

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

Informe final de Servicio Social

Evaluación de la germinación en líneas mutantes de vainilla y cruzas en condiciones *in vitro*


Prestador de Servicio Social:

Dannia Fernanda Garrido Fernández

Matrícula: 2172031900


Asesor Interno:

Dra. Mariela Fuentes Ponce
Número económico. 34017

Firma _____ 

Asesor Externo

Dr. Carlos Román Castillo Martínez
Laboratorio de biotecnología y conservación forestal del INIFAP
Número de cédula. 2162857

Firma _____ 

Lugar de realización:

Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias

Fecha de inicio y terminación:

Del 10 de noviembre del 2021 al 10 de mayo del 2022.

Índice

Índice de figuras	2
Índice de cuadros	2
Índice de gráficos.	2
1. Resumen	3
2. Introducción	3
3. Marco teórico.....	4
3.1 Descripción y clasificación de <i>V. planifolia</i>	4
3.2 Historia e investigación	5
3.3 Germinación en la vainilla	5
3.4 Mutagénesis aplicada.....	6
3.5 Mutagénesis por irradiación gamma	6
4. Objetivos	7
5. Metodología utilizada	7
6. Actividades realizadas.	11
7. Objetivos y metas alcanzadas.	11
8. Resultados, discusión y conclusiones.	12
Resultados y discusión	12
Conclusiones.....	16
9. Recomendaciones.....	17
10. Literatura citada	17
11. Anexos.....	20

Índice de figuras

Figura 1. Gammacell 220	6
Figura 2. Establecimiento de mutantes. Primer plataforma tratamiento (+), segundo tratamiento (-) ordenadas de izquierda a derecha de testigo a 200 gy.....	19
Figura 3. Establecimiento de cruzas ordenadas de inodora a H121 de izquierda a derecha.....	19
Figura 4. Vista al microscopio de la primera evaluación de semillas mutantes realizada 33 días después del establecimiento	12
Figura 5. Mutantes irradiadas a dosis gy en las que se presentaron mejores resultados de inducción de germinación.....	19
Figura 6. Evaluación final; Cruzas 2	20
Figura 7. Evaluación final; Cruzas 3	20

Índice de cuadros

Cuadro 1. Técnicas de micropropagación <i>in vitro</i> para <i>V. Planifolia</i>	8
Cuadro 2. Actividades realizadas	11
Cuadro 3. Segunda evaluación mutantes realizada el 29 de diciembre de 2021	13
Cuadro 4. Tercera evaluación mutantes realizada en febrero de 2022	13
Cuadro 5. Evaluación final mutantes el 22 de abril de 2022.....	14
Cuadro 6. Evaluaciones cruzas de <i>V. planifolia</i> y su respectiva fecha de realización	15

Índice de gráficos

Gráfico 1. Porcentaje de germinación en las evaluaciones de cruzas.....	16
---	----

1. RESUMEN

Se ha reportado que constantemente aumenta el número de especies de vainilla en el mundo, dentro de las cuales se encuentra *V planifolia*, la cual, considerando su importancia cultural, social y económica en los últimos años, se busca constantemente ampliar su diversidad y proteger la conservación de este material fitogenético. Es por ello que el objetivo de este proyecto fue evaluar y analizar la germinación y variabilidad genética en líneas mutantes de vainilla en condiciones *in vitro* y así realizar un manual de manejo y germinación de *V. planifolia* mediante mutagénesis *in vitro*.

En este proyecto se establecieron *in vitro* dos proyectos con semillas de *V planifolia* en el laboratorio de biotecnología del INIFAP CENID-COMEF. En el primer proyecto se irradiaron vainas a dosis de 2 a 200 gy y para la otra parte se establecieron 27 cruzas; ambas en medio MS. Las mutantes presentaron resultados favorables en la inducción de germinación en las semillas que fueron irradiadas a dosis bajas de 2 gy a 10gy, mientras que en ambos experimentos se observó un crecimiento constante en la tasa de germinación a lo largo de las evaluaciones, así como un crecimiento exponencial de plántula al cambiar el medio MS a medio MS con vitaminas.

2. INTRODUCCIÓN

El género *Vanilla* pertenece a la familia *Orchidacea* y actualmente se conoce que hay más de 110 especies distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Cribb *et al*, 2010). En México y Centroamérica se encuentran principalmente distribuidas 15 especies, entre las que esta *V. planifolia* (Soto *et al*, 2010). Esta especie, dentro de las orquidáceas, produce frutos comestibles a los que se debe su importante demanda en la industria alimenticia ya que esta representa aproximadamente el 95% de toda la producción mundial (Bory *et al*, 2008).

Tomando en consideración la situación tan desafiante que se vive actualmente, es necesario e incluso urgente conservar y utilizar de forma sostenible la diversidad fitogenética ya que esa diversidad es la base de la seguridad alimentaria. El problema de hambruna y desnutrición cada día crece más, actualmente más de mil millones de personas viven en esta situación, pero es más preocupante la estimación del 2050 donde la población mundial habrá alcanzado más de 9 mil millones de habitantes lo cual representa un aumento necesario del 60% de alimentos

(FAO, 2021). Así mismo, el cambio climático no solamente está dificultando las producciones en campo, si no que la base de recursos se ve amenazada por esto, ocasionando una pérdida gradual de la diversidad fitogenética para la alimentación y la agricultura (Ramírez *et al*, 2010).

La mutagénesis ha contribuido significativamente a la obtención de nuevas especies en gran número de cultivos a nivel mundial existiendo en la actualidad más de 2500 especies liberadas en las que se aplicó esta tecnología, destaca su aplicación en plantas que se propagan vegetativamente (Nieto, 2017).

La mutagénesis permite generar un sinfín de efectos a través de diferentes dosis de rayos gamma en explantes *in vitro* de *V. planifolia*. La vainilla (*Vanilla planifolia Andrews*) es una especie de gran importancia en las culturas de Mesoamérica y en la actualidad ha recobrado el interés de los mercados internacionales por su uso en la industria alimentaria (Ramírez *et al*, 2010). Según González *et al*, (2011), una de las limitantes en su propagación sexual es la baja germinación de la semilla, lo cual ha popularizado la multiplicación vegetativa con bajos índices de variación genética.

Es por esto último, que estas técnicas de modificación genética serán clave para la optimización del proceso de producción debido a que estas se llevan a cabo desde la semilla, volviendo a la planta más eficiente y productiva desde antes de germinar.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. DESCRIPCION Y CLASIFICACION DE LA VAINILLA

Vanilla planifolia es una orquídea nativa de los bosques tropicales de México y América Central (Bory *et al.*, 2008). Su fruto se procesa para obtener vainillina, producto que es muy utilizado en industrias como la alimentaria, farmacéutica y cosmética (Sasikumar 2010).

Una de las principales características que le dan tan alto valor a la *Vainilla planifolia* es que esta produce frutos aromáticos comestibles, así como su importancia cultural en las culturas mesoamericanas, llegando a ser un cultivo simbólico en México como lo es en la región de Totonacapan en el estado de Veracruz (Lubinsky *et al.* 2008).

En las últimas décadas, la vainilla se ha vuelto el aromatizante más utilizado en la repostería y

heladería, así como en la industria vinícola, tabacalera, y de perfumería, entre otras (Brownell, 2006), considerándose incluso como uno de los productos agrícolas con mayor valor comercial del mundo.

3.2 HISTORIA E INVESTIGACIÓN

Considerando que la vainilla tiene su origen y domesticación en México siendo un aromático muy importante para las sociedades prehispánicas, especialmente para la cultura totonaca, actualmente en México hay muy pocas plantaciones y productores que se dedican a este cultivo, cultivándose solamente tres especies de Vainilla a gran escala: *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona Schiede* y *Vanilla tahitensis Moore* (González *et al*, 2011)

Actualmente la vainilla se ha vuelto un cultivo con mucho interés para su investigación y mejoramiento genético, debido a la alta rentabilidad que tiene pudiéndose incluso comparar con otros cultivos de suma importancia de la zona tales como cítricos o plátanos. Entre las principales problemáticas que se busca resolver y mejorar son la baja germinación de la semilla y la poca variabilidad genética de la especie (Ramírez *et al*. 2000).

3.3 GERMINACIÓN EN LA VAINILLA

Para el establecimiento de la vainilla *in vitro*, el explante más utilizado y con mejores resultados, es la yema axilar. Aunque lo más conveniente para el establecimiento de la especie sería utilizar las semillas, esto no se hace ya que estas simplemente no germinan y de ser así, el tiempo de germinación es en promedio de 18 semanas (Ramírez *et al*, 2016).

Parra (1987) reportó una respuesta de germinación entre los 101 y 108 días después de la siembra en medio Murashige-Skoog, García *et al*, (2004) reportó germinación entre los 90 y 100 días en medio MS y Knudson, Vivar 2004 obtuvo respuesta de germinación hasta las 21 semanas después de haber establecido *in vitro* las semillas; mientras que León (2006) obtuvo respuesta de germinación en 72 días con un promedio de 5.7 semillas germinadas en medio MS adicionado con 0.05mgL de ANA y 0.01mgL de BAP.

