CONSERVACIÓN DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks.) BAJO CONDICIONES DE LENTO CRECIMIENTO *in vitro*

In vitro CONSERVATION OF VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks.) UNDER SLOW GROWTH CONDITIONS

Jericó J. Bello-Bello[1], Giovanna G. García-García[2] y Lourdes Iglesias-Andreu[2]*

[1]Campus Córdoba, Colegio de Postgraduados. Km 348 carr. federal Córdoba-Veracruz, Congregación Manuel León. 94946, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. [2]Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Universidad Veracruzana. Av. de las Culturas Veracruzanas No. 101, Col. Emiliano Zapata. 91090, Xalapa, Veracruz, México.

**Autor para correspondencia* (xliglesias@gmail.com)

RESUMEN

En México, la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) es considerada una especie endémica sujeta a protección especial debido a las severas afectaciones que ha sufrido su hábitat natural. En atención a esta problemática, es importante emprender programas para el rescate y conservación de este valioso recurso genético. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro concentraciones (0, 10, 20 y 30 g L^{-1}) de dos agentes osmóticos: manitol y polietilenglicol (PEG), y cuatro concentraciones (0, 1, 2 y 3 mg L^{-1}) de dos inhibidores del crecimiento vegetal: ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC), sobre la supervivencia y crecimiento *in vitro* de plantas de *V. planifolia*. En todos los tratamientos se utilizaron brotes de 0.5 cm de altura regenerados *in vitro*. Estos brotes fueron cultivados en medio de cultivo (MS). A los 180 d de cultivo se evaluó porcentaje de supervivencia, longitud de la planta, número de hojas, número y longitud de raíces. Los cultivos *in vitro* mostraron valores menores en las variables evaluadas de crecimiento, cuando fueron incrementadas las concentraciones de los agentes osmóticos e inhibidores en el medio de cultivo. Los tratamientos con PAC mantuvieron 100 % de supervivencia de los brotes. Sin embargo, este compuesto provocó la presencia de anormalidades en la parte apical y radical de las plántulas *in vitro*. Respecto al ABA, al utilizar 3 mg L^{-1} los brotes mostraron valores menores en todas las variables evaluadas y 90 % de supervivencia. Estos resultados permitieron establecer un método de conservación *in vitro* a mediano plazo de *V. planifolia* que prolonga el periodo entre subcultivos cada 180 d, sin afectar la viabilidad y fenotipo de las plantas.

Palabras clave: *Vanilla planifolia,* ácido abscísico, crecimiento mínimo, manitol, paclobutrazol, polietileneglicol.

SUMMARY

In México, vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) is considered an endemic species that requires special protection due to severe changes in its natural habitat. Thus, development of conservations programs for rescuing this genetic resource is important. This study evaluated the effect of four concentrations (0, 10, 20 y 30 g L^{-1}) of two osmotic agents: mannitol and polyethylene glycol (PEG); and four concentrations (0, 1, 2 y 3 mg L^{-1}) of plant growth inhibitors: abscisic acid (ABA) and paclobutrazol (PAC); on survival and in-vitro growth of *V. planifolia* plants. *In-vitro* regenerated shoots, 0.5 cm tall, were used for all treatments. These shoots were grown on MS culture medium. Survival percentage, plant height, leaf number, root number and root length were recorded after 180 d in culture. Results showed a reduction in all response variables when osmotic agent concentrations increased. PAC treatments maintained 100 % survival; however, this compound affected the *in-vitro* phenotype of plantlets. Instead, ABA at 3 mg L^{-1} caused a reduction in all variables, except survival percentage, which was 90 %. These results provide an *in-vitro* conservation method for *V. planifolia*, that extends lapses between subcultures to 180 d, without affecting their viability and normal phenotype.

Index words: *Vanilla planifolia*, abscisic acid, mannitol, paclobutrazol, polyethylene glycol, slow growth.

INTRODUCIÓN

La vainilla (V*anilla planifolia* Jacks) es una orquídea nativa de las selvas tropicales del sureste de México y América Central (Soto-Arenas y Cribb, 2010; Salazar-Rojas *et al*., 2012). De ella se obtiene la vainillina, sustancia considerada como el saborizante más popular del mundo (Bory *et al*., 2008; Greule *et al*., 2010). *V. planifolia* se encuentra enlistada en la categoría de alto grado de erosión genética (FAO, 1995). En 2009, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) otorgó la denominación de origen: "Vainilla de Papantla", para su protección.

