

Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*

In vitro germination of *Vanilla planifolia* and *V. pompona* hybrids

Rebeca A. Menchaca G. *, José M. Ramos P. *, David Moreno M. *, Mauricio Luna R. *, Martín Mata R. *, Luis Miguel Vázquez G. *, Miguel A. Lozano R. *

Resumen

El cultivo de la vainilla se lleva a cabo ampliamente por medio de propagación clonal, de manera asexual por cortes de tallos y la producción de frutos se realiza por autopolinización. Esta práctica inhibe la variación genética y la emergencia de nuevos individuos por recombinación sexual. Por lo anterior, se considera necesario realizar cruza por propagación sexual entre especies para obtener nuevos individuos con características deseables para el cultivo. En el presente trabajo se obtuvieron híbridos de dos especies de vainilla como parte de un programa de mejoramiento genético. En general, las semillas híbridas obtenidas que presentaron mayor porcentaje de germinación fueron interespecíficas de *V. planifolia* ♂ y *V. pompona* ♀ (85%), seguido de la cruce inversa *V. planifolia* ♀ y *V. pompona* ♂ (57,9%). Las semillas producto de *V. pompona* autopolinizada obtuvieron valores muy bajos de germinación (10,8%), mientras que las obtenidas de *V. planifolia* autopolinizada no presentaron germinación. El medio de cultivo más eficiente en todos los tratamientos fue el Murashige & Skoog (MS) adicionado con 400 mg/L⁻¹ de glutamina y 80 mg/L⁻¹ de sulfato de adenina.

Palabras clave: vainilla, mejoramiento genético, híbridos de vainilla, germinación *in vitro*, *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona*.

Abstract

The cultivation of vanilla is extensive clonal asexual propagation by cuttings and fruit production by artificial self-pollination. This feature tends to inhibit the genetic variation and the emergence of new individuals by sexual recombination. Therefore, sexual propagation between species it is considered necessary to obtain new individuals with desirable characteristics for cultivation. In this paper we were able to obtain hybrids of two species of vanilla. In general, the hybrids seeds obtained whit the higher germination percentage were interspecific crosses of *V. planifolia* and *V. pompona* (85%), followed by reverse cross *V. planifolia* and *V. pompona* (57.9%). Seeds obtained of *V. pompona* self-pollination were very low germination (10.8%) while those obtained from *V. planifolia* self-pollination showed no germination in any media culture. The most efficient medium for all treatments was the Murashige & Skoog (MS) supplemented whit 400 mg/L⁻¹ glutamine and 80 mg/L⁻¹ of adenine sulfate.

Key words: Vanilla, breeding, vanilla hybrids, *in vitro* germination, *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona*.

Recibido: septiembre 10 de 2009 **Aprobado:** mayo 30 de 2011

* Posgrado en Ecología Tropical, Centro de Investigaciones Tropicales (Citro), Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver., México. ornamentales130@yahoo.com.mx

Introducción

La vainilla es una planta tropical perteneciente a la familia *Orchidaceae* de la que se obtiene uno de los saborizantes más populares en el mundo. A pesar de ser una especie de cultivo, la vainilla (*Vanilla planifolia*) 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), la especie también ha sido considerada como amenazada por el escaso número de individuos silvestres y, aun siendo México su centro de origen, se encuentra en amenaza de extinción en esta región (Semarnat, 2002; Duval *et al.*, 2006), por lo que son importantes el rescate y la conservación del material de vainilla existente de los individuos de cultivo, así como de las especies silvestres cercanas, además de la generación de diversidad genética mediante la hibridación interespecífica (Soto-Arenas, 1999).

Los fungicidas utilizados en los cultivos de vainilla contra patógenos como *Fusarium spp* han perturbado el ciclo de interacción entre hongos micorrizógenos nativos que integran la rizósfera de la vainilla, y que son necesarios para su germinación, provocando una ocasional y casi nula reproducción por semilla en la naturaleza y probablemente una disminución en la capacidad de absorción de nutrientes por las raíces adventicias (Soto-Arenas, 2006), por lo que se considera necesario establecer un programa integral de conservación que contemple tanto a las especies del género *Vanilla* como a sus hongos micorrízicos y poder incorporar micorrizas en estrategias de conservación (Porras-Alfaro y Bayman, 2007).

