



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



ESCUELA DE AGRONOMÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA:

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Vanilla tahitensis* J.W. Moore mediante
explantes nodales

AUTORAS:

Carranza Mendoza Jesica Monserrate

Casquete Cedeño Ángela Luisa

TUTORA:

Ing. Liliana Corozo Quiñonez, Ph.D.

REVISORA:

Ing. Miryan Pinoargote Chang

SANTA ANA – MANABÍ – ECUADOR

2021

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Vanilla tahitensis* J.W. Moore mediante
explantes nodales

Carranza Mendoza Jesica Monserrate
Casquete Cedeño Ángela Luisa

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniero Agrónomo

Tutor (a):

Ing. Liliana Corozo Quiñonez, PhD

Revisor (a):

Ing. Miryan Pinoargote Chang

Línea de Investigación:

Soberanía y seguridad alimentaria

Mejoramiento genético y biotecnología vegetal

Universidad Técnica de Manabí
Facultad de Ingeniería Agronómica
Carrera de Agronomía

Ecuador

2021

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a DIOS por haberme guiado y brindarme las fuerzas necesarias para continuar aun en momentos difíciles, a mi sobrina Paolita y a mi Abuelita que están en el cielo, ellas han sido los ángeles que me cuidan y me guían.

A mi esposo Jefferson Vélez por brindarme sus consejos y su apoyo.

A mi pequeño hijo Jefferson que está en mi vientre, que es y será mi motivo de superación.

A mis queridos padres Flor Mendoza y Klever Carranza, que siempre me brindaron su apoyo y nunca me cortaron las alas para volar y siempre estuvieron ahí para apoyarme.

A Susana García ella no solo es mi amiga es como mi segunda madre, de quien tuve su apoyo incondicional y siempre estuvo ahí para motivarme.

A mis hermanos, mi hermana, mis cuñadas, mi cuñado, mis sobrinos y a toda mi familia que han deseado los mejores éxitos para mí.

Jesica Carranza

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento eterno a Dios por haberme permitido llegar a mi meta tan anhelada, por haberme dado la fuerza necesaria para seguir y no rendirme.

A mis padres por brindarme su ayuda y su apoyo incondicional y darme la oportunidad de estudiar.

A la Ing. Susana García por su amistad y porque siempre estuvo ahí apoyándome

A mis hermanos y a toda mi familia que estuvieron ahí viendo mi esfuerzo.

Agradecer a mis docentes que a través de estos 10 semestre compartieron sus conocimientos sus experiencias, les quedo muy agradecida.

A mi estimada directora de tesis Dra. Liliana Corozo que me brindo la orientación necesaria para poder realizar mi trabajo, gracias por su paciencia por brindarme sus conocimientos y su amistad.

A la Ing. Fátima Macias quien me ayudo en el trabajo de laboratorio, brindándome sus conocimientos y su gran habilidad que tiene trabajando en cultivo de tejido.

A mi revisora de tesis Ing. Myrian Pinargote por su gran ayuda en la realización del trabajo por sus consejos y sus sabios conocimientos.

A mis amigas Valeria Casanova y mi compañera de tesis Luisa Casquete por su gran amistad.

A Jeovanny Pin por toda la ayuda que me brindo un gran amigo sin duda.

Jesica Carranza

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme vida y permitirme culminar esta etapa, guiándome por el camino correcto para no desvanecer y lograr mis objetivos.

A mis padres, Senén Delfín Casquete Valle y Ángela Cleopatra Cedeño Robles por su apoyo, esfuerzo y amor incondicional ante cualquier situación, ya que sin ellos no hubiese obtenido mi título universitario.

A mi hermano, por ser un ejemplo de superación para mi vida y por el apoyo que me brinda siempre.

A mi familia, que de una u otra manera se hicieron presente durante mi carrera universitaria.

Luisa Casquete

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por darme la paciencia, valentía y sabiduría necesaria para enfrentarme a los retos que se presentaron durante este proceso.

A mis padres y hermano, por su paciencia, su amor, por motivarme y enseñarme que el esfuerzo es necesario para lograr las metas propuestas.

A mi esposo, Charles Jhonson Gaibor Chiguano, por brindarme su apoyo, amistad, respeto y cariño, por enseñarme a confiar en que puedo lograr lo que me proponga, y enseñarme a ver el lado positivo de las adversidades.

A mi compañera de tesis, Jesica Monserrate Carranza Mendoza, por ser mi compañera y amiga durante mis estudios universitarios, por ser mi complemento en la investigación realizada.

A nuestros Docentes, Dra. Liliana Corozo Quiñonez, Ing. Miryan Pinoargote Chang, Ing. Fátima Macías Ponce, Dr. Bertín Vélez Olmedo, Ing. Susana García Álava por ser tanto nuestra guía como apoyo en nuestro trabajo investigativo.

A mis amigos y compañeros de clases, por haber sido participes de muchas alegrías y experiencias vividas dentro y fuera de los establecimientos de la Universidad.

Luisa Casquete

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO

Ing. LILIANA COROZO QUIÑONEZ, Ph.D Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación “**ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *VANILLA TAHITENSIS* J.W. MOORE MEDIANTE EXPLANTES NODALES**”, es trabajo original realizado por los estudiantes **JESICA MONSERRATE CARRANZA MENDOZA Y ANGELA LUISA CASQUETE CEDEÑO**, el cual fue realizado bajo mi tutoría.

Ing. LILIANA COROZO QUIÑONEZ, Ph.D.

DIRECTORA DE TRABAJO

CERTIFICACIÓN DEL REVISOR DE TRABAJO

Ing. MIRYAN ANGELICA PINOARGOTE CHANG, Ph.D Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí.

Certifica:

Que el trabajo de titulación “**Establecimiento y multiplicación in vitro de Vanilla tahitensis J.W. Moore mediante explantes nodales**”, es trabajo original realizado por los estudiantes **JESICA MONSERRATE CARRANZA MENDOZA Y ANGELA LUSA CASQUETE CEDEÑO** y, el cual fue realizado bajo mi tutoría.

Ing. MIRYAN ANGELICA PINOARGOTE CHANG, Ph.D.

REVISOR DE TRABAJO

CERTIFICACIÓN DE LA COMISIÓN DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN

Sometida a consideración del Tribunal de Seguimiento y Evaluación, legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADA POR:

Ing. Presidente del tribunal de sustentación

Ing. Miembro del tribunal de sustentación

Ing. Miembro del tribunal de sustentación

DECLARACIÓN SOBRE DERECHO DE AUTOR

La responsabilidad de las ideas, resultados conclusiones de la presente investigación, corresponden únicamente a los autores.

