



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología



Desarrollo y validación de una tecnología para la
micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl

Génesis Luisana Romero Zambrano

Tutora: Caroline Nicole Oriana Bacquet Perez, PhD

Cotutor: Luis Eduardo Morillo Velastegui, PhD

Tena, enero 2022

Napo, Ecuador

DERECHO DE AUTOR



Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 10 de septiembre de 2021

Yo, Génesis Luisana Romero Zambrano con documento de identidad N°1311963175 declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería 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.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:

Génesis Luisana Romero Zambrano

CERTIFICADO DEL DIRECTOR



Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: Desarrollo y validación de una tecnología para la micropropagación de *Vanilla odorata*, en la modalidad de tesis, fue realizado por: Génesis Luisana Romero Zambrano, 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 Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 26 de agosto de 2021

Firma:



Escaneó el certificado digitalizado por:
CAROLINE NICOLE
ORIANA BACQUET
PEREZ

Dra. Caroline Nicole Oriana Bacquet Perez
C.I: 1756516041

Firma:



Escaneó el certificado digitalizado por:
LUIS EDUARDO
MORILLO
VELASTEGUI

Dr. Luis Eduardo Morillo Velastegui
C.I: 1708207632

AGRADECIMIENTOS

A la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Regional Amazónica Ikiam y todos quienes hacen parte de ella, por los conocimientos y también las enseñanzas de vida adquiridas. Un agradecimiento especial al profesor Rafael de Almeida por su apoyo y amistad, y al profesor Pablo Cisneros por ser el primero en permitirme conocer el mundo de la investigación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP y su Estación Experimental Santa Catalina.

A la Cooperación Alemana GIZ por su apoyo en el financiamiento del proyecto.

Al Dr. Eduardo Morillo, líder del Departamento Nacional de Biotecnología, y co-tutor de mi tesis, por brindarme la oportunidad y confianza de realizar la investigación y por todas las enseñanzas que me brindó.

Al Ing. Santiago Meneses, técnico del laboratorio de Cultivo de Tejidos, por su valiosa guía a lo largo de toda la investigación. Gracias por ser mi mentor en el cultivo de tejidos vegetales.

A la Sra. Georgina Vera por sus enseñanzas, sus consejos y su alegría.

Al Ing. Paulo Barrera por su valioso aporte en el planteamiento de la investigación. Gracias por su apoyo, confianza y amistad.

A mi tutora y amiga, Caroline Bacquet, a quien admiro profundamente.

A Stalin Bermúdez, por su apoyo incondicional durante toda la carrera.

A los profesionales que contribuyeron con su experiencia para la revisión de la parte estadística, Marcelo Almeida y Willin Alvarez.

DEDICATORIA

A mi madre, Tatiana. Por ser mi pilar, mi guía, mi motor y mi amiga. Gracias por darme la vida, y también valores. Por creer en mí siempre y enseñarme a ser valiente. Cada logro al que llegue en mi vida habrá sido por ti.

A mi abuela Estrella por su amor incondicional y mi abuelo Roque, mi ángel en el cielo, cuyo recuerdo vivirá siempre en mi corazón.

A mi hermana Alejandra y a Coco, quienes hacen mis días más felices.

A mis tíos Sonia y Yandry, por su apoyo y sus consejos siempre. Así también a mis primas Itziar e Irene por alegrar mis días.

Finalmente, esta investigación va dedicada a los agricultores. Mi anhelo es poder generar un impacto positivo en el valioso trabajo que desempeñan en la sociedad.

ÍNDICE GENERAL

DERECHO DE AUTOR	II
CERTIFICADO DEL DIRECTOR	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. <i>Vanilla</i> sp.	1
1.1.2. <i>Vanilla odorata</i>	3
1.1.3. Método tradicional de propagación de vainilla	5
1.1.4. Condiciones de cultivo.....	5
1.1.5. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	6
1.2. Planteamiento del problema.....	6
1.3. Justificación de la investigación	7
1.4. Objetivos de la investigación.....	7
General	7
Específicos	7
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	8
2.1. Localización del estudio.....	8
2.2. Condiciones de cultivo	8
2.3. Metodología	9
2.3.1. Colecta de material	9
2.3.2. Establecimiento en invernadero	9
2.3.3. Fase de establecimiento <i>in vitro</i>	10
2.3.4. Fase de multiplicación	12
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	14
3.1. Fase de establecimiento <i>in vitro</i>	14

3.2. Fase de multiplicación	15
3.2.1. Índice de multiplicación	16
3.2.2. Dimensiones de los brotes	18
3.2.3. Número de raíces	18
3.2.4. Oxidación.....	20
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	21
4.1. Fase de establecimiento <i>in vitro</i>	21
4.2. Fase de multiplicación	22
4.2.1. Índice de multiplicación	22
4.2.2. Dimensiones de los brotes	23
4.2.3. Número de raíces	24
4.2.4. Oxidación.....	25
4.3. Perspectivas.....	25
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	27
5.1. Conclusiones.....	27
5.2. Recomendaciones	27
REFERENCIAS	28
ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág
1. Ubicación del sitio experimental.	8
2. Condiciones de invernadero.	9
3. Características del sitio experimental.	9
4. Promedios y pruebas de significancia para las variables de estudio ante los cuatro medios de cultivo a los 60 días.	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág
1. A) Vainas de vainilla curadas. B) Vainillina.	2
2. <i>Vanilla odorata</i> . A) Hábito. B) Flor. C) Perianto disecado, aplanado. D) Vista lateral del labio y la columna. E) Vistas de columna, lateral y ventral. G) Casquete de antera y polinia.	4
3. <i>V. odorata</i> establecida <i>in vitro</i> y su crecimiento.	14
4. Representación de las variables de estudio ante los dos protocolos de desinfección evaluados.	14
5. <i>Vitro</i> plantas de <i>V. odorata</i> de 2 meses de crecimiento en medio de multiplicación. A) Medio con 3 mg.L ⁻¹ de BAP. B) Medio con 2.15 mg.L ⁻¹ de BAP. C) Medio con 1 mg.L ⁻¹ de BAP. D) Medio control	17
6. Cantidad de brotes viables por explante sembrado, para cada uno de los medios evaluados a los 60 días de cultivo.	17
7. Cantidad de brotes viables por explante sembrado, para cada uno de los medios evaluados a lo largo del tiempo	18
8. Cantidad de raíces por explante sembrado, para cada uno de los medios evaluados a los 60 días de cultivo.	19
9. <i>Vitro</i> plantas de <i>V. odorata</i> de 2 meses de crecimiento en medio de multiplicación. A) Medio con 2.15 mg.L ⁻¹ de BAP. B) Medio con 1 mg.L ⁻¹ de BAP.	19
10. Explantes de <i>V. odorata</i> oxidados tras 60 días en medio de multiplicación control y a 1 mg.L ⁻¹	20

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo de micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl. Esto se realizó con el fin de brindar una alternativa al método actual de propagación por esquejes, cuya eficiencia no es óptima. Se utilizaron yemas axilares de plantas madre de una zona de producción en Tena. Para la primera fase de establecimiento *in vitro* se evaluaron dos protocolos de desinfección (PD1 y PD2) reportados para la vainilla comercial *V. planifolia*. Para la segunda fase de multiplicación de las *in vitro* plantas establecidas, se evaluaron cuatro medios de cultivo con diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) (0, 1, 2.15 y 3 mg.L⁻¹). De la primera fase del estudio, se determinó que el protocolo de desinfección PD2 fue el más eficiente, obteniendo una menor contaminación (40%) y una sobrevivencia cercana al 60%. En cuanto a la fase de multiplicación, se determinó que los medios de cultivo con 2.15 y 3 mg.L⁻¹ de BAP favorecieron una mayor brotación, permitiendo alcanzar índices de multiplicación de 4 y 3.5 respectivamente a los 60 días de evaluación. Los resultados obtenidos al momento, permitieron establecer y multiplicar *in vitro* explantes de *V. odorata* en medios de cultivo semisólidos.

Palabras clave: Introducción, multiplicación, *in vitro*, vainilla amazónica.

ABSTRACT

The objective of this research was to establish a micropropagation protocol for *Vanilla odorata* C. Presl in semi-solid culture media. This was done in order to provide an alternative to the current method of propagation by cuttings, whose efficiency is not optimal. Axillary buds of mother plants from a production area in Tena were used. For the first phase of *in vitro* establishment, two disinfection protocols (PD1 and PD2) reported for the commercial vanilla *V. planifolia* were evaluated. For the second phase of multiplication of the established *in vitro* plants, four culture media with different concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) (0, 1, 2.15 and 3 mg.L⁻¹) were evaluated. From the first phase of the study, it was determined that the PD2 disinfection protocol was the most efficient, obtaining less contamination (40%) and a survival close to 60%. Regarding the multiplication phase, it was determined that the culture media with 2.15 and 3 mg. L⁻¹ of BAP favored a greater sprouting, allowing to reach multiplication indices of 4 and 3.5 respectively at 60 days of evaluation. The results obtained at the moment, allowed to establish and multiply *in vitro* explants of *V. odorata* in semisolid culture media.

Keywords: Introduction, multiplication, *in vitro*, Amazon vanilla

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Vanilla* sp.

Vanilla Plumier ex Miller es el grupo más documentado de orquídeas [1]. Este género de orquídeas hemiepífitas [2] apareció hace aproximadamente 34 millones de años en Suramérica [3]. Comprende casi 140 especies [1], las cuales se encuentran en su mayoría en América tropical a pesar de que el género se distribuye en todos los continentes excepto Australia [4]. Los principales productores de vainilla actualmente son Madagascar, Tahití, Indonesia y México [5].

1.1.1.1. Usos

A partir de las vainas fermentadas de la planta (Figura 1A) se obtiene una de las especias más utilizadas en todo tipo de recetas y fragancias a nivel global, siendo su sabor el más popular del mundo [6]. Sus características organolépticas son atribuidas a alrededor de 200 compuestos químicos [7], de los cuales el más conocido es la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (Figura 1B) [8]. Existen cuatro tipos de productos obtenidos a partir de las vainas. El primero y más usado en los hogares es el extracto de vainilla. Este consiste en una solución en alcohol etílico de los componentes presentes en las vainas, en donde el solvente representa alrededor del 90% de la composición. El segundo producto es la oleorresina de vainilla, un líquido viscoso y oscuro mucho más concentrado que el extracto común. Aún más concentrado es el aceite esencial de vainilla, que al ser el producto más puro es también el más costoso. Finalmente se encuentra el azúcar vainillado, azúcar granulado mezclado con vainas o extracto de vainilla [9]. Los productos mencionados son utilizados en la industria de la perfumería, como saborizante de helados, chocolates y demás postres, refrescos y bebidas alcohólicas [6].

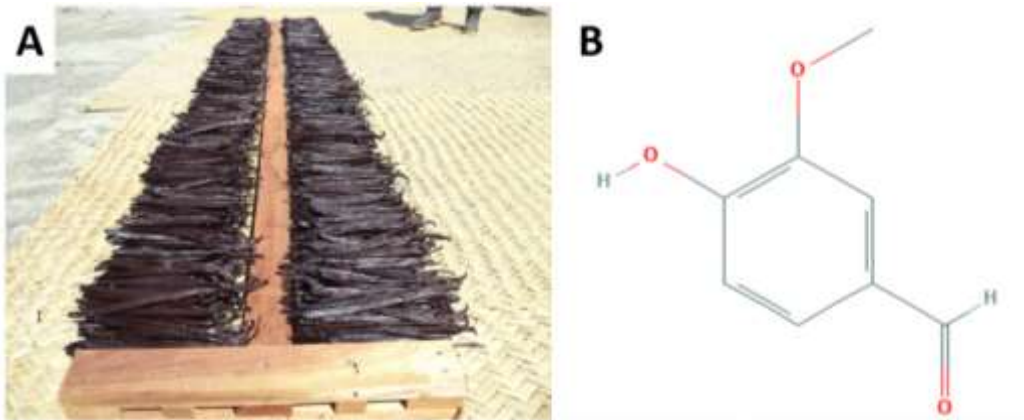


Figura 1.- A) Vainas de vainilla curadas. Fuente: [10]. B) Vainillina. Fuente: [11].

