

RESCATE Y MULTIPLICACIÓN DE LAS ORQUÍDEAS *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*  
y *Vanilla planifolia* Andrews POR MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS

Hilda E. Lee-Espinosa<sup>1,2</sup>  
Antonio Laguna-Cerda<sup>2</sup>  
Joaquín Murguía-González<sup>1</sup>  
Lourdes Iglesias-Andreu<sup>3</sup>  
Benjamín García-Rosas<sup>1</sup>  
María Elena Galindo Tovar<sup>1</sup>  
Ivonne Landero Torres<sup>1</sup>  
Teresita Ramírez Hernández<sup>1</sup>  
Felipe A. Barredo-Pool<sup>4</sup>  
Nancy Santana-Buzzy<sup>4</sup>

RESUMEN

Debido a la amenaza de extinción de la flora de orquídeas en México y creciente demanda de especies ornamentales y agroindustriales para el desarrollo económico del campo, se trató de encontrar una solución viable, aplicando métodos biotecnológicos para el rescate y producción de suficiente material vegetal, estableciendo modelos de propagación *in vitro* con dos especies de orquídeas amenazadas: vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews), única orquídea de importancia agroindustrial, utilizando para la multiplicación clonal *in vitro* yemas axilares (Z1=jóvenes y Z2=maduras), logrando un promedio de  $18.57 \pm 2.44$  y  $11.00 \pm 1.04$  brotes por explante en yemas Z1 y Z2, respectivamente, con  $9.55 \mu\text{M}$  de 6-bencil-amino-purina (BAP) en el medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con mio-inositol ( $554.9 \mu\text{M}$ ), vitaminas ( $5 \text{ ml L}^{-1}$ ), antioxidantes y sacarosa ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ). Las plantas (2-3 cm), desarrollaron raíces con  $0.44 \mu\text{M}$  de ácido naftalén-acético (ANA) en el medio MS 50%, y al alcanzar ~5 cm, se aclimatizaron con el 100% de supervivencia. En *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*, orquídea silvestre con potencial ornamental, se utilizaron semillas para la inducción del proceso en el medio MS, conteniendo ANA, BAP, kinetina (Kin) y ácido indol-3-acético (AIA), en combinaciones múltiples. La combinación ANA, BAP y AIA,  $2 \text{ mg L}^{-1}$  c/u resultó óptima para la inducción de callo embriogénico, que produjo la mayor proliferación y formación de embriones somáticos en fotoperiodo 16-h ( $33.78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), en tres subcultivos a intervalos de 45 días en el mismo medio de cultivo, con 611 embriones somáticos (ESs). El estudio histológico mostró estructuras embriogénicas. Los ESs producidos, se encapsularon en matriz de alginato de sodio para la producción de semilla sintética, como método de distribución y conservación.

**Palabras clave:** Orchidaceae, propagación clonal, morfogénesis, callos embriogénicos, embriogénesis somática, protocormos

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas, relevantes entre las ornamentales, son plantas distintivas y fascinantes, con flores bellas que les confieren importancia económica mundial, por lo que continuamente son saqueadas de su hábitat, provocando su explotación irracional, y colocando a la mayoría dentro la Norma Ecológica Mexicana SEMARNAT, 2001 (NOM-ECO-059, 2001). Existen estrategias de solución, como su uso sustentable (plantaciones de vainilla, cultivo de las *Laelias* y otras especies, en traspatios y viveros tecnificados); sin embargo, estos métodos de propagación son lentos, resultando necesario desarrollar estrategias para su propagación eficiente,

<sup>1</sup> Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Región Orizaba – Córdoba. Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma del Estado de México. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Centro Universitario El Cerrillo. pcarn@uaemex.mx

<sup>3</sup> Universidad Veracruzana. Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada.

<sup>4</sup> Centro de Investigación Científica de Yucatán. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. kalapana66@hotmail.com

