



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA EN BIOTECNOLOGÍA

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN
DE *VANILLA ODORATA* C. PRESL EN SISTEMAS DE
INMERSIÓN TEMPORAL (SITS) TIPO RITA®**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: JORGE RICARDO BERMEO PEÑAFIEL

TUTORA: PhD. Zulay Marina Niño Ruíz

COTUTOR: PhD Luis Eduardo Morillo Velastegui

Napo – Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, **JORGE RICARDO BERMEO PEÑAFIEL**, con documento de identidad N° **1713553673** declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de **Ingeniero en Biotecnología**, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 19 de junio del 2023



Jorge Ricardo Bermeo Peñafiel

C.I: 1713553673

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, JORGE RICARDO BERMEO PEÑAFIEL, con documento de identidad N°1713553673, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN DE VANILLA ODORATA C. PRESL EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL (SITS) TIPO RITA®, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiám una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiám para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 19 de junio de 2023



Jorge Ricardo Bermeo Peñafiel

C.I: 1713553673

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “**Optimización del proceso de micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl en Sistemas de Inmersión Temporal (SITs) tipo RITA®**”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por **Jorge Ricardo Bermeo Peñafiel**, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 19 de junio del 2023

PhD. Zulay Marina Niño Ruíz

CI: 1756516041

PhD. Luis Eduardo Morillo Velastegui

CI: 1708207632

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Regional Amazónica Ikiám por los conocimientos compartidos. A la Facultad de Ciencias de la Vida por permitirme formar parte de la misma y cultivar mi curiosidad para desarrollar nuevas ideas y proyectos.

Al Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y la Estación Experimental Santa Catalina.

A la Dra. Zulay Niño la decana de la Facultad de Ciencias de la Vida por su apoyo constante y estar siempre dispuesta a compartir sus conocimientos.

Al Dr. Eduardo Morillo, director del Departamento Nacional de Biotecnología y cotutor de esta tesis, por darme la oportunidad de contribuir al desarrollo del proyecto “Vainilla”.

Al Msc. Santiago Meneses por su mentoría en desarrollo de este estudio y por su disposición innegable y generosa para compartir sus conocimientos.

Al PhD. Willin Álvarez por su ayuda en la estadística de esta tesis.

A todos los integrantes del equipo del Departamento Nacional de Biotecnología y de la Estación Santa Catalina: Georgina, Johana, Maribel por su ayuda.

DEDICATORIA

A mi amada familia que siempre me ha apoyado en todas mis luchas.

A mi padre Jorge Milton que es mi guía, a mi madre María Dolores que me dio la vida.

Ambos me han mostrado el verdadero valor de la vida. Gracias por esa fe infinita.

A mi abuela Margarita Eufrosina quien sigue siendo mi luz y mi fuerza constante. Gracias por ese amor incomparable.

A mis hermanos Rodrigo Sebastián y Christian Javier por su confianza y ayuda constante en todos mis proyectos. Gracias por esa fuerza única.

A mis tías Yolanda, Marlene, María, Guillermina y a mi tío Carlín, Lucho, Alfonso, Patricio y Jorge por su cariño.

A mis primos Galo André, David, Diego, Patricio Javier, Carlos Isaac, Josue y Lorena que fueron parte importante de mi infancia y educación.

A mis ancestros Cármen, Ubelia, Amable, Jorge María Isaac, gracias por este legado.

A todas mis maestras y maestros de esta vida, gracias por esos aprendizajes.

A la Amazonía que es lo que verdaderamente hay que proteger y preservar, y anhelo que con esta investigación pueda ayudar a cuidar su infinita naturaleza.

A la verdad que es mi Diosa y a la Ciencia que es mi camino para aproximarme a ella, y así poder admirarla para seguir medrando.

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	i
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	ii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1.CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1.Antecedentes	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Origen y taxonomía.....	1
1.1.3. Genero Vanilla	2
1.1.4. Actualidad taxonómica	3
1.1.5. Vanilla odorata C. Presl.....	5
1.1.5.1 Descripción morfológica.....	6
1.1.5.2 Importancia económica	8
1.1.5.3 Métodos de cultivo	9
1.1.5.4 Propagación.....	10
1.1.5.5 Técnicas de cultivo in vitro	10
1.1.5.6 Medio de cultivo	11
1.2 Planteamiento del problema	15

1.3	Justificación de la investigación.....	16
1.4	Objetivos de la investigación	17
1.4.1	<i>General</i>	17
1.4.2	<i>Específicos</i>	17
2.	CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	18
2.1	Localización del estudio	18
2.2	Condiciones de cultivo.....	18
2.3	Metodología	19
2.3.1	Material Vegetal	19
2.3.2	<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i>	20
2.3.4	<i>Factores de estudio</i>	21
2.3.5	<i>Tratamientos</i>	22
2.3.5	Variables evaluadas	22
3.	CAPÍTULO III: PRESENTACION DE DATOS Y RESULTADOS	24
3.1	Multiplicación en Sistemas de Inmersión Temporal	24
3.2	Índice de multiplicación	24
3.3	Longitud de brotes.....	29
3.4	Diámetro de brotes.....	32
3.5	Número de hojas por brote.....	35
3.6	Número de raíces por <i>vitroplanta</i>	38
3.7	Porcentaje de Oxidación	40
3.8	Porcentaje de Hiperhidratación	44

4. CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	47
4.1 Interpretación de resultados.....	47
4.1.1 Índice de multiplicación.....	47
4.1.2 Largo y diámetro de brotes.....	50
4.1.3 Número de hojas por brote.....	52
4.1.4 Número de raíces por vitroplanta.....	53
4.1.5 Oxidación e Hiperhidratación.....	54
4.1.6 Consideraciones generales.....	55
5. CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
5.1 Conclusiones.....	58
5.2. Recomendaciones.....	58
6. REFERENCIAS.....	61
7. ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Jerarquía taxonómica de <i>Vanilla odorata</i> C. Presl.....	6
Tabla 2. Reportes de los efectos de <i>V. planifolia</i> en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®.....	14
Tabla 3. Ubicación del sitio experimental	18
Tabla 4. Ubicación del sitio experimental	18
Tabla 5. Esquema del análisis de varianza (ANOVA) en la micropropagación de <i>Vanilla odorata</i> C. Presl utilizando Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA.....	21
Tabla 6. Tratamientos de multiplicación <i>V. odorata</i>	22
Tabla 7. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los tratamientos de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Vanilla odorata</i> en medio de cultivo líquido con SITs tipo RITA®.....	24
Tabla 8. ANOVA del índice de multiplicación de la micropropagación de <i>Vanilla odorata</i> con SITs - RITA.....	25
Tabla 9. ADEVA del índice de multiplicación de la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs–RITA.....	26
Tabla 10. ANOVA de longitud de brote en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	30
Tabla 11. ADEVA de longitud de brote en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs – RITA.....	31
Tabla 12. ANOVA del diámetro de brote en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	33
Tabla 13. ADEVA del diámetro de brote en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs – RITA.....	33
Tabla 14. ANOVA del número de hojas por brote en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	36

Tabla 15. ADEVA del número de hojas por brote en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	37
Tabla 16. ANOVA de número de raíces por <i>vitro</i> planta en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	39
Tabla 17. ADEVA del número de raíces por brote en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	39
Tabla 18. Prueba Kruskal- Wallis de porcentaje de oxidación en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	41
Tabla 19. Prueba Kruskal- Wallis con rango de significancia estadística para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	42
Tabla 20. Prueba Kruskal- Wallis de porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de <i>V. odorata</i> con SITs - RITA	44
Tabla 21. Promedios y pruebas de significancia para los variables evaluados de los mejores tratamientos y controles de este estudio	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Lámina a color de <i>Vanilla odorata</i> . A-C. flor vista frontal a lateral D. perianto disecado, E. Labelo y columna en vista lateral, F. Labelo vista frontal, G. Columna en vista lateral y frontal, H. Inflorescencia, I. Hojas. Fuente: [19].	7
Figura 2.Esquema de funcionamiento del recipiente RITA®. A. Período de exposición B. Paso de medio desde sección de almacenamiento a la cámara de cultivo por presión de aire por tubo central C. Período de inmersión. D. Paso de retorno por gravedad. Fuente: [59].....	13
Figura 3.Índice de multiplicación de los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo.	27
Figura 4.El tratamiento con mayor número de brotes (Tratamiento t7) y el tratamiento con menor número de brotes (Tratamiento t4).	32
Figura 5.Las cuatro repeticiones del tratamiento t2, con bajo consumo de medio de cultivo	35
Figura 6. Longitud de brotes los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo.....	38
Figura 7. Hojas por brote de los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo.....	40
Figura 8.Hojas por brote de los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo	45
Figura 9.Raíces por <i>vitroplanta</i> de los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo.....	28
Figura 10.Graficas para frecuencia, volumen y tratamientos comparando con pruebas Kruskal-Wallis y Wilcoxon	29
Figura 11.Explantes con alteraciones morfológicas, algunas fotos de explantes con brotes oxidados e hiperhidratados	47
Figura 12.Las 5 repeticiones para los controles Cp con <i>Vanilla planifolia</i> y los controles Co con <i>Vanilla odorata</i>	56

RESUMEN

En el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina (EESC); se desarrolló un estudio para optimizar la micropropagación de la especie *Vanilla odorata* utilizando Sistemas de Inmersión Temporal. Se evaluaron diferentes frecuencias de inmersión cada 4, 6 y 8 horas con una duración de 2 minutos cada una y volúmenes de 150, 200 y 250 mL. Se utilizaron como explantes 10 yemas apicales de 2cm por frasco RITA® evaluados en 9 tratamientos. El medio de cultivo compuesto de 4.3 g.L⁻¹ de medio Murashigue y Skoog (MS) con 2.15 mg.L⁻¹ de BAP, 150 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 35 mg.L⁻¹ de clorhidrato de L-cisteína, 30 g.L⁻¹ de sucrosa con pH ajustado a 5.8. Después de 45 días se evaluó el índice de multiplicación, longitud, diámetro y número de hojas por brote, raíces por *vitro* planta, volumen de medio de cultivo consumido y porcentaje de oxidación. El proceso de micropropagación se pudo optimizar de 60 a 45 días, y de un índice de multiplicación de 4 en medio semisólido a 9.3 brotes en el tratamiento t7 con una frecuencia de 8 horas y volumen de 150mL.

Palabras clave: *Vanilla odorata*, Sistemas de Inmersión Temporal, optimización, micropropagación

ABSTRACT

In the tissue culture laboratory of the Biotechnology Department of the National Institute of Agricultural Research (INIAP), Santa Catalina Experimental Station (EESC), a study was carried out to optimize the micropropagation of the *Vanilla odorata* species using Temporary Immersion Systems. Different immersion frequencies were evaluated every 4, 6 and 8 hours with a duration of 2 minutes each and volumes of 150, 200 and 250 mL. Ten 2 cm apical buds per RITA® flask were used as explants and evaluated in 9 treatments. The culture medium composed of 4.3 g.L⁻¹ Murashigue and Skoog (MS) medium with 2.15 mg.L⁻¹ BAP, 150 mg.L⁻¹ ascorbic acid, 35 mg.L⁻¹ L-cysteine hydrochloride, 30 g.L⁻¹ sucrose with pH adjusted to 5.8. After 45 days, the multiplication rate, length, diameter and number of leaves per shoot, roots per *in vitro* plant, volume of culture medium consumed and percentage of oxidation were evaluated. The micropropagation process could be optimized from 60 to 45 days, and from a multiplication index of 4 in semisolid medium to 9.3 shoots in treatment t7 with a frequency of 8 hours and volume of 150mL.

Key words: *Vanilla odorata*, Temporary Immersion Systems, optimization, micropropagation.

1. CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1 Generalidades

La especie más cultivada de “vainilla” a nivel mundial es *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, siendo Madagascar el primer productor, seguido de Indonesia y México [1]. Esta planta es parte del grupo con mayor interés comercial debido a que sus frutos contienen vainillina, un químico de alto valor utilizado en la industria alimenticia, cosmética [2] y farmacéutica por sus cualidades antioxidante y antimicrobiano, entre otras [1]. De hecho, la vainilla es la segunda de las tres especias más costosas después del azafrán [3]. La vainillina es extraída de las vainas de algunas plantas aromáticas del género *Vanilla*. Además, se cultiva en otros países como Papúa Nueva Guinea, China, Turquía, Tonga, Uganda, Comoros e India. Finalmente, el mayor importador a nivel mundial de vainilla es Estados Unidos [4,5].

La segunda especie de *Vanilla* más cultivada a escala comercial es *Vanilla x tahitensis* Moore [5]. Sin embargo, en los últimos años se ha prestado atención a dos especies adicionales: *Vanilla pompona* subsp. *grandiflora* (Lindl.), cuyos frutos grandes le otorgan una mayor vigorosidad, aunque su extracto es de menor calidad [5]; y híbridos entre *V. planifolia* que presentan buen crecimiento y resistencia a altas temperaturas y fusarium [6]. *V. x tahitensis* Moore es un híbrido que surgió hace unos 500-600 años [7], con una genética en menor contribución del polen de la especie *Vanilla odorata* C. Presl., lo que tiene un gran impacto en su aroma y en la división de la vaina [5,8].

1.1.2 Origen y taxonomía

Las orquídeas u orquidáceas son una familia de monocotiledóneas que tuvieron su primera divergencia a partir del ancestro común de todos los otros miembros del Orden Asparagales hace 112 millones de años [9]. Hace 90 millones de años comenzó la divergencia hacia los diferentes linajes que componen Orchidaceae [10], siendo Vanilloideae uno de los linajes más antiguos y con mayor diversidad (200 especies) [11,12]. La divergencia de Vanilloideae empezó hace 84 millones de años [10], después de la subfamilia Apostasioideae (15 especies) que contiene 2 géneros *Apostasia* y

Neuwiedia. Esta última representa las orquídeas más primitivas y presentan menor cantidad de modificaciones de un ancestro pre-orquídea [13].

La familia Orchidaceae es una de las familias más diversas y numerosas de plantas con semilla, representando aproximadamente el 10% de todas las plantas con semilla [14]. Se han reportado alrededor de 30.000 especies en 800 géneros en todo el mundo, lo que la convierte en una de las familias con mayor diversidad y cantidad de especies a nivel global [15]. Esta familia tiene una distribución por todo el planeta, excepto en zonas polares [16,17], y la mayoría de sus especies se encuentran naturalmente en regiones tropicales de América, Asia y África, particularmente en montañas.

En Brasil, Orchidaceae representa las monocotiledóneas con el mayor número de especies, con alrededor de 2.400 especies distribuidas en varios ecosistemas, principalmente en el neotrópico, y se agrupan en 191 géneros [18]. Esta familia es importante tanto desde el punto de vista ecológico como económico, ya que algunas especies se utilizan en la producción de alimentos y medicamentos, y muchas otras son altamente valoradas como plantas ornamentales.

1.1.3. Genero Vanilla

El género *Vanilla* es parte de la tribu Vanilleae y se caracteriza por tener solo un estambre fértil. A pesar de que se han publicado 196 nombres en el género a nivel específico, actualmente se reconocen 118 especies en Orchidaceae [8]. Sin embargo, recientemente se ha reportado la existencia de 120 especies [11], mientras que algunos autores mencionan la presencia de 126 especies [19,20].

A pesar de su lenta tasa de diversificación genética [9]., las especies de *Vanilla* tienen una distribución pantrópica, con una distribución principalmente en los trópicos del Nuevo Mundo [12]. Aunque son raros los casos de radiaciones génicas locales [19], la mayoría de las especies son endémicas de América tropical. Un subconjunto de 35 especies propias del clado americano produce frutos aromáticos [11,21], que posiblemente contienen vainillina [8].

A lo largo de la historia, el género *Vanilla* ha sido objeto de diferentes propuestas taxonómicas. En 1896, Rolfe propuso dos secciones para este género: Foliasae y

Aphyllae. En 1954, Porteres dividió Foliasae en tres subsecciones: Papiloseae, Lamellosae y Membranaceae. En 2010, Soto Arenas & Cribb, y Bouetard et al., de manera independiente propusieron una clasificación para todo el género *Vanilla*.

La clasificación propuesta por Soto Arenas & Cribb para el género *Vanilla*, divide el género en dos subgéneros: Xannata y Vanilla. Cada uno de estos subgéneros se subdivide en secciones y morfogrupos. El subgénero Xanata se divide en dos secciones, Tethya y Xanata[22]. Tanto Soto Arenas & Cribb (2010) como Bouetard et al. (2010) coinciden en los resultados obtenidos para los clados, pero con distintos nombres Paleotropical (gamma) y Neotropical fragante (Beta) [23].

1.1.4. Actualidad taxonómica

En 2020 Hasing et al. [14] publica el genoma de *V. planifolia* a escala cromosómica seleccionando la accesión Daphna, esta especie representa el tipo comercial más común de vainilla, y presento 1.480,9 Mb a escala cromosómica. Esto permitió conocer mejor la estructura y el tamaño del genoma de esta especie. Esta información es fundamental para entender los procesos de mejora genética y la biología de la planta, lo cual podría tener aplicaciones prácticas en el futuro, como mejorar la productividad de las plantas y aumentar la calidad de la vainilla que se produce.

En 2022 Favre et al., realizan un estudio de diversidad genética inter e intraespecífica en el género *Vanilla* utilizando Genotipado por Secuenciación (GBS, por sus siglas en inglés) para la identificación de 2004 marcadores de Polimorfismos de un solo Nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) filtrados de alta calidad con el fin de analizar la relación genética y estructura de las dos especies más cultivadas de *Vanilla* (*V. planifolia* y *V. tahitensis*) y siete especies relacionadas estrechamente junto con 19 híbridos interespecíficos.

