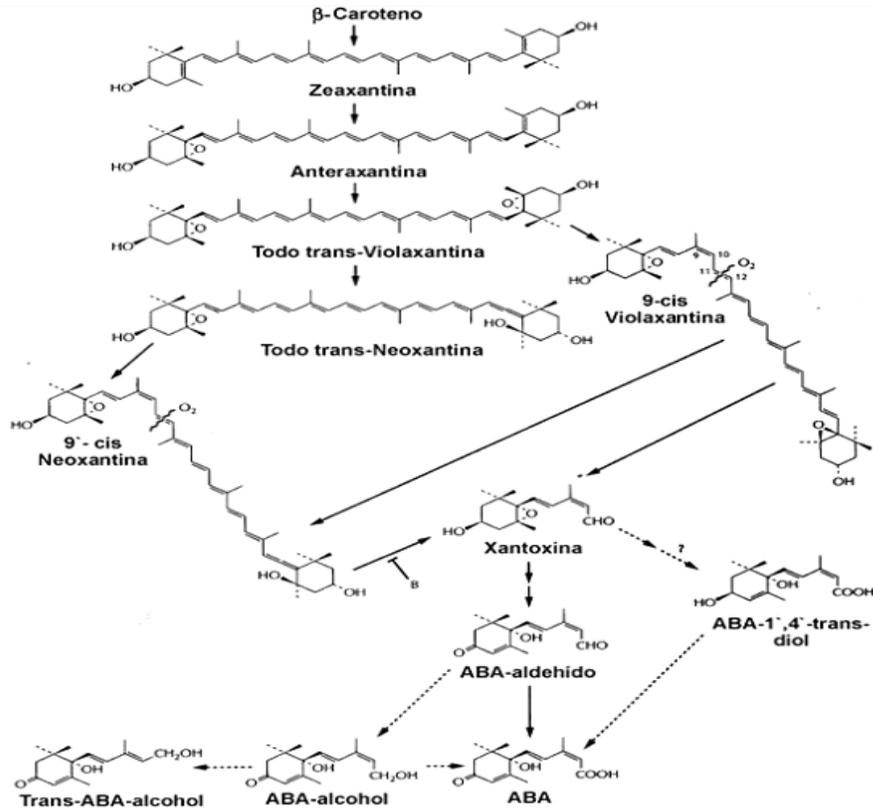


Figura 10. Biosíntesis del ácido abscísico (ABA).

Los efectos provocados a nivel fisiológicos son los siguientes (Cossio, 2013):

Respecto a las semillas y yemas de especies leñosas, entran en dormancia cuando están expuestas a temperaturas bajas, además, los meristemos del árbol serán protegidos con la formación de escamas y su crecimiento se detendrá temporalmente. Por lo que proponen que la dormición sea producida por un balance entre el inhibidor del crecimiento ABA y los promotores del crecimiento como citocininas y giberelinas (Alcántara *et al.*, 2019).

La inhibición del crecimiento es una de las respuestas más comunes y está directamente relacionada con la inhibición del desarrollo. Sin embargo, el ABA, no provoca este efecto en todas las especies, debido a que las giberelinas, contrarrestan su acción (Cossio, 2013 y Alcántara *et al.*, 2019). También, actúa sobre la maduración del embrión vegetal y está implicada en procesos de regulación génica y promoción de la senescencia (Alcántara *et al.*, 2019).

Por otra parte, cuando las plantas superiores sufren de estrés hídrico, se incrementa el contenido de ABA, lo que produce el cierre estomático inhibiendo una ATPasa de la membrana plasmática de las células guarda, además, el ABA se incrementa también en respuesta a otros tipos de estrés (lesiones, salino y térmico) (Alcántara *et al.*, 2019).

Por último, controla el desarrollo embrionario siendo el responsable de la inducción de la síntesis de proteínas de la embriogénesis tardía que protegen al embrión de la desecación que implica su maduración y hace que el embrión entre en un estado de dormancia primaria, previniendo que se produzca el fenómeno de viviparidad (Cossio, 2013).

## **2.11. ORGANOGÉNESIS**

La organogénesis es una de las fases más importantes dentro de los sistemas *in vitro*, debido a que constituye una de las posibles vías morfogénicas para la diferenciación de plantas, puesto que consiste en la formación de raíces, que origina la rizogénesis o brotes adventicios (caulogénesis), en los explantes cultivados *in vitro*, que puede ocurrir a través de dos vías: directa e indirecta (Pérez-Bernal *et al.*, 2008 y Perea, 2010).

La primera hace referencia a la formación de órganos a partir del explante seleccionado (células, tejidos u órganos vegetales iniciadores del cultivo *in vitro*), sin fases intermedias de callo, mientras que la indirecta se refiere a la formación previa de callo y a la posterior formación de órganos (Perea, 2010 y Martín *et al.*, 2015).

Una mayor proliferación puede lograrse con la adición de sustancias reguladoras de crecimiento como las citoquininas (bencilaminopurina, zeatina, kinetina y tidiazurón), que en combinación con las auxinas (ácido naftalenacético o ácido indolacético), pueden regular la formación de los brotes o raíces, dependiendo de la concentración empleada de cada una, puesto que han reportado que, para inducir la formación de brotes, debe incrementarse la concentración de citoquininas sobre las auxinas, mientras que, para obtener raíces, se requiere de una mayor concentración

de auxinas (Pérez-Bernal *et al.*, 2008; Perea, 2010; Pineda *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2015).

Sin embargo, existen varios factores que deben ser considerados para obtener el mejor resultado de organogénesis, por ejemplo: el tamaño y la edad fisiológica de los explantes, puesto que han documentado que los tejidos juveniles presentan una mayor eficacia para la organogénesis que los tejidos derivados de órganos adultos o senescentes. También la luz, temperatura y composición del medio de cultivo (consistencia, pH y los reguladores del crecimiento), desempeñan un papel importante en el desarrollo de la respuesta organogénica (Pérez-Bernal *et al.*, 2008).

### III. ANTECEDENTES

Diversos autores han realizado estudios sobre el uso de retardantes de crecimiento: ácido abscísico (ABA), paclobutrazol (PAC) y agentes osmóticos: manitol, sorbitol, sacarosa y polietilenglicol (PEG), con diversos objetivos (conservación *ex situ*, tuberización, microtuberización, desarrollo, rendimiento, regeneración *in vitro* de cuerpos protocórmicos, micropropagación, aclimatación y crecimiento), en distintas especies de plantas, tal es el caso de *Vanilla planifolia*, *Solanum tuberosum* L., *Eclipta alba* (L.) Hassk, *Helianthus annuus* L., *Tibouchina urvilleana* (DC). Cogn., *Vanda tricolor*, *Vitis vinifera* L. var. Black Matrouh, *Agave bracteosa*, entre otras.

#### 3.1. SUSTANCIAS EMPLEADAS EN EL CRECIMIENTO VEGETAL *IN VITRO*

Hussain *et al.* (2006), realizaron un estudio para evaluar la tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Cardinal. Los cultivos se multiplicaron en medio Murashige & Skoog con 1 mg/l de ácido giberélico (GA3). Cuando el número de brotes fue máximo, cambiaron los cultivos por medio para inducción de tubérculos. Los medios de tuberización *in vitro* consistieron en MS adicionado a diferentes concentraciones de CCC (0, 100, 150, 200 y 250 mg/l), BAP (0, 1, 2, 3 y 4 mg/l) y sacarosa (30, 60, 90 y 120 g/l). Refieren que 200 mg/l de CCC o 90 g/l de sacarosa en los medios promovieron la inducción máxima de tubérculos (16.5 y 15.6 tubérculos/frasco respectivamente) seguido de BAP a 4 mg/l, produciendo 9 tubérculos/matraz, además de que la oscuridad completa era esencial para la inducción del tubérculo.

Kozak (2006), evaluó el efecto de retardantes del crecimiento aplicados *in vitro* sobre la aclimatación y crecimiento de *Tibouchina urvilleana* (DC). Cogn. *In vivo*. Cultivaron *in vitro* puntas de brotes, por 4 semanas en medio Murashige & Skoog (MS), suplementado con paclobutrazol a 0.1, 0.5, 1.0 y 5 mg dm<sup>3</sup>, flurprimidol a 0.1, 1.0 y 5 mg dm<sup>3</sup>, cloruro de clorocolina (CCC) a 5, 50, 250 mg dm<sup>3</sup> y un control. Transfirieron los microesquejes enraizados al invernadero y los trasplantaron a una mezcla de turba-perlita 1:1, durante 5 semanas. Luego, las cultivaron en un sustrato de turba durante

otras 5 semanas. La aclimatación de los brotes enraizados en el invernadero fue efectiva en 92.5-100 %. La supervivencia de las plantas fue menor cuando se cultivaron previamente microesquejes en medio con flurprimidol a 5 mg dm<sup>3</sup>. El cultivo de brotes de *Tibouchina urvilleana in vitro* en medios con retardantes del crecimiento tuvo un efecto significativo en el crecimiento posterior de plantas *ex vitro*. Paclobutrazol y flurprimidol a 5 mg dm<sup>3</sup> inhibieron el crecimiento de plantas después de 10 semanas de crecimiento *ex vitro*.

Ray y Bhattacharya (2008), evaluaron el uso de 6-bencilaminopurina (BAP) a 2.2, 4.4 y 8.8 µM, Thiadiazuron (TDZ) a 2.3, 4.5 y 9 µM y cloruro de clorocolina (CCC) a 0.63, 3.16, 6.33 y 12.66 µM, con el objetivo de mejorar la micropropagación de *Eclipta alba*. El regulador de crecimiento BAP resultó ser más eficaz en la inducción y proliferación de brotes adventicios. La frecuencia más alta de respuesta en brotes fue del 100% y el número máximo de brotes (23) por explante, después de 60 días de cultivo en medio MS que contenía 8.8 µM de BAP. El efecto priming en microbrotes de *Eclipta alba* con la adición de 6.3 µM de cloruro de clorocolina (CCC) resultó más eficaz, con cambios en los brotes después de 30 días, reflejados en una mayor producción de número de raíces, elevación de nivel de clorofila en hojas y aumento de biomasa, además, el alargamiento hizo que las plantas fueran más resistentes y adecuadas para aclimatación. Al propagarlas en suelo sobrevivieron el 100 % de las plantas con tratamiento y el 84 % de las plantas no tratadas.

Zakaria *et al.* (2008), emplearon bencil adenina (BA) a concentraciones de 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 mg/l, cloruro de clorocolina (CCC) a 0, 125, 250 y 500 mg/l y su combinación. Evaluaron respecto al tratamiento control (0 mg/l) en cada caso, para conocer los niveles óptimos de microtuberización en papa variedad Diarnant. La primera microtuberización fue a los 13 días a 10 mg/l BA y obtuvieron el número máximo (12.9) y peso medio (252.1 mg) de microtubérculos en la combinación (BA/CCC) a 10:500 mg/l.

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2012), desarrollaron un sistema de conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento retardado para las especies *Agave bracteosa*, *A. chiapensis*, *A. nizandensis*, *A. ornithobroma*, *A. peacockii*, *A. titanota*, *A. victoria*

*reginae*, *A. cupreata*, *A. karwinskii* y *A. potatoorum*, consideradas como amenazadas, con el objetivo de disponer de una herramienta que permita la conservación a mediano plazo de germoplasma de estas especies. Determinaron que la adición de agentes osmóticos al medio de cultivo (manitol o sorbitol 50 g/l) reducen la tasa de crecimiento *in vitro* de los tejidos, prolongando el tiempo entre subcultivos de 75 días a 10 meses, sin afectar su viabilidad ni capacidad de regenerar plantas completas en medios con citocininas y sin los agentes osmóticos. Obtuvieron regeneración de entre 5.8 y 20.6 brotes por explante en tejidos conservados durante 10 meses con agentes osmóticos. Los brotes formaron raíces y se adaptaron a suelo entre un 92 y 80 %, respectivamente, permitiendo el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro*.

Hassan *et al.* (2014), determinaron un medio de conservación *in vitro* de uva local (*Vitis vinifera* L. var. Black Matrouh) y su identificación molecular. La conservación a medio plazo la iniciaron a 5 °C en condiciones de oscuridad total, utilizaron explantes de corte nodal cultivados *in vitro* en medio MS al 75 %, con glucosa, manitol o sorbitol a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 o 8.5 % (p/v) y un control. El efecto de diferentes períodos de conservación provocó que el porcentaje de supervivencia disminuyera gradualmente con el aumento de la conservación (períodos de 3, 6, 9 a 12 meses). Se obtuvo un 88.89 % de explantes de corte nodal verdes y saludables cuando se conservaron durante 12 meses en un medio de conservación con 3.5 o 4.5 % de glucosa, 2.5 % manitol y sorbitol al 5.5 %. El número de brotes por explante y su longitud disminuyó con el aumento del período de conservación de 6 a 12 meses. La determinación de la estabilidad fue mediante la evaluación de Secuencias Intergénicas Repetidas Simples (ISSR). El análisis de marcadores ISSR no mostró variación entre los conservados y material no conservado con las imprimaciones utilizadas.

