

**CONSERVACIÓN *in vitro*  
A MEDIANO PLAZO DE VAINILLA  
(*Vanilla planifolia* Andrews;  
Orchidaceae)**

**MEDIUM-TERM *in vitro*  
CONSERVATION OF VANILLA  
(*Vanilla planifolia* Andrews;  
Orchidaceae)**

**Cisneros-Marrero, I.V.; C.L. Miceli-Méndez A.G. Rocha-Loredo, M.Á. Peralta-Meixueiro y M.A. López-Miceli**

CONSERVACIÓN *in vitro* A MEDIANO PLAZO DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Andrews; Orchidaceae)

MEDIUM-TERM *in vitro* CONSERVATION OF VANILLA (*Vanilla planifolia* Andrews; Orchidaceae)



**Conservación *in vitro* a mediano plazo de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews; Orchidaceae)****Medium-term *in vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews; Orchidaceae)**

Cisneros-Marrero, I.V.;  
C.L. Miceli-Méndez  
A.G. Rocha-Loredo,  
M.Á. Peralta-Meixueiro  
y M.A. López-Miceli

CONSERVACIÓN *in vitro* A  
MEDIANO PLAZO DE  
VAINILLA (*Vanilla planifolia*  
Andrews; Orchidaceae)

MEDIUM-TERM *in vitro*  
CONSERVATION OF  
VANILLA (*Vanilla planifolia*  
Andrews; Orchidaceae)

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 57: 145-155. Enero 2024

DOI:  
10.18387/polibotanica.57.8

**Ingrid Viridiana Cisneros-Marrero**

<https://orcid.org/0009-0002-7018-8160>

**Clara Luz Miceli-Méndez** / [clara.miceli@unicach.mx](mailto:clara.miceli@unicach.mx)

<https://orcid.org/0009-0006-9492-7609>

**Ana Guadalupe Rocha-Loredo**

<https://orcid.org/0000-0003-2284-9622>

**Miguel Ángel Peralta-Meixueiro**

<https://orcid.org/0000-0002-2100-7821>

**Mario Alberto López-Miceli**

<https://orcid.org/0009-0007-9582-7615>

Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

**RESUMEN:** *Vanilla planifolia* Andrews, es una especie Sujeta a Protección Especial, que requiere la generación de estrategias de conservación novedosas, como la conservación *in vitro* a mediano plazo, permitiendo alargar los intervalos entre subcultivos, manteniendo la capacidad para reactivar las tasas de crecimiento. En este sentido los trabajos dedicados a la conservación *in vitro* a mediano plazo de vainilla se encuentran enfocados principalmente en el uso de agentes osmóticos, no obstante, los inhibidores de crecimiento son, un mecanismo promisorio cuyo uso debe evaluarse, ejemplos de ello son el ácido abscísico (ABA) y cloruro de cloromequat (CCC), que se han ensayado con éxito en otras especies, sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre los efectos de su interacción en vainilla. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la interacción de diferentes concentraciones de ABA (0, 1.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>) y CCC (0, 1, 2, 4 y 6 mg L<sup>-1</sup>) adicionados al medio Murashige y Skoog (MS) al 75%, en la inhibición de la morfogénesis en el cultivo *in vitro* de microestacas de *Vanilla planifolia*, de 1.5 cm de longitud, sometidas a un fotoperiodo de 16/8 horas luz/obscuridad, a 25 ± 2 °C a 2000 lux de intensidad lumínica durante 200 días, evaluando para ello la longitud total de las plántulas, el número de brotes, hojas, raíces y porcentaje de supervivencia, obteniendo los mejores resultados en el tratamiento 3.0: 2.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA/CCC (T 12) debido a que presentó una supervivencia del 100%, 1.90 cm de longitud total, 0.44 brotes, 1.88 hojas y 1.64 raíces, por lo que, la combinación de los reguladores permitió la conservación *in vitro* a mediano plazo de *V. planifolia* al reducir el crecimiento y desarrollo de las plántulas sin afectar su sobrevivencia.

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

**ABSTRACT:** *Vanilla planifolia* Andrews, is a species subject to special protection, which requires the generation of novel conservation strategies, such as medium-term *in vitro* conservation, allowing for longer intervals between subcultures, while maintaining the ability to reactivate growth rates. In this sense, works dedicated to the medium-term *in vitro* conservation of vanilla are mainly focused on the use of osmotic agents, nevertheless, growth inhibitors are a promising mechanism whose use should be evaluated, examples of which are abscisic acid (ABA) and chlormequat chloride (CCC), which have been successfully tested in other species, however, so far there are no reports on the effects of their interaction in vanilla. Therefore, the present study aimed to determine the effect of the interaction of different concentrations of ABA (0, 1.5 and 3 mg L<sup>-1</sup>) and CCC (0, 1, 2, 2, 4 and 6 mg L<sup>-1</sup>) added to Murashige and Skoog (MS) medium at 75%, on the inhibition of morphogenesis *in vitro* culture of *Vanilla*

*planifolia* microstakes, 1.5 cm in length, subjected to a photoperiod of 16/8 hours light/dark, at  $25 \pm 2$  °C at 2000 lux light intensity for 200 days, evaluating the total length of the plantlets, the number of shoots, leaves, roots and survival percentage, the best results were obtained in treatment 3.0: 2.0 mg L<sup>-1</sup> of ABA/CCC (T 12) because it showed 100% survival, 1.90 cm total length, 0.44 shoots, 1.88 leaves and 1.64 roots. Therefore, the combination of the regulators had a synergistic effect that allowed the medium-term *in vitro* conservation of *V. planifolia* by reducing the growth and development of the seedlings without affecting their survival.