El cultivo tradicional de la vainilla se realiza a partir de segmentos cortados de tallo (clones), ocasionando que no se presente variación genética entre individuos, esta práctica ha causado que las plantaciones sean susceptibles al ataque de plagas y enfermedades, en particular por la pudrición de la raíz causada por *Fusarium batatis var. vanillae* Tucker y la antracnosis causada por *Calospora vanillae* (Divakaran *et al.*, 2006).

Otro problema que presenta la vainilla es el escaso número de insectos polinizadores, que se han reducido por la aplicación de plagicidas (Coro, 2009), por lo que cada flor tiene que ser autopolinizada manualmente para formar un fruto, lo que implica una mayor inversión en mano de obra para el cultivo (Soto-Arenas, 1999).

Los programas de mejoramiento genético de vainilla han sido muy limitados. Sin embargo, existen especies que pudieran aportar rasgos deseables; según Soto (1999), las especies más interesantes para llevar a

cabo un programa de cruza son: *Vanilla phaeantha*, *V. insignis*, *V. odorata* y *V. pompona*, particularmente esta última puede ser de gran utilidad debido a que produce frutos grandes, robustos y fuertemente fragantes, es una planta muy vigorosa y xerofítica y, a diferencia de otras especies, puede crecer en zonas graníticas tanto volcánicas como calcáreas, mantiene un gran número de frutos hasta la cosecha y es polinizada naturalmente con mayor frecuencia que *V. planifolia*, lo que implica ahorro en el cultivo (Childers, 1959, citado en Soto, 1999).

La germinación de semillas de vainilla, y su posterior propagación vegetativa, permitirían sentar las bases de un banco de germoplasma *in vitro* estableciendo líneas con potencial de mejora tanto en sus características vegetativas como de resistencia a plagas y enfermedades.

Por otro lado, el desarrollo de programas de hibridación podría permitir a futuro la incorporación en las plantaciones de rasgos deseables que se pudieran encontrar en las plantas silvestres tales como: porcentajes más altos de autopolinización, resistencia a algunas enfermedades, etc. (Soto, 1999).

En el presente trabajo se planteó como objetivos lograr obtener híbridos interespecíficos de *V. planifolia* y *V. pompona* por polinización manual, y determinar el medio de cultivo adecuado para su germinación, caracterizando las variables porcentaje e índice germinativo.

Materiales y métodos

El trabajo de campo se realizó en abril de 2008, en la localidad de Taracuán, municipio de Papantla, Veracruz, en México, en una plantación comercial de la productora Norma Vallejo. Se seleccionó este sitio dado que las dos especies se encontraban establecidas alternadas en el cultivo y presentaron además floración simultánea. El sitio está localizado a 60 msnm y 20° 27" de latitud norte y 97° 19" de longitud oeste, con temperatura media anual de 20,8 °C, y precipitación pluvial media anual 1,160 mm. La fase de germinación *in vitro* se llevó a cabo en el laboratorio de conservación y propagación de orquídeas del Centro de Investigaciones Tropicales (Citro) de la Universidad Veracruzana en Xalapa.

Polinización. Las cruza de *Vanilla planifolia* y *V. pompona* se realizaron a través de polinización manual controlada, en las primeras horas de la mañana, debido a lo efímero de la floración. Según el donador del polen o gameto masculino (♂) y el donador de óvulos

o gametos femeninos (♀), se logró obtener frutos de 4 condiciones diferentes: 1) *V. planifolia* autopolinizada; 2) *V. planifolia* ♀ y *V. pompona* ♂; 3) *V. planifolia* ♂ *V. pompona* ♀; 4) *V. pompona* autopolinizada.

Colecta de frutos. Los frutos de cada cruce fueron cortados a los 44 días después de la polinización (ddp) según lo recomendado por Parra (1987), transportados en bolsas de papel encerado y mantenidos en refrigeración a 5 °C, sin que pasaran más de 24 h antes de su siembra.

Desinfección. Los frutos se lavaron en una solución jabonosa y se enjuagaron con agua corriente dos veces, retirando cuidadosamente los restos florales de los extremos, posteriormente se colocaron en una solución de blanqueador comercial al 3% (0,18 NaClO) durante 15 min, seguido de un baño en alcohol etílico 96° por 10 min, finalmente se colocaron en una caja de Petri y se flamearon 2 veces antes de la siembra.

Siembra. Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, los frutos se disectaron longitudinalmente con la ayuda de un bisturí y se extrajeron las semillas de la parte media para su siembra.