Bello-Bello *et al.* (2015), evaluaron el efecto de manitol y polietilenglicol (PEG) a cuatro concentraciones (0, 10, 20 y 30 g/l) y de ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC) a concentraciones de 0, 1, 2 y 3 mg/l, sobre la supervivencia y crecimiento *in vitro* de plantas de *Vanilla planifolia*. Utilizaron brotes de 0.5 cm de altura, cultivados en medio de cultivo (MS). A los 180 días del cultivo evaluaron el porcentaje de

supervivencia, longitud de la planta, número de hojas y número y longitud de raíces. Obtuvieron que al emplear 1, 2 y 3 mg/l de ABA los porcentajes de supervivencia fueron 100, 90 y 90 % respectivamente y, particularmente al utilizar 3 mg/L los brotes mostraron los valores menores sobre la longitud ( $1.3 \pm 0.12$  cm), número de hojas ( $1.8 \pm 0.26$ ), número de raíces ( $1.5 \pm 0.29$ ) y longitud de raíz ( $1.9 \pm 0.17$  cm) siendo el tratamiento más eficaz.

Mehraj *et al.* (2017), realizaron un experimento para conocer la respuesta de diferentes concentraciones (0, 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/l) de cloruro de clorocolina (CCC), además agregaron dos sales: nitrato de amonio (412.5 mg/l) y nitrato de potasio (950.0 mg/l), obteniendo medios MS modificados para la regeneración *in vitro* de cuerpos protocórmicos (PLBs) de *Phalaenopsis* 'Fmk02010'. A los 42 días de haber sido cultivados, obtuvieron números máximos de PLBs en los medios con 0.01 mg/l de CCC (15.66) y peso fresco máximo (0.21 g), una tasa de formación del 100 %, una variación del 58,83 % en el número de PLBs ( $R^2= 0,5883$ ) y 47,44 % de variación en peso fresco ( $R^2= 0,4744$ ) a las diferentes concentraciones de CCC. Refieren que la adición de una concentración muy baja de CCC en el medio de cultivo de plantas puede aumentar el número, tasa de formación y peso fresco de PLBs de *Phalaenopsis*.

Wayan-Deswiniyanti y Dwipayani-Lestari (2018), reportaron que el aumento de la diversidad de características de las plantas de orquídeas puede ser hecho administrando paclobutrazol. El tratamiento con paclobutrazol en medio de cultivo tuvo como objetivo inhibir el crecimiento tanto en hojas y la longitud de los brotes de modo que la planta (*Vanda tricolor*) se volviera más pequeña que la original. El resultado de la resistencia al crecimiento, que ocurrió varió según la concentración de paclobutrazol agregado al medio Vacint y Went (VW) en cultivo de semillas de Orquídea tricolor, añadieron agua de coco con diferentes concentraciones de paclobutrazol: control K0 (0%), K1 (1 mg/l), K2 (3 mg/l), K3 (5 mg/l) y K4 (7 mg/l). Cada tratamiento con cinco repeticiones. El resultado de la siembra de *Vanda tricolor* fue que el 40 % de las semillas presentaron imbibición y formaron protocormos, el 8 % de las semillas se oscurecieron y el 52 % de los cultivos se contaminaron. Es decir, la semilla de esta orquídea tuvo respuesta, porque creció, hasta desarrollar protocormos, pero

estadísticamente al adicionar paclobutrazol al medio no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las orquídeas *Vanda tricolor* ( $P > 0.05$ ).

### **3.2. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EMPLEADOS EN EL CULTIVO *EX VITRO***

Garza *et al.* (2001), reportaron el efecto de cuatro fitoreguladores comerciales en el desarrollo y rendimiento del girasol, dichas plantas fueron tratadas con Biozyme T F (Ácido Giberélico, Auxinas y Citoquininas) a 500 cc/ha, Biogib (giberelina) a 5 mM, Cycocel (Cloromequat) a 3 000 ppm, Cultar (Paclobutrazol) 31 ppm y un testigo, para evaluar los efectos sobre los componentes morfológicos del rendimiento del girasol (*Helianthus annuus* L.). El experimento consistió en 20 unidades experimentales, cada una con 6 surcos. Evaluaron la altura de la planta, diámetro del tallo, longitud y ancho de la hoja, longitud y diámetro del pecíolo, área foliar, diámetro del capítulo, número de achenios/planta, peso de achenios/capítulo y rendimiento de grano/capítulo (Kg/ha). Mediante una ANOVA determinaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en todas las variables. Con la aplicación de Biogib (giberelina) obtuvieron un mayor aumento en la altura de las plantas, pero decremento en el rendimiento, con Cycocel (Cloromequat) las plantas presentaron la menor altura, Cultar (Paclobutrazol) fue el que produjo una mayor área foliar y Biozyme (Ácido Giberélico, Auxinas y Citoquininas) originó la menor área foliar. Con respecto al rendimiento de grano con Biozyme (Ácido Giberélico, Auxinas y Citoquininas) y Cultar (Paclobutrazol) lograron la mayor producción.

Lázaro *et al.* (2007), evaluaron los efectos del Cloromecuato (CCC) en trigo y obtuvieron una reducción de la altura en dos cultivares. El experimento G96 consistió en la adición de 3 l/ha, sin regulador (CCC) obtuvieron plantas con una altura de 96 cm y con cloromecuato de 78 cm y con el experimento U96 sin regulador ejemplares de 108 cm y con 2 l/ha de regulador la altura fue menor (102 cm), sin embargo, el CCC fue poco efectivo para controlar el vuelco (pérdida de la posición vertical normal de los tallos), pero produjo un promedio de rendimiento de 8 %, las dosis añadidas del regulador aumentaron el número de granos/g de espiga (el factor de fertilidad de las espigas), el aumento en este factor explica la respuesta positiva del rendimiento.

Zheng *et al.* (2012), realizaron un estudio para comprobar la hipótesis que los retardantes del crecimiento: clorocolina (CCC) y paclobutrazol (PBZ) podrían mejorar la acumulación de carbohidratos en los bulbos de lirio al mejorar la capacidad fotosintética y cambiar las hormonas endógenas, por lo que rociaron a los híbridos de *Lilium* Oriental 'Sorbonne' con un aerosol de solución CCC o PBZ (ambos a 300 mg/l), seis semanas después de la siembra. Los parámetros morfológicos, contenidos de hormonas endógenas: ácido giberélico (GA), ácido abscísico (ABA) y ácido indol-3-acético (IAA) y los contenidos de carbohidratos se midieron de seis a 18 semanas después de la siembra, a intervalos de 2 semanas. Los resultados mostraron que CCC aumentó la biomasa de hojas y tallos que podrían producir más fotoasimilados disponibles para transporte y utilización. Sin embargo, el tratamiento con PBZ suprimió el crecimiento vegetativo y favoreció el transporte de fotoasimilación a los bulbos, además observaron un pequeño retraso en la formación de yemas y antesis, pero los tratamientos (CCC y PBZ) mejoraron el contenido de sacarosa en las hojas, disminuyeron el GA, pero aumentaron el contenido de IAA en los bulbos de lirio. Por lo tanto, es un método eficaz.

Bermúdez (2018), evaluó el efecto de chlormequat (Cycocel®) sobre plántulas de lechuga en invernadero, analizando cuatro tratamientos, aplicando una única dosis de 4.2, 8.4 y 12.6 ml/l a los 15 días después de siembra, comparadas con un testigo. utilizó un diseño experimental completamente al azar. Las variables evaluadas a los 26 días después de la siembra fueron altura total (cm) de la planta, altura de tallo y diámetro (mm), número de hojas y volumen y longitud de raíz. Obteniendo que las plántulas con chlormequat a 12.6 ml/l, presentaron menor altura total (9.36 cm) y menor altura de tallo (12 mm), comparadas con el testigo (14.69 cm y 21 mm correspondientemente), sin embargo, el diámetro del tallo presentó valores similares (3.12 mm), en comparación con el testigo (3.11 mm), un número de hojas de 5, siendo igual al número de hojas obtenido del testigo, pero diferente a las dosis de 8.4 ml/l (4 hojas) y 4.2 ml/l (4 hojas), que no presentaron diferencias entre sí, el volumen y longitud de raíz, todos los tratamientos fueron superiores al testigo.

## IV. HIPÓTESIS

H0: El empleo de retardantes de crecimiento no generará diferencias en el crecimiento y desarrollo de los explantes de *Vanilla planifolia*.

H1: El empleo de retardantes de crecimiento generará diferencias en el crecimiento y desarrollo de los explantes de *Vanilla planifolia*.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. GENERAL

Evaluar el efecto de retardantes de crecimiento en el cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia* Andrews.

### 5.2. PARTICULARES

Determinar el efecto de la interacción de diferentes concentraciones de los retardantes de crecimiento ácido abscísico y cloruro de cloromequat en el cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Analizar el efecto del ácido abscísico y cloruro de cloromequat en la organogénesis de las microestacas.

Examinar el porcentaje de supervivencia de las microestacas obtenidas bajo efectos de retardantes de crecimiento.

## VI. MÉTODO

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH, ubicado en Ciudad Universitaria, Libramiento Norte Poniente 1150, Colonia Lajas Maciel Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

### 6.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron microestacas de vainilla (*Vanilla planifolia*) de 1.5 cm (Figura 11), obtenidas de plántulas previamente cultivadas *in vitro* en medio Murashige & Skoog al 50 %, incubadas a  $25 \pm 2$  °C, con un ciclo de fotoperiodo de 16/8 h y una intensidad lumínica de 2000 lux (Figura 12).



Figura 11. Microestacas de *Vanilla planifolia*.



Figura 12. Plántulas de *Vanilla planifolia* cultivadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la UNICACH.

### 6.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MADRE (MACROELEMENTOS, MICROELEMENTOS Y QUELATOS)

Se vertió la mitad del volumen final de la solución madre a preparar en un matraz Erlenmeyer (500 ml de agua destilada), posteriormente se agregaron una por una las sales minerales siguiendo el orden mostrado en el Cuadro 1; se esperó la disolución completa de cada una antes de adicionar la siguiente, una vez disueltas las sales; se

aforó a un litro y se colocó cada solución resultante en un recipiente de vidrio (Figura 13), en el caso particular de los quelatos, se utilizó un frasco ámbar. Por último, se conservaron en refrigeración hasta su uso.

Cuadro 1. Reactivos para la preparación de soluciones madres.

<b>Macroelementos (10X)</b>
100 ml (Por litro de medio)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (nitrato de amonio) 16.5 g
KNO <sub>3</sub> (nitrato de potasio) 19.0 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (cloruro de calcio) 4.4 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (sulfato de magnesio) 3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (fosfato de potasio monobásico) 1.7 g
<b>Microelementos (100X)</b>
10 ml (Por litro de medio)
KI (yoduro de potasio) 83 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (ácido bórico) 620 mg
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O (sulfato de manganeso) 1690 mg
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (sulfato de zinc) 860 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (molibdato de sodio) 25 mg
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (sulfato cúprico) 2.5 mg
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (cloruro cobalto) 2.5 mg
<b>Quelatos (100X)</b>
10 ml (Por litro de medio)
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O 4.123 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 2.780 g



Figura 13. Solución de microelementos.

### 6.3. PREPARACIÓN DE MEDIO MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) AL 75 %

Para la preparación de los medios de cultivos, se colocaron 500 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. Posteriormente se vertieron 75 ml de macroelementos, 7.5 ml de microelementos, 7.5 ml de quelatos, 30 g/l de sacarosa, ácido abscísico (ABA) a 0, 1.5 y 3 mg/l, cloruro de cloromequat (CCC) a 0, 1, 2, 4 y 6 mg/l o su combinación (ABA/CCC) (Cuadro 2) (Figura 14) y se colocó en una parrilla con agitador magnético, una vez mezclado, se aforó a 1000 ml; una vez aforado, en un matraz Erlenmeyer, se ajustó el pH a 5.6 con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) al 1 N (Figura 14), una vez obtenido el pH deseado, se agregaron 2.5 g/l de Phytigel Sigma®, se calentó hasta alcanzar el punto de ebullición, se vaciaron 20 ml de medio MS al 75 %, en cada uno de los frascos de vidrio de 125 ml con tapa (Figura 15), por último, se esterilizaron en autoclave (Figura 16) a 121 °C a una presión de 15 lb psi<sup>-1</sup>, durante 15 minutos, se dejaron solidificar, se sellaron con película plástica adherente, se etiquetaron y dejaron a prueba de esterilidad durante 72 h.