**Key words:** abscisic acid, chlormequat chloride, reduced growth.

## INTRODUCCIÓN

La especia vainilla se obtiene de los frutos beneficiados de diversas especies del género *Vanilla*, una de estas es *V. planifolia* Andrews, que representa cerca del 95% de los frutos comercializados (Bory *et al.*, 2008; Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014). La especie es originaria de las selvas tropicales del sureste de México y América Central (Bello-Bello *et al.*, 2015), siendo considerado México como su centro de origen y domesticación (Rodríguez-Deméneghi *et al.*, 2023). Sin embargo, su polinización y germinación en ambientes naturales es baja. Aunado a ésto, las poblaciones naturales han sido diezgadas por la recolecta excesiva e ilegal, provocando que se encuentre en vía de extinción en su hábitat natural, razón por la que es considerada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 “Sujeta a Protección Especial (Pr)” (Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010; Bello-Bello *et al.*, 2015; Bonilla *et al.*, 2015; Lozano-Rodríguez *et al.*, 2015).

Con base a lo anterior, es necesario el desarrollo de estrategias para la conservación de esta especie. Actualmente, la conservación *ex situ* es considerada como la mejor opción, debido al deterioro del hábitat por la tala inmoderada y el cambio de uso de suelo (Menchaca & Lozano, 2018), además de ser una opción para preservar algunas especies vegetales (Reed *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2020). Los bancos de germoplasma son un método tradicional de conservación *ex situ*, sin embargo, no son una buena opción de conservación para todas las especies (Engelmann, 2011; Coelho *et al.*, 2020). Mientras que el método de colecciones de campo tiene como limitante el de requerir un considerable espacio físico y un alto costo para el mantenimiento, control de plagas y enfermedades (Bello-Bello *et al.*, 2014; Coelho *et al.*, 2020). Por lo tanto, los métodos biotecnológicos como la conservación *in vitro* a corto (crecimiento activo), mediano (crecimiento lento) y largo plazo (crioconservación) pueden considerarse mejores alternativas (Coelho *et al.*, 2020).

Respecto al método a mediano plazo como es el de crecimiento lento, los explantes permanecen por 6 meses o hasta por 12 meses en cultivo *in vitro* (Rayas *et al.*, 2002; Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010). Este método se basa en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta, con la finalidad de incrementar el plazo de tiempo entre subcultivos, para disminuir los riesgos de contaminación por el subcultivo constante, sin que se produzcan cambios genéticos y se logre mantener la diversidad genética de una especie bajo condiciones estériles sin poner en peligro la estabilidad de la planta (Shibli *et al.*, 2006).

A nivel mundial se han empleado ciertas sustancias relacionadas en el crecimiento vegetal, entre ellas, el cloruro de clormequat (CCC), que ha sido empleado como inhibidor del crecimiento vegetal en diversas especies en invernadero como es el caso de plántulas de lechuga (Bermúdez, 2018), además, han reportado trabajos sobre desarrollo y rendimiento del girasol (Silva-Garza *et al.*, 2001), microtuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Cardinal y Diarnant (Hussain *et al.*, 2006; Zakaria *et al.*, 2008), sobre aclimatación y crecimiento *in vitro* de *Tibouchina urvilleana* (DC). Cogn. (Kozak, 2006), micropropagación de *Eclipta alba* (L.) Hassk (Ray & Bhattacharya, 2008), regeneración *in vitro* de cuerpos protocórmicos (PLBs) de *Phalaenopsis* ‘Fmk02010’ (Mehraj *et al.*, 2017), entre otros; pero no han reportado su empleo para la conservación *in vitro* a mediano plazo en cultivos como la vainilla; así

también los trabajos dedicados a su conservación *in vitro* mediante el empleo de ácido abscísico (ABA) son escasos (Bello-Bello *et al.*, 2015; Pastelín, 2018; Bautista-Aguilar *et al.*, 2021).

Tomando en consideración lo anterior, el empleo de ABA y CCC puede considerarse como una estrategia de conservación *in vitro* a mediano plazo, para aumentar los intervalos entre subcultivos, suministro constante de plantas libres de patógenos y disminución en el empleo de mano de obra, a comparación del método de conservación a corto plazo, el cual implica un crecimiento a tasas normales, conllevando a un mantenimiento constante, mayor mano de obra (remunerado) y mayor cantidad de reactivos, debido a que los subcultivos se realizan cada 30 a 60 días (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2010; Pérez *et al.*, 2012; Bello-Bello *et al.*, 2015; Bonilla *et al.*, 2015; Alcántara *et al.*, 2017).

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la interacción de diferentes concentraciones de los inhibidores de ABA y CCC en la inhibición de la morfogénesis de microestacas de *V. planifolia* cultivadas *in vitro* como una alternativa de conservación a mediano plazo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

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

### Material vegetal

La colecta del material biológico utilizado fue autorizada por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) bajo la licencia de colecta científica SGPA/DGVS/11157/19. Derivado de lo anterior, se obtuvieron mediante cultivo *in vitro* plántulas de vainilla (*V. planifolia*) y posteriormente microestacas (explantes) de 1.5 cm. Todo el material empleado se cultivó *in vitro* en medio Murashige y Skoog al 50%, incubados a  $25 \pm 2$  °C, con un ciclo de fotoperiodo de 16/8 h y una intensidad lumínica de 2000 lux.