En las últimas décadas se ha podido adquirir más conocimiento sobre esta especie, de los tratamientos (medio de cultivo y reguladores), sin embargo, no se ha logrado cambiar las problemáticas y dificultades de la germinación de ésta, sigue siendo igual de tardada y variable.

Es por ello, que este trabajo es externamente asesorado por el doctor titular del laboratorio de Biotecnología del CENID-COMEF del INIFAP, ya que se cuenta con un amplio conocimiento sobre la germinación *in vitro* de vainilla, así como de mutagénesis aplicada para mejoramiento genético e inducción de variabilidad genética y germinación.

3.4 MUTAGÉNESIS APLICADA

La mutagénesis es un proceso para generar mutaciones; es decir, cambios en la secuencia del ADN (Shu *et al*, 2011). Esta técnica se aplica para inducir o mejorar las características de las plantas, sus principales aplicaciones son la obtención de resistencia a plagas y enfermedades (Duncan, 1998; Ángeles, 2014), resistencia a salinidad y al estrés hídrico (Aguilar, 2013; Meco, 2015), así como aumentar la variabilidad genética (Antúnez *et al*, 2017).

3.5 MUTAGÉNESIS POR IRRADIACIÓN GAMMA

Un protocolo completo de mutagénesis *in vitro* conlleva varias etapas desde la selección de material, determinación de la dosis letal media (DL50) así como el establecimiento y propagación.



Figura 1. Gammacell 220

La radiación representa el mutágeno físico más importante. Aquellas que son capaces de dañar a moléculas de ADN tienen longitudes de onda menores a 340 nm y energía fotónica mayor a 1 electronvoltio, y las principales fuentes de radiación son la luz UV, los rayos X y la radiación gamma. El tipo de daño se puede considerar como daño letal (causa mortalidad bajo condiciones específicas) y subletal (las células no mueren), sin embargo, en todos los casos el daño es a nivel molecular (Wani *et al*, 2014).

La radiación gamma es el mutágeno físico más ampliamente utilizado y se produce por el decaimiento de Cobalto 60 o plutonio 239; tiene alto poder de penetración y es considerado muy peligroso. Sin embargo, ha resultado muy eficiente para inducir mutaciones en tejidos vegetales, incluyendo granos de polen. Su longitud de onda es más corta que los rayos X, por lo que tienen mayor energía y así pueden penetrar mayor profundidad en el tejido, así como tener un impacto uniforme. Su efecto mutagénico reside principalmente en inducir la ruptura de la doble cadena de ADN generando arreglos cromosómicos, aunque dependiendo de la dosis y tiempo de exposición, produce normalmente mutaciones puntuales (Pathirana, 2011).

4. OBJETIVO

Evaluar y analizar la germinación en líneas mutantes y cruzas de vainilla en condiciones *in vitro*.

5.METODOLOGÍA UTILIZADA

Para este trabajo se analizó previamente un aproximado de 20 artículos basados en establecimiento de vainilla *in vitro*, mutagénesis y germinación de semilla de *Vainilla planifolia* de alta fiabilidad sin una limitante de antigüedad y zona de estudio, esto último, con el fin de obtener un conocimiento aún más amplio sobre este proceso.

En el presente trabajo se realizaron dos establecimientos de semillas de *V. planifolia* con dos diferentes tipos de material. Ambas se realizaron por irradiación gamma. Sin embargo, se realizaron dos establecimientos, uno en donde se establecieron semillas a diferentes dosis de irradiación y otro de semillas de cruzas de *V. planifolia*.

Las vainas se llevaron a irradiar al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y se irradiaron con un equipo Gammacell 220. Este aparato está formado por CO60 que funciona como fuente de radiación y está protegido de una gruesa capa de plomo para el blindaje.

Posteriormente se realizó en el laboratorio de Biotecnología forestal del Centro Nacional de Investigación disciplinaria en conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales la preparación de medio de cultivo en frasco. Para este medio por litro se utilizó 30 mg de sacarosa, 4.42 mg de Medio Murashige and Skoog y 9 mg de Agar controlando el pH entre 5.7 y 5.8.

Se mandaron a irradiar 16 vainas de *V. planifolia* en etapa media de maduración, las cuales fueron cosechadas una semana antes, a distintas radiaciones; 2 gy, 4 gy, 8 gy, 10 gy, 25 gr, 50gy, 75 gy

200 gy así como 27 vainas de cruza de vainilla que se enviaron directamente de la BUAP

Para el cultivo de las mutantes se usaron 2 vainas más sin radiación como testigos, De las dos vainas correspondientes a cada dosis, se le realizó en una el método de desinfección recomendado, 1 minuto en alcohol al 70% y 20 minutos en cloro al 30%, y en la otra vaina una desinfección básica con toalla desinfectante; mientras que para el cultivo de las cruza se realizó una desinfección recomendada para todas las vainas.

Se realizaron 3 evaluaciones a lo largo del proyecto, comenzando con la observación y evaluación de la germinación y posterior a ello se evaluó el avance en el crecimiento de las cruza y así, con el análisis y el complemento con la bibliografía de apoyo, analizar la efectividad de la metodología utilizada.

TÉCNICAS DE MICROPROPAGACIÓN PARA *V. PLANIFOLIA*

En el cultivo de vainilla, regularmente, se utiliza la propagación vegetativa principalmente por esquejes debido a la viabilidad de la semilla para este proceso. Sin embargo, se han realizado a lo largo del tiempo varias técnicas de micropropagación para mejorar y acelerar la germinación, así como para mejoramiento genético (Cuadro 1).

Cuadro 1. Técnicas de micropropagación *in vitro* para *V. Planifolia*.

Referencia	Explante	Medio de cultivo	Tratamiento	Respuesta
Castaños F, O <i>et al</i> , 2017.	Semilla	MS	IBA, BAP	Plántula
León, 2006.	Semilla	MS	ANA, BAP	Plántula
Vivar, 2004.	Semilla	MS	Ninguno	Plántula
Torres G, MJ <i>et al</i> , 2011.	Semilla	MS y Yasuda	Ninguno	Plántula
Reyes L, D <i>et al</i> , 2015	Tallos con yemas axilares	MS	BAP, KIN, TDZ	Brotes
George, R <i>et al</i> , 2004.	Nudos	MS	IBA	Brotes
Rodríguez H, G <i>et al</i> , 2009.	Nudos	MS	BAP	Brotes

De esta previa investigación se delimitaron las características óptimas para para el establecimiento dela especie en este experimento, las cuales fueron el uso de la semilla como explante, en medio de cultivo MS y sin tratamiento, esto último debido a que el medio que se utilizó ya contenía vitaminas ya que el medio que se utilizó contenía vitaminas.

TIPO DE EXPLANTE: SEMILLAS

El uso de semillas como germoplasma inicial para irradiar permite manipular una cantidad grande, en función de la especie de algunos cientos por kilogramo a miles para así esperar generar un mayor número de mutantes; pero esto implica evaluar, en algunos casos, cientos de plántulas.

Para este trabajo se seleccionaron y se hicieron lotes de 6 vainas por tratamiento para llevarse a irradiar con radiación gamma. Esta exposición se realizó dentro del Instituto de Investigaciones Nucleares (ININ).

DESINFECCIÓN DE VAINAS

Para la desinfección de las vainas se llevó a cabo el procedimiento realizado por Castillo *et al*, (2018) el cual consistió en lavar tres veces las vainas con agua y jabón con la finalidad de eliminar cualquier contaminante. El lavado se realizó con un cepillo de cerdas suaves.

Una vez lavadas las vainas, se colocaron en vasos de precipitados previamente rotulados de sus respectivas dosis de radiación. Se separaron en dos tratamientos, positivo (+) y negativo (-); para el positivo se realizó una desinfección recomendada que consiste en sumergir las vainas en una solución de etanol al 70% por 30 segundos, después se decanta y se hicieron de dos a tres enjuagues con agua estéril, Para finalizar el proceso de desinfección, las vainas se enjuagaron nuevamente en una solución de cloro al 20% durante 10 minutos en el agitador y en la campana se enjuagaron cuatro veces con agua esterilizada para retirar todo el residuo de cloro. Para el tratamiento negativo solamente se desinfectaron con una limpieza rápida con toallas desinfectantes Clorox.

Las vainas de ambos tratamientos se colocaron por último en papel aluminio dentro de la campana, en donde se flamearon 2 veces cada vaina para completar la desinfección.