De acuerdo con la norma NOM-059-SEMARNAT-2010, en México esta especie se encuentra en riesgo, sujeta a protección especial. Para atender esta problemática, es importante emprender acciones para el rescate y conservación de este valioso recurso genético. De acuerdo con Pence *et al.* (2002), los sistemas de conservación *in vitro* constituyen una herramienta económica para la conservación de los recursos fitogenéticos a mediano y largo plazo y, actualmente, son una alternativa viable a los sistemas tradicionales de conservación de germoplasma en huertos clonales, jardines botánicos o bancos de semillas.

Uno de los métodos más empleados para la conservación *in vitro* de algunas especies de importancia agrícola como la vainilla, consiste en la reducción del crecimiento

Recibido: 27 de Junio del 2013
Aceptado: 26 de Enero del 2015

de las células o tejidos, con el objetivo de prolongar los periodos entre subcultivos y disminuir los costos inherentes a la mano de obra y reactivos necesarios para la conservación de germoplasma. Para ello se emplean comúnmente reguladores osmóticos como manitol y sorbitol (Montalvo-Peniche *et al*., 2007; Hassan *et al*., 2014). Estos compuestos contribuyen a reducir el potencial osmótico del medio de cultivo y, por ende, la disponibilidad de agua para los tejidos (Montalvo-Peniche *et al*., 2007). Debido a sus propiedades como agente osmótico no penetrante, el polietilenglicol (PEG) puede ser un compuesto utilizado en los programas de conservación *in vitro* (Srivastava *et al*., 2013).

Otra alternativa para reducir la tasa de crecimiento es el uso de inhibidores del crecimiento como el ácido abscísico (ABA) (Pence *et al*., 2002; Sarasan *et al.,* 2006; Barrueto y Carvalho, 2008) y el paclobutrazol (PAC) (Ziv, 2000). Este último compuesto perteneciente al grupo de los triazoles, es transportado por el xilema y puede ser absorbido por las hojas, tallos o raíces, y tiene como acción principal inhibir la síntesis del ácido giberélico por lo cual reduce la elongación celular (Jankiewicz, 2003). Además, el PAC ha sido utilizado en cultivo de tejidos vegetales dado el efecto positivo que ejerce en la inducción de los procesos de morfogénesis *in vitro* (Lorenzo *et al*., 1998; Ziv, 2000).

Métodos de crecimiento mínimo y crioconservación han sido reportados en *Vanilla* spp. por diferentes autores (Divakaran *et al*., 2006; González-Arnao *et al*., 2009; Divakaran y Babu, 2009). Sin embargo, a la fecha, no existen estudios comparativos sobre el efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento durante la conservación *in vitro* de esta especie.

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana, ha establecido 14 "accesiones" *in vitro* que incluyen colectas de los estados de Veracruz, Oaxaca, Puebla y Quintana Roo, las cuales requieren constantes subcultivos para su conservación. Por ello, el objetivo de este estudio fue establecer las condiciones de cultivo para la conservación *in vitro* a mediano plazo de germoplasma de vainilla a través de un estudio comparativo entre osmorreguladores (manitol y PEG) e inhibidores del crecimiento vegetal (ABA y PAC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon brotes obtenidos *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks Andrews morfotipo Mansa) de 0.5 cm de altura provenientes de la región del Totonacapan, Veracruz, México. Estos brotes se generaron después de tres subcultivos (cada 45 d) de yemas axilares (0.3-0.5 cm) en medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2 mg L^{-1} de BAP (bencilamino purina, Sigma®), de acuerdo con la metodología propuesta por Lee-Espinoza *et al*. (2008).

Efecto de agentes osmóticos e inhibidores de crecimiento sobre la tasa de crecimiento *in vitro*

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (0, 10, 20 y 30 g L^{-1}) de dos agentes osmóticos: manitol y polietilenglicol PM-6000 (Sigma®) y diferentes concentraciones (0, 1, 2 y 3 mg L^{-1}) de dos inhibidores del crecimiento vegetal: ácido abscísico (ABA, Sigma®) y paclobutrazol (PAC, Syngenta®) para desarrollar una alternativa de conservación *in vitro* por lento crecimiento *in vitro* de *V. planifolia.* Para ello se utilizaron tubos de ensaye de 22 x 220 mm con tapa de polipropileno (MOLLER®), que contenían 15 mL de medio MS y 0.22 % (w/v) de Gelrite™ (Sigma®) como agente gelificante.