1.1.1.2. Importancia económica

Actualmente existe gran interés económico por las vainas de vainilla debido a su alto valor y demanda en el mercado [12]. De hecho, cada año se consumen 2000 toneladas de las mismas a nivel mundial [9]. Los principales consumidores globales son Alemania, Francia y Estados Unidos, quienes en conjunto abarcan el 80% de las importaciones [9]. Durante los últimos 10 años Madagascar estuvo produciendo del 50 al 80% de la demanda total, lo equivalente a \$250.5 millones [13,14]. Esta centralización en la producción por parte de un país implica fluctuaciones significativas en el precio de la misma lo largo del tiempo, especialmente en períodos en los que dicho territorio sufre desastres naturales [14]. Esto se evidenció en el año 2016 cuando, tras los efectos de un ciclón que azotó Madagascar, el precio del kg se disparó a \$600 y superó el precio de la plata [15]. Actualmente la vainilla está posicionada como la segunda especia más costosa después del azafrán [16], lo cual demuestra el alto potencial económico que implica su producción.

En Ecuador se produce vainilla por parte de la empresa Vainuz Vainillas en Santo Domingo de los Tsáchilas y la Asociación Kallari en la Amazonía [17]. La empresa Vainuz Vainillas empezó su producción en 2007, con 20 kg de vainas [18]. Actualmente registra una exportación anual de 300 kg a más de 10 países [18]. En el estudio financiero realizado por Rosenfeld-Molina (2017) de un proyecto de producción y exportación al mercado alemán por parte de la empresa, se encontró que este es viable y económicamente rentable. Por la alta demanda del producto dentro del mercado alemán y el déficit estimado en el cumplimiento de la misma,

se calcula que este tipo de proyectos podría contar con un periodo de recuperación de la inversión de 2 años y una Tasa Interna de Retorno del 77.13% [19]. En cuanto a la Amazonía, la vainilla se proyecta como una alternativa de sustento para los pueblos Kichwas. De hecho, actualmente se la conoce como el nuevo “oro verde” de la Amazonía [20]. Cada vez más agricultores están optando por incluir este rubro como parte de sus chagras. En Tena ya se han identificado 57 productores vainilleros como parte de la Asociación Kallari [21]. Aunque la vainilla aún representa únicamente el 10% de los ingresos de la Asociación, ya se exporta vainas secas a un precio de \$500 por kg [20]. Es así que a pesar del reciente inicio en el cultivo de vainilla en el país, este ya está generando desarrollo económico.

1.1.1.3. Importancia socioambiental

Los primeros registros de uso de la vainilla se extienden al año 1427 por parte de los aztecas. En esa época se la utilizaba en preparaciones de chocolate y para fines medicinales [22]. Posteriormente fue cultivada por la civilización totonaca, para quienes no solo se convirtió en su principal cultivo comercial si no en un agente de prosperidad [23]. Para esta civilización, la vainilla se trataba de una planta sagrada y objeto de reverencioso culto [24]. Se conoce también su consumo por parte de la cultura maya. Sus usos en el periodo prehispánico, además de saborizante, incluyen medicina diurética, rituales, afrodisiaco, estimulador de apetito y facilitador de digestión [25]. En los pueblos Kichwa de la Amazonía ecuatoriana, donde apenas hace unas décadas se le empezó a dar uso, las mujeres son las encargadas de realizar la polinización manual de la planta. Es así que el cultivo representa una oportunidad de empoderar a la mujer [20]. Además, el hábito de crecimiento característico de la vainilla implica que esta se desarrolle en asociación a árboles autóctonos [20]. Por lo tanto, su cultivo no implica deforestación y es apto para ser acoplado en sistemas agroforestales como lo es la chagra. Este último es un sistema de cultivo ancestral Kichwa que tiene incidencias en la recuperación cultural y del suelo [26].

1.1.2. *Vanilla odorata*

Vanilla odorata C. Presl. es una especie silvestre de vainilla. Se encuentra altamente distribuida a lo largo de América tropical continental [2]. Se la ha registrado en Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Nicaragua, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Guyana,

Honduras, México, Panamá, Perú, Surinam y Venezuela [27]. En Ecuador, se la ha reportado en la Amazonía, donde está siendo cultivada como parte de las chagras Kichwa [20]. *V. odorata* consta como especie en peligro de extinción dentro de la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN [28].

1.1.2.1. Descripción botánica

Sus hojas se caracterizan por ser largas, acuminadas y estrechamente lanceoladas [2] aunque hay algunas poblaciones cuyas hojas son un poco más cortas y anchas [1]. En cuanto a la flor, los pétalos y sépalos van de color verde a amarillento, el labelo blanco amarillento, la garganta carece de tonos amarillos y los márgenes son lacerado - fimbriados [1]. Sus frutos son sincárpicos, en forma de cápsula [29] y fuertemente fragantes [2]. En la Figura 2 se observa la morfología de las diferentes partes de la planta.

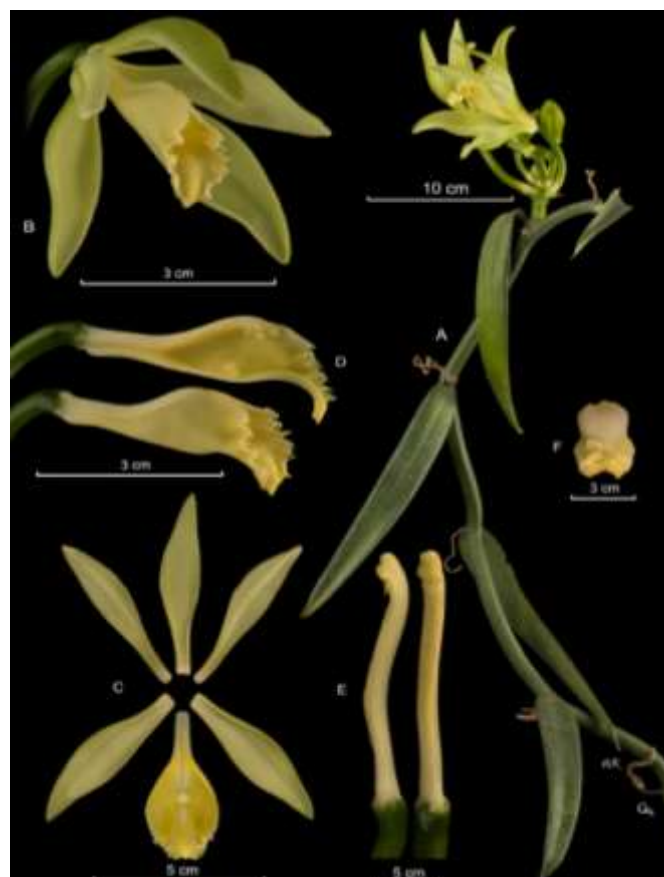


Figura 2.- *Vanilla odorata*. A) Hábito. B) Flor. C) Perianto disecado, aplanado. D) Vista lateral del labio y la columna. E) Vistas de columna, lateral y ventral. G) Casquete de antera y polinia. Fuente: [1]

1.1.2.2. Importancia

En México *V. odorata* se cultiva ocasionalmente como fuente de fragancia por el fuerte aroma de sus frutos [2]. Aun así, es una de las especies que ha recibido menos atención en cuanto a su potencial de cultivo y comercialización, dentro de la extensa variedad de especies de vainilla [30]. Se sabe que el mercado de la vainilla se centra en la especie comercial *V. planifolia* [31]. Sin embargo, investigaciones relacionadas a especies silvestres como *V. odorata* son trascendentales para la diversificación de dicho mercado [30]. Sus características genéticas la convierten en una de las especies del género que tolera rangos más extensos de altitud y temperatura [31]. Además, cuenta con características organolépticas prometedoras [30]. Como en todo producto, el contar con destacadas características organolépticas supone una combinación de color, sabor, textura y aroma agradable al consumidor [32]. Es así que esta especie cuenta con un potencial prometedor en la industria de la vainilla.

1.1.3. Método tradicional de propagación de vainilla

Debido a la escasa o nula capacidad de germinación de las semillas en la propagación sexual, la técnica de multiplicación más usada es la propagación asexual [33]. Esta consiste en la reproducción por esquejes obtenidos a partir de plantas madre. Dicho método, además de ser laborioso, conlleva un alto riesgo de contagio de enfermedades y debilitamiento de la planta madre [34]. Estos problemas implican una disminución en la producción de plantas [8]. De esta manera, el método tradicional no resuelve la gran demanda industrial que existe actualmente para la vainilla [35–37].

1.1.4. Condiciones de cultivo

La planta crece en clima tropical cálido húmedo [38]. Las condiciones óptimas varían de una especie a otra. Para el caso particular de *V. odorata*, se la ha encontrado en un rango de altitud desde 0 hasta 2065 msnm y temperatura promedio anual de 16 a 33°C [31].

Los cultivos de vainilla son altamente susceptibles a patógenos como *Fusarium oxysporum*, debido principalmente a los bajos niveles de variación genética ocasionados por su propagación vegetativa [39]. Consecuentemente, es necesario llevar a cabo un adecuado control fitosanitario como parte de las condiciones de cultivo. Los manuales de producción

recomiendan utilizar fungicidas como Carbendazim o Caldo Bordelés para prevenir y tratar este patógeno [38,40].

1.1.5. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* se refiere al cultivo de células vegetales, tejidos, órganos y plántulas en un medio artificial en condiciones ambientales asépticas y controladas [41]. Es así que permite la producción de plantas libres de enfermedades masivamente, en corto tiempo y en cualquier época del año [42]. De esta forma, se presenta como una alternativa para conseguir resultados rápidos y eficientes en la propagación de diversas especies de plantas [43]. Adicionalmente representa una alternativa de conservación importante al requerir cantidades limitadas de tejido como fuente de explante [8].

1.1.5.1. Propagación de vainilla por técnicas *in vitro*

El establecimiento y propagación *in vitro* de vainilla es necesaria para la producción a gran escala y la conservación de germoplasma [8]. Se ha reportado múltiples protocolos que permiten la micropropagación de *V. planifolia* por cultivos semisólidos [34,37,44–47], en donde el principal regulador de crecimiento utilizado ha sido la citoquinina Bencilaminopurina (BAP). Este tipo de sistemas ha mostrado resultados favorables. Lee-Espinosa y colaboradores (2008) obtuvieron hasta 18.5 brotes por yema axilar tras 12 semanas en medio de multiplicación. Con su metodología de micropropagación, estimaron que con un banco de *in vitro* plantas debidamente establecido es posible producir de 100'000 a 150'000 plántulas al año por cada explante de planta madre [46]. Por su parte, el protocolo reportado por Ramos-Castella et. al (2014) fue capaz de generar 5.80 brotes por explante tras 4 semanas en medio de multiplicación [47].

1.2. Planteamiento del problema

Hasta la fecha no existe ningún reporte publicado sobre un protocolo validado para la micropopagación de *V. odorata*. Esto se debe a la centralización que existe en el mercado actual por especies comerciales como *V. planifolia*. Es así que la carencia en el desarrollo de tecnologías para *V. odorata* no solo representa un vacío en el conocimiento, si no que afecta a la diversificación del mercado de la vainilla. Ante la falta de un método alternativo de propagación, la multiplicación de esta especie se ve restringida al método tradicional por corte

de esquejes. El mismo, al presentar inconvenientes en cuanto a la calidad fitosanitaria de las plantas y su potencial productivo, afecta directamente al rendimiento de los cultivos de vainilla en las chagras de la Amazonía ecuatoriana.

1.3. Justificación de la investigación

Es urgente y necesario desarrollar herramientas que permitan a los productores sostener la creciente demanda de la vainilla en el mercado regional y global. Los beneficios que presenta el cultivo *in vitro* posibilitan esto, generando cultivos menos laboriosos y a la vez más sustentables y productivos. Habiendo sido exitoso en otras especies del mismo género, el cultivo *in vitro* se presenta como una alternativa viable para la propagación de *V. odorata*.

La presente investigación es pionera en la generación de información hasta ahora ausente en la Amazonía ecuatoriana. Además, el trabajo se realizó para fomentar la cadena de valor de la vainilla en la Amazonía. Esto es, mediante el establecimiento de tecnologías que posibiliten producir mayor cantidad de plantas de calidad uniforme a escala comercial, lo cual incide directamente en la economía de este sector agrícola.