ESTABLECIMIENTO DE VAINAS

La preparación del medio se llevó a cabo en base a las técnicas ya establecidas en el laboratorio

de biotecnología por el investigador Carlos Román Castillo. En 1 litro de agua destilada, se agregaron 4.33 g-L1 de medio MS, se disolvió con ayuda del agitador y un imán, se pesaron los materiales y se añadieron 30 g de sacarosa y se ajustó el pH a 5.7-5.8 y una vez ajustado se agregó 9 g-L1 de agar. Se retiró el imán y se disolvió en el microondas por lapsos de 3 minutos a potencia media, una vez que hirvió y se disolvió totalmente se vaciaron con ayuda del dispensador en los frascos previamente esterilizadas 20 mL para volverse a esterilizar en la autoclave.

Antes del establecimiento se limpió con alcohol la campana para posteriormente flamearla junto con las cajas Petri, bisturís y pinzas. Una vez lavadas las vainas se recortaron los bordes a una distancia de aproximadamente 1 cm de cada lado y con cuidado se abrió cada vaina en dos, cada una sobre una caja Petri diferente.

Se tomaron las semillas con ayuda del borde de las pinzas y se fueron colocando sobre el medio de cultivo en los frascos respectivos. Al finalizar se rotularon cada uno de los frascos con su dosis de radiación.

Resiembra: Aproximadamente a partir del cuarto mes el medio de cultivo se fue deshidratando o terminando así que se preparó medio de cultivo básico MS con vitaminas Murashige y Skoog (1962) con las mismas medidas de desinfección y se continuó cambiando con ayuda de las pinzas de un frasco a otro de la misma manera que en el establecimiento.

De las mutantes se establecieron un total de 86 frascos para las mutantes, 45 del tratamiento (+) desinfección recomendada y 41 del tratamiento (-) desinfección rápida (Figura 3). Mientras que para las cruces se establecieron 206 frascos, todos en medio MS (Figura 4).

6. ACTIVIDADES REALIZADAS

Cuadro 2. Actividades realizadas

MES	ACTIVIDADES
NOVIEMBRE 2021	Se realizó una evaluación de germinación <i>in vitro</i> de cruzas y material irradiado. Se prepararon los medios de cultivo para establecimiento de las mutantes y se estableció el 22 de noviembre de 2021. Se prepararon los medios de cultivo para cultivos de cruzas y se estableció el material el 26 de noviembre de 2021.
DICIEMBRE 2021	Se prepararon los medios de cultivo para subcultivos y se realizaron dos evaluaciones, el 9 de diciembre para mutantes y el 29 de diciembre para mutantes e cruzas.
ENERO 2022	Se realizaron los subcultivos de los materiales germinados <i>in vitro</i> .
FEBRERO 2022	Se preparó, conforme se fue necesitando, medio de cultivo para subcultivos subsecuentes y a la par se realizó una evaluación de la germinación el 28 de febrero de 2022 para ambos materiales.
MARZO 2022	Se continuó evaluando la germinación.
ABRIL 2022	Se realizó la última evaluación el día 22 de abril del 2022 y se terminó de evaluar la tasa de crecimiento.
MAYO 2022	Se redactó el manual para presentar el 1ro de mayo el informe final.

7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

El objetivo de este proyecto se logró ya que se evaluó y analizó de forma correcta y satisfactoria la germinación en líneas mutantes de vainilla en condiciones *in vitro*.

Adicional a eso, se obtuvo un amplio conocimiento sobre el establecimiento y germinación *in vitro* de la especie de Vainilla y con base en ello se modificó la metodología obtenida en la bibliografía investigada para optimizar los resultados en inducción de la germinación y variabilidad genética en *V. planifolia* *in vitro* elaborando exitosamente el manual de manejo

(anexo 1) y germinación *in vitro* de *V. planifolia* mediante mutagénesis el cual se muestra en el anexo 7.

8. RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Resultados y discusión

En la primera evaluación, no se presentó aun respuesta de germinación; sin embargo, las semillas no presentaron contaminación (Figura 4).

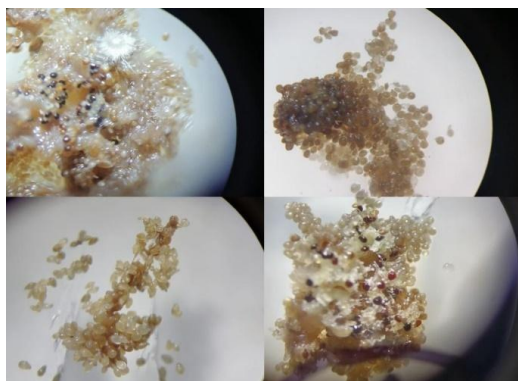


Figura 4. Vista al microscopio de la primera evaluación de semillas de *V. planifolia* mutantes realizada 33 días después del establecimiento.

Para la segunda evaluación, se observó germinación en algunas dosis radiación (Cuadro 3); donde los que tuvieron una desinfección recomendada (positivo) tuvieron un porcentaje de germinación de 20% a 2gy y 25% en 10gy, mientras que en los que se realizó una desinfección rápida (negativo) se presentó un porcentaje promedio de germinación de 25% a 4gy y un 50% a 8gy.

Cuadro 3. Segunda evaluación mutantes realizada al mes del establecimiento.

Positivas	% Germinación	Negativas	% Germinación
Testigo	0%	Testigo	0%
2gy	20%	2gy	0%
4gy	0%	4gy	25%
8gy	0%	8gy	50%

10gy	25%	10gy	0%
25gy	0%	25gy	0%
50gy	0%	50gy	0%
75gy	0%	75gy	0%
200gy	0%	200gy	0%
	5%		8.33%

En la tercera etapa de evaluación se presentó un aumento en los porcentajes de germinación (Cuadro 4) donde en el tratamiento positivo subió a 66.6% en 10gy, mientras que para el negativo aumentó un 100% en 2gy y 85.71% para 8gy.

Cuadro 4. Tercera evaluación mutantes realizada al segundo mes del establecimiento.

Positivas	% Germinación	Negativas	% Germinación
Testigo	0%	Testigo	0%
2gy	20%	2gy	100%
4gy	0%	4gy	25%
8gy	0%	8gy	85.71%
10gy	66.6%	10gy	0%
25gy	0%	25gy	0%
50gy	0%	50gy	0%
75gy	0%	75gy	0%
200gy	0%	200gy	0%
10	9.62%		23.41%

Para la última evaluación, se observó un incremento en la germinación de ambos tratamientos de desinfección (Cuadro 5), donde en el tratamiento positivo el testigo tuvo un porcentaje de germinación de 25%, así como 4gy con 25%, mientras que para el tratamiento negativo aumentó un 30% en 4gy y un 25% en 10gy.

Cuadro 5. Evaluación final mutantes el cuarto mes de establecimiento. .

Positivas	% Germinación	Negativas	% Germinación
Testigo	25%	Testigo	0%
2gy	25%	2gy	100%
4gy	0%	4gy	50%
8gy	0%	8gy	85.71%
10gy	66.6%	10gy	25%
25gy	0%	25gy	0%
50gy	0%	50gy	0%
75gy	0%	75gy	0%
200gy	0%	200gy	0%
	12.95%		28.96%

Iglesias *et al* (2014) mencionan que a través del uso de bajas dosis de radiación se han podido lograr avances genéticos, sin comprometer fisiológicamente a la planta, logrando estimular la brotación, germinación y variabilidad genética de las plantas. Dentro de cada evaluación realizada se presentó un porcentaje de germinación favorable únicamente en las muestras que se expusieron a menor radiación (2gy, 4gy, 8gy y 10gy) (Figura 5); a pesar de haberse hecho diferentes muestras no en todas se presentó germinación, Flores *et al* (2017) señalan que los medios sólidos tienen una baja tasa de multiplicación en algunas especies.

En referencia a las cruza, se realizó una resiembra parcial entre cada evaluación, así como una multiplicación de material para la última evaluación, con un cambio de medio de MS a MS con vitaminas obteniendo también un crecimiento exponencial de plántula.

Se logró un 100% de sobrevivencia de material cultivado *in vitro* (Cuadro 6), así como una germinación exponencial sobre todo de la primera a la segunda evaluación, hubo pequeñas y constantes pérdidas de material en algunas cruza como la H4, H13, H19, H20, así como una multiplicación en las H2 Y H3, las cuales fueron las que se resembraron en medio MS con vitaminas.

Cuadro 6. Evaluaciones del promedio de germinación de cruzas de *V. planifolia* y su respectiva fecha de realización.