Medios de cultivo. Se utilizaron 4 medios de cultivo (tabla 1).

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados

| | | |
|---|-----|---|
| 1 | BM1 | Terrestrial orchid medium (Phytotechnology Labs B141) |
| 2 | BM2 | Terrestrial orchid medium +.2 mg/L ⁻¹ de BA (Phytotechnology Labs B 142) |
| 3 | KC | Knudson C (1946) (Phytotechnology Labs K400) |
| 4 | MS | Murashige & Skoog (1962) + 400 mg/L ⁻¹ de glutamina y 80 mg/L ⁻¹ de sulfato de adenina (Phytotechnology Labs M 519) |

Todos los medios fueron adicionados con 20 g/L⁻¹ de sacarosa (D-Sucrosa) (Phytotechnology Labs S391), el pH fue ajustado a 5,6 con 0,1 N de HCl o NaOH, se adicionaron 2 g/L⁻¹ de Gelrite (Phytotechnology Labs G469), y fueron esterilizados en autoclave a 120 °C por 15 min y 15 lb de presión.

Los frutos obtenidos de las 4 cruces fueron sembrados en los 4 medios descritos, resultando un total de 16 tratamientos (tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos utilizados para evaluación de la germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*

| Frutos | Medios de cultivo | | | |
|-------------|-------------------|------|-----|-----|
| | BM1 | BM2 | KC | MS |
| 1 Vpl ♀♂ | 1BM1 | 1BM2 | 1KC | 1MS |
| 2 Vpl♀ Vpo♂ | 2BM1 | 2BM2 | 2KC | 2MS |
| 3 Vpo♀Vpl♂ | 3BM1 | 3BM2 | 3KC | 3MS |
| 4 Vpo♀♂ | 4BM1 | 4BM2 | 4KC | 4MS |

Vpl: *Vanilla planifolia*, **Vpo:** *Vanilla pompona*.

Se utilizó un frasco de cultivo como unidad experimental con 10 repeticiones por tratamiento.

Incubación. Los frascos de cultivo se incubaron en un cuarto con temperatura controlada 25±2 °C y con un fotoperiodo de 16 h luz con una intensidad lumínica de 164 fc.

Registro de datos. El porcentaje de germinación e índice germinativo fueron registrados a los 100 días después de la siembra. La cuantificación de la germinación se efectuó siguiendo las fórmulas propuestas por Arditti modificado por Pierik *et al.* (1988):

Porcentaje de germinación (%G)

$$100 \times [(b+c+d)] / [a+b+c+d]$$

Índice de germinación (IG)

$$10(1b+2c+3d) / a+b+c+d$$

Las letras a, b, c y d indican la frecuencia de cada etapa de crecimiento y desarrollo del embrión.

Por tanto, a = Etapa no germinativa; b = El embrión crece o se hincha sin romper la cubierta; c = El embrión emerge de la cubierta seminal; d = El embrión emerge totalmente de la cubierta seminal.

Como indican Pierick *et al.* (1988), en esta forma de evaluación el índice de germinación se deriva del porcentaje de cada etapa de crecimiento y desarrollo del embrión, y nos da una idea de la velocidad germinativa así como de la presencia y proporción de cada una de las etapas de desarrollo inicial, ya que a mayor IG

mayor presencia de las etapas germinativas más avanzadas en el desarrollo.

Evaluación estadística

Previo al análisis estadístico se realizó la transformación angular (arco seno) para los datos de porcentaje de germinación, para el Índice Germinativo los datos se transformaron con la fórmula de $\sqrt{x+0,5}$ (según lo recomendado por Ruiz et al., 2008). Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (Anova) para las variables %G e IG, y se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Los análisis se realizaron en el paquete estadístico Statistica versión 7 (Statsoft).

Resultados y discusión

Las cruzas entre especies diferentes del género *Vanilla* fueron compatibles, lo cual también fue observado por Mino et al. (2008). Las semillas comenzaron a presentar ruptura de la testa y emergencia del embrión aproximadamente a los 40 días después de la siembra, lo cual coincide con Granados (1991) para semillas de 44 ddp.

El análisis de varianza de los datos transformados mostró diferencias significativas entre los tratamientos (medios de cultivo) y entre frutos a un nivel de significancia $p < 0,05$ para las variables analizadas (%G e IG).