1.4. Objetivos de la investigación

General

Establecer un protocolo de micropropagación de *Vanilla odorata* C. Presl.

Específicos

- Determinar un protocolo de desinfección eficiente para el establecimiento *in vitro* de *V. odorata*.
- Evaluar el efecto de cuatro medios de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *V. odorata*.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización del estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). La localización del sitio se especifica en la Tabla 1.

Tabla 1. Ubicación del sitio experimental

Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Sitio	Estación Experimental Santa Catalina (EESC)
Altitud	3100 msnm
Latitud	0° 22' 8" S
Longitud	78° 33' 24" O

Fuente: Estación Meteorológica Izobamba, ubicada en la EESC-ENIAP

2.2. Condiciones de cultivo

Las condiciones del invernadero en el que se establecieron las plantas se detallan en la Tabla 2. Las características del laboratorio en el que se desarrollaron los estudios experimentales de establecimiento y multiplicación del material vegetal se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 2. Condiciones de invernadero

Temperatura	
Promedio	22±2°C
Máxima	14±1°C
Mínima	23±1°C
Humedad relativa	
Promedio	40%
Máxima	30%
Mínima	60%

Tabla 3. Características del sitio experimental

Temperatura promedio	21±3°C
Fotoperiodo	16/8 horas luz
Intensidad de luz	65-70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Humedad relativa	20%

2.3. Metodología

Los materiales utilizados para el desarrollo de la metodología se enlistan en el Anexo 1.

2.3.1. Colecta de material

Se colectaron plantas de *V. odorata* previamente identificadas por caracterización morfológica. Se seleccionó plantas de hasta dos meses de edad en el vivero del señor Francisco Cerda ubicado en la provincia de Napo, cantón Tena (1°0'49"S, 77°50'5"O) (Anexo 2). En la misma locación se colectó sustrato para el trasplante.

2.3.2. Establecimiento en invernadero

Un día después de la colecta, las plantas se establecieron en el invernadero del INIAP localizado en la Estación Experimental Santa Catalina, provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Cutuglahua. Se las trasplantó a macetas individuales, adicionando el sustrato recolectado en Tena. El mismo, consistió en un suelo franco arenoso de pH 5.46 compuesto en un 71% de arena, 22% de limo y 7% de arcilla [48]. Se limpiaron las hojas y tallos con una solución jabonosa compuesta de agua corriente y jabón neutro. Se aplicó fertilizante (MARCHFOL 25.16.12) 1 g.L⁻¹ a nivel de sustrato y fungicida (Carbendazim) 0.5% (v/v) de manera foliar. Las plantas se mantuvieron durante dos semanas para aclimatación en invernadero antes del inicio de los experimentos (Anexo 3), con las condiciones detalladas en la Tabla 2.

2.3.3. Fase de establecimiento *in vitro*

2.3.3.1. Diseño experimental y procesamiento estadístico

La unidad experimental estuvo conformada por un tubo de ensayo con 5 mL de medio de cultivo y un explante. Los explantes consistieron en yemas axilares de hasta 5 mm de diámetro y 20 mm de largo provenientes del primero al cuarto nudo de plantas establecidas en invernadero (Anexos 4A y 4B).

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) y se efectuaron 30 observaciones por cada tratamiento. Los datos se procesaron estadísticamente con el software R versión 4.1.0 [49]. Se utilizó la prueba exacta de Fisher con tabla de 2x2. El nivel de significancia estadística alfa utilizado fue de 0.05.

2.3.3.2. Tratamientos

Se evaluaron dos protocolos de desinfección:

- Protocolo de desinfección 1 (PD1). Modificado de (Lee-Espinosa et al., 2008) [46]. Los explantes se cepillaron en una solución jabonosa compuesta de agua corriente y jabón neutro, y se enjuagaron en agua corriente. Se escindieron raíces aéreas y hojas y se dividió el explante por cada yema. Las yemas se llevaron a agitación en 100 mL de agua destilada con 1 gota de Tween 20 por 20 minutos. Para el enjuague, se las agitó en agua destilada por 10 minutos. Posteriormente se agitó en fungicida (Carbendazim Carbenpac®500 al 0.5 % y Sulfato de cobre pentahidratado al 0.5%) durante 1 hora. En cámara de flujo se expuso a los explantes a etanol 70% por 30 segundos seguido de concentraciones sucesivas de hipoclorito de sodio: 1% + 5 gotas de Tween 20 por 20 minutos, 0.5% por 10 minutos y 0.1 % por 2 minutos respectivamente. Finalmente se llevó a cabo 4 enjuagues con agua destilada estéril que contenía 150 mg.L⁻¹ de ácido cítrico y 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico.
- Protocolo de desinfección 2 (PD2). Modificado de (Sharma & Bora, 2017) [50]. Los explantes se cepillaron en una solución jabonosa compuesta de agua corriente y jabón neutro, y se enjuagaron en agua corriente. Se escindieron raíces aéreas y hojas y se dividió el explante por cada yema. Posteriormente se agitó en fungicida (Carbendazim Carbenpac®500 al 0.5 % y Sulfato de cobre pentahidratado al 0.5%) durante 1 hora. En

cámara de flujo los explantes se expusieron a etanol 70% por 30 segundos seguido de concentraciones sucesivas de hipoclorito de sodio: 3.8% + 5 gotas de Tween 20 por 1 hora y 1.925% por 30 minutos respectivamente. Finalmente se llevó a cabo 4 enjuagues con agua destilada estéril que contenía 150 mg.L⁻¹ de ácido cítrico y 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico.

Los explantes provenientes de ambos protocolos de desinfección se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS) con 2.15 mg.L⁻¹ de BAP, 35 mg.L⁻¹ de clorhidrato de L-cisteína, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 2 g.L⁻¹ de carbón activado, 2.2 g.L⁻¹ de Gelrite™ y pH ajustado de 5.8. Modificado de [47]. Las unidades experimentales se mantuvieron en el cuarto de cultivo con las condiciones detalladas en la Tabla 3 durante 60 días. En el día 30 se llevó a cabo un subcultivo en el mismo medio descrito anteriormente.

El proceso de establecimiento *in vitro* se encuentra esquematizado en el Anexo 5.

2.3.3.3. Variables evaluadas

A los 30 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables:

- Porcentaje de contaminación con hongos (%): se registró visualmente la presencia o ausencia de hongos. Se realizó una relación porcentual entre el número de explantes sembrados y el número de explantes contaminados con hongos.
- Porcentaje de contaminación con bacterias (%): se registró visualmente la presencia o ausencia de bacterias. Se realizó una relación porcentual entre el número de explantes sembrados y el número de explantes contaminados con bacterias.
- Porcentaje de contaminación mixta (%): se registró visualmente la presencia o ausencia de hongos y bacterias. Se realizó una relación porcentual entre el número de explantes sembrados y el número de explantes contaminados con hongos y bacterias.
- Porcentaje de oxidación (%): se registró visualmente la cantidad de explantes oxidados por unidad experimental. Se realizó una relación porcentual entre el número de explantes sembrados y el número de explantes oxidados.
- Tasa total de sobrevivencia: Se realizó una relación entre el número de explantes sembrados y el número de explantes sin contaminación ni oxidación.

- Porcentaje de brotación (%): se registró visualmente la cantidad de yemas brotadas por unidad experimental. Se realizó una relación porcentual entre el número de explantes sembrados y el número de explantes brotados.
- Porcentaje de enraizamiento (%): se registró visualmente la cantidad de raíces por unidad experimental. Se realizó una relación porcentual entre el número de explantes sembrados y el número de explantes enraizados.

2.3.4. Fase de multiplicación

2.3.4.1. Diseño experimental y procesamiento estadístico

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de vidrio con 15 mL de medio de cultivo y 1 explante. Los explantes consistieron en yemas axilares de hasta 5 mm de diámetro y 15 mm de largo provenientes de plantas establecidas *in vitro* en la fase anterior (Anexo 4C).

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) y se efectuaron 10 observaciones por cada tratamiento. Los datos se procesaron estadísticamente con el software R versión 4.1.0 [49]. La normalidad y la homogeneidad de la varianza se evaluaron mediante las pruebas de Shapiro y Levene respectivamente. Para los datos en escala de razón se realizó un test de Kruskal Wallis seguido de un Test de Mann-Whitney entre cada par de grupos con corrección de significancia. Para los datos en escala ordinal se realizó una prueba exacta de Fisher. El nivel de significancia estadística alfa utilizado fue de 0.05.

2.3.4.2. Tratamientos

Se evaluaron cuatro medios de cultivo:

- Medio control: Modificado de (Ramos-Castellá, Iglesias-Andreu, Bello-Bello & Lee-Espinosa, 2014) [47]. Medio MS suplementado con 150 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 35 mg.L⁻¹ de clorhidrato de cisteína, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 100 mL.L⁻¹ de agua de coco, 2.2 g.L⁻¹ de Gelrite™ y pH ajustado a 5.8.
- Medio 1: Modificado de (Ramos-Castellá, Iglesias-Andreu, Bello-Bello & Lee-Espinosa, 2014) [47]. Medio MS suplementado con 1 mg.L⁻¹ de BAP, 150 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 35 mg.L⁻¹ de clorhidrato de cisteína, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 100 mL.L⁻¹ de agua de coco, 2.2 g.L⁻¹ de Gelrite™ y pH ajustado a 5.8.

- Medio 2: Reportado en (Ramos-Castellá, Iglesias-Andreu, Bello-Bello & Lee-Espinosa, 2014) [47]. Medio MS suplementado con 2.15 mg.L⁻¹ de BAP, 150 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 35 mg.L⁻¹ de clorhidrato de cisteína, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 100 mL.L⁻¹ de agua de coco, 2.2 g.L⁻¹ de Gelrite™ y pH ajustado a 5.8.
- Medio 3: Modificado de (Ramos-Castellá, Iglesias-Andreu, Bello-Bello & Lee-Espinosa, 2014) [47]. Medio MS suplementado con 3 mg.L⁻¹ de BAP, 150 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 35 mg.L⁻¹ de clorhidrato de cisteína, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 100 mL.L⁻¹ de agua de coco, 2.2 g.L⁻¹ de Gelrite™ y pH ajustado a 5.8.

Las unidades experimentales se mantuvieron en el cuarto de cultivo (Anexo 6) con las condiciones detalladas en la Tabla 3 durante 60 días. En el día 30 se llevó a cabo un subcultivo en medio sin agua de coco bajo las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento detalladas anteriormente.

2.3.4.3. Variables evaluadas

A los 30 y 60 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables:

- 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 producidos por cada explante sembrado.
- Número de raíces: Se contabilizó las raíces por cada unidad experimental.
- Longitud de brotes (cm): Se midieron los brotes desde la base hasta la punta.
- Ancho de brotes (cm): Se midió el diámetro de los brotes en su región más ancha.
- Porcentaje de oxidación (%): se registró visualmente la cantidad de explantes oxidados por unidad experimental. Se realizó una relación porcentual entre el número de explantes sembrados y el número de explantes oxidados.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Fase de establecimiento *in vitro*

Los protocolos evaluados permitieron establecer *in vitro* plantas de *V. odorata* (Figura 3).



Figura 3.- *V. odorata* establecida *in vitro* y su crecimiento

En la Figura 4 y el Anexo 7 se detalla el desempeño de los dos protocolos de desinfección en las variables evaluadas.