DICIEMBRE	% Germinación	FEBRERO	% Germinación	ABRIL	% Germinación
Inodora	0%	Inodora	0%	Inodora	0%
H1	14.28%	H1	55.55%	H1	66.66%
H2	100%	H2	100%	H2	100%
H3	69.23%	H3	80%	H3	80%
H4	28.56%	H4	20%	H4	37.50%
H5	62.50%	H5	87.50%	H5	87.50%
H6	10%	H6	54.54%	H6	81.81%
H7	0%	H7	0%	H7	0%
H8	75%	H8	90.90%	H8	90.90%
H9	20%	H9	37.50%	H9	37.50%
H10	0%	H10	0%	H10	50%
H11	0%	H11	25%	H11	25%
H12	60%	H12	100%	H12	100%
H13	11.76%	H13	43.75%	H13	62.50%
H14	0%	H14	0%	H14	0%
H15	0%	H15	0%	H15	0%
H16	50%	H16	25%	H16	37.50%
H17	28.56%	H17	71.43%	H17	62.50%
H18	0%	H18	28.56%	H18	28.56%
H19	0%	H19	87.50%	H19	100%
H20	20%	H20	80%	H20	85.71%
H21	0%	H21	66.66%	H21	66.66%
H23	0%	H23	16.66%	H23	16.66%
H25	0%	H25	0%	H25	14.28%
H26	0%	H26	0%	H26	0%
H27	0%	H27	0%	H27	0%

H121	0%	H121	0%	H121	0%
Total	18.09%	Total	39.65%	Total	44.21%

La tasa de germinación de las cruzas de *V* aumentó constantemente (gráfico 1), específicamente, como se ve de forma más detallada en las imágenes 6 y 7, las cruzas 2 y 3 fueron las que presentaron una mejor inducción de germinación, así como una muy exitosa respuesta al cambio de medio de MS a MS con vitaminas presentando un crecimiento exponencial en plántula. Tomando en cuenta la recomendación de Menchaca R (2017) sobre 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, se considera que el medio MS, ya sea con vitaminas y/o aminoácidos logra valores más altos en cuanto a las variables porcentaje e índice germinativo comparado con otros medios como MS e incluso comparado con medio Knudson (1950) y medio Delassus (1963).

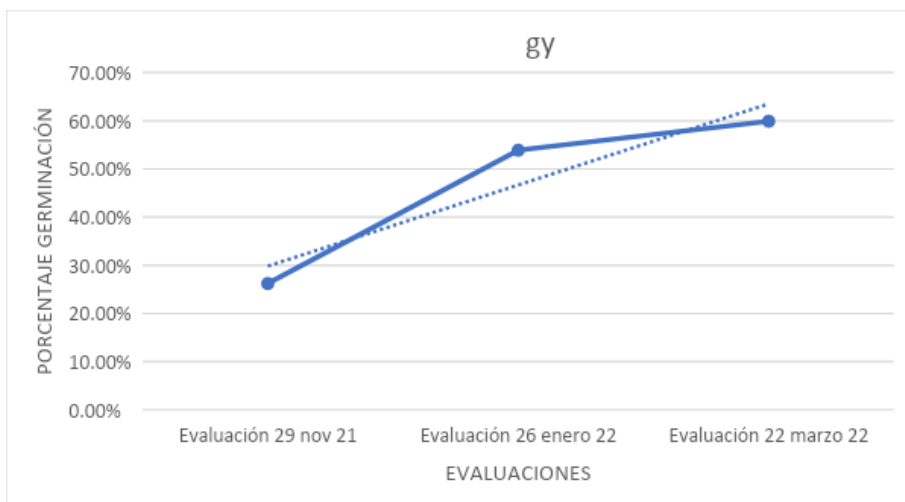


Gráfico 1. Porcentaje de germinación en las evaluaciones de cruzas.

Tanto las semillas mutantes como las cruzas se multiplicarán y una parte se conservará posteriormente en condiciones de crecimiento mínimo en el laboratorio de biotecnología del INIFAP y en el laboratorio de fitogenética de la BUAP, sede Teziutlán, Puebla.

CONCLUSIONES

Las mejores dosis para inducir la germinación en semillas de Vainilla son de 2 a 10 gy, La aplicación de radiación de 25 gy a 75gy no presenta ningún indicio de germinación, pero tampoco de muerte por lo cual no se recomienda, mientras que la dosis a una radiación de 200 gy ya no es viable debido a que causa daño fuerte parecido a quemadura y muerte en la semilla.

El medio MS con vitamina fue el más favorable para el desarrollo de la plántula. El tratamiento negativo tuvo un mayor porcentaje de germinación en referencia al positivo.

Se presentó una inducción en la germinación de las cruzas 2 y 3.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda siempre seguir las medidas de bioseguridad y manejo de material vegetativo para evitar contaminación sobre todo cuando se trabaja con material de importancia genética.

En cuanto a la investigación de las semillas mutantes, se sugiere seguir experimentando a dosis más bajas entre 2 y 10 gy, es decir a 2,3,4,5,6,7,8,9,10gy. Y para la investigación de las cruzas se recomienda continuar observando y evaluando las posibles modificaciones genéticas que ocurrieron con la radiación ya que al estar en una etapa experimental no se puede establecer o delimitar algún cambio o modificación en específico.

10.LITERATURA CITADA

- Bory, S; S. Brown, M. F; P. Besse (2016) Evolutionary processes and diversification in the genus *Vanilla*. En: E. Odoux, M. Grisoni, editores, *Vanilla*. CRC Press, Florida, US. p. 15-29.
- Castillo M, CR; García C, F; Vallejo R, MA; Reyes M, I. (2018) Mutagénesis *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* Franco. Folleto técnico Núm 31. CENID-COMEF. INIFAP.
- Cribb P; Soto, M. (2010) A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex-Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). *Lankesteriana* 9(3):355-398.
- FAO (2021) Informe de las Naciones Unidas: El año de la pandemia, dominado por un repunte del hambre mundial. Recuperado de <https://www.fao.org/news/story/es/item/1415653/icode/>
- Foroughbakhch P, R; Bacópulos M, E; Benavides M, A (2015) Efecto de la irradiación en la germinación y vigor de tres especies vegetales.

- García S., H. Saga stume, y L. Molina 2004. Evaluación de Medios de Cultivo para la Germinación y Desarrollo de Plántulas de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) *in vitro*.
- González M, F; Aguirre M, JF (2011) Germinación de semilla y obtención de plántulas de Vainilla planifolia en condiciones *in vitro*. INIFAP.
- Iglesias A, I; Moreno L, P (2014) Establecimiento de las bases biotecnológicas y ecológicas en la mejora genética de Vainilla planifolia. Cuadernos de biodiversidad. 2014. 45. P. 1-6.
- Mayta A, ME. (2016) Dosimetría de rayos gamma para la inducción de mutación en cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen).
- Nieto B, P (2017) Caracteres morfológicos de vainilla (*Vanilla planifolia* Jack.) utilizados por el agricultor en la selección de material reproductivo en cuatro municipios del Totonacapan, México. Tesis Mag. Sc. Puebla, MX, Colegio de Postgraduados. 145 p
- Parra Q, RA. (1987). Cultivo *in vitro* y anatomía de óvulos de *Vanilla planifolia* Andrews. Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Centro de Fruticultura, Chapingo, México
- Ramírez, VP; Ortega, PR; López, AH; Castillo, FG; Livera, MM; Rincon, FS; Zavala, FG. (2010) Recursos Fitogenéticos de México para la alimentación y la agricultura, Informe Nacional, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. Chapingo, Estado de México, MX. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)
- Soralez C, LE (2015) Inducción de mutaciones en Centeno (*Secale cereale* Linneo) empleando radiación gamma. Repositorio la Molina.
- Soto, M; R. Dressler (2010) A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla Plumier ex Miller* with a characterization of their region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana* 9(3):285-354.
- Soto, M; R. Dressler (2013) *Vanilla*. En: B. Hammel, M. Grayum, C. Herrera, y N. Zamora, editores, Manual de plantas de Costa Rica, Volumen III Monocotiledóneas (Orchidaceae-Zingiberaceae). Missouri Botanical Garden, INBio, Museo Nacional de Costa Rica. p. 583-587.
- Vivar T, M. (2004) Proyecto de Investigación de nominado Germinación y propagación de *Vanilla planifolia* (vainilla Andrews) *in vitro*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

11.ANEXOS

Figura 2. Establecimiento de mutantes. Primer plataforma tratamiento (+), segundo tratamiento (-) ordenadas de izquierda a derecha de testigo a 200 gy.



Figura 3. Establecimiento de cruzas ordenadas de inodora a H121 de izquierda a derecha



Figura 5. Mutantes irradiadas a dosis gy en las que se presentaron mejores resultados de inducción de germinación.



Figura 6. Evaluación final; Cruzas 2



Figura 7. Evaluación final; Cruzas 3



Anexo. Manual de manejo y germinación *in vitro* de *V. planifolia* mediante mutagénesis.

Manual de manejo y germinación *in vitro* de *V. planifolia* mediante mutagénesis.



Dannia Fernanda Garrido Fernández ABRIL

2022

PRESENTACIÓN

Este manual aporta experimentación a la línea de investigación de la vainilla y su desarrollo mediante mutagénesis.

La primera sección de este proyecto describe brevemente las características y distribución geográfica, así como la problemática de la especia y su importancia. Después se presentan generalidades de la germinación de la vainilla y la aplicación de mutagénesis *in vitro* para el mejoramiento genético.

