



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN  
MODALIDAD TESINA**

**Título:** “Micropropagación y crioconservación de germoplasma de *Vanilla planifolia* (Orchidaceae)”.

Estudiante: Joel David Romuchewsky

Asesor: Lic. (Dra.) Natalia Raquel Dolce

Año: 2021

### ***Agradecimientos***

En primer lugar, agradecer a Dios por darme la fuerza para no bajar los brazos durante toda la carrera.

En segundo lugar, dar gracias a mis viejos Pablo y Elena que incansablemente lucharon para que pueda terminar la carrera y no me permitieron tener otro pensamiento que no sea llegar a la meta, hicieron todo lo que estuvo a su alcance y más para que nunca me pueda faltar nada.

En tercer lugar, Valeria hoy mi esposa, que desde nuestro primer día y a la distancia estuvo apoyándome en cada cosa que debía realizar y esas charlas por celular de cada día hacia que todo fuera distinto y más aún cuando salía mal en una materia que con sus palabras siempre me cambiaba el ánimo.

En cuarto lugar, a mis hermanas Griselda y Evelin que desde su lugar siempre estuvieron presente en todo tiempo.

En quinto lugar y no menos importantes a mis abuelos hoy tres de ellos no están, pero siempre confiando en su nieto y que iba a llegar a la meta desde el primer día de estudio ya me decían ingeniero asegurando que lo iba a lograr.

También durante la carrera tuve la posibilidad de conocer grandes compañeros y grandes profesores que fueron marcando muchas cosas que hoy las tengo presentes y me van a servir para llevar a cabo durante la vida profesional.

Y por último agradecer a mi directora de tesis Natalia Dolce quien puso todo lo que estuvo a su disposición para poder llevar adelante cada cosa que se necesitaba para poder avanzar con la investigación.

## **Antecedentes**

El género *Vanilla* pertenece a la tribu Ofridia de la familia Orchidaceae, la cual cuenta con más de 800 géneros distribuidos en unas 25.000 especies (Bory *et al.*, 2008). Del género *Vanilla* se conocen alrededor de 110 especies, de las cuales sólo 3 son cultivadas por su importancia comercial (*V. planifolia* Jacks. ex Andrews, *V. tahitensis* J.W. Moore, *V. pompona* Schiede). Según Duval *et al.* (2006), el 95% de la vainilla comercial es obtenido a partir de *V. planifolia*.

*Vanilla planifolia* es una planta de tallo simple y ramificado, cilíndrico, grande, flexible, sustancioso, verde y carnoso; con entrenudos dispuestos en zigzag. Las hojas son de un verde brillante, grandes, suculentas, elípticas, estrechamente lanceoladas; con nervaduras paralelas y oscuras que se vuelven prominentes cuando la hoja se seca. El sistema radical es denso. Presenta raíces subterráneas llamadas trazadores, que se extienden en un radio de 80 cm. También tiene raíces adventicias o crampones opuestas a las hojas (CONCAVAL, s.f), las cuales son carnosas y largas, que la planta utiliza para adherirse al tutor y nutrirse a través del velamen. Las flores están dispuestas en racimos que salen de las axilas de las hojas, con 20 o más flores amarillo verdosas y poco visibles, con eje corto y suculento; son de poca duración (1-2 días como máximo). El fruto es una vaina casi cilíndrica y el conjunto de vainas sobre una misma inflorescencia se llama pezón. Las semillas son diminutas, carecen de endosperma; son fértiles solo si son producto de polinización natural (Asociación Costarricense de Orquideología, 2000).

La vainilla es un cultivo de exportación pues a partir de sus frutos se obtiene la vainillina, considerada hoy el saborizante natural de mayor importancia en el ámbito mundial. Se usa en la industria alimenticia, refresquera, licorera, farmacéutica, de perfumería y cosméticos, y en menor cantidad en la industria tabacalera y de artesanías (González, 2003). Las industrias de productos lácteos, helados, bombones, dulces, pasteles y perfumes, son las más consumidoras de vainilla en su forma natural como extracto o esencia, o dispersa en una base de azúcar de dextrosa (González, 2003). Es la única especie de las orquídeas que produce frutos comestibles (Asociación Naturland, 2000).

*Vanilla planifolia* es una orquídea originaria de las regiones húmedas tropicales de México y América Central, pero también se encuentra en forma silvestre en los bosques de América del Sur (Soto, 1999). Esta planta se cultiva en países como Madagascar, Indonesia, Tahiti, Filipinas, Haití, Uganda y en menor cantidad en México y Costa Rica (Walton *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de ser una especie de cultivo, al ser multiplicada vegetativamente usando en su mayoría un solo material genético (*V. planifolia* cv. mansa); la vainilla se encuentra enlistada en la categoría de alto grado de erosión genética, entendida como la pérdida de materia prima para el futuro mejoramiento genético de las plantas (FAO, 1995). Esta especie también ha sido considerada como amenazada por el escaso número de individuos silvestres, puesto que sus poblaciones naturales en el sur de México -las fuentes más importantes de diversidad genética- están a punto de desaparecer debido a la deforestación y la extracción excesiva (Duval *et al.*, 2006). Por lo expuesto, es un desafío importante realizar una intensa labor de selección, propagación y conservación para salvaguardar el patrimonio genético de la vainilla (Gopinath, 1994; Suseela y Thomas, 2000; Thomas y Suseela, 2000).