Cuadro 2. Matriz de combinaciones de retardantes de crecimiento.

ABA/CCC mg/l	0	1	2	4	6
	Control	T 01	T 02	T 03	T 04
<b>0</b>	0.0: 0.0	0.0: 1.0	0.0: 2.0	0.0: 4.0	0.0: 6.0
	T 05	T 06	T 07	T 08	T 09
<b>1.5</b>	1.5: 0.0	1.5: 1.0	1.5: 2.0	1.5: 4.0	1.5: 6.0
	T 10	T 11	T 12	T 13	T 14
<b>3</b>	3.0: 0.0	3.0: 1.0	3.0: 2.0	3.0: 4.0	3.0: 6.0

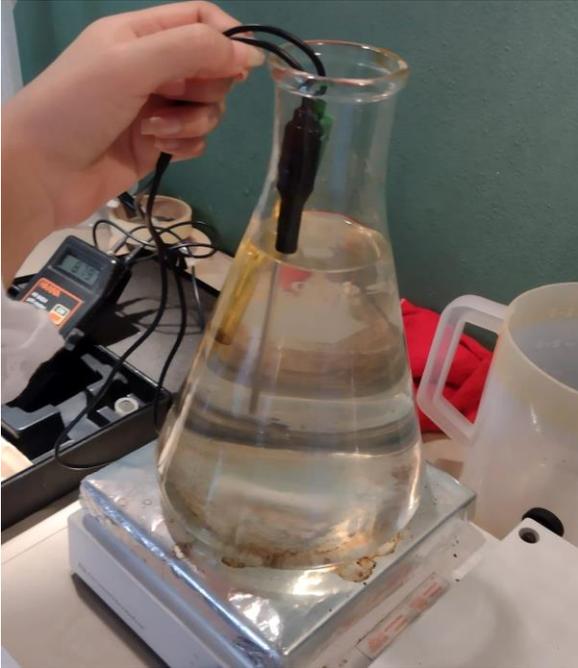


Figura 14. Preparación de medios de cultivo para la siembra de microestacas de *Vanilla planifolia*.

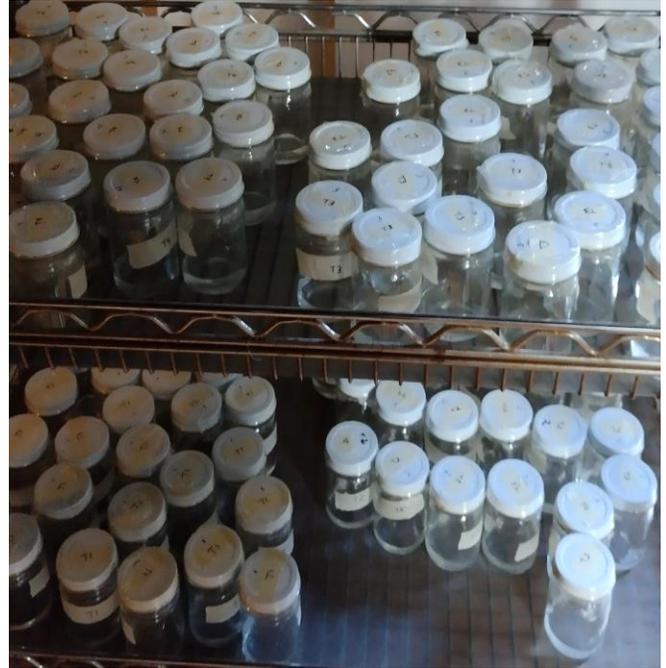


Figura 15. Frascos con 20 ml de medio MS al 75 %, con retardantes de crecimiento (ABA, CCC y ABA/CCC).



Figura 16. Autoclave para esterilización de medios.

## 6.4. CONSERVACIÓN *IN VITRO* A MEDIANO PLAZO

Posteriormente las microestacas fueron transferidas asépticamente a los frascos de vidrio de forma aleatoria (una microestaca por frasco) con medio de cultivo modificado (con ABA, CCC o ambos) (Figura 17) estéril. Los tratamientos experimentales y el control estuvieron bajo condiciones de incubación por 200 días a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, un ciclo de fotoperiodo de 16/8 h y una intensidad lumínica de 2000 lux (Figura 18).

## 6.5. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES

Al cumplir el periodo de incubación se midió la longitud total de las plántulas, longitud de la raíz mayor y longitud de la hoja mayor, con un vernier digital marca Stainless Hardened (Figura 19). Se contabilizó el número de brotes, número de raíces, número de hojas y porcentaje de supervivencia.



Figura 17. Siembra de una microestaca de *Vanilla planifolia* por frasco.



Figura 18. Cuarto de crecimiento, bajo condiciones controladas.



Figura 19. Medición de las variables evaluadas, con un vernier digital.

## 6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó un diseño completamente al azar con 25 explantes por tratamiento, un explante (microestaca) por unidad experimental, teniendo un total de 375 unidades experimentales, 14 tratamientos y control.

Se realizaron pruebas exploratorias, se obtuvo la mediana, media y desviación estándar. Los datos obtenidos se pusieron a prueba bajo los supuestos de normalidad (Shapiro Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene); dichos supuestos no se cumplieron ( $p < 0.05$ ), por lo que se transformaron los datos mediante la  $(\sqrt{X + 1})$ ; sin embargo, no se logró obtener normalidad y homogeneidad de varianza, por lo tanto, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis usando medianas para la comparación estadística entre grupos, al obtener diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se llevó a cabo la prueba *post hoc* de Dunn, para saber entre qué grupos hay diferencia. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico R versión (4.1.1).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. INTERACCIÓN DE LOS RETARDANTES DE CRECIMIENTO ABA Y CCC EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia* Andrews

#### 7.1.1. Efecto de los retardantes de crecimiento en el fenotipo de las plántulas de vainilla

Respecto a la interacción de las combinaciones de ABA/CCC, los tratamientos aplicados y evaluados no tuvieron efecto negativo en el fenotipo de las plántulas, puesto que sus estructuras (tallo, hojas, raíces y brotes) se desarrollaron de manera normal y sin alteraciones en su coloración (Figura 20).

Los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones: al respecto Bello-Bello *et al.* (2015), al emplear 1, 2 y 3 mg/l de ABA, no encontraron anomalías fenotípicas en las plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks). Por su parte, Barrueto y Carvalho (2008) reportaron que al conservar yemas axilares nodales de yuca (*Manihot esculenta* Grantz) con 20 y 30  $\mu$ M de ABA, obtuvieron una completa dormancia de yemas, sin afectar su desarrollo y posterior conversión en plántulas. Mientras que, Yun-peng *et al.* (2012), mencionan que las plántulas de dos especies de lirios (*Lilium davidii* Duch. ex Elwes y *Lilium longiflorum* Thunb.), conservadas durante 15 meses con 3 mg/l de ABA y subcultivadas en un medio sin ABA durante un mes, no mostraron afectaciones en su morfología.

Por el contrario, Alcántara *et al.* (2019), señalan que altos niveles de ácido abscísico pueden inducir un mal desarrollo en la planta y, como efecto secundario, puede reducirse la transpiración vegetal por medio de la regulación de las estomas estableciendo desequilibrio osmótico, lo que lleva a un nivel de turgencia impar a nivel celular.



Figura 20. Efecto de concentraciones de dos retardantes de crecimiento, sobre la conservación *in vitro* de *Vanilla planifolia* Andrews. Concentraciones de izquierda a derecha: A) ácido abscísico (ABA) a 0, 1.5 y 3 mg/l, B) cloruro de cloromequat (CCC) a 0, 1, 2, 4 y 6 mg/l y C) su combinación (ABA/CCC) a 1.5: 1.0, 1.5: 2.0, 1.5: 4.0, 1.5: 6.0, 3.0: 1.0, 3.0: 2.0, 3.0: 4.0 y 3.0: 6.0 mg/l a 200 días de cultivo.

### 7.1.2. Efecto de los retardantes de crecimiento en la longitud total de las plántulas de *V. planifolia*

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ , prueba de Kruskal Wallis), al comparar las medianas de la longitud total de las plántulas. Respecto a la prueba de Dunn, presento diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), entre las medianas del tratamiento que contenía 1.5 con las de 3 mg/l ABA, mientras que con CCC se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a concentraciones de 4 y 6 mg/l, por último, presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) a partir del tratamiento adicionado con 1.5: 4.0 mg/l de ABA/CCC (Cuadro 3). Además, se obtuvo que las plántulas del tratamiento con 3.0:6.0 mg/l de ABA/CCC (T 14), presentaron el mayor

efecto inhibitor sobre su crecimiento, obteniendo el promedio más bajo ( $0.30 \pm 0.34$  cm); sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p=1.0$ , prueba de Dunn), con el tratamiento (T 12), adicionado con 3.0: 2.0 mg/l ( $0.40 \pm 0.38$  cm) y T 13 a 3.0: 4.0 mg/l ( $0.35 \pm 0.46$  cm); mientras que el control reflejo el promedio más alto ( $3.44 \pm 1.38$  cm) (Cuadro 3 y Figura 21).

Coincidiendo con Bello-Bello *et al.* (2015), quienes encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, al evaluar el uso de 1, 2 y 3 mg/l de ABA. Además, refieren que, con 3 mg/l de ABA obtuvieron el promedio más bajo ( $1.3 \pm 0.12$ ) y difiriendo con Yun-peng *et al.* (2012), puesto que reportaron que las plántulas de lirios (*Lilium longiflorum*), después de seis meses de almacenamiento a  $-2^{\circ}\text{C}$ , no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos adicionados con 1 y 3 mg/l de ABA, sin embargo sus resultados son similares a los obtenidos en esta investigación, debido a que al evaluar la especie *L. davidii*, encontraron que los efectos fueron significativos, al añadir diferentes concentraciones de ABA y medio nutritivo, además, determinaron que el medio de conservación con mayor efecto inhibitor sobre el crecimiento en altura de las dos especies de lirios fue 1/4 de medio MS con 3 mg/l de ABA, reflejando los promedios más bajo ( $3.5 \pm 0.8$  y  $5.3 \pm 1.0$ , respectivamente).

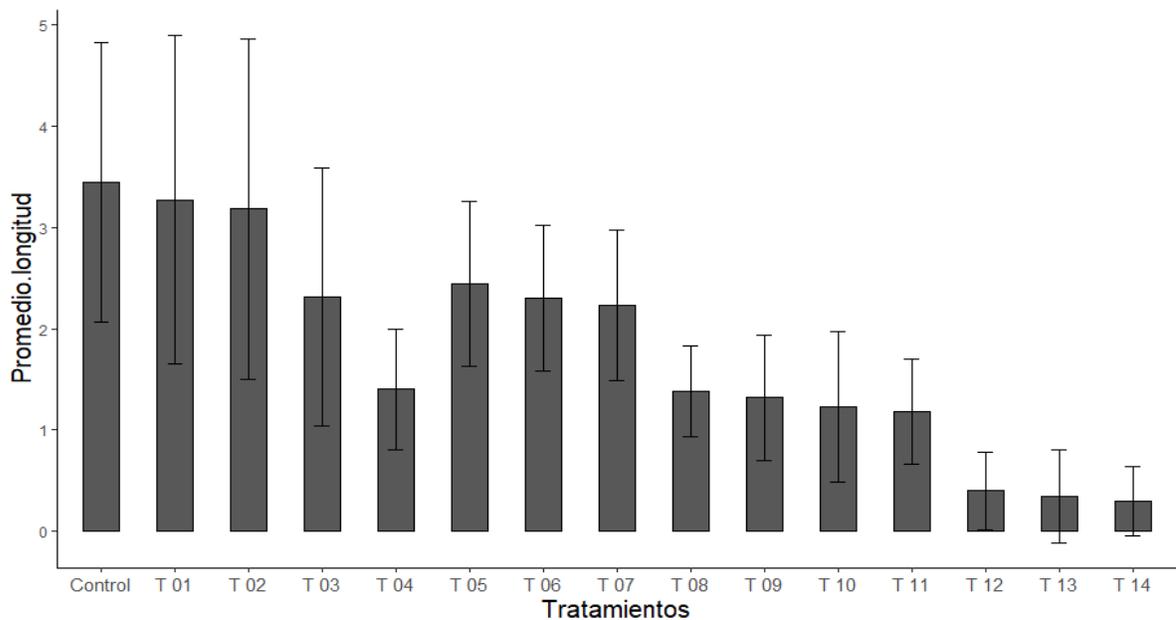


Figura 21. Promedio de la longitud total (cm) de las plántulas con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.