CARRANZA MENDOZA JESICA MONSERRATE

CASQUETE CEDEÑO ANGELA LUISA

Contenido

1) INTRODUCCIÓN.....	6
2) OBJETIVOS.....	9
2.1. <i>Objetivo general</i>	9
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	9
3) MARCO TEÓRICO	10
3.1. Origen y distribución.....	10
3.2. Taxonomía	11
3.3. Descripción morfológica.....	11
3.4. Importancia económica y nutricional de la vainilla.....	12
3.5. Cultivares de importancia económica de vainilla a nivel mundial.....	13
3.5.1. <i>Vanilla planifolia</i>	13
3.5.2. <i>Vanilla tahitensis</i>	13
3.5.3. <i>Vanilla pompona</i>	13
3.6. Propagación de la vainilla	¡Error! Marcador no definido.
3.7. Cultivo de tejidos.....	¡Error! Marcador no definido.
3.8. Micropropagación.....	¡Error! Marcador no definido.
3.9. Fases de la micropropagación.....	¡Error! Marcador no definido.
3.10. Importancia de la micropropagación de la vainilla	15
3.11. Medios de cultivos	16
3.12. Fitorreguladores de crecimiento.....	16
3.12.1. Giberelinas	16
3.12.2. Citoquininas	17
4) METODOLOGÍA	18
4.1. Localización del ensayo	18
4.2. Material vegetal.....	18

4.3. Fase de establecimiento	¡Error! Marcador no definido.
4.3.1. Selección y preparación del material proveniente de campo	19
4.3.2. Siembra	20
4.3.3. Porcentaje de contaminación	21
4.3.4. Tiempo de respuesta	21
4.4. Fase de multiplicación.	¡Error! Marcador no definido.
4.4.1. Multiplicación <i>in vitro</i>	22
Tabla 1. Tratamientos para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Vanilla tahitensis</i>.	22
4.4.2. Numero de nudos	22
4.4.3. Diámetro de tallo.	22
4.5. Análisis estadístico	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
5.1. Establecimiento <i>in vitro</i>	24
5.2. Multiplicación <i>in vitro</i>	25
5.2.1. Altura de planta (cm)	25
5.2.2. Número de nudos	26
5.2.3. Diámetro de tallo (mm)	28
6. CONCLUSIONES.....	29
7. RECOMENDACIONES.....	29
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Material vegetal empleado para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Vanilla tahitensis</i> ..	18
.....	
Figura 2. Etapa de desinfección.....	18
Figura 3. Etapa de siembra.....	18
Figura 4. Respuesta morfogénica y contaminación en <i>Vanilla tahitensis</i> ; Error! Marcador no definido.	
Figura 5. Emisión de nudos en <i>Vanilla tahitensis</i> Error! Marcador no definido.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos para la multiplicación *in vitro* de *Vanilla tahitensis*.....20

Tabla 2. Altura de planta, número de nudos y diámetro del tallo en la multiplicación *in vitro* de explantes de *Vanilla tahitensis* en medio MS suplementado con concentraciones de BAP, KIM y AG3.....25

RESUMEN

La vainilla es una fuente de vainillina natural que tiene mucha importancia en la economía de varios países, su principal acervo genético está amenazado por la deforestación lo que ha provocado la desaparición de hábitats naturales y especies silvestres. Por lo que, la multiplicación y conservación de la diversidad de la vainilla es de suma importancia debido a su estrecha base genética. El objetivo de esta investigación fue desarrollar una metodología para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de vainilla (*Vanilla tahitensis*) a partir de explantes nodales. En el establecimiento *in vitro* se utilizó como medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y en la multiplicación *in vitro* se suplementó el medio MS con una citocinina (bencilaminopurina) y una giberelina (GA₃) además de vitaminas, ácido ascórbico. En la fase de establecimiento *in vitro* la contaminación bacteriana y fúngica fue inferior al 10%, mientras que durante la multiplicación *in vitro*, la mayor altura de planta (1,50 cm), diámetro de tallo (1,72 mm) y número de nudos (1,67) se obtuvieron con 2 mg L⁻¹ de BAP + 0,25 mg L⁻¹ de AG₃.

Palabras Claves: Orquídea, micropropagación, reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

Vanilla is a source of natural vanillin that is very important in the economy of several countries, its main gene pool is threatened by deforestation, which has caused the disappearance of natural habitats and wild species. Therefore, the multiplication and conservation of the diversity of *vanilla* is of utmost importance due to its narrow genetic base. The objective of this research was to develop a methodology for the establishment and *in vitro* multiplication of *vanilla* (*Vanilla tahitensis*) from nodal explants. In the *in vitro* establishment, Murashige and Skoog (MS) were used as the culture medium and in the *in vitro* multiplication the MS medium was supplemented with a cytokinin (benzylaminopurine) and a gibberellin (GA3) in addition to vitamins, ascorbic acid. In the *in vitro* establishment phase, bacterial and fungal contamination was less than 10%, while during *in vitro* multiplication, the greatest plant height (1.50 cm), stem diameter (1.72 mm) and number of knots (1.67) were obtained with 2 mg L⁻¹ of BAP + 0.25 mg L⁻¹ of AG3.

Keywords: Orchid, micropropagation, growth regulators.

1) INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla* spp.) pertenece a la familia *Orchidaceae* es nativa de Centroamérica, sin embargo, se distribuye en regiones tropicales como Madagascar, India, Filipinas e Indonesia. Esta especie, es utilizada a nivel mundial ya que de ella se obtiene vainillina, utilizada como aromatizante y saborizante para fines comerciales, debido a su elevada demanda en la industria. El género *Vanilla* cuenta con aproximadamente 110 especies a nivel mundial, siendo, *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitensis* las especies más destacadas en producción mundial, mientras que la mayoría de las especies de este género son consideradas silvestres (Jiménez et al., 2017).

Dentro de las especies domésticas, la planta de vainilla es valorada como una de las plantas más importantes dentro de este grupo. Su domesticación, aunque no ha sido comprobada debido a la escasez de variedades junto con la falta de distinción entre plantas silvestres y domesticadas, se cree que se originó en el estado de México al norte de Veracruz, esto debido a la tradición histórica que posee el cultivo dentro del territorio (Baltazar-Nieto, 2010).