conservación y uso sustentable. Una alternativa viable es la adopción y optimización de técnicas biotecnológicas (cultivo de tejidos vegetales), como instrumento útil en la propagación de especies vegetales; su uso intensivo, integrado a otras tecnologías permitirá desarrollar protocolos de micropropagación para especies vegetales, y ofrecer herramientas en el desarrollo sostenible de la horticultura ornamental. En el presente estudio se seleccionó a la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews), por ser la única orquídea de uso agroindustrial, y encontrarse en peligro de extinción, debilitando al sistema producto-vainilla mexicano, aunado a manejo inadecuado del cultivo, problemas fitosanitarios, socio-económicos, y la escasez de material vegetal para el establecimiento de plantaciones comerciales. La segunda especie, *Laelia anceps ssp. dawsonii f. dawsonii*, orquídea epífita originaria de México distribuida en las sierras de la vertiente del Golfo de México en los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz (Halbinger, 1993), es una de las orquídeas silvestres mexicanas más apreciadas porque sus características botánicas le permiten cumplir con los estándares internacionales de calidad (Soto, 1993) confiriéndole gran potencial ornamental, y enfrentando problemas de conservación, por la colecta excesiva, además de su baja tasa de propagación, y semillas con baja capacidad de germinación (1-5 %), colocándola en la NOM-ECO, 2001 como una especie en peligro de extinción. Es necesario conservar su variabilidad genética y estimular su propagación eficiente para el uso sustentable y reducción de su colecta excesiva. Existen reportes de la regeneración de orquídeas *in vitro* a partir de diferentes tipos de explante: protocormos y ápices de raíz (Philip y Nainar, 1986), yemas axilares (George y Ravishankar, 1997), ápices (Geetha y Sutheer, 2000), sin embargo, su eficiencia aún es baja. La germinación *in vitro* de semillas incluyen al género *Laelia*: *L. albida* (Santos-Hernández *et al.*, 2005), *L. rubescens* Lindley (Potisek *et al.*, 1996), *L. autumnalis* (Ávila y Salgado, 2006), pero, hasta el momento no existen reportes de embriogénesis somática en *Laelia anceps ssp. dawsonii*. En la presente investigación, se propone establecer protocolos de propagación clonal masiva *in vitro* y embriogénesis somática en las especies seleccionadas, efectuando el estudio histológico de los procesos, y diseño de un sistema de conservación *ex situ*, mediante la producción de semilla sintética como estrategia de rescate, aprovechamiento y distribución, ofreciendo una nueva visión en la agricultura al permitir mayor facilidad de manipulación, transportación, almacenamiento, reducción de costos de producción y propagación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en cuatro etapas, iniciando con el establecimiento de los experimentos de propagación clonal *in vitro* en vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews), seleccionando como explante a las yemas axilares por considerarse más adecuados para establecer cultivos clonales *in vitro*, y su relativamente alta disponibilidad en la planta. Se utilizaron yemas de la parte apical de tallos de plantas de 3 años de edad provenientes de Papantla, Veracruz, México, y clasificándolas por su posición, en dos zonas: a) Zona 1: situadas del 1° al 4° nudo (jóvenes); b) Zona 2: ubicadas entre el 5° y el 8° nudo (maduras). El establecimiento se realizó en el medio de cultivo MS, suplementado con 554.9  $\mu\text{M}$  de myo-inositol, 5  $\text{ml L}^{-1}$  de vitaminas MS, 150  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico y 20  $\text{g L}^{-1}$  de sacarosa, previa desinfección con inmersiones consecutivas en hipoclorito de sodio comercial (6% cloro activo), diluido a diferentes concentraciones: 1) 10% (v/v) por 20 min; 2) 5% (v/v) por 10 min; y 3) 2% (v/v) por 2 min. Seguidos de 4-5 enjuagues con agua destilada y esterilizada, conteniendo 150  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico y 100  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico. Durante la inducción de brotes, las yemas fueron sometidas a concentraciones de BAP (5.73, 7.64, 9.55 y 11.46  $\mu\text{M}$ ), mientras que en la fase de multiplicación los brotes obtenidos (0.5 - 0.7 cm de altura), fueron sometidos a las mismas concentraciones de la citocinina (BAP), adicionando además, 4.45  $\mu\text{M}$  de ANA en cada tratamiento; Una vez aislados los brotes (~2.0 cm de altura), fueron transferidos a diferentes tratamientos, en el medio basal de MS, suplementando con diferentes concentraciones de ANA (0.44, 2.22, 4.45 y 6.67  $\mu\text{M L}^{-1}$ ) para inducir enraizamiento. Los brotes de 5 cm de altura promedio y con presencia de raíces, fueron transferidos a condiciones de invernadero para su aclimatización, en macetas conteniendo musgo-turbo (Peat-moss) y agrolita (1:1). La humedad relativa fue del 90 % y se redujo la iluminación al 75% (malla-sombra). Al cabo de 30 días, las plantas que sobrevivieron fueron trasplantadas a suelo, en condiciones de campo. En *Laelia anceps ssp. dawsonii*, la fuente de explantes la constituyeron semillas maduras, para conservar la variabilidad genética de la especie, contenidas en cápsulas no dehiscentes producidas por polinización manual de inflorescencias de plantas colectadas en la región de Totutla-Huatusco, y cultivadas en el municipio de Fortín de las Flores, Veracruz. Se indujo embriogénesis somática, mediante la proliferación de callo embriogénico a partir de las semillas, en un medio MS suplementado con ANA, BAP, kinetina (Kin) y AIA, en las combinaciones: ANA+BAP+AIA, 2.0  $\text{mg L}^{-1}$  c/u; ANA+BAP, 2.0  $\text{mg L}^{-1}$  c/u, y Kin+ANA+BAP, 2.0  $\text{mg L}^{-1}$  c/u, evaluando la

capacidad morfogénica (número de ESs producidos en los callos) a los 45 días desarrollo *in vitro*. Se determinó el efecto de las condiciones de incubación y medios de cultivo, en un experimento completamente aleatorizado, evaluando 3 medios de cultivo basales (MS, KC y VW) suplementados con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, BAP, AIA, y dos condiciones de incubación: fotoperiodo 16 h (33.78 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) y oscuridad a una temperatura de incubación de 23 ± 1 °C. Se sembraron diez callos de ≈2 mm de diámetro por cada tratamiento, seleccionados de acuerdo a su textura rugosa, consistencia friable y color verde intenso. Después de cinco semanas, se evaluó el número de embriones somáticos formados. Para determinar el índice de multiplicación (I.M.) de los embriones somáticos (ESs), y el efecto de los subcultivos, se evaluaron tres medios de cultivo conformados por las sales minerales de MS, Knudson C (KC) y Vacin y Went (VW), suplementadas con 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, y 2.0 mg L<sup>-1</sup> de cada una de las fitohormonas ANA, BAP, AIA; los tiempos de subcultivo evaluados fueron de 21, 30, 45 y 90 días. El tratamiento testigo nunca fue subcultivado. El conteo de ESs se realizó a los 180 días, cuando concluyó el experimento. El índice de multiplicación se calculó de la siguiente manera: Índice de Multiplicación (IM) =  $\sum$  ESs formados/tratamiento/ Núm. ESs inicial. Los ESs en etapa de plúmula se cultivaron en un medio VW, suplementado con mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), solución de vitaminas (5 mL L<sup>-1</sup>), BAP (2 mg L<sup>-1</sup>), AIA (1 mg L<sup>-1</sup>) y carbón activado (0.2%), y las plántulas desarrolladas fueron transferidas a invernadero para su aclimatización, sembradas en sustrato compuesto por peat-moss y piedra volcánica 1:1, durante ≈30 días, o hasta que se observó la aparición de una nueva hoja. En la siguiente etapa de la investigación, se realizó la caracterización morfológica de la embriogénesis somática desarrollada *in vitro*, observando cortes histológicos de las estructuras morfogénicas producidas en los diferentes estadios del desarrollo embriogénico. Para la inclusión de las estructuras, las muestras se fijaron por 24 horas en FAA (formaldehído: ácido acético glacial: etanol 96%: agua destilada =10: 5: 50: 35 v/v/v). Posteriormente deshidratadas en series de etanol (30, 50, 70 y 85 y 96 %). En el último paso de deshidratación se realizaron tres cambios sucesivos, de 45 min cada uno, en etanol absoluto (100 %). Los tejidos deshidratados se infiltraron en resinas plásticas (polímeros), utilizando el Kit JB-4 de Polysciences®, y se realizaron los cortes de 3-7 μm de grosor con microtomo de rotación Microm HM 325, fijándolos en serie sobre portaobjetos por calentamiento en placa (38-40° C), y se tiñeron con azul de toluidina; las observaciones y serie fotográfica se realizaron con microscopio óptico Axioplane Carl Zeiss, caracterizando cada uno de los estadios por los que pasa un embrión somático, desde el inicio de la embriogénesis somática. En la última etapa de la investigación, se diseñó un sistema de conservación de germoplasma a mediano plazo, encapsulando los ESs producidos, en matriz de alginato de sodio+cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 75 mM, para producir semillas sintéticas. Para determinar los factores físicos y químicos que influyen en la germinación y mantenimiento de la viabilidad de las semillas sintéticas almacenadas durante determinados periodos de tiempo, se probaron concentraciones de alginato de sodio (2.0, 3.0 y 4.0 %), sales de MS (37.5, 50 y 100 %) y BAP (0.5, 1.0 y 2.0 mg L<sup>-1</sup>) en la matriz de encapsulación, además de diferentes temperaturas (4, 20 y 25 °C) y tiempos de incubación (15 y 30 días). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó siempre un diseño completamente aleatorizado, con 15 repeticiones por cada tratamiento. Las variables experimentales fueron sometidas a análisis de varianza de clasificación simple mediante el procedimiento de PROC ANOVA del paquete estadístico SAS System (SAS Institute, 1989-1997), Versión 6.12, SAS Institute INC. Cary, NC, USA. Posteriormente, se efectuaron las comparaciones de medias con la prueba de Tukey (α =0.05) (Steel y Torrie, 1980). Se utilizó el programa Excel para presentar los resultados obtenidos en graficas, y el programa STATISTICA (versión) para efectuar un análisis de conglomerados usando la distancia euclidiana y el algoritmo de UPGMA (Unweighted Pair Group Average) y un análisis de componentes principales.