En este contexto, las técnicas de cultivo *in vitro* se presentan como una herramienta útil para la propagación masiva de muchas especies vegetales y la recuperación de especies en peligro. El término cultivo *in vitro* de tejidos vegetales cubre un amplio espectro de técnicas que implican el cultivo, bajo condiciones de asepsia, de órganos o fragmentos de órganos (semillas, embriones, hojas, tallos, yemas, raíces, anteras, óvulos), callos, células aisladas y protoplastos en un medio

nutritivo artificial definido, bajo condiciones ambientales controladas (Mroginski y Roca, 1991; Iriondo y Pita, 1998). El uso de estas técnicas permite la propagación de material vegetal con altas tasas de multiplicación en un ambiente aséptico, a la vez que posibilitan la obtención de plantas libres de virus, la producción de plantas haploides, el rescate de embriones inmaduros o híbridos, la hibridación somática mediante fusión de protoplastos y la producción de semillas sintéticas (Dodds, 1991; Iriondo y Pita, 1998).

Durante las últimas décadas, las técnicas de cultivo *in vitro* han surgido como una valiosa alternativa para la conservación de germoplasma vegetal (Engelmann, 1991; Bunn *et al.*, 2007), dado que la miniaturización de los explantes permite reducir las necesidades de espacio y, por lo tanto, los costos laborales para el mantenimiento de las colecciones *in vitro* de germoplasma, en comparación con las colecciones *ex vitro*. Los métodos empleados son diferentes, dependiendo de la duración del almacenamiento requerida.

Para la conservación a corto y mediano plazo, el objetivo es reducir el crecimiento y aumentar los intervalos entre subcultivos, sin afectar la viabilidad del material conservado. Las modificaciones en las condiciones físicas de incubación y/o en el medio de cultivo son las principales estrategias utilizadas para la conservación *in vitro* de germoplasma (Engelmann, 1991; 2011; Negri *et al.*, 2000; Malaurie, 2001; Gupta y Mandal, 2003; Bunn *et al.*, 2007). Para el almacenamiento a largo plazo, se procuran temperaturas inferiores a -130 °C para alcanzar condiciones de ausencia de agua en estado líquido, baja energía cinética molecular y una difusión extremadamente lenta, logrando así que las reacciones químicas se encuentren prácticamente paralizadas (Pritchard, 1995). Bajo estas condiciones, se logra la detención de la mayoría de los procesos metabólicos y con ello el bloqueo de los mecanismos fisiológicos responsables del envejecimiento, postulándose longevidades extremadamente largas (Iriondo Alegría, 2001).

Las técnicas de crioconservación utilizan normalmente nitrógeno líquido -NL-, lo que asegura una temperatura constante de -196 °C y, de esta manera, la prolongación indefinida del período de conservación (Bonner, 1990; Pritchard, 1995). No obstante, la crioconservación presenta una serie de problemas derivados, principalmente, de la humedad inicial de la muestra y de las alteraciones que sufre el material en los procesos de congelación/descongelación. Ambos factores deben ser detalladamente evaluados antes de decidir si es adecuada la utilización de esta técnica para un determinado tipo de material biológico (Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997).

Respecto al género *Vanilla*, durante las últimas décadas se ha investigado la posibilidad de propagación *in vitro* utilizando diversas partes de la planta. Se reportan antecedentes de regeneración a partir del cultivo de callos (Gu *et al.*, 1987; Davidson y Knorr, 1991), yemas axilares (Kononowicz y Janick, 1984; George y Ravishankar, 1997; Giridhar y Ravishankar, 2004) y ápices caulinares (Geetha y Sudheer, 2000). Sin embargo, en algunos casos la eficiencia de estos protocolos es baja y aun son necesarios estudios adicionales para optimizarlos y/o desarrollar nuevos sistemas *in vitro* que permitan la regeneración eficiente de plantas de *V. planifolia* mediante la vía organogénica o embriogénica, con especial atención al uso de explantes pequeños con potencial para ser crioconservados.

En cuanto a la crioconservación de germoplasma de vainilla, los únicos antecedentes publicados conciernen al uso de ápices caulinares provenientes de plantas *in vitro* aplicando la técnica degota-vitrificación (González-Arnao *et al.*, 2009); sin embargo, la supervivencia y regeneración de plantas a partir de ápices crioconservados fueron bajas (30 y 10%, respectivamente). Por lo tanto, los protocolos para la crioconservación de esta especie también deben ser optimizados antes de prever su aplicación a gran escala.

## **HIPÓTESIS**

Es factible establecer sistemas *in vitro* que permitan una eficiente regeneración de plantas y crioconservación de germoplasma de *Vanilla planifolia*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Generar los conocimientos necesarios para el establecimiento de sistemas eficientes de micropropagación y crioconservación de germoplasma de *Vanilla planifolia*.

### **Objetivos Específicos:**

- Desarrollar y/u optimizar sistemas *in vitro* que permitan la regeneración de plantas de *V. planifolia*, a partir de diferentes explantes, mediante la vía organogénica o embriogénica.
- Establecer procedimientos que permitan la crioconservación de germoplasma de *V. planifolia*, estudiando la incidencia de diferentes tratamientos crioprotectores sobre la supervivencia de diversos explantes y promoviendo el acondicionamiento previo de los explantes para soportar el estrés al que son sometidos durante la exposición a temperaturas ultrabajas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y condiciones de multiplicación de las plantas madres**

Se trabajó con plantas *in vitro* de *Vanilla planifolia* (Fig. 1a), pertenecientes a la colección de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE. Para el mantenimiento de dicha colección, cada 8-10 semanas se realizó el cultivo de microestacas en medios frescos.

