

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE BIORREACTORES PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)

ESTABLISHMENT OF A BIOREACTOR SYSTEM FOR VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) MICROPROPAGACIÓN

Jericó J. J.¹, Bello-Bello, J. J.¹, Spinoso-Castillo, J.¹, Iglesias-Andreu, L. G.^{2*}

¹Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Congregación Manuel León, Municipio de Amatlán de los Reyes, C. P. 94946, Veracruz, México. ²Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana. Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Xalapa, Veracruz México.

*Autor responsable: xliglesias@gmail.com

RESUMEN

Se diseñó e instaló un sistema de biorreactores para la micropropagación a gran escala de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, una orquídea de importancia económica. Se comparó la eficiencia del protocolo de cultivo *in vitro* empleando el método convencional en medio sólido con el sistema de inmersión temporal en medio líquido. Los resultados mostraron que el cultivo en biorreactores permitió alcanzar en 30 días de cultivo una tasa más elevada de multiplicación (12 brotes/explante) mientras que en medio semisólido la tasa de multiplicación fue menor (7 brotes/explante), indicando que el sistema de cultivo en biorreactores es una excelente alternativa para la propagación *in vitro* de esta valiosa especie.

Palabras clave: propagación, inmersión temporal, SIT, vainillina.

ABSTRACT

A bioreactor system was designed and installed for the large-scale micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. an orchid of economic importance. The efficiency of the *in vitro* culture protocol using the conventional method in solid medium was compared with the temporary immersion system in liquid medium. The results showed that cultivation in bioreactors allowed to reach a higher rate of multiplication (12 shoots/explant) in 30 days of cultivation, while in the semisolid medium the rate of multiplication was lower (7 shoots/explant); this indicates that the cultivation system in bioreactors is an excellent alternative for *in vitro* propagation of this valuable species.

Key words: propagation, temporary immersion, SIT, vanilla.



INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es una orquídea que se cultiva comercialmente por sus silicuas aromáticas de las cuales se extrae la vainillina, una sustancia saborizante ampliamente demandada para su uso en la industria alimenticia y como cosmético (Bory, 2008). A pesar de su importancia esta especie se encuentra amenazada (NOM-ECOL-059-2001) debido a que las poblaciones silvestres han sido diezmadas con la recolecta excesiva para establecer plantaciones comerciales. En México es una especie subutilizada, ya que actualmente sólo se produce cerca de 1% de la producción mundial y no se ha aprovechado la denominación de origen "Vainilla de Papantla" que el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) le otorgó en 2009 para su protección (Soto, 2006). Una de las limitantes actuales de esta especie es que no se cuenta con protocolos eficientes para su propagación masiva. En la actualidad esta especie se propaga comercialmente por la vía asexual mediante el uso de esquejes (segmentos de tallo) que se obtienen de plantaciones comerciales, sin embargo, dada la importancia económica, social y cultural del cultivo, así como el desabasto de propágulos resulta importante contar con un protocolo eficiente para propagar comercialmente la especie (Figura 1).

La micropropagación de plantas

La micropropagación o clonación *in vitro* de plantas es una de las aplicaciones biotecnológicas más desarrollada en los últimos años. En la actualidad constituye una de las herramientas más utilizadas. Por esta vía, es posible obtener un gran número de individuos libres de plagas y enfermedades en menor tiempo y empleando espacios reducidos. Actualmente la industria biotecnológica agrícola en México cuenta con potencial productivo para la propagación masiva de plantas. Sin embargo, el empleo de la micropropagación a escala comercial se ha limitado cada vez más, debido principalmente a los altos costos por mano de obra, baja eficiencia biológica y falta de automatización durante los procesos de la micropropagación. Existen reportes para micropropagación de *V. planifolia* (Philip y Nainar, 1986; Tencio, 1992; Lee-Espinosa *et al.*, 2008; Mino 2009; Palama *et al.*, 2010; Chin Tan *et al.*, 2011). Sin embargo, los protocolos de micropropagación que se han desarrollado en este cultivo tienen baja tasa de multiplicación; además, el uso de sistemas de inmersión temporal no ha sido reportado en esta especie.