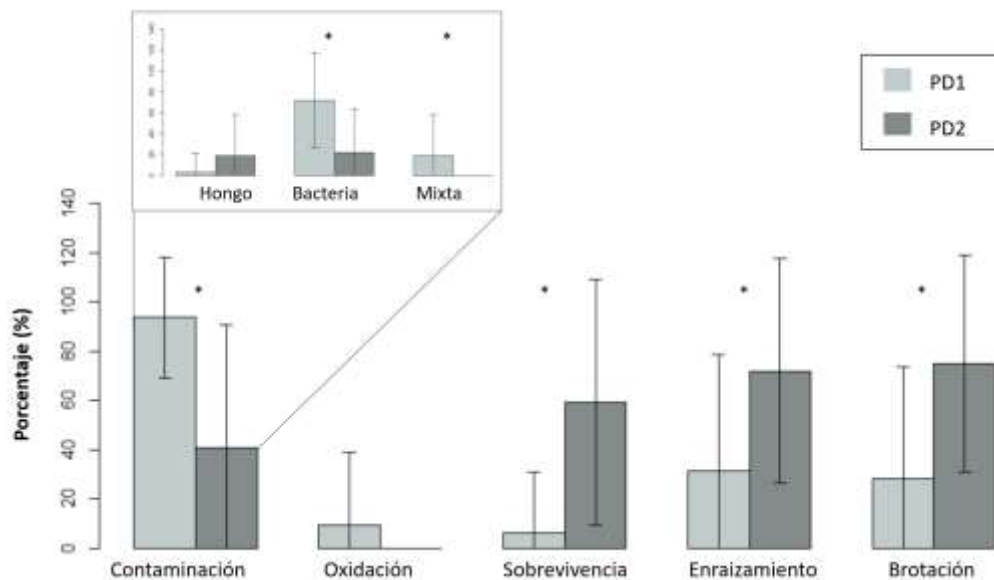


Figura 4.- Representación de las variables de estudio ante los dos protocolos de desinfección evaluados. Los asteriscos (*) indican las variables en las que se encontró diferencias estadísticamente significativas entre protocolos ($P < 0.05$).

Se detectó contaminación microbiana mediante síntomas visibles ocasionados en el medio de cultivo (Anexo 8). En cuanto a la contaminación por hongos, fue identificada por la presencia de colonias de aspecto algodonoso de colores blanco, verde, anaranjado y negro. Esta fue registrada en un 3.12% de los explantes desinfectados con PD1 y un 18.75% de aquellos tratados con PD2, no presentándose diferencias estadísticamente significativas entre sí. Por su parte, la contaminación por bacterias fue registrada a través de colonias traslúcidas u opacas de color blanco, amarillo y rojo. Esta se presentó en 71.88% y 21.88% de los explantes tratados con PD1 y PD2, respectivamente. En esta variable se encontró diferencias estadísticamente significativas entre protocolos, indicando que PD2 fue más efectivo en evitar la contaminación bacteriana. De manera similar, PD2 minimizó la contaminación mixta. La misma se evidenció en un 18.75% para PD1 mientras que no se la encontró en PD2. En definitiva, de manera general PD2 se desempeñó mejor evitando la contaminación. Mientras que el 93.75% de los explantes tratados con PD1 presentaron algún tipo de contaminación, para PD2 el porcentaje de contaminación total encontrado fue 40.62%. Por otro lado, los protocolos no mostraron diferencias significativas entre sí en cuanto a oxidación. Esta característica fue encontrada en un 9.38% de los explantes tratados con PD1 y en un 0% de aquellos tratados con PD2.

PD2 también posibilitó más sobrevivencia. De hecho, con este protocolo se obtuvo una sobrevivencia de 59.38% mientras que con PD1 fue de 6.25%. Lo mismo ocurrió con el enraizamiento y la brotación, para los cuales se tuvo valores de 71.88% y 75% con PD2. Dichos porcentajes resultaron significativamente mayores a los obtenidos con PD1 para las mismas variables, siendo estos de 31.25% y 28.12% respectivamente.

3.2. Fase de multiplicación

La metodología aplicada permitió multiplicar explantes de *V. odorata* (Anexos 9 y 10). La Tabla 4 describe el desempeño de los 4 medios de cultivo para las variables evaluadas.

Tabla 4.- Promedios y pruebas de significancia para las variables de estudio ante los cuatro medios de cultivo a los 60 días.

Medio	Índice de multiplicación	Longitud de brote (cm)	Ancho de brote (cm)	Número de raíces	Oxidación (%)
	(1)*	(1)	(1)	(1)*	(2)*
Control	0,73 b	0,91	0,27	1,45 a	45,45 a
1 mg.L ⁻¹ BAP	2,00 b	1,04	0,32	0,82 ab	27,27 ab
2 mg.L ⁻¹ BAP	4,00 a	0,86	0,31	0,55 bc	0,00 b
3 mg.L ⁻¹ BAP	3,55 a	0,81	0,25	0,36 c	0,00 b

(1) Test de Kruskal – Wallis

(2) Test de Fisher

Los asteriscos (*) indican las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Las letras indican cuáles son los tratamientos entre los cuales se encontró diferencias.

3.2.1. Índice de multiplicación

Se demostró que la producción de brotes tuvo diferencias entre los medios de cultivo evaluados (Figura 5). Los medios con 2.15 y 3 mg.L⁻¹ de BAP permitieron la mayor producción de brotes y no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. En los mismos se encontró índices de multiplicación de 4 y 3.55 respectivamente a los 60 días de cultivo. En contraste, ambos se diferencian estadísticamente a los medios control y con 1 mg.L⁻¹ (Figura 6). Estos últimos presentan índices de multiplicación de 0.73 y 2, respectivamente. De esta manera, la concentración de BAP en el medio y la producción de brotes se relacionan de manera directamente proporcional. Esta relación se mantiene a lo largo del período de evaluación (Figura 7). De hecho, tras finalizar los 60 días de evaluación la tendencia de aceleración en la producción de brotes se mantuvo y en el día 75 se observó que los explantes del medio con 2.15 mg.L⁻¹ de BAP alcanzaron un índice de 7.8. Sin embargo, es importante notar que dicha aceleración en la tendencia se tuvo únicamente a partir de los 30 días en todos los medios de cultivo. Este suceso coincide con el subcultivo realizado en medio sin agua de coco.

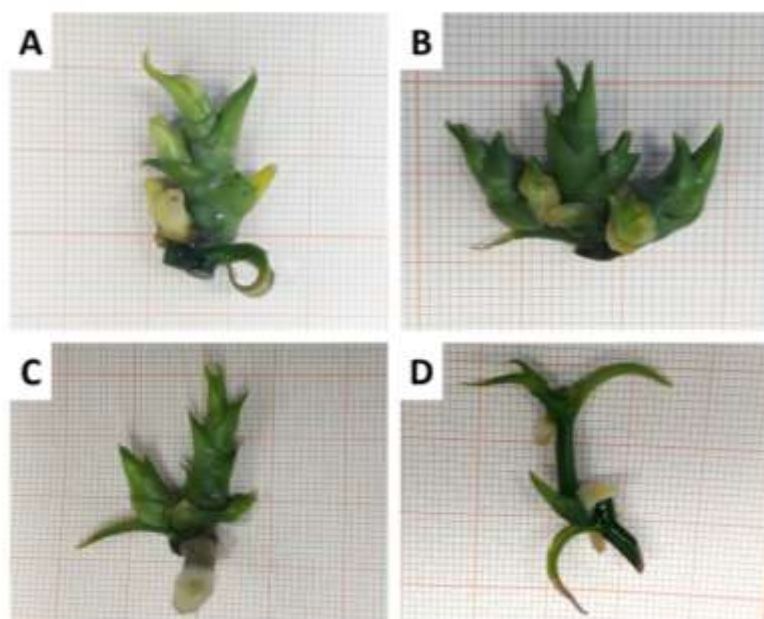


Figura 5.- *Vitro* plantas de *V. odorata* de 2 meses de crecimiento en medio de multiplicación. A) Medio con 3 mg.L⁻¹ de BAP. B) Medio con 2,15 mg.L⁻¹ de BAP. C) Medio con 1 mg.L⁻¹ de BAP. D) Medio sin hormonas

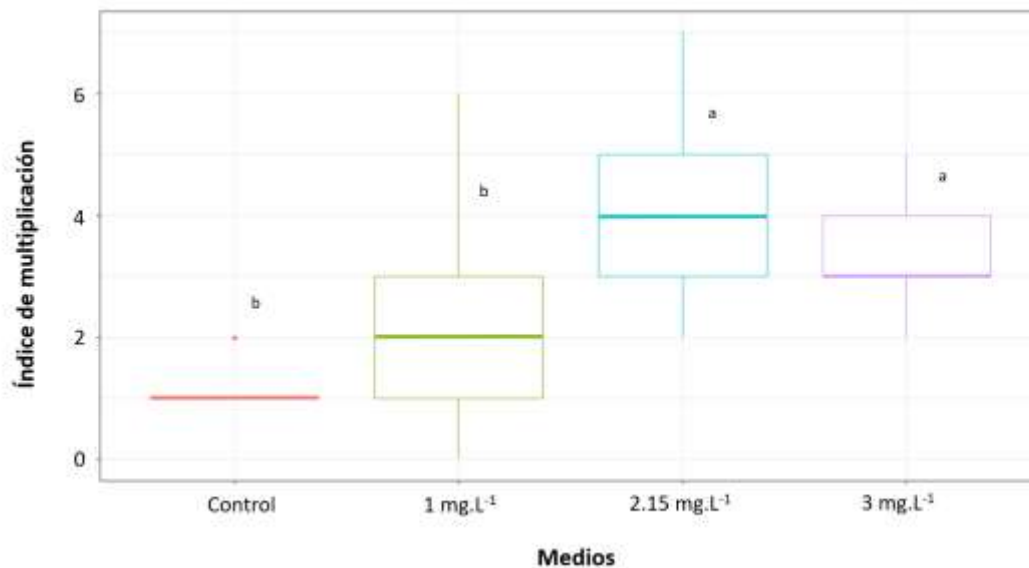


Figura 6.- Índice de multiplicación para cada uno de los medios evaluados a los 60 días de cultivo. Las letras indican cuáles son los tratamientos entre los cuales se encontró diferencias estadísticamente significativas.

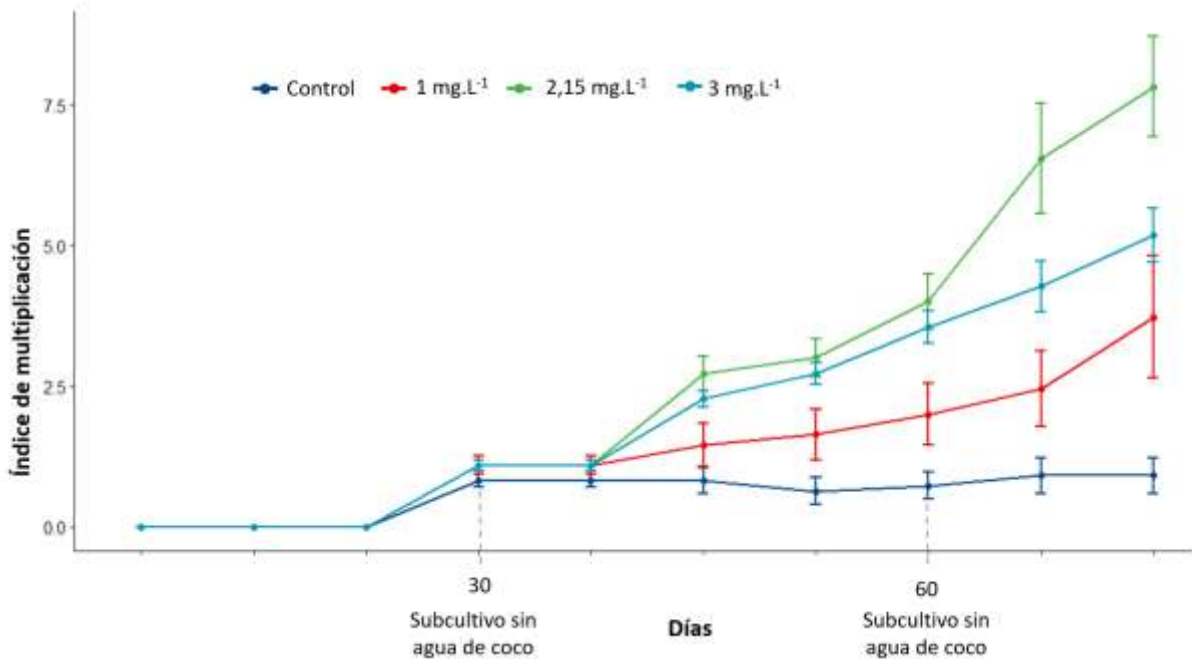


Figura 7.- Índice de multiplicación para cada uno de los tratamientos evaluados a lo largo del tiempo.