En general, las semillas de los frutos que presentaron mayor porcentaje de germinación fueron los híbridos de cruza interespecíficas, en comparación con las autopolinizaciones; entre ellos, las semillas del fruto 3 que presentaron los valores más altos de germinación (85%) corresponden a *Vanilla planifolia* ♂ x *V. pompona* ♀, seguido del fruto 2 que corresponde a la crusa inversa *Vanilla planifolia* ♀ y *V. pompona* ♂ (57,9%). Las semillas del fruto 4 producto de *V. pompona* autopol-

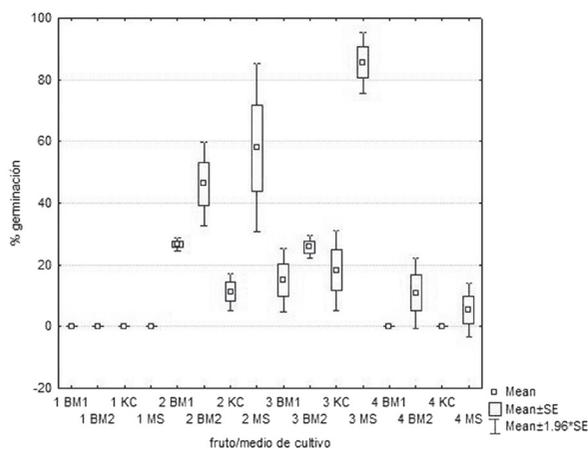


Figura 1. Porcentaje de germinación por fruto en cada medio de cultivo.

nizada obtuvieron valores muy bajos de germinación (5,3%), mientras que el fruto 1 producto de la autopolinización de *V. planifolia* no presentó germinación en ninguno de los tratamientos en el presente trabajo (figura 1).

Respecto a la variable respuesta Índice Germinativo los resultados fueron muy similares sobresaliendo el fruto 3 en el medio MS, el cual mostró diferencias entre los demás tratamientos (figura 2).

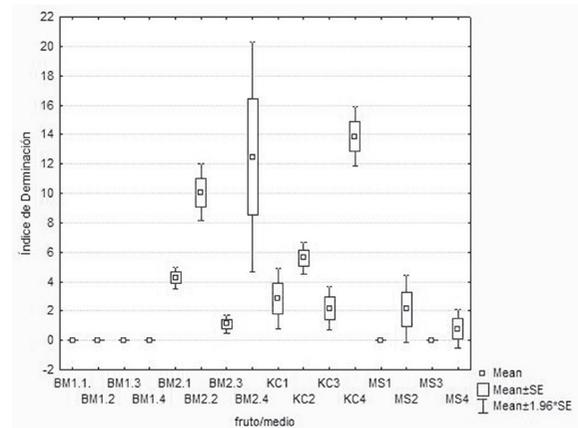


Figura 2. Índice de germinación por fruto en cada medio de cultivo.

Las plantas híbridas presentaron mayor vigor que las plantas producto de autopolinización (figura 3).

Efecto del medio de cultivo

El medio de cultivo que presentó los valores más altos en cuanto a las variables porcentaje e índice germina-

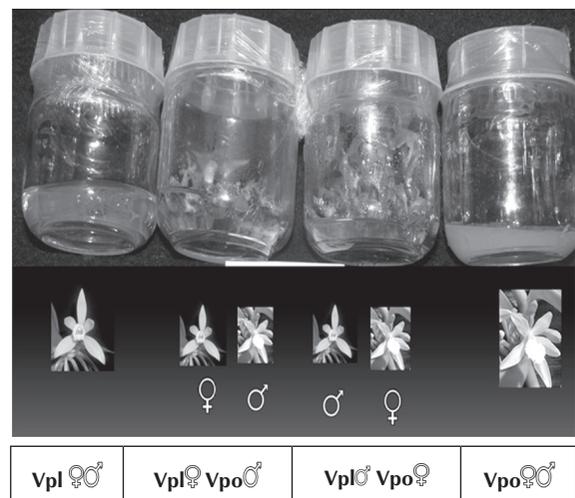


Figura 3. Efecto de las diferentes cruza (frutos) en el medio de cultivo que presentó mayor porcentaje de germinación (MS).

tivo fue el MS adicionado con 400 mg/L⁻¹ de glutamina y 80 mg/L⁻¹ de sulfato de adenina, lo cual coincide con Parra (1987), Granados (1991) y Moreno (2006), seguido por el medio BM2 y BM1.