Las microestacas (segmentos de tallo de ~15 mm de largo incluyendo una yema axilar; Fig. 1b) se cultivaron individualmente en tubos de vidrio de 15 ml, conteniendo 4 ml de medio semisólido, constituido por el medio basal de Murashige y Skoog (1962) –MS– con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 6,5 g.L<sup>-1</sup> de agar (A-1292, Sigma-Aldrich Ltd. Co.). El pH del medio se ajustó -antes del agregado del agente gelificante- a 5,6 mediante KOH y/o HCl. Los tubos con medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 1,46 kg.cm<sup>-2</sup> y 120 °C durante 20 min. Una vez que los explantes se cultivaron asépticamente en una cabina de flujo laminar de aire estéril, los tubos se sellaron con Resinite AF 50® (Casco SAIC Company) y se incubaron en una cámara de crecimiento a 27 ± 2 °C con un fotoperíodo de 14 h e intensidad lumínica de 116 µm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPFD (densidad de flujo de fotones fotosintéticos).

### **Micropropagación**

Con el propósito de contar con sistemas *in vitro* que posibiliten la multiplicación de individuos selectos, a partir de explantes con potencial para ser crioconservados (los cuales se busca que sean del menor tamaño posible y constituidos por tejidos organizados), se realizaron estudios de regeneración de plantas, mediante la vía organogénica y/o embriogénica, a través del cultivo de diferentes secciones de una planta. Se evaluó el efecto del tipo de explante utilizado y la concentración y combinación de reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio de cultivo sobre la capacidad de regeneración de plantas.

### Experimento 1

En una primera etapa, se realizó una prueba piloto, utilizando como explantes ápices caulinares y radicales (2-3 mm de longitud), segmentos internodales (rebanadas de tallos de 1-2 mm de espesor), fragmentos de hojas ( $\sim 25 \text{ mm}^2$ , extraídos de la porción basal, media y apical de las láminas foliares) y segmentos de raíces (2-3 mm de longitud, extraídos de la porción basal, media y apical de raíces jóvenes). En todos los casos, los explantes fueron extraídos de plantas *in vitro*, originadas a partir de las microestacas, después de 30-45 días del último subcultivo en MS (Fig. 1c). Los reguladores de crecimiento vegetal utilizados pertenecen al grupo de las citocininas y auxinas. Las citocininas evaluadas fueron: N6-bencilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) y tiazurón (TDZ), en una concentración de  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Las auxinas ensayadas fueron: ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) y ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram); en concentraciones de 0,01; 0,1; 1 o  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Las diferentes combinaciones de citocininas y auxinas evaluadas en este experimento sumaron un total de 48 medios de cultivo. En todos los casos, el medio basal utilizado fue MS con  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarosa y  $6,5 \text{ g.L}^{-1}$  de agar.

El cultivo de los explantes se llevó a cabo en condiciones asépticas, trabajando en una cabina de flujo laminar de aire estéril. Los diferentes explantes se cultivaron individualmente, en tubos de vidrio de 11 ml contenido 3 ml de medio de cultivo, previamente esterilizados en autoclave. La incubación se llevó a cabo en una cámara de crecimiento a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y oscuridad permanente durante los primeros 45 días. Luego de este período de inducción, los cultivos fueron transferidos a MS fresco y mantenidos en condiciones estándar de crecimiento (fotoperiodo de 14 h e intensidad lumínica de  $116 \mu\text{m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  PPFD). La capacidad de regeneración de los diferentes explantes fueron evaluados luego de 90 días de iniciado el cultivo.



**Figura 1.** Plantas *in vitro* de *Vanilla planifolia* pertenecientes a la colección de trabajo. (a) Plantas obtenidas 60 días después del cultivo de las microestacas (b) en MS sin reguladores de crecimiento vegetal. (c) Plantas regeneradas luego de 30 días del subcultivo de las microestacas, con raíces jóvenes (indicadas con flechas) usadas como fuente de explantes para los experimentos de regeneración de plantas y crioconservación. Las barras representan 1 cm.

### *Experimento 2*

En una segunda etapa de evaluación, se seleccionaron dos tipos de explantes: ápices caulinares y radicales, por ser los únicos que posibilitaron la regeneración de plantas en el primer experimento. Se evaluó el efecto de la concentración y combinación de dos citocininas (BAP o KIN en concentraciones de 0,5; 1 y 3 mg.L<sup>-1</sup>) y dos auxinas (AIB o ANA en concentraciones de 0,01 y 0,1 mg.L<sup>-1</sup>) adicionadas al medio de cultivo, sobre la capacidad de regeneración de plantas de ambos tipos de ápices.

El cultivo de los explantes se realizó como se describió en el experimento anterior. Los ápices caulinares fueron incubados en una cámara de crecimiento a 27 ± 2 °C con un fotoperíodo de 14 h e intensidad lumínica de 116 µm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPFD durante 60 días, luego de lo cual se procedió a evaluar la regeneración de plantas a partir de dichos explantes. Por otra parte, la incubación de los ápices radicales se llevó a cabo en oscuridad permanente durante los primeros 60 días. Luego de este período de inducción, los cultivos fueron transferidos a MS fresco y mantenidos durante 60 días adicionales bajo condiciones estándar de crecimiento (fotoperíodo de 14 h e intensidad lumínica de 116 µm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPFD). La capacidad de regeneración de plantas a partir de ápices radicales fue evaluada luego de 120 días de iniciado el cultivo de tales explantes.