Los datos generados apoyan la taxonomía propuesta por Bouetard et al., (2010) [23], pero difiere de un tema importante de análisis, la progenie de *V. x tahitensis*, siendo *V. odorata* un progenitor, pero existe una duda con el otro progenitor dado que este último es más cercano a *V. sotoarenasii* que a *V. planifolia* como se había reportado [10].

Los resultados del estudio más actual [11], muestran que las variaciones de forma y color de frutos se debe a la epigenética, mientras que la variabilidad de la morfología de órganos reproductivos esta poco impactada por las condiciones ambientales y otorgan un mayor valor taxonómico, y con lo que se plantea la cercanía de *V. x tahitensis* con sus progenitores *V. odorata* y *V. sotoarenasii*.

Esto se corrobora con Chambers et al., [8] en 2021 cuando se constata con un Análisis de Componentes Principales (PCA), que; *V. x tahitensis* está separada de *V. planifolia*, pero una accesión de esta última esta cercana a *V. sotoarenasii*. Por otra parte, Karremans et al., (2020) [19] sostiene que *V. sotoarenasii* no es una especie, sino un híbrido introgresado entre *V. odorata*, *V. tahitensis* y/o *V. planifolia*.

La mayor cantidad de vainilla comercial se reproduce por descendientes propagados vegetativamente (reproducción asexual) debido a esto se ha reportado una diversidad genética limitada [24]. Utilizando información genética se ha podido confirmar la uniformidad genética de la mayoría de los cultivos, como los estudios de variación de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) con los que se determina la acumulación de mutaciones puntuales por medio de la multiplicidad vegetativa [2].

La baja diversidad genética se ha reportado utilizando ISSR [8], y la heterocigosidad que surge de la propagación clonal estricta lleva a la acumulación de mutaciones deletéreas. Por lo tanto, la sostenibilidad de las plantaciones de *V. planifolia* podría estar amenazada por la carga mutacional, y se plantea como la mejor estrategia para preservar el potencial adaptativo el mantenimiento de sistemas clonales/sexuales mixtos [25]. La ruta morfogénica directa en *V. planifolia* reporta altos niveles de variación somaclonal [26], utilizando estos sistemas se ha desarrollado una planta (Handa) resistente a *Fusarium* [27].

Es importante integrar diferentes perspectivas y desarrollar tecnologías que ayuden al mejoramiento de la vainilla como un producto de gran importancia comercial. Uno de los primeros pasos a seguir es el desarrollo de procesos de micropropagación para abastecer el material vegetal necesario para las diferentes investigaciones. Las investigaciones deben abarcar diferentes enfoques para abordar todos los temas relevantes relacionados con la vainilla.

1.1.5. *Vanilla odorata* C. Presl

La especie *Vanilla odorata* C. Presl. es la segunda especie con frutos más fragantes después de *V. planifolia*, pero tiene diferentes ventajas sobre esta, como mayor tolerancia al cambio de ambiente, resistencia a condiciones adversas de alta insolación, sequía, sombra excesiva y menor ataque de insectos como el gusano peludo (*Plusia aurífera*) y chinche roja (*Tentecoris confusos*) [15], por la textura y química de la corteza, la disponibilidad de sus micorrizas asociadas, tiene tolerancia a la humedad [28].

V. odorata es una especie importante para investigación, considerando que es la especie con propiedades aromáticas y organolépticas prometedoras [20,29]. Además, porque presenta los valores más amplios en altitud de 0 hasta los 2065 m.s.n.m., también los valores más bajos para temperaturas mínimas en el mes más frío (3.3 a 18.1°C) y la temperatura más alta en el mes más caliente (32.5 °C), además las más bajas precipitaciones en el mes más seco lo que le hace una de las más tolerantes a la sequía.

Tiene una amplia presencia a lo largo de la Amazonía y Andes [20], distribuida desde México hacia el sur de América central, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia [7]. Esto la convierte en una de las especies con mayor abundancia, debido a que presenta uno de los pocos casos reportados de melitocoria, que es una relación simbiótica cuando abejas (género *Euglossa*) transportan distancias largas las semillas [30]. Esta abundancia y diversidad, así como su perfil bioclimático [31] le confieren la importancia para conservar esta especie como acervo genético secundario de *V. planifolia* [2].

Esta especie presenta características morfológicas similares a *Vanilla insignis* Ames, pero a diferencia tiene sus tallos sulcados, apéndices más numerosos y grandes, hojas más anchas y su hábito xerófilo. Esta especie también se la confunde visualmente con *Vanilla fimbriata* que difiere por entrenudos más cortos, hojas anchas, flores grandes y superficie apical densamente peluda con un callo semiorbicular limitado al ápice del lóbulo medio.[32]. Además, ha sido descrita por varios autores como especie conoespecífica a *V. odorata* [21].

En la Tabla 1 se muestra la taxonomía de *Vanilla odorata* C. Presl obtenida de la web Tropicos.org del Missouri Botanical Garden.

Tabla 1. Jerarquía taxonómica de *Vanilla odorata* C. Presl

Taxo	Descripción
Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embriofita
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Lilianaes Takht.
Orden	Asparagales Link
Familia	Orchidaceae Juss.
Genero	<i>Vanilla</i> Mill.
Especie	<i>odorata</i> C. Presl

Elaborado por: Bermeo Jorge

Por otra parte, *Vanilla ensifolia* y *Vanilla uncinata* también fueron consideradas sinónimo de *V. odorata*, pero representa una especie distinta y un taxón coespecífico de *V. karenchristianae* respectivamente [19]. La ubicación de Vanilloideae cerca de la base del árbol filogenético de la familia de las orquídeas, y la posición basal de Orchidaceae dentro del orden de las monocotiledóneas Asparagales como Agave, también puede ayudar a establecer la cercanía con otras especies. [13].

1.1.5.1 Descripción morfológica

En 2021, Chiron et al. llevaron a cabo una revisión para establecer las principales diferencias taxonómicas entre varias especies de *Vanilla* que no estaban bien definidas. En esta revisión, se establecieron las características distintivas de la especie *V. odorata*, incluyendo hojas estrechas y ensiformes con una relación largo/ancho de 10 y entrenudos más cortos que las hojas. Además, su callo apical está formado por 3 a 5 quillas y el ángulo del ápice del lóbulo medio presenta un ángulo de agudo a obtuso [32]. La Figura 1 muestra la morfología de las hojas, el tallo, la inflorescencia y las estructuras de la flor, donde se pueden observar las principales características de esta especie, como sus hojas estrechas de alrededor de 12.5 cm, labio trilobado con bordes laterales

fimbriado, callo apical formado por quillas papiladas y cara ventral de la columna glandulosa.

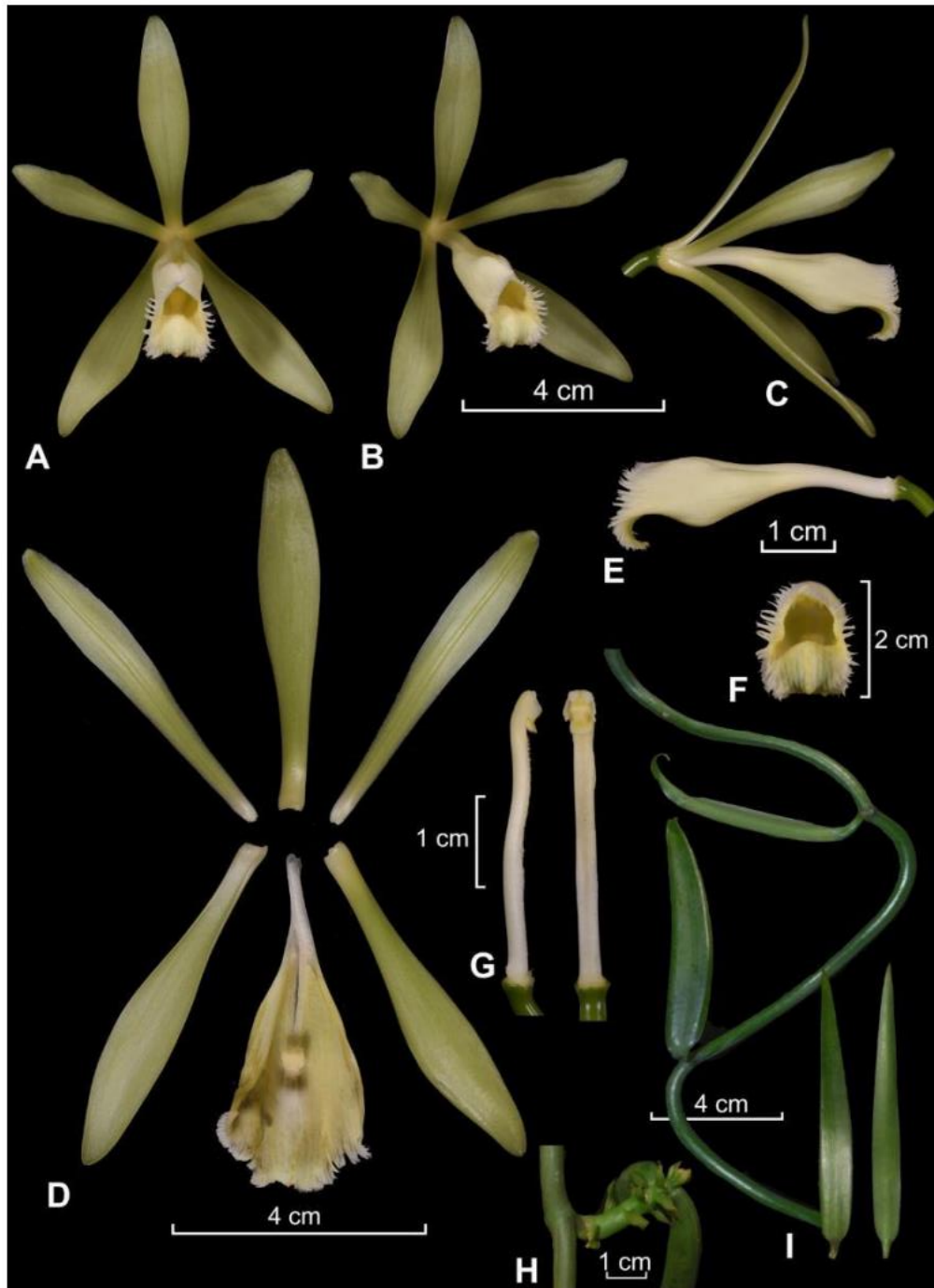


Figura 1. Lámina a color de *Vanilla odorata*.
Fuente: [20]

A-C. flor vista frontal a lateral D. perianto disecado, E. Labelo y columna en vista lateral, F. Labelo vista frontal, G. Columna en vista lateral y frontal, H. Inflorescencia, I. Hojas.

Esta información taxonómica es importante para establecer la cercanía con otras especies de *Vanilla*, ya que la familia Vanilloideae se encuentra cerca de la base del árbol filogenético de las orquídeas, y la familia Orchidaceae es la familia basal dentro del orden de las monocotiledóneas Asparagales, al igual que Agave.

La especie presenta tallos teretes, flexuosos de color verde oscuro de 4 a 7 mm de diámetro con raíces de color blancas internodales de hasta 7 cm de largo y sus entrenudos de 7 a 13 cm; donde crecen hojas con peciolo corto, son lanceoladas, ensiformes, erectas, poco pecioladas, acuminadas y muy agudas abruptamente recurvadas en el ápice, carnosas y ligeramente nerviadas, aproximadamente de 2 mm de grosor, con dimensiones de 14 a 20 cm de largo y de 1.2 a 2cm de ancho.

Sus inflorescencias son de 3 a 4 cm con 13 flores aproximadamente de color pálido amarillo verdoso, labio blanco con papilas amarillas o naranjas, brácteas florales oblongas de hasta 8 mm, mientras que las inferiores son más largas. Ovario pedicelado de 25 a 40 mm, tiene sépalos de 45 a 55 mm lineales lanceolados, los sépalos laterales cóncavos, carnosos de 50 x 13 mm, sépalos dorsales de 52x11 mm y pétalos de 50x10 mm lanceolados.

Columna de 30 mm ventralmente densamente granuloso o peludo. Los frutos son lineales y lanceolados de 12.5 a 16 cm de largo, sincárpicos, sésiles y fuertemente perfumados. Damian (2020) por otro lado en su clave taxonómica establece los rasgos que identifican a la especie; tépalos mayores a 5 cm de largo, amarillentos a crema, los márgenes del labio son lacerados y el ápice con un cojín con protuberancias verrugosas.

1.1.5.2 Importancia económica

La demanda de vainilla en Ecuador ha aumentado en los últimos años, lo que ha llevado a un incremento en los rubros de exportación de la planta [4]. Para mejorar los métodos de reproducción por esquejes, se pueden utilizar diferentes tecnologías como el cultivo en medio semisólido y diferentes sistemas de inmersión temporal, lo que puede aumentar la producción de plántulas clonales con características idénticas y también ayudar a conservar los recursos fitogenéticos a largo plazo [33]. Esta técnica también puede ser utilizada para investigar nuevas especies y mejorar la producción de vainilla [6,15,34].

Es importante diversificar la producción de vainilla en el país para garantizar su acervo genético y mantener la demanda de este producto en el mercado. Hay reportes de hasta 600 dólares el kilogramo de *V. planifolia* [35]. Vainuz, una empresa ecuatoriana, exporta vainas de la especie *V. x tahitensis* al precio de 350 dólares por kilo [4], mientras que la Asociación Kallari vende vainilla de la especie *V. odorata* a 500 dólares el kilogramo debido a su alta calidad [36]. Las exportaciones anuales de vainilla en Ecuador alcanzaron los 350,000 dólares en 2019 [4].

La especie *V. odorata* es importante debido a la composición de sus frutos, que contienen una alta concentración de derivados de alcohol anisílico, los cuales aportan un matiz floral y perfumado que define la calidad de la vainilla. Estos derivados no se encuentran en la *V. planifolia*, otra especie de vainilla [12]. Aunque *V. odorata* puede ser una importante fuente de ingresos para el país, su cultivo puede ser difícil debido a que las vainas tienden a dividirse en la vid, lo que las hace susceptibles a la proliferación de hongos [30].

Además, los altos costos de producción también la hacen más cara que otras especies de vainilla aromática, como la de Madagascar, que se vende a 100 dólares por kilo [4]. El precio de la vainilla ha sido muy fluctuante en los últimos años debido a desastres naturales y conflictos sociales en los lugares de producción [36,37].

1.1.5.3 Métodos de cultivo

La *Vanilla* es una orquídea hemiepífita que se cultiva de tres maneras distintas. Esta planta necesita soporte físico, materia orgánica y sombra para su crecimiento. La forma de cultivo actualmente se la realiza en terrenos tipo forestal, de forma intensiva en terrenos deforestados y en casas de sombra. Las raíces aéreas de esta especie ayudan a trepar a las vides y también absorben agua de la humedad del aire. El suelo ideal para su cultivo está compuesto por humus, es ligero y poroso, para evitar el desarrollo de moho [38].

La nutrición de la *Vanilla* proviene de las raíces subterráneas que se alimentan de la descomposición de materia orgánica. En los sistemas de cultivo intensivo se utiliza abono orgánico, mantillo de caña de azúcar y fibra de coco para mejorar la calidad del sustrato y la nutrición de la planta [38].

1.1.5.4 Propagación

La propagación de la *Vanilla* comercial se ha realizado tradicionalmente mediante la propagación asexual por medio de esquejes de vides vigorosas obtenidos de plantas madres. Los esquejes deben tener al menos 3 nodos con brotes axilares y normalmente tienen de 6 a 8 nodos, con una longitud de 20 a 80 cm y un diámetro de 1 cm [12].

Sin embargo, la propagación sexual de la *Vanilla* es limitada debido a la baja tasa de germinación de sus semillas [39]. Por otro lado, el uso de técnicas tradicionales ha contribuido a la propagación de enfermedades y plagas que representan problemas fitosanitarios en las plantas.

Entre los principales problemas se encuentran la pudrición de tallos y raíces causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vanillae*, necrosis y antracnosis causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc., marchitamientos a causa de *Phytophthora* sp. y la roya por *Calospora vanillae* Masee [40].

1.1.5.5 Técnicas de cultivo *in vitro*

La técnica *in vitro*, que se refiere al cultivo de plantas en ambientes artificiales en condiciones de asepsia y bajo el control de factores que influyen en el crecimiento [41], han sido efectivas para la micropropagación por organogénesis directa de múltiples brotes, aprovechando la totipotencia y plasticidad celular utilizando explantes nodales con meristemas axilares [42], y/o apicales, tanto en medios semisólidos como medios líquidos [43,44].

El medio de cultivo es una solución de nutrientes específicos para cada necesidad de cultivo. Está compuesto por macro y micronutrientes, fuentes de carbono y agua, entre las formas de medio están medio líquido y el semisólido con la adición de un gelificante. [45] El medio Murashige & Skoog (MS, 1962) es ampliamente utilizado en el cultivo *in vitro* de *Vanilla* [26,46], al que se le puede agregar diferentes reguladores de crecimiento, como la Bencilaminopurina (BAP) y agua de coco para mayor producción de brotes [40,47].

Además, se han probado extractos de otros frutos, como la piña, como suplementos

para sustituir el uso de reguladores de crecimiento debido a su alto costo en el mercado. La eficiencia de estos procesos de micropropagación se ha mejorado utilizando medios líquidos en Sistemas de Inmersión Temporal (SITs), lo que ha logrado el mayor índice de multiplicación en *V. planifolia* [38,45, 24, 33].