### Preparación de medio

Se preparó medio Murashige y Skoog al 75% (MS 75%), con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, adicionado con ABA a 0, 1.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>, CCC a 0, 1, 2, 4 y 6 mg L<sup>-1</sup> o su combinación (ABA/CCC) (Tabla 1). Se ajustó el pH a 5.6 con NaOH y HCl al 1 N, se agregó 2.5 mg L<sup>-1</sup> de Phytigel Sigma®, se vació 20 ml de medio MS 75%, en cada uno de los frascos de vidrio de 125 ml con tapa, por último, se esterizaron en autoclave a 121 °C a una presión de 15 psi<sup>-1</sup>, durante 15 minutos.

### Conservación *in vitro* a mediano plazo

Posteriormente las microestacas fueron transferidas asépticamente a los frascos de vidrio (una microestaca por frasco) con medio de cultivo modificado (ABA, CCC o ambos) estéril. Los tratamientos experimentales y el control se incubaron durante 200 días bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura de la etapa de cultivo previa a la obtención de las microestacas.

### Evaluación de las variables

Al cumplir el periodo de incubación se midió la longitud total de las plántulas obtenidas a partir de la yema de las microestacas, con un vernier digital Stainless Hardened®. Al finalizar el experimento se contabilizó el número de brotes, número de hojas, número de raíces y porcentaje de supervivencia.

**Tabla 1.** Combinaciones de inhibidores de crecimiento, ABA y CCC, utilizados en la conservación *in vitro* de *Vanilla planifolia*

**Table 1.** Combinations of growth inhibitors, ABA and CCC, used in the *in vitro* conservation of *Vanilla planifolia*.

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

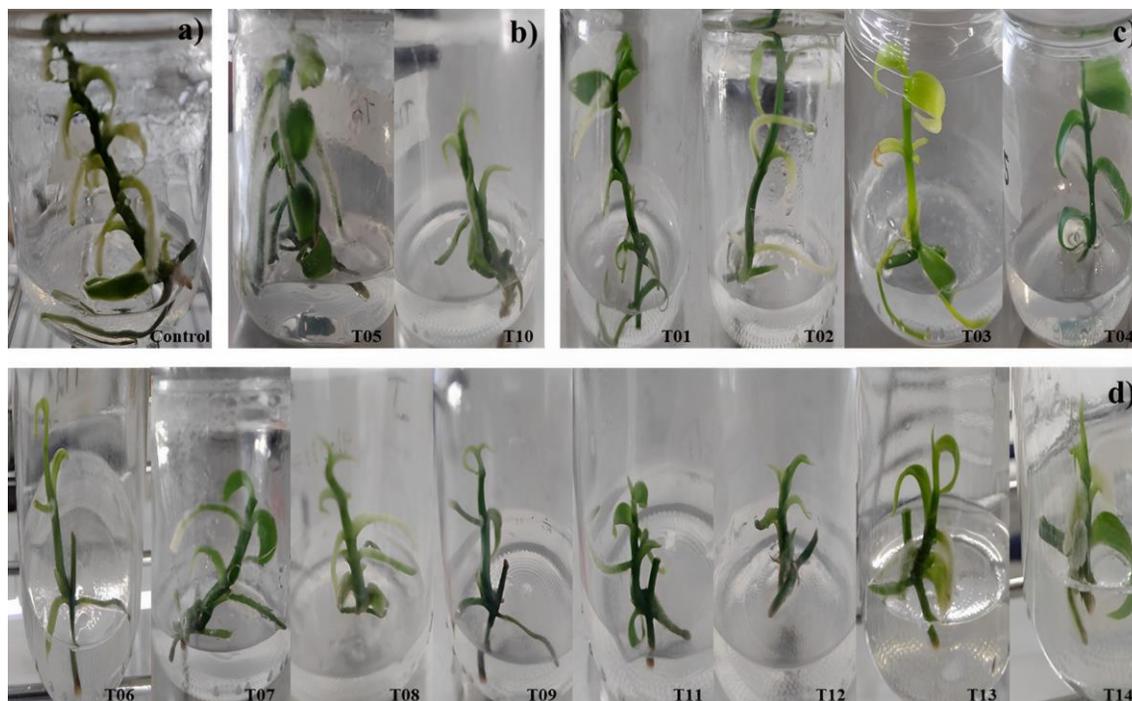
### Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar para 14 tratamientos experimentales y un control, cada tratamiento constó de 25 unidades experimentales, cada una conformada por una microestaca creciendo en un frasco con 25 ml de medio de cultivo con su respectivo tratamiento, empleándose un total de 375 unidades experimentales. Los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba Shapiro Wilk y Levene, para analizar la normalidad y homogeneidad de las varianzas, al no superarse los supuestos se optó por realizar una prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ), y posteriormente una prueba de Dunn, para determinar diferencias intragrupos. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico R versión (4.1.1).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de 200 días de cultivo *in vitro* se observó una reducción en la longitud de los explantes, la mayoría de ellos vigorosos. Así mismo, se observa que el tratamiento Control pese a presentar una mayor longitud, las hojas viejas inferiores presentaron una clorosis general avanzada, verde pálido a amarillo desde las hojas viejas hasta las jóvenes y nuevo crecimiento, además de un desarrollo débil, así como la pérdida y secado de hojas viejas (Figura 1a). Mientras que, en los tratamientos experimentales, únicamente se observan síntomas de déficit nutrimental en el tratamiento T 03 (4 mg L<sup>-1</sup> de CCC) (Figura 1c).