### **Crioconservación de germoplasma**

Con el propósito de establecer procedimientos que permitan la conservación a largo plazo de germoplasma de vainilla, se realizaron estudios de crioconservación de ápices caulinares y radicales, siguiendo los protocolos de vitrificación y de gota-vitrificación, los cuales se describen a continuación.

En todos los casos, los ápices caulinares y radicales (2-3 mm de longitud) fueron extraídos de plantas *in vitro*, originadas a partir de las microestacas, después de 30-45 días del último subcultivo (como se describió anteriormente) y luego pre-acondicionados durante 16-24 h en un medio constituido por MS suplementado con 0,3 M de sacarosa.

#### *Experimento 1. Técnica de vitrificación*

El método de vitrificación se caracteriza por inducir una intensa deshidratación osmótica, mediante la exposición del material biológico a mezclas crioprotectoras muy concentradas, conocidas como formulaciones PVS (*Plant Vitrification Solutions*). El tratamiento con las PVS facilita la ocurrencia de la transición vítreo, durante el enfriamiento rápido de las muestras, por la inmersión directa al nitrógeno líquido (Sakai y Englemann, 2007). El tratamiento de los explantes con la PVS generalmente se lleva a cabo a temperaturas cercanas a los 0 °C (colocando las muestras en hielo) para reducir la posibilidad de toxicidad ocasionada por el elevado potencial osmótico de dichas soluciones. Adicionalmente, para que los tejidos adquieran mayor tolerancia frente a la deshidratación con la PVS y a la crioconservación, previo a estos dos procesos, se realiza un tratamiento breve denominado “tratamiento de carga”, en el cual se utiliza una mezcla de sacarosa y glicerol.

El procedimiento llevado a cabo en este trabajo de investigación consistió en transferir los ápices caulinares y radicales pre-acondicionados a una caja de Petri conteniendo la solución de carga (0,4 M de sacarosa + 2 M de glicerol), donde permanecieron por 20 min a temperatura ambiente. A continuación, los explantes fueron tratados con las soluciones vitrificadoras PVS2: 30% glicerol + 15% etilenglicol + 15% DMSO (w/v) en medio de cultivo con 0,4 M sacarosa y PVS3: 50% de glicerol + 50% sacarosa (w/v) durante 15, 30, 45 y 60 min a 0 °C. Luego, los ápices fueron colocados

en crioviales conteniendo 1 mL de PVS2 o PVS3 e inmersos rápidamente en NL y mantenidos allí durante al menos 1 h.

Para el calentamiento de las muestras, los crioviales fueron extraídos del NL y sumergidos rápidamente en un baño termostático a 35 °C durante 2 min. Finalmente, se procedió al lavado de las soluciones crioprotectoras colocando los ápices en un frasco contenido 25 mL de solución de lavado (MS líquido suplementado con 1,2 M de sacarosa) durante 20 min. (tratamiento de descarga).

#### *Experimento 2. Técnica de gota-vitrificación*

Esta técnica ha derivado del método de vitrificación y se diferencia de éste en que se logra una ultra-rápida velocidad de enfriamiento y de calentamiento de las muestras, dado que en lugar de usar crioviales, los tejidos se transfieren a una gota de solución vitrificadora colocada sobre una pequeña lámina de aluminio, en la que son inmersas directamente al NL (Panis *et al.*, 2005). Estas láminas dan lugar a tasas de enfriamiento ultra-rápidas de alrededor de 130 °C·seg<sup>-1</sup>. Para el calentamiento, la lámina con las muestras se sumerge directamente en abundante medio de cultivo líquido suplementado con sacarosa. La magnífica conductividad térmica de la lámina de aluminio, aunada al poco volumen de solución crioprotectora en contacto con los tejidos, propicia que tanto el enfriamiento como el calentamiento transcurran a una velocidad muy elevada (Sakai y Engelmann, 2007).

Para el desarrollo de este protocolo, se realizaron los tratamientos de carga y de exposición a las PVS como se describió en la técnica anterior. A continuación, los ápices caulinares y radicales fueron colocados en gotas de PVS (~15 µl) previamente dispensadas sobre pequeñas láminas de papel aluminio e inmediatamente inmersas en NL. La recuperación del material vegetal crioconservado se realizó extrayendo las láminas de aluminio del NL y sumergiéndolas rápidamente en MS líquido suplementado con 1,2 M de sacarosa durante 20 min a temperatura ambiente antes de proceder al recultivo.

En ambos casos, luego del proceso de crioconservación y recuperación del material vegetal, los ápices caulinares y radicales fueron cultivados en medios de cultivo constituidos por MS suplementado con 1 mg.L<sup>-1</sup> de KIN.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

En cada experimento, tanto de regeneración de plantas como de crioconservación de germoplasma, los tratamientos fueron arreglados en un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones de diez muestras cada uno. Los resultados se analizaron calculando los valores promedio de las tres repeticiones. Finalmente, los datos fueron sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de las medias fue realizada usando el test de comparaciones múltiples de Duncan ( $P<0,05$ ).