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.8 con NaOH 0.5 N y se esterilizaron durante 15 min en autoclave (FE-299 Felisa®, México) a 1.5 kg cm^{-2} de presión y 120 °C. Los recipientes de cultivo, con un brote cada uno, así como el tratamiento testigo (sin agentes osmóticos e inhibidores del crecimiento) desarrollados en medio MS se incubaron a 24 ± 2 °C y se mantuvieron bajo lámparas de luz fluorescente Philips® (40-50 µmol m^{-2} s^{-1}) bajo un fotoperiodo de 16 h luz. Transcurridos 180 d de incubación se evaluó el porcentaje de supervivencia, longitud de planta, número de hojas y raíces de los brotes cultivados *in vitro*.

Enraizamiento y aclimatación de las vitroplantas

Los brotes sobrevivientes fueron trasferidos a medio MS adicionado con 3 mg L^{-1} de ácido indolacético (AIA) para su enraizamiento. Para su aclimatación los brotes enraizados *in vitro* con una altura de entre 5-10 cm fueron enjuagados con agua corriente y sembrados en charolas de 50 x 30 x 5 cm, que contenían sustrato estéril de musgo turboso y agrolita (1:1), bajo condiciones de invernadero. Se aplicaron riegos con agua corriente tres veces por semana y la humedad relativa se mantuvo entre el 70 y 80 %, y con sombra de 50 %.

Cuando las plantas alcanzaron 30 cm de altura, éstas se transfirieron a contenedores individuales con una mezcla de musgo turboso, agrolita y composta (1:1:1) como sustrato, y se aplicó fungicida (Tecto60®, 1 g L^{-1}) y fertilización foliar (Fertiplus®) una vez por semana durante un mes. Finalmente, las plántulas fueron trasferidas a campo bajo malla sombra.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, con los tratamientos que se describen en el Cuadro 1, y se usaron 10 explantes por tratamiento. Los experimentos se realizaron por triplicado. Para lograr que las variables cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, previo al análisis de varianza (ANDEVA) fue necesaria la transformación de valores ($\sqrt{(X+1)}$). Los datos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS® v. 11.5 para Windows y comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos osmorreguladores de crecimiento utilizados en este estudio ejercieron un efecto negativo sobre las variables de supervivencia y crecimiento evaluadas. Este efecto se acentuó a medida que fueron incrementadas las concentraciones de estos compuestos (Cuadro 1).

Los tratamientos con 10, 20 y 30 g L^{-1} de manitol mostraron valores de supervivencia de 90, 70 y 53 %, respectivamente. Las variables longitud de brotes, número de hojas, y número y longitud de las raíces, mostraron diferencias significativas en las concentraciones de 20 y 30 g L^{-1} de manitol (Cuadro 1) (Figura 1a). Un comportamiento similar fue observado en los tratamientos con PEG. Sin embargo, los porcentajes de supervivencia obtenidos con este osmorregulador no fueron más altos que con manitol, pues fueron de 83, 70 y 43 % para los tratamientos de 10, 20 y 30 g L^{-1}, respectivamente. El tratamiento con 30 g L^{-1} de PEG inhibió la altura (Figura 1b) y supervivencia de las plantas.

En relación con los efectos de manitol sobre la conservación *in vitro* de germoplasma, Sarkar y Naik (1998) en papa (*Solanum tuberosum*) reportaron que 20 y 40 g L^{-1} de este compuesto no afectaron la supervivencia del germoplasma *in vitro*. En este mismo cultivo, Fortes y Scherwinski-Pereira (2001) mencionan que el manitol puede llegar a causar una reducción del crecimiento y menor número de brotes por explante. Por su parte, Skalova *et al*. (2012) durante la conservación *in vitro* de yacón (*Smallanthus sonchifolius*), encontraron que las concentraciones más adecuadas para la conservación *in vitro* de esta especie fueron de 10 y 20 g L^{-1}.