Por otro lado, el medio Knudson C presentó los valores más bajos en las variables estudiadas; a este respecto, Knudson (1950) y Delassus (1963) (citados en Parra, 1987) mencionan que los híbridos de *V. pompona* y *V. planifolia* son difíciles de obtener, sin embargo, en ambos casos los autores utilizaron el medio Knudson, el cual en el presente trabajo presentó, además de bajos porcentajes de germinación, notable clorosis en todos los tratamientos, lo cual coincide con Parra (1987), por lo que se deduce que probablemente este medio de cultivo no posee los requerimientos nutricionales adecuados para la germinación de *Vanilla*.

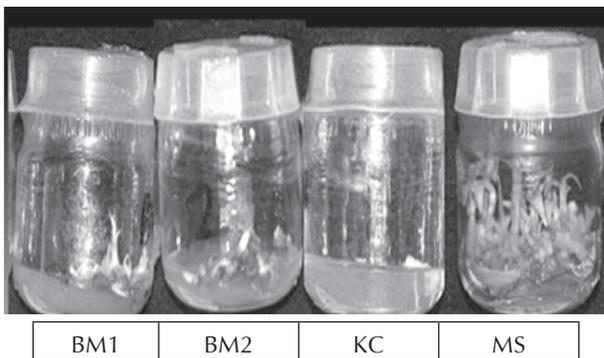


Figura 4. Efecto de los diferentes medios de cultivo en las semillas que presentaron mayor porcentaje de germinación (fruto 3 Vpo®Vpl®).

Conclusiones

Es posible obtener híbridos de *Vanilla planifolia* x *V pompona* y su retrocruza con altos valores de germinación.

Se recomienda el uso del medio MS adicionado con 400 mg/L⁻¹ de glutamina y 80 mg/L⁻¹ de sulfato de adenina, para la germinación de híbridos de *Vanilla*.

Las cruza interespecíficas de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona* expresan vigor híbrido y proporcionan alternativas para programas de mejoramiento genético aportando nuevas características al cultivo con potencial ecológico y económico.

Agradecimientos

A la productora Norma Vallejo de Papantla, Veracruz, México, por permitir realizar las polinizaciones y por no abandonar el cultivo de la vainilla. A la Red Vai-

nilla del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos Sinarefi-Sagarpa y a CONACyT por el financiamiento otorgado para la investigación.

Referencias bibliográficas

- Coro Arizmendi. 2009. La crisis de los polinizadores. *Biodiversitas*, 85.
- Divakaran, M., Babu, N., Ravindran, P. N., Peter, K. V. 2006 Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*, 108: 414-422.
- Duval, M., Bory, S., Andrzejewski, S., Grisoni, M., Besse, P., Causse, S. et al. 2006. Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. *Les Actes du BRC*, 6: 181-196.
- FAO. 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.
- Granados, F. J. C. 1991. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de un híbrido de *V. planifolia* x *V. pompona*. Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados Chapingo, México.
- Minoo, D., Jayakumar, N., Veena, S., Vimala, J., Basha, A., Saji, K. 2008. Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD Polymorphism. *Genet Resour Crop Evol*, 55: 459-470.
- Moreno, R. Y. 2006. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de *Vanilla planifolia*. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana.
- Parra, Q. R. 1987. Cultivo *in vitro* y anatomía de óvulos de Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
- Pierick, R. L., Sprenkels, P. A., van der Meyers, Q. C. 1988. Seed germination and further development of plantelets of *Paphiopedilum cilioare in vitro*. *Sci. Hort.*, 39: 139-153.
- Porras-Alfaro, A., Bayman, P. 2007. Mycologia Mycorrhizal fungi of Vanilla diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99 (4): 510-525.
- Ruiz, B. C., Laguna, C. A., Iglesias, A. L., Damon, A., Marín, H. T., Azpíroz, R. H., Moreno, M. J. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula*. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, BA Argentina.
- Semarnat. 2002. Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) de Protección especial de especies nativas de México de Flora y Fauna silvestres. *Diario Oficial de la Federación*, marzo 6.
- Soto-Arenas, M. A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín AC. Informe final SNIB-Conabio, proyecto J101. México D. F.
- Soto-Arenas, M. A. 2006. Los retos de un cultivo basado en una especie amenazada con una historia de vida compleja. Memoria del Congreso Internacional de Productores de Vainilla. Papantla, Veracruz, mayo.