Sistemas de inmersión temporal (SIT)

El Sistema de Inmersión Temporal (SIT) es el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos temporalmente a medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones axénicas y controladas. Actualmente existen una amplia gama de modelos y sistemas automatizados que se emplean en la micropropagación de plantas, dentro de los cuales destaca el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT[®]) (Escalona *et al.*, 1999), el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]) (Alvard *et al.*, 1993), el Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMINT[®]) (Robert *et al.*, 2006), el Plantima[®] (A-Tech Bioscientific, 2010) y, más recientemente, el SETIS[®] (SETIS, 2012). La tecnología de biorreactores y técnicas de micropropagación de alta frecuencia abren las puertas para lograr un mayor escalado en el proceso de micropropagación. El sistema de micropropagación que se propone en el



Figura 1. Huerta comercial de vainilla (*Vanilla planifolia*) originada asexualmente. Esqueje y yema.

presente trabajo permite la semiautomatización del proceso y evita el uso de agentes gelificantes que encarece el proceso convencional, reduce los costos ocasionados por la mano de obra y aumenta la eficiencia biológica del cultivo *in vitro* de *V. planifolia*. Con base en lo anterior, el objetivo del presente fue desarrollar un protocolo para la micropropagación eficiente del germoplasma de *V. planifolia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo Vegetal del Instituto de Biotecnología y Ecología aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana. Para su ejecución primeramente se diseñó e instaló el SIT a nivel de laboratorio y posteriormente se estableció el protocolo de micropropagación. Para la instalación del SIT se adecuó un espacio físico con control de las condiciones de temperatura y humedad adecuadas para el desarrollo e incubación de los cultivos *in vitro*. Se dispuso de un anaquel cuya parte superior se adaptó para ubicar un recipiente con los explantes y, en su parte inferior, otro conteniendo el medio de cultivo. Ambos frascos estuvieron comunicados a través de mangueras de silicona. Las condi-

ciones de esterilidad se lograron mediante el empleo de filtros hidrofóbicos de $0.2 \mu\text{m}$. Según el tiempo programado, la válvula y el aire proveniente del compresor se abren para impulsar el medio de cultivo hacia la parte superior conteniendo los explantes. Durante el período de inmersión se produce un flujo de aire que genera el burbujeo del medio que a su vez remueve los explantes. Pasado el tiempo de inmersión, el líquido regresa por gravedad al reservorio de medio de cultivo. La frecuencia y el tiempo de inmersión se regulan mediante el empleo de un temporizador o controlador lógico programable (PCL). De esta forma se logra la automatización del sistema de inmersión temporal (Figura 2).

Propagación *in vitro*

Se emplearon como explantes, yemas y ápices de plantas de vainilla (*V. planifolia*) recolectadas en Papantla, Veracruz México; se lavaron bajo un flujo de agua corriente por 45 minutos. Posteriormente se mantuvieron en agitación por 30 minutos en una solución de Benomilo 1 g L^{-1} (Promyl®). Una vez en la cámara de flujo laminar se procedió a desinfectar los explantes en soluciones de etanol al 70% v/v durante 30 s y cloro comercial al 10% v/v durante 20 minutos. Finalmente se aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Después de este tratamiento los explantes se sumergieron nuevamente por 10 minutos en una solución al 3% de cloro comercial (hipoclorito de sodio) y se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril. Los explantes se cultivaron en medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2 g L^{-1} de benciladenina (BA) de acuerdo con la metodología propuesta por Lee-Espinoza *et al.* (2008). Para la etapa de enraizamiento se utilizó medio MS al 50% sin reguladores del crecimiento. Para el medio semisólido se usó Gelrite™ (SIGMA®) al 0.22% (w/v) como agente gelificante. El pH de los medios fue ajustado a 5.8. La esterilización se realizó en autoclave a 1.5 Kg cm^{-2} de presión y 121 °C durante 20 minutos. Los recipientes de cultivo, conteniendo tres explantes para el medio semisólido y cinco para el SIT, fueron incubados a $24 \pm 2 \text{ °C}$ y se mantuvieron bajo luz fluorescente ($40\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad. Se utilizó un diseño