Al respecto, se ha indicado que concentraciones elevadas de manitol pueden ser tóxicas para algunas especies vegetales y pueden llegar a ocasionar la muerte de la planta. Sin embargo, la concentración letal parece estar en función de cada especie (Loureiro da Silva y Scherwinski-Pereira, 2001). Recientemente, al comparar el efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento en regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), Srivastava *et al*. (2013) reportaron que fue necesario aplicar 20 g L^{-1} de manitol para disminuir el crecimiento *in vitro*, y que la combinación de 0.1, 0.5 y 1 g L^{-1} de ABA, ancimidol (ANC) y PEG, respectivamente, disminuyó también el crecimiento en esta especie.

Al evaluar el efecto de los inhibidores del crecimiento

Cuadro 1. Efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento sobre la conservación *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jacks.

Tratamiento	Dosis	Supervivencia (%)	Longitud (cm)	Núm. hojas	Núm. raíces	Longitud de raíz (cm)
Testigo	0	100	5.3 ± 0.24 a	4.8 ± 0.26 a	3.7 ± 0.28 d	5.1 ± 0.17 abc
Manitol (g L^{-1})	10	90	5.1 ± 0.26 a	3.8 ± 0.34 abc	3.8 ± 0.34 ab	5.0 ± 0.19 abc
	20	70	3.6 ± 0.22 b	3.8 ± 0.34 abc	4 ± 0.37 ab	3.6 ± 0.21 bc
	30	53	2.7 ± 0.26 bcd	2.2 ±0.18 de	2.5 ± 0.29 bcd	4.4 ± 0.31 abc
PEG (g L^{-1})	10	83	5.0 ± 0.2 a	4.2 ± 0.28 ab	3.7 ± 0.28 abc	5.1 ± 0.12 ab
	20	70	3.2 ± 0.24 bc	2.8 ± 0.34 bcde	3 ± 0.30 bcd	4.2 ± 0.17 abc
	30	43	1.8 ± 0.14 def	2.4 ± 0.20 cde	2.7 ± 0.28 bcd	4.5 ± 0.64 abc
PAC (mg L^{-1})	1	100	3.0 ± 0.15 bc	3.4 ± 0.36 abcd	3.8 ± 0.34 ab	4.5 ± 4.48 abc
	2	100	2.4 ± 0.10 cde	2.5 ± 0.36 cde	4.8 ± 0.26 ab	4.2 ± 0.37 abc
	3	100	1.6 ± 0.20 ef	1.8 ± 0.26 e	2.5 ± 0.29 bcd	4.7 ± 0.36 abc
ABA (mg L^{-1})	1	100	5.0 ± 0.20 a	4.5 ± 0.36 a	3.7 ± 0.28 abc	5.2 ± 0.18 a
	2	90	2.5 ± 0.27 cde	3.4 ± 0.36 abcd	2.2 ± 0.42 cd	3.5 ± 0.33 c
	3	90	1.3 ± 0.12 f	1.8 ± 0.26 e	1.5 ± 0.29 d	1.9 ± 0.17 d

Los valores representan la media ± ES (error estándar) a los 180 d de cultivo, n = 30. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