Finalmente se agrega la sección de metodología en donde se explica desde el uso de explante, la radiación utilizada y los materiales y métodos para el establecimiento de la especie.

CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Características generales	2
2.2 Nombre común	2
2.3 Distribución geográfica	2
2.4 Importancia y usos	3
2.5 Problemáticas del cultivo	3
2.6 Germinación en la vainilla.....	4
3. Mutagénesis en el mejoramiento genético.....	4
4. Protocolo.....	5
4.1 Técnicas de micropropagación de <i>v. Planifolia</i>	5
4.2 Mutagénesis por irradiación gamma.....	6
4.3 Tipo de explante: semilla	7
4.4 Desinfección de vainas.....	8
4.5 Materiales y métodos de establecimiento.....	9
4.6 Resultados.....	11
5. Consideraciones finales	17
6. Agradecimientos	18
7. Referencias.....	19

1. INTRODUCCIÓN

El género *Vanilla* pertenece a la familia *Orchidacea* y actualmente se conoce que hay más de 110 especies distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Cribb *et al*, 2010). En México y Centroamérica se encuentran principalmente distribuidas 15 especies, entre las que esta *V. planifolia* (Soto *et al*, 2010). Esta especie, dentro de las orquidáceas, produce frutos comestibles a los que se debe su importante demanda en la industria alimenticia ya que esta representa aproximadamente el 95% de toda la producción mundial (Bory *et al*, 2008).

Tomando en consideración la situación tan desafiante que se vive actualmente, es necesario e incluso urgente conservar y utilizar de forma sostenible la diversidad fitogenética ya que esa diversidad es la base de la seguridad alimentaria. El problema de hambruna y desnutrición cada día crece más, actualmente más de mil millones de personas viven en esta situación, pero es más preocupante la estimación del 2050 donde la población mundial habrá alcanzado más de 9 mil millones de habitantes lo cual representa un aumento necesario del 60% de alimentos (FAO, 2021). Así mismo, el cambio climático no solamente está dificultando las producciones en campo, si no que la base de recursos se ve amenazada por esto, ocasionando una pérdida gradual de la diversidad fitogenética para la alimentación y la agricultura (Ramírez *et al*, 2010).

La mutagénesis ha contribuido significativamente a la obtención de nuevas especies en gran número de cultivos a nivel mundial existiendo en la actualidad más de 2 500 especies liberadas en las que se aplicó esta tecnología, destaca su aplicación en plantas que se propagan vegetativamente (Nieto, 2017).

La mutagénesis permite generar un sinnúmero de efectos a través de diferentes dosis de rayos gamma en explantes *in vitro* de *V. planifolia*. La vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) es una especie de gran importancia en las culturas de Mesoamérica y en la actualidad ha recobrado el interés de los mercados internacionales por su uso en la industria alimentaria. Según González *et al*, (2011), una de las limitantes en su propagación sexual es la baja germinación de la semilla, lo cual ha popularizado la multiplicación vegetativa con bajos índices de variación genética.

Es por esto último, que estas técnicas de modificación genética serán clave para la optimización del proceso de producción debido a que estas se llevan a cabo desde la semilla, volviendo a la planta más eficiente y productiva desde antes de germinar.

2. ANTECEDENTES

2.1 CARACTERISTICAS (DESCRIPCION, CLASIFICACION)

Vanilla planifolia es una orquídea nativa de los bosques tropicales de México y América Central (Bory et al., 2008). Su fruta se procesa para obtener vainillina, producto que es muy utilizado en industrias como la alimentaria, farmacéutica y cosmética (Sasikumar 2010).

Una de las principales características que le dan tan alto valor a la *Vanilla planifolia* es que esta produce frutos aromáticos comestibles, así como su importancia cultural en las culturas mesoamericanas, llegando a ser un cultivo simbólico en México como lo es en la región de Totonacapan en el estado de Veracruz (Lubinsky et al. 2008).

En las últimas décadas, la vainilla se ha vuelto el aromatizante más utilizado en la repostería y heladería, así como en la industria vinícola, tabacalera, y de perfumería, entre otras (Brownell 2006), considerándose incluso como uno de los productos agrícolas con mayor valor comercial del mundo.

2.2 NOMBRE COMUN

En México *V. planifolia* es conocida con la principal denominación de Vainilla, este nombre se le estableció debido a la forma de vaina que tiene.

2.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los bosques tropicales húmedos de México y Centroamérica se consideran el origen de la Vainilla, pero también se encuentra actualmente de forma silvestre en las selvas de Sudamérica y regiones tropicales de Asia. La vainilla fue descubierta por el pueblo Totonaca y utilizada por distintos pueblos como los aztecas y mexicas. (Ramírez et al., 1999).

En México se utilizaba principalmente como perfume, pero en la época de la conquista los españoles la llevaron a Europa donde posteriormente llegó hasta África y Asia y poco a poco

fue siendo más cotizada debido a su aroma. La vainilla se llevó a Inglaterra en 1800 y después a los jardines botánicos de Francia, se distribuyó a Indonesia y Madagascar, siendo estos últimos de los mayores productores de vainilla.

2.4 IMPORTANCIA Y USOS

V. planifolia es la especie de vainilla con más impacto económico, ecológico y social. La vainilla es uno de los recursos genéticos con más importancia debido a que es un recurso esencial en las comunidades indígenas y rurales de México. Sin embargo, actualmente esta especie tiene una fuerte problemática de uso y conservación ya que la mayor parte de las poblaciones silvestres han sido genéticamente erosionadas y en algunos casos eliminadas por colectas excesivas para establecer plantaciones, a tal grado que la especie se encuentra sujeta a protección especial por el gobierno mexicano con el fin de evitar su extinción (Norma Oficial Mexicana NOM059-ECOL-2001).

Los principales productores de vainilla son países en desarrollo como Madagascar, India, Costa Rica, Jamaica, Turquía, Tonga lo que evidencia la necesidad de generar tecnologías acordes con la realidad de esos países, con miras a incrementar la producción y la calidad del producto final. En este sentido, considerando las dificultades de este cultivo de resistencia a plagas y condiciones ambientales, así como la dificultad y largo tiempo de germinación, en este trabajo se pretende crear un manual para brindar información respecto al manejo y germinación de la *V. planifolia* mediante mutagénesis, con la finalidad de compartir la información con las comunidades y técnicos dedicados a la producción del cultivo de vainilla.

2.5 PROBLEMAS DEL CULTIVO

Considerando que la vainilla tiene su origen y domesticación en México y fue un aromático muy importante para las sociedades prehispánicas, especialmente para la cultura totonaca, actualmente en México hay muy pocas plantaciones y productores que se dedican a este cultivo, cultivándose solamente tres especies a gran escala: *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona Schiede* y *Vanilla tahitensis Moore* (González et al, 2011)

Actualmente la vainilla se ha vuelto un cultivo con mucho interés para su investigación y

mejoramiento genético, debido a la alta rentabilidad que tiene pudiéndose incluso comparar con otros cultivos de suma importancia de la zona tales como cítricos o plátanos. Entre las principales problemáticas que se busca resolver y mejorar son la baja germinación de la semilla y la poca variabilidad genética de la especie (Ramírez *et al.* 2000).

2.6 GERMINACIÓN EN LA VAINILLA

Para el establecimiento de la vainilla *in vitro*, el explante más utilizado y con mejores resultados, es la yema axilar. Aunque lo más conveniente para el establecimiento de la especie sería utilizar las semillas, esto no se hace ya que estas simplemente no germinan y de ser así, el tiempo de germinación es en promedio de 18 semanas (Ramírez *et al.*, 2016).

Parra (1987) reportó una respuesta de germinación entre los 101 y 108 días después de la siembra en medio Murashige-Skoog, García *et al.*, (2004) reportó germinación entre los 90 y 100 días en medio MS y Knudson, Vivar 2004 obtuvo respuesta de germinación hasta las 21 semanas después de haber establecido *in vitro* las semillas; mientras que León (2006) obtuvo respuesta de germinación en 72 días con un promedio de 5.7 semillas germinadas en medio MS adicionado con 0.05mgL de ANA y 0.01mgL de BAP.

En las últimas décadas se ha podido adquirir más conocimiento sobre esta especie, de los tratamientos (medio de cultivo y reguladores), sin embargo, no se ha logrado cambiar las problemáticas y dificultades de la germinación de ésta, sigue siendo igual de tardada y variable. Es por ello, que este trabajo es externamente asesorado por el doctor titular del laboratorio de Biotecnología del CENID-COMEF del INIFAP, ya que se cuenta con un amplio conocimiento sobre la germinación *in vitro* de vainilla, así como de mutagénesis aplicada para mejoramiento genético e inducción de variabilidad genética y germinación.

3. MUTAGÉNESIS EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

A través de la radiación, determinando las dosis letales medias e inhibitorias de la especie, así como con el uso de bajas dosis de radiación se han podido lograr avances genéticos, sin comprometer fisiológicamente a la planta, logrando estimular la brotación, germinación y variabilidad genética de las plantas (Iglesias *et al.*, 2014).