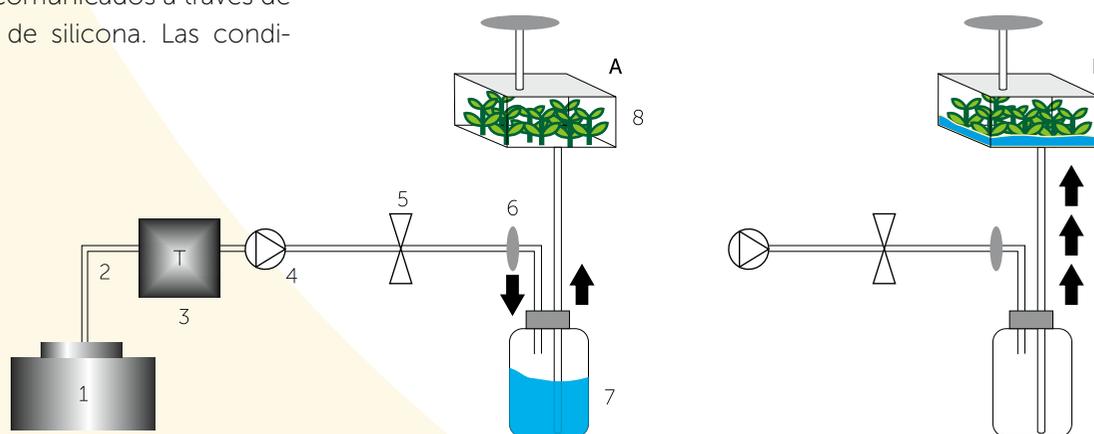


Figura 2. Diagrama del sistema de inmersión temporal (SIT). A: Sin inmersión. B: Con inmersión. 1: Compresor de aire, 2: Manguera de silicona, 3: Temporizador, 4: Bomba de solenoide, 5: Conexión a tubo de venteo, 6: Filtro venteo, 7-8: Recipiente con explantes.

experimental completamente al azar y se emplearon 30 explantes por tratamiento. Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS v. 11.5 para Windows y, para detectar diferencias entre los tratamientos, se realizó una prueba t-Student ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que fue posible lograr la inducción de brotes en los dos sistemas evaluados. Sin embargo, el cultivo en biorreactores resultó ser el más eficiente ya que permitió obtener 12 brotes por explante en promedio. El cultivo en medio semisólido solo permitió obtener una tasa de multiplicación de siete brotes por explante (Cuadro 1). El sistema de inmersión temporal en biorreactores aumentó en 42% la tasa de multiplicación, comparado con el sistema en medio sólido.

La longitud de los brotes fue mayor en medio sólido (1.8 cm), mientras que en inmersión temporal fueron de 1.4 cm en promedio. Esto se debió probablemente a que los formados en inmersión temporal tienen mayor superficie de contacto con el medio de cultivo líquido. Además, los formados en medio líquido fueron homogéneos. Una de las ventajas del sistema de inmersión temporal, comparado con otros realizados *in vitro*, es que permite combinar la aireación con la inmersión del explante, sometiéndolo al tiempo y periodo de inmersión requerido para que las plántulas tomen del medio de cultivo los nutrientes y reguladores del crecimiento para su desarrollo. Esta es una de las razones que lo hacen más eficiente. De acuerdo con Alvard *et al.* (1993), el tiempo de inmersión del explante es, probablemente, la característica que más atención requiere cuando se desea propagar una especie. Los SIT han sido empleados para la micropropagación de plantas de cítricos (*Citrus spp.*) (Cabasson *et al.*, 1997), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Lorenzo *et al.*, 1998),

caféto (*Coffea arabica*) (Etienne-Barry *et al.*, 1999), banano (*Musa paradisiaca*) (Colmenares y Giménez, 2003), manzano (*Malus domestica*) (Zhu *et al.*, 2005), eucalipto (*Eucalyptus spp.*) (McAlister *et al.*, 2005), chile habanero (*Capsicum chinense*) (Bello-Bello *et al.*, 2010), entre otros. En el caso particular de *V. planifolia*, los brotes obtenidos bajo el SIT mostraron ser más vigorosos en comparación con aquellos que fueron cultivados en medios semisólido (Figura 3).

Cuando los brotes alcanzaron entre 2-4 cm de longitud después de 30 días de cultivo *in vitro*, fueron trasladados a etapa de enraizamiento en biorreactores, donde 100% de los brotes produjeron raíces (Figura 4 A), con 95% de supervivencia durante la etapa de aclimatización, observándose plántulas vigorosas (Figura 4 B).