## RESULTADOS

Independientemente de la zona del tallo de donde fueron aisladas, se pudo observar un efecto lineal en la respuesta de las yemas de vainilla a los diferentes tratamientos (Fig. 1a y b), aumentando el número de brotes por explante con el incremento de la concentración de la citoquinina, hasta alcanzar un óptimo (9.55μM de BAP). A partir de esta concentración, la capacidad de emisión de los brotes disminuyó significativamente, como se aprecia en la Figura 1. El mejor tratamiento para la inducción y proliferación de brotes resultó T2, tanto para las yemas provenientes de la Zona 1 como de la Zona 2. Como se aprecia en la Figura 1a, las yemas jóvenes alcanzaron a formar un promedio de 18.57 ± 2.44 brotes por explante, mientras que en las yemas maduras (Figura 1b), alcanzaron un máximo de 11.00 ± 1.04 brotes por explantes. Los resultados obtenidos permiten pronosticar que la tasa de multiplicación de vainilla, considerando que se utilicen todas las yemas (Zona 1 + Zona 2), realizando los subcultivos con una periodicidad de 3 meses, oscilaría entre de 1.86-1.1 x 10<sup>5</sup> para

una producción aproximada de 100,000-150,000 plántulas/ explante/ año. En la Figura 1c se puede apreciar que la capacidad regenerativa de las yemas difiere significativamente, en dependencia de la zona del tallo de donde son aisladas e independientemente de los tratamientos evaluados. Las yemas de la Zona 1 formaron como promedio, 11.2 brotes por explante, mientras que las yemas de la Zona 2 promediaron 6.2 brotes por explante. Estos resultados sugieren que la edad fisiológica de las yemas de vainilla es un factor determinante en la capacidad multiplicativa de la especie.

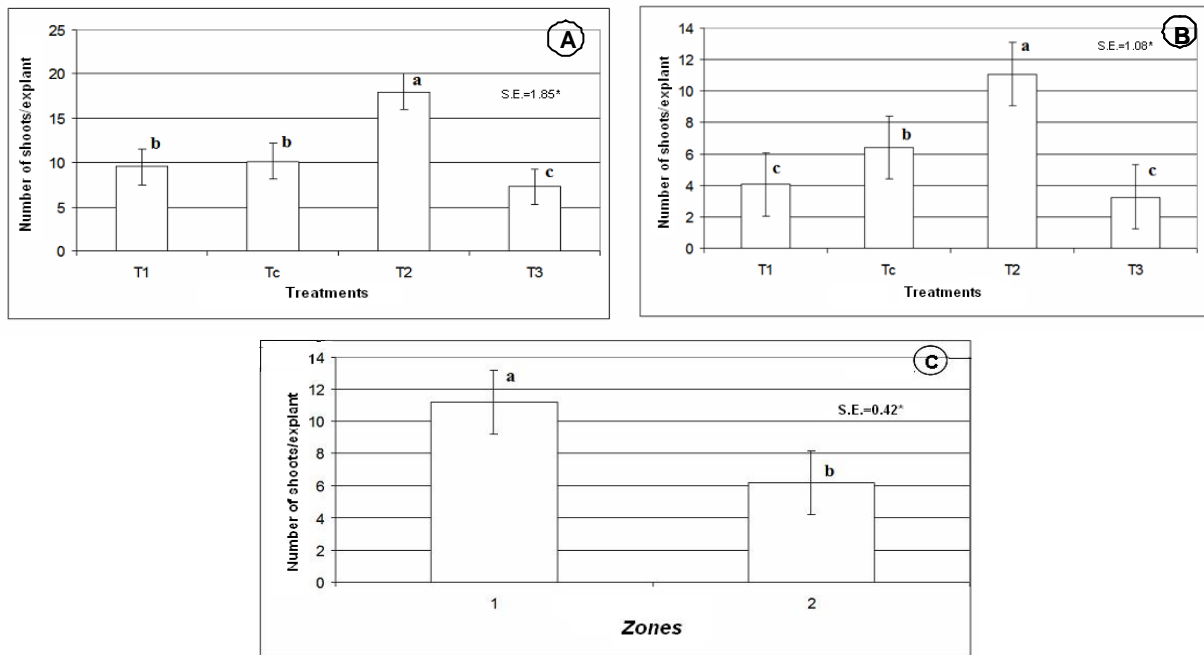


Figura 1. Respuesta de yemas axilares de vainilla (*V.planifolia* Andrews) a diferentes concentraciones de BAP( $\mu$ M): T0=7.64, T1=5.73, T2=9.55 y T3=11.46. : A,B) provenientes de diferentes zonas del tallo; C) yemas Z1 y Z2, independientemente de los tratamientos. Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

El análisis de conglomerado realizado, muestran dos grupos bien definidos (Fig. 2a): El grupo I que estuvo conformado sólo por el tratamiento T2 (9.55  $\mu$ M), que además de su alta homogeneidad, resultó el mejor tratamiento para la formación de brotes, con una media de  $18.57 \pm 2.440501$  de brotes por explante. Mientras que los tratamientos T1 y T3 (5.73 y 11.46  $\mu$ M), así como el control, clasificaron en el grupo II. Este grupo, contrario a T2, resultó muy heterogéneo en su conformación. En el cuadro 1 se presentan las estadísticas descriptivas (valores medios, varianza y desv. estándar) para cada uno de los clusters formados en la Zona 1 y la Zona 2.