La mutagénesis se aplica para inducir o mejorar las características de las plantas, sus

principales aplicaciones son la obtención de resistencia a plagas y enfermedades (Duncan, 1998; Ángeles, 2014), resistencia a salinidad y al estrés hídrico (Aguilar, 2013; Meco, 2015), así como aumentar la variabilidad genética (Antúnez *et al*, 2017).

El conocimiento sobre la inducción de germinación de la vainilla mediante esta técnica es muy escaso, sin embargo, en otras especies se ha estudiado y obtenido resultados favorables en la aplicación de esta técnica. Foroughbakhch *et al*, (2015) observaron que en girasol y soya hubo un efecto positivo de germinación y tolerancia al estrés de alta temperatura y humedad en base a la radiación aplicada. También se ha podido observar efectos positivos en la germinación mediante inducción de mutaciones en cañihua (Mayta, 2016) y en centeno (Solaluz, 2015).

4. PROTOCOLO

4.1 TECNICAS DE MICROPROPAGACION PARA *V. PLANIFOLIA*

En este cultivo, se utiliza la propagación vegetativa principalmente por esquejes debido a la viabilidad de la semilla para este proceso. Sin embargo, se ha realizado a lo largo del tiempo pruebas para mejorar y acelerar la germinación y mejoramiento genético a partir, también, de la semilla. De esta previa investigación (Cuadro 1) , se delimitaron las características que tendría este establecimiento, como lo fue usar la semilla como explante, en medio de cultivo MS y sin tratamiento ya que el medio que se utilizó contenía vitaminas.

Cuadro 1. Investigaciones realizadas sobre *V. Planifolia in vitro*

Referencia	Explante	Medio de cultivo	Tratamiento	Respuesta
Castaños F, O <i>et al</i> , 2017.	Semilla	MS	IBA, BAP	Plántula
León, 2006.	Semilla	MS	ANA, BAP	Plántula
Vivar, 2004.	Semilla	MS	Ninguno	Plántula
Torres G, MJ <i>et al</i> , 2011.	Semilla	MS y Yasuda	Ninguno	Plántula

Reyes L, D <i>et al</i> , 2015	Tallos con yemas axilares	MS	BAP, KIN, TDZ	Brotes
George, R <i>et al</i> , 2004.	Nudos	MS	IBA	Brotes
Rodríguez H, G <i>et al</i> , 2009.	Nudos	MS	BAP	Brotes

4.2 MUTAGENESIS POR IRRADIACIÓN GAMMA

Un protocolo completo de mutagénesis *in vitro* conlleva varias etapas desde la selección de material, determinación de la dosis letal media (DL50) así como el establecimiento y propagación.

En el presente trabajo se realizaron dos establecimientos de semillas de *V. planifolia* con dos diferentes tipos de material. Ambas se realizaron por irradiación gamma. Sin embargo, un establecimiento fue de semillas a diferentes dosis de irradiación y el otro un establecimiento de distintas cruzas de *V. planifolia*.

Las vainas se llevaron a irradiar al Instituto Nacional de investigaciones Nucleares (ININ) y se irradiaron con un equipo Gammacell 220 (Figura 1) . Este aparato está formado por CO60 que funciona como fuente de radiación y está protegido de una gruesa capa de plomo para blindaje.



Figura 1. Gammacell 220

La radiación representa el mutágeno físico más importante. Aquellas que son capaces de dañar a moléculas de ADN tienen longitudes de onda menores a 340 nm y energía fotónica mayor a 1 electronvoltio, y las principales fuentes de radiación son la luz UV, los rayos X y la radiación gamma. El tipo de daño se puede considerar como daño letal (causa mortalidad bajo condiciones específicas) y subletal (las células no mueren), sin embargo, en todos los casos el daño es a nivel molecular (Wani *et al*, 2014).

La radiación gamma es el mutágeno físico más ampliamente utilizado y se produce por el decaimiento de Cobalto 60 o plutonio 239; tiene alto poder de penetración y es considerado muy peligroso. Sin embargo, ha resultado muy eficiente para inducir mutaciones en tejidos vegetales, incluyendo granos de polen. Su longitud de onda es más corta que los rayos X, por lo que tienen mayor energía y así pueden penetrar mayor profundidad en el tejido, así como tener un impacto uniforme. Su efecto mutagénico reside principalmente en inducir la ruptura de la doble cadena de ADN generando arreglos cromosómicos, aunque dependiendo de la dosis y tiempo de exposición, produce normalmente mutaciones puntuales (Pathirana, 2011).

4.3 TIPO DE EXPLANTE: SEMILLAS

El uso de semillas como germoplasma inicial para irradiar permite manipular una cantidad grande, en función de la especie de algunos cientos por kilogramo a miles para así esperar generar un mayor número de mutantes; pero esto implica evaluar, en algunos casos, cientos de plántulas.

Materiales:

- Vainas de *V. planifolia*
- Sobres de 20cm x 10 cm

Procedimiento:

Se deben seleccionar y contar las vainas que se irradiarán, haciendo lotes de 6 vainas por tratamiento y rotular respectivamente cada sobre, colocando las vainas en cada uno. La exposición a radiación gamma se debe hacer por técnicos e instalaciones adecuadas como las del Instituto de Investigaciones Nucleares (ININ) que se encuentra en México. El tiempo de exposición necesaria para alcanzar la dosis de Gy depende de la intensidad de la fuente de

Cobalto60 y se requiere calcular antes de solicitar el procedimiento, las semillas se ponen a germinar una vez que se han irradiado.

En el caso de estos tratamientos, se expusieron a radiación en dosis de 0 a 200 Gy, pero se observó que al utilizar arriba de 75 Gy no hubo ninguna mutación y más que eso, no sobrevivió el material irradiado. A las vainas se les aplicaron dosis de 2,4,8,10,25,50,75,100 y 200 gy.

4.4 DESINFECCIÓN DE VAINAS

Material y reactivos

- Agua corriente y agua estéril
- Toallas desinfectantes Clorox
- Jabón antibacterial
- Solución de cloro al 20%
- Solución de etanol al 70% a partir de etanol 96°
- Etanol 96° al 100%
- Encendedor y papel aluminio
- Vasos de precipitado

Equipo

- Agitador
- Campana de flujo laminar

Procedimiento

Lavar tres veces las vainas con agua y jabón con la finalidad de eliminar cualquier contaminante. El lavado se recomienda que sea con un cepillo de cerdas suaves.

Una vez lavadas las vainas, se colocarán en vasos de precipitados previamente rotulados de sus respectivas dosis de gy. Se separarán en dos tratamientos, positivo (+) y negativo (-); para el positivo se realizara una desinfección recomendada que consiste en sumergir las vainas en una solución de etanol al 70% por 30 segundos, después se decanta y se realiza de dos a tres enjuagues con agua estéril, Para finalizar el proceso de desinfección, las vainas se enjuagan

nuevamente en una solución de cloro a l20% durante 10 minutos en el agitador y ahora en la campana se enjuaga cuatro veces con agua esterilizada para retirar todo el residuo de cloro. Para el tratamiento negativo solamente se desinfectará con una limpieza rápida con toallas desinfectantes Clorox.

Las vainas de ambos tratamientos se colocarán por último en papel aluminio dentro de la campana, en donde se flamearán 2 veces cada vaina para completar la desinfección.

4.5 MATERIALES Y METODOS ESTABLECIMIENTO

Preparación de medios para cultivo in vitro y establecimiento

Material y reactivos

- Agua 1L
- Medio de cultivo básico MS Murashige y Skoog (1962)
- Medio de cultivo básico MS con vitaminas Murashige y Skoog (1962)
- Sacarosa cristalina 30 g-L1
- Agar de grado para micropropagación 9 g- L1
- Soluciones con KOH y HCL 1N o 0.1N para el ajuste del pH
- Frascos de vidrio para cultivo estériles
- Bisturí y pinzas
- Cajas Petri estériles
- Encendedor
- Etanol 96° al 100%

Equipo:

- Autoclave
- Agitador magnético e imán
- Medidor de pH
- Microondas
- Dispensador

- Báscula
- Germinator 500

Procedimiento:

Preparación del medio

En 1 litro de agua destilada, agregar 4.33 g-L1 de medio MS, esperar a que se disuelva con ayuda del agitador y un imán, pesar y añadir 30 g de sacarosa y ajustar el pH a 5.7-5.8 y una vez ajustado agregar 9 g-L1 de agar. Retirar el imán y disolver en el microondas por lapsos de 3 minutos a potencia media, una vez que hierva y se disuelva totalmente dispensar en los frascos previamente esterilizadas 20 mL y volver a esterilizar en la autoclave.

Antes del establecimiento se debe limpiar con alcohol la campana para posteriormente flamearla junto con las cajas Petri, bisturís y pinzas.