Si bien la mayoría de la información se ha reportado en base a la especie *V. planifolia*, con éxito se ha demostrado que es viable el desarrollo de estas herramientas para *V. odorata*. En 2022, Romero-Zambrano G., informó la primera contribución sobre micropropagación para la especie *Vanilla odorata* C. Presl, proporcionando protocolos para desinfección de explantes y multiplicación sin agua de coco y con concentraciones específicas de 2.15 y 3 ppm de BAP en los que se favorece la brotación. En esta tesis, se busca optimizar los sistemas de micropropagación para mejorar la producción masiva utilizando Sistemas de Inmersión Temporal (SITs).

1.1.5.6 Medio de cultivo

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica utilizada para la propagación masiva de plantas, investigación en biotecnología y mejoramiento genético de cultivos [31]. Para su correcto desarrollo, es necesario contar con un medio de cultivo adecuado que proporcione los nutrientes necesarios y que esté ajustado a las condiciones óptimas para el crecimiento de las células vegetales [48].

El medio de cultivo está compuesto por sales y vitaminas, medio Murashige & Skoog (MS, 1962) y sucrosa, que proporcionan energía a las células vegetales. Además, en algunos casos se añade caseína para aportar nutrientes adicionales. Es importante ajustar el pH del medio entre 5.7-5.8 para garantizar un ambiente propicio para el crecimiento celular [48].

El agua de coco (AC) es un suplemento que ha sido ampliamente utilizado en los medios de cultivo de otras especies [48], incluyendo la familia Orchidaceae [49], para la germinación y desarrollo de plántulas de orquídeas debido a su amplia variedad de componentes orgánicos e inorgánicos. Estos incluyen aminoácidos esenciales, vitaminas, reguladores de crecimiento, compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos, enzimas, hormonas, purinas y sales minerales, iones orgánicos y altos contenidos en magnesio y fósforo [50,51].

La composición y las propiedades fisicoquímicas del agua de coco varían según la madurez del fruto. Se ha reportado una disminución en la acidez titulable en base a la presencia del ácido málico, que es el ácido orgánico dominante en el AC, en la madurez del fruto [52]. Por otra parte, los contenidos de fructosa, glucosa y sacarosa aumentan con la madurez del fruto, así como la presencia de potasio y sodio.

Los minerales como el calcio, hierro y magnesio también tienen una mayor presencia en frutos maduros, aunque la concentración de compuestos fenólicos totales (TCP) es menor [52]. Sin embargo, se ha reportado una mayor concentración de TCP [53] y la capacidad de captación de radicales a mayor tiempo de maduración, y se ha demostrado que el calentamiento microonda a 90°C mejora estos índices [54].

El medio de cultivo también puede contener diferentes reguladores de crecimiento según el objetivo del estudio. Por ejemplo, el BAP (Bencilaminopurina) pertenece al grupo de las citocininas y se atribuye una disminución en la altura de las plantas debido al acortamiento del entrenudo. Cuando hay más citocininas presentes, se produce una disminución del número de entrenudos [50,51]. Se ha reportado que para la especie *V. x tahitensis*, un medio MS con BAP y ácido giberélico G3 produce una mayor generación de nodos y hojas [41]

1.1.6 Sistemas de Inmersión Temporal (SITs)

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SITs) son una herramienta semiautomática de micropropagación que permite la producción intensiva de plántulas clonales mediante la programación de factores como el tiempo y la frecuencia de inmersión [47]. Esta técnica tiene la ventaja de facilitar el cambio de medio, mejorar la aireación y nutrición de los explantes. Los SITs están compuestos por diferentes tipos de recipientes, que han sido desarrollados desde la primera técnica de inmersión periódica en medios de cultivo líquido en 1952.

En 1993, Alvard y Teisson crearon el recipiente de Inmersión Temporal RITA® (Figura 2), que estableció el concepto de inmersión temporal en el cultivo *in vitro* utilizando medios líquidos [55]. Este recipiente presenta ventajas como la facilidad de renovación del medio, la reducción de la hiperhidricidad y el aumento de la supervivencia de las *in vitro* plantas durante la etapa de aclimatación [47]. Además, se ha demostrado que los

SITs permiten una mayor absorción de nutrientes al entrar en contacto directo el medio de cultivo con las hojas, debido a la mayor superficie de absorción que se genera [43].

El recipiente de Inmersión Temporal (RITA®) es una patente del CIRAD (1995) y consiste en un recipiente autoclavable de polipropileno con dos secciones, una de almacenamiento en la parte inferior y una sección superior con una bandeja con agujeros y una malla que sostiene los explantes además un tubo central del mismo material que permite la entrada del aire que antes pasa por un filtro, además en la tapa rosca con empaque, también un orificio lateral que permite la salida del aire al que se le conecta una manguera y otro filtro [56].

Por inyección y presión de aire lleva el medio líquido del fondo hacia una bandeja superior donde se encuentran explantes durante un tiempo y frecuencia determinada, después de la inmersión el líquido por gravedad deciente al fondo hasta el nuevo ciclo como se muestra en el esquema de la Figura 2.

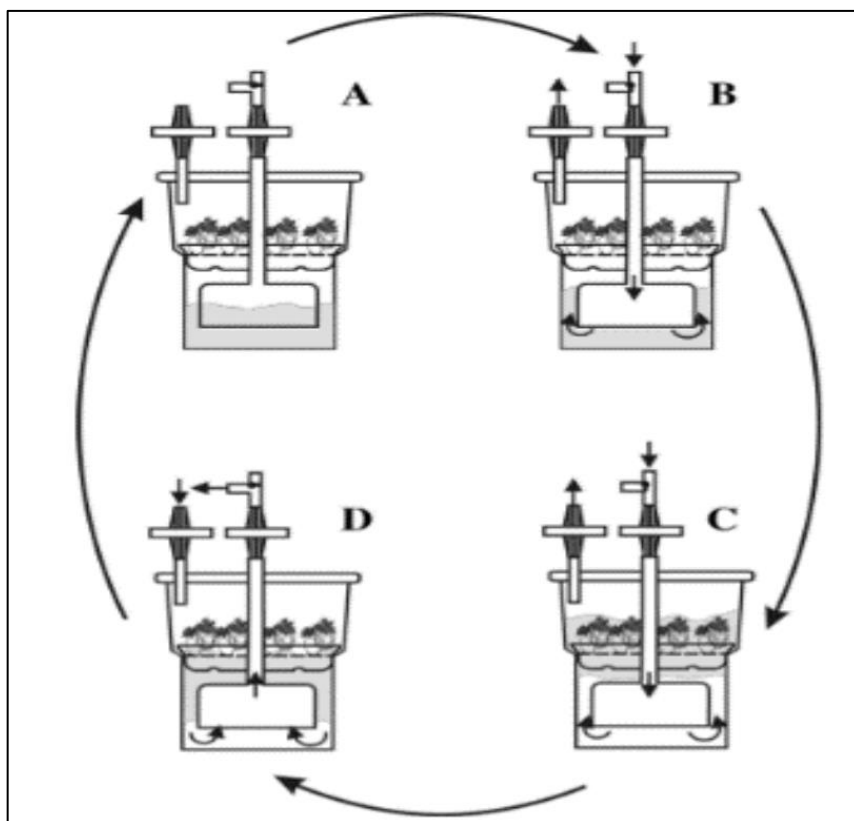


Figura 2. Esquema de funcionamiento del recipiente RITA®.
Fuente: [56]

Cabe destacar que este proyecto se lleva a cabo en el Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de la Estación Santa Catalina, como parte del proyecto de investigación de "Vainilla". Con este estudio se busca contribuir al desarrollo de una tecnología más eficiente y rentable para la producción de plántulas clonales de *Vanilla odorata*.

1.2 Planteamiento del problema

La propagación de *Vanilla* presenta limitaciones debido a que se realiza principalmente por esquejes del tallo, lo que conlleva problemas fitosanitarios y baja tasa de germinación y viabilidad de semillas [39]. Ante esto, se busca optimizar la micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl utilizando Sistemas de Inmersión Temporal (SITs) en recipientes RITA®, ya que no existen reportes para esta especie en este sistema.

Entre las problemáticas más importantes que se presentan en el cultivo de *Vanilla* se encuentra la vitrificación o hiperhidricidad por exposición prolongada al medio de cultivo, lo que afecta la eficiencia de producción [57]. Los SITs se plantean como una alternativa viable para mejorar la eficiencia de producción, ya que se han reportado mejores resultados [46] y requieren una menor mano de obra para su producción [4,41,57]. Además, la especie *V. odorata* puede ser establecida como un sistema de producción agroforestal en comunidades amazónicas, lo que representa una oportunidad para su desarrollo dentro de la sociedad ecuatoriana.

Es importante tener en cuenta que, aunque se toman como referencia los estudios previos realizados con *V. planifolia*, se evaluarán los efectos de la especie *V. odorata*, la cual es una especie distinta y puede presentar resultados diferentes. El proyecto de investigación de "Vainilla" que se lleva a cabo en el Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de la Estación Santa Catalina incluye la optimización de la micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl utilizando SITs en recipientes RITA®.

1.3 Justificación de la investigación

La importancia agrocomercial de la “vainilla” y la sobreexplotación de especies comerciales como *V. odorata* han generado la necesidad de métodos de propagación más eficientes, como la micropropagación y el cultivo *in vitro*, para la prevención fitosanitaria y la producción a gran escala[26,28,35]. En este contexto, la optimización de la micropropagación con medios líquidos se vuelve fundamental para el desarrollo de tecnologías más eficientes en beneficio de empresas y gremios pequeños, contribuyendo así al desarrollo local y nacional.

Para la realización de esta investigación se utilizará los frascos tipo RITA®, que ofrecen ventajas como la facilidad de manipulación de explantes y cambio de medio, una mejor nutrición mineral, disminución de problemas de asfixia o vitrificación, y renovación de aire [58], además por la cantidad de reportes con estos recipientes en SITs [46,47,59]. Este proyecto es parte del proyecto más amplio: “Evaluación de un sistema eficiente de propagación de Vainilla odorata utilizando Sistemas de Inmersión Temporal (SITs)” creado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas dentro del Departamento Nacional de Biotecnología. En beneficio de gremios pequeños y asociaciones campesinas como la Asociación Amazónica Kallari, la cual es participe de este proyecto, junto con el INIAP, GIZ y URAI.

La factibilidad económica del cultivo de *V. odorata* por sus características organolépticas ha abierto la oportunidad para la diversificación de un producto altamente rentable como es la “vainilla” en el mercado mundial. Considerando los casos comerciales en el Ecuador [4], se plantea la importancia de investigar esta especie de *Vanilla* [58].

Además, la investigación contribuirá a la promoción de sistemas alternativos de cultivo y comercialización de la “vainilla”, fomentando la generación de cultivos agroecológicos en sistemas agroforestales diversificados y utilizando como guías a parientes silvestres de la vainilla y sus polinizadores naturales como las abejas del género *Euglossa* [60]. Es importantes mencionar que las especies comerciales se encuentra amenazadas debido a la sobreexplotación [61], *V. odorata* se encuentra en la Lista Roja de especies Amenazadas de la IUCN [62].

La generación de tecnología para la propagación masiva en SITs para *V. odorata* es la base para el desarrollo de sistemas a gran escala y agroforestales con plantas de buena calidad sanitaria uniforme que beneficien a la población en general. En este sentido, la investigación en micropropagación de *V. odorata* utilizando Sistemas de Inmersión Temporal SITs (RITA) es fundamental para la evaluación de la eficiencia de este método de propagación y su potencial aplicación en la producción a gran escala de vainilla.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 General

Optimizar el proceso de micropropagación con un protocolo de cultivo *in vitro* de *V. odorata* C. Presl en medios líquidos con el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SITs) tipo RITA®.

1.4.2 Específicos

- Determinar la frecuencia de inmersión más eficiente para la micropropagación de *V. odorata* C. Presl en medio líquido usando SITs tipo RITA®.
- Establecer la cantidad de medio líquido más eficiente para la micropropagación de *V. odorata* C. Presl usando SITs tipo RITA®.

2. CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Localización del estudio

El desarrollo experimental de este estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, ubicada en la localización descrita en la Tabla 3.

Tabla 3. Ubicación del sitio experimental

	Descripción
Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Lugar	Estación Experimental Santa Catalina (EESC)
Altitud	3100 m.s.n.m.
Latitud UTM	0° 22' 8" S
Longitud UTM	78° 33' 24" O

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

2.2 Condiciones de cultivo

Las condiciones del cuarto de cultivo donde se llevó a cabo el montaje de los Sistemas de Inmersión Temporal se especifican en la Tabla 4.

Tabla 4. Ubicación del sitio experimental

	Descripción
Temperatura promedio	21±3°C
Fotoperiodo	16/8 horas luz
Intensidad de luz	3000 lm
Humedad relativa	20%

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

2.3 Metodología

2.3.1 Material Vegetal

Se utilizó *vitro* plantas de *Vainilla odorata* y *V. planifolia*. Las *vitro* plantas cultivadas en medio semisólido fueron establecidas en el Laboratorio de cultivo vegetal del Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP – Estación Santa Catalina). Se contó con material vegetal, *vitro* plantas en medio semisólido obtenido por multiplicación, aplicando el protocolo de desarrollo reportado en la tesis de Romero G. (2022), y que forma parte de la primera fase del proyecto “Vainilla” creado por el INIAP. Se utilizaron aproximadamente 458 *vitro plantas* de la especie *V. odorata*. Y además aproximado de 80 *vitro plantas* de la especie *V. planifolia* que se utilizó como referencia o para los ensayos en SITs tipo RITA.

Los explantes sembrados en los SITs fueron los extremos apicales de 2 cm de longitud de *vitro* plantas con 1 meristemo apical, y de 2 a 3 meristemos laterales. Se cultivaron en recipientes tipo RITA® de 1L (150 × 130 mm), en medio de cultivo sin Gelrite™ reportado por Romero G (2022), compuesto por 4.3 g.L⁻¹ de medio Murashig y Skoog (MS) con 2.15 mg.L⁻¹ de BAP, 150 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 35 mg.L⁻¹ de clorhidrato de L-cisteína, 30 g.L⁻¹ de sucrosa con pH ajustado a 5.8; este protocolo fue modificado de (Ramos-Castellá, Iglesias-Andreu, Bello-Bello & Lee-Espinosa, 2014).

Los explantes se sembraron en recipientes tipo RITA® de 1L previamente autoclavados con el medio líquido según el volumen de cada uno de los tratamientos y dentro de fundas con los orificios de salida cubiertos con papel aluminio. Después de la siembra se colocan mangueras y filtros hidrófobos de 0.2 µm estériles en cada una de los orificios, uno de entrada de aire con manguera pequeña y uno de salida con manguera más larga. Se vuelve a cerrar la funda con el recipiente dentro, para después transportar todos los recipientes al cuarto de cultivo donde se instalaron tres ensayos con sus cuatro repeticiones por cada frecuencia. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 21 ±3°C, con un fotoperiodo de 16/8 - h de luz/oscuridad, luz led blanca (65-70 µmol.m⁻².s⁻¹) y una humedad relativa de 20%.

Se evaluaron los efectos en 9 tratamientos siendo estos 7 las variables evaluadas; índice de multiplicación, longitud de brote, ancho de brote, hojas por brote, raíces por *vitroplanta*, porcentaje de oxidación e hiperhidratación, con dos factores frecuencia de inmersión y volumen de medio de cultivo líquido, y la interacción de ambos en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA a los 45 días desde la siembra.

2.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de 3^2 (3 niveles para cada uno de los 2 factores). La unidad experimental fue un contenedor RITA® de 1000 mL, 150mm de altura y 130 mm de diámetro de polisulfona, y los explantes fueron extremos apicales de 2 cm de longitud de las *vitroplantas* cultivadas en medio semisólido. Se usaron 10 explantes por recipiente con 4 repeticiones por cada tratamiento montado. Cada frecuencia montada tuvo 12 ensayos (frascos) con los 3 distintos volúmenes, para lo que se usó 360 explantes de *Vanilla odorata* para los tratamientos, y 36 explantes de *V. planifolia* para el control Cp.

Los datos se procesaron estadísticamente con el software RStudio 2022.12.0+353. Se realizó un análisis de varianza de dos factores (TWO WAY ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, seguido de la prueba de Tukey al 95% de significancia ($p \leq 0.05$). Se comprobó la normalidad y la homogeneidad de la varianza mediante las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente.

En las variables que no cumplieron con estos supuestos, se realizó una prueba de Kruskal Wallis con una corrección estadística con el método Bonferroni. Es importante considerar que este método de ajuste tiene limitaciones en la flexibilidad para ajustar los niveles de significancia para diferentes conjuntos de comparaciones. Por lo tanto, se aplicó la prueba de Willcoxon con el tratamiento con mayor oxidación como referencia. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 5. Esquema del análisis de varianza (ANOVA) en la micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl utilizando Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	35
Tratamientos	8
Frecuencias de inmersión (F)	2
Volúmenes de inmersión (V)	2
F x V	4
Error experimental	27

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

2.3.4 Factores de estudio

Se tuvieron dos factores de estudio: frecuencia y volumen de medio líquido. Se precisaron 3 volúmenes ($v_1=150$ mL, $v_2=200$ mL y $v_3=250$ mL), con un tiempo de 2 minutos de inmersión, en cada una de las 3 diferentes frecuencias de inmersión ($f_1=2$ min cada 4 horas, $f_2 = 2$ min cada 6 horas y $f_3 = 2$ min cada 8 horas). Resultando en 9 tratamientos montados en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

Para el control se utilizó el protocolo reportado por Ramos-Castellá et al., (2014), utilizando como regulador de crecimiento 2.15 mg.L⁻¹ de BAP; Romero G., (2022) plantea que el medio de cultivo en medio semisólido con agua de coco tuvo una influencia negativa en la producción de brotes. Por esta razón se consideró también importante realizar un control con el protocolo con agua de coco, pero con la especie *V. odorata*.