Vanilla planifolia, *V. tahitensis* y *V. pompona* son las tres especies más importantes a nivel mundial las únicas fuentes de vainillina natural que existe. *V. tahitensis* es cultivada en Tahití, ofrece un sabor único e inigualable esto se debe a sus métodos ancestrales polinésicos de fermentación y curado, se presume que es un híbrido artificial y por sus características únicas tiene mucho más valor que la *Vanilla planifolia*. Se desconoce la conservación actual de la *V. tahitensis* x *V. pompona* al ser especies de importancia mundial es importante establecer una estrategia de conservación de los recursos genéticos de la vainilla, es primordial establecer un banco de germoplasma ya sea en campo o de forma *in vitro* (Azofeifa-Bolaños et al., 2014).

La vainilla es una especie importante, que no se produce en muchos países, pero se consume en el mundo entero. La vainilla y los diferentes extractos y esencias que se producen de ella, es un insumo base para miles de productos, así el 50 % de los 10.000 perfumes más comercializados aprovechan la sustancia y el 70 % de los helados más consumidos en el planeta. Además, es imprescindible para aromatizar jabones y cremas corporales (Quintana & Aguilar, 2020).

Madagascar e Indonesia son líderes mundiales en la producción de vainilla (3102 y 2259 toneladas ha⁻¹), contribuyendo al mercado con el 90% del producto (Inderiati & Ratnawati, 2019). En Latinoamérica México es el mayor exponente con 522 toneladas (FAOSTAT, 2021).

En Ecuador no existen datos estadísticos de la producción de vainilla, sin embargo, existen empresas privadas como “Kallari” y “Vainilla Vainuz – Vainillas del Ecuador” quienes cultivan aprovechando las condiciones climáticas favorables para el cultivo y la posterior exportación del producto. Es un producto que requiere mano de obra especializada durante el proceso, pero es beneficioso para la diversificación económica (Quintana & Aguilar, 2020).

La vainilla suele ser reproducida mediante esquejes, pero al utilizar esta técnica suelen generarse algunos problemas, tales como retraso en el crecimiento, desarrollo y producción, este tipo de técnicas se realiza solo a mínima escala debido a las enfermedades que pueden presentarse como pudrición de tallos y raíces (Gätjens-Boniche et al., 2018), se trata de un hongo el cual se observa en el tallo de la planta con una tonalidad de café oscuro, mientras que en la raíz la lesión avanza a las raíces adventicias, de esta manera se impide la absorción de agua y nutrientes necesarios para el debido desarrollo de la planta (Loaiza, 2019).

La propagación mediante cultivo *in vitro* de explantes nodales es una técnica innovadora en la producción de vainilla. Por ello, es importante desarrollar una metodología

de micropropagación para *Vanilla tahitensis*, a partir de explantes nodales, por ser una alternativa viable para obtener vitroplantas conservando la calidad genética del material vegetal además del valor económico y cultural que tiene la especie a nivel mundial.

2) OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- ✓ Desarrollar una metodología para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de vainilla (*Vanilla tahitensis*) a partir de explantes nodales.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de *Vanilla tahitensis*.
- ✓ Evaluar el efecto de diferentes combinaciones de citoquininas y giberelinas en la multiplicación *in vitro* de explantes nodales de *V. tahitensis*.

3) MARCO TEÓRICO

3.1. Origen y distribución

La Vainilla tiene su origen en los bosques tropicales de México y América central (Villanueva, 2017). México es uno de los ocho centros de origen de varias especies que son comestibles y ha contribuido al desarrollo y alimentación de la humanidad (Flores et al., 2017).

Los mexicanos que pertenecían a la cultura Maya fueron los que dieron inicio a los métodos de curado de frutos, los cuales eran utilizados para dar fragancia a lugares como templos, a estos se les agregaba sustancias como por ejemplo resina de copal para que adquirieran un fragante aroma. Por otra parte, los Aztecas empleaban *V. planifolia* en una sustancia sagrada compuesta de cacao, vainilla y miel (Diez, 2014).

A mediados del siglo XIX en la polinesia francesa se considera la introducción de la vainilla, la aclaración del origen de la vainilla Tahití es compleja ya que se han propuesto tres introducciones de distintos orígenes (Filipinas, Francia e India occidentales) (Brunschwig et al., 2017).

La vainilla no es una especie endémica de la flora polinesia, fue en 1848 cuando los primeros plántones fueron traídos por un almirante francés adaptándose a su nuevo entorno, las variedades importadas adquirieron sin embargo unas características singulares dando nacimiento a una nueva subespecie, la *Vanilla tahitensis*. En primer momento, fue un elemento decorativo muy apreciado en los jardines polinesios, luego hacia 1880 comenzó el cultivo a gran escala. En aquella época, la vainilla de Tahití fue el segundo producto de exportación de lo que por entonces se denominaban los "Establecimientos Franceses de Oceanía (Explore France, 2017).

3.2. Taxonomía

Según Roskov et al. (2020), la vainilla pertenece al reino plantae, división Tracheophyta, de clase Liliopsida, orden Asparagales, familia *Orchidaceae*, género *Vanilla*, especie *Vanilla tahitensis* J.W. Moore.

3.3. Descripción morfológica

V. tahitensis crece en climas cálidos y húmedos con temperatura promedio de 25°C, el suelo en donde se realice siembra debe tener buen drenaje y materia orgánica en gran cantidad (Saldívar-Iglesias, 2015). Chambers et al. (2019) mencionan que, la vainilla produce dos tipos de raíces, las adventicias que le permiten a la planta trepar y sostenerse del tutor, mientras que la raíz subterránea, adquiere nutrientes del suelo y retienen agua. El tallo es blando, de color verde y su textura carnosa (Álvarez, 2019).

Las hojas de vainilla varían su tamaño de acuerdo, a la maduración en un rango de 8 a 25 cm de largo, y de 2 a 9 cm de ancho, posee hojas ovaladas o lanceoladas. Las flores poseen el fragante aroma característico de la vainilla, el color varía de acuerdo con la especie y su tamaño aproximadamente es de 6 a 8 cm de largo y 5 a 10 cm de ancho. La floración se da en un periodo de 2 meses una vez por año (Chambers et al., 2019).

Los frutos de vainilla tienden a formarse en la cuarta u octava semana después de haberse efectuado la fertilización en el ovario de la planta, se trata de una capsula carnosa, prolongada, de 15 a 25 cm de largo y de 8 a 14 mm de ancho, su color es verde y al llegar a la etapa de maduración pasa a tornarse verde amarillento, esta etapa se realiza entre el tercer o el décimo mes, las semillas de *V. tahitensis* son redondas y pequeñas, de aproximadamente 0,24 a 0,33 mm (Macas, 2019).