Establecimiento

Una vez lavadas las vainas se recortan los bordes a una distancia de aproximadamente 1 cm de cada lado y con cuidado se abre la vaina en dos, cada una sobre una cada Petri diferente. Se toman las semillas con ayuda del borde de las pinzas y se van colocando sobre el medio de cultivo en los frascos respectivos. Al finalizar se rotulan o marcan cada uno de los frascos con su dosis de gy.

Resiembra: Cuando el medio de cultivo se vaya deshidratando o terminando se preparará medio de cultivo básico MS con vitaminas Murashige y Skoog (1962) (Figura 2), con las mismas medidas de desinfección y se irán cambiando con ayuda de las pinzas de un frasco a otro de la misma manera que en el establecimiento.



Product Information Sheet

M519
Murashige & Skoog (MS)
Basal Medium w/ Vitamins

Synonym: MS Medium

Properties

Form: Fine to Fluffy Powder
Appearance: White to Yellow Powder
Application: Plant Tissue Culture
Solubility: Water
Typical Working Concentration: 4.43 g/L
Storage Temp: 2-6°
Storage Temp of Stock Solution: Preparation of concentrated solutions is not recommended as insoluble precipitates may form.
Other Notes: Contains the macro- and micronutrients and vitamins as described by Murashige and Skoog (1962).
pH = 3.5-4.5

Formula (mg/L)

Ammonium Nitrate	1650
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride•6H ₂ O	0.025
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.26
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.8
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate•H ₂ O	16.9
Molybdc Acid (Sodium Salt)• 2H ₂ O	0.25

Potassium Iodide	0.83
Potassium Nitrate	1900
Potassium Phosphate, Monobasic	170
Zinc Sulfate•7H ₂ O	8.6
Glycine (Free Base)	2
myo-Inositol	100
Nicotinic Acid (Free Acid)	0.5
Pyridoxine•HCl	0.5
Thiamine•HCl	0.1

Figura 2. Ficha técnica medio MS con vitaminas. Murashige, T. y F. Skoog (1962).

Como se observa en la Figura 3, de las mutantes se establecieron un total de 86 frascos para las mutantes, 45 del tratamiento (+) desinfección recomendada y 41 del tratamiento (-) desinfección rápida. Mientras que para las cruza se establecieron 206 frascos, todos en medio MS.

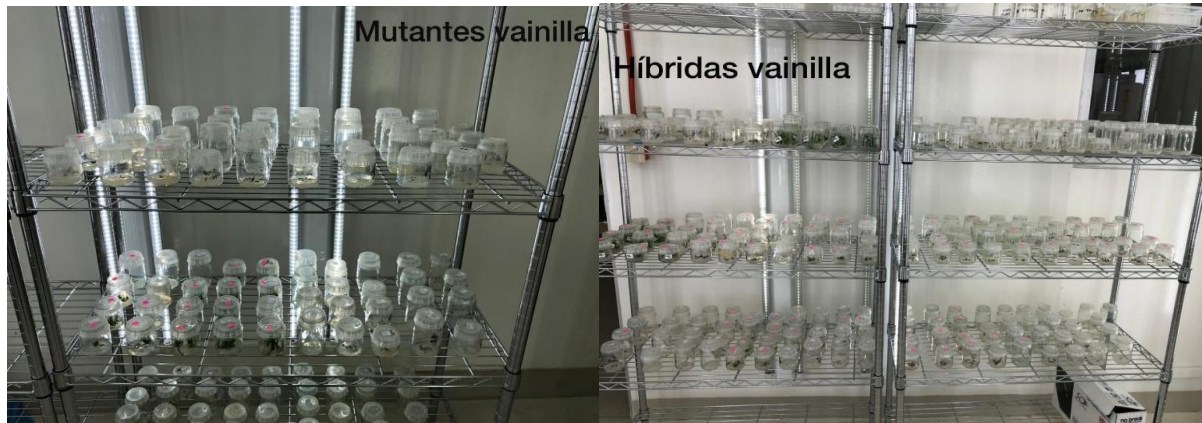


Figura 3. Establecimientos de semillas mutantes e cruza de vainilla.

4.6 RESULTADOS DE PROTOCOLO

En la primera evaluación, no se pudo observar aún respuesta de germinación; sin embargo, se logró establecer correctamente las semillas logrando no presentar contaminación (Figura 4). Al implementar sistemas automatizados para poder propagar plantas in vitro favorece la generación de plantas vigorosas y sin anomalías en su morfología (Flores *et al* 2017).

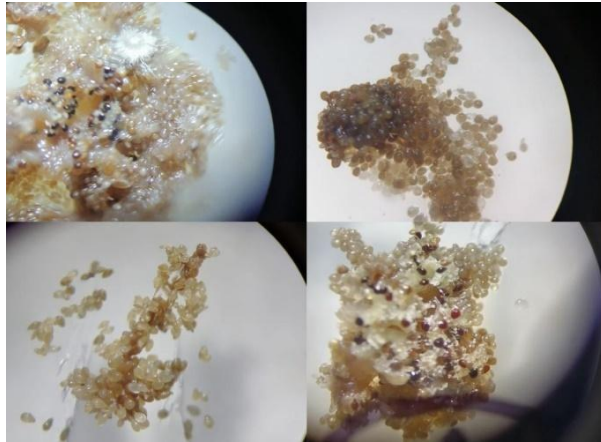


Figura 4. Vista al microscopio de la primera evaluación de semillas mutantes realizada 33 días después del establecimiento.

Para la segunda evaluación, se observó germinación en algunas dosis gy (Cuadro 2); donde los que tuvieron una desinfección recomendada (positivo) tuvo un porcentaje de germinación de 20% a 2gy y un 25% en 10gy, dando un porcentaje total de germinación del 5%, mientras que en los que se realizó una desinfección rápida (negativo) presentó un porcentaje de germinación de 25% a 4gy y un 50% a 8gy, dando un porcentaje total de germinación de 8.33%.

Cuadro 2. Segunda evaluación mutantes realizada el 29 de diciembre de 2021.

Positivas	% Germinación	Negativas	% Germinación
Testigo	0%	Testigo	0%
2gy	20%	2gy	0%
4gy	0%	4gy	25%
8gy	0%	8gy	50%
10gy	25%	10gy	0%
25gy	0%	25gy	0%
50gy	0%	50gy	0%
75gy	0%	75gy	0%

200gy	0%	200gy	0%
	5%		8.33%

En la tercera etapa de evaluación se presentó un aumento en los porcentajes de germinación (Cuadro 3) donde en el tratamiento positivo subió a 66.6% en 10gy, dando un total de germinación de 9.62%, mientras que para el negativo aumentó un 100% en 2gy y 85.71% para 8gy, incrementando el porcentaje total a 23.41%.

Cuadro 3. Tercera evaluación mutantes realizada en febrero de 2022.

Positivas	% Germinación	Negativas	% Germinación
Testigo	0%	Testigo	0%
2gy	20%	2gy	100%
4gy	0%	4gy	25%
8gy	0%	8gy	85.71%
10gy	66.6%	10gy	0%
25gy	0%	25gy	0%
50gy	0%	50gy	0%
75gy	0%	75gy	0%
200gy	0%	200gy	0%
10	9.62%		23.41%

Para la última evaluación, se observó un incremento en la germinación de ambos tratamientos (Figura 5), donde en el tratamiento positivo el testigo tuvo un porcentaje de germinación de 25%, así como 4gy con 25%, mientras que para el tratamiento negativo aumentó un 30% en 4gy y un 25% en 10gy (Cuadro 4).



Figura 5. Establecimiento de mutantes. Primer plataforma tratamiento (+), segundo tratamiento(-) ordenadas de izquierda a derecha de testigo a 200 gy

Cuadro 4. Evaluación final mutantes el 22 de abril de 2022

Positivas	% Germinación	Negativas	% Germinación
Testigo	25%	Testigo	0%
2gy	25%	2gy	100%
4gy	0%	4gy	50%
8gy	0%	8gy	85.71%
10gy	66.6%	10gy	25%
25gy	0%	25gy	0%
50gy	0%	50gy	0%
75gy	0%	75gy	0%
200gy	0%	200gy	0%
	12.95%		28.96%

Iglesias *et al* (2014) menciona que a través del uso de bajas dosis de radiación se han podido lograr avances genéticos, sin comprometer fisiológicamente a la planta, logrando estimular la brotación, germinación y variabilidad genética de las plantas, dentro de cada evaluación

realizada se presentó un porcentaje de germinación favorable únicamente en las muestras que se expusieron a menor radiación (2gy, 4gy, 8gy y 10yg) (Figura 6); a pesar de haberse hecho diferentes muestras no en todas se presentó germinación, Flores *et al* (2017) señala que los medios sólidos tienen una baja tasa de multiplicación en algunas especies.



Figura 6. Mutantes irradiados a dosis gy en las que se presentaron mejores resultados de inducción de germinación.