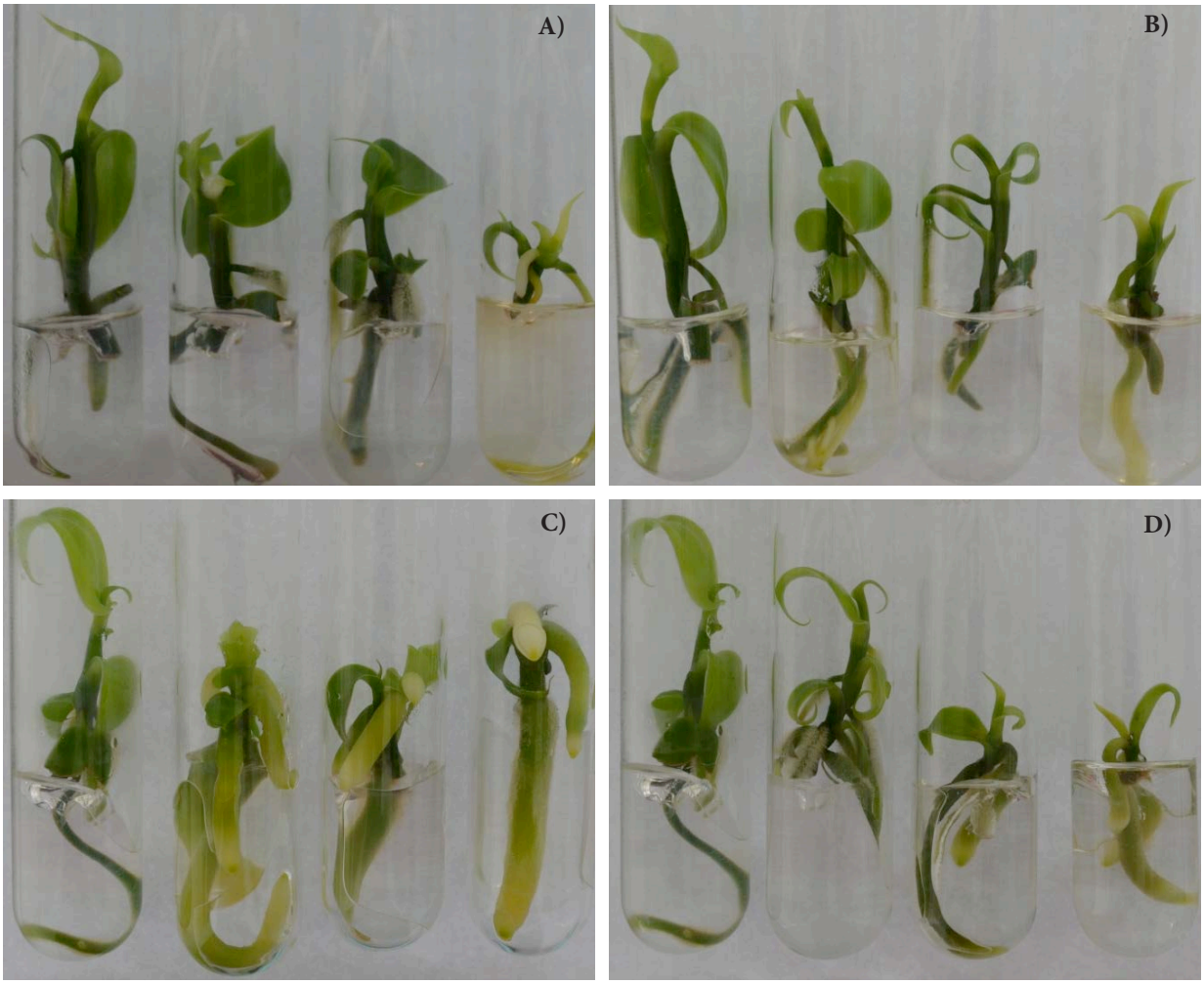


Figura 1. Efecto de concentraciones de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento sobre la conservación *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew. Dosis de izquierda a derecha: A) manitol: 0, 10, 20 y 30 g L^{-1}; B) polietileneglicol: 0, 10, 20 y 30 g L^{-1}; C) paclobutrazol: 0, 1, 2 y 3 mg L^{-1}, y D) ácido abscísico: 0, 1, 2 y 3 mg L^{-1}. A 180 d de cultivo.

PAC y ABA, se pudo observar que en todos los tratamientos con PAC se logró 100 % de supervivencia de los brotes. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre la longitud de los brotes, el número de hojas y la longitud de las raíces, a partir de los tratamientos que contenían 2 mg L^{-1} de ABA y PAC. La inhibición del crecimiento de los brotes en los tratamientos con PAC trajo consigo un efecto negativo en el fenotipo de las plántulas, denotado por anormalidades en la parte apical y radical que presentaron engrosamiento en ambas estructuras. Cabe resaltar que los tratamientos con este inhibidor afectaron el crecimiento apical y promovieron el alargamiento de raíces *in vitro* (Cuadro 1) (Figura 1c).

El uso de PAC ha sido reportado en el CTV para inducir procesos de morfogénesis *in vitro.* Al respecto, Lorenzo *et al.* (1998) establecieron un protocolo para la formación de brotes de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y observaron que la adición de 1 mg L^{-1} de PAC redujo la longitud de brotes y promovió la tasa de multiplicación *in vitro*. En gladiola (*Gladiolus* spp.), Nagaraju *et al.* (2002) lograron aumentar la formación de cormos en presencia de 10 mg L^{-1} de PAC. De igual forma, Chen *et al. (*2005) en lilis (*Hemerocallis* spp.), aumentaron la eficiencia de regeneración *in vitro* al adicionar 2.5 mg L^{-1} de PAC.