### 7.1.3. Efecto de los retardantes de crecimiento en la longitud de la raíz mayor

Al aplicar la prueba Kruskal Wallis, sobre la variable longitud de la raíz mayor, se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Mientras que, con la prueba de Dunn, se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las medianas del tratamiento 1.5 con las de 3 mg/l ABA, además la longitud de la raíz mayor disminuyó a partir de la adicción de 2 mg/l de CCC y a 3.0: 1.0 mg/l de ABA/CCC (Cuadro 3). Reflejando el promedio más bajo ( $1.51 \pm 0.84$ ) a 3.0:6.0 mg/l de ABA/CCC (T 14), sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p=1.0$ , prueba de Dunn) con el tratamiento (T 12), que contenía 3.0: 2.0 mg/l ( $1.54 \pm 0.67$ ); mientras que el promedio más alto se obtuvo en el control ( $4.72 \pm 1.15$ ) (Cuadro 3 y Figura 22).

Siendo similar a lo reportado por Bello-Bello *et al.* (2015), quienes encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, al evaluar el uso de 1, 2 y 3 mg/l de ABA, sobre la longitud de la raíz, obteniendo el promedio más bajo ( $1.9 \pm 0.17$ ), al usar 3 mg/l de ABA.

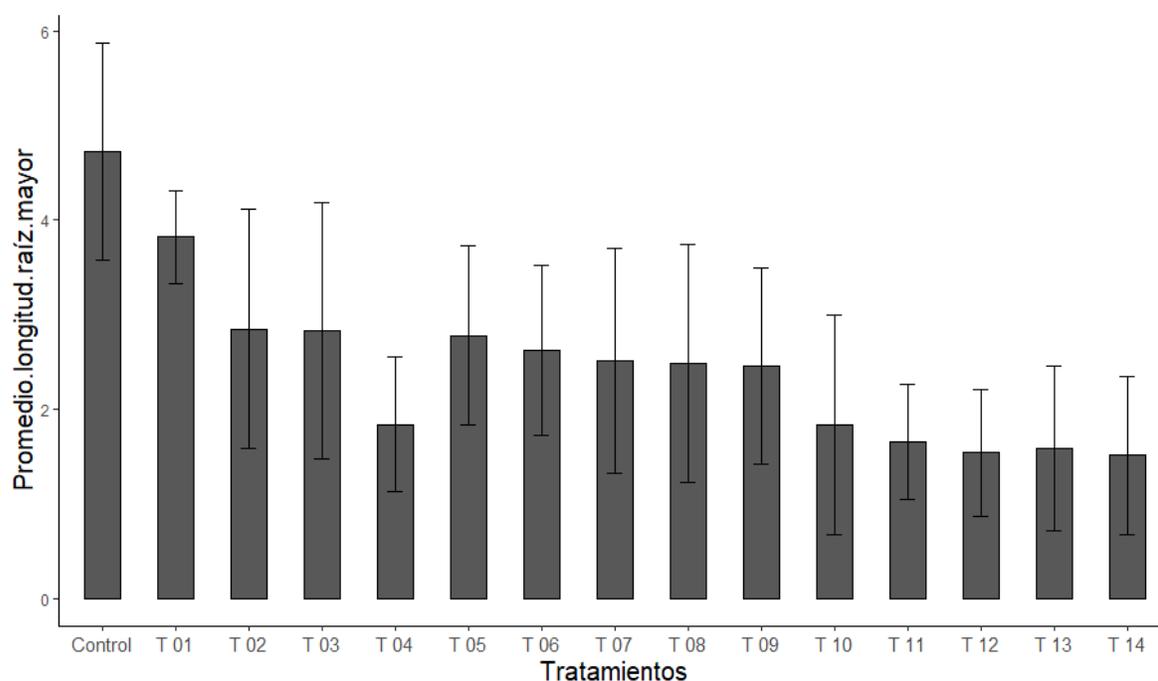


Figura 22. Promedio de la longitud de la raíz mayor (cm), con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.

#### 7.1.4. Efecto de los retardantes de crecimiento en la longitud de la hoja mayor

Al evaluar la variable longitud de la hoja mayor, se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis). La prueba de Dunn mostro diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), en las concentraciones 1.5 con las de 3 mg/l de ABA, mientras que en el caso del retardante de crecimiento CCC, se determinó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) a 6 mg/l y a partir del tratamiento 3.0:1.0 mg/l de ABA/CCC (Cuadro 3). Por otra parte, el promedio más bajo ( $0.48 \pm 0.37$ ) se presentó a 3.0:6.0 mg/l de ABA/CCC (T 14) y el más alto se obtuvo en el control ( $1.23 \pm 0.44$ ) (Cuadro 3 y Figura 23).

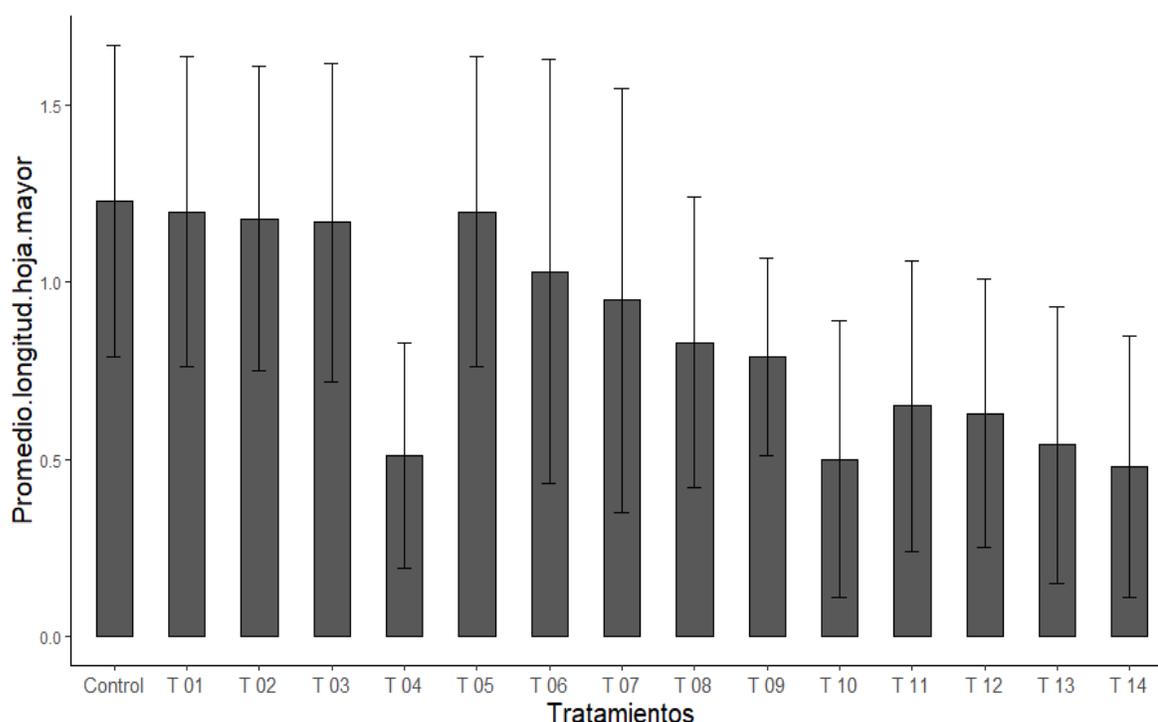


Figura 23. Promedio de la longitud de la hoja mayor (cm), con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.

Por lo tanto, la interacción de ácido abscísico y cloruro de cloromequat a 3.0: 2.0, 3.0: 4.0 y 3.0: 6.0 mg/l, presentó un efecto sinérgico, sobre la longitud total de las plántulas, la longitud de la raíz mayor y hoja mayor, de la especie *Vanilla planifolia*. Por lo que puede ser considerado como una buena alternativa de conservación a mediano

plazo, que permite aumentar los intervalos entre subcultivos, con un costo monetario menor, debido a que el CCC y ABA tiene un valor en el mercado de \$1,000.00 y \$1899.00 pesos mexicanos respectivamente, a comparación del método de conservación a corto plazo, el cual implica un crecimiento a tasas normales, mantenimiento constante, más horas de trabajo, reactivos y una mayor propensión a accidentes o contaminaciones (Bonilla *et al.*, 2015), debido a que los subcultivos se realizan cada 30 días (Miceli-Méndez, 2021 y Medina, 2017).

Al respecto, Bañón-Arias y Martínez-López (2010) y Cossio (2013), mencionan que el efecto de la interacción de diferentes concentraciones de retardantes de crecimiento aplicadas simultáneamente, se clasifica por su acción, de la siguiente manera: sinergismo, que hace referencia cuando la acción de una determinada sustancia se ve favorecida por la presencia de otra, al contrario, el antagonismo se da cuando la presencia de una sustancia evita la acción de otra o un balance de concentración (la acción de una determinada sustancia depende de la concentración de otra).

Además, cuando resulta un sinergismo, este puede ser aprovechado para reducir la dosis empleada de cada uno de los retardantes de crecimiento o reguladores de crecimiento, el efecto dañino a altas concentraciones de alguno de estos, además de los costos. La utilización de dos compuestos con distinto mecanismo de acción o que afecten a dos etapas distintas de la biosíntesis de las giberelinas puede mejorar la eficacia (Bañón-Arias y Martínez-López, 2010 y Cossio, 2013).

Citando como ejemplo, la aplicación conjunta de clormecuat y daminozida presentaron un efecto sinérgico en *Poinsettia (Euphorbia pulcherrima)*; así, se ajusta la dosis del primer compuesto para que no cause fitotoxicidad, y se aumenta el nivel de eficacia con el aumento del segundo. Las mezclas de daminozida-paclobutrazol y etefón-prohexadiona han producido efectos sinérgicos en cultivos de *Begonias (Begonia semperflorens)*. Además, Rivera-Calderón *et al.* (2008), encontraron un efecto sinérgico entre dos inductores de tuberización (BAP/CCC), al obtener las producciones más altas de microtubérculos, al emplear las siguientes concentraciones: 10:500, 5.0:500 y 8.0:800 mg/l de BAP/CCC.

## 7.2. EFECTO DEL ABA Y CCC EN LA ORGANOGÉNESIS DE LAS MICROESTACAS DE VAINILLA

### 7.2.1. Efecto de los retardantes de crecimiento en el número de brotes

Al realizar la prueba de Kruskal Wallis, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), al comparar las medianas del número de brotes. Se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ , prueba de Dunn) entre las medianas del tratamiento adicionado con 1.5 con las de 3 mg/l ABA, respecto a CCC, se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ , prueba de Dunn) a partir de la concentración 2 mg/l y a 3.0: 2.0 mg/l de ABA/CCC (Cuadro 3). La formación de nuevos brotes fue más alta, sin la adición de retardantes de crecimiento (control), obteniendo un promedio de  $3.67 \pm 0.57$ , mientras que el promedio más bajo ( $0.27 \pm 0.46$ ) se presentó a 3.0:6.0 mg/l de ABA/CCC (T14), es decir la adicción de ambos retardantes de crecimiento, fue eficaz para inhibir la formación de brotes. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p=1.0$ , prueba de Dunn), con el tratamiento (T 12), adicionado con 3.0: 2.0 mg/l ( $0.40 \pm 0.38$  cm) y T 13 a 3.0: 4.0 mg/l ( $0.35 \pm 0.46$  cm) (Cuadro 3 y Figura 24).

Al respecto, Da Silva y Scherwinski-Pereira (2011), observaron una tendencia lineal de disminución de los valores respecto a la longitud de los brotes y número de yemas por brote de pimienta (*Piper aduncum* L.), al aumentar las concentraciones de ABA de 1 a 3 mg/l. En el caso de la pimienta larga (*Piper hispidinervum* Kunth.), al usar 1 y 2 mg/l de ABA, no encontraron un efecto inhibitorio significativo, sobre la longitud de los brotes y las yemas por brote, obteniendo un promedio de 13 cm y 10 yemas. Sin embargo, al añadir 3 mg/l de ABA, obtuvieron un promedio más bajo de 8.8 cm de longitud y 6.8 yemas por brotes.