Para el caso de *V. planifolia* Bello-Bello *et al.* (2015), reportan la ausencia de anomalías fenotípicas en las plántulas de vainilla, cultivadas *in vitro* con 1, 2 y 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA con MS al 100%, de manera similar, Barreto & Carvalho (2008) reportan una completa dormancia de yemas, sin afectar su desarrollo y posterior conversión en plántulas de yemas axilares nodales de yuca (*Manihot esculenta* Grantz) conservadas en 5.29 y 7.92 mg L<sup>-1</sup> de ABA. De igual forma Yun-peng *et al.* (2012), refieren la ausencia de afectaciones morfológicas en el cultivo de dos especies de lirios (*Lilium davidii* Duch. ex Elwes y *Lilium longiflorum* Thunb.) en medio adicionado con 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA durante 15 meses.



**Figura 1.** Efecto de concentraciones de dos inhibidores de crecimiento, sobre la conservación *in vitro* de *Vanilla planifolia* Andrews. Concentraciones de izquierda a derecha: a) Control, b) ácido abscísico (ABA) a 1.5 y 3 mg L<sup>-1</sup>, c) cloruro de cloromequat (CCC) a 1, 2, 4 y 6 mg L<sup>-1</sup> y d) combinación (ABA/CCC) a 1.5: 1.0, 1.5: 2.0, 1.5: 4.0, 1.5: 6.0, 3.0: 1.0, 3.0: 2.0, 3.0: 4.0 y 3.0: 6.0 mg L<sup>-1</sup> a 200 días de cultivo.

**Figure 1.** Effect of concentrations of two growth inhibitors on the *in vitro* conservation of *Vanilla planifolia* Andrews. Concentrations from left to right: a) Control, b) abscisic acid (ABA) at 1.5 and 3 mg L<sup>-1</sup>, c) chlorocholine chloride (CCC) at 1, 2, 4, and 6 mg L<sup>-1</sup>, and d) combination (ABA/CCC) at 1.5:1.0, 1.5:2.0, 1.5:4.0, 1.5:6.0, 3.0:1.0, 3.0:2.0, 3.0:4.0, and 3.0:6.0 mg L<sup>-1</sup> after 200 days of cultivation.

Respecto a la longitud total, existe una relación entre el tamaño decreciente de los explantes y el incremento en las concentraciones de CCC y ABA, observándose diferencias estadísticamente significativas ( $p = 2.2e-16$ , Kruskal Wallis), siendo el tratamiento T 14 (3.0: 6.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA/CCC) el que presentó el promedio más bajo con 1.80 cm, seguido por los tratamientos T 13 (3.0: 4.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA/CCC) y T 12 (3.0: 2.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA/CCC) con 1.85 y 1.90 cm respectivamente, éstos conforman un grupo que se diferencia estadísticamente del resto de tratamientos (Tabla 2, Figura 2a). Lo anterior concuerda con lo reportado por Bello-Bello *et al.* (2015); Pastelín (2018); Bautista-Aguilar *et al.* (2021), quienes refieren que el empleo de ABA tiene una relación entre la disminución de la longitud total del explante de vainilla y el incremento de la dosis empleada, siendo los tratamientos con mayor contenido del regulador (3 y 5 mg L<sup>-1</sup> ABA) en medio MS al 100%, los que presentaron las medias más bajas 1.3, 1.42 y 0.71 cm respectivamente, resultado semejante al obtenido en el tratamiento T 10 (3.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA) el cual presentó una longitud de 1.23 cm. Es importante mencionar que los experimentos realizados por Bello-Bello *et al.* (2015), Pastelín (2018) y Bautista-Aguilar *et al.* (2021), tuvieron una duración de 180, 186 y 120 días respectivamente, mientras que el presente experimento fue de 200 días en medio MS al 75%, por lo que la interacción entre el ABA y el CCC generó una disminución significativa en la longitud de los explantes ( $p = 2.2e-16$ , Kruskal Wallis).

En lo referente al número de brotes, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ( $p = 2.2e-16$ , Kruskal Wallis), se tiene que a mayor concentración de reguladores, se obtuvo una menor formación de brotes, una menor media en el tratamiento T 14 con 0.27 brotes, seguido de los tratamientos T 12 y T 13 una media de 0.44 y 0.28, mismos que

son semejantes entre sí y se diferencian del resto de tratamientos, estos resultados contrastan con los 3.67 brotes obtenidos en el tratamiento Control (Tabla 2, Figura 2b), por lo que, la interacción de ambos retardantes, permitió una inhibición eficaz, presentando un efecto sinérgico libre de efectos indeseados o deficiencias nutrimentales como la presentada en el tratamiento T 03 adicionado únicamente con CCC. Lo anterior, coincide con lo referido por Da Silva & Scherwinski-Pereira (2011), quienes observaron diferencias significativas en la longitud de los brotes y número de yemas por brote de pimienta (*Piper aduncum* L.), al usar 1, 2 y 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA. En el caso de la pimienta larga (*Piper hispidinervum* Kunth.), al usar 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA, obtuvieron el promedio más bajo de 8.8 cm de longitud y 6.8 yemas por brotes. En cuanto al número de hojas, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis), se tuvo una menor formación de hojas en el tratamiento T 14 con una media de 1.83 hojas, seguido por los tratamientos 12 y 13 con medias de 1.88 y 1.86 hojas respectivamente (Tabla 2, Figura 2c), estos resultados son similares a lo reportado por Bautista-Aguilar *et al.* (2021) quienes al conservar vainilla en MS (100 %) suplementado con 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA, obtuvieron una media de 1 hoja, por su parte, Bello-Bello *et al.* (2014), al conservar caña de azúcar, encontraron una menor formación de hojas obteniendo un promedio de 2.5 hojas, en el tratamiento de mayor concentración con 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA.