3.4.Importancia económica y nutricional de la vainilla

En el género *Vanilla* existen tres especies que son consideradas de importancia económica en el mundo *V. planifolia*, *V. tahitensis* y *V. pompona* ya que estas poseen la mayor fuente de vainillina. *Vanilla tahitensis* posee un sabor único, debido al aroma de sus vainas, dando como resultado una mezcla entre el aroma de las vainas verdes combinadas con los métodos de fermentación y curado. Se deduce que es un híbrido artificial y debido a sus propiedades únicas las vainas adquieren un valor más alto que el de *Vanilla planifolia* (Azofeifa-Bolaños et al., 2014).

La vainilla representa un rubro económico importante a nivel mundial, hasta el 2018 generó un rendimiento de 7 575 ton (FAO, 2018), por su gran demanda y diversidad de usos, entre los que sobresalen: la elaboración de alimentos, cosméticos, y otras industrias, variando tanto su aroma como su sabor de acuerdo al ambiente donde se está generando su crecimiento (Chambers et al., 2019).

Su importancia se resalta en la elaboración de dulces y helados de alta calidad, la vainilla es utilizada para la producción de chocolate fino y sencillo, se comercializa las capsulas, el extracto de vainilla, se obtiene el azúcar de vainilla, se extrae sustancias olorosas y sabrosas. *Vanilla tahitensis* contiene piperonal que es usado en la fabricación de perfumes (Colombia, 2003).

El cultivo de vainilla no solo se enfoca la importancia económica sino también en la cultural, ecológica y social ya que al desarrollarse en bosques tropicales y subtropicales está ayudando a la conservación de la flora natural. La importancia de la vainilla se encuentra en sus vainas de calidad gourmet, en el mercado internacional son muy apetecibles por ello alcanza precios muy elevados llevando el segundo lugar del cultivo más costoso a nivel mundial (Saldívar-Iglesias, 2015).

3.5.Cultivares de importancia económica de vainilla a nivel mundial

3.5.1. *Vanilla planifolia*

Es una de las especies de mayor importancia a nivel mundial debido a que su fruto es utilizado como saborizante y aromatizante tiene características organolépticas ocupando el segundo lugar entre las especies más costosas, la principal zona de producción de la vainilla en México es la región del Totonacapan, que abarca el norte del estado de Puebla y el centro de Veracruz (Cervantes Castillo et al., 2018).

3.5.2. *Vanilla tahitensis*

Desde el punto de vista de Brunshwig et al. (2017), la vainilla de Tahití representa menos del 1% de la producción total de vainilla mundial, posee un aroma única, debido a un original sabor a anís, muy apreciado especialmente en gastronomía y perfumería. La *Vanilla tahitensis* fue por mucho tiempo considerada como un cruce entre la *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*. En realidad, se trata más bien de una subespecie de la *Vanilla planifolia* (Explore France, 2017).

3.5.3. *Vanilla pompona*

Según Hernández-Ruíz et al. (2019), la *Vanilla pompona* es una especie prioritaria dentro del acervo genético secundario de *V. planifolia*, porque posee características importantes que no se encuentran en el germoplasma de esta última, como la resistencia a antracnosis (*Collectotrichum* sp.), la pudrición de raíz (*Fusarium oxysporum* sp.) y la tolerancia a climas xerofitos. En México se reconoce de manera general la existencia de dos poblaciones de *V. pompona* una de las flores con segmentos extendidos de grandes dimensiones que se distribuye de Veracruz hacia el norte de Oaxaca por la vertiente del golfo de México y otras con flores semicerradas ubicadas en la costa del océano pacífico.

3.6. Propagación *in vitro*

Como expresan Martínez & Gago (2008), el término micropropagación se definió por primera vez en 1986 como “cualquier proceso aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de sus órganos, de sus tejidos o de sus células y que produzcan poblaciones de plántulas que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente”. Mientras que Flores et al. (2017) la define como el proceso de multiplicación asexual de plantas aplicando métodos de cultivos de tejidos *in vitro* vegetales, la más extensa en lo que respecta a la biotecnología vegetal, es más utilizada por su gran cantidad de productividad, tiene muchas ventajas entre estas mantener las características genotípicas del material inicial, el uso de ambientes controlados en condiciones asépticas, el número ilimitado de plantas que se obtienen a corto plazo (Flores et al., 2017).

Segretín (2007) reporta que en los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro* se pueden distinguir las siguientes etapas durante el proceso:

- 1) **Elección** de la planta y/o tejido donante de explantes.
- 2) **Establecimiento**, que consiste en la desinfección de los explantes (generalmente con hipoclorito sodio) y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático según se desee.
- 3) **Multiplicación**, para generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.
- 4) **Enraizamiento**, en la que se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.
- 5) En relación a la **aclimatación** Indacochea-Ganchozo et al. (2017) mencionan que, esa etapa es esencial en una micropropagación porque de ella depende la eficiencia y la calidad final de las plantas producidas *in vitro*, y a la vez es una etapa crítica donde las plantas no suelen tolerar las condiciones ambientales.

3.7.Importancia de la micropropagación de la vainilla

La propagación y el cultivo de las orquídeas con el pasar del tiempo fue revolucionando con las investigaciones de Knudson (1922), quien realizó trabajos con semillas que germinaron en un medio simple de azúcar logrando propagar la vainilla por medio de explantes nodales de plántulas (Sedano et al., 2015).

Según Gamboa-Gaitán, (2014), recientemente se ha explorado la posibilidad de conservar y propagar la vainilla *in vitro* lo cual ha arrojado unos resultados esperanzadores al menos para la preservación en el corto y mediano plazo.

Divakaran et al. (2006), establecieron *in vitro* puntas de brote y segmento nodales de plantas cultivadas en el campo de diferentes vainillas (*V. planifolia*, *V. andamanica*, *V. aphylla*, *V. pilifera* y *V. wightiana*) en el Instituto Indio de Especies Investigaciones, para ello utilizaron como medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) suplementado con 15g/L⁻¹ de sacarosa y manitol sellados en recipientes a 22 ± 2° C, logrando buen crecimiento en las plantas estudiadas.

Lozano et al. (2015), micropropagaron *Vanilla planifolia* empleando medio de cultivo Murashige & Skoog, junto con Bencilaminopurina, Kinetina, meta-Topolina y Thiadiazuron, en diferentes concentraciones (2.22 µM, 4.44 µM y 8.8 µM), sacarosa (20 g L⁻¹), consiguiendo 6,1 brotes/explante con una altura promedio de 5,59 cm por brote con BAP (8.88 µM) después de 120 días del cultivo.