3.2.2. Dimensiones de los brotes

La concentración de regulador de crecimiento en el medio no afectó a las dimensiones (longitud y ancho) de los brotes producidos. En estas variables, ninguno de los medios presentó diferencias estadísticamente significativas entre sí (Tabla 4). En promedio, los brotes producidos a los 60 días de cultivo tuvieron dimensiones de 0,91 cm de longitud y 0,29 cm de ancho.

3.2.3. Número de raíces

El medio con la concentración más alta de BAP y aquel sin presencia de la misma tienen diferencias significativas entre sí en cuanto a la producción de raíces (Figura 8). Es decir, mientras que las *vitro* plantas que crecieron en medio con 3 mg.L⁻¹ de BAP generaron en promedio 0.36 raíces, aquellas del medio control produjeron 1.45. En la Figura 9A se muestra una *vitro* planta sembrada en medio con 2,15 mg.L⁻¹ de BAP, la cual no cuenta con raíces. Esto contrasta a lo observado en la Figura 9B, con una *vitro* planta sembrada en medio con una menor concentración de BAP (1 mg.L⁻¹) y que presenta una pronunciada raíz. Por lo tanto, la

relación entre la concentración de BAP y la presencia de raíces es inversamente proporcional, contrario a lo obtenido con la producción de brotes.

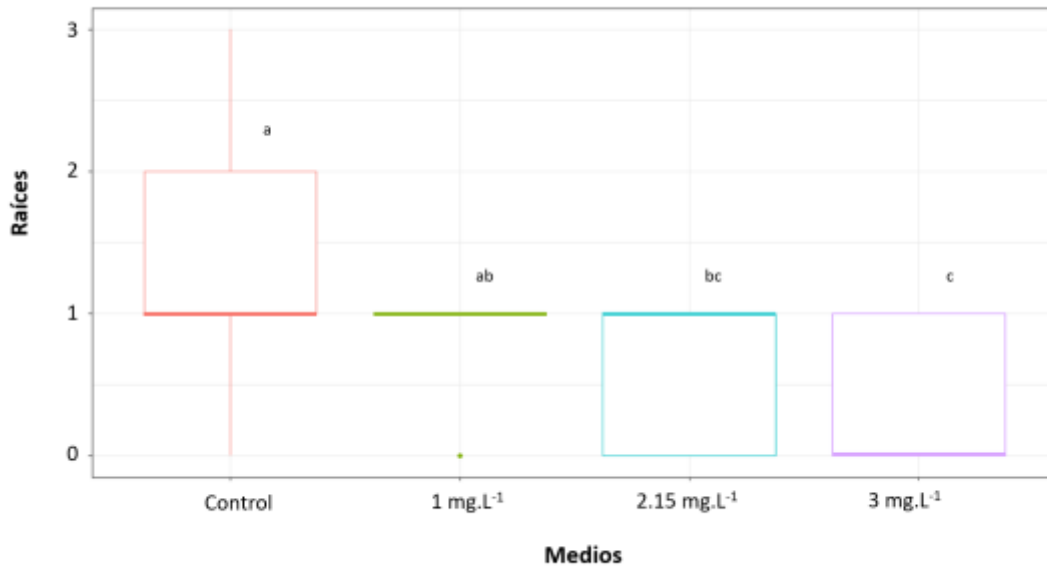


Figura 8.- Cantidad de raíces por explante sembrado, para cada uno de los medios evaluados a los 60 días de cultivo. Las letras indican cuáles son los medios entre los cuales se encontró diferencias estadísticamente significativas.

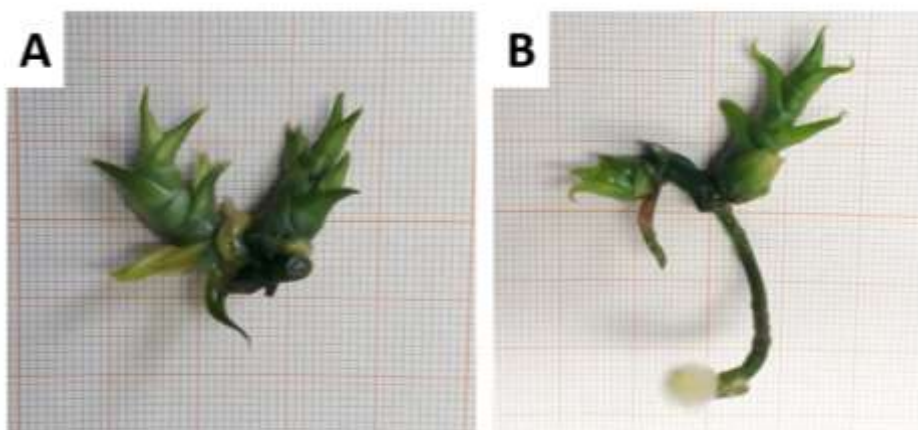


Figura 9.- *Vitro* plantas de *V. odorata* de 2 meses de crecimiento en medio de multiplicación. A) Medio con 2,15 mg.L⁻¹ de BAP. B) Medio con 1 mg.L⁻¹ de BAP.

3.2.4. Oxidación

La oxidación (Figura 10) se presentó únicamente en los explantes sembrados en los medios control y a 1 mg.L^{-1} . En los mismos, se la encontró en niveles de 27.27% y 45.45% respectivamente. De hecho, la oxidación registrada para el medio control es estadísticamente significativa en relación a los demás tratamientos (Tabla 4).



Figura 10.- Explantes de *V. odorata* oxidados tras 60 días en medio de multiplicación control y a 1 mg.L^{-1} .

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Fase de establecimiento *in vitro*

PD2 se desempeñó de mejor manera en la eliminación de contaminación microbiana, tanto para colonización bacteriana como mixta. Los factores que diferenciaron a este protocolo en relación a PD1 fueron las mayores concentraciones y tiempos de exposición a hipoclorito de sodio. Así, es evidente que este producto fue determinante para alcanzar una mejor desinfección. El hipoclorito de sodio es un desinfectante efectivo contra todo tipo de bacterias, hongos y virus [51]. Ejerce su acción a través de la oxidación irreversible de proteínas, aminoácidos y péptidos microbianos [52]. Así mismo, por su alto pH es capaz de interferir en la integridad de la membrana celular [52,53]. También se ha demostrado que la exposición al mismo afecta de manera negativa al ADN microbiano [52,54]. En definitiva, es un producto que cuenta con múltiples vías para ejercer su efecto desinfectante. Actualmente es uno de los agentes más utilizados en el cultivo *in vitro* [55]. De hecho, su uso ha sido recomendado para la desinfección de explantes nodales de vainilla por su alta efectividad, mínima toxicidad para el operador y bajo costo [56].

En cuanto a oxidación, ninguno de los protocolos de desinfección evaluados contó con niveles significativos. Esto pudo deberse al uso de ácido cítrico y ácido ascórbico en el último enjuague de los explantes como parte de ambos protocolos de desinfección, así como la adición de carbón activado al medio de cultivo. Mientras el ácido cítrico y el ácido ascórbico tienen acción antioxidante, el carbón activado actúa como un adsorbente capaz de remover compuestos fenólicos que pueden deteriorar al explante [57]. Cabe recalcar que la exposición de cloro a altas concentraciones tiende a afectar negativamente a la viabilidad del tejido vegetal [55]. Sin embargo, las mayores concentraciones de cloro utilizadas en PD2 fueron lo suficientemente altas para aumentar la efectividad sin alcanzar niveles que ocasionaran pérdida de explantes por oxidación. De esta manera, la sobrevivencia se vio optimizada.

Por otro lado, la mayor sobrevivencia alcanzada con PD2 implica que una mayor cantidad de *in vitro* plantas puedan desarrollarse. Por consiguiente, se alcanzó mayores niveles de brotación y enraizamiento con este protocolo.

4.2. Fase de multiplicación

4.2.1. Índice de multiplicación

Se evidenció una relación directamente proporcional entre la concentración de BAP y el índice de multiplicación. Las citoquininas como el BAP se caracterizan por su capacidad de inducción de la división celular, la liberación de la dormancia en los brotes laterales y a menudo la formación de brotes adventicios [58]. Es así que el BAP se posiciona como el principal actor para la proliferación de brotes en el cultivo *in vitro*, y su presencia en concentraciones óptimas permite la producción de múltiples brotes [50].

El índice de multiplicación de 4 obtenido para el medio con 2,15 mg.L⁻¹ es menor a los resultados de (Ayele, Tefera & Bantte, 2017) [37] y (Ramos-Castellá, Iglesias-Andreu, Bello-Bello & Lee-Espinosa, 2014) [47], quienes reportan índices de 5,33 y 5,80 para la multiplicación de yemas axilares de *V. planifolia* en medios semisólidos. Además, en los mencionados reportes se obtuvieron dichos valores en un periodo de alrededor de 30 días en contraste a los 60 días de evaluación que se tuvo en el presente estudio. Al respecto, es importante considerar que durante los 30 días iniciales de evaluación únicamente se tuvo la producción de un brote por explante en promedio en todos los medios de cultivo (Figura 7). A partir del subcultivo en medio sin agua de coco la tendencia de proliferación comienza a cambiar, y es apenas desde este punto donde empieza a evidenciarse multiplicación propiamente dicha. Estos resultados indican que la inclusión de agua de coco como parte del medio de cultivo tuvo un impacto negativo durante los primeros 30 días en la producción de brotes.

El agua o endospermio líquido del coco se ha usado ampliamente en la industria de cultivo de tejidos vegetales como un aditivo promotor del crecimiento [59], incluso en la propagación masiva de diferentes especies de orquídeas [60]. Es una mezcla compleja de agua y múltiples sustancias nutricionales y/o hormonales, las cuales incluyen azúcares, iones orgánicos, vitaminas, lípidos aminoácidos, compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos, enzimas y fitohormonas (auxinas y citoquininas) [59]. Su contenido en difenil urea también es valorado en el cultivo de tejidos vegetales, por la propiedad que tiene este compuesto de exhibir respuestas parecidas a las citoquininas [61]. Considerando esto y su contenido de fitohormonas, queda claro que el agua de coco aporta con factores de crecimiento adicionales

a los agregados en el medio de cultivo (exógenos) y a los que se encuentran propiamente en la *vitro* planta (endógenos). Es así que este agente podría contribuir a que la concentración de factores de crecimiento presentes en el medio sobrepasen el umbral óptimo, teniendo así un efecto inhibitorio [62]. Adicionalmente, existen factores de dormancia como el ácido abscísico que forman parte del agua de coco y podrían causar inhibición en el crecimiento *in vitro* [61].

Esta inhibición en el crecimiento generada por el agua de coco se ha reportado anteriormente en la micropropagación de orquídeas. En una evaluación del efecto de diferentes aditivos para el cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis*, se encontró que la inclusión de agua de coco en el medio redujo el crecimiento y la sobrevivencia de las plantas [62]. En dicha investigación se reportó un medio de cultivo que permite la producción de plantas de 5 cm con sobrevivencia de 100% a los 4 meses de cultivo. Al adicionar agua de coco al 10% en el medio de cultivo, la altura de las plantas se redujo a 3.16 cm y la sobrevivencia a 70% durante el mismo periodo de tiempo. Así mismo, con agua de coco al 20% en el medio, se obtuvieron plantas de 1.66 cm y sobrevivencia del 30%. Resultados similares fueron obtenidos en una investigación del efecto de ácido naftalénico (NAA) y agua de coco en el crecimiento de *Paraphalaeonopsis serpentilingua* [63]. En dicho estudio se encontró que la combinación NAA a 0.5 ppm y agua de coco a 7.5% permitió optimizar la cantidad de brotes producidos. Al aumentar las concentraciones de NAA y agua de coco a 1.5 ppm y 10% respectivamente se optimizó el tiempo de emergencia de la primera yema axilar, pero la cantidad de brotes producidos disminuyó de 11 a 1. Los autores comentan la importancia de determinar la proporción adecuada entre las hormonas exógenas (tanto las adicionadas directamente como las contenidas en el agua de coco) y endógenas, para que la multiplicación se lleve a cabo de manera adecuada.