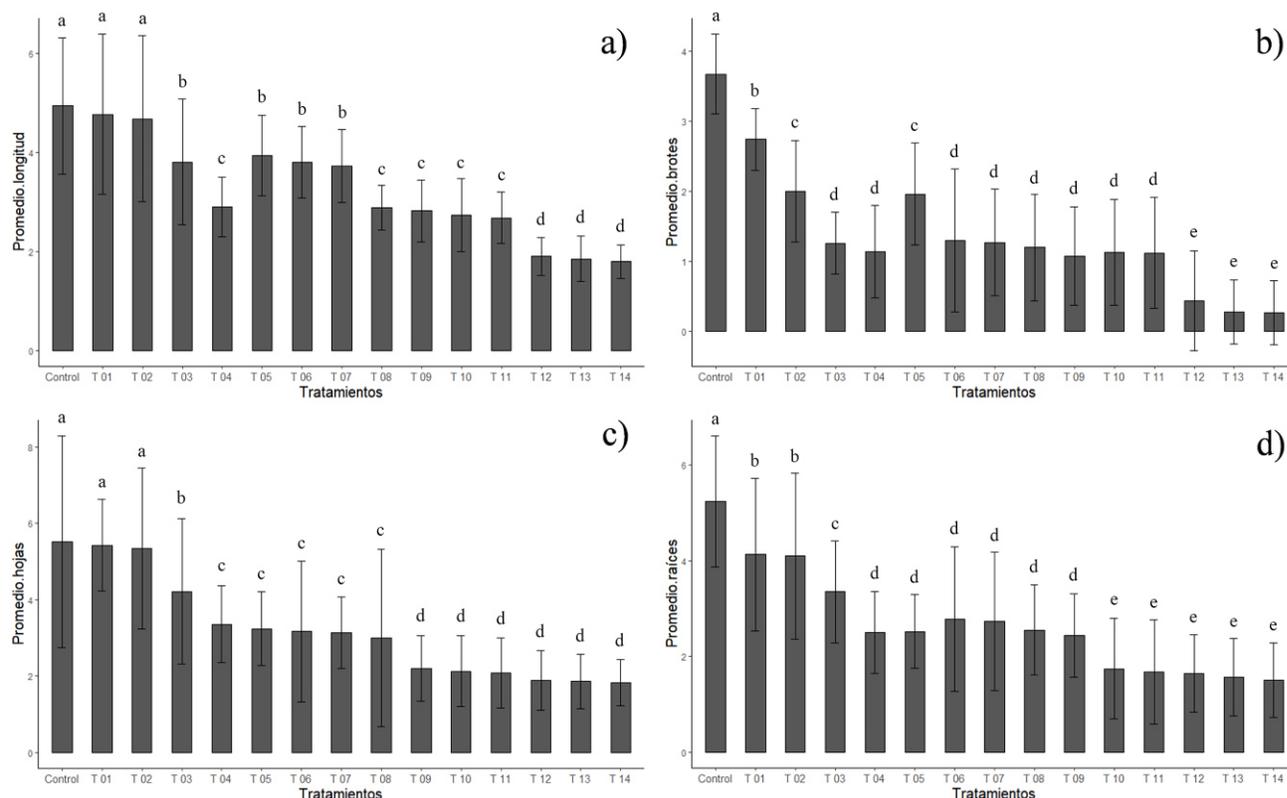
En lo referente al número de raíces, la prueba de Kruskal Wallis evidencia diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), manteniéndose la tendencia observada con anterioridad, presentando la media más baja en el T 14 con una media de 1.50 raíces por explante (Tabla 2, Figura 2d).

Respecto a lo anterior, Páez & González (2001), refieren que el empleo de 1.5 mg L<sup>-1</sup> de ABA y 1.5 mg L<sup>-1</sup> de CCC, permitieron la obtención del promedio de desarrollo de raíces más bajo en la conservación *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) (1.15), mientras que Rivera-Calderón *et al.* (2008), señalan que la adición de 10:500 mg L<sup>-1</sup> de BAP/CCC al medio de cultivo (MS al 100%), es capaz de inducir la más alta producción de microtubérculos de papa, con un promedio de 9.08. Hussain *et al.* (2006), reportaron además que el empleo de medio de cultivo Murashige y Skoog, adicionado con 200 mg L<sup>-1</sup> de CCC es capaz de inducir la máxima formación de tubérculos en papa (16.5 tubérculos/frasco).

**Tabla 2.** Efecto de la interacción de diferentes concentraciones de ABA y CCC en la morfogénesis de *V. planifolia*.  
**Table 2.** Effect of the interaction of different concentrations of ABA and CCC on the morphogenesis of *V. planifolia*.