Por otra parte, el uso de cloruro de cloromequat (CCC), ha sido documentado por Rivera-Calderón *et al.* (2008), quienes señalan que la adición de 10:500 mg/l de BAP/CCC al medio de cultivo (MS al 100 %), es capaz de inducir la más alta producción de microtubérculos de papa, con un promedio de 9.08, considerando este método una estrategia alterna, para la conservación del germoplasma de papa. Por su parte,

Hussain *et al.* (2006), reportaron que el empleo de medio de cultivo Murashige & Skoog, adicionado con 200 mg/l de CCC promovieron la inducción máxima de tubérculos (16.5 tubérculos/frasco).

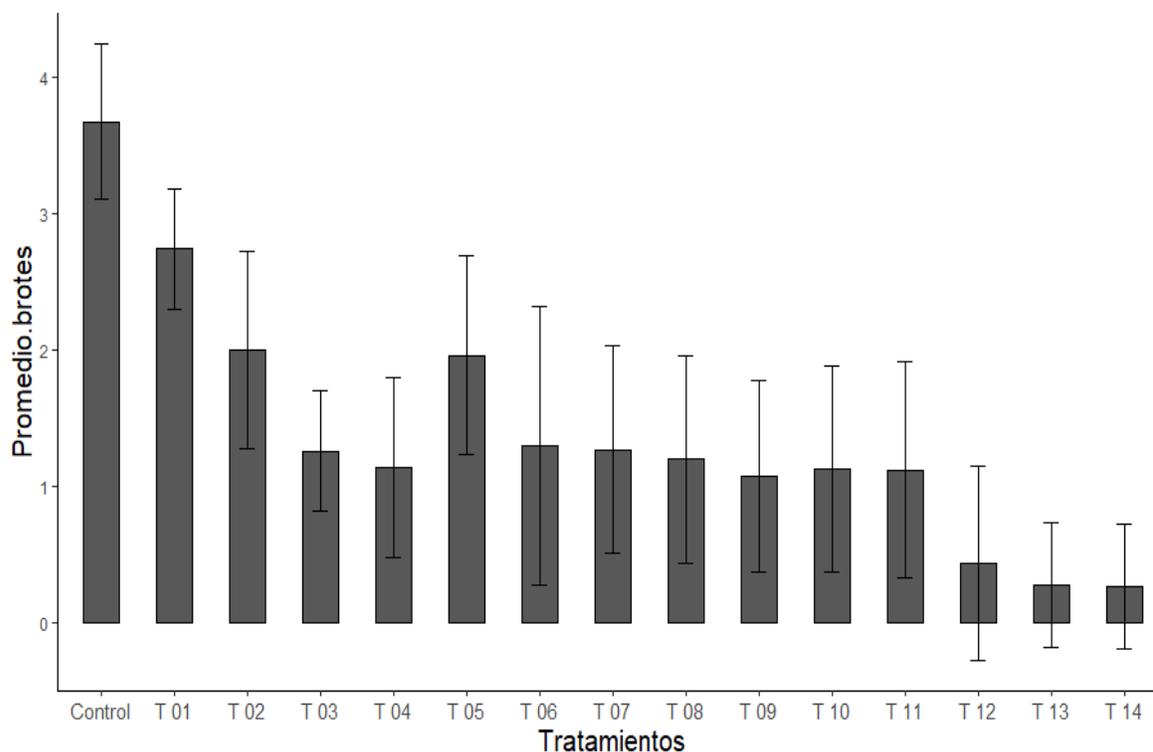


Figura 24. Promedio del número de brotes con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.

### 7.2.2. Efecto de los retardantes de crecimiento en el número de raíces

La prueba de Kruskal Wallis indico que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Mientras que, al aplicar la prueba de Dunn, se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las medianas del tratamiento 1.5 con las de 3 mg/l ABA, en las concentraciones 4 y 6 mg/l de CCC y a partir del tratamiento 3.0: 1.0 mg/l (Cuadro 3). Además, el control presento el número de raíces más alto, con un promedio de  $5.24 \pm 1.37$ , mientras que en el tratamiento 14 se obtuvo el promedio más bajo ( $1.50 \pm 0.78$ ) (Cuadro 3 y Figura 25).

Por su parte, Páez y González (2001), al conservar de manera *in vitro* papa (*Solanum tuberosum* L) variedad Patrones, observaron diferencias significativas entre los tratamientos al evaluar el número de raíces. Además, al añadir al medio de cultivo Murashige & Skoog retardantes de crecimiento (1.5 mg/l de ABA y 1.5 mg/l de CCC) y 2 % de Sacarosa, obtuvieron el promedio de desarrollo de raíces más bajo (1.15).

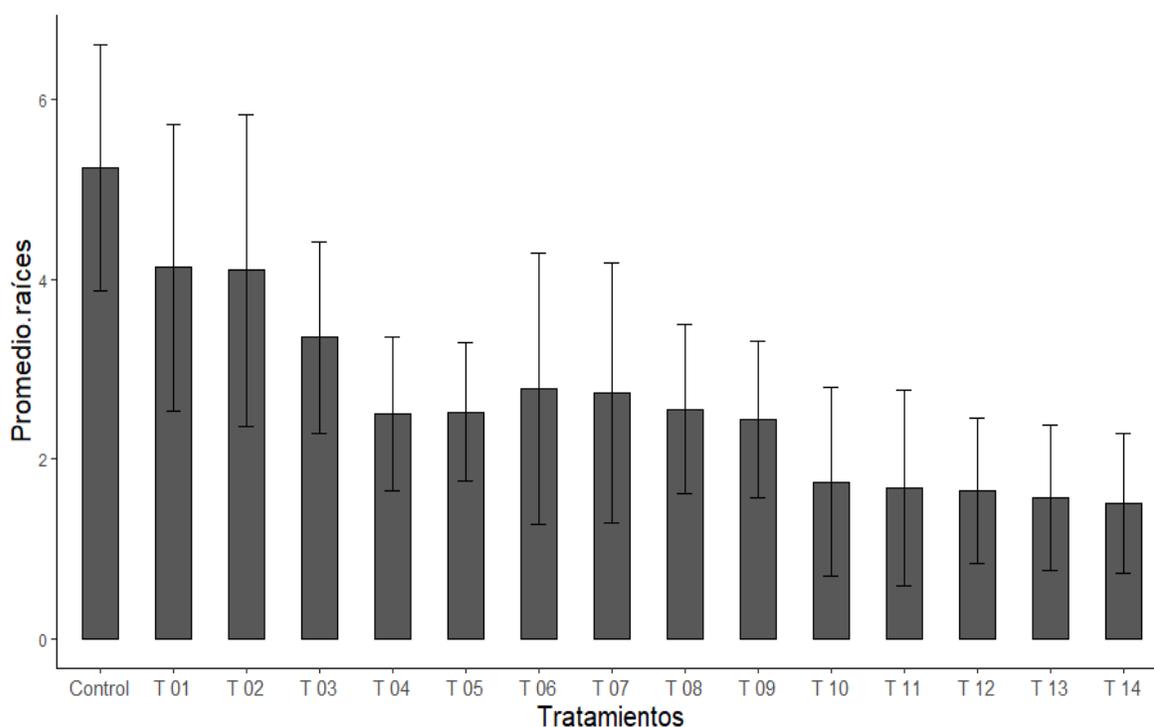


Figura 25. Promedio del número de raíces con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.

### 7.2.3. Efecto de los retardantes de crecimiento en el número de hojas

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis), al comparar las medianas del número de hojas (Cuadro). Al realizar la prueba de Dunn se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los tratamientos adicionados con 1.5 y 3.0 mg/l ABA, en cuanto al retardante CCC, se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a 4 y 6 mg/l y a partir del tratamiento con 1.5: 6.0 mg/l de ABA/CCC (Cuadro 3). La formación de hojas fue más alta, sin la adición de retardantes de crecimiento (control), obteniendo un promedio de  $5.52 \pm 2.77$ , mientras

que el promedio más bajo ( $1.83 \pm 0.61$ ), se presentó a 3.0:6.0 mg/l de ABA/CCC (T14) (Cuadro 3 y Figura 26).

Siendo similar a lo reportado por Bello-Bello *et al.* (2014), en el estudio realizado sobre la conservación *in vitro* de caña de azúcar, donde encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, adicionados con 1, 2 y 3 mg/l de ABA. Además, obtuvieron el promedio más bajo ( $2.5 \pm 0.24$ ) de la variable número de hojas, al emplear 3 mg/l de ABA.

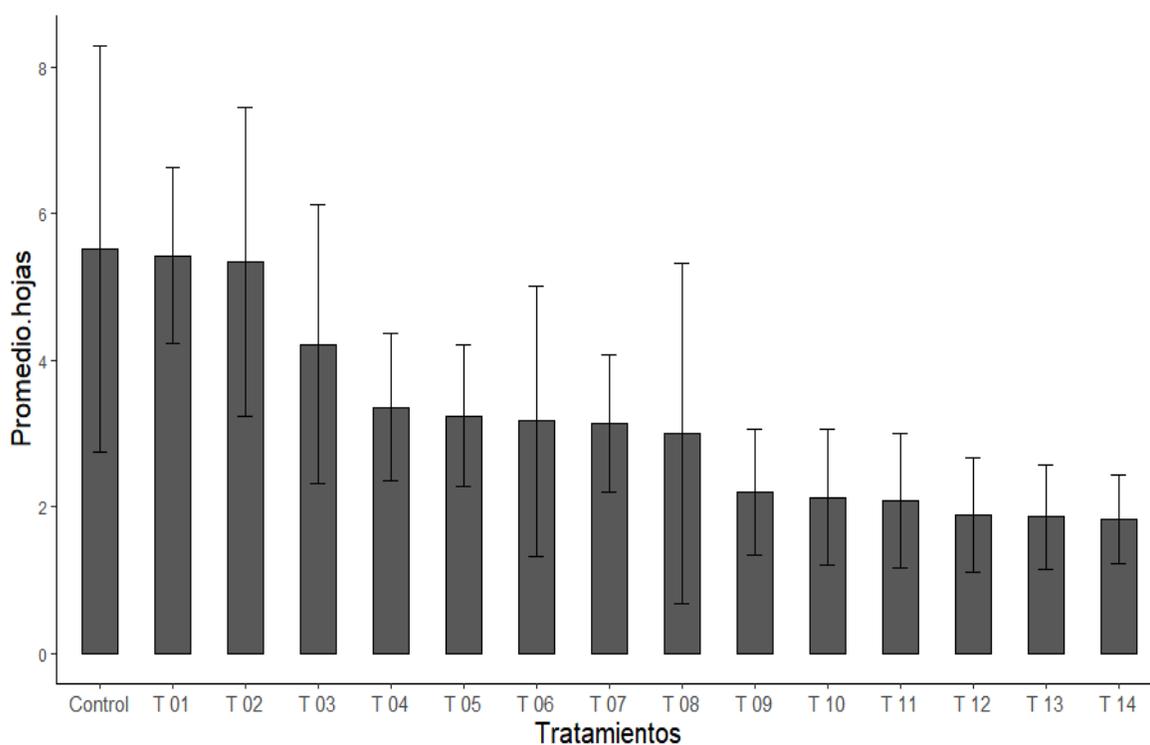


Figura 26. Promedio del número de hojas con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.