Bello-Bello et al. (2015), utilizaron brotes obtenidos de *Vainilla planifolia* de 0,5 cm de altura de la región de Totonacapan, Veracruz México, y los cultivaron en medio MS suplementado con 2mg/L⁻¹ de BAP (bencilaminopurina, Sigma®). Logrando 100% de supervivencia en brotes.

Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu (2016) evaluaron sistemas de biorreactores (biorreactores de inmersión temporal (BIT), biorreactores de inmersión por gravedad (BIG) y receptor de inmersión temporal automatizada (RITA)) en las fases de multiplicación y enraizamiento de *V. planifolia*. Logrando en la multiplicación *in vitro* 18, 06 brotes/explante utilizando sistemas BIT. Mientras que, para la fase de enraizamiento el mejor resultado en cuanto a raíces más largas se logró con BIT.

3.8. Medios de cultivos

Los medios de cultivos son ambientes artificiales que han sido diseñados por el ser humano para suministrar los nutrimentos minerales con las cantidades necesarias, incluyendo los macronutrientes y micronutrientes (Krikorian, 1993). Los medios de cultivos requieren de esterilización, luego de ser preparados, esto con el fin de excluir algún tipo de microorganismo que contamine la población muestreada (Apella & Araujo, 2005).

3.9. Fitorreguladores de crecimiento

Son compuestos generados por síntesis química, en ocasiones presentan estructura diferente a los procedentes de la planta, pero con actividad biológica parecida. Son utilizados para realizar cambios durante el ciclo de vida de las plantas y mejorar aspectos importantes en el ámbito agrícola, los principales grupos de fitorreguladores son las auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Castro et al., 2019).

3.9.1. Giberelinas

Las giberelinas están adheridas a varios aspectos del desarrollo y ciclo de vida de las plantas tales como la floración, senescencia y germinación que ayudan al enraizamiento y al incremento de longitud de raíces y tamaño del explante (Laguna-Ibarra et al., 2019). Las giberelinas participan en la germinación de semilla, el crecimiento del tallo, la inducción floral, el desarrollo del polen y el crecimiento del fruto (Bohorquez-Sandoval et al., 2011).

3.9.2. Citoquininas

Las citoquininas se usan para promover la formación de brotes laterales, inducen a la división celular, estimula la formación de la clorofila y mejora los procesos fotosintéticos y esto permite la adaptación del explante a las nuevas condiciones del cultivo (Laguna-Ibarra et al., 2019). Intervienen en procesos de división celular, retardo en la senescencia de la planta, inducen la formación de raíces y regulan la dominancia apical (Bohorquez-Sandoval et al., 2011).

4) METODOLOGÍA

4.1. Localización del ensayo

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, ubicada en la parroquia Lodana, km 13½ vía Portoviejo-Santa Ana, durante los meses de enero a junio del 2021.

4.2. Material vegetal

La especie que se utilizó para la investigación fue *Vanilla tahitensis*, colectada en una plantación perteneciente a la empresa “Adseragro” ubicada en el sitio “San Juan” del cantón Jama de la provincia de Manabí, el material vegetal utilizado consistió en explantes nodales obtenidos de vainilla (Figura 1).



Figura 1. Material vegetal empleado para el establecimiento *in vitro* de *Vanilla tahitensis*. a) Trasplante de plantas en maceta. b) Plantas para extracción de explantes. c) Plantas seleccionadas para realizar la siembra *in vitro*.

4.3. Actividades desarrolladas en el laboratorio de cultivo de tejidos

4.3.1. Selección y preparación del material proveniente de campo

Luego de coleccionar brotes de *Vanilla tahitensis* en campo, estos fueron sembrados en macetas donde se mantuvieron por tres meses aproximadamente. Se realizaron aplicaciones semanales de fungicida (Rozzo 2cc/litro de agua) para reducir los niveles de contaminación. Posteriormente, las plantas fueron llevadas al laboratorio de cultivo de tejidos para iniciar el trabajo de investigación.

Se utilizó explantes nodales de vainilla que fueron colocados en un vaso de precipitación y lavados con jabón líquido durante 5 minutos (Figura 2a), posteriormente se colocaron en agitación en un Shaker (agitador orbital) (Figura 2b) y se enjuagó con abundante agua. El material fue llevado a condiciones de asepsia (cámara de flujo laminar) y colocado en frascos esterilizados conteniendo una solución de Tween 20, por 15 minutos, luego fueron sumergidos en etanol al 90% por 5 minutos, por último, para su desinfección los explantes se llevaron a una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5 % por un lapso de 20 minutos (Figura 2c), finalmente se enjuagaron por tres ocasiones con agua destilada estéril. Este procedimiento se realizó con cada solución (Figura 2d).



Figura 4. Preparación y desinfección de los explantes. a) Corte de explantes utilizados para el establecimiento *in vitro*. b) Explantes nodales colocados en agitador orbital. c) Explantes nodales colocados en solución de Tween 20 durante 15 minutos. d) Explantes en hipoclorito de sodio.

4.3.2. Siembra

Una vez realizado el proceso de desinfección se procedió a reducir el tamaño de los explantes (Figura 3a-b), los mismos que fueron colocados en una solución de cisteína (500 ppm) para evitar oxidación, previo a la siembra. Se sembraron 120 explantes nodales de *Vanilla tahitensis* en tubos de ensayo de 25x150 mm, conteniendo el medio básico de Murashige & Skoog (1962) suplementado con vitaminas, 15g de azúcar, 1,5 g de gel y 25 ppm de amoxicilina (Figura 3 c-d). Una vez realizada la siembra se selló con papel films, seguidamente los cultivos fueron colocados en cámara de crecimiento por 15 días con un

fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y temperatura de 24 ± 2 . En esta fase se evaluó el número de explantes contaminados por hongos y bacterias (Figura 3e).