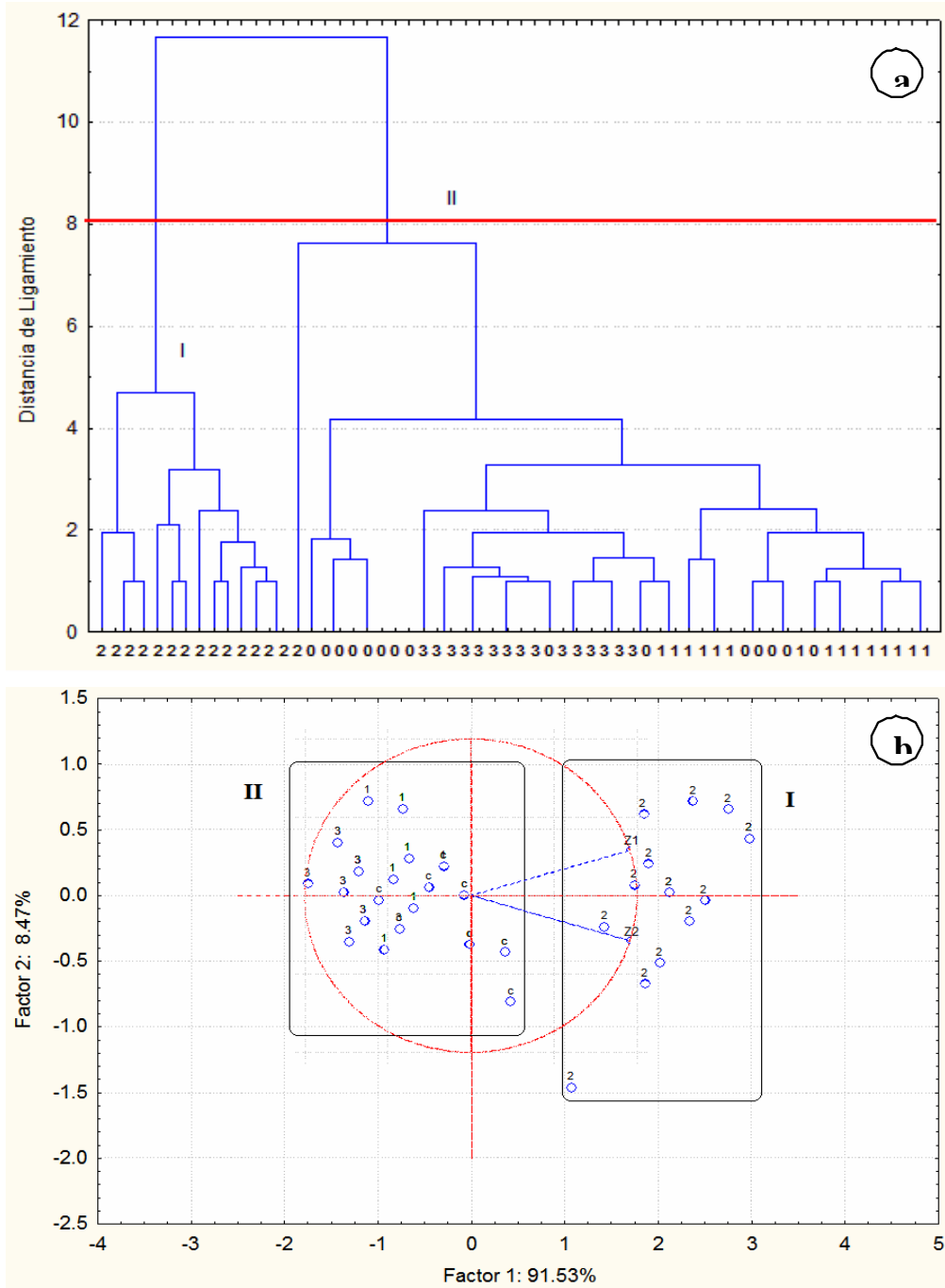


Figura 2. a) Dendrograma del agrupamiento de los tratamientos empleando la distancia euclidiana y el algoritmo de UPGMA; b) Clasificación por análisis de componentes principales de los tratamientos en base a la zona del tallo de donde proviene las yemas. (0=T0; 1=T1; 2=T2; 3= T3)

Cuadro 1. Estadística descriptiva (medias y desviación estándar) de los clusters formados por análisis de conglomerados

	Cluster I	Cluster II
Zone 1	18.57 ± 2.44	9.00 ± 1.61
Zone 2	11.00 ± 1.03	4.74 ± 2.03

En los tratamientos T1 y T3 (BAP 5.73 y 11.46  $\mu\text{M}$ , respectivamente) se obtuvo una menor proliferación de brotes por explante (7.0 y 7.4 brotes por explante, respectivamente); superados por el tratamiento testigo T0 (7.64  $\mu\text{M}$  de BAP), con una tasa promedio de 9.2 brotes/ explante. La Figura 2b permitió corroborar además que, con independencia de la zona fisiológica de donde provengan las yemas, la adición de 9.55  $\mu\text{M}$  de BAP (T2) al medio de cultivo favoreció notablemente la expresión de una mayor capacidad de regeneración y proliferación de brotes de cada yema, comparado con el resto de los tratamientos evaluados. Por otro lado, la tasa de multiplicación obtenida en T2 para vainilla, supera las tasas reportadas a la fecha, para esta misma especie (Cervera y Madrigal, 1981; Philip y Nainar, 1985; Ganesh, *et al*, 1996; George y Ravishankar, 1997; Greetha y Sudheer, 2000; Giridhar y Ravishankar, 2004). Por otro lado, aunque el promedio de brotes obtenidos en el tratamiento T2, a partir de las yemas provenientes de la Zona 1 y la Zona 2 difiere significativamente entre sí (Fig. 1c), los resultados del análisis de componentes principales (Fig. 2b) mostró que el tratamiento T2 fue el que mayor número de brotes por explante indujo en ambas Zonas. De acuerdo con estos resultados se puede concluir que el tratamiento T2 resultó mejor para la inducción y proliferación de brotes en vainilla. Los brotes obtenidos en el tratamiento T2 (9.55  $\mu\text{M}$  de BAP) a los 30 días de cultivo, mostraron un desarrollo vigoroso y hojas verde intenso y brillante, el promedio de brotes/ explante osciló entre 5 y 6.5, en dependencia de la zona del tallo de donde procedieron. A partir de los 45 días se observó un incremento notable en la proliferación y desarrollo de los brotes, alcanzando a los tres meses un promedio de 18.6 brotes/explante. Durante la inducción de raíces en brotes aislados de *Vanilla planifolia*, se observó una relación inversa entre la concentración de la auxina utilizada (ANA) y el desarrollo de la raíz, así a medida que aumentó la concentración de ANA hasta 6.67  $\mu\text{M}$ , disminuyó la longitud de las raíces en los brotes hasta 2.9 mm, en contraste con 29.06 mm de longitud de raíces cuando se utilizaron únicamente 0.445  $\mu\text{M}$ . En *Laelia anceps ssp. dawsonii*, la biomasa formada durante la inducción de callo en los dos medios de cultivo, fue abundante ( $\approx 200$  mg), de consistencia friable, y de coloración verde tenue, con puntos verde intenso dispersos en la masa morfológica, lo que permite inferir la naturaleza embriogénica del proceso, en el medio MS con 2 mg  $\text{L}^{-1}$  de ANA, BAP, AIA. En contraste, con la misma combinación de reguladores del crecimiento en el medio VW únicamente se logró la germinación de las semillas, apreciada por la formación de protocormos (PLBs) sin formación de callo. En el medio MS con ANA y BAP (2 mg  $\text{L}^{-1}$  respectivamente) se formó callo escaso ( $\approx 50$  mg) que degeneró rápidamente para tornarse café-amarillento, con la formación de protocormos aislados, y la misma combinación de reguladores del crecimiento en el medio VW, únicamente se observó germinación de las semillas. Como resultado de la exposición de los callos a fotoperiodo y oscuridad, se observó una mayor eficiencia en la proliferación de callo y formación de embriones somáticos en fotoperiodo de 16 h ( $33.78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). El medio con las sales MS estimuló la formación de 165.2 embriones somáticos en promedio y abundante callo embriogénico de color verde intenso; con el medio KC se formaron en promedio 97.6 ESs. En oscuridad el medio MS logró inducir en promedio 86 embriones y el medio KC sólo 56.6 embriones somáticos. Mientras que, el medio VW presentó menor capacidad morfológica en las dos condiciones evaluadas, apenas 26 en 16 h-luz y en oscuridad únicamente 15.2 embriones somáticos (Figura 3).