4.2.2. Dimensiones de los brotes

Las dimensiones de brote de 0.91 cm de longitud y 0.29 cm de ancho a los 60 días de cultivo, fueron menores a las reportadas para *V. planifolia*. (Ramos-Castellá, Iglesias-Andreu, Bello-Bello & Lee-Espinosa, 2014) [47], quienes utilizaron la misma composición de medio de cultivo que en el presente estudio, obtuvieron brotes de 1.05 cm de longitud y 0.51 cm de ancho a

los 30 días de cultivo. Al igual que con el índice de multiplicación, el tamaño de brote obtenido indica que aún se puede optimizar la composición del medio de cultivo.

Los resultados encontrados no representaron evidencia suficiente para sugerir que la concentración de BAP afecta a las dimensiones de los brotes producidos en las *vitro* plantas de *V. odorata*. Esto contrasta a lo reportado en bibliografía, que detalla la relación entre los factores de crecimiento en el medio y la elongación del brote [64]. Se ha reportado que la concentración de BAP afecta directamente a las dimensiones de brotes de *vitro* plantas de diversas especies comerciales, como uva [65], parra [66] y banana [67]. Este comportamiento también se ha encontrado en *V. planifolia* [37,68,69]. Sin embargo, es común que los efectos de los factores de crecimiento varíen de una especie a otra [70].

4.2.3. Número de raíces

Se evidenció una relación inversamente proporcional entre la concentración de BAP y la presencia de raíces. Este comportamiento podría ser resultado del control ejercido por el balance auxinas – citoquininas en el tejido vegetal. Ambas sustancias son requeridas sinérgicamente para inducir la división celular y el crecimiento [71]. Por lo consiguiente, sus niveles en el medio de cultivo deben estar cuidadosamente balanceados y controlados para un adecuado desarrollo de la planta [58]. Skoog y Miller (1957) plantearon un modelo que explica la incidencia de ambas, de forma antagonista, en la formación de brotes y raíces [72]. Es decir, a menor concentración de auxinas que de citoquininas, se induce la proliferación de brotes. Por el contrario, concentraciones de auxinas que predominan ante los niveles de citoquininas se traducen en la formación de raíces. Se presume que en los medios de cultivo con mayor cantidad de BAP (a 3 y 2,15 mg.L⁻¹) los niveles de citoquinina superaron la concentración de auxinas endógenas, lo que favoreció a la brotación. En contraste, en aquellos medios con menor concentración de BAP, la predominancia de auxinas desencadenó la producción de raíces. De esta manera, los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con el modelo clásico de morfogénesis de raíces y brotes a partir de la relación auxinas/citoquininas. Aunque existen excepciones al mencionado modelo, dicho comportamiento ha sido corroborado en múltiples especies de plantas, incluyendo el grupo de las orquídeas [73–76].

4.2.4. Oxidación

La presencia de oxidación en los medios con menor o nula concentración de BAP, sugiere que en dichos grupos existió un desbalance hormonal. Se ha establecido que si los diferentes tipos, combinaciones y concentraciones de factores de crecimiento en el medio no se encuentran balanceados se presenta estrés oxidativo en la planta, lo cual se traduce en oscurecimiento [57]. Por otro lado, la ausencia de oxidación en medios de cultivo con mayores concentraciones de BAP sugiere que dicho factor de crecimiento pudo haber ejercido un efecto protector ante el oscurecimiento de las *in vitro* plantas. Se ha demostrado que citoquininas como el BAP tienen un efecto antisenescencia y antioxidante [77–79].

4.3. Perspectivas

Los resultados reportados marcan un inicio en la micropropagación de *V. odorata*. Más allá de los medios de cultivo semisólidos utilizados en el presente estudio, existen métodos que permiten optimizar la brotación de las plantas *in vitro*. Entre estas tecnologías destacan los Sistemas de Inmersión Temporal (SITs). Las ventajas que representan el uso de estos sistemas incluyen la automatización del proceso, el contacto incrementado de los explantes con el medio nutritivo, la reducción de costos asociados a medios sólidos y el control de la hiperhidricidad, lo cual en su defecto reduce el estrés mecánico en los cultivos vegetales [80]. Estos han probado ser útiles para la micropropagación de diversas especies útiles, incluyendo a *V. planifolia*. [47,81]. En esta última, se ha reportado que la micropropagación con SITs puede llegar a duplicar el índice de multiplicación obtenido con medios semisólidos [47]. Una vez que se conoce la composición adecuada para el desarrollo de *V. odorata* en medio de cultivo semisólido, es prometedor evaluarla en sistemas como los SITs.

Además de sus implicaciones en la productividad del cultivo, la micropropagación de las diferentes especies de vainilla representa una alternativa efectiva para su mantenimiento en bancos genéticos *in vitro* [82]. En este sentido, es importante caracterizar genéticamente el material establecido. Al entender la diversidad genética existente, es posible proponer estrategias de conservación efectivas [83]. Además, conocer el germoplasma de las especies silvestres de vainilla abre nuevas posibilidades en el mejoramiento de los cultivares comerciales [84], cuya falta de variabilidad genética tiene un impacto negativo en su

tolerancia a cambios de temperatura y enfermedades [33]. En definitiva, el reporte de un protocolo para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *V. odorata* abre la puerta a un sinnúmero de investigaciones venideras.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Las metodologías evaluadas permitieron establecer y multiplicar *vitro* plantas de *V. odorata* en medios de cultivo semisólidos.

En la fase de establecimiento *in vitro*, PD2 fue el protocolo más eficiente para la desinfección de los explantes por tener las mayores concentraciones y tiempos de exposición a hipoclorito de sodio. Esto repercutió en la disminución de la contaminación y la optimización de la sobrevivencia observada en este protocolo.

Por su parte, en la fase de multiplicación se estableció que los medios de cultivo con 2.15 y 3 mg.L⁻¹ de BAP favorecieron la brotación de *V. odorata* a la vez que minimizaron el enraizamiento y la oxidación de las *vitro* plantas. Los índices de multiplicación obtenidos son menores a los reportados en bibliografía para la especie *V. planifolia*. En el presente estudio la multiplicación empezó de manera tardía, a los 30 días de cultivo. Esto incidió en el número de brotes registrados y pudo deberse a la presencia de agua de coco en el medio durante el primer mes. En definitiva, la conservación de una relación óptima entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es crucial para el adecuado desarrollo de las *vitro* plantas.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda probar otros agentes desinfectantes en PD2 y/o diferentes concentraciones de los mismos para reducir la contaminación por hongos.

En cuanto a la multiplicación, se recomienda realizar ensayos a diferentes concentraciones de agua de coco en el medio de cultivo para valorar si es posible optimizar la brotación.

En futuros estudios se recomienda aplicar otros sistemas de cultivo, como lo son los Sistemas de Inmersión Temporal (SITs), que posiblemente permitan acrecentar el índice de multiplicación alcanzado.

REFERENCIAS

1. Karremans A, Chinchilla I, Rojas-Alvarado G, Cedeño Fonseca M, Damian 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
2. Soto Arenas MA, Cribb P. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex mill. (Orchidaceae: Vanillinae). *Lankesteriana*. 2010; doi:10.15517/lank.v0i0.12071
3. 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:https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.021
4. Gigant R, Bory S, Grisoni M, Besse P. Biodiversity and Evolution in the *Vanilla* Genus. 2011. doi:10.5772/24567
5. Walton NJ, Mayer MJ, Narbad A. Vanillin. *Phytochemistry*. 2003;63: 505–515. doi:10.1016/s0031-9422(03)00149-3
6. Havkin-Frenkel D, Belanger FC, Booth DYJ, Galasso KE, Tangel FP, Hernández Gayosso CJ. A Comprehensive Study of Composition and Evaluation of Vanilla Extracts in US Retail Stores. In: Havkin-Frenke D, Belanger FC, editors. *Handbook of Vanilla Science and Technology*. 2nd ed. Wiley Blackwell; 2019. pp. 349–365.
7. Arya S, Lenka S. *Vanilla Farming: The Way Forward*. 2019. doi:10.13140/RG.2.2.18451.02087
8. Gantait S, Kundu S. In vitro biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiol Plant*. 2017;39: 196. doi:10.1007/s11738-017-2462-1
9. Havkin-Frenkel D, French J, Pak F, Frenkel C. Inside Vanilla: *Vanilla planifolia*'s botany,

- curing options and future market prospects. *Perfum Flavorist*. 2005;30: 36–55.
10. Hernández-Hernández J. Atypical Flowering of *Vanilla planifolia* in the Region of Junín, Peru. In: Havkin-Frenkel D, Belanger F, editors. *Handbook of Vanilla Science and Technology*. 2nd ed. Wiley Blackwell; 2019. pp. 53–84.
 11. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1183, Vanillin [Internet]. 2021 [cited 9 Jun 2021]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillin>.
 12. Ortiz HB, Morales RG, Trujillo KTV. Supply Chain and Economic Viability of *Vanilla planifolia* Andrew Production: A Case Study. *Agro Product*. 2021;14.
 13. CNV International & Fairfood International. Bittersweet Vanilla The unsavoury story of vanilla farmers in Madagascar’s Sava Region. [Internet]. 2018. Available: https://www.cnvinternationaal.nl/_Resources/Persistent/9da3661792b3b40f13e64b21aa87894acd03e051/CNV Fairfood Vanilla-report ENG final.pdf
 14. Rakotonanahary Ambinintsoa N, Cao J. An ICT Integration Approach on Malagasy Agriculture: The Case of Vanilla Production. *Open J Soc Sci*. 2020;8. doi:DOI:10.4236/jss.2020.86017
 15. BBC. Vainilla: el codiciado sabor que provoca robos y asesinatos en Madagascar [Internet]. 2018. Available: <https://www.bbc.com/mundo/media-45275273>
 16. Havkin Frenkel D, Belanger F. Application of Metabolic Engineering to Vanillin Biosynthetic Pathways in Vanilla Planifolia. *Applications of Plant Metabolic Engineering*. 2007. pp. 175–196. doi:10.1007/978-1-4020-6031-1_7
 17. Quintana M. Desarrollo de cultivos sostenibles de vainilla en Ecuador. *Rev Investig Talent*. 2020;7: 64–72. Available: <https://doi.org/10.33789/talentos.7.1.124>
 18. Revista Líderes. Vainuz produce vainilla en Santo Domingo y ya empezó a exportar [Internet]. 2020. Available: <https://www.revistalideres.ec/lideres/vainuz-investigacion-exportacion-vainilla-empresa.html>

19. Rosenfeld Molina CJ. Plan de negocios para producción de Vainilla de Tahití (*Vanilla tahitensis*) en Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, con fines de exportación. Escuela Agrícola Panamericana. 2017.
20. Benarroch E. Los pueblos amazónicos de Ecuador cultivan vainilla como opción de sustento [Internet]. 2020 [cited 10 Aug 2021]. Available: <https://www.sinembargo.mx/11-09-2020/3857114>
21. Díaz Paillacho DM. Análisis de la cadena productiva de la vainilla (*Vanilla planifolia*) para la optimización de costos en la Asociación Kallari, en la parroquia Tena, cantón Tena, provincia Napo. Universidad Nacional de Loja. 2016.
22. Stehlé H. Le vanillier et sa culture. *Fruits*. 1952;7: 50–56.
23. Bruman H. The Culture History of Mexican Vanilla. *Hisp Am Hist Rev*. 1948;28: 360–376. doi:10.2307/2507753
24. Damiron R. La vainilla y su cultivo. dirección General de Agricultura y Fitosanitaria; 1994.
25. Ossenbach C. History of Orchids in Central America Part I: From Prehispanic times to the Independence of the new Republics. *Harvard Pap Bot*. 2005;10: 183–226. Available: <http://www.jstor.org/stable/41761814>
26. Programa Bioeconomía. La vainilla – Nueva inquilina de la chakra amazónica [Internet]. Quito; 2020. Available: <https://www.bivica.org/file/view/id/5662>
27. Missouri Botanical Garden. Tropicos.org. In: *Vanilla odorata* C. Presl [Internet]. 2021 [cited 25 Jan 2021]. Available: <http://www.tropicos.org>
28. Hernández M, Herrera-Cabrera BE, Vega M, Wegier A, Azurdia C, Cerén-López J, et al. *Vanilla odorata* (errata version published in 2020). In: The IUCN Red List of Threatened Species 2017 [Internet]. 2017 [cited 25 Jan 2021]. doi:<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T105878864A173976492.en>.
29. Frenkel C, Ranadive A, Tochiutl Vázquez J, Havkin-Frenkel D. Curing of Vanilla. In: Havkin-Frenkel D, Belanger F, editors. *Handbook of Vanilla Science and Technology*. 2nd