Por otro lado, se ha reportado que las plantas provenientes de sistemas de regeneración *in vitro* en el cual se emplean tratamientos con este compuesto presentan ventajas adaptativas a condiciones desfavorables de temperaturas extremas, sequía, salinidad y ataque por patógeno (Jaleel *et al.*, 2007). Aunque en ninguno de los tratamientos de PAC aplicados en el presente estudio se produjo la muerte de los brotes de vainilla, la presencia de fenotipos anormales

durante el desarrollo de las plantas *in vitro* sugiere que este compuesto no debe ser empleado para la conservación *in vitro* de germoplasma de *V. planifolia*, al menos a las dosis evaluadas.

Se constató que los tratamientos que contenían 1, 2 y 3 mg L^{-1} de ABA mostraron los mayores porcentajes de supervivencia de los brotes (100, 90 y 90 %, respectivamente). Las variables longitud de brotes, número de hojas, y número y longitud de las raíces mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. No se apreciaron diferencias en los porcentajes de supervivencia de los brotes cuando se emplearon concentraciones de 2 y 3 mg L^{-1} de ABA. Sin embargo, los brotes del tratamiento con 3 mg L^{-1} de este inhibidor afectaron significativamente el crecimiento de las plantas, dados los menores valores que presentaron las variables longitud de las plantas, número de hojas y longitud de la raíz (Cuadro 1) (Figura 1d).

Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de ABA sobre la conservación *in vitro* de mangostán (*Garcinia mangostana),* Keatmetha *et al.* (2006) mostraron que 1 mg L^{-1} de este inhibidor mantenía un efecto inhibitorio del crecimiento sin afectación de la supervivencia ni el número de brotes por explante. Barrueto y Carvalho (2008), al evaluar el efecto de ABA sobre la conservación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta* Grantz), observaron que el número y la longitud de los brotes se reducían a concentraciones de 5 y 8 mg L^{-1}. Se ha indicado que el ABA actúa endógenamente como un inhibidor del crecimiento en diversos procesos celulares de las plantas, debido a su efecto fisiológico en el cierre de estomas y en la regulación endógena de la síntesis de auxinas, citocininas y giberelinas (Swamy y Smith, 2005).

Una aplicación relativamente reciente de ABA es su efecto para retardar el crecimiento vegetal en los sistemas de conservación *in vitro* (Pence *et al.* 2002). Según Loureiro da Silva y Scherwinski-Pereira (2011), las altas concentraciones de ABA (3 mg L^{-1}) pueden llegar a afectar la supervivencia, longitud de brotes y numero de brotes por explante, en especies como *Piper aduncum* y *Piper hispidinervum.* Estos autores encontraron que una concentración de 2 mg L^{-1} de ABA mantuvo 100 % de supervivencia, lo que sugiere que esta concentración es adecuada para la inducción de la dormancia *in vitro* de estas especies.

En este estudio se obtuvo 90 % de supervivencia en presencia de 3 mg L^{-1} de ABA a los 180 d de incubación, y mostraron 95 % de supervivencia durante la etapa de aclimatación bajo invernadero. Las vitroplántulas aclimatadas tuvieron un aspecto vigoroso (Figura 2a). Cuando éstas alcanzaron 50 cm de longitud fueron transferidas a campo bajo malla sombra (Figura 2b).

En *V. planifolia* se han establecido diversos protocolos de conservación *in vitro*. Divakaran *et al.* (2006) lograron conservar brotes *in vitro* con medio de cultivo MS suplementado con 15 g L^{-1} de sacarosa y manitol. En ese estudio se obtuvo una longitud promedio de 8.2 cm para cada brote y 90 % de supervivencia a los 12 meses de cultivo. Los resultados obtenidos permitieron alcanzar un mismo porcentaje de supervivencia, y se logró además reducir la longitud promedio de los brotes a sólo 1.3 cm a los 6 meses de cultivo. González-Arnao *et al.* (2009) desarrollaron un sistema de crioconservación de ápices de vainilla; sin embargo, en dicho estudio apenas lograron obtener 30 % de supervivencia y 10 % de regeneración a planta, lo cual muestra que aún se requieren trabajos encaminados a la optimización de este sistema para que resulte efectivo para la conservación a largo plazo de estos recursos genéticos.