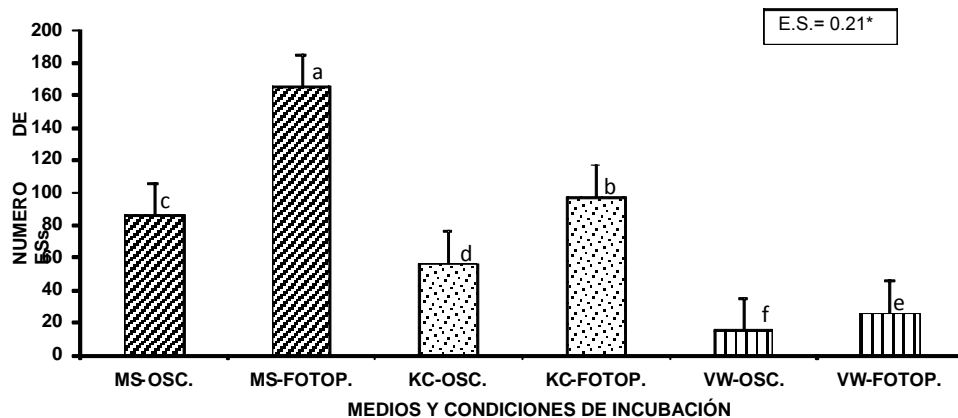


Figura 3. Efecto del medio de cultivo (MS, KC, VW) y las condiciones de incubación (oscuridad; fotoperiodo de 16 h  $33.78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en la proliferación de ESs de *L. anceps ssp. dawsonii*. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes. (Tukey, 0.01)

La respuesta morfogénica siguió un patrón de desarrollo similar al de la diferenciación por embriogénesis somática, descrito para otras especies de orquídeas como *Oncidium* (Chen y Chang, 2000) y *Cymbidium* (Huan *et al.*, 2004). La formación de ESs en los tres medios de cultivo, fue superior en fotoperiodo de 16 h ( $33.78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Estas observaciones demuestran que las condiciones de incubación influyen en la inducción de embriogénesis somática de los callos y la posterior regeneración de embriones somáticos. Respecto a la combinación de las sales MS con el balance auxina-citocinina, se observó que los ESs desarrollados en fotoperiodo tomaron coloración verde intenso con marcada tendencia a formar callo embriogénico, de consistencia friable, ya que al contacto sus estructuras independientes se separaban, presentando ápice radical y caulinar perfectamente definidos lo que demuestra la ocurrencia de embriogénesis somática típica tal como ocurre en las dicotiledóneas en estas condiciones. Los callos mostraron diferente capacidad morfogénica en cada una de las combinaciones de fitohormonas utilizadas, constatando que la capacidad multiplicativa de los ESs alcanzó su máxima eficiencia a las seis semanas de establecido el experimento, en los tres tratamientos probados, aunque con diferencias significativas entre ellos. La combinación ANA y AIA con BAP produjo en promedio 425.75 ESs, por lo que se consideró que produjo la mayor capacidad de multiplicación de los callos embriogénicos obtenida en este experimento, en contraste con la combinación Kin, ANA, BAP, que mostró la menor capacidad de multiplicación con un promedio de 202.75 ESs en el mismo periodo de tiempo; la combinación ANA, BAP, que contenía una citocinina y una auxina, presentó una respuesta intermedia, de 275.5 ESs en promedio; a las cuatro semanas de cultivo, se observó una menor producción de ESs, con promedios de 311, 172 y 245.75 en las combinaciones de fitohormonas: ANA, y AIA, BAP; Kin, ANA, BAP y ANA, BAP, respectivamente. Los callos continuaron proliferando después de su transferencia a los medios de cultivo con las sales de MS, KC y VW, suplementadas con ANA, BAP, AIA ( $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ c/u}$ ), y mantenidos durante diez semanas en cultivo. La mayor formación de ESs (463.5) se alcanzó a las 7.76 semanas de cultivo cuando se utilizaron las sales MS. En los medios de cultivo KC y VW los máximos índices de multiplicación (263.5 y 54.5 embriones somáticos) se obtuvieron a las 8.82 y 6.11 semanas de cultivo, respectivamente. En todos los casos, se observó descenso en el I.M., una vez alcanzado el nivel óptimo, ya que los embriones somáticos inician el proceso de conversión a plántula por carecer de subcultivo a medio fresco lo cual provoca la inhibición del proceso de multiplicación, activando su germinación. El medio de cultivo MS resultó mejoró que los medios KC y VW para inducir proliferación de ESs a partir del callo embriogénico, aunque el período de tiempo en que se logró este efecto fue el más prolongado; en contraste, cuando se efectuaron subcultivos del callo, la multiplicación de los embriones somáticos se elevó considerablemente en el tercer subcultivo; esta tendencia se observó en los tres períodos de tiempo considerados (21, 30 y 45 días) y alcanzó el nivel máximo de multiplicación cuando los subcultivos se realizaron a intervalos de 45 días (Figura 5A). Una vez logrado éste punto de máxima capacidad de multiplicación, se observó en todos los casos, un descenso significativo a los 90 días. El análisis de varianza, mostró diferencias significativas entre el tiempo y el número de subcultivos realizados; a intervalos de 45 días se regeneraron 524 ESs producidos en los tres subcultivos (Figura 5B); asimismo, fue posible detectar diferencias significativas en el número de subcultivos, obteniendo 611 ESs, como el mayor promedio de multiplicación, en el tercer subcultivo (S3), al cabo de 135 días de desarrollo *in vitro*.