Cuadro 3. Efecto de la interacción de diferentes concentraciones de ABA y CCC en la morfogénesis de *Vanilla planifolia* Andrews

Tratamientos	mg/l	Longitud total (cm)		Brotes		Hojas		Raíces		Longitud de la raíz mayor (cm)		Longitud de la hoja mayor (cm)		Supervivencia	
		Mediana	Media	Mediana	Media	Mediana	Media	Mediana	Media	Mediana	Media	Mediana	Media		
Control	0.0: 0.0	3.0 a	3.44 ± 1.38	4.0 a	3.67 ± 0.57	5.0 a	5.52 ± 2.77	5.0 a	5.24 ± 1.37	5.0 a	4.72 ± 1.15	1.0 a	1.23 ± 0.44	84	
CCC	T01	1	3.0 a	3.27 ± 1.62	3.0 b	2.74 ± 0.44	5.0 a	5.43 ± 1.20	4.0 b	4.13 ± 1.60	4.0 b	3.82 ± 0.49	1.0 a	1.20 ± 0.44	92
	T02	2	3.0 a	3.18 ± 1.68	2.0 c	2.0 ± 0.72	5.0 a	5.35 ± 2.11	4.0 b	4.10 ± 1.74	3.0 c	2.85 ± 1.26	1.0 a	1.18 ± 0.43	80
	T03	4	2.0 b	2.31 ± 1.27	1.0 d	1.26 ± 0.44	4.0 b	4.22 ± 1.91	3.0 c	3.35 ± 1.07	3.0 c	2.83 ± 1.35	1.0 a	1.17 ± 0.45	92
	T04	6	1.0 c	1.40 ± 0.60	1.0 d	1.14 ± 0.66	3.0 c	3.36 ± 1.01	2.0 d	2.50 ± 0.85	2.0 d	1.84 ± 0.71	0.5 b	0.51 ± 0.32	56
ABA	T05	1.5	2.0 b	2.44 ± 0.81	2.0 c	1.96 ± 0.73	3.0 c	3.24 ± 0.97	2.0 d	2.52 ± 0.77	3.0 c	2.78 ± 0.95	1.0 a	1.20 ± 0.44	100
	T10	3	1.0 c	1.23 ± 0.74	1.0 d	1.13 ± 0.75	2.0 d	2.13 ± 0.92	1.0 e	1.74 ± 1.05	1.9 d	1.84 ± 1.16	0.5 b	0.50 ± 0.39	92
ABA/CCC	T06	1.5: 1.0	2.0 b	2.30 ± 0.72	1.0 d	1.30 ± 1.02	3.0 c	3.17 ± 1.85	2.0 d	2.78 ± 1.51	3.0 c	2.62 ± 0.90	1.0 a	1.03 ± 0.60	92
	T07	1.5: 2.0	2.0 b	2.23 ± 0.74	1.0 d	1.27 ± 0.76	3.0 c	3.14 ± 0.94	2.0 d	2.73 ± 1.45	2.95 c	2.51 ± 1.19	1.0 a	0.95 ± 0.60	88
	T08	1.5: 4.0	1.0 c	1.38 ± 0.45	1.0 d	1.20 ± 0.76	3.0 c	3.0 ± 2.32	2.0 d	2.55 ± 0.94	3.0 c	2.48 ± 1.26	1.0 a	0.83 ± 0.41	80
	T09	1.5: 6.0	1.0 c	1.32 ± 0.62	1.0 d	1.08 ± 0.70	2.0 d	2.20 ± 0.86	2.0 d	2.44 ± 0.87	3.0 c	2.46 ± 1.04	0.9 a	0.79 ± 0.28	100
	T11	3.0: 1.0	1.0 c	1.18 ± 0.52	1.0 d	1.12 ± 0.79	2.0 d	2.08 ± 0.92	1.0 e	1.67 ± 1.09	2.0 d	1.65 ± 0.61	0.6 b	0.65 ± 0.41	96
	T12	3.0: 2.0	0.3 d	0.40 ± 0.38	0 e	0.44 ± 0.71	2.0 d	1.88 ± 0.78	1.0 e	1.64 ± 0.81	2.0 d	1.54 ± 0.67	0.6 b	0.63 ± 0.38	100
	T13	3.0: 4.0	0.2 d	0.35 ± 0.46	0 e	0.28 ± 0.46	2.0 d	1.86 ± 0.72	1.0 e	1.57 ± 0.81	2.0 d	1.58 ± 0.87	0.5 b	0.54 ± 0.39	84
	T14	3.0: 6.0	0.25 d	0.30 ± 0.34	0 e	0.27 ± 0.46	2.0 d	1.83 ± 0.61	1.0 e	1.50 ± 0.78	2.0 d	1.51 ± 0.84	0.5 b	0.48 ± 0.37	72

Datos obtenidos a 200 días de cultivo, n = 25. Las medianas con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (Dunn,  $p < 0.05$ ), además los datos representan las medias ± SD (desviación estándar).

### 7. 3. PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE PLÁNTULAS DE VAINILLA BAJO EFECTOS DE RETARDANTES DE CRECIMIENTO DURANTE 200 DÍAS

Los tratamientos adicionados con 1.5 mg/l de ABA (T 05), 1.5: 6.0 mg/l (T 09) y 3.0: 2.0 mg/l (T 12) de ABA/CCC, reflejaron el porcentaje de supervivencia más alto de 100 % respectivamente, seguido por el tratamiento con 3.0: 1.0 mg/l de ABA/CCC (T 11) con un 96 %. Mientras que, en el tratamiento adicionado con 6 mg/l de CCC (T 04), se obtuvo el porcentaje de supervivencia más bajo con un 56 % (Figura 27 y Cuadro 3).

Los resultados obtenidos, coinciden con lo reportado por los siguientes autores: Bello-Bello *et al.* (2015), en el estudio sobre la conservación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia*), refieren que con 1, 2 y 3 mg/l de ABA obtuvieron un porcentaje de supervivencia del 100, 90 y 90 %, respectivamente. Por su parte, Da Silva y Scherwinski-Pereira (2011), en su investigación sobre la conservación *in vitro* de brotes de *Piper aduncum* y *Piper hispidinervum* (pimienta y pimienta larga, respectivamente), reportaron que la supervivencia de los brotes de *P. aduncum*, a 0.5 y 1.0 mg/l de ABA fue del 100 %, mientras que los brotes de *P. hispidinervum*, reflejaron una supervivencia del 100 % al añadir 1 y 2 mg/l de ABA.

Sin embargo, los porcentajes de supervivencias obtenidos al usar 3 mg/l de ABA en esta investigación, son diferentes a los reportados en los siguientes estudios: Da Silva y Scherwinski-Pereira (2011), indican que al usar 3 mg/l de ABA, obtuvieron una supervivencia del 34.5 % de brotes cultivados de *P. hispidinervum*. Al igual que Bello-Bello *et al.* (2014), sobre la conservación *in vitro* de caña de azúcar, puesto que al emplear 3 mg/l de ABA, obtuvieron un efecto negativo sobre la supervivencia que fue de 53 %, siendo paclobutrazol (PAC) el retardante de crecimiento más viable para la conservación de esta especie con un 100 % de supervivencia.

Mientras que Jun-Pan *et al.* (2014), reportaron una supervivencia del 48 % de las microplántulas de uva silvestre china (*Vitis heyneana*), después de 10 meses sin subcultivo, utilizando un área de película respirable con aire (ABFA) de 19.63 mm<sup>2</sup>, 5.0

g/l de CCC y una intensidad de luz baja, siendo estas las condiciones más adecuadas para su conservación a crecimiento lento.

En relación con el porcentaje de supervivencia, se observó que la causa principal de mortalidad de las plántulas de vainilla fue la contaminación de los medios de cultivo. Obteniendo los valores más altos en los tratamientos con 6 mg/l de CCC (T 04) y con 2 mg/l de CCC (T 02) con 24 y 20 % respectivamente (Figura 27), causada por la presencia de hongos (Figura 28), mientras que solo los tratamientos con 1 mg/l de CCC (T 01), 1.5: 2.0 mg/l (T 07), 1.5: 6.0 mg/l (T 09) y 3.0: 2.0 mg/l (T 12) de ABA/CCC, no presentaron contaminación (Figura 27).

Al respecto, Aguilar (2000), Hernández y González (2010) y Bello-Bello (2020), han reportado que la contaminación por microorganismos (hongos y bacterias), es uno de los problemas más graves al micropropagar plantas mediante cultivo *in vitro*, porque afecta los resultados e incluso mata al tejido vegetal cultivado, causada por diversas entradas de contaminantes en las diferentes etapas del proceso, las cuales pueden provenir del material de campo donde la contaminación es propia de la planta, introducciones accidentales al preparar los medios de cultivo o una inadecuada manipulación de los explantes al subcultivar, puesto que en ese momento se abren los frascos y quedan expuestos, sumado a una inadecuada técnica aséptica, aumenta las posibilidades de contaminación, además, los cultivos almacenados por un largo periodo en el cuarto de crecimiento, son más vulnerables a sufrir contaminaciones de hongos.

Además, las plántulas presentaron una segunda causa de mortalidad por fenolización u oscurecimiento del explante (figura 29). Los tratamientos adicionados con 6 mg/l de CCC (T 04) y 3.0: 6.0 mg/l de ABA/CCC (T 14), presentaron los valores más altos de 20 y 16 % respectivamente. Por su parte, Azofeifa (2009), menciona que la fenolización es la oxidación, provocada por radicales libres y compuestos fenólicos, que ocasionan el oscurecimiento del tejido vegetal o el medio de cultivo, causando la muerte del explante. Siendo un problema que ocurre frecuentemente al realizar la técnica de cultivo *in vitro*, debido a diversas causas: al efecto corrosivo producido por las sustancias usadas para desinfectar los explantes, los cortes realizados al tejido

vegetal durante su selección, la composición y la cantidad del medio de cultivo seleccionado, además de la calidad del frasco a emplear.

Concordando con los resultados reportados por Tejada-Alvarado *et al.* (2022), quienes mencionan que los segmentos nodales de bambú (*Guadua angustifolia*), desarrollaron brotes a los siete días de su cultivo *in vitro*. Sin embargo, el medio de cultivo presento pardeamiento y oscurecimiento ocasionado por los fenoles liberados por los explantes, afectando su viabilidad y provocando su posterior muerte. Por su parte, Rodríguez-Layza *et al.* (2021), observaron fenolización de los microesquejes de café (*Coffea arabica* Var. Caturra Rojo), cultivados *in vitro*.

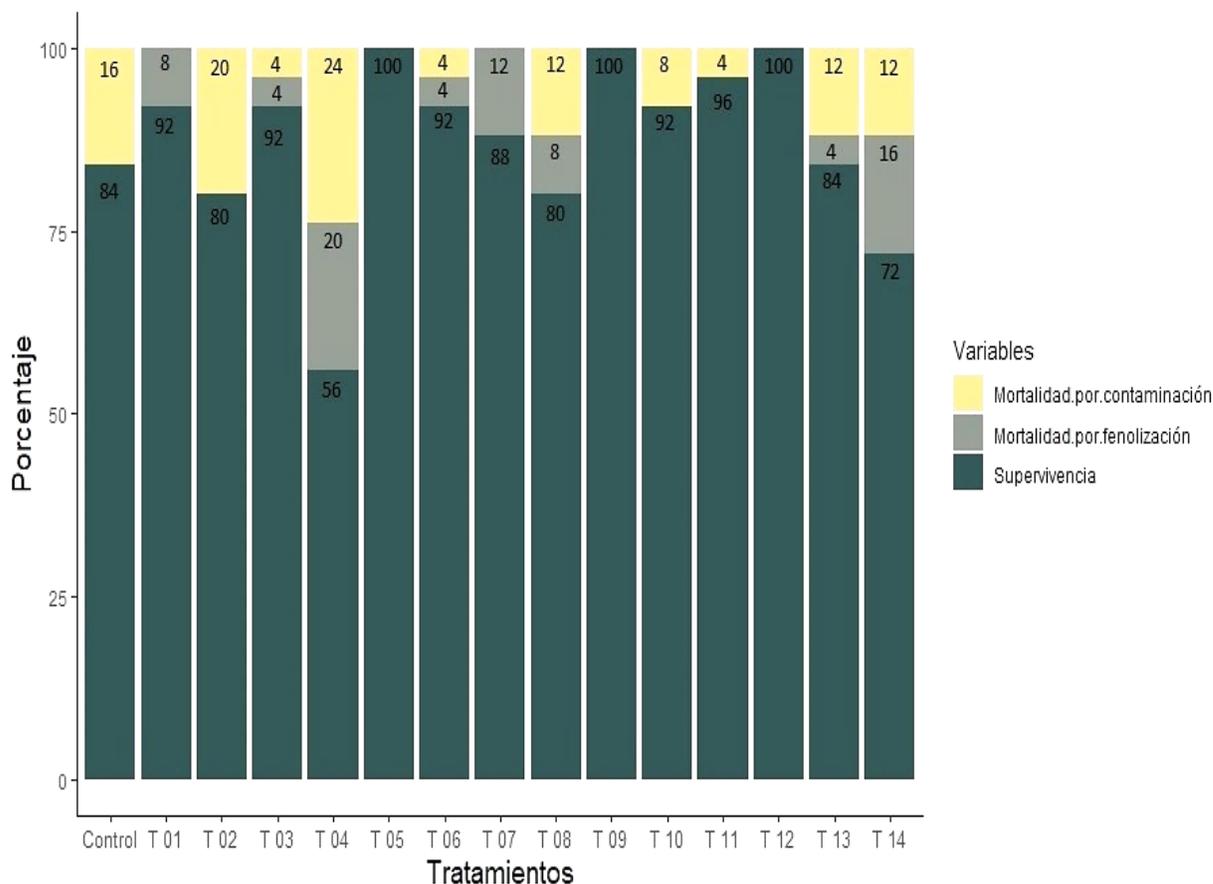


Figura 27. Porcentaje de supervivencia y mortalidad de plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia*) con los diferentes tratamientos: ABA/CCC mg/l, a 200 días de cultivo.



Figura 28. Plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia*) muertas por la contaminación de hongos en el medio de cultivo.



Figura 29. Plántulas de *Vanilla planifolia*, cultivadas *in vitro*, muertas por fenolización.