Un aspecto importante que se debe tener en cuenta cuando

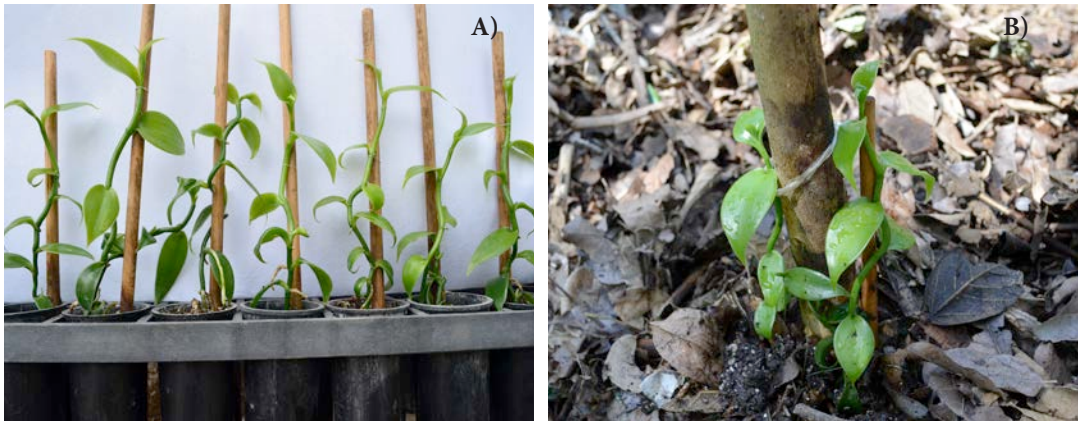


Figura 2. Plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks *ex* Andrews) *ex vitro.* A) Aclimatación en invernadero, y B) Trasplante en campo.

se establece un protocolo de conservación *in vitro* por lento crecimiento, es mantener durante este proceso un tamaño reducido de las plántulas sin que se afecte su viabilidad y sobrevivencia, para así reducir el número de subcultivos y costos de mantenimiento del germoplasma conservado. El método de conservación por lento crecimiento del germoplasma *in vitro* conlleva un trabajo laborioso, debido al alto número de subcultivos que deben efectuarse así como los altos costos de electricidad que implica cuando se utilizan cámaras frigoríficas para reducir la temperatura. La crioconservación requiere además un suministro constante de nitrógeno líquido cuyo uso en laboratorios comerciales no resulta rentable.

Por ello, el presente protocolo que sólo contempla la aplicación de 3 mg L^{-1} de ABA al medio MS puede resultar un método más eficiente de conservación por lento crecimiento de germoplasma de *V. planifolia*, ya que con poco espacio, pocos subcultivos y con mínimas cantidades de labores de mantenimiento se podría mantener, bajo condiciones estériles en un ambiente controlado (libres de enfermedades y de fluctuaciones climáticas), el germoplasma de vainilla colectado, lo cual contribuiría a facilitar los trabajos de micropropagación e intercambio de germoplasma de este valioso cultivo.

CONCLUSIONES

Se estableció un método para la conservación *in vitro* de *V. planifolia* basado en la adición de ABA (3 mg L^{-1}). Este compuesto permite mantener un banco de germoplasma *in vitro* con 90 % de viabilidad con subcultivos cada 180 d. Las plántulas conservadas *in vitro* pueden ser transferidas a medio de multiplicación para obtener una fuente de material vegetal requerido para su micropropagación, intercambio de germoplasma o programas de mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por el financiamiento otorgado al proyecto: "Bases Biotecnológicas para el Mejoramiento Genético de *Vanilla planifolia*", que integra el cuerpo académico UV-CA-234, dentro de la Red: "Conservación, Manejo y Mejoramiento Genético de Plantas".

BIBLIOGRAFÍA

Barrueto L. P. and C. B. Carvalho (2008) Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of cassava (*Manihot esculentus*). *Chilean Journal of Agricultural Research* 68:304-308.

Bory S., P. Lubinsky, A. M. Risterucci, J. L. Noyer, M. Grisoni, M. F. Duval and P. Besse (2008) Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany* 95:805-815.

Chen J., D. E. Hall and V. De Luca (2005) Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41:58-62.

Divakaran M., K. N. Babu and K. V. Peter (2006) Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 110:175-180.