CONCLUSIONES

El sistema de micropropagación de vainilla empleando los biorreactores propuestos aumentan la tasa de multiplicación y permiten disminuir el costo de operación y el uso de agentes gelificantes, facilitando la

Cuadro 1. Número y longitud de brotes de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) desarrollados en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

Sistema de cultivo	Número de brotes/ explante (media±ES)	Longitud (cm)
Medio sólido	7.11±0.31 b	1.88±0.09 a
Inmersión temporal	12.04±0.48 a	1.45±0.07 b

*Los valores representan la media±ES (error estándar). Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (t-Student, $p \leq 0.05$).



Figura 3. Desarrollo de brotes obtenidos en diferentes sistemas de micropropagación. A: Medio semisólido. B: Inmersión temporal.

regeneración de plantas a gran escala, lo que hace posible liberar accesiones conservadas *in vitro* y facilitar su reinserción a los ecosistemas alterados.

LITERATURA CITADA

Alvard D.C., Teisson C.D. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 32: 55–60.

A-Tech Bioscientific (<http://www.atechbios.com.tw>)

Bello-Bello J., Canto-Flick A., Balam-Uc E., Gómez-Uc E., Robert M., Iglesias-Andreu L., Santana-Buzzy N. 2010. Improvement of *In Vitro* proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion. *HORTSCIENCE* 45(7): 1093–1098.

Bory S., Lubinsky P., Risterucci A.M., Noyer J.L., Grisoni M., Duval M.F., Besse P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *Am. J. Bot.* 95 (7): 805-815

Cabasson C., Alvard D., Dambier D., Ollitrault P., Teisson C. 1997. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 33–37

Chin T.B., Foan C., Alderson P. 2011. Optimization of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* 105: 457–463.

Colmenares M., Giménez C. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 20: 468-477.

Escalona M., Lorenzo J.C., González B., Daquinta M., Gonzalez J.L., Desjardins Y., Borroto C.G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.*18:743–748.

Geetha S., Sudheer A. 2000. In vitro propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Currentscience*. 79(69): 886-890.

Lee Espinoza H., Murguía J., García B., and Córdoba A. 2008. *In vitro* Clonal Propagation of *Vanilla planifolia* Andrew. *HortScience*.

Lorenzo J.C., Gonzalez B.L., Escalona M., Teisson C., Espinosa P. and Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54:197–200

MacAlister B., Finnie J., Watt M. M. P. and Blakeway F. 2005. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 347-358

Minno D and Nirmal K (2009). Micropropagation and *In vitro* Conservation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). In: Mohan J and Praveen K (eds) *Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants*. *Methods Mol Biol.* Vol. 547 (pp.129-138) Humana Press, New York.

Palama T., Menard P., Fock I., Choi Y., Bourdon E., Govinden-Soulange J., Payet M.B, Verpoorte R. and Kodja H. 2010. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla*



Figura 4. Enraizamiento y aclimatización de vitroplántulas de vainilla. A: Enraizamiento. B: Aclimatización en condiciones de invernadero.

- planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. BMC Plant Biol. 10 (82): 1-18.
- Phillip V., Nainar S. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb) Ames using tissue culture. J Plant Physiol. 122: 211-215.
- Robert M.L., Herrera-Herrera J.L., Herrera-Herrera G., Herrera-Alamillo M.A., Fuentes-Carrillo P.A. 2006. New temporary immersion bioreactor system for micropropagation, p. 121-129. In: Loyola-Vargas, V.M. and F. Vazquez-Flota (eds.). Plant cell culture protocols. 2nd Ed Vol 11. Humana Press, Totowa, NJ.
- Sánchez-Morales S., Becerril-Román E., Tijerina-Chávez L., Santizo-Rincón J.L. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción de Papantla, Veracruz. Rev Fitotec Mex. 24: 49-56.
- SETIS. (<http://www.setis-systems.be>)
- Soto-Arenas M.A. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. Biodiversitas 66: 1-9.
- Tencio G. 1992. Respuesta de la vainilla (*Vanilla fragans*) *in vitro* al ácido acetil salicílico. Instituto tecnológico de Costa Rica. Depto. de Agronomía. Costa Rica.
- Zhu Li-Hua, Li Xue-Yuan, Welander M. 2005. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81:313-318.