El análisis histológico de las secciones transversal y longitudinal de los callos cultivados en el medio de cultivo básico MS suplementado con ANA, BAP, AIA  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno, mostró estructuras embriogénicas en los diferentes estadios, similares morfológicamente a los embriones cigóticos desarrollados (PLBs) durante la germinación de semillas de orquídeas (Shimura y Koda, 2004), sin embargo, mediante el análisis histológico fue posible demostrar que se originaron de callos constituidos por células características del tejido embriogénico, concentradas en el sitio de donde emergen las estructuras embriogénicas típicas. Las estructuras regeneradas del callo, eventualmente se transformaron en ESs independientes, sin conexión vascular entre ellas y el tejido del que provienen. Las observaciones histológicas demuestran que la regeneración de las plantas del callo ocurrió a través de la formación de embriones somáticos y que el callo inducido en este trabajo fue embriogénico. Los ESs formados en la superficie del callo, continuaron su multiplicación y desarrollaron brotes y raíces durante su conversión a plántulas completas, en el medio VW, suplementado con ( $\text{mg L}^{-1}$ ): BAP (2.0), AIA (1.0). Las plántulas (4-5 cm) con brotes y raíces, mostraron un 95 % de sobrevivencia durante su aclimatización. La mejor respuesta a la germinación, de las semillas sintéticas encapsuladas fue observada cuando se utilizó una concentración del 3 % de alginato de sodio en complejo con 75 mM de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . La matriz de encapsulación preparada con las sales de MS al 100 % suplementadas con 1.0 y 2.0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP, permitió un 100 % de conversión de los embriones encapsulados en plántulas después de 25 a 31 días de incubación.

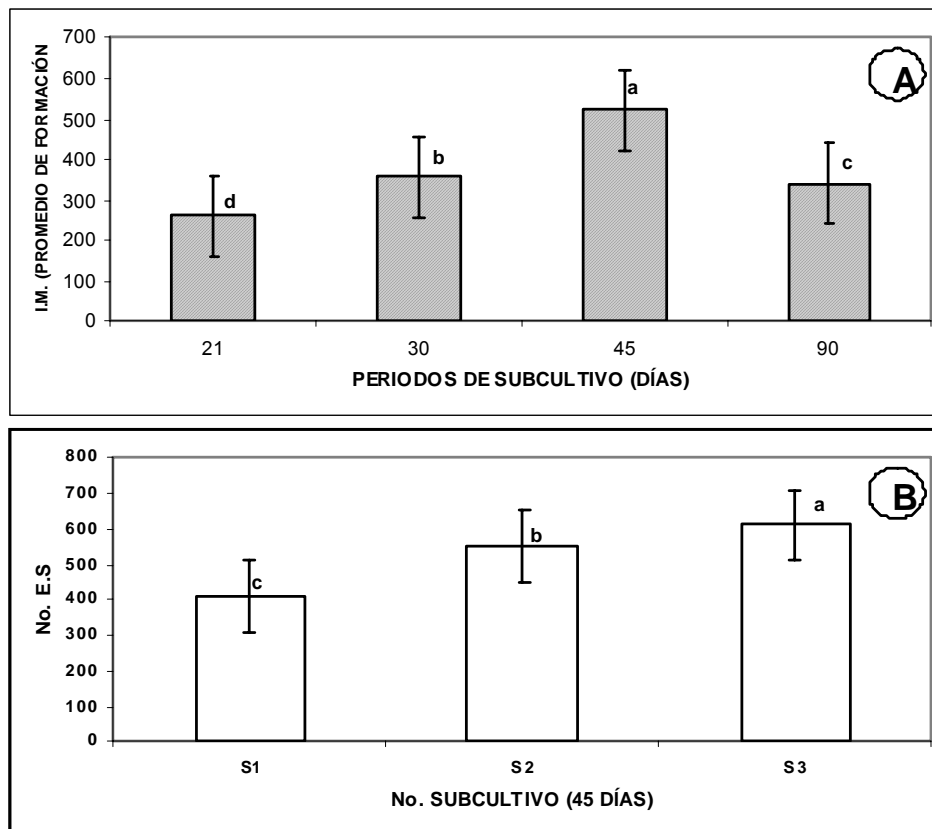


Figura 5. Efecto de tiempos de subcultivo sobre la capacidad multiplicativa de ESs de *L. anceps* ssp. *dawsonii*: A) ESs promedio producidos en 4 tiempos de subcultivo: 21, 30, 45 y 90 días; B) multiplicación de ESs a intervalos de 45 días, durante tres subcultivos sucesivos (135 días)