Divakaran M. and K. N. Babu (2009) Micropropagation and *In Vitro* Conservation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *In*: S.M. Jain and P.K. Saxena (eds.). Protocols for *in Vitro* Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants. Humana Press, Totowa, NJ, US. pp:129-138.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (1995) International Technical Conference on Plant Genetic Resources. Report of the Sub-Regional: Preparatory Meeting for Central America, Mexico and the Caribbean. San José, Costa Rica. pp:21-24.

Fortes G. R. and J. E. Scherwinski-Pereira (2001) Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 36:1261-1264.

González-Arnao M. T., C. E. Lazaro-Vallejo, F. Engelmann, R. Gamez-Pastrana, Y. M. Martinez-Ocampo, M. C. Pastelin-Solano and C. Diaz-Ramos (2009) Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 45:574-582.

Greule M., L. Tumino, T. Kronewald, U. Hener, J. Schleucher, A. Mosandl and F. Keppler (2010) Improved rapid authentication of vanillin using δ13C and δ2H values. *European Food Research and Technology* 231:933-941.

Hassan N. A., R. G. Stino, A. H. Gomaa and R. M. Al-Mousa (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.

Jaleel C. A, R. Gopi, P. Manivannan and R. Panneerselvam (2007) Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity. *Acta Physiologiae Plantarum* 29:205-209.

Jankiewicz L. S. (2003) Reguladores de Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas. Propiedades y Acción. Ed. Mundi-Prensa. México. 487 p.

Keatmetha W., P. Suksa-Ard, M. Mekanawakul and S. Te-Chato (2006) *In vitro* germplasm conservation of *Garcinia mangostana* (L.) and *Lansium Dosmesticum* (Corr.) Walailak. *Journal of Science and Technology* 3:33-50.

Lee-Espinosa H. E., J. Murguía-González, B. García-Rosas, A. L. Cordova-Contreras, A. Luguna-Cerda, J. O. Mijangos-Cortés, L. F. Barahona-Pérez, L. G. Iglesias-Andreu and N. Santana-Buzzy (2008) *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *Hortscience* 43:454-458.

Lorenzo J. C., B. L. Gonzalez, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa and C. Borroto (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54:197-200.

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

Montalvo-Peniche M. C., L. G. Iglesias-Andreu, J. O. Mijangos-Cortés, S. L. Nahuat-Dzib, F. Barahona-Perez, A. Canto-Flick and N. Santana-Buzzy (2007) *In vitro* germplasm conservation of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Hortscience* 42:1247-1252.

Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Nagaraju V., G. Bhowmik and V. A. Parthasarathy (2002) Effect of paclobutrazol and sucrose on *in vitro* cormel formation in gladiolus. *Acta Botanica Croatica* 61:27-33.

Pence V. C., J. A. Sandoval, V. M. Villalobos and F. Engelmann (2002) *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation. *IPGRI Technical Bulletin* 7:26-29.

Salazar-Rojas V. M., B. E. Herrera-Cabrera, A. A. Delgado, M. Soto-Hernández, F. Castillo-González and M. Cobos-Peralta (2012) Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack.

(Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:875-887.

Sarasan V., R. Cripps, M. M. Ramsay, C. Atherton, M. Mcmichen, G. Prendergast and J. K. Rowntree (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42:206-214.

Sarkar D. and P. S. Naik (1998) Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica* 102:275-280.

Skalova I., I. Viehmannova and J. Vitamvas (2012) *In vitro* conservation of *Smallanthus sonchifolius* under slow-growth conditions. *Agricultura Tropica et Subtropica* 45:147-150.

Soto-Arenas M. A. and P. Cribb (2010) A new infrageneric classification and sinopsis of the genus *Vanilla* plum. Ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). *Lankesteriana* 9:355-398.

Srivastava M., D. K. Purshottam, A. K. Srivastava and P. Misra (2013) *In vitro* conservation of *Glycyrrhiza glabra* by slow growth culture. *International Journal of Bio-Technology and Research* 3:49-58.

Swamy P. M. and B. N. Smith (2005) Role of abscisic acid in plants stress tolerance. *Current Science* 76:1220-1227.

Ziv M. (2000) Bioreactor technology for plant micropropagation. *In*: Horticultural Reviews, Vol. 24 (ed. J. Janick). John Wiley & Sons, Inc. Oxford, UK.