El protocolo creado por Ramos-Castellá et al. [47], (2014) reporta un índice de multiplicación de 17.54 ± 1.14 en *V. planifolia* que consta de 6 explantes por recipiente como densidad de siembra; para este estudio se evaluó 5 repeticiones. Además, Ramirez-Mosqueda & Iglesias-Andreu [46] (2016) resultados para el índice de multiplicación a los 42 días de 12.77 ± 0.27 con una densidad de siembra de 10 explantes. Considerando que el volumen era el mismo, es decir 25 mL por explante, se estableció la evaluación para este estudio a los 45 días.

2.3.5 Tratamientos

La interacción entre los dos factores de estudio da como resultado 9 tratamientos como se muestra en la Tabla 6, para la micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl utilizando SITs tipo RITA®.

Tabla 6. Tratamientos de multiplicación *V. odorata*

Tratamiento	Codificación	Descripción
t ₁	f _{1V1}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 4 horas en 150 MI de medio.
T ₂	f _{1V2}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 4 horas en 200 MI de medio.
T ₃	f _{1V3}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 4 horas en 250 MI de medio.
T ₄	f _{2V1}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 6 horas en 150 MI de medio.
T ₅	f _{2V2}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 6 horas en 200 MI de medio.
T ₆	f _{2V3}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 6 horas en 250 MI de medio.
T ₇	f _{3V1}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 8 horas en 150 MI de medio.
T ₈	f _{3V2}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 8 horas en 200 MI de medio.
T ₉	f _{3V3}	Frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 8 horas en 250 MI de medio.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

A manera de control y basado en la investigación bibliográfica se utilizará un tratamiento único con el cual se ha reportado los mejores resultados por Ramos-Casttella (2014) [47] con *V. planifolia*.

2.3.5 Variables evaluadas

Los efectos se evaluaron a los 45 días después de la siembra y entre las variables respuesta se estableció las siguientes para cada tratamiento:

Índice de multiplicación: Se estableció la relación entre el número de brotes viables y la cantidad de explantes iniciales, obteniendo así el número de brotes por explante que produce cada planta.

Longitud de brotes (cm): Utilizando papel milimétrico se midió los brotes generados, desde la base hasta el meristemo apical.

Diámetro de brote (cm): Con papel milimétrico se midió el diámetro de los brotes, desde una perspectiva cenital.

Número de hojas por brote: Por registro visual se realizó un conteo del número de hojas por brote cultivado en cada unidad experimental.

Número de raíces por *vitroplanta*: Por registro visual, se realizó un conteo general del número de raíces en cada una de las 10 *vitroplantas* sembradas.

Porcentaje de brotes oxidados e hiperhidratados (%): Se establecerá la relación porcentual entre el número de brotes oxidados e hiperhidratados y la cantidad total de brotes. La hiperhidratación se detectará de forma visual por sensibilidad al quiebre.

3. CAPÍTULO III: PRESENTACION DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Multiplicación en Sistemas de Inmersión Temporal

Se comprobó que las variables evaluadas cumplieran los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro – wilk, Kolmogorov – Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianza de Levenne (Tabla 7).

Tabla 7. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para tratamientos de multiplicación *in vitro* de *Vanilla odorata* en medio de cultivo líquido con SITs RITA®

Prueba	Índice de multiplicación	Longitud de brote	Diámetro de Brote	Número de hojas por brote	Número de raíces por vitroplanta	Oxidación	Hiperhidratación
Shapiro-Wilk	0.64	0.61	0.08	0.14 ⁽¹⁾	0.63	3.96E-09	2.31E-12
	p-value						
Levenne	0.25	0.69	0.32	0.56	0.82	0.006	7.40E-17

Nota: (1) Se uso la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

3.2 Índice de multiplicación

Los datos siguen una distribución normal y homogeneidad de varianza como se muestra en la Tabla 7, se realizó un análisis con ANOVA de dos factores para conocer los efectos principales de las variables independientes como se muestra en la Tabla 8; pudiendo establecer que hay diferencias significativas entre las frecuencias.

Tabla 8. ANOVA del índice de multiplicación de la micropropagación de *V. odorata* con SITs-RITA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error		
		cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	35			
Tratamientos	8			
Frecuencias de inmersión (f)	2	11.96	3.85	0.03 *
Volúmenes de medio (v)	2	2.98	0.96	0.39 ^{ns}
f x v	4	5.56	1.79	0.16 ^{ns}
Error experimental	27			
Coeficiente de Variación			25.48	

Nota: (ns): No significativo, (*) Significativo

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Para el índice de multiplicación en la micropropagación de *V. odorata* la prueba de significancia y comparación de las medias (Tabla 9), mostró que para el factor frecuencia existen diferencias con 3 rangos de significancia (a, ab y b), siendo la frecuencia f3 la que presentó mayor índice de multiplicación con 7.72 brotes por explante, mientras que f2 presentó el menor índice de multiplicación con 5.8 brotes por explante. Además, es importante mencionar que los resultados de f1 fueron cercanos a f3 por lo que su grado de significancia fue (ab). Para el factor volumen no hubo diferencias significativas.

Tabla 9. Prueba de significancia y comparación de medias del índice de multiplicación de la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Factores	Descripción	Índice de Multiplicación (brote/explante)	
Frecuencia (f)	f1= cada 4 horas	7.24	ab
	f2= cada 6 horas	5.80	b
	f3= cada 8 horas	7.72	a
Volumen (v)	v1= 150 mL	7.13	a
	v2= 200 mL	6.35	a
	v3= 250 mL	7.28	a
f x v	t1= cada 4 horas + 150mL	6.58	a
	t2= cada 4 horas + 200mL	7.38	a
	t3= cada 4 horas + 250mL	7.78	a
	t4= cada 6 horas + 150mL	5.50	a
	t5= cada 6 horas + 200mL	5.83	a
	t6= cada 6 horas + 250mL	6.08	a
	t7= cada 8 horas + 150mL	9.33	a
	t8= cada 8 horas + 200mL	5.85	a
	t9= cada 8 horas + 250mL	7.98	a
Cp		7.87	
Co		5.72	

Nota: Los datos con letras diferentes expresan estadísticas diferencias significativas.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

En las interacciones de los factores no se observó diferencia significativa, pero en la Figura 3 se presenta una gráfica de cajas y bigotes que muestra los resultados de todos los tratamientos en función de su índice de multiplicación. La leyenda muestra que el contorno de las cajas separa en grupos según la frecuencia, siendo los 3 tratamientos primeros f1, los 3 siguientes f2 y los 3 últimos f3, donde se puede observar que los dos mejores resultados corresponden al tratamiento f3, donde el tratamiento t7 fue con el cual se obtuvo mejor promedio con 9.3 brotes por explante, con volumen v1 de 15 mL por explante y frecuencia f3 de 8 horas durante 2 minutos de inmersión, la frecuencia más prolongada de este estudio. A este resultado le sigue t9 y t3, ambos con volumen de 25 mL por explante.

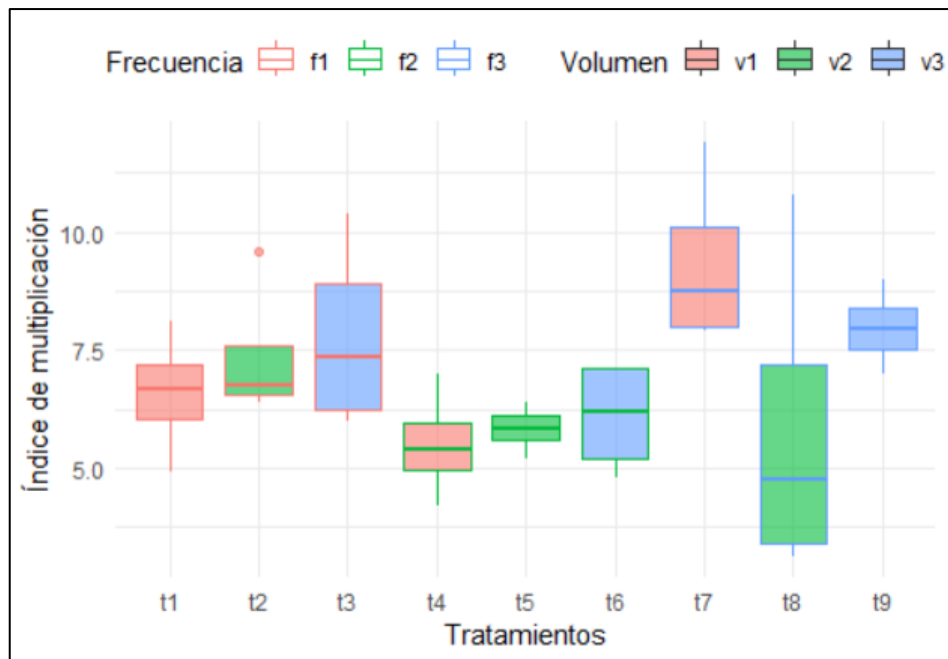


Figura 3. Índice de multiplicación de los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

El tratamiento t8 con un volumen v2 y muestra una diferencia marcada con los otros tratamientos con frecuencia f3. El tratamiento t8 muestra la mediana más baja de todo el estudio, y además una variabilidad de datos alta. Otro aspecto a notar en la Figura 3 es que las medianas de cada tratamiento son próximas entre cada frecuencia con excepción de f3, considerando que el tratamiento t8 presento el menor resultado de la mediana del índice de multiplicación.

Por otra parte, la gráfica también nos muestra la alta variabilidad de los datos, expresada en la longitud de la caja de cada tratamiento de la frecuencia f3 y además de los volúmenes v3 con excepción del tratamiento t9 que presenta una baja variabilidad. El tratamiento con el menor número de brotes es el tratamiento 4, en la Figura 4 se puede observar las 4 repeticiones del tratamiento.



Figura 4. El tratamiento con mayor número de brotes (Tratamiento t7) y el tratamiento con menor número de brotes (Tratamiento t4).

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

En la Figura 3 se puede observar que el segundo mejor promedio fue del tratamiento 9 con la frecuencia 3 (f3), estos resultados son diferentes a las mejores frecuencias reportadas por Ramos-Castellá et al.,[47] (2014) para *V. planifolia* en los cuales se obtiene los peores resultados en la frecuencia cada 8 horas, y en la mayor frecuencia de inmersión evaluada de 2 min cada 12h se tienen los mejores resultados.

La frecuencia f1 tiene las inmersiones en periodos de tiempo más cortos, por lo tanto, más inmersiones por día, esto puede haber estimulado a una mejor respuesta adaptativa por parte de las *vitroplantas* teniendo resultados consecutivos según su volumen para los tratamientos con esta frecuencia (t3, t2, y t1). Y siendo t3 el tratamiento con mejores resultados para esta frecuencia (7.78 brotes/explante) por tener más disponibilidad de nutrientes.



Figura 5. Las cuatro repeticiones del tratamiento t2, con bajo consumo de medio de cultivo

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Relacionando este resultado con el consumo de medio, t1 y t3 presentan similar consumo de medio, pero el tratamiento t2 presenta el mayor consumo de medio de cultivo, pero no presenta un gran desarrollo en su tejido vegetal (por su número de hojas) como se muestra en la Figura 5 con los brotes evaluados del tratamiento y se puede ver un tamaño menor de las *vitroplantas* en comparación de los tratamientos mostrados en la Figura 4. Los resultados del control con *V. planifolia* son menores a los resultados reportados utilizando frascos tipo RITA®, pero en esta investigación fueron los segundos con mejor promedio para índice de multiplicación. Los controles muestran una clara diferencia entre sí.

3.3 Longitud de brotes

Se determinó que hay normalidad y homogeneidad de varianza entre los datos de longitud de brote (Tabla 7). En el ANOVA se observa diferencia significativa entre las frecuencias, pero no hay diferencias significativas entre los volúmenes evaluados, ni entre la interacción de los dos factores, como se muestra en la Tabla 10. Además, el coeficiente de variación es de 8.62% lo que indica unos datos homogéneos con baja variabilidad.

La frecuencia más larga (f3: 8 horas) tiene los tratamientos con mejores resultados, tanto para largo como diámetro de brote. Los efectos en la longitud y diámetro presentaron diferencias altamente significativas entre las frecuencias, pero no hay diferencias entre

los diferentes volúmenes para la longitud de brote, agrupando los tres volúmenes en un solo grupo de significancia como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. ANOVA de longitud de brote en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	35			
Tratamientos	8			
Frecuencias de inmersión (f)	2	0.04	6.97	0.004 **
Volúmenes de medio (v)	2	0.002	0.33	0.72 ^{ns}
f x v	4	0.01	1.50	0.23 ^{ns}
Error experimental	27			
Coeficiente de Variación		8.62		

Nota. (ns): No significativo, (*) Significativo

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Hay diferencias entre las frecuencias con 3 grupos significativos distintos, siendo la frecuencia f3 (8 horas) la que presenta el mejor resultado de 0.94 cm, seguida de 0.87 para la frecuencia f1 y finalmente f2 con un promedio de 0.83 resultado cercano al anterior.

Tabla 11. Prueba de significancia y comparación de medias de longitud de brote en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Factores	Descripción	Longitud de brote (cm)	
Frecuencia (f)	f1= cada 4 horas	0.87	ab
	f2= cada 6 horas	0.83	b
	f3= cada 8 horas	0.94	a
Volumen (v)	v1= 150 mL	0.89	a
	v2= 200 mL	0.88	a
	v3= 250 mL	0.87	a
f x v	t1= cada 4 horas + 150mL	0.89	a
	t2= cada 4 horas + 200mL	0.82	a
	t3= cada 4 horas + 250mL	0.90	a
	t4= cada 6 horas + 150mL	0.82	a
	t5= cada 6 horas + 200mL	0.87	a
	t6= cada 6 horas + 250mL	0.79	a
	t7= cada 8 horas + 150mL	0.97	a
	t8= cada 8 horas + 200mL	0.94	a
	t9= cada 8 horas + 250mL	0.91	a
Cp		1.03	
Co		0.92	

Nota: Los datos con letras diferentes expresan estadísticas diferencias significativas.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

El efecto de la interacción de los 2 factores se observa en la Tabla 9, no se evidencia diferencias entre los resultados de los tratamientos, sin embargo, el mayor promedio fue del tratamiento t7 (8 horas + 150mL) con 0.97 cm longitud de brote. El tratamiento t8 obtuvo el segundo mejor resultado en cuanto al promedio de largo de brote, registrando una medida de 0.94cm. A pesar de ello, se observó un bajo índice de multiplicación en este tratamiento. En tercer lugar, se encuentra el tratamiento t9 con un promedio de 0.91cm, muy cercano al promedio obtenido por el tratamiento t3 de 0.90cm.

En la Figura 4 se puede ver los tratamientos, y sus resultados de longitud de brotes, destacando los tres tratamientos de la frecuencia f3 con mejores resultados y las medianas superiores a todos los otros tratamientos del estudio.

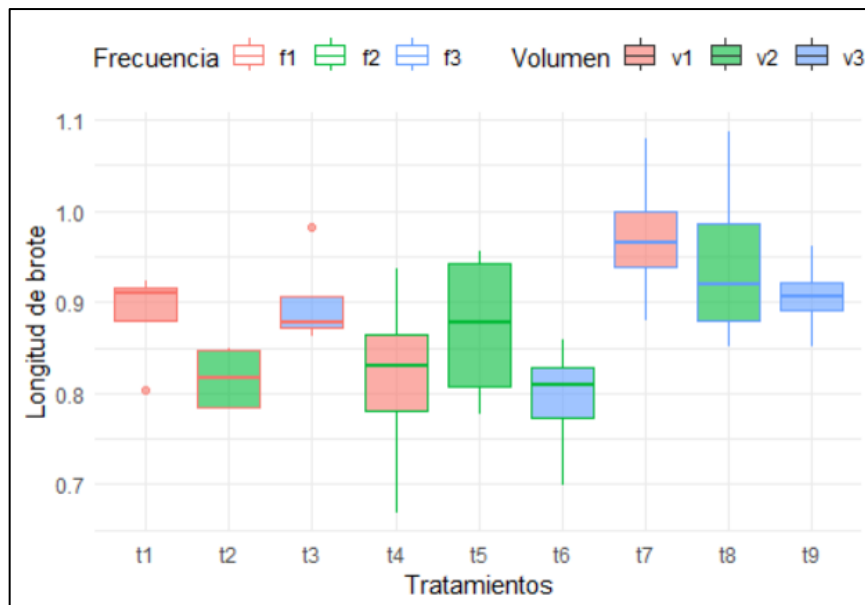


Figura 6. Longitud de brotes los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Existe más variabilidad de los datos en los tratamientos con la frecuencia 2 y el volumen v2. El control Cp con *V. planifolia* tubo los mejores resultados para longitudes de brote con 1.03 cm por brote.

3.4 Diámetro de brotes

Se constató que hay una normalidad y homocedasticidad en los datos (Tabla 7); y se realizó un análisis de varianza evidenciando una diferencia altamente significativa entre las frecuencias, y diferencia significativa para el volumen.