- ed. Wiley Blackwell; 2019. pp. 191–222.
30. Flanagan NS, Chavarriaga P, Mosquera-Espinosa AT. Conservation and Sustainable Use of Vanilla Crop Wild Relatives in Colombia. In: Havkin-Frenkel D, Belanger FC, editors. Handbook of Vanilla Science and Technology. 2nd ed. Wiley Blackwell; 2019.
 31. Flores Jiménez Á, Reyes López D, Jiménez García D, Romero Arenas O, Rivera Tapia JA, Huerta Lara M, et al. Diversidad de *Vanilla* spp.(Orchidaceae) y sus perfiles bioclimáticos en México. Rev Biol Trop. 2017;65: 975–987.
 32. Ojeda N. ¿Qué son las características organolépticas de los alimentos? [Internet]. 2018 [cited 17 Dec 2021]. Available: <https://www.ceac.es/blog/que-son-las-caracteristicas-organolepticas-de-los-alimentos>
 33. Bory S, Grisoni M, Duval M-F, Besse P. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. Genet Resour Crop Evol. 2008;55: 551–571. doi:10.1007/s10722-007-9260-3
 34. Gätjens-Boniche O, Acuña-Matamoros CL, Montero-Carmona W, Díaz C, Torres S. Propagación masiva y formación de callos protocórmicos de vainilla a partir de ápices radicales. Polibotánica. 2018; 157–180.
 35. Ekmekçigil M, Bayraktar M, Akkuş Ö, Gürel A. High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2019;136: 451–464. doi:10.1007/s11240-018-1526-2
 36. Sharma R, Bora S. In Vitro Sterilization Protocol of *Vanilla planifolia* Explants for Micropropagation. Nat Soc Sci. 2016;4: 135–142. Available: www.impactjournals.us
 37. Ayele Y, Tefera W, Bantte K. Enhanced Protocol Development for *in vitro* Multiplication and Rooting of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) Clone (Van.2/05). Biotechnol J Int. 2017;18: 1–11. doi:10.9734/BJI/2017/33726
 38. Hernandez-Hernandez J. Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Establecimiento y mantenimiento [Internet]. Taplacoyan, Veracruz; 2011. Available:

<https://www.yumpu.com/es/document/read/47333259/vainilla-establecimiento-y-mantenimiento-instituto-nacional-de->

39. Flanagan NS, Mosquera-espinoza AT. An integrated strategy for the conservation and sustainable use of native Vanilla species in Colombia. 2016; doi:10.15517/lank.v16i2.26007
40. Vargas-Hernandez L, Gámez-Vásquez H. Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la Sierra Huasteca Potosina. Folleto para productores. San Luis Potosí; 2014.
41. Bhojwani SS, Dantu PK. Plant tissue culture: an introductory text. Springer; 2013.
42. Olmos S, Luciani G, Galdeano E. IV. Capítulo 1 Micropropagación. 2010. pp. 353–362.
43. Lopes da Silva AL, Kielse P, Horbach M, Brondani G, Walter J, Dos Santos L, et al. Applications of micropropagation in plant biotechnology. 2019.
44. Bello-Bello J, García-García G, Iglesias-Andreu L. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks .) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. RevFitotec Mex. 2015;38: 165–171. Available: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802015000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en
45. Giridhar P, Gokare R. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. Indian J Biotechnol. 2004;3: 113–118.
46. Lee-Espinosa H, Murguía-González J, García-Rosas B, Córdova-Contreras A, Laguna-Cerda A, Mijangos-Cortés J, et al. *In Vitro* Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). HortScience. 2008;43: 454–458.
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. Vitr Cell Dev Biol - Plant. 2014;50: 576–581. doi:10.1007/s11627-014-9602-8

48. Departamento de Suelos EESC INIAP. Informe de ensayo # 21-0203. 2021.
49. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria; 2021. Available: <https://www.r-project.org/>
50. Sharma R, Bora S. Influence of explants type and Plant Growth Regulators on *in vitro* multiple shoot regeneration of *Vanilla planifolia*. Int J Agric Sci Res. 2017;7: 189–196.
51. Yildiz M, Er C. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Unum usitatissimum*). Naturwissenschaften. 2002;89: 259–261. doi:10.1007/s00114-002-0310-6
52. Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. Biocontrol Sci. 2006;11: 147–157. doi:10.4265/bio.11.147
53. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002;13: 113–117. doi:10.1590/S0103-64402002000200007
54. Yildiz M, Fatih Ozcan S, T Kahramanogullari C, Tuna E. The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and *in vitro* regeneration capacity of the Tissue. Nat Prod J. 2012;2: 328–331.
55. Yildiz M. The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. Recent Advances in Plant in vitro Culture. Intech; 2012. pp. 63–90. Available: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
56. Ayele Y, Tefera W. Low Cost Sterilization Technique and *In Vitro* Initiation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.). J Agric Sci Food Res. 2018;9: 1–6.
57. Azofeifa Á. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agron Mesoam. 2009;20: 153–175.
58. Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. Vitr Cell Dev Biol - Plant. 1996;32: 272–289.

doi:10.1007/BF02822700

59. Yong JWH, Ge L, Ng YF, Tan SN. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*. 2009;14: 5144–5164. doi:10.3390/molecules14125144
60. Agampodi VA, Jayawardena B. Effect of coconut (*Cocos nucifera* L.) water extracts on adventitious root development in vegetative propagation of *Dracaena purplecompacta* L. *Acta Physiol Plant*. 2009;31: 279–284. doi:10.1007/s11738-008-0230-y
61. Gnasekaran P, Rathinam X, Sinniah U, Subramaniam S. A Study on the Use of Organic Additives on the Protocorm-like Bodies (PLBS) Growth of *Phalaenopsis violacea* Orchid. *J Phytol*. 2010;2: 29–33.
62. Zahara M, Datta A, Boonkorkaew P, Mishra A. The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* hybrid 'Pink'. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2017;60.
63. Mukarlina M, Listyawati A, Mulyani S. The effect of coconut water and naphthalene acetic acid (NAA) application on the *in vitro* growth of *Paraphalaeonopsis serpentilingua* from West Kalimantan. *Nusant Biosci*. 2010;2.
64. Ashraf MF, Aziz MA, Kemat N, Ismail I. Effect of cytokinin types, concentrations and their interactions on *in vitro* shoot regeneration of *Chlorophytum borivillianum* Sant. & Fernandez. *Electron J Biotechnol*. 2014;17: 275–279. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.08.004
65. Khan N, Ahmed M, Hafiz I, Abbasi N, Ejaz S, Anjum M. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *Oeno One*. 2015;49: 37–45.
66. Goussard PG, PG G. Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. 1981;
67. Jafari N, Othman RY, Khalid N. Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. *African J Biotechnol*.

- 2011;10: 2446–2450.
68. Zuraida AR, Fatin Liyana Izzati KH, Nazreena OA, Wan Zaliha WS, Che Radziah CMZ, Zamri Z, et al. A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of *Vanilla planifolia*. *Am J Plant Sci*. 2013;04: 1685–1692. doi:10.4236/ajps.2013.49205
 69. Tan BC, Foan C, Alderson P. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 2010;105: 457–463. doi:10.1007/s11240-010-9866-6
 70. van Staden J, Zazimalova E, George E. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ, editors. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd ed. Springer; 2008. pp. 2055–226.
 71. Gaspar T, Kevers C, Faivre-Rampant O, Crèvecoeur M, Penel CL, Greppin H, et al. Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. *Vitr Cell Dev Biol - Plant*. 2003;39: 85–106. doi:10.1079/IVP2002393
 72. Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol*. 1957;11: 118–130.
 73. Gil CA, Ariza CC, Castillo TL, Salgado DL, Banda Sánchez L, Vanegas ML. Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. *Rev UDCA Actual Divulg Científica*. 2019;22. doi:10.31910/rudca.v22.n2.2019.1275
 74. Delany W, Desmond K, Prussack DA, Varevice S, Smith RA. Investigating the Skoog-Miller Model for Organogenesis Using Sweet Potato Root Explants. *Am Biol Teach*. 1994;56: 44–46. doi:10.2307/4449741
 75. Eckardt NA. A New Classic of Cytokinin Research: Cytokinin-Deficient *Arabidopsis* Plants Provide New Insights into Cytokinin Biology. *Plant Cell*. 2003;15: 2489–2492. doi:10.1105/tpc.151110
 76. Teale WD, Ditengou FA, Dovzhenko AD, Li X, Molendijk AM, Ruperti B, et al. Auxin as a Model for the Integration of Hormonal Signal Processing and Transduction. *Mol Plant*. 2008;1: 229–237. doi:https://doi.org/10.1093/mp/ssn006

77. Hönig M, Plíhalová L, Husičková A, Nisler J, Doležal K. Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19: 4045. doi:10.3390/ijms19124045
78. Zavaleta-Mancera HA, López-Delgado H, Loza-Tavera H, Mora-Herrera M, Trevilla-García C, Vargas-Suárez M, et al. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J Plant Physiol.* 2007;164: 1572–1582. doi:10.1016/j.jplph.2007.02.003
79. Aremu AO, Gruz J, Subrtová M, Szüčová L, Doležal K, Bairu MW, et al. Antioxidant and phenolic acid profiles of tissue cultured and acclimatized *Merwillia plumbea* plantlets in relation to the applied cytokinins. *J Plant Physiol.* 2013;170: 1303–1308. doi:10.1016/j.jplph.2013.04.008
80. Pascoal Golle D, Koefender J, Nicolodi Camera J, Kaiper C, Kattaneo Horn R. Temporary Immersion Bioreactors: Cultivation of sweet potato from meristems. In: Stefenon VM, editor. *Micropropagation: Methods and effects.* Nova Science Publishers; 2019. p. 73,74.
81. Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks Plant. *Vitr Cell Dev Biol.* 2016;v. 52: 154-160–2016 v.52 no.2. doi:10.1007/s11627-015-9735-4
82. Divakaran M, Nirmal Babu K, Ravindran PN, Peter K. Biotechnology for micropropagation and enhancing variations in Vanilla. *Asian J Plant Sci Res.* 2015;5: 52–62.
83. Flanagan N, Mosquera-Espinosa A. An integrated strategy for the conservation and sustainable use of native *Vanilla* species in Colombia. *Lankesteriana.* 2016;16: 201–218. doi:10.15517/lank.v16i2.26007
84. Ramos-Castellá AL, Iglesias-Andreu LG, Martínez-Castillo J, Ortíz-García M, Andueza-Noh RH, Octavio-Aguilar P, et al. Evaluation of molecular variability in germplasm of vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in Southeast Mexico: implications for

genetic improvement and conservation. *Plant Genet Resour.* 2016;15: 310–320.