Tratamientos	mg L <sup>-1</sup>		Longitud total (cm)	Brotes	Hojas	Raíces
			Media	Media	Media	Media
CCC	Control	0.0: 0.0	4.94 ± 1.38 a	3.67 ± 0.57 a	5.52 ± 2.77 a	5.24 ± 1.37 a
	T 01	1	4.77 ± 1.62 a	2.74 ± 0.44 b	5.43 ± 1.20 a	4.13 ± 1.60 b
	T 02	2	4.68 ± 1.68 a	2.0 ± 0.72 c	5.35 ± 2.11 a	4.10 ± 1.74 b
	T 03	4	3.81 ± 1.27 b	1.26 ± 0.44 d	4.22 ± 1.91 b	3.35 ± 1.07 c
	T 04	6	2.90 ± 0.60 c	1.14 ± 0.66 d	3.36 ± 1.01 c	2.50 ± 0.85 d
ABA	T 05	1.5	3.94 ± 0.81 b	1.96 ± 0.73 c	3.24 ± 0.97 c	2.52 ± 0.77 d
	T 10	3	2.73 ± 0.74 c	1.13 ± 0.75 d	2.13 ± 0.92 d	1.74 ± 1.05 e
ABA/CCC	T 06	1.5: 1.0	3.80 ± 0.72 b	1.30 ± 1.02 d	3.17 ± 1.85 c	2.78 ± 1.51 d
	T 07	1.5: 2.0	3.73 ± 0.74 b	1.27 ± 0.76 d	3.14 ± 0.94 c	2.73 ± 1.45 d
	T 08	1.5: 4.0	2.88 ± 0.45 c	1.20 ± 0.76 d	3.0 ± 2.32 c	2.55 ± 0.94 d
	T 09	1.5: 6.0	2.82 ± 0.62 c	1.08 ± 0.70 d	2.20 ± 0.86 d	2.44 ± 0.87 d
	T 11	3.0: 1.0	2.68 ± 0.52 c	1.12 ± 0.79 d	2.08 ± 0.92 d	1.67 ± 1.09 e
	T 12	3.0: 2.0	1.90 ± 0.38 d	0.44 ± 0.71 e	1.88 ± 0.78 d	1.64 ± 0.81 e
	T 13	3.0: 4.0	1.85 ± 0.46 d	0.28 ± 0.46 e	1.86 ± 0.72 d	1.57 ± 0.81 e
	T 14	3.0: 6.0	1.80 ± 0.34 d	0.27 ± 0.46 e	1.83 ± 0.61 d	1.50 ± 0.78 e

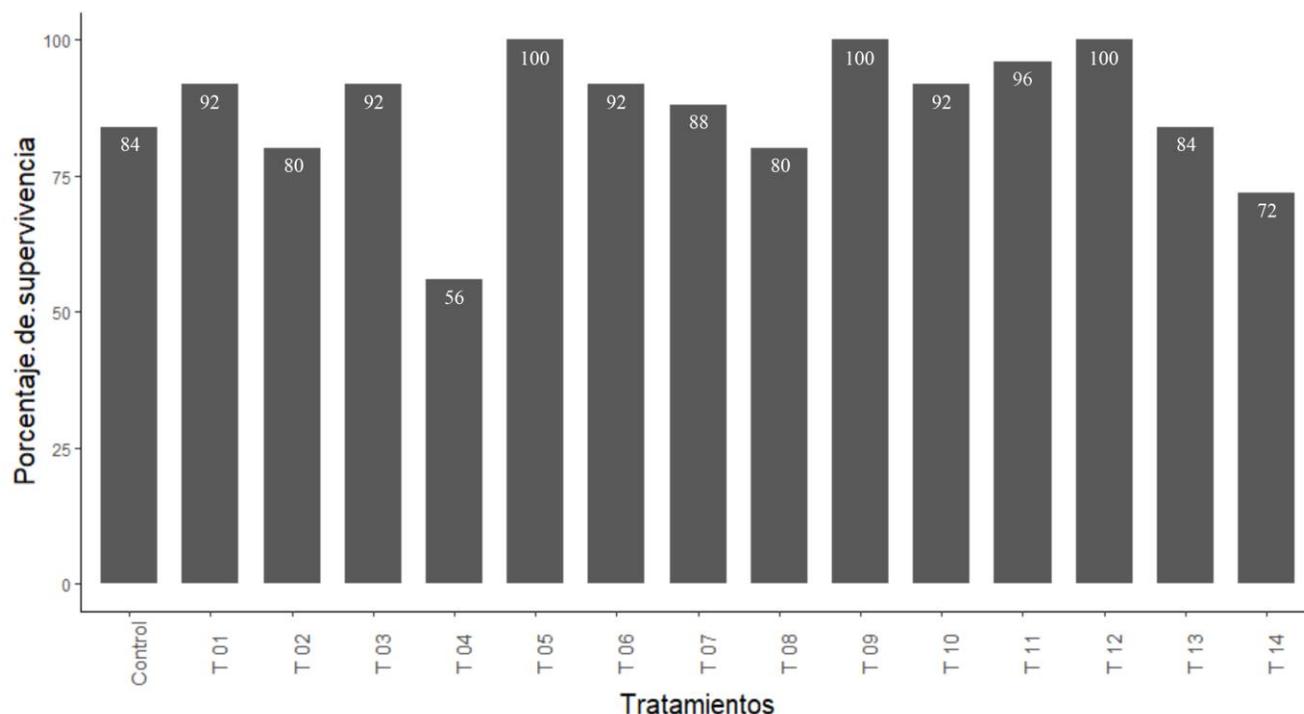
Datos obtenidos a 200 días de cultivo. Las medias con letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ , prueba de Dunn) entre tratamientos ( $n = 375$  microestacas).



**Figura 2.** Efecto de la interacción de diferentes tratamientos: ABA/CCC mg L<sup>-1</sup>, en la morfogénesis de *V. planifolia*, a 200 días de cultivo: a) Longitud total (cm), b) Número de brotes, c) Número de hojas y d) Número de raíces. Las medias con letras diferentes en cada barra indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ , prueba de Dunn) entre tratamientos ( $n = 375$  microestacas).