Tabla 12. ANOVA del diámetro de brote en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	35			
Tratamientos	8			
Frecuencias de inmersión (f)	2	0.02	45.36	2.33e-09 ***
Volúmenes de medio (v)	2	0.002	3.51	0.04 *
f x v	4	0.0003	0.67	0.62 ^{ns}
Error experimental	27			
Coefficiente de Variación		9.35		

Nota. ns: no significativo, *: significativo, ** y ***: altamente significativo.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

En la comparación de las medias para el diámetro de brote se puede ver una diferencia con tres grupos de significancia bien definidos, siendo el mejor el diámetro de los explantes del tratamiento f3, con 0.28 cm, seguido de la frecuencia f1 (0.24 cm), y con una mayor diferencia la frecuencia f2 (0.19cm).

Tabla 13. Prueba de significancia y comparación de medias del diámetro de brote en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Factores	Descripción	Diámetro de brote (cm)	
Frecuencia (f)	f1= cada 4 horas	0.24	b
	f2= cada 6 horas	0.19	c
	f3= cada 8 horas	0.28	a
Volumen (v)	v1= 150 mL	0.22	b
	v2= 200 mL	0.24	ab
	v3= 250 mL	0.25	a
f x v	t1= cada 4 horas + 150mL	0.22	bc
	t2= cada 4 horas + 200mL	0.23	bc
	t3= cada 4 horas + 250mL	0.26	ab
	t4= cada 6 horas + 150mL	0.18	c
	t5= cada 6 horas + 200mL	0.20	c
	t6= cada 6 horas + 250mL	0.19	c
	t7= cada 8 horas + 150mL	0.27	ab
	t8= cada 8 horas + 200mL	0.28	ab
	t9= cada 8 horas + 250mL	0.29	a
Cp		0.27	
Co		0.28	

Nota: Los datos con letras diferentes expresan estadísticas diferencias significativas.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Según el volumen se dividen en 3 grupos significativos, pero con un rango de proximidad más reducido. El volumen v3 presentó el mejor resultado (0.251 cm), seguido del volumen v2 y v1 con una mayor diferencia. En el ANOVA no se evidencia una diferencia significativa entre los tratamientos lo que puede deberse a que el rango es muy reducido. Pero al aplicar Tukey se evidencia una diferencia entre las medias ya que esta prueba es más sensible, al comparar pares de tratamientos entre sí lo que puede resultar en una tendencia a diferenciarse entre los promedios de cada tratamiento.

El mayor promedio de diámetro de brote es el del tratamiento t9 (0.29 cm) con volumen v3 (25mL por explante, considerando que el promedio del diámetro de los tratamientos de la frecuencia f3 (t9, t8 y t7) fueron cercanos con diferencias de 0.01 a 0.02 cm como se observa en la Tabla 13, agrupándolos en los 2 primeros grupos de significancia (a y ab; Tabla 13).

Los tratamientos se dividieron en cuatro grupos de acuerdo a su significancia en términos del promedio de diámetro. El tratamiento t9 (8 horas con 25mL por explante) tuvo el mejor promedio de diámetro con 0.29cm. Los tratamientos t8, t7 y t3 se agruparon en otro grupo de significancia (ab).

En la Figura 5 se pueden apreciar los mejores resultados en términos de diámetro de brote, en los cuales predominan los tratamientos de la frecuencia f3. Sin embargo, es importante destacar que, dentro del rango de las medianas correspondientes a esta frecuencia se ubica él también la mediana del tratamiento t3, las medianas se observan con la línea del centro de las cajas de cada tratamiento. Por otro lado, los grupos con un diámetro de brote inferior a 0.2cm de tallo se observaron en la frecuencia f2.

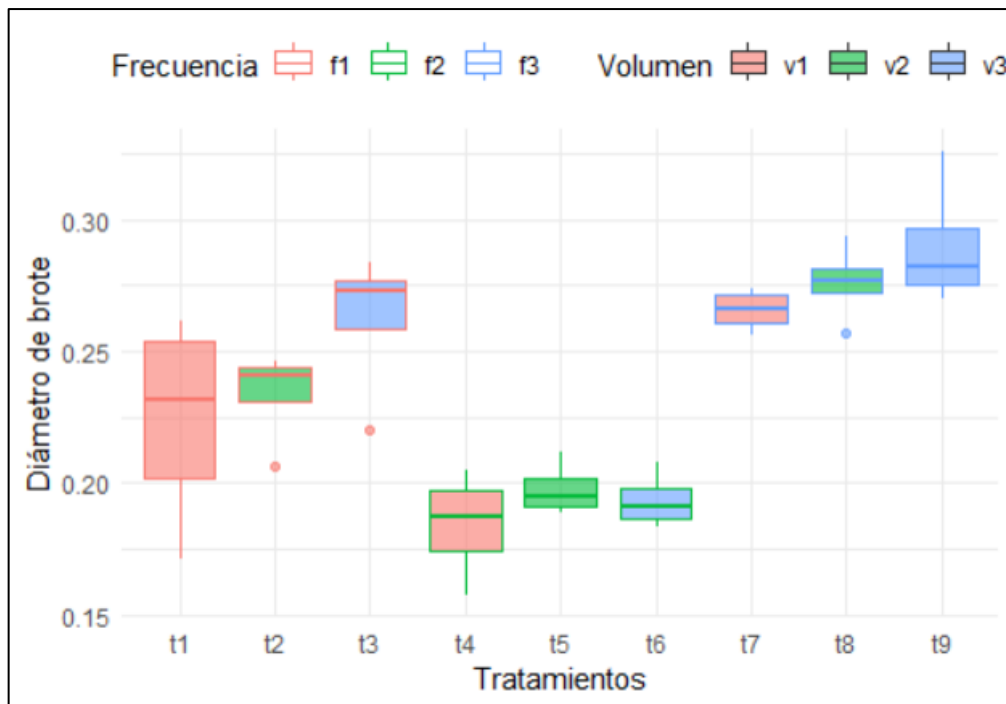


Figura 7. Diámetro de brotes de los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo.
Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

El tratamiento t9 fue el tratamiento con mayores diámetros para anchos de los brotes tuvo diámetros estadísticamente iguales con el control Co de *V. odorata*, se observó esta coincidencia puede que, debido otros factores como el medio de cultivo o la densidad de siembra, porque con respecto a las configuraciones del SITs frecuencia y volumen son distintas al tratamiento t9.

Por otra parte, el control Cp muestra resultados buenos, pero en otro grupo significativo (ab), esto sugiere que la diferencia entre ambas especies también tiene efectos en el diámetro del brote.

3.5 Número de hojas por brote

Se verificó homogeneidad de varianza y normalidad en los tratamientos como se muestra en la Tabla 7. Se realizó un ANOVA de dos factores y se estableció que, hay diferencias altamente significativas en el número de hojas entre las frecuencias, mientras que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los volúmenes de medio de cultivo, ni entre las interacciones de los dos factores.

Tabla 14. ANOVA del número de hojas por brote en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	35			
Tratamientos	8			
Frecuencias de inmersión (f)	2	0.71	16.24	2.34e-05 ***
Volúmenes de medio (v)	2	0.07	1.55	0.23 ^{ns}
f x v	4	0.04	0.88	0.49 ^{ns}
Error experimental	27			
Coeficiente de Variación		10.99962		

Nota: ns: no significativo, *: significativo, ** y ***: altamente significativo

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

En la comparación de medias (Tabla 15) se observa para las frecuencias tres grupos de significancia y con rango de diferencia, siendo el mejor resultado para la frecuencia f3 (2.14 cm), seguida de la frecuencia f2 y finalmente f1. Según el volumen solamente se tuvo un grupo de significancia, siendo el mejor promedio del del volumen v1 (1.98 cm) seguido del v3 y v2 con promedios muy cercanos.

Tabla 15. Prueba de significancia y comparación de medias del número de hojas por brote en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Factores	Descripción	Número de hojas por brote	
Frecuencia (f)	f1= cada 4 horas	1.65	c
	f2= cada 6 horas	1.90	b
	f3= cada 8 horas	2.14	a
Volumen (v)	v1= 150 mL	1.98	a
	v2= 200 mL	1.85	a
	v3= 250 mL	1.86	a
f x v	t1= cada 4 horas + 150mL	1.80	ab
	t2= cada 4 horas + 200mL	1.56	b
	t3= cada 4 horas + 250mL	1.60	b
	t4= cada 6 horas + 150mL	2.04	ab
	t5= cada 6 horas + 200mL	1.87	ab
	t6= cada 6 horas + 250mL	1.78	ab
	t7= cada 8 horas + 150mL	2.11	a
	t8= cada 8 horas + 200mL	2.11	a
	t9= cada 8 horas + 250mL	2.19	a
Cp		1.87	
Co		2.21	

Nota: Los datos con letras diferentes expresan estadísticas diferencias significativas.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

El número de hojas entre las frecuencias presentó una diferencia altamente significativa, siendo la frecuencia f3 la que mostró el mejor resultado en el promedio para número de hojas. Todos los tratamientos con frecuencias f3 obtuvieron los mejores resultados para número de hojas (t9, t8 y t7) agrupados en el primer grupo significativo. En la presente investigación el tratamiento t9 fue el que presentó mejores resultados con 2.19 hojas por explante, en el mismo grupo de significancia que los tratamientos (t8 y t7) de la frecuencia f3, señalando que no se encontró diferencias estadísticas con respecto al volumen.

Los tratamientos se agruparon en 3 grupos de significancia siendo los tratamientos de la frecuencia f3 los cuales presentaron los mejores resultados, seguidos de todos los tratamientos de la frecuencia 2 (t4, t5 y t6) los que presentaron los promedios (1.78, 1.87 y 2.04 hojas respectivamente) en el mismo grupo de significancia (ab) junto con el tratamiento t1 (1.8 hojas). En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos para el número de hojas en el estudio de la micropropagación de *V. odorata* bajo RITA®.

Mientras que, el volumen v1 (15mL por explante) presenta el mejor resultado para número de hojas. El tratamiento t9 siendo la excepción de esta relación mencionada que tuvo los mejores resultados estadísticamente iguales para los tratamientos de la frecuencia f3.

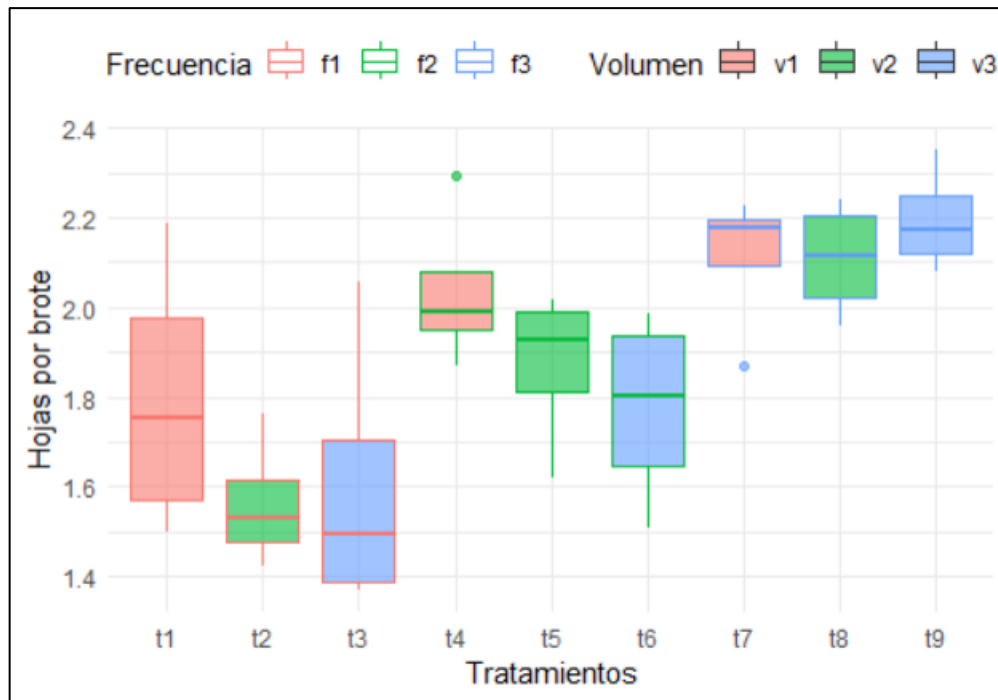


Figura 8. Hojas por brote de los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo. Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

El resultado para el control Co fue el mejor resultado de este estudio para número de hojas por brote. Mientras que el control Cp presentó 1.87 hojas por brote ubicándose en el grupo significativo medio de este estudio.

3.6 Número de raíces por *vitroplanta*

Se verificó normalidad y homogeneidad de varianza como se muestra en la Tabla 7. Se utilizó un ANOVA de dos factores y se estableció que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes frecuencias, volúmenes, ni en la interacción de estos dos factores. Se determinó que no existen diferencias significativas entre ninguno de los dos factores, ni la interacción entre ambos. Los mejores promedios para el número de raíces se presentaron en la frecuencia de inmersión f2 (cada 6 horas) en el tratamiento t6 (2.38) pero en la frecuencia f3 presenta un promedio cercano, y el tratamiento t7 (2.25 raíces, frecuencia de cada 8 horas y volumen 15 mL por explante).

Tabla 16. ANOVA de número de raíces por *vitro* planta en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	35			
Tratamientos	8			
Frecuencias de inmersión (f)	2	1.57	2.50	0.10 ^{ns}
Volúmenes de medio (v)	2	0.41	0.66	0.53 ^{ns}
f x v	4	0.83	1.33	0.29 ^{ns}
Error experimental	27			
Coeficiente de Variación		50.84		

Nota. (ns): No significativo

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

En la comparación de medias no se muestran diferencias entre la varianza intra grupos alta por lo que se agrupan en un solo grupo significativo tanto las frecuencias, volumen.

Tabla 17. Prueba de significancia y comparación de medias del número de raíces por brote en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Factores	Descripción	Número de raíces por <i>vitro</i> planta	
Frecuencia (f)	f1= cada 4 horas	1.15	a
	f2= cada 6 horas	1.83	a
	f3= cada 8 horas	1.70	a
Volumen (v)	v1= 150 mL	1.63	a
	v2= 200 mL	1.35	a
	v3= 250 mL	1.70	a
f x v	t1= cada 4 horas + 150mL	1.25	a
	t2= cada 4 horas + 200mL	0.90	a
	t3= cada 4 horas + 250mL	1.30	a
	t4= cada 6 horas + 150mL	1.40	a
	t5= cada 6 horas + 200mL	1.73	a
	t6= cada 6 horas + 250mL	2.38	a
	t7= cada 8 horas + 150mL	2.25	a
	t8= cada 8 horas + 200mL	1.43	a
	t9= cada 8 horas + 250mL	1.43	a
Cp		2.10	
Co		1.80	

Nota: Los datos con letras diferentes expresan estadísticas diferencias significativas.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

En la Figura7 se puede ver el número de raíces por *vitroplanta* por tratamiento se observa que hay una relación inversamente proporcional según los volúmenes entre las frecuencias f2 y f3, como también se observa en los promedios de la tabla 17, es decir a mayor volumen f2 presenta los mejores resultados mientras que f3 los peores. El mejor promedio para número de raíces por *vitroplanta* fue del tratamiento t6 con frecuencia de 6 horas y 250mL.

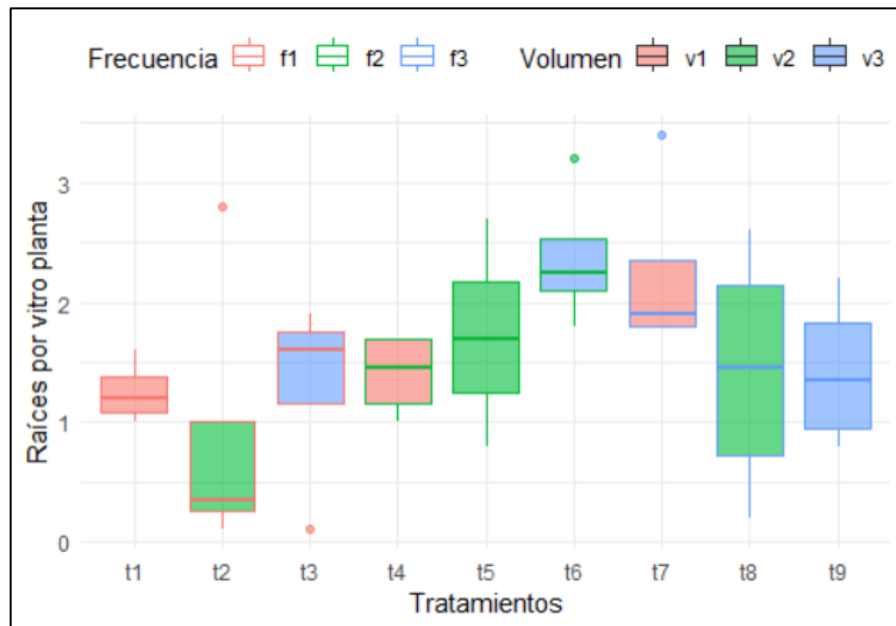


Figura 9. Raíces por *vitroplanta* de los tratamientos evaluados a los 45 días de cultivo.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Los dos controles Cp y Co también presentan el tercer y cuarto resultado con mayor número de raíces por *vitroplanta* respectivamente, esto puede deberse a la composición del medio de cultivo viendo una mejor respuesta de *V. planifolia* para la producción de raíces, ya que, si se compara con el tratamiento t1 con los mismos parámetros de frecuencia y volumen de los controles, los promedios son lejanos entre sí.

3.7 Porcentaje de Oxidación

Los porcentajes de oxidación en este estudio no cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, por lo cual se realizó un análisis con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis como se muestra en la Tabla 18 no mostro que hay diferencias significativas entre ninguno de los factores en estudio y su interacción.