## **RESULTADOS**

### **Micropropagación**

#### *Experimento 1*

Al cabo de 90 días de iniciado el cultivo (45 días en los medios de inducción + 45 días en MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal), la regeneración de plantas de vainilla sólo fue posible a partir de ápices caulinares y radicales en los medios de cultivo suplementados con KIN o BAP 3 mg.L<sup>-1</sup>, solas o combinadas con AIB o ANA en concentraciones de 0,01 o 0,1 mg.L<sup>-1</sup>. En los

medios en los cuales la citocinina utilizada fue KIN, los porcentajes de regeneración de plantas oscilaron entre 43 y 87% a partir de ápices caulinares y entre 20 y 60% a partir de ápices radicales; mientras que los medios que contenían BAP brindaron porcentajes de regeneración entre 10 y 60% sólo a partir de ápices radicales. Los diferentes porcentajes de regeneración dependieron de la presencia o ausencia, el tipo y la concentración de auxina adicionada al medio de cultivo.

### *Experimento 2*

La regeneración de plantas a partir de ápices caulinares se evaluó luego de 60 días de realizado el cultivo en los medios de inducción, considerando el porcentaje de ápices que desarrollaron plantas con la morfología normal para esta especie (incluyendo un vástago, hojas y raíces; Fig. 2 b,c,d). Por otra parte, la regeneración de plantas a partir de ápices radicales se evaluó luego de 120 días de iniciado el cultivo en los medios de inducción (donde permanecieron durante los primeros 60 días, seguido de un periodo adicional de 60 días en MS libre de reguladores de crecimiento vegetal para dar lugar a la expresión), considerando también el porcentaje de ápices que desarrollaron plantas con la morfología normal para esta especie.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos a partir del cultivo de ápices caulinares y radicales. Se observa que las tasas de regeneración a partir de ápices caulinares fueron significativamente mayores en los medios suplementados únicamente con KIN en todas la concentraciones evaluadas ( $0,5; 1$  o  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) o bien en los medios adicionados con  $0,5$  o  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de KIN en combinación con  $0,01$  o  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB. Estos siete medios de cultivo mencionados permitieron la regeneración de plantas en porcentajes que van desde 83 a 97%. En cuanto a los medios de cultivo suplementados con BAP, si bien estimularon el crecimiento de los ápices caulinares, en general no brindaron plantas con la morfología normal para esta especie (Fig. 2 e, f). Los mayores porcentajes de regeneración (33 a 17%) se obtuvieron en los medios conteniendo  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP (la menor dosis ensayada) en combinación o no con AIB  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  o ANA  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ . Por su parte, la regeneración de plantas a partir de ápices radicales fue posible en la mayoría de los medios de cultivo evaluados, obteniéndose los mayores porcentajes de regeneración (80-83%) en los medios suplementados con  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de KIN o BAP (Fig. 3); si bien estos valores no se diferencian significativamente de los obtenidos en los medios adicionados con  $0,5$  o  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de KIN o BAP así como en aquellos con  $0,5$  o  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de KIN o BAP en combinación con  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB o ANA.

Es bien conocido que el equilibrio entre los reguladores de crecimiento vegetal, particularmente las citocininas y auxinas, en el medio de inducción es un determinante para la regeneración de plantas mediante la vía organogénica (Evans *et al.*, 1981). En este estudio, tanto los ápices caulinares como radicales de *V. planifolia* mostraron respuestas diferenciales de acuerdo a la combinación y concentración hormonal utilizada en los medios de inducción. Si bien los ápices caulinares cultivados en MS libre de reguladores de crecimiento vegetal fueron capaces de regenerar plantas, se lograron tasas de regeneración significativamente superiores en los medios suplementados con una citocinina (KIN  $0,5; 1$  o  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ), combinada o no con una auxina. Mientras que para los ápices radicales fue fundamental la suplementación del medio de inducción con una citocinina (KIN o BAP) para lograr la regeneración de plantas a partir de este tipo de explantes. Estos resultados constituyen un gran aporte biotecnológico dado que la regeneración de plantas a partir de ápices caulinares y radicales, además de permitir la clonación de genotipos selectos, brinda explantes muy apropiados a la hora de encarar estudios de crioconservación de germoplasma.

**Tabla 1.** Efecto del tipo, concentración y combinación de citocininas y auxinas adicionadas al medio basal MS sobre la regeneración de plantas a partir de ápices caulinares y radicales de *Vanilla planifolia*.

KIN [mg L <sup>-1</sup> ]	BAP [mg L <sup>-1</sup> ]	AIB [mg L <sup>-1</sup> ]	ANA [mg L <sup>-1</sup> ]	Regeneración de plantas (%)	
				Ápices caulinares <sup>1</sup>	Ápices radicales <sup>2</sup>
-	-	-	-	33def	0f
0.5	-	-	-	93 <sup>a</sup>	73a
1.0	-	-	-	97 <sup>a</sup>	80a
3.0	-	-	-	90 <sup>a</sup>	63abc
0.5	-	0.01	-	93 <sup>a</sup>	60abc
1.0	-	0.01	-	83ab	67abc
3.0	-	0.01	-	47cde	40cde
0.5	-	0.10	-	93 <sup>a</sup>	10f
1.0	-	0.10	-	83ab	13ef
3.0	-	0.10	-	67bc	17def
0.5	-	0.01	-	67bc	60abc
1.0	-	0.01	-	20fg	70ab
3.0	-	0.01	-	50cd	43bcd
0.5	-	0.10	-	60c	7f
1.0	-	0.10	-	27efg	23def
3.0	-	0.10	-	67bc	20def
	0.5	-	-	33def	67abc
	1.0	-	-	3h	83a
	3.0	-	-	0h	63abc
	0.5	0.01	-	0h	63abc
	1.0	0.01	-	0h	73a
	3.0	0.01	-	0h	43bcd
	0.5	0.10	-	17fg	23def
	1.0	0.10	-	0h	40cde
	3.0	0.10	-	0h	7f
	0.5	-	0.01	20fg	57abc
	1.0	-	0.01	0h	60abc
	3.0	-	0.01	0h	40cde
	0.5	-	0.10	7gh	0f
	1.0	-	0.10	0h	7f
	3.0	-	0.10	0h	0f

<sup>1</sup>Regeneración de plantas a partir de ápices caulinares, expresada como el porcentaje de ápices que desarrollaron vástagos y raíces luego de 60 días del cultivo (n = 30).