## VIII. CONCLUSIONES

- La técnica de crecimiento reducido, empleando diferentes concentraciones de los retardantes de crecimiento ácido abscísico y cloruro de cloromequat, no reflejó un efecto negativo en el fenotipo de las plántulas evaluadas. Presentando un efecto sinérgico a 3.0: 2.0, 3.0: 4.0 y 3.0: 6.0 mg/l (T 12, T 13 y T14 respectivamente), que permitió la conservación *in vitro* a mediano plazo de la especie *Vanilla planifolia* Andrews.
- Las combinaciones de ABA y CCC a 3.0: 2.0, 3.0: 4.0 y 3.0: 6.0 mg/l, mostraron un efecto significativo ( $p < 0.05$ , prueba de Dunn), sobre la longitud total de las plántulas, longitud de la raíz mayor y longitud de la hoja mayor y la organogénesis (número de brotes, número de hojas y número de raíces), reflejado en la obtención de los promedios más bajos a excepción de la variable longitud de la hoja mayor.
- Sin embargo, las plántulas de vainilla del tratamiento (T 12), adicionado con 3.0: 2.0 mg/l de ABA/CCC, tuvieron una supervivencia del 100 %, logrando subcultivos cada 200 días. Por lo tanto, este método, puede considerarse como una estrategia para el establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro* con un costo monetario y energético menor, en comparación con otras técnicas de conservación a corto o largo plazo, que requieren de insumos costosos o no son viables porque afectan el tejido vegetal, causando incluso su muerte.

## IX. RECOMENDACIONES

- Realizar futuras investigaciones con base en el método establecido en este trabajo, tomando en cuenta los tratamientos 12 (3.0: 2.0 mg/l), 13 (3.0: 4.0 mg/l) y 14 (3.0: 6.0 mg/l), los cuales fueron los más efectivos.
- Emplear microestacas o brotes de la misma especie (*Vanilla planifolia* Andrews) u otra especie de orquídea para determinar si puede ser aplicado en otras especies, además de realizar tres repeticiones por tratamiento.
- Extender el periodo de conservación de 200 días a 230 días, así como el uso de otro retardante no empleando hasta el momento en esta especie y para estos fines, puesto que actualmente el ABA no puede ser importado al país.
- Tomar todas las medidas necesarias para que el área de trabajo se encuentre completamente bajo condiciones estériles, para disminuir las posibilidades de contaminación y riesgo de daño o muerte del material vegetal cultivado.

## X. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Aguilar, 2000. Análisis de las fuentes de contaminación en un laboratorio de cultivo de tejidos: Detección y medidas de control. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/1592848>. Consultado el 14 de marzo de 2022.
- Albarrán, J. G., Fuenmayor, F., Fuchs, M., Martínez, G., Rodríguez, A., Manzanilla, E., Díaz, E., León, R. y Torrealba, M. 2011. Estrategias biotecnológicas para la Amusáceas. *Agronomía Tropical*. 61(1): 85-94.
- Alcántara, J. S., Castilla-Pérez, M. G. y Sánchez-Mora, R. M. 2017. Importancia de los cultivos vegetales *In vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*. 71-83.
- Alcántara, J. S., Acero, G. J., Alcántara, J. D. y Sánchez, R. M. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*. 17(32): 109-129.
- Andrade-Díaz, D., Córdoba-Figueroa, M. E., Criollo-Escobar, H. y Lagos-Burbano, T. C. 2013. Evaluación de medios de cultivo para propagación *In vitro* de semillas y explantes de especies silvestres de *Solanum*. *Acta agronómica*. 62(1): 27-36.
- Annapurna, D., Muyeed, A. S. y Viswanath, S. 2015. Morphological and Genetic Diversity Analysis in a Germplasm Bank of *Dendrocalamus Stocksii* (Munro.)- Implications on Conservation. *International Journal of Molecular Ecology and Conservation*. 5(3): 1-8.
- Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J. y Streit, C. 2000. *Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico; guía de 18 cultivos: Vainilla*. Alemania: Naturland e. V. Gräfelfing. 18 p.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175.

- Azofeifa-Bolaños, J. B., Paniagua-Vásquez, A y García-García, J. A. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 25(1): 189-202.
- Bañón-Arias y Martínez-López. 2010. Control del crecimiento y desarrollo de plantas ornamentales. <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/45284-Control-del-crecimiento-y-desarrollo-de-plantas.html>. Consultado el 13 de julio de 2022.
- Barrera-Rodríguez, A. I., Herrera-Cabrera, B. E., Jaramillo-Villanueva, J. L., Escobedo-Garrido, J. S., y Bustamante-González, Á. 2009. Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* A.) bajo naranjo y en malla sombra en el Totonacapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10(2): 199-212.
- Barrueto, L. P. y Carvalho, C. B. 2008. Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of cassava (*Manihot esculentus*). *Chilean Journal of Agricultural Research*. 68(3): 304-308.
- Bello-Bello, J. J., Poot-Poot, W., Iglesias-Andreu, L., Caamal-Velázquez, H. y Diaz-Sanchez, M. 2014. Comparación del efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento en la conservación *in vitro* de caña de azúcar. *Agrociencia*. 48: 439-446.
- Bello-Bello, J. J., Morales-Ramos, V. y Gómez-Merino, F. C. 2014. Conservación de recursos genéticos de Caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agro Productividad*. 7(2): 42-46.
- Bello-Bello, J. J., García-García, G. G. e Iglesias-Andreu, L. 2015. Conservación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 38(2): 165-171.
- Bello-Bello, J. J. 2020. Método para la esterilización de medios de cultivos utilizado en la micropropagación comercial de plantas. <https://www.colpos.mx/wb/hp/notas-informativas/metodo-para-la-esterilización-de-medios-de-cultivos-utilizado-en->

la-micropropagacion-comercial-de-plantas *in vitro*. Consultado el 15 de marzo de 2022.

Benson, E. E., Johnston, J., Muthusamy, J. y Harding, K. 2006. Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. *In: Gupta, DS; Ibaraki, Y. eds. Plant Tissue Culture Engineering. Springer. Holanda. p.441-476.*

Bermúdez, R. A. 2018. Efecto de tres concentraciones de Chlormequat (Cycocel®) en producción de plántulas de lechuga cultivar Tropicana. Tesis Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

Bonilla, M. M., Mancipe, C. y Aguirre, A. C. 2015. Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 6(1): 67-82.*

Bory, S., Grisoni, M., Duval, M. F. y Besse, P. 2008. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution. 55(4): 551-571.*

Cerna, M., Cárdenas, S., Cruz, A. y Jácome, I. 2014. *LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida. 20 (2): 5-19.*

Coro-Arizmendi, M. 2009. La crisis de los polinizadores. CONABIO. *Biodiversitas. 85: 1-5.*

Cossio, L. 2013. Reguladores de crecimiento. <https://exa.unne.edu.ar/Reguladores>. Consultado el 11 de junio de 2022.

Cozzolino, S. y A. Widmer. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution. 20: 487-494.*

Da Silva, T. L. y Scherwinski-Pereira, J. E. 2011. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira. 46 (4): 384-389.*

- Delgadillo, W. 2022. Bancos de Germoplasma: Guardianes de la Seguridad Alimentaria. <https://www.uaeh.edu.mx/gaceta/4/numero38/abril/germoplasma>. Consultado el 10 de julio de 2022.
- Elorza, P., López, M., Hernández, A. D., Olmedo, G., Domínguez, C. y Maruri, J. M. 2007. Efecto del tipo de tutor sobre el contenido de vainillina y clorofila en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) en Tuxpan, Veracruz, México: *Revista UDO Agrícola*. 7.
- Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 47: 5-16.
- Engelmann, F. 2012. Germplasm collection, storage, and conservation. *Plant germplasm*. 255-267.
- Espinosa, A., Hernández, L. S., Paneque, O. G. y Pupo, J. J. 2002. Empleo del ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. *Biotecnología Vegetal*. 2(1): 39-42.
- Félix, 2007. El Cultivo de la Vainilla y sus principales Plagas. Tesis Licenciatura. Departamento de la Ciencias del Suelo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Flórez, V. J. y Pereira, M. F. 2009. El ácido abscísico acelera el desarrollo floral de solidago en días cortos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 62(1): 4835-4841.
- García-Águila, L., de Feria, M. y Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*. 7(2): 67-79.
- Garza, S., Gámez-González, M. A., Zavala-García, H., Cuevas- Hernández, F., Rojas B. y Garcidueñas, M. 2001. Efecto de cuatro fitorreguladores comerciales en el desarrollo y rendimiento del girasol. *Ciencia UANL*. 4(1): 69-75.
- González-Arno, M. T. y Engelmann, F. 2013. Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. Crioconservación de plantas en América

- Latina y el Caribe. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Gopal, J. A. Chamail, D Sarkar. 2002. Slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature. *Potato Research*. 45: 203-213.
- Guo, B., Stiles, A. y Liu, C. 2013. Low-temperature preincubation enhances survival and regeneration of cryopreserved *Saussurea involucrate* Callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 49: 320-325.
- Hassan, N. A., Stino, R. G., Gomaa, A. H. y Al-Mousa, R. M. 2014. *In vitro* medium-term germplasm conservation and genetic stability of grape (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants*. 6: 09-17.
- Hernández, E. E. 2001. Evaluación del efecto de retardadores de crecimiento sobre la producción de pascua *Euphorbia pulcherrima* Willd. Tesis de licenciatura. Universidad Zamorano. Francisco Morazán, Honduras.
- Hernández, Y. y González, M.E. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*. 31(4).
- Hernández, H. J. 2011. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región Sur-Sureste de México: Trópico húmedo 2011. Paquete tecnológico Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Establecimiento y mantenimiento. México: Gobierno Federal, SAGARPA, INIFAP, Vivir Mejor.
- Hernández-Apolinar, M., de la Rosa, Y. G., Yáñez-Ordóñez, O. e Hinojosa-Díaz, I. 2016. Identificación de polinizadores naturales de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad*. 9(S1): 21-24.
- Hussain, I., Chaudhry, Z., Muhammad, A., Asghar, R., Naqvi S. M. y Rashid, H. 2006. Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on *in vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L. CV.Cardinal). *Pakistan Journal of Botany*. 38(2): 275-282.

- Iriondo, J. 2011. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agraria: Producción y protección vegetal*. 16(1): 5-24.
- Jun-Pan, X., Zhang, W. E. y Li, X. 2014. *In vitro* conservation of native Chinese wild grape (*Vitis heyneana* Roem. & Schult) by slow growth culture. *Vitis*. 53(4): 207-214.
- Jordán, M. y Casaretto, J. 2016. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. Fisiología Vegetal En: Squeo, F. A. y Cardemil, L. (Eds.). Universidad de La Serena, La Serena, Chile. Pp. 2-28.
- Kozak, D. 2006. The effect of growth retardants applied *In vitro* on the acclimatization and growth of *Tibouchina urvilleana* cogn. *In vivo*. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 5(1): 65-70.
- Krishnan, P., Decruse, S. y Radha, R. 2011. Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through *in vitro* technology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 47: 110-122.
- Lázaro, A. L., Bariffi, J. H., Belo, G., de Dios M. A. y Etchegoyen, F. 2007. Efectos del Cloromecuato (CCC) en Trigo. Unidad Integrada Balcarce. Argentina.
- Lozano-Rodríguez, M. A., Menchaca-García, R. A., Alanís-Méndez, J. L. y PechCanché, J. M. 2015. Cultivo *in vitro* de yemas axilares de *Vanilla planifolia* Andrews con diferentes citocininas. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan*. 4(6): 1153-1165.
- Lugo-Castillo, A. 2012. Recolección, cultivo y comercio de la vainilla en Veracruz durante el siglo XIX. <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icshu/article/view/874>. Consultado el 02 de septiembre de 2022.
- Martín, R., Chong-Pérez, B., Pérez-Alonso, N. 2015. Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis*. *Bioteología Vegetal*. 15(4): 195-206.