Tabla 18. Prueba Kruskal- Wallis de porcentaje de oxidación en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Factores	Grados de Libertad	P- value
Tratamientos	8	0.71
Frecuencias de inmersión (f)	2	0.12
Volúmenes de medio (v)	2	0.56
MSD	21.39	

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Se realizó la prueba utilizando el método de corrección Bonferroni para comparar las medianas de la variable oxidación, entre todos los tratamientos. Los resultados indican que no se encontraron diferencias significativas entre los factores y su interacción, lo que se evidencia al agruparlos en un único grupo de significación estadística (Tabla 19). Sin embargo, se presenta un rango para facilitar la interpretación de los valores.

Tabla 19. Prueba Kruskal- Wallis con rango de significancia estadística para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Factores	Descripción	Oxidación (%)	Rango
Frecuencia (f)	f1= cada 4 horas	0.66917	18.92 a
	f2= cada 6 horas	1.08917	17.17 a
	f3= cada 8 horas	0.85725	19.42 a
Volumen (v)	v1= 150 mL	0.70725	19.29 a
	v2= 200 mL	1.51833	20.04 a
	v3= 250 mL	0.39000	16.17 a
f x v	t1= cada 4 horas + 150mL	0.75250	21.38 a
	t2= cada 4 horas + 200mL	0.36250	17.25 a
	t3= cada 4 horas + 250mL	0.89250	18.13 a
	t4= cada 6 horas + 150mL	0.00000	13.50 a
	t5= cada 6 horas + 200mL	3.26750	24.50 a
	t6= cada 6 horas + 250mL	0.00000	13.50 a
	t7= cada 8 horas + 150mL	1.36925	23.00 a
	t8= cada 8 horas + 200mL	0.92500	18.38 a
	t9= cada 8 horas + 250mL	0.27750	16.88 a
Cp			1.5
Co			0.0

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Posteriormente se analizó con la Figura 8 con la prueba de Wilconxon para comparar en pares, en este caso el tratamiento t7 presento resultados más altos en las medianas de porcentaje de oxidación, pero se observa una mayor variabilidad de los datos en las frecuencias f1 y f3 que también presentan datos atípicos.

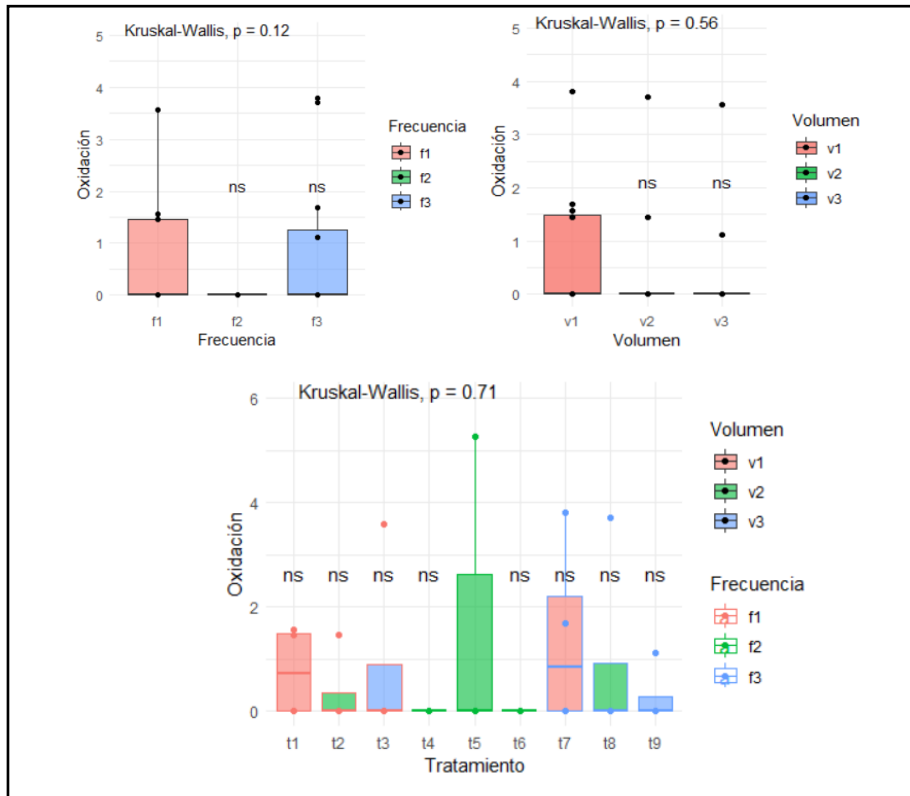


Figura 10. Graficas para frecuencia, volumen y tratamientos comparando con pruebas Kruskal-Wallis y Wilcoxon.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

En los tratamientos T3.1, T5.1, T5.2 y T8.1, se presentaron 4 explantes oxidados con todos sus brotes, cada uno con 3, 5, 3 y 4 brotes respectivamente, algunos de estos casos se observan en la Figura 9 (A y B). Además, se presentaron casos de oxidación en brotes puntuales como en el tratamiento T3.1 con 3 brotes oxidados, y para el resto de casos son en total 9 brotes en los tratamientos T1.1, T1.3, T2.1, T7.1 (2), T7.2 (3) y T9.2. En C y D de la Figura 9, se puede observar dos casos de oxidación.

Además, se registró 2 explantes hiperhidratados en el tratamiento T7.1 y en el tratamiento T7.3, los cuales se pueden observar en E y F de la Figura 11. En cuanto a las frecuencias, no se encontraron diferencias significativas, aunque se observó que la frecuencia f1 y f3 se relacionan con los valores cercanos del rango, al igual que el volumen v1 y v2. En cuanto a la interacción de factores, se pudo observar que los tratamientos t5, t7 y t1 presentaron los rangos superiores.

En volumen se tiene una mayor cantidad de oxidados es el volumen v1 y todos presentan datos atípicos. Visualizando la Figura 8 los tratamientos se observa la

mediana del tratamiento t1 y t7 en rangos similares, pero el tratamiento t5 presenta fuerte variabilidad de datos y los datos extremos más predominantes, y los tratamientos t4 y t6 no presentaron ningún tipo de oxidación teniendo un 100% de brotes viables. En el control Cp se tuvo un explante oxidado, específicamente en el control C3.3 con 3 brotes y de un total de oxidación de 1.5%.

3.8 Porcentaje de Hiperhidratación

Al no cumplir con los supuestos de normalidad y heterocigocidad. Se realizó una prueba Kruskal-Wallis, considerando que el porcentaje de hiperhidratación fue mínimo en todo este estudio y se registró únicamente en un tratamiento. Se evidencia que no hay diferencias entre los factores, pero si hay una diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 20).

Tabla 20. Prueba Kruskal- Wallis de porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	P- value
Tratamientos	8	0.04
Frecuencias de inmersión (f)	2	0.13
Volúmenes de medio (v)	2	0.13
MSD		8.73

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

El porcentaje de 0.16% se registró en la frecuencia 3 de cada 8 horas y en el volumen v1 de 15mL por explante. Ya que en estos factores fueron en los únicos que se presentaron los casos de hiperhidratación. El tratamiento t7 muestra los únicos 2 casos de brotes hiperhidratados y por esto en la Tabla 21 se puede observar dos grupos significativos en las interacciones de los dos factores.

Tabla 21. Prueba Kruskal- Wallis para el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de *V. odorata* con SITs – RITA

Factores	Descripción	Hiperhidratación (%)
Frecuencia (f)	f1= cada 4 horas	0.00 a
	f2= cada 6 horas	0.00 a
	f3= cada 8 horas	0.16 a
Volumen (v)	v1= 150 mL	0.16 a
	v2= 200 mL	0.00 a
	v3= 250 mL	0.00 a
f x v	t1= cada 4 horas + 150mL	0.00 b
	t2= cada 4 horas + 200mL	0.00 b
	t3= cada 4 horas + 250mL	0.00 b
	t4= cada 6 horas + 150mL	0.00 b
	t5= cada 6 horas + 200mL	0.00 b
	t6= cada 6 horas + 250mL	0.00 b
	t7= cada 8 horas + 150mL	0.47 a
	t8= cada 8 horas + 200mL	0.00 b
	t9= cada 8 horas + 250mL	0.00 b

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

En ninguno de los controles se observaron brotes hiperhidratados. Si se realiza un conteo general de los brotes totales que son 2507 brotes con respecto a estos casos muy puntuales tenemos que el porcentaje que representan los brotes oxidados es de 0.75% mientras que los casos de brotes hiperhidratados representa el 0.08%, dándonos un total de 0.83% entre ambos casos.

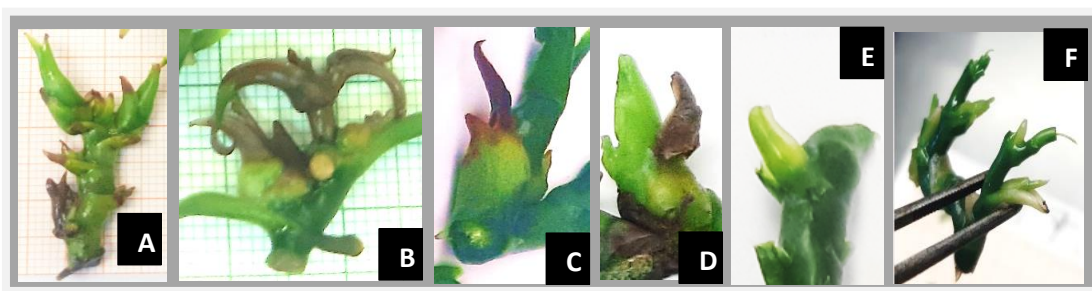


Figura 11. Explantes con alteraciones morfológicas, algunas fotos de explantes con brotes oxidados e hiperhidratados.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

La Tabla 21 presenta los resultados de los mejores tratamientos obtenidos para la micropropagación de *V. odorata* en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA. Se

muestran los efectos sobre el índice de multiplicación, longitud y diámetro de brote, número de hojas por brotes, raíces por *vitro* planta, porcentaje de oxidación e hiperhidratación.

Tabla 21. Promedios y pruebas de significancia para los variables evaluados de los mejores tratamientos y controles de este estudio.

Tratamiento	Índice de multiplicación (brote/explante)	Longitud de brote (cm)	Diámetro de brote (cm)	Número de hojas por brote	Número de raíces por <i>vitro</i> planta	Oxidación (%)	Hiperhidratación (%)
t7	9.33	0.97	0.27 ab	2.11 a	2.25	1.84	0.4725
t8	5.85	0.94	0.28 ab	2.11 a	1.43	0.93	-
t9	7.98	0.91	0.29 a	2.19 a	1.43	0.28	-
Cp	7.87	1.03	0.27	1.87	2.07	1.50	-
Co	5.72	0.92	0.28	2.21	1.75	-	-

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Nota: Tiempo en cultivo: 45 días. **Sistema de cultivo:** sistema de inmersión temporal (RITA), con una frecuencia de inmersión de 2min. Los valores de los promedios, seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes a $p \leq 0,05$ según la prueba de Tukey. Efectos significativos: a $p < 0,05$

4. CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1 Interpretación de resultados

4.1.1 Índice de multiplicación

La frecuencia con mejores resultados fue f3: cada 8 horas. *V. odorata* presenta mejores resultados para las frecuencias de inmersión f3 (8 horas / 3 veces por día), la más larga de este estudio. A diferencia de este estudio que para la especie *V. planifolia* las mejores frecuencias de inmersión reportadas para la micropropagación de la especie *V. planifolia* utilizando recipientes RITA han sido de cada 6 horas [58], y cada 4 horas [46,47,59], siendo estas las menores frecuencias evaluadas

Se sabe que el genotipo de cada especie de vainilla influye en sus preferencias de frecuencia de inmersión para la micropropagación. Georgiev et al. (2014) sostiene que según la especie y el sistema de inmersión temporal utilizado dependerán los efectos evaluados para la micropropagación de las plantas [56], En este sentido, se ha observado que *V. planifolia*, con un genotipo diferente al de *V. odorata*, prefiere frecuencias cortas de inmersión (4-6 horas), mientras que *V. odorata* presenta mejores resultados en frecuencias de inmersión largas (8 horas).

La diferencia genética encontrada en estas especies sugiere que sus preferencias de frecuencia de inmersión son específicas y pueden estar relacionadas con su adaptación a diferentes entornos y condiciones de crecimiento. Es importante destacar que la ruta de morfogénesis de cada especie también puede influir en estas preferencias [63]. En la investigación realizada se ha observado que *V. planifolia* prefiere más veces de riego por día, mientras que *V. odorata* prefiere pocas veces de riego. Esto puede deberse a las condiciones climáticas y de suelo en las que se desarrollan cada una de estas especies. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos en esta investigación no son concluyentes y se necesitan más estudios para confirmar estas observaciones.

Por otro lado, en un estudio reciente realizado en Biorreactores de inmersión temporal (BIT®) Villegas-Ramírez (2022) se reportó el mejor índice de multiplicación global (33.7

brotos/explante) en *V. planifolia* la mejor frecuencia de inmersión de cada 6 horas, con la consideración que este fue la menor frecuencia evaluada. A diferencia de este estudio que presentó los mejores resultados para las frecuencias más largas. Además, en el reporte se usó un tiempo de inmersión de 10 min, mayor al reportado por la mayoría de estudios con Sistemas de inmersión temporal en *V. planifolia* (2 minutos).

En los reportes con RITA para *V. planifolia* reportan disminución en el índice de multiplicación a mayores volúmenes (50mL por explante) teniendo mejores resultados (17.54 brotes/explante) con el menor volumen evaluado (25 mL por explante). Con estas mismas configuraciones en los SITs (2 min cada 4 h y 25mL por explante) Ramirez-Mosqueda reporta en BITs un resultado similar de 18.06 brotes/explante. A diferencia de Villegas-R. J. que reporta los mejores resultados utilizando BIT (34.93 brotes/explante) para los mayores volúmenes evaluados (40mL por explante) [35], al igual que este estudio que reporta al mayor volumen evaluado el mejor promedio como se observa en la comparación de medias (Tabla 11).

En la interacción de los factores, se observó que el tratamiento t7, con volumen v1 de 15mL por explante, presentó el mejor resultado. Es posible que en los tratamientos de la frecuencia f3, con menos inmersiones por día, se haya generado estrés hídrico por déficit de agua. Lo que podría explicar por qué los explantes de esta especie asimilaron de mejor manera los nutrientes presentando una respuesta caracterizada por cambios morfológicos, fisiológicos, como algunos de los observados. Sin embargo, es necesario realizar análisis bioquímicos y moleculares para contrastar la información con otras especies y tener una comprensión más completa de los procesos subyacentes a estas preferencias de frecuencia de inmersión [63].

Aunque no existen reportes sobre el efecto de esta especie ante el estrés hídrico, pero los resultados muestran que a diferencia de *V. planifolia*, que presenta mayor número de brotes con 6 inmersiones por día, la especie *V. odorata* presenta mayor número de brotes con menos inmersiones por día (3). Es importante señalar que, si bien las características del perfil bioclimático de *V. odorata* son diferentes que las de *V. planifolia*, debido al desarrollo de cada genotipo esta estimulado por diversas condiciones ambientales en las que su crecimiento es óptimo. Estas condiciones específicas nos pueden ayudar a entender las preferencias en condiciones *in vitro* de cada especie, como es el caso de la frecuencia de inmersión, lo cual se podría asociar con

características propias de cada especie como la resistencia a la sequía de la especie en estudio.

Según reportes de Martínez-Santos, E. et al. (2021) al inducir estrés hídrico generado por el déficit de agua en *V. planifolia* se registró una reducción del índice estomático y el porcentaje de estomas abiertos, esto afecta al equilibrio hídrico alterando el balance entre la absorción y transpiración de las *vitro* plantas, además se reporta que una acumulación de prolina [63]. La prolina está relacionada con la capacidad adaptativa ante condiciones ambientales ante las cuales resulta difícil una adaptación.

Entonces el estrés generado en las *vitro* plantas de *V. odorata* por la cantidad de medio de cultivo, siendo los menores volúmenes los que generan mayor estrés, y por su capacidad a mejor adaptabilidad y supervivencia, serían una posible razón por las cuales se tiene un mayor número de brotes en el tratamiento t7. Sin embargo, es importante continuar investigando en esta línea para entender mejor las respuestas adaptativas de las vitroplantas ante diferentes tipos de estrés y cómo se pueden utilizar estas respuestas para mejorar la producción de plantas en condiciones desfavorables.

Considerando que el volumen no presento diferencias significativas, es importante analizar la variación entre los promedios. En los tratamientos con una frecuencia de inmersión f1 (cada 4 h) el mejor promedio del volumen en esta frecuencia fue el volumen v3 (25mL por explante; 7.78 brotes/explante) relativamente cercano al tratamiento t9 (volumen v3 y frecuencia f3; 7.98 brotes/explante), Mientras que los tratamientos con frecuencia f3 (cada 8 h), t7 y t9 presentan mejores promedios con volumen v1 (15mL/explante) y v3 (25 mL/explante) respectivamente.

Según observación visual durante el funcionamiento del SIT con respecto a la forma de inmersión del líquido. En los tratamientos con menor volumen (v1) se observó que el medio de cultivo subía lenta y llegaba a los explantes de manera suave, mientras que en los volúmenes mayores (v2 y v3) el medio subía de manera violenta y movía de forma brusca todos los explantes.