<sup>2</sup>Regeneración de plantas a partir de ápices radicales, expresada como el porcentaje de ápices que desarrollaron vástagos y raíces luego de 120 días de iniciado el cultivo (n = 30).

Los valores representan los valores promedio de tres repeticiones. Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Duncan (*P*<0.05).



**Figura 2.** Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de *Vanilla planifolia*. a) Planta madre dadora de explantes, mostrando en detalle un ápice caulinar establecido *in vitro* (3-4 mm de largo). b-f) Respuestas obtenidas luego de 60 días del cultivo en MS sin suplementación hormonal (b) o suplementado con KIN 3 mg.L<sup>-1</sup> (c), BAP 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (d), BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> (e) y BAP 3 mg.L<sup>-1</sup> (f). Las barras representan 1 cm.

### Crioconservación de germoplasma

#### Experimentos 1 y 2

Luego de 60 días del cultivo de los ápices caulinares y radicales provenientes de cada uno de los protocolos de crioconservación ensayados, se evaluó la supervivencia tanto de las muestras crioconservadas como de las no crioconservadas (entendiendo la supervivencia como el porcentaje de explantes que mostraron algún signo de crecimiento después de 60 días de cultivo

en el medio de inducción constituido por MS suplementado con 1 mg.L<sup>-1</sup> de KIN). Los resultados obtenidos a partir de ambos explantes y protocolos de crioconservación evaluados se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Efecto del tratamiento de carga, los diferentes tiempos de exposición a las soluciones de vitrificación (PVS2 y PVS3) y la técnica de crioconservación aplicada (Vitrificación y Gota-vitrificación) sobre la sobrevivencia de ápices caulinares (AC) y radicales (AR) crioconservados y no crioconservados (-NL) de *Vanilla planifolia*.

Tratamientos	-NL <sup>(b)</sup>		Vitrificación <sup>(c)</sup>		Gota-vitrificación <sup>(c)</sup>	
	AC	AR	AC	AR	AC	AR
Testigo <sup>(a)</sup>	93a	77a	0	0	0b	0
Solución de carga	80ab	50b	0	0	0b	0
PVS2 15 min	73ab	23c	0	0	0b	0
PVS2 30 min	60bc	0d	0	0	17a	0
PVS2 45 min	33cd	0d	0	0	0b	0
PVS2 60 min	10d	0d	0	0	0b	0
PVS3 15 min	77ab	27c	0	0	0b	0
PVS3 30 min	57bc	0d	0	0	10a	0
PVS3 45 min	40cd	0d	0	0	0b	0
PVS3 60 min	17d	0d	0	0	0b	0

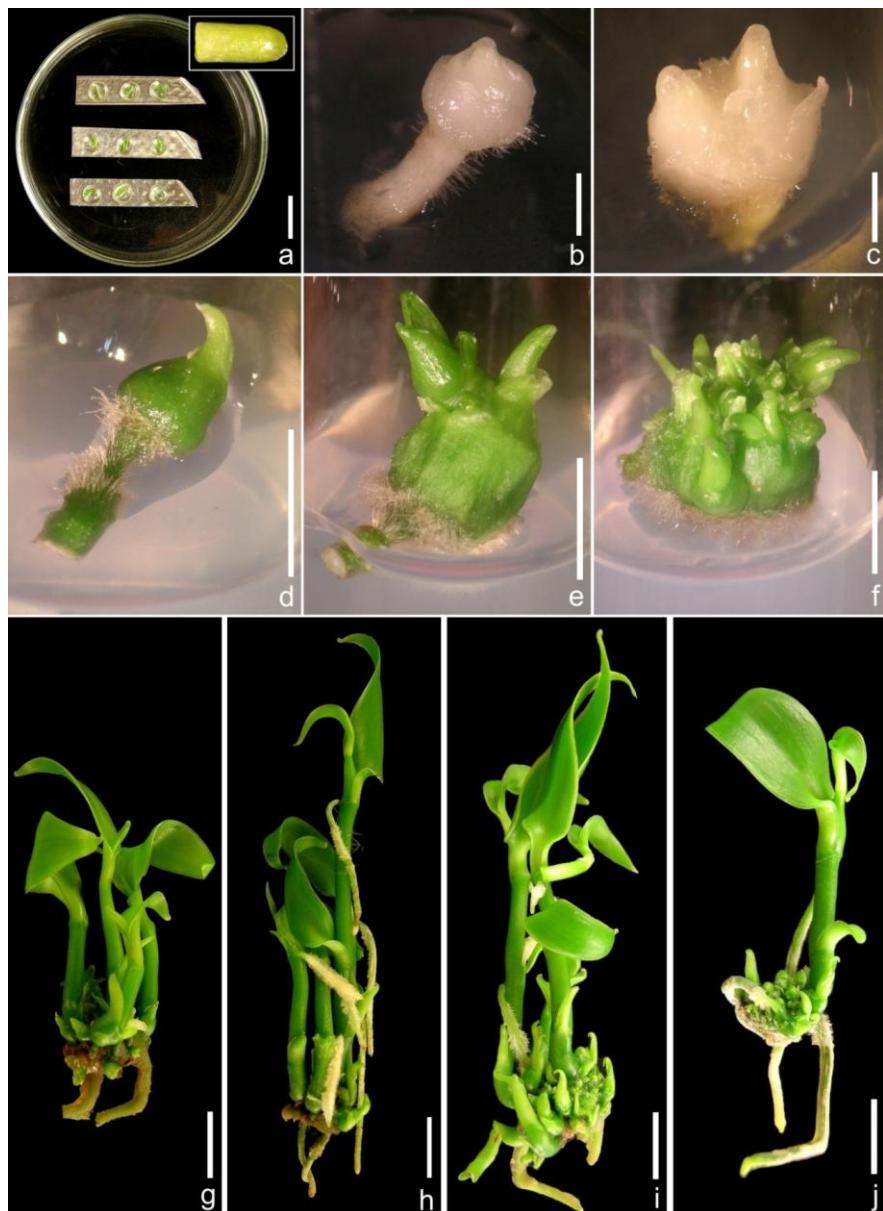
Los datos representan la media de tres repeticiones. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de comparación múltiple de Duncan ( $p < 0.05$ ).