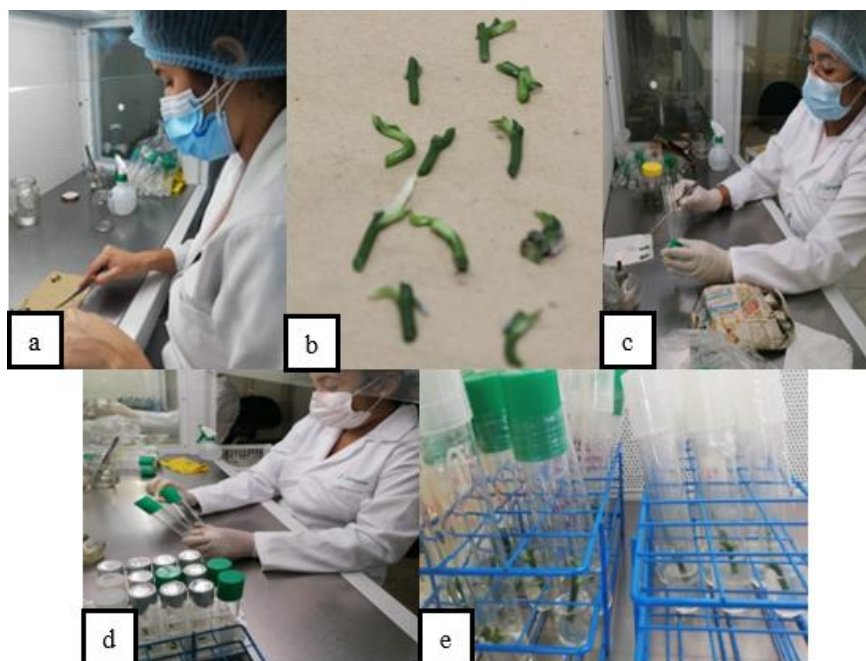


Figura 5. Establecimiento *in vitro* de explantes. a-b) Reducción del tamaño de explantes. c-d) Siembra de explante en tubo de ensayo con medio MS. e) Explantes en cuarto de crecimiento.

4.3.3. Variables evaluadas

a) Porcentaje de contaminación

Se evaluó el número de explantes nodales contaminados a partir del tercer día de establecimiento durante 2 semanas.

b) Tiempo de respuesta

Se evaluó desde la primera semana hasta el momento en que se dé el desarrollo de una yema.

4.3.4. Multiplicación *in vitro* de explantes de *Vanilla tahitensis*

Los explantes establecidos en medio básico de Murashige y Skoog (MS), se cultivaron durante 10 días, para luego ser transferidos a los tratamientos a estudiar (Tabla 1). El material vegetal se mantuvo en cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y una temperatura de 24 ± 2 grados centígrados.

Tabla 1. Tratamientos para la multiplicación *in vitro* de *Vanilla tahitensis*.

Medio sólido Murashige y Skoog (MS)					
	BAP (mg)	GA ₃		KINETINA	GA ₃
1)	1,0 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹	4)	0,5 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹
2)	1,5 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹	5)	0,75 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹
3)	2,0 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹	6)	1,0 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹
7)	Testigo (MS sin reguladores de crecimiento)				

4.3.5. Variables analizadas

a) Numero de nudos

Se contabilizó en cada tratamiento el número de nuevos nudos emitidos.

b) Diámetro de tallo

Se midió el diámetro del tallo cada tratamiento, con la ayuda de un calibrador.

Todas las variables fueron evaluadas a las ocho semanas después de la siembra en los tratamientos correspondientes.

4.3.6. Análisis estadístico

Los datos se sometieron a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilks modificado) y homogeneidad de los residuos de la varianza.

En la fase de establecimiento se registró el número de explantes contaminados. En la fase de multiplicación *in vitro* se estableció un Diseño completamente al Azar (DCA), el cual incluyó 6 tratamientos más 1 testigo sin efecto hormonal con 3 repeticiones, los mismos que se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA), aplicando la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0,05$) para las medias de los tratamientos. El análisis se realizó con el paquete estadístico InfoStat profesional.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Establecimiento *in vitro*

Los explantes establecidos de *Vanilla tahitensis*, presentaron bajos niveles de contaminación bacteriana y fúngica (8,82% y 9,41% respectivamente). La presencia de bacterias y hongos se determinó mediante la observación de las características fenotípicas visibles, como desarrollo de las colonias bacterianas y el crecimiento micelial de hongos durante el establecimiento *in vitro* (Figura 4b-c). Sin embargo, la reducción eficaz de la contaminación de los explantes de *Vanilla tahitensis* en esta investigación, puede estar relacionada con la eficiencia del protocolo de desinfección (Tween 20, etanol al 90 % y NaClO al 1,5 %) y la adición de antibiótico (amoxicilina) al medio de cultivo. En cuanto al tiempo de respuesta, a los ocho días después del establecimiento *in vitro* en los explantes de *Vanilla tahitensis* se observó el inicio del desarrollo de las yemas axilares (Figura 4a).

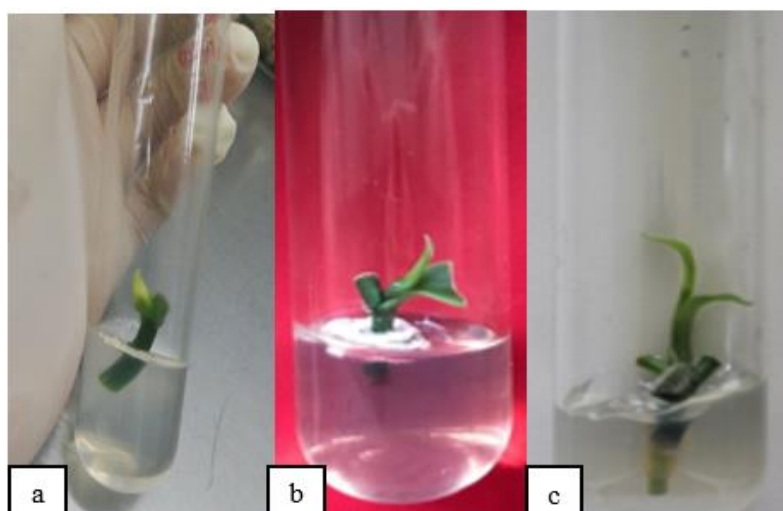


Figura 4. Respuesta morfogénica y contaminación microbiana en *Vanilla tahitensis*. a) Aparición de la primera yema axilar. b) Contaminación fúngica. c) Contaminación bacteriana.

En varias investigaciones realizadas en *Vanilla planifolia* se reportan bajos porcentajes de contaminación empleando agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio (Tan et al., 2011; Zuraida et al., 2013) y cloruro de mercurio (Janarthanam & Seshadri, 2008). Mientras que Gantait & Kundu (2017), mencionan que la presencia de bacterias en los explantes de *V. planifolia* fue controlada mediante una desinfección

exhaustiva de los explantes y con la adición del antibiótico (estreptociclina al 0,2%) al medio de cultivo.