**Figure 2.** Effect of the interaction of different treatments: ABA/CCC mg L<sup>-1</sup>, on the morphogenesis of *V. planifolia*, at 200 days of cultivation: a) Total length (cm), b) Number of shoots, c) Number of leaves, and d) Number of roots. Means with different letters on each bar indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ , Dunn's test) between treatments ( $n = 375$  microcuttings).

En lo referente a la supervivencia de los explantes, se observó que los tratamientos T 05 (1.5 mg L<sup>-1</sup> de ABA), T 09 (1.5: 6.0 mg L<sup>-1</sup>) y T 12 (3.0: 2.0 mg L<sup>-1</sup>) de ABA/CCC, reflejaron los porcentajes más altos con 100% para todos los casos, seguidos por el tratamiento T 11 (3.0: 1.0 mg L<sup>-1</sup>/ ABA: CCC) con un 96%, mientras que, en el tratamiento T 04 (6.0 mg L<sup>-1</sup> de CCC), obtuvo el porcentaje de supervivencia más bajo con un 56% (Figura 3).



**Figura 3.** Porcentaje de supervivencia de plántulas de vainilla (*V. planifolia*) con los diferentes tratamientos a 200 días de cultivo.

**Figure 3.** Percentage of survival of vanilla seedlings (*V. planifolia*) with different treatments at 200 days of cultivation.

Los resultados obtenidos, coinciden con lo reportado por Bello-Bello *et al.* (2015), en el estudio sobre la conservación *in vitro* de vainilla, refieren que con 1, 2 y 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA obtuvieron un porcentaje de supervivencia del 100, 90 y 90%, respectivamente, mientras que Bautista-Aguilar *et al.* (2021), obtuvieron un 93.3% de supervivencia en explantes de *V. planifolia* conservados en medio MS al 100% adicionado con 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA e incubado a 22 °C. Además de ser similar a lo reportado por Da Silva & Scherwinski-Pereira (2011), quienes obtuvieron una supervivencia del 100% en *P. aduncum*, en medio MS adicionado con 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA y un 100% en brotes de *P. hispidinervum*, en medio adicionado con 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> de ABA, para el caso del CCC no se encuentran reportes de sus efectos en la tasa de supervivencia de los explantes.

## CONCLUSIÓN

El mejor tratamiento para la conservación *in vitro* a mediano plazo de *V. planifolia* es el tratamiento T 12 (3.0: 2.0 mg L<sup>-1</sup>/ ABA: CCC, MS al 75%), debido a que presentó una supervivencia del 100% de los explantes y una menor longitud total en un periodo de 200 días, sin síntomas de deficiencias nutrimentales y anomalías en su desarrollo, por lo tanto, puede considerarse como una estrategia para salvaguardar este material vegetal mediante el establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro*, para futuros proyectos de reubicación o intercambios con otros bancos de germoplasmas; con menor mano de obra, en comparación con la técnica de conservación a corto plazo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada con número de apoyo: 788729, a la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, al programa de la Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales y a la Bióloga Leydi Judith López Pérez por su apoyo en el laboratorio.

## LITERATURA CITADA

- Alcántara, J. S., Castilla, M. G., & Sánchez, R. M. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *In vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 71–83. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Azofeifa-Bolaños, J. B., Paniagua-Vásquez, A., & García-García, J. A. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agron. Mesoam*, 25(1), 189–202. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43730495019>
- Barrueto, L. P., & Carvalho, C. B. (2008). Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of cassava (*Manihot esculentus*). *Chil. J. Agric. Res*, 68(3), 304–308. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392008000300011>
- Bautista-Aguilar, J. R., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ramírez-Mosqueda, M. A., & Ortiz-García, M. M. (2021). *In Vitro* Conservation and Genetic Stability in *Vanilla planifolia* Jacks. *HortScience*, 56(12), 1494–1498. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16118-21>
- Bello-Bello, J. J., García-García, G. G., & Iglesias-Andreu, L. (2015). Conservación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex*, 38(2), 165–171. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61038806006>
- Bello-Bello, J. J., Morales-Ramos, V., & Gómez-Merino, F. C. (2014). Conservación de recursos genéticos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agro Productividad*, 7(2), 42–46. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/513>
- Bermúdez, R. A. (2018). Efecto de tres concentraciones de Chlormequat (Cycocel®) en producción de plántulas de lechuga cultivar Tropicana. Escuela Agrícola Panamericana.
- Bonilla, M. M., Mancipe, C., & Aguirre, A. C. (2015). Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Rev. Invest. Agra. Amb*, 6(1), 67–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/21456453.1264>
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M. F., & Besse, P. (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genet. Resour. Crop Evol*, 55(4), 551–571. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9260-3>
- Coelho, N., Gonçalves, S., & Romano, A. (2020). Endemic Plant Species Conservation: Biotechnological Approaches. *Plants*, 9(3), 345. <https://doi.org/10.3390/plants9030345>
- Da Silva, T. L., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2011). *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. *Pesq. Agropec. Bras*, 46(4), 384–389. <https://www.scielo.br/j/pab/a/KVJ4xHcKZtqZzmqVpWRv4Ms/?lang=en&format=pdf>
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 47, 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>
- Hussain, I., Chaudhry, Z., Muhammad, A., Asghar, R., Naqvi, S. M., & Rashid, H. (2006). Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on *in vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L. CV. Cardinal). *Pak. J. Bot*, 38(2), 275–282. [https://www.researchgate.net/publication/267416286\\_Effect\\_of\\_chlorocholine\\_chloride\\_su\\_crose\\_and\\_BAP\\_on\\_in\\_vitro\\_tuberization\\_in\\_potato\\_Solanum\\_tuberosum\\_L\\_cvCardinal](https://www.researchgate.net/publication/267416286_Effect_of_chlorocholine_chloride_su_crose_and_BAP_on_in_vitro_tuberization_in_potato_Solanum_tuberosum_L_cvCardinal)
- Kozak, D. (2006). The effect of growth retardants applied *In vitro* on the acclimatization and growth of *Tibouchina urvilleana* cogn. *In vivo*. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 5(1), 65–70.
- Lozano-Rodríguez, M. A., Menchaca-García, R. A., Alanís-Méndez, J. L., & PechCanché, J. M. (2015). Cultivo *in vitro* de yemas axilares de *Vanilla planifolia* Andrews con diferentes citocininas. *Rev. Cient. Biol. Agropec. Tux*, 4(6), 1153–1165.