<sup>(a)</sup>Ápices recién explantados, sin recibir tratamiento previo a su cultivo en MS + KIN 1.

<sup>(b)</sup>Porcentaje de explantes ( $n = 30$ ) que mostraron alguna vía de desarrollo morfogenético después de 60 días de cultivo en MS + KIN 1 (sin previa exposición al NL).

<sup>(c)</sup>Porcentaje de explantes ( $n = 30$ ) que mostraron alguna vía de desarrollo morfogenético después de 60 días de cultivo en MS + KIN 1 (previa crioconservación siguiendo las técnicas de vitrificación o gota-vitrificación).

Se observa que los explantes que no fueron expuestos al NL (controles sin crioconservar) presentaron diferentes porcentajes de supervivencia dependiendo de los tratamientos a los cuales fueron sometidos. En cuanto a los ápices caulinares, aquellos que no recibieron algún tratamiento previo a su cultivo en el medio de regeneración (testigos) así como aquellos tratados con la solución de carga, presentaron altos porcentajes de sobrevivencia (93 y 80% respectivamente). Por su parte, en aquellos explantes expuestos a la solución de carga seguida del tratamiento con las soluciones crioprotectoras la supervivencia fue significativamente afectada por el tiempo de exposición del material a las soluciones PVS, siendo mayor el porcentaje de supervivencia cuando menor fue el tiempo de contacto con estas soluciones. Asimismo, a igual tiempo de exposición, se evidenció una supervivencia levemente superior en los ápices tratados con la solución PVS3 respecto a la solución PVS2. En cuanto a los ápices caulinares crioconservados, sólo se registró supervivencia cuando se aplicó la técnica de gota-vitrificación y los ápices fueron expuestos a las soluciones vitrificadoras (PVS2 y PVS3) durante 30 min.



**Figura 3.** Regeneración de plantas in vitro a partir de ápices radicales de *V. planifolia*. (a) Detalle del explante utilizado tanto en los ensayos de propagación como de crioconservación de germoplasma. (b, d, g, h) Formación de una yema caulinar y regeneración de plantas de vainilla a partir de ápices radicales cultivados en MS + KIN  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , después de 45, 60 y 120 días respectivamente. (c, e, f, i, j) Diferenciación de yemas caulinares y regeneración de plantas de vainilla a partir de ápices radicales cultivados en MS + BAP  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , después de 45, 60, 90 y 120 días respectivamente. Las barras representan 1 cm en a, g-j; 2 mm en b, c; 5 mm en d-f.

Con respecto a los ápices radicales, no se registró supervivencia en ninguno de los tratamientos en los cuales los ápices fueron sumergidos en NL, independientemente de la técnica utilizada y del tiempo de exposición a las soluciones PVS. Las dos técnicas empleadas (Vitrificación y Gota-vitrificación) no resultaron adecuadas para la crioconservación de ápices caulinares y radicales de *V. planifolia*, al menos en lo que respecta al tipo y concentración de los crioprotectores utilizados y los tiempos de exposición que se evaluaron en este trabajo. Es conocido que la mayoría de las sustancias crioprotectoras presentan fitotoxicidad, dado el elevado potencial osmótico que presentan, por lo que es fundamental determinar para cada tipo de explante y especie estudiada

tanto la composición como los tiempos de exposición a las soluciones crioprotectoras para que estas no resulten fitotóxicas y a la vez protejan adecuadamente a los tejidos para que estos puedan tolerar la exposición al NL. Considerando las tasas de supervivencia obtenidas a partir de los tratamientos controles, queda demostrado que las formulaciones y tiempos de exposición utilizados en este experimento ocasionaron ese efecto negativo en los explantes, especialmente en los ápices radicales.

## CONCLUSIONES

Este trabajo constituye un interesante aporte biotecnológico dado que la regeneración de plantas a partir de ápices caulinares y radicales, además de permitir la clonación de genotipos selectos, brinda explantes muy apropiados a la hora de encarar estudios para la crioconservación de su germoplasma, dado que se constituyen de tejidos organizados y potencialmente estables desde el punto de vista genético, lo que garantiza el almacenamiento seguro de germoplasma.