## DISCUSIÓN

El protocolo propuesto en este estudio permite aprovechar todas las yemas ubicadas entre el ápice y el octavo nudo del tallo (Zona1+ Zona 2), lo que reduce el número de plantas madres sacrificadas. Por otro lado, permite la inducción y proliferación de brotes adventicios en sólo un medio de cultivo (MS+9.55 µM BAP), y elongar y enraizar los brotes aislados, también en un medio (MS+0.44 µM de ANA), independientemente de la procedencia de las yemas (Zona 1 y Zona 2). A partir de las yemas jóvenes (Zona 1), cada 3 meses, es posible obtener  $18.57 \pm 2.44$  brotes por explante, y de las yemas maduras (Zona 2) se obtienen hasta  $11.00 \pm 1.04$  brotes por explantes. Utilizando todas las yemas (Zona 1 + Zona 2) y subcultivos cada 3 meses, es posible pronosticar una tasa de multiplicación para vainilla, que oscila entre  $1.1 - 1.86 \times 10^5$  para una producción aproximada de 100,000-150,000 plántulas por cada yema utilizada, de cada planta madre, por año de cultivo. Hasta la fecha, los protocolos reportados se basan exclusivamente, en el uso de las yemas que se encuentran más cercanas a la zona apical del tallo (1°-3er nudo) (Cervera y Madrigal, 1981; Philip y Nainar, 1985; Ganesh, et al, 1996; George y Ravishankar, 1997; Greetha y Sudheer, 2000; Giridhar y Ravishankar, 2004), lo que implica que la tasa de multiplicación por planta se reduce a la mitad, comparado con el protocolo que estamos proponiendo. Giridhar y Ravishankar (2004), reportaron una tasa de multiplicación de  $17 \pm 2.5$  utilizando combinaciones de BA+Zeatina ó TDZ+ agua de coco (10%), con subsiguientes subcultivos en BA o ANA para la proliferación de los brotes. De manera general, los protocolos reportados requieren de 4 a 6 meses sólo para la inducción y proliferación de los brotes. El establecimiento de procedimientos rápidos, sencillos y con tasas de multiplicación mayores que las obtenidas por los métodos tradicionales, indudablemente son de gran valor tanto para producción de la especie, como para la industria. Las condiciones de incubación y el medio de cultivo,



influyeron en el desarrollo de los callos embriogénicos de *L. anceps ssp. dawsonii*; en oscuridad, se observaron callos pequeños (<5 mm diámetro), particularmente en el medio VW, y presentaron coloración verde blanquecina; el medio KC, en las mismas condiciones, indujo callo más desarrollado (5-8 mm de diámetro promedio) de coloración verde tenue, al igual que los ESs formados en la misma condición en el medio MS, los que mostraron la misma coloración verde tenue observada en el medio KC, pero un mejor desarrollo del callo, cuyo diámetro promedio fue mayor a 8 mm. En fotoperiodo de 16 h ( $33.78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) resultaron mejores para la inducción de callo, en todos los medios de cultivo probados, lo cual va de acuerdo con los reportes de Chen y Chang (2004a) quienes lograron la inducción de callo en PLBs de la orquídea *Cymbidium* con fotoperiodo de 16 h ( $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); los callos de coloración verde intenso, generaron ESs en mayor número y de aspecto vigoroso, que desarrollaron sus primeras hojas y raíces sin necesidad de transferirlos a medio fresco. Se apreció interacción entre los medios de cultivo y las combinaciones de fitohormonas utilizadas, sobre la morfogénesis de *L. anceps ssp. dawsonii*, coincidiendo con Fehér *et al* (2003), quien indica que la embriogénesis somática no puede definirse como una respuesta específica a uno o más reguladores del crecimiento exógenos, ya que existe interacción con los componentes del medio. Sin embargo, las hormonas son los candidatos más viables en la regulación de señales del desarrollo; Huan *et al.* (2004), reportan el importante papel de los reguladores del crecimiento exógenos en la formación de callo embriogénico en la orquídea *Cymbidium*. Las auxinas y las citocininas son los principales reguladores del crecimiento en plantas, involucradas en la regulación de la división y diferenciación celular. De acuerdo a Dudits *et al.*, 1991, el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) es la auxina exógena preferencial para la inducción de embriogénesis somática, aunque, el desarrollo embriogénico ha sido reportado en ausencia de reguladores del crecimiento (Choi *et al.*, 1998) así como en presencia de citocininas y de auxinas como el AIA, el cual en concentraciones relativamente altas ( $1-2 \text{ mg L}^{-1}$ ) ha mostrado estar asociado con el incremento en la respuesta embriogénica de varias especies vegetales (Rajasekaran *et al.*, 1987); en *Oncidium* (Orchidaceae) Chen y Chang (2000) reportaron el uso de auxinas solas y en combinación, sin citocininas, en dosis altas de 3 hasta  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D; asimismo reportan el uso de 2,4-D con TDZ [1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-urea] para inducir callo embriogénico y posteriormente ANA (ácido naftalén-acético) en combinación con TDZ, en explantes de hoja y ápices de raíz, para promover la formación de ESs a partir del callo; en contraste, con *L. anceps ssp. dawsonii* se indujo callo embriogénico y regeneración y proliferación de embriones somáticos, únicamente con ANA y AIA en combinación con las citocininas BAP y Kin. El uso de la combinación BAP con ANA y AIA, indujo la mejor respuesta morfogénica y la multiplicación eficiente de ESs, así como la conversión de los ESs a plántulas; cuando se utilizó una auxina (ANA) en combinación con cualquiera de las citocininas BAP y Kin disminuyó la inducción de callo y el I.M., lo que demuestra que una combinación de fitohormonas a favor de las auxinas, resulta adecuada para la inducción de callo embriogénico, la proliferación de ESs, y la conversión a plántula en *L. anceps ssp. dawsonii*. En nuestro estudio, la conversión a plántulas y desarrollo de raíces en el medio de inducción coincide con Martin (2003) en *Ipsea malabárica* (Reichb .f.) J. D. Hook, una orquídea silvestre amenazada, endémica de la India y Sri Lanka, reporta la inducción de raíces fuertes cuando las plántulas permanecían en el medio de proliferación múltiple. En nuestro caso, lograr la maduración y conversión de los embriones somáticos en plántulas completas en el medio de cultivo MS suplementado con ANA, BAP, AIA ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  c/u), evidentemente con mayor número y tipo de auxinas, puede deberse a que, el uso de combinaciones con más citocininas que auxinas en el medio de iniciación y de multiplicación, pueden inhibir el enraizamiento; George y Sherrington (1984), observaron que, los elevados niveles endógenos de citocininas en algunas especies inhiben el enraizamiento, requiriendo subcultivos sin citocininas a fin de reducirlos y suprimir el bloqueo de su efecto. La regeneración y conversión de plántulas a partir de ESs, dependen tanto de la especie, como de las condiciones de cultivo. En *Oncidium* (Orchidaceae), la expansión secuencial de los embriones y su germinación en PLBs, ocurrió después de 2-3 semanas en el medio de inducción (Chen y Chang, 2000), y en nuestro estudio, para *L. anceps ssp. dawsonii*, la inducción de ESs, su maduración y conversión en plántulas, ocurrió a las 8.82 semanas en el mismo medio de cultivo. De acuerdo a estos resultados, se logró establecer un protocolo completo de regeneración de plantas, y adicionalmente se realizaron subcultivos de los callos inicialmente regenerados, a intervalos de 45 días con fotoperiodo de 16 h ( $33.78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), logrando la formación de 611 ESs, como el mayor promedio de multiplicación, en el tercer subcultivo (S3) a los 135 días de desarrollo *in vitro*. A la fecha, los mayores promedios de formación de ESs reportados para la familia Orchidaceae son de 59.5 (Chen y Chang, 2004a), en *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa Shimadzu, a partir de protocormos, en un proceso de embriogénesis repetitiva en fotoperiodo de 16 h ( $28-36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), y de 134.2 ESs formados en las secciones adaxial, abaxial y terminal de explantes foliares de *Oncidium* (Chen y Chang, 2004b).