- Masuelli, R. W. y Marfil, C. F. 2011. Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *Journal of Basic and Applied Genetics*. 22(1): 2-8.
- Maturana, P. A. 2012. Efecto de la aplicación foliar de cloruro de cloromequat en algunos parámetros de calidad de varas de *Lilium* híbrido L/A var. Litouwen. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.
- Medina, R. D., Schaller, S. C., Dolce, N. R., y Mroginski, L. A. 2017. Determinación de la eficiencia de la micropropagación de genotipos de mandioca (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) de interés para el Nordeste Argentino. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 52(3): 497-505.
- Mehraj, H., Alam, M., Habiba, S. U. y Shimasaki, K. 2017. Role of chlorocholine chloride on the *in vitro* PLBs organogenesis of Phalaenopsis 'Fmk02010'. Facultad de Agricultura, Universidad de Kochi, Japón. 173.
- Menchaca, G. R. A. y Lozano, R. M. A. 2018. Conservación *ex situ* de un cultivo amenazado: la vainilla. En: Silva-Rivera, E., Martínez-Valdés V., Lascurain, M. y Rodríguez-Luna E. (Coords.). De la recolección a los agroecosistemas soberanía alimentaria y conservación de la biodiversidad. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México. Pp. 253-267.
- Miceli, M. C. L., Miceli, M. A., García-Ruiz, L. J. y Reyes, E. F. J. 2015. Situación actual y horizontes de la vainilla. En: Miceli, M. C. L. y Rivera, V. G. (Coords.). Historia, problemática y horizontes de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). UNICACH. Chiapas, México. Pp. 15-30.
- Normah, M., Choo, W., Yap, L. y Mohamed, Z. 2011. *In vitro* conservation of Malaysian biodiversity-achievements, challenges and future directions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 47:26-36.
- Ortiz, R. 2000. Conservación de células, tejidos y órganos vegetales a bajas temperaturas: Crioconservación. <http://www.hannover2000.net/expo2000hannove/es/tecnologia/proyectos/crioc onservaci on/largo.htm>. Consultado el 25 de abril de 2022.

- Páez, J. y González, R. 2001. Conservación *In Vitro* de Dos Variedades de Papa (*Solanum tuberosum* L) Bajo Condiciones de Crecimiento Mínimo. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 12: 121-129.
- Paniagua-Vázquez, A., Azofeita-Bolaños, B. y García-García, J. A. 2013. Cultivo de la vainilla orgánica en sistemas agroforestales. Serie Claves Metodológicas de la Extensión Universitaria. *Universidad en Dialogo*. 3(2): 31-46.
- Pastelín, M. C. 2018. Evaluación del establecimiento y desarrollo durante la micropropagación y conservación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). Tesis de doctorado. facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Universidad Veracruzana. Orizaba Córdoba, Veracruz.
- Paz Jorge, Fleitas Hugo y Bela Diego. 2017. Efectos del Cloruro de Mepiquat y del Cloromecuato sobre el crecimiento de dos variedades de algodón sembradas en surcos estrechos. Centro Regional Chaco Formosa. Estación Experimental Agropecuaria Sáenz Peña. Argentina.
- Pence, V. 2011. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 47: 176-187.
- Perea, M. 2010. Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*. En: Perea, M. (Eds.). Selección del Explante. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Pp.11-121.
- Pérez-Bernal, M., Delgado, M., Hernández, C. A. y Armas, R. 2008. Organogénesis indirecta a partir de meristemas apicales caulinares de la variedad cubana de arroz reforma. *Cultivos Tropicales*. 29: 23-28.
- Pérez, E., Esparza, M. J. y Pérez, M. E. 2012. Conservación *in vitro* de germoplasma de Agave spp. Bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35(4): 279-287.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Esparza-Araiza M. J. y Pérez-Reyes, M. E. 2012. Conservación *in vitro* de germoplasma de agave spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35 (4): 279-287.

- Pineda, A., Vargas, T. E., Escala, M. y De García, E. 2012. Organogénesis *in vitro* en piña 'española roja' y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro*. 24(3): 175-186.
- Quirós, W., Guevara, A. L., Sánchez, P., Aguilar, M. E., Bonilla, N., Quesada, P., Barrantes, W., Jiménez, M. L., Castro, M., González, M. G. y Noches, L. 2008. Costa Rica, el estado de los recursos fitogenéticos 2008. Segundo informe nacional. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Oficina Nacional de Semillas, Comisión Nacional de Recursos Filogenéticos. Costa Rica. Ed. Columna Artes Gráficas S.A. p. 131.
- Rademacher, W. 2000. Growth retardants: Effects on gibberellins biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 51: 501-531.
- Ramírez, C., Rapidel, B. y Matthey, J. editores. 1999. Reporte XI Congreso Nacional Agronómico, San José, Costa Rica. Principales factores agronómicos restrictivos en el cultivo de la vainilla y su alivio en la zona de Quepos, Costa Rica., San José, Costa Rica.
- Rao, N. K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. 3: 136-145.
- Ray, A. y Bhattacharya, S. 2008. An improved micropropagation of *Eclipta alba* by *in vitro* priming with chlorocholine chloride. *Journal of Plant Biotechnology*. 92: 315-319.
- Rayas, A., Mederos, V., García, M., López, J., Cabrera, M., Ventura, J., Martínez, M., Gutiérrez, V., Álvarez, M. y Bauta, M. 2002. Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. *Biotecnología Vegetal*. 2(4): 249-251.
- Reyes-López, D., González, M. T., Menchaca, R. A., Cruz, M. I., Tovar, A., Kelso, H. A., Barcenas, J. y Pérez, A. 2014. Rescate, conservación, investigación y utilización de la biodiversidad de la vainilla en México.

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/168849/l\\_Seminario\\_Internacional\\_de\\_Vainilla.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/168849/l_Seminario_Internacional_de_Vainilla.pdf). Consultado el 9 de abril de 2021.

- Rivera-Calderón, A. L., Valbuena-Benavides, R. I., Hidalgo-Hidalgo, R. y Moreno-Mendoza, J. D. 2008. Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. *Acta Agronómica (Palmira)*. 57(3): 175-180.
- Rivera, A., Valbuena, R., Hidalgo R. y Moreno, J. 2008. Crioconservación de yemas de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* ssp. andigena mediante desecado de tejidos. *Revista Corpoica*. 9(2): 37-44.
- Rivera, V. G., Moctezuma, R. R., Hernández, C. L. E, Miceli, C. L. 2015. Invertebrados asociados a plantaciones de *Vanilla planifolia* en las Montañas del Norte, Chiapas, México. En: Miceli, M. C. L. y Rivera, V. G. (Coords.). Historia, problemática y horizontes de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). UNICACH. Chiapas, México. Pp. 31-48.
- Rodríguez-Layza, J., Gonzales-Arteaga, J. J., Romero-Rivas, L. C. y Párraga-Quintanilla, A. 2021. Establecimiento *in vitro* de café var. caturra roja a partir de microesquejes. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 5(5): 8132-8148.
- Sánchez-Chiang, N. y Jiménez, V. M. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía mesoamericana*. 20(1): 135-151.
- Sánchez-Chiang, N. y Jiménez, V. M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 21(1): 193-205.
- Sant, R., Panis, B., Taylor, M. y Tyagi, A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta*) accessions. *Journal of Plant Biotechnology*. 92:107-111.
- Shibli, R., Shatnawi, M., Subaih, W. y Ajlouni, M. 2006. *In vitro* conservation and cryoconservation of plant genetic resources: A review. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2(4): 372-382.

- Soengas, P., Cartea, E., Lema, M. y Velasco, P. 2009. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. *Molecular Breeding*. 23(3): 389-395.
- Soto-Arenas, M. A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín AC. Reporte final SNIB-CONABIO proyecto N°. J101.
- Soto-Arenas, M. A. 2003. (generic treatment), en: Orchidoideae (part two), vanilloideae, Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. y Rasmussen, F. N. *Genera Orchidacearum*. 3: 321-334.
- Soto-Arenas, M. A. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. *Biodiversitas*. 66: 1-9.
- Soto, A., M. A. y Solano G. A. R. 2007. Ficha técnica de *Vanilla planifolia*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.
- Soto-Arenas, M. A. 2009. Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla*. Instituto Chinoín, A.C., en: "Generación y recopilación de información de las especies de las que México es centro de origen y diversidad genética". SEMARNAT, CONABIO.
- Soto-Arenas, M. y Dressler, R. L. 2010. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla plumier* ex Miller with a characterization of their region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9(3): 285-354.
- Tavazza, R., Alonso, R., Papacchioli, V. y Pagnotta, L. 2015. A validated slow-growth *in vitro* conservation protocol for globe artichoke germplasm: A cost-effective tool to preserve from wild to elite genotypes. *Scientia Horticulturae*.
- Tejada-Alvarado, J. J., Meléndez-Mori, J. B., Vilca-Valqui, N. C., Huaman-Huaman, E., Oliva-Cruz, S. M. 2022. Efecto de biocidas y consistencia del medio de cultivo

- para el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*. BOSQUE. 43(2): 117-123.
- Uchida, J. Y. 2011. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for *Vanilla* (*Vanilla planifolia*). <https://es.scribd.com/document/98007842/Vanilla-Specialty-Crop>. Consultado el 25 de mayo de 2022.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2. <https://www.iucnredlist.org>. Consultado el 25 de septiembre de 2021.
- Universidad Autónoma del Estado de México. 2015. Cultivo de vainilla (*vanilla planifolia* Jackson). México. 41.
- Villanueva-Viramontes, S. 2017. Estructura genética de *Vanilla planifolia* Andrews silvestre en la península de Yucatán, México: implicaciones para la conservación de la especie. Tesis de Doctorado. Unidad de Recursos Naturales. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán.
- Wang, Y. L., Fan, M. J. y Liaw, S. L. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica*. 46:29-34.
- Wayan-Deswiniyanti, N. y Dwipayani-Lestari, N. K. 2018. *In vitro* paklobutrazol application effects on *Vanda tricolor* orchid. *Simbiosis VI*. (1): 16-19.
- Yun-peng, D., Wen-yuan, L., Ming-fang, Z., Heng-bin, H. y Gui-xia, J. 2012. The establishment of a slow-growth conservation system *in vitro* for two wild lily species. *African Journal of Biotechnology*. 11 (8): 1981-1990.
- Zakaria, M., Hossain, M. M., Khaleque- Mian, M. A., Hossain, T. y Uddin, M. Z. 2008. *In vitro* tuberization of potato influenced by benzyl adenine and chloro choline chloride. *Bangladesh Journal of Agricultural*. 33 (3): 419-425.
- Zheng, R., Wu, Y. y Xia, Y. 2012. Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium* Oriental hybrids

'Sorbonne'. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine y Biotechnology)*. 13 (2): 136-144.

Zhao, M. A., Xhu, Y. Z., Dhital, S. P., Khu, D. M., Song, Y. S., Wang, M. y Lim, H. T. 2005. An efficient cryopreservation procedure for potato (*Solanum tuberosum* L.) utilizing the new ice blocking agent, supercool X1000. *Plant Cell Reports*. 24:477-481.

## XI. ANEXOS

### Anexo 1. Homogeneidad de varianzas (prueba de Levene)

Variable	Levene (Valor "p")
Longitud total de las plántulas	4.994e-08
Número de brotes	0.03664
Número de hojas	9.615e-10
Número de raíces	0.04355
Longitud de la raíz mayor	0.04979
Longitud de la hoja mayor	0.1492

Los valores de  $p$  menores a 0.05, indican que los datos no tienen homogeneidad de varianzas.

### Anexo 2. Normalidad (prueba de Shapiro Wilk)

Variable	Shapiro Wilk (Valor "p")
Longitud total de las plántulas	5.415e-13
Número de brotes	1.351e-14
Número de hojas	1.665e-14
Número de raíces	1.584e-14
Longitud de la raíz mayor	5.497e-06
Longitud de la hoja mayor	1.881e-07

Los valores de  $p$  menores a 0.05, indican que los datos no tienen normalidad.

### Anexo 3. Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Kruskal Wallis (Valor "p")	H0
Longitud total de las plántulas	2.2e-16	Rechazada
Número de brotes	2.2e-16	Rechazada
Número de hojas	2.2e-16	Rechazada
Número de raíces	2.2e-16	Rechazada
Longitud de la raíz mayor	2.2e-16	Rechazada
Longitud de la hoja mayor	1.213e-13	Rechazada

Al ser el valor de "p" significativo (menor a 0.05), se rechaza la hipótesis nula.

## Anexo 4. Cronograma de actividades

2021

CRONOGRAMA													
Actividades	Semestre	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sept	Oct	Nov	Dic
Clases	Primer												
	Segundo												
Avance de manuscrito de tesis.													
Preparación de medios de cultivo.													
Siembra.													
Incubación.													
Curso: Biología de la Conservación.													
Curso: Aplicaciones Multivariadas en Ecología.													
Curso: Bases Ecológicas para la Agricultura Sustentable.													
Análisis de datos preliminares.													
Presentación ante el comité tutorial.													
Coloquio.													
2022		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sept	Oct	Nov	Dic
	Tercer												
Avance de manuscrito de tesis.													
Segundo coloquio													
	Cuarto												
Envío de artículo.													
Documento de tesis final.													