Las plántulas *in vitro* de *Vanilla tahitensis* se desarrollaron normalmente en cuanto a su tamaño, forma y coloración. Por lo tanto, teniendo en cuenta los caracteres morfológicos visibles, las plantas establecidas se mantuvieron estables fenotípicamente con respecto al material original.

5.2. Multiplicación *in vitro*

5.2.1. Altura de planta (cm)

No se observó diferencia significativa cuando se compararon los tratamientos entre sí, sin embargo, cuando se adicionó al medio 2 de BAP mg/L⁻¹ + 0,25 AG₃ mg/L⁻¹ las plántulas mostraron la mayor altura (1,50 cm). Mientras que, bajas concentraciones de kinetina en combinación con AG₃ (0,5 mg/L⁻¹ de KIN + 0,25 mg/L⁻¹ de AG₃) afectaron negativamente la longitud del explante (0,94 cm).

El alargamiento del tallo no se debe a una mayor formación de nudos, sino al resultado de una rápida elongación de las células internodales, debido a divisiones celulares seguidas de la elongación celular. Los resultados en la presente investigación demuestran que la combinación del BAP + AG₃ fue más eficaz que las combinaciones con kinetina para aumentar la altura de planta en los segmentos nodales. En concordancia con los reportes de Nagesh (2008); Tan et al. (2011), quienes encontraron que la tasa de proliferación de los explantes cultivados en el medio suplementado con kinetina era generalmente menor que el BAP.

En relación al análisis ortogonal se observó diferencias en relación al testigo (Tabla 2), siendo este superior a los tratamientos (2,50 cm). Lo que supone que las orquídeas en términos generales, prefieren sustratos con bajos contenidos minerales para su normal desarrollo.

Erawati et al. (2020) evaluaron diferentes concentraciones de BAP (0mg. L^{-1} , 1mg. L^{-1} , 2mg. L^{-1} , y 3mg. L^{-1}) y kinetina (0mg. L^{-1} , 1mg. L^{-1} y 2mg. L^{-1}) en medio MS, comprobando que los brotes de *Vanilla* no dependen del crecimiento exógeno y que la mayor longitud de brotes (2 a 2,5 cm) se obtuvo con la adición de 3mg. L^{-1} de BAP.

Es claro suponer que los resultados en relación a la altura de planta en especies de vainilla son variables y tienen relación con el comportamiento de la especie evaluada. Noorhazira et al. (2018) reportan longitudes de 4,5 cm con 1 mg/L BAP^{-1} haciendo suponer que a menor concentración de BAP mayor longitud del explante. Mientras que Cordova (2007) obtuvieron longitudes entre 2 y 4 cm con $0,5\text{ mg/L de BAP}^{-1}$ en medio MS.

5.2.2. Número de nudos

Se observó diferencias significativas en el análisis de varianza y en el ortogonal, logrando el mayor número de nudos (1,67) con 2 mg/L^{-1} de BAP $\text{mg/L}^{-1} + 0,25\text{ mg/L}^{-1}$ de AG_3 y 1,76 cuando no se adicionó ningún fitorregulador al medio de cultivo (Figura 5b-c). Sin embargo, cuando se adicionó $0,75\text{ mg/L}^{-1}$ de KIN + $0,25\text{ mg/L}^{-1}$ de AG_3 el número de nudos se vio afectado (Figura 5a), lo que hace suponer que la kinetina no favorece el aumento de nudos en vainilla. El número de nudos que se logró cuando se combinó BAP con la giberelina posiblemente se deba a que el AG_3 indujo el crecimiento internodal en esta especie.

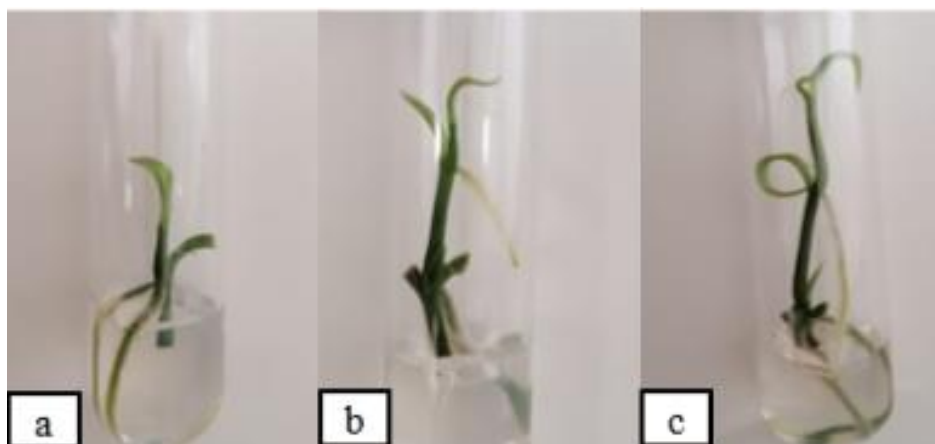


Figura 5. Emisión de nudos en *Vanilla tahitensis*. a) Presencia de número de nudos con KIN. b) Presencia de nudos con AG_3 . c) Presencia de nudos en el testigo.

Zerihun et al. (2009) cultivando segmentos nodales de *Vanilla planifolia* en diferentes niveles de BAP combinados con AG₃, observaron 6 - 8 nudos/explante siendo la inclusión de AG₃ lo que facilitó el crecimiento vertical del nudo con un aumento de la longitud entre nudos.

Tabla 2. Altura de planta, número de nudos y diámetro del tallo en la multiplicación *in vitro* de explantes de *Vanilla tahitensis* en medio MS suplementado con concentraciones de BAP, KIM y AG₃.