## CONCLUSIONES

La mayor proliferación de brotes en *Vanilla planifolia* Andrews fue obtenida con 9.55  $\mu\text{M}$ , con promedios de  $18.57 \pm 2.44$  y  $11.00 \pm 1.04$  brotes/ explante en las zonas 1 y 2, respectivamente. Los brotes aislados produjeron raíces eficientes en  $\frac{1}{2}$  MS y 0.44  $\mu\text{M}$  NAA; la tasa de multiplicación en nuestro sistema es 100,000-150,000 brotes/yema/año, y la eficiencia está dada por el aprovechamiento óptimo de las plantas madres, alto índice de proliferación de brotes, menor número de pasos y el uso de medios de cultivo sencillos en su composición. El protocolo propuesto es el más eficiente reportado a la fecha para *Vanilla planifolia* Andrews, ya que con un aprovechamiento óptimo de las yemas axilares de cada planta madre, se logra una mayor producción de brotes adventicios, por yema y por planta, así como una supervivencia del 100% de las plantas regeneradas. El manejo de las condiciones de cultivo y combinaciones de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo, permitieron la producción de ESs de *L. anceps ssp. dawsonii*, que desarrollaron plantas completas que se aclimatizaron en invernadero. El mayor I.M. de callos embriogénicos se obtuvo con ANA, BAP y AIA, 2 mg L<sup>-1</sup> c/u, adicionados al medio MS. El fotoperiodo de 16 h ( $33.78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), promovió la proliferación de callo embriogénico, y la regeneración de ESs; el mayor promedio de multiplicación (611 ESs por explante), se obtuvo con tres subcultivos a intervalos de 45 días. La combinación de los reguladores de crecimiento ANA, BAP, AIA, 2 mg L<sup>-1</sup> c/u, en el medio MS, permite la maduración y conversión de embriones somáticos en plántulas completas, y elimina la necesidad de realizar la fase de enraizamiento *in vitro*, lo cual reduce el tiempo de laboratorio a campo, bajando costos de producción. La caracterización histológica demostró que la regeneración de plántulas de *L. anceps ssp. dawsonii* ocurrió a través de embriogénesis somática, fue posible observar estructuras bipolares sin conexión vascular con el tejido materno y presentando los diferentes estadios por los que pasa un embrión durante el desarrollo. Estos resultados constituyen el primer protocolo de regeneración a través de embriogénesis somática reportado para *Laelia anceps ssp. dawsonii*, caracterizado por ser relativamente rápido y no implica el uso de medios de cultivo muy diversos, simplificando el sistema.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Biólogo Antonio Bustos M., por proporcionar las plantas de *Laelia anceps ssp. dawsonii*; Unión de Productores de Vainilla de Papantla, Ver., por el material vegetal de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews); la Universidad Veracruzana por el soporte financiero, y al PROMEP como patrocinador de la beca para estudios doctorales.

## LITERATURA CITADA

- Avila, I. y R. Salgado. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de Hidalgo (Ed.). 8:138-149.
- Cervera, E. y R. Madrigal. 1981. In vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* A.). Environ. Exp. Bot. 21:441. (abstr.).
- Cheng, J.T. y W.C. Chang. 2004a. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa Shimadzu. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 40:290-293.
- Cheng, J.T. y W.C. Chang. 2004b. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79:315-320.
- 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Science 160:87-93.
- Choi, Y.E., D.C. Yang, J.C. Park, W.Y. Soh y K.T. Choi. 1998. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. Plant Cell Rep. 17:544-551.

- Dudits, D.L., Bögre, y J. Györgyey. 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. J. Cell Sci. 99:475-484.
- Fehér A, T.P. Pasternak y D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74:201-228.
- Ganapathi, T.L. 2001. Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. rasthali (Musa spp. AAB group). D. Cantliffe, (ed.) In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 37:178-181.
- Ganesh, D.S., H.L. Sreenath, y G. Jayashree. 1996. Micropropagation of vanilla through node culture. J. Plantation Crops 24:16-22.
- Geetha, S. y A.S. Sudheer. 2000. In vitro propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. Curr. Sci. 79:886-889.
- George, P.S. y G.A. Ravishankar. 1997. In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. Plant Cell Rep. 16:490-494.
- George, E.F. y P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Eversley, England. 1333 p.
- Goh, C.J. 1983. En: S.K. Sen and K.L. Giles (eds.). Plant cell culture in crop improvement. Plenum Press, New York, p. 319-336.
- Huan, L.V., T. Takamura y M. Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. Plant Science 166:1443-1449.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. Am. Orchid Soc. Bull. 15:214-217.
- Laws, N. 2002. Orchid commerce around the world. Floraculture International, (D. Hamrick, Ed.) 10:28-29.
- Martin, K.P. 2003. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (Reichb .f.) J.D.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Diario Oficial (6 de marzo 2002), México, D.F.
- Philip, V.J. y A.Z. Nainar. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. J. Plant Physiol. 122:211-215.
- Potisek, M C, M. Sarmiento y L.N. Puc. 1996. Germinación de semillas y su establecimiento in vitro de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stamfordianum* Batem. INIFAP. CIR-SURESTE (Eds.) Campeche, Camp. México. 1:187-192.
- Rajasekaran, K., M.B. Hein, G.C.Davis, M.G. Carnes y I.K. Vasil. 1987. Exogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. J. Plant Physiol. 130:13-25.
- Santos-Hernández, L.M., J.E. Martínez-García, y E. Aguirre-León. 2005. In vitro Propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for Conservation and Ornamental Purposes in México. HortScience 40(2):439-442.
- SAS System 1989-1997 Version 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Soto, M. A. 1993. Clasificación infraespecífica de *Laelia anceps*. Orquídea (Méx.) 11:233-277.

STATISTICA (1998) STAT SOFT Inc. Statistica for Windows, Version 5 (Computer program manual). Statistica: user guide. 2325 East 13th Street, Tulsa, Ok. 74104. USA.

Steel, R. G. y J. H Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach. 2<sup>nd</sup> Mc Graw Hill (Eds.). New York. 633 p.

Vacin, E. F. y F. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Botanical Gazette, 110: 605-613.