De todos modos, es necesario continuar con las investigaciones para ajustar ciertas variables de los protocolos de crioconservación disponibles y esto haga posible la conservación a largo plazo de ápices caulinares y/o radicales de *V. planifolia*. Para ello sería interesante determinar tanto la composición de las soluciones crioprotectoras (evaluando también otros azúcares y azúcares-alcoholes) y la máxima concentración posible de cada uno de sus componentes, así como los tiempos máximos de exposición a las soluciones, todo lo cual no resulte tóxico para las células y a la vez sea suficiente para proteger adecuadamente a los tejidos para tolerar la exposición al NL.

## BIBLIOGRAFÍA

- Asociación Costarricense de Orquideología. 2000. Boletín Informativo. San José, Costa Rica. [www.ticorquideas.com](http://www.ticorquideas.com)
- Asociación Naturlad. 2000. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico. Guías de 18 cultivos. Vainilla. 18 pp.
- Bonner F. 1990. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. Forest Ecology and Management 35: 35-43.
- Bunn E., Turner S., Panaia M., Dixon K. 2007. The contribution of *in vitro* technology and cryogenic storage to conservation of indigenous plants. Australian Journal of Botany 55: 345-355.
- Bory S., Lubinsky P., Risterucci A.M., Noyer J.L., Grisoni M., Duval M.F., Besse P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). American Journal of Botany 95: 805-815.
- Davidson G. y Knorr D. 1991. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia*. Food Biotechnology 5: 59-66.
- Dodds J.H. 1991. *In Vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman & Hall, London. 240 pp.
- Duval M.F., Bory S., Andrzejewski S., Grisoni M., Besse P., Causse S., Charon C., Dron M., Odoux E., Wong M. 2006. Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. Les Actes du BRG 6: 181-196.
- Engelmann F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm-a review. Euphytica 57: 227-243.
- Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cell Dev Biol Plant 47: 5-16. doi:10.1007/s11627-010-9327-2

- Evans D.A., Sharp W.R., Flick C.E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis, pp. 45-113. En: Thorpe T.A. (ed.) Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press, New York.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1995. Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos de América Central y México. Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos fitogenéticos. San José, Costa Rica.
- Geetha S. y Sudheer A. 2000. In vitro propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. Current Science 79: 886-889.
- George P. y Ravishankar G. 1997. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. Plant Cell Reports 16: 490-494.
- Giridhar P. y Ravishankar G.A. 2004. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. Indian Journal of Biotechnology 3: 113-118.
- González K. 2003. Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Tesis Bach, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- González-Arnao M., Lazaro-Vallejo C., Engelmann F., Gamez-Pastrana R., Martinez-Ocampo Y., Pastelin-Solano M., Diaz-Ramo C. 2009. Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 45: 574-582.
- Gopinath C. 1994. Secret of vanillaó farmer's notebook on *Vanilla*. Indian Spice Associates, Putur, Karnataka, p.31.
- Greule M., Tumino L., Kronewald T., Hener U., Schleucher J., Mosandl A., Keppler F. 2010. Improved rapid authentication of vanillin using 813C and 82H values. European Food Research and Technology 231: 933-941.
- Gupta S. y Mandal B.B. 2003. In vitro methods for PGR conservation: principles and prospects, pp. 71-80. En: Chaudhury R., Pandey R., Malik S.K., Mal Bhag (eds.). In vitro Conservation and Cryopreservation of Tropical Fruit Species. IPGRI Office for South Asia and NBPGR, New Delhi.
- Gu Z., Arditii J., Nyman L.P. 1987. *Vanilla planifolia*: callus induction and plantlet production in vitro. Lindleyana 2: 48-52.
- Iriondo J.M. y Pita J.M. 1998. Bancos de cultivo *in vitro*. Agricultura 794: 714-715.
- Iriondo Alegría J.M. 2001. Investigación agraria. Producción y Protección Vegetales 16: 5-24.
- Kononowicz H. y Jarrick J. 1984. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*. Horticultural Science 19: 58-59.
- Malaurie B. 2001. Medium- and long-term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops. Acta Horticulturae 560: 69-77.
- Mroginski L.A. y Roca W.M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, pp. 19-40. En: Roca W.M. y Mroginski L.A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Negri V., Tosti N., Standardi A. 2000. Slow - growth storage of single node shoots of apple genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62: 159-162.
- Panis B., Piette B., Swennen R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. Plant Science 168: 45-55.
- Pita Villamil J.M. y Pérez Ruiz C. 1997. Criconservación de semillas. Agricultura 775: 123-125.

- Pritchard H.W. 1995. Cryopreservation of seeds, pp. 133-144. En: Day J.G. y McLellan M.R. (eds.). Methods in Molecular Biology, Vol. 38. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Sakai A. y Engelmann F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28: 151-172.
- Soto M. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoin AC. Informe final SNIB-CONABIO Proyecto J101. México D. F. 106 pp.
- Suseela B. y Thomas J. 2000. *Phytophthora* rot-a new disease of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. *Journal of Spices Aromatic Crops* 9(1): 73-75.
- Thomas J. y Suseela B. 2000. *Sclerotium* rot - a new disease of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. *Journal of Spices Aromatic Crops* 9(2): 175-176.
- Walton N., Mayer M., Narbad A. 2003. Vanillin. *Phytochemistry* 63: 505-515.