La forma de inmersión del líquido es un factor importante a considerar en los sistemas de inmersión temporal, ya que puede afectar la morfología y desarrollo de las vitro plantas [73]. En este caso, la forma violenta de inmersión en los volúmenes mayores

pudo provocar problemas en la posición y crecimiento de los explantes, lo cual puede impactar en la producción de brotes. Los resultados reportados por Ramos-Castella et al. (2014) coinciden con esta observación, mostrando que volúmenes mayores a 150mL pueden reducir la producción de brotes. Por lo tanto, la elección del volumen adecuado de medio de cultivo en los sistemas de inmersión temporal puede ser crucial para obtener los mejores resultados en la multiplicación de vitro plantas.

Si bien los sistemas de inmersión temporal (SIT) entre sus beneficios son reducir el estrés mecánico a comparación de los sistemas con agitación [44], en este caso puede representar una causa que este influenciando en el índice de multiplicación. Dependiendo del volumen estos podrían influir en la integridad morfológica y el desarrollo del crecimiento debido al estrés mecánico, siendo este generado por el cambio de posición y movimiento producido en cada inmersión de las *vitroplantas*. Watt en 2012 evidencia que el volumen del frasco y del medio de cultivo tiene relación con la biomasa en el cultivo, y es un factor determinante en la micropropagación en SITs.

Se ha reportado para otros SITs en los que se tiene una menor producción de biomasa debido al estrés mecánico [64]. Es decir, el estrés mecánico pudo afectar al desarrollo de las plantas, ya que requirió más energía para retomar su crecimiento apical, lo cual limitó su crecimiento y producción de nuevos brotes. El índice de multiplicación de *V. odorata* en medio semisólido se optimizó de 4 brotes/explante [65] a 9 brotes/explante utilizando medio líquido en los SITs tipo RITA®.

4.1.2 Largo y diámetro de brotes

En este estudio el mejor resultado de los tratamientos en el largo de brote fue en el tratamiento t7 de (0.97cm, con volumen v1), pero el control Cp obtuvo el mayor promedio de 1.03 cm. Para *V. planifolia* en RITA el mayor largo de brote se reportó por Ramírez-Mosqueda en 2016, de 1.69 cm (2 min cada 4 horas con 25mL por explante) a los 42 días de cultivo.

A diferencia de otros reportes como Ramos-Castellá et al., (2014) que a los 30 días de cultivo presenta un largo de brote de 13.5 mm con una frecuencia de cada 4 y 8 horas de inmersión y 33.33 mL por explante. A los 45 días de cultivo (6 semanas), y utilizando BIT se reporta por Villegas-R (2022) la mayor longitud de brote para la frecuencia de

cada 10 minutos cada 6 horas y 30 mL por explante (2.51 cm) y en el volumen de 20 mL por explante (2.08 cm).

Los resultados sugieren que la longitud de los brotes en la especie *V. planifolia* depende tanto de la frecuencia como del volumen de inmersión en el medio de cultivo. Se obtienen mejores resultados en volúmenes menores y frecuencias de inmersión más cortas [44,45,64]. Por otro lado, en este estudio con *V. odorata* se observan mejores resultados en longitud de brotes a frecuencias de inmersión más largas, aunque se produce un efecto similar de brotes más largos en volúmenes de cultivo menores.

Esto puede deberse a que en los SITs el contacto directo del medio de cultivo líquido con las hojas y toda la estructura vegetal de la planta facilita la absorción de nutrientes, por medio de estomas y poros acuosos, debido a que existe una mayor superficie de absorción [43]. Por su capacidad adaptativa y la robustez del genotipo de esta *V. odorata*, como es una mayor tolerancia a la sequía; esto puede significar una mayor producción de osmolitos de prolina y glicina betaína, que son metabolitos utilizados en la regulación de la presión osmótica en las células y protección de efectos nocivos del estrés abiótico.

Por otra parte, en estudios con *V. planifolia* que no reporta resistencia a factores abióticos, sino se reporta que a mayor estrés hídrico se produce una reducción en crecimiento de brotes, proteínas solubles y porcentaje de estomas abiertos [72]. En los tratamientos con frecuencia f3, el aumento de la superficie de absorción, puede estar representada por el largo y ancho de brotes, que puede haber sido estimulado por mecanismos de adaptación como la síntesis y acumulación de prolina y glicina betaína como respuesta al estrés generado en la planta debido a la cantidad limitada de medio de cultivo y frecuencias de inmersión muy aplazadas.

Esta diferencia podría evidenciarse en un análisis de metabolitos relacionados a la adaptabilidad en cada especie. Es necesario tomar en cuenta que los datos obtenidos en esta tesis no son prueba concluyente de esta especulación. Pero ratifican la diferencia entre los diferentes genotipos y no establecen ninguna preferencia para el género, sino sus procesos sugieren que son independientes por especies.

Se obtuvo resultados similares al cultivo en medio semisólido, pero a los 45 días a diferencia de los 60 días reportados por Romero G. (2022) que presenta los mejores resultados reportados para *V. odorata* en el diámetro (0.32 cm), este resultado concuerda con Ramos- Castella. et al. (2014) que reporta para *V. planifolia* el mayor diámetro en cultivo semisólido SS (0.51 cm) y utilizando SIT (0.48 cm) con la frecuencia de cada 4 horas, en un volumen de 33.3 mL por explante.

El control Co muestra un bajo índice de multiplicación, pero se posiciona entre los mejores resultados para dimensiones de brote y número de hojas esto puede ser por una mejor adaptabilidad de *V. odorata* a condiciones extremas [31], y puede que por influencia del medio de cultivo distinto con mayor contenido de citocininas, desarrolló mayor tejido vegetal en con efectos positivos en las variables mencionadas [66].

Los resultados de esta investigación contribuyen a la comprensión de los perfiles bioclimáticos de cada especie de *Vanilla*, al relacionar las frecuencias y volúmenes de medio de cultivo con factores ambientales como la disponibilidad y exposición al agua, evaluando variables ambientales como precipitación y temperatura, según los bioclimas de origen. Esto permite interpretar las preferencias de cada especie y relacionarlas con resultados en laboratorio, basados en la información generada por Jiménez et al. (2017), quien estudió el perfil bioclimático de varias especies de *Vanilla* y sus efectos en el desarrollo vegetativo.

Hernández et al. en 2010 reportó que *V. odorata* requiere menos precipitación promedio anual (365 mm) y menor temperatura en el mes más frío (3°C) en comparación con *V. planifolia*, que necesita 1.500 mm anuales. Esto sugiere que *V. odorata* es una especie de *Vanilla* aromática robusta que responde mejor ante el estrés hídrico y lapsos de tiempo más largos para inmersiones.

4.1.3 Número de hojas por brote

Los mejores resultados de número de hojas reportados para *V. planifolia* utilizando RITA fue de 2.40 hojas por brote Ramos-Castellá et al., (2014) para un tratamiento con una frecuencia de cada 8 horas, que concuerda con los resultados de esta investigación frecuencia f3 (pero en diferentes volúmenes), reportándose que a mayor volumen mayor número de hojas. Ramírez- Mosqueda y Iglesias- Andreu (2016) reporta el mayor

número de hojas (2.70 hojas) en SITs tipo BIG (Gravity Immersion Bioreactors) con inmersiones de 2 min cada 4 horas y un volumen de 25 mL por explante.

En 2022 Villegas utilizando BIT reporta los mejores resultados para número de hojas por *vitro*plantas (34.73 hojas/explante) en la frecuencia más baja del estudio cada 6 horas durante 10 minutos y con volumen de 30mL por explante, pero se reporta mejores resultados a mayor volumen (40mL por explante). Esto puede estar relacionado con la capacidad adaptativa de *V. odorata* al ser reportada como una especie silvestre [31], puede presentar mejores respuestas ante diferentes tipos de estrés como la limitante del volumen del medio de cultivo.

Por otra parte, el mayor promedio obtenido para número de hojas por *vitro*planta fue de 19,25 hojas en el tratamiento t7 que tiene volumen v1. El tratamiento t9 y el control Co presentan los mejores promedios para el numero de hojas por brote, lo que diferencia la producción de hojas de los resultados de los tratamientos, los controles, además la diferencia de los resultados entre las dos especies, puede estar dada en la disponibilidad del medio de cultivo y su composición.

4.1.4 Número de raíces por vitroplanta

El estudio en RITA para *V. planifolia* de Ramírez-Mosqueda (2016) reporta 2.76 raíces por brote con una longitud de brote de 1.04 cm en medio de cultivo para enraizamiento conformado únicamente por medio nutritivo y sucrosa a los 28 días. En esta investigación se obtuvo resultados similares, pero en número de raíces por *vitro* planta, siendo estas en su mayoría raíces en desarrollo mayores a 0.2 cm. Por lo que se puede inferir que, al consumirse los otros compuestos del medio de cultivo se inició un proceso de enraizamiento con los compuestos principales del medio de cultivo sucrosa y medio nutritivo.

Además, por la morfología observada en las *vitro* plantas de los tratamientos en general, mostraban puntas de las hojas amarillentas como se muestra en la Figura 4. Estas evidencias nos ayudan a entender que las *vitro* plantas, debido al largo periodo de cultivo 45 días comenzaron a mostrar alteraciones morfológicas como las mencionadas, que no fueron reportados en estudios con *V. planifolia* utilizando RITA, pero si hay

reportes de estas alteraciones morfológicas similares en las que se atribuyen a síntomas por hiperhidricidad [31].

También Macas R., (2019) reporta para *V. x tahitensis* una longitud de raíz de 2.31 cm, utilizando un medio de cultivo Murashige & Skoog (MS, 1962) y las vitaminas B5 descritas por Gamborg, et al. (1968), bencil amino purina (BAP) y ácido indol butírico (IBA) como reguladores de crecimiento para enraizamiento (Macas R., 2019). A diferencia del protocolo de Ramirez-Mosqueda este medio de cultivo si contiene reguladores de crecimiento por lo que resultó una mayor longitud de raíz.

Los resultados reportados de raíces por brote sembrado los controles Cp (2.1 raíces) fueron de los mayores en este estudio, posiblemente por la composición del agua de coco por lo que este protocolo puede servir como un medio de enraizamiento. El tratamiento t2 presentó la menor cantidad de raíces y el mayor consumo de medio, esto puede ser debido a la incapacidad de asimilar nutrientes llevando al desarrollo de tejido radicular para poder captar mayor cantidad de nutrientes. Por otra parte, el tratamiento 6 se tiene el menor resultado para longitud de brotes, pero la mayor cantidad de raíces.

4.1.5Oxidación e Hiperhidratación

El porcentaje de oxidación fue mayor que de hiperhidratación, esto que ratifica los beneficios de los SITs para reducir estas alteraciones morfológicas [60]. Ramos-Castella menciona casos hiperhidratación en tratamientos a 45 minutos de inmersión cada 8 horas, pero reporta que la especie *V. planifolia*, responde mejor a tiempos de inmersión de 2 min e inmersiones frecuentes de 4 horas para prevenir la hiperhidricidad. En este estudio se presentaron 2 brotes hiperhidratados un porcentaje menor al 0.1%. En los tratamientos que más se registró oxidación fue en el tratamiento t7.

A pesar que estos datos no son suficientes para establecer conclusiones con respecto a la diferencia entre tratamientos y la efectividad ante estas variables, podemos mencionar algunas de las posibles causas por las que se encontraron los casos puntuales. En el tratamiento t7 se pudo deber al estrés en las plantas donde también se encontraron los casos de hiperhidratación y oxidación.

Además, la abundancia de tejido vegetal pudo haber dificultado la recepción de la luz dentro de los recipientes, como también se ha reportado para en otros cultivos casos de hiperhidratación en los cuales el medio se queda entre los brotes al tener esta tendencia de formar pelotas con los brotes enredados [73] . Los 2 explantes hiperhidratados del tratamiento t7, se pueden observar en las imágenes E y F de la Figura 11.

En el control Co no se observaron casos de brotes oxidados ni hiperhidratados, posiblemente porque el medio de cultivo de este estimuló de manera positiva a esta especie logrando mayores resultados en las otras variables evaluadas como ya se mencionó, además su capacidad adaptativa propia de cada genotipo promueve la acumulación de osmolitos de prolina (Pro) y glicina betaína siendo protectores de las especies reactivas (ROS) [72].

Mientras que en el control Cp se tuvo un explante oxidado, específicamente en el control C3.3 con 3 brotes y de un total de 239 brotes estos 3 brotes oxidados representan el 1.5% este porcentaje es alto debido a que el número de explantes por cada ensayo es de 6. A diferencia de Co la oxidación puede haberse dado por la influencia del agua de coco y la cantidad de componentes que esta presenta que no se pudieron asimilar de manera correcta.

4.1.6 Consideraciones generales

El proceso de micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl fue optimizado utilizando Sistemas de inmersión Temporal (SITs) con recipientes tipo RITA a los 45 días de cultivo. La frecuencia f3 (2 min de inmersión cada 8 horas) presentó los tratamientos con mejores resultados para índice de multiplicación, longitud y ancho de brote, Los mejores resultados se registraron en el tratamiento t7 con un volumen de 15 mL por explante (v1) y una frecuencia de inmersión de 2 min cada 8 horas (f3).

Con respecto al volumen de medio se determinó que a mayor cantidad de volumen se produce una reducción en el índice de multiplicación, pero promueve el desarrollo foliar y engrosamiento de brotes, pero con menor longitud de los brotes como se observó en el tratamiento t9. Esto puede ayudar a determinar qué tipo de tratamiento aplicar dependiendo de los objetivos.

Con respecto a la calidad de las *vitroplantas* después de los 45 días se observaron hojas con puntas quemadas y amarillentas, como se muestra en la Figura 9, en varios tratamientos en todos los volúmenes y frecuencias. Según los reportes de estos efectos en las hojas de orquídeas se dan por una deficiencia del calcio o exceso de minerales solubles en el agua [67].

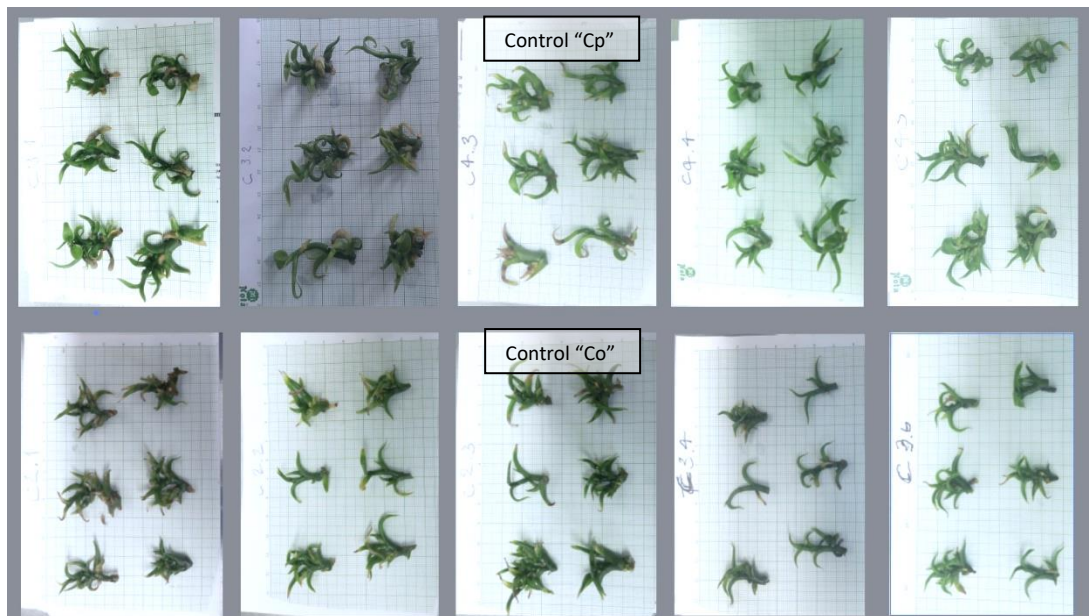


Figura 4. Las 5 repeticiones para los controles Cp con *Vanilla planifolia* y los controles Co con *Vanilla odorata*.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

Si comparamos las plantas en los controles se puede ver que las *vitro* plantas de *V. odorata* también presentan esta característica de hojas amarillentas, mientras que en *V. planifolia* no se observaron estas alteraciones morfológicas, esto puede deberse a las características propias de cada especie y su tolerancia a largos periodos de cultivo *in vitro*, siendo *V. planifolia* una planta con la cual se ha venido cultivando *in vitro* un mayor periodo de tiempo que la especie en *V. odorata*.

En este estudio se tuvo los tratamientos en general presenta hojas con daños morfológicos que podrían deberse a limitaciones para la absorción de nutrientes; en varios de los tratamientos se evidenció puntas amarillentas, como también lo reportó Villegas- R. J. (2022) en sus investigaciones, pero sin referirse a un tratamiento específico. Puede que esto promueva la activación de diferentes mecanismos adaptativos que lleven a la especie a aprovechar la disponibilidad de recursos para la

generación de nuevos brotes y ocasionando que las hojas queden comprometidas como se observó en los ensayos evaluados [67].

Sin embargo, estas observaciones podrían utilizarse como base para futuras investigaciones en programas de mejoramiento genético o en la optimización de protocolos de multiplicación. Es posible que la capacidad adaptativa de *V. odorata* le permita hacer un mejor uso del medio de cultivo en situaciones de estrés, como la disponibilidad limitada de medio líquido o frecuencias de inmersión más largas. En definitiva, se necesita una mayor investigación para determinar las implicaciones genéticas y fisiológicas de estas características bioclimáticas en *V. odorata* y cómo se pueden aplicar en la práctica del cultivo *in vitro*.

5. CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los resultados de este estudio demostraron que el establecimiento de un protocolo de micropropagación con medio líquido en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® para *Vanilla odorata* C. Presl logró optimizar el proceso de micropropagación, alcanzando un índice de multiplicación de 9.3 brotes por explante, lo que supera el índice reportado en la misma especie utilizando medio semisólido.

Se determinó que la frecuencia de inmersión cada 8 horas durante 2 minutos fue la más eficiente, obteniendo los mejores resultados para el número de hojas por brote y la longitud y diámetro de los brotes. Asimismo, se observó que la especie *V. odorata* presenta mejores respuestas de crecimiento a frecuencias largas.

En cuanto al volumen del medio líquido, se encontró que el uso de 15 mL por explante fue el más eficiente y presentó mejores *resultados*, siendo este el menor volumen utilizado en el estudio, igual al mejor volumen total reportado en RITA para la micropropagación de *V. planifolia*.

5.2. Recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere continuar con la evaluación del enraizamiento y adaptación de las *vitro* plantas de *V. odorata*, completando el protocolo de propagación de acuerdo con la siguiente fase del proyecto "Vainilla".

Se recomienda realizar evaluaciones a mayores frecuencias de inmersión para determinar si es posible mejorar los resultados obtenidos en este estudio. Ya que se observaron mejores efectos en los tratamientos como frecuencia de inmersión más largo, es decir menos inmersiones por día.

Se sugiere evaluar otros sistemas de inmersión temporal, como el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), el cual ha demostrado ser muy efectivo en la micropropagación de *V. planifolia*.

6. REFERENCIAS

1. Rodríguez-deméneghi MV, Armas-silva AA. Scientia Agropecuaria Vanilla cultivation in Mexico : Typology , characteristics , production , agroindustrial prospective and biotechnological innovations as a sustainability strategy agroindustrial e innovaciones biotecnológicas como estrategia de suste. 2023;14: 93–109.
2. Bory S, Lubinsky P, Risterucci A, Noyer J, Grisoni M, Duval M, et al. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). Am J Bot. 2008;95: 805–815.
3. Cardon, J. M. 2021. Reflections on development and agriculture through the lens of peace corps experience in the Comoros islands. 2021; 6.
4. Ballesteros- P, M. & Pazmiño-R. S. Potencial exportable de vainilla de la subpartida arancelaria 09051000 hacia la Unión Europea en el periodo 2015-2019. 2021.
5. Chambers AH, Moon P, Edmond V, Bassil E. *Vanilla* Cultivation in Southern Florida. Edis. 2019;2019: 7. doi:10.32473/edis-hs1348-2019
6. Menchaca R, Ramos J, Moreno D, Luna M, Mata M, Vázquez L, et al. Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona* . Rev Colomb Biotecnol. 2011;13: 80–84. Available: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22945/23724>
7. Teoh ES. The story of *Vanilla* . Orchids as Aphrodisiac, Medicine or Food. Springer; 2019. pp. 109–130.
8. Chambers A, Cibrián-Jaramillo A, Karremans AP, Moreno Martinez D, Hernandez-Hernandez J, Brym M, et al. Genotyping-By-Sequencing diversity analysis of international *Vanilla* collections uncovers hidden diversity and enables plant improvement. Plant Science. 2021;311. doi:10.1016/j.plantsci.2021.111019
9. Bogarín D, Pupulin F, Smets E, Gravendeel B. Evolutionary diversification and historical biogeography of the orchidaceae in central America with emphasis on Costa Rica and Panama. Lankesteriana. 2016;16: 189–200. doi:10.15517/lank.v16i2.26005
10. Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, et al. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015;282. doi:10.1098/rspb.2015.1553
11. Favre F, Jourda C, Grisoni M, Piet Q, Rivallan R, Dijoux JB, et al. A genome-wide assessment of the genetic diversity, evolution and relationships with allied species of the clonally propagated crop *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. Genet Resour Crop Evol. 2022;69: 2125–2139. doi:10.1007/s10722-022-01362-1

12. Daphna Havkin-Frenkel, and Faith C. Belanger JW& S. Handbook of *Vanilla* Science and Technology. ProQuest Ebook Central. 2018. Available: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/biblitesm/detail.action?docID=5448976.%0ACreated> from biblitesm on 2022-03-29 19:02:49.%0A
13. Cameron KM. Vanilla Phylogeny and Classification. Handbook of Vanilla Science and Technology. 2010; 241–255. doi:10.1002/9781444329353.ch14
14. Hasing T, Tang H, Brym M, Khazi F, Huang T, Chambers AH. A phased *Vanilla planifolia* genome enables genetic improvement of flavour and production. *Nat Food*. 2020;1: 811–819. doi:10.1038/s43016-020-00197-2
15. Tavares Gonzáles FB. Caracterización aromática y genética de cultivares de vainilla (*Vanilla* sp.) de México. 2018.
16. Menini Neto L, Alves RJV, Barros F de, Forzza RC. Orchidaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, MG, Brasil. *Acta Bot Brasilica*. 2007;21: 687–696. doi:10.1590/s0102-33062007000300015
17. Martija-Ochoa M. El gran libro de las orquídeas. Barcelona: Parkstone International; 2019.
18. Vaz ABM, Mota RC, Bomfim MRQ, Vieira MLA, Zani CL, Rosa CA, et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Can J Microbiol*. 2009;55: 1381–1391. doi:10.1139/W09-101
19. Karremans AP, Chinchilla IF, Rojas-Alvarado G, Cedeño-Fonseca M, Damián A, Léotard G. A reappraisal of neotropical *Vanilla* . With a note on taxonomic inflation and the importance of alpha taxonomy in biological studies. *Lankesteriana*. 2020;20: 395–497. doi:10.15517/lank.v20i3.45203
20. Damian A. PL. Taxonomía del género *Vanilla* Plum . ex Mill . (Orchidaceae : vanilleae). 2020.
21. Arenas M, Cribb P. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). *Lankesteriana*. 2013;0. doi:10.15517/lank.v0i0.12071
22. Soto-Arenas MA (2009). Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla* . Instituto Chinoín, AC Generación y recopilación de información de las especies de las que México es centro de origen y diversidad genética. 2009.
23. Bouetard A, Lefeuvre P, Gigant R, Bory S, Pignal M, Besse P, et al. Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. *Mol Phylogenet Evol*. 2010;55: 621–630. doi:10.1016/j.ympev.2010.01.021
24. A MAS, D RL. 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 1. 2010;9.
25. McKey D, Elias M, Pujol ME, Duputié A. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist*. 2010;186: 318–332. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03210.x

26. Villegas-Ramírez J. & Palma-Zúñiga T. Caracterización morfogénica de la vainilla (*Vanilla planifolia* ANDREWS) PARA SU PROPAGACIÓN. 2022;46: 9–24.
27. Grisoni M, Dijoux J. Vanilla Variety named “Handa.” 2017;1: 1–6.
28. CVC - FUNAGUA. Planes de manejo para la conservación de 22 especies focales de plantas en el Departamento del Valle del Cauca. Manual de introducción Ionic. 2011. Available: https://ecopedia.cvc.gov.co/sites/default/files/archivosAdjuntos/pm_sp_focales_plantas_2010.pdf
29. Flanagan NS, Chavarriaga P, Mosquera-espínosa AT. Conservation through use of *Vanilla* crop wild relatives in Colombia. 2019.
30. Karremans AP. Adam Karremans: Irresistiblemente fragante: la misteriosa ecología de *Vanilla* Mill. VI Conferencia Científica de Orquídeas Andinas. 2019.
31. Jiménez ÁF, López DR, García DJ, Arenas OR, Rivera Tapia JA, Lara MH, et al. Diversidad de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y sus perfiles bioclimáticos en México. *Rev Biol Trop*. 2017;65: 975–987. doi:10.15517/rbt.v65i3.26809
32. Chiron GR, Sambin A, Krahl AH. Taxonomic notes on *Vanilla odorata*, *Vanilla fimbriata* and related species (Orchidaceae). 2021; 76–115.
33. Bello-Bello JJ, García-García GG, Iglesias-Andreu L. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento in vitro. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2015;38: 165. doi:10.35196/rfm.2015.2.165
34. Villanueva-Viramontes S, Hernandez-Apolinar M, Fernandez-Concha GC, Dorantes-Euan A, Dzib GR, Martinez-castillo J. *Vanilla planifolia* silvestre y sus parientes en la península de Yucatán, México: análisis sistemáticos en ISSR e ITS. *Bot Sci*. 2017;95: 169–187.
35. Villegas-R J. Empleo de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) para la multiplicación in vitro de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) y su caracterización morfogénica. 2021.
36. Benarroch E. L. Los pueblos amazónicos de Ecuador cultivan vainilla como opción de sustento [Internet]. [sinembargo.mx](https://www.sinembargo.mx/11-09-2020/3857114). 2020. Available: <https://www.sinembargo.mx/11-09-2020/3857114>
37. E. Porras R. Estudio de mercado para la comercialización nacional e internacional de vainilla natural (*Vanilla tahitiensis*). 2013.
38. De Guzman CC, Zara RR. Vanilla. *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*. 2012;1: 547–589. doi:10.1533/9780857095671.547
39. Flores O, Zometa JFC, Godoy MEM de, Pastrana MRG, María Teresa González Arnao MGV, Rivera y NA. Germinación in vitro de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. *Revista de investigación y difusión científica agropecuaria*. 2017;21: 51–58.

40. Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias Andreu LG, Noa Carrazana JC, Armas-Silva AA. Técnicas biotecnológicas para la obtención de genotipos de *Vanilla planifolia* Jacks. resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. vanillae. Cuadernos de biodiversidad. 2018;54. doi:10.14198/cdbio.2018.54.02
41. Macas R. Propagación de Vainilla (*Vanilla tahitensis*) en diferentes medios de cultivo in vitro. Universidad de Guayaquil. 2019;11: 1–46. Available: http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng-8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484_SISTEM_PEMBETUNGAN_TERPUSAT_STRATEGI_MELESTARI
42. Lozano M, Menchaca R, Alanís J, Peche J. Cultivo in vitro de yemas axilares de *Vanilla planifolia* con diferentes citocininas. RevBiologico Agropecuaria Tuxpan. 2015;4(6): 1154–1163. Available: https://www.academia.edu/24131704/Cultivo_in_vitro_de_yemas_axilares_de_Vanilla_planifolia_con_diferentes_citocininas
43. Monja-Mio KM, Olvera-Casanova D, Herrera-Alamillo M, Sánchez-Teyer FL, Robert ML. Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora.' 3 Biotech. 2021;11: 1–8. doi:10.1007/s13205-020-02604-8
44. Purohit S, Teixeira da Silva J, Habibi N. Current Approaches for Cheaper and Better Micropropagation Technologies. International Journal of Plant Developmental Biology. 2003;5: 1–36.
45. Lee-espinosa HE, Biolo FC, Laguna-cerda A, El C, Agrí FC, Auto U, et al. In Vitro Clonal Propagation of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). 2008;43: 454–458.
46. Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 2016;52: 154–160. doi:10.1007/s11627-015-9735-4
47. Ramos-Castellá A, Iglesias-Andreu LG, Bello-Bello J, Lee-Espinosa H. Improved propagation of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 2014;50: 576–581. doi:10.1007/s11627-014-9602-8
48. Peixe A, Raposo A, Lourenço R, Cardoso H, Macedo E. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. Sci Hortic. 2007;113: 1–7. doi:10.1016/j.scienta.2007.01.011
49. Kitsaki CK, Zygouraki S, Ziobora M, Kintzios S. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). Plant Cell Rep. 2004;23: 284–290. doi:10.1007/s00299-004-0841-8
50. Abbas B. In vitro seeds germination and plantlet development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae) Sago palm project View project Sago Palm Project View project. ResearchgateNet. 2016;2: 154–159. Available: <https://www.researchgate.net/publication/301782593>

51. Krikorian, A.D., Cronauer SS. Banana In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). Handbook of Plant Cell Culture. 1991. pp. 327–348.
52. Tan TC, Cheng LH, Bhat R, Rusul G, Easa AM. Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. Food Chem. 2014;142: 121–128. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.040
53. Mantena SK, Badduri SR, Siripurapu KB, Unnikrishnan MK. In vitro evaluation of antioxidant properties of *Cocos nucifera*. 2003.
54. Arzeta-ríos AJ, Guerra-ramírez D, Reyes-trejo B. Microwave heating effect on total phenolics and antioxidant activity of green and mature coconut water. 2020;16.
55. Albarracín C. Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal. 2012.
56. Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. Eng Life Sci. 2014;14: 607–621. doi:10.1002/elsc.201300166
57. Sreedhar R V., Venkatachalam L, Neelwarne B. Hyperhydricity-related morphologic and biochemical changes in *Vanilla* (*Vanilla planifolia*). J Plant Growth Regul. 2009;28: 46–57. doi:10.1007/s00344-008-9073-4
58. González KS. Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. 2003.
59. Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA, Bogdanchikova N, Pérez-Sato JA, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2017;129: 195–207. doi:10.1007/s11240-017-1169-8
60. Watteyn C, Dejonghe O, van Hoyweghen K, Azofeifa Bolaños JB, Karremans AP, Vranken L, et al. Exploring farmer preferences towards innovations in the *Vanilla* supply chain. J Clean Prod. 2022;330. doi:10.1016/j.jclepro.2021.129831
61. SEMARNAT. 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. Diario Oficial de la Federación 2010 pp. 1–77. Available: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010
62. Hernández M, Herrera-Cabrera BE, Vega M, Wegier A, Azurdia C, Cerén-López J et al. *Vanilla odorata* (errata version published in 2020). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: In: e.T105878864A173976492. [Internet]. 2020. Available: <https://www.iucnredlist.org/species/105878864/173976492>

63. Martínez-Santos E, Cruz-Cruz CA, Spinoso-Castillo JL, Bello-Bello JJ. In vitro response of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) to PEG-induced osmotic stress. *Sci Rep.* 2021;11: 22611. doi:10.1038/s41598-021-02207-0
64. Szopa A, Kokotkiewicz A, Bednarz M, Jafarnik K, Luczkiewicz M, Ekiert H. Bioreactor type affects the accumulation of phenolic acids and flavonoids in microshoot cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2019;139: 199–206. doi:10.1007/s11240-019-01676-6
65. Romero Zambrano GL. Desarrollo y validación de una tecnología para la micropropagación de *Vanilla odorata* L. 2022.
66. Peña-Ramírez YJ, Juárez-Gómez J, Gómez-López L, Jerónimo-Pérez JL, García-Sheseña I, González-Rodríguez JA, et al. Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: An improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant.* 2010;46: 149–160. doi:10.1007/s11627-010-9280-0
67. Naik SK, Bharathi TU, Barman D, Medhi RP. *Orchid Nutrition.* 2010.

7. ANEXOS

Tabla anexo 1. Listado de materiales

Insumos	
Pinzas anatómicas	Lámpara de alcohol
Bisturís (mango y cuchillas)	Jeringas 5 y 10 ml
Erlenmeyers varios volúmenes	Papel aluminio
Jarras plásticas graduadas	Papel toalla
Probetas de varios volúmenes	Cinta indicadora Autoclave
Barra magnética	Papel servilleta
Espátulas	Parafilm
Fósforera	Rolopac
Fundas plásticas	Mascarillas
Guantes	Mandil
Reactivos	
Medio MS sin vitaminas	6-Bencilaminopurina (BAP)
Sucrosa	Clorhidrato de cisteína
Ácido ascórbico	Etanol 70% y 96%
Agua de coco	Agua destilada
Equipos	
Sistema de Inmersión temporal	Recipientes tipo RITA®
Agitador magnético	Mangueras
Balanza de precisión	Estanterías con lámparas
Destilador de agua	pH-metro
Autoclave semiautomático	Pipetas
Cámara flujo laminar	Refrigeradora
Calefactor	Cuarto de cultivo

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023

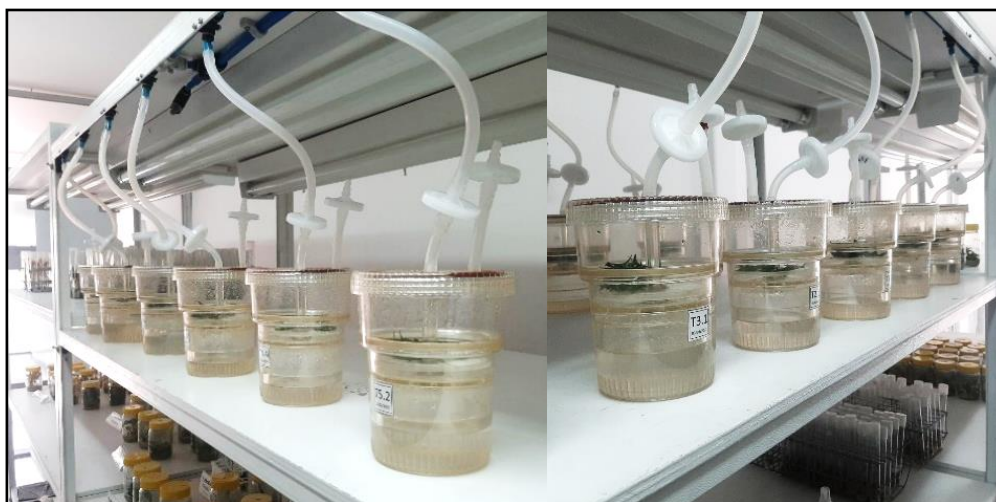


Figura anexo 1. Montaje de Sistema de Inmersión temporal con recipientes tipo RITA® en cuarto de cultivo.

Elaborado por: Bermeo Jorge, 2023