ANEXOS

Anexo 1.- Lista de materiales

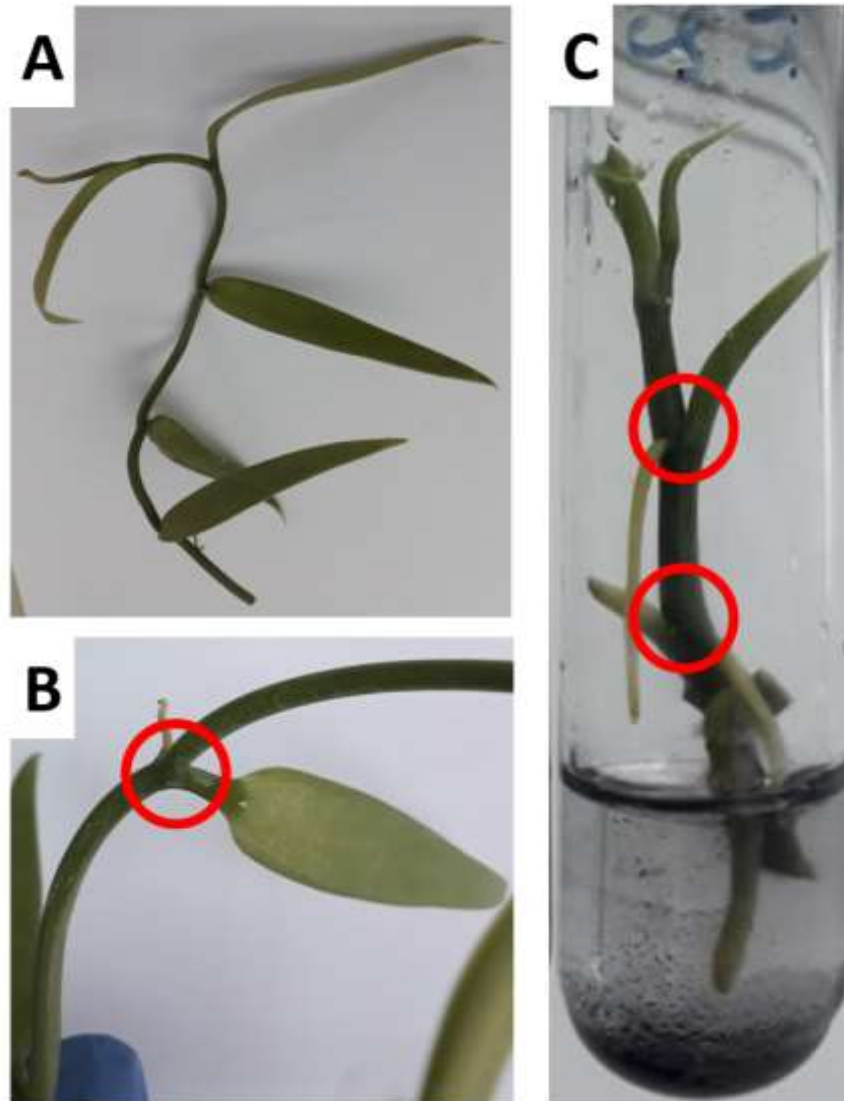
Insumos	
Barra magnética	Jarras plásticas graduadas
Bisturís	Jeringas 5 y 10 ml
Frascos de vidrio de 100 y 200 ml con tapa	Lámpara de alcohol
Cinta indicadora Autoclave	Mandil y traje de enfermero
Rolopac	Mango de bisturí
Erlenmeyers varios volúmenes	Papel aluminio
Espátulas	Papel toalla
Fósforos	Papel toalla absorbente
Fundas plásticas	Papel servilleta
Guantes	Parafilm
Mascarillas	Pinzas anatómicas
Probetas de varios volúmenes	Tijera de podar
Reactivos	
MS sin vitaminas	Tween 20
Sucrosa	Carbendazim
Gelrite (Phytigel)	Hipoclorito de sodio
Hidróxido de sodio	Ácido ascórbico
Ácido clorhídrico	Ácido cítrico monohidratado
Clorhidrato de cisteína	Nafthalaceticacid (NAA)
Carbón activado	6-Bencilaminopurina (BAP)
Agua de coco	Etanol 70%
Equipos	
Agitador magnético	Dispensador de medio
Agitador orbital	Estanterías con lámparas
Autoclave horizontal	Estufa
Autoclave tipo olla	Incubadora
Balanza de precisión	Microondas
Cámara flujo laminar simple	pH-metro
Cámara flujo laminar doble	Pipetas
Destilador de agua	Refrigeradora



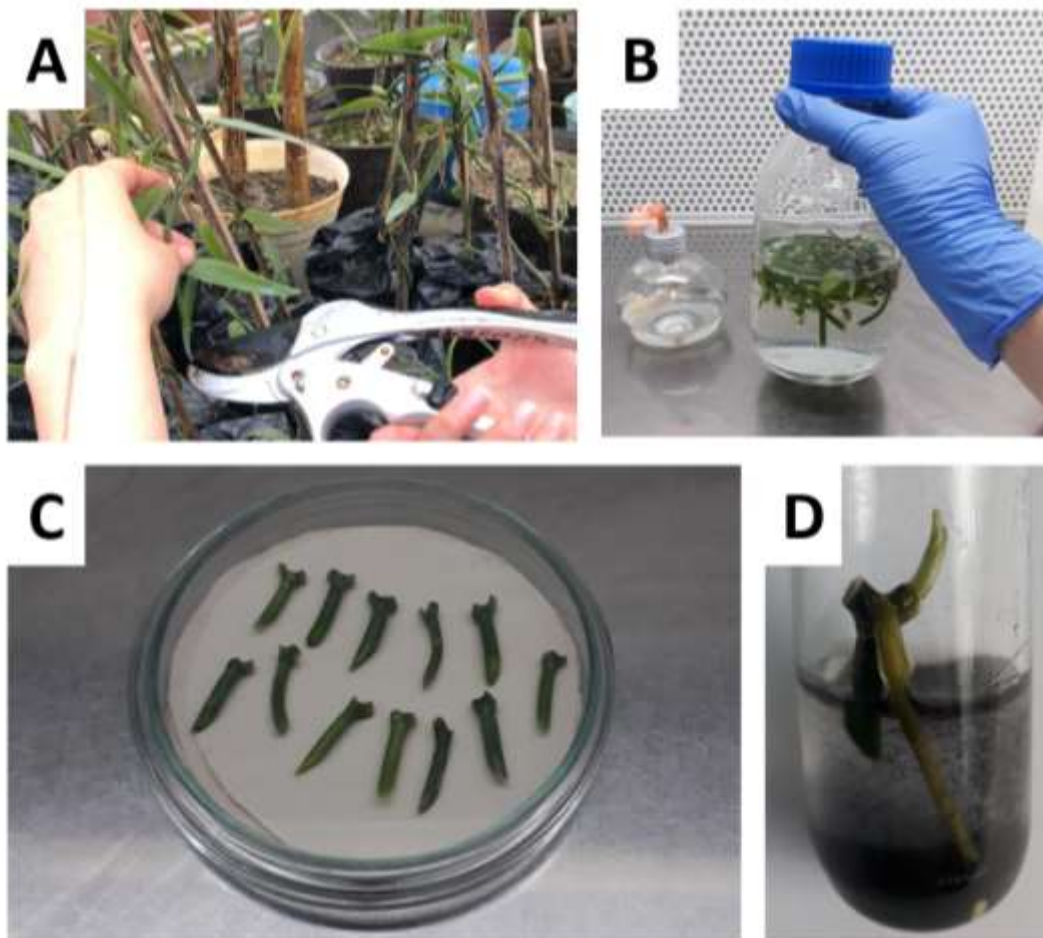
Anexo 2.- Sitio de colecta



Anexo 3.- Plantas *V. odorata* establecidas en invernadero



Anexo 4.- Material vegetal utilizado para el establecimiento *in vitro*. A) Porción de 4 yemas axilares escindida de la planta en invernadero. B) Yema axilar de la planta en invernadero. C) Yemas axilares de planta establecida *in vitro*.



Anexo 5.- Proceso de introducción *in vitro*. A) Colecta del explante. B) Desinfección. C) Disección del explante. D) Siembra y evaluación.

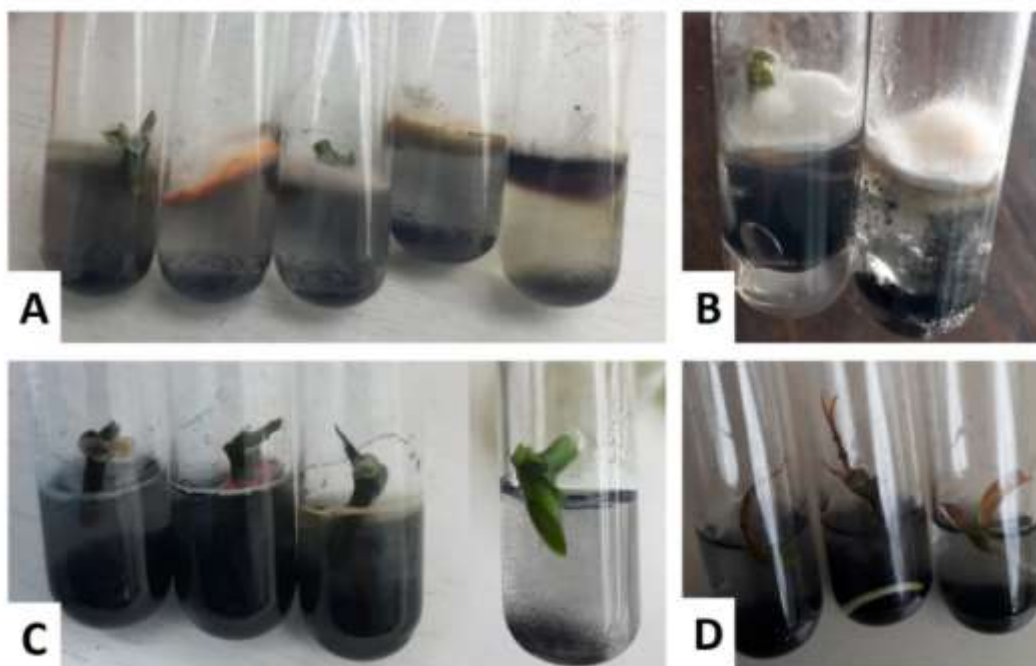


Anexo 6.- Cuarto de cultivo

Anexo 7.- Porcentajes y pruebas de significancia para las variables de estudio ante los dos protocolos de desinfección evaluados.

	Contaminación por hongos (%)	P valor *
Protocolo 1	3,12	0,10
Protocolo 2	18,75	
	Contaminación por bacterias (%)	
Protocolo 1	71,88	0,00
Protocolo 2	21,88	
	Contaminación mixta (%)	
Protocolo 1	18,75	0,02
Protocolo 2	0,00	
	Contaminación total (%)	
Protocolo 1	93,75	0,00
Protocolo 2	40,62	
	Oxidación (%)	
Protocolo 1	9,38	0,24
Protocolo 2	0,00	
	Sobrevivencia (%)	
Protocolo 1	6,25	0,00
Protocolo 2	59,38	
	Enraizamiento (%)	
Protocolo 1	31,25	0,00
Protocolo 2	71,88	
	Brotación (%)	
Protocolo 1	28,12	0,00
Protocolo 2	75,00	

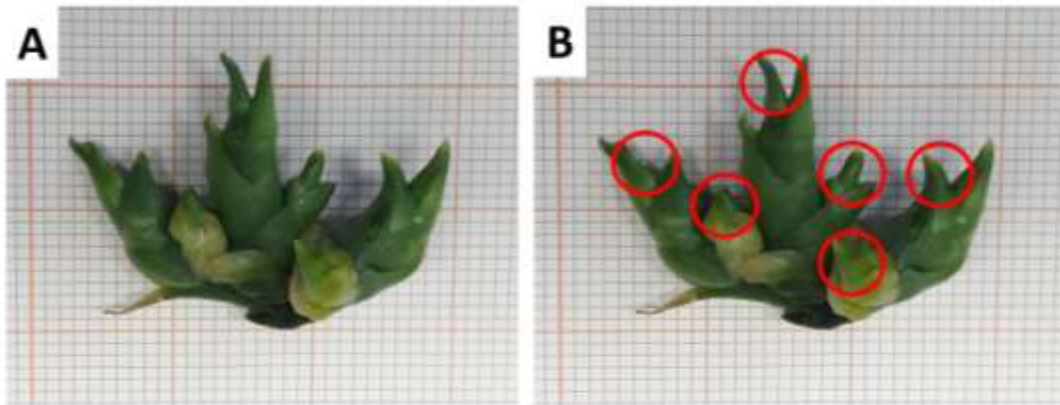
*p-valor Test de Fisher



Anexo 8.- Problemas en el establecimiento *in vitro*. A) Contaminación por hongos. B) Contaminación mixta. C) Contaminación por bacterias. D) Oxidación.



Anexo 9.- Micropropagación de *V. odorata*.



Anexo 10.- Brotación de *V. odorata*. A) Fotografía original. B) Conteo de brotes.