**Recibido:**  
23/mayo/2023

**Aceptado:**  
8/enero/2024

- [https://www.researchgate.net/publication/293556691\\_Cultivo\\_in\\_vitro\\_de\\_yemas\\_axilares\\_de\\_Vanilla\\_planifolia\\_Andrews\\_con\\_diferentes\\_citocininas](https://www.researchgate.net/publication/293556691_Cultivo_in_vitro_de_yemas_axilares_de_Vanilla_planifolia_Andrews_con_diferentes_citocininas)
- Mehraj, H., Alam, M. M., Habib, S. U., & Shimasaki, K. (2017). Role of chlorocholine chloride on the *in vitro* PLBs organogenesis of *Phalaenopsis* 'Fmk02010'. In Proceedings of the Korean Society of Crop Science Conference. 173–173.
- Menchaca, R. A., & Lozano, M. A. (2018). Importancia de la Conservación *ex situ* de un cultivo amenazado: la vainilla. In E. Silva-Rivera, V. Martínez-Valdés, M. Lascrain, & E. Rodríguez-Luna (Eds.), *De la recolección a los agroecosistemas soberanía alimentaria y conservación de la biodiversidad* (pp. 253–267).
- Páez, J., & González, R. (2001). Conservación *In Vitro* de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L) Bajo Condiciones de Crecimiento Mínimo. *Rev. Latinoam. Papa*, 12, 121–129. <http://ojs.papaslatinas.org/index.php/rev-alap/article/view/113/116>
- Pastelín, M. C. (2018). Evaluación del establecimiento y desarrollo durante la micropropagación y conservación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). Universidad Veracruzana.
- Pérez, E., Esparza, M. J., & Pérez, M. E. (2012). Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. Bajo condiciones de crecimiento retardado. *Rev. Fitotec. Mex*, 35(4), 279–287. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802012000400004](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000400004)
- Ray, A., & Bhattacharya, S. (2008). An improved micropropagation of *Eclipta alba* by *in vitro* priming with chlorocholine chloride. *J. Plant Biotechnol*, 92, 315–319. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9328-y>
- Rayas, A., Mederos, V., García, M., López, J., Cabrera, M., Ventura, J., Martínez, M., Gutiérrez, V., Álvarez, M., & Bauta, M. (2002). Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. *Biotecnología Vegetal*, 2(4), 249–251.
- Reed, B. M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., & Pence, V. C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 47, 1–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11627-010-9337-0>
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental-especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo prefacio.
- Rivera-Calderón, A. L., Valbuena-Benavides, R. I., Hidalgo-Hidalgo, R., & Moreno-Mendoza, J. D. (2008). Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. *Acta Agron (Palmira)*, 57(3), 175–180. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169913320004>
- Rodríguez-Deméneghi, M. V., Aguilar-Rivera, N., Gheno-Heredia, Y. A., & Armas-Silva, A. A. (2023). Vanilla cultivation in Mexico: Typology, characteristics, production, agroindustrial prospective and biotechnological innovations as a sustainability strategy. *Scientia Agropecuaria*, 14(1), 93–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2023.009>
- Sánchez-Chiang, N., & Jiménez, V. M. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agron. Mesoam*, 21, 193–205. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212010000100020&script=sci\\_abstract&tlng=es](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212010000100020&script=sci_abstract&tlng=es)
- Shibli, R., Shatnawi, M., Subaih, W., & Ajlouni, M. (2006). *In vitro* conservation and cryoconservation of plant genetic resources: A review. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2(4), 372–382.
- Silva-Garza, M. A., Gámez-González, H., Zavala-García, F., Cuevas-Hernández, B., & Rojas-Garcidueñas, M. (2001). Efecto de cuatro fitorreguladores comerciales en el desarrollo y rendimiento del girasol. *Ciencia UANL*, 4(1), 69–75. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/1066>
- Yun-peng, D., Wen-yuan, L., Ming-fang, Z., Heng-bin, H., & Gui-xia, J. (2012). The establishment of a slow-growth conservation system *in vitro* for two wild lily species. *Afr. J. Biotechnol*, 11(8), 1981–1990. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2868>
- Zakaria, M., Hossain, M. M., Khaleque-Mian, M. A., Hossain, T., & Uddin, M. Z. (2008). *In vitro* tuberization of potato influenced by benzyl adenine and chloro choline chloride. *Bangladesh J. Agril. Res*, 33(3), 419–425. <https://doi.org/10.3329/BJAR.V33I3.1601>