En referencia a las cruas, se realizó una resiembra parcial entre cada evaluación, así como una multiplicación de material para la última evaluación, con un cambio de medio de MS a MS con vitaminas obteniendo también un crecimiento exponencial de plántula.

Se logró un 100% de sobrevivencia de material cultivado *in vitro* (Cuadro 5.), así como una germinación exponencial sobre todo de la primera a la segunda evaluación, hubo pequeñas y constantes pérdidas de material en algunas cruas como la H4, H13, H19, H20, así como una multiplicación en las H2 Y H3, las cuales fueron las que se resembraron en medio MS con vitaminas.

Cuadro 5. Evaluaciones cruzas de *V. planifolia* y su respectiva fecha de realización.

DICIEMBRE	%Germinación	FEBRERO	%Germinación	ABRIL	%Germinación
Inodora	0%	Inodora	0%	Inodora	0%
H1	14.28%	H1	55.55%	H1	66.66%
H2	100%	H2	100%	H2	100%
H3	69.23%	H3	80%	H3	80%
H4	28.56%	H4	20%	H4	37.50%
H5	62.50%	H5	87.50%	H5	87.50%
H6	10%	H6	54.54%	H6	81.81%
H7	0%	H7	0%	H7	0%
H8	75%	H8	90.90%	H8	90.90%
H9	20%	H9	37.50%	H9	37.50%
H10	0%	H10	0%	H10	50%
H11	0%	H11	25%	H11	25%
H12	60%	H12	100%	H12	100%
H13	11.76%	H13	43.75%	H13	62.50%
H14	0%	H14	0%	H14	0%
H15	0%	H15	0%	H15	0%
H16	50%	H16	25%	H16	37.50%
H17	28.56%	H17	71.43%	H17	62.50%
H18	0%	H18	28.56%	H18	28.56%
H19	0%	H19	87.50%	H19	100%
H20	20%	H20	80%	H20	85.71%
H21	0%	H21	66.66%	H21	66.66%
H23	0%	H23	16.66%	H23	16.66%
H25	0%	H25	0%	H25	14.28%
H26	0%	H26	0%	H26	0%
H27	0%	H27	0%	H27	0%
H121	0%	H121	0%	H121	0%
Total	18.09%	Total	39.65%	Total	44.21%

Como se observa en el gráfico 1, en las cruzas de *V planifolia* se presentó un claro crecimiento en la tasa de germinación, así mismo, las cruzas 2 y 3 presentaron una mejor inducción de germinación, así como una muy exitosa respuesta al cambio de medio de MS a MS con vitaminas presentando un crecimiento exponencial en plántula.

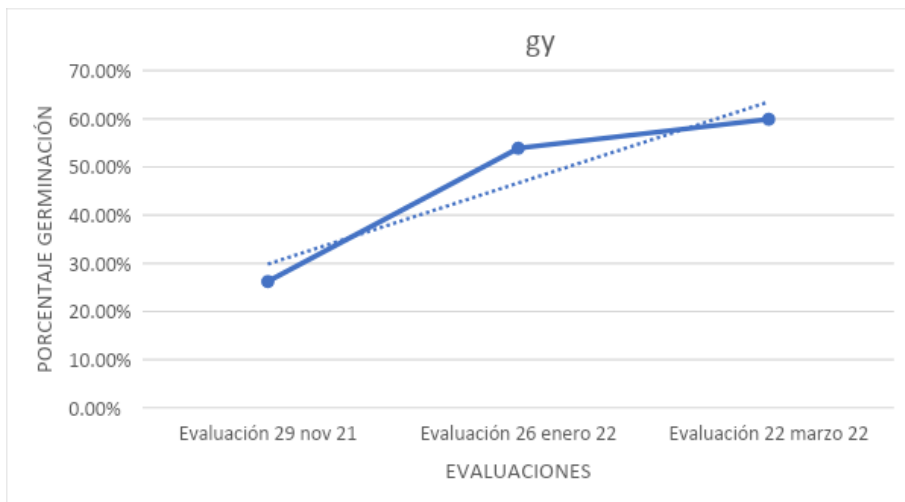


Gráfico 1. Porcentaje de germinación en las evaluaciones de cruzas

5. CONSIDERACIONES FINALES

Finalmente se pueden delimitar 3 afirmaciones, la primera que si se aplica una radiación de 2 a 10 gy se presenta una inducción en la germinación en semillas; la segunda que si se aplica una radiación de 25 gy a 75gy la semilla no presenta ningún indicio de germinación ni de muerte; y la tercera que si se aplica una radiación de 200gy causa un daño parecido a quemadura

También, el medio más con vitamina es más favorable para el desarrollo de la plántula y tratamiento negativo tiene un mayor porcentaje de germinación en referencia al positivo.

No se pudo observar aún una variabilidad genética en las cruzas, sin embargo, se presenta una inducción en la germinación de las cruzas 2 y 3.

Se recomienda aplicar mutagénesis junto con un correcto establecimiento y propagación de los mutantes y cruzas seleccionadas para garantizar una exitosa y homogénea reproducibilidad de las especies generadas; así como siempre seguir las medidas de bioseguridad y manejo de material vegetativo para evitar contaminación sobre todo cuando se trabaja con material de importancia genética.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradezco la oportunidad y el gran apoyo que me brindó el Dr. Carlos Román Castillo Martínez, investigador del Laboratorio de biotecnología y conservación forestal del CENID-COMEF.

A la Dr. Mariela Fuentes Ponce, docente de la Universidad Autónoma Metropolitana por su constante revisión y asesoramiento.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por el apoyo al irradiar el material de lavainilla.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por brindarme el lugar, equipo y materiales para este proyecto.

7. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Bory, S; S. Brown, M. F; P. Besse (2016) Evolutionary processes and diversification in the genus *Vanilla*. En: E. Odoux, M. Grisoni, editores, *Vanilla*. CRC Press, Florida, US. p. 15-29.
- Castillo M, CR; García C, F; Vallejo R, MA; Reyes M, I. (2018) Mutagénesis *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* Franco. Folleto técnico Núm 31. CENID-COMEF. INIFAP.
- Cribb P; Soto, M. (2010) A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex-Mill. (Orchidacea: Vanillinae). *Lankesteriana* 9(3):355-398.
- FAO (2021) Informe de las Naciones Unidas: El año de la pandemia, dominado por un repunte del hambre mundial. Recuperado de <https://www.fao.org/news/story/es/item/1415653/icode/>
- Foroughbakhch P, R; Bacópulos M, E; Benavides M, A (2015) Efecto de la irradiación en la germinación y vigor de tres especies vegetales.
- García S., H. Saga stume, y L. Molina 2004. Evaluación de Medios de Cultivo para la Germinación y Desarrollo de Plántulas de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) *in vitro*.
- González M, F; Aguirre M, JF (2011) Germinación de semilla y obtención de plántulas de *Vanilla planifolia* en condiciones *in vitro*. INIFAP.
- Iglesias A, I; Moreno L, P (2014) Establecimiento de las bases biotecnológicas y ecológicas en la mejora genética de *Vanilla planifolia*. Cuadernos de biodiversidad. 2014. 45. P. 1-6.
- Mayta A, ME. (2016) Dosimetría de rayos gamma para la inducción de mutación en cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen).
- Nieto B, P (2017) Caracteres morfológicos de vainilla (*Vanilla planifolia* Jack.) utilizados por el agricultor en la selección de material reproductivo en cuatro municipios del Totonacapan, México. Tesis Mag. Sc. Puebla, MX, Colegio de Postgraduados. 145 p
- Parra Q, RA. (1987). Cultivo *in vitro* y anatomía de óvulos de *Vanilla planifolia* Andrews. Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Centro de Fruticultura, Chapingo, México
- Ramírez, VP; Ortega, PR; López, AH; Castillo, FG; Livera, MM; Rincón, FS; Zavala, FG. (2010) Recursos Fitogenéticos de México para la alimentación y la agricultura, Informe Nacional, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. Chapingo, Estado de México, MX. Secretaría de Agricultura,

Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)

- Soraluz C, LE (2015) Inducción de mutaciones en Centeno (*Secale cereale linneo*) empleando radiación gamma. Repositorio la Molina.
- Soto, M; R. Dressler (2010) A revision of the Mexican and Central American species of Vanilla Plumier ex Miller with a characterization of their its region of the nuclear ribosomal DNA. Lankesteriana 9(3):285-354.
- Soto, M; R. Dressler (2013) Vanilla. En: B. Hammel, M. Grayum, C. Herrera, y N. Zamora, editores, Manual de plantas de Costa Rica, Volumen III Monocotiledóneas (Orchidaceae-Zingiberaceae). Missouri Botanical Garden, INBio, Museo Nacional de Costa Rica. p. 583-587.
- Vivar T, M. (2004) Proyecto de Investigación denominado Germinación y propagación de Vanilla planifolia (vainilla Andrews) *in vitro*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.