Tratamientos	Altura de planta (cm)	Número de nudos	Diámetro de tallo (mm)
T1= 1 BAP + 0,25 AG ₃	1,34 ± 0,05	1,49 ± 0,04 abc	1,66 ± 0,04 ab
T2= 1,5 BAP + 0,25 AG ₃	1,39 ± 0,07	1,56 ± 0,04 abc	1,63 ± 0,04 ab
T3= 2 BAP + 0,25 AG ₃	1,50 ± 0,08	1,67 ± 0,10 ab	1,72 ± 0,00 a
T4= 0,5 KIN + 0,25 AG ₃	0,94 ± 0,07	1,19 ± 0,05 c	1,33 ± 0,12 bc
T5= 0,75 KIN + 0,25 AG ₃	1,03 ± 0,00	0,38 ± 0,03 d	1,10 ± 0,02 c
T6= 1 KIN + 0,25 AG ₃	1,21 ± 0,00	1,33 ± 0,02 bc	1,52 ± 0,02 ab
T7= Testigo	2,50 ± 0,05	1,76 ± 0,06 a	1,79 ± 0,02 a
Probabilidad ANOVA			
Fuente de variación			
Tratamiento	0,072NS	0,000*	0,040*
Tratamiento vs Testigo	0,000*	0,004*	0,003*
Coefficiente de variación (%)	17,8	16,35	14,47

5.2.3. Diámetro de tallo (mm)

Se observó diferencias significativas en el análisis de varianza y en el ortogonal, logrando el mayor diámetro (1,72 mm) con 2 de BAP mg/L^{-1} + 0,25 AG₃ mg/L^{-1} y 1,79 mm cuando no se adicionó ningún fitorregulador al medio de cultivo. Sin embargo, las combinaciones de AG₃ con kinetina afectaron negativamente el diámetro de la planta. Lo que incide en que probablemente el BAP muestre un efecto positivo sobre el diámetro del tallo. En este sentido, los regulares de crecimiento utilizados incidieron en la arquitectura del tallo. Lo que sugiere que las giberelinas tienen un movimiento más generalmente bidireccional de la molécula en la planta (Hernández, 2015).

6. CONCLUSIONES

1. Los bajos niveles de contaminación microbiana en el establecimiento *in vitro* de los explantes se debió al protocolo de desinfección aplicado. Adicionalmente, los explantes se adaptaron de manera favorable a las condiciones de cultivo.
2. Los mejores resultados en las variables analizadas en la multiplicación *in vitro* se consiguieron adicionando al medio de cultivo 2 mg/L^{-1} BAP + $0,25 \text{ mg/L}^{-1}$ AG₃.

7. RECOMENDACIONES

1. Utilizar antibióticos en los medios de cultivos para evitar la contaminación bacteriana.
2. Probar otras dosis de giberelinas (AG₃) y combinarlas con otras hormonas en la fase de multiplicación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, A. (2019). *Vainilla aroma Chocó*.
- Apella, M., & Araujo, P. (2005). Microbiología de agua. Conceptos básicos. In *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua* (pp. 33–50). Universidad Nacional de San Martín. <https://doi.org/10.31819/9783954871568-002>
- Azofeifa-Bolaños, J., Paniagua-Vásquez, A., & García-García, J. (2014). Importancia y desafíos de la consevación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1), 189–202.
- Baltazar-Nieto, P. (2010). *Caracteres morfológicos de Vainilla (Vanilla planifolia J.) utilizados por el agricultor en la selección del materia reproductivo en cuatro municipios del Totonacapan, Mexico*. Colegio de Postgraduados.
- Bello-Bello, J., García-García, G. G., & Iglesias-Andreu, L. (2015). Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* JACKS.) bajo condiciones de lento crecimiento in vitro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(2), 165–171. <https://doi.org/10.35196/rfm.2015.2.165>
- Bohorquez-Sandoval, C., Alvarez Herrera, J., & Niño Medina, R. (2011). Giberelinas y 6-Bencilaminopurina en la plantulación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) híbrido Adrale RZ F1. *Temas Agrarios*, 16(2), 42–53. <https://doi.org/10.21897/rta.v16i2.690>
- Brunschwig, C., Collard, F.-X., Andrzejewski, S., & Raharivelomanana, P. (2017). Tahitian Vanilla (*Vanilla x tahitensis*): A Vanilla Species with Unique Features. In

Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants. (p. 13).
<https://doi.org/10.5772/66621>

Castro, J., Solís, M., Castro, R., & Calderón, C. (2019). Mini review: Uso de fitorreguladores en el manejo de cultivos agrícolas. *Frontera Biotecnológica*, *102*(3), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.02.006>

Cervantes Castillo, A., Lima Morales, M., Delgado Alvarado, A., Herrera Cabrera, B. E., Arévalo Galarza, G. A., Soto Hernandez, R. M., García Osorio, C., & Arévalo Galarza, M. de L. C. (2018). Calidad de frutos vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) procedente de la Huasteca Potosina, México. *Nova Scientia*, *10*(21), 360–378. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1586>

Chambers, A., Moon, P., Edmond, V. D. V., Bassil, E., & Valdes, D. (2019). Cultivo de vainilla en el sur de Florida. *Edis*, *2019*(6), 8. <https://doi.org/10.32473/edis-hs1350-2019>

Colombia, F. C. (2003). Manual de Fitoprotección y Análisis de Plaguicidas. In *Chemonics International*.

Cordova, D. (2007). *Reproducción in vitro de Vainilla (Vanilla planifolia A.) a partir de segmentos nodales y yemas axilares*. Zamorano.

Diez, M. (2014). *Ecofisiología de la vainilla Vanilla planifolia Andrews* [Universidad Nacional de Colombia]. <http://www.bdigital.unal.edu.co/49347/>

Divakaran, M., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2006). Conservation of Vanilla species, in vitro. *Scientia Horticulturae*, *110*(2), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.003>

Erawati, D. N., Wardati, I., Humaida, S., & Fisdiana, U. (2020). Micropropagation of

- Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) with modification of cytokinins. *Second International Conference on Food and Agriculture*, 411(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/411/1/012009>
- Explore France, P. (2017, June 13). *La vainilla de Tahití*. 13 de Junio de 2017.
<https://es.france.fr/es/las-islas-de-tahití/articulo/vainilla-tahiti>
- FAOSTAT. (2021). *Base de datos de la FAO sobre agricultura, comercio y alimentación*.
<http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Flores, O., Cuéllar, J., Montes, M., Gámez, M., Gónzales, M., Guevara, M., & Aguilar, N. (2017). Germinación in vitro de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. *Avances En Investigacion Agropecuaria*, 21(2), 70–81.
- Gamboa-Gaitán, M. (2014). Vainillas colombianas y su microbiota. II. Diversidad, cultivo y microorganismos endófitos. *Universitas Scientiarum*, 19(3), 287–300.
<https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-3.vcmd>
- Gantait, S., & Kundu, S. (2017). In vitro biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9). <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2462-1>
- Gätjens-Boniche, O., Acuña-Matamoros, C. ., Montero-Carmona, W., Díaz, C., & Torres, S. (2018). Propagación masiva Y formación de callos protocórmicos de vainilla a partir de ápices radicales. *Polibotánica*, 45, 157–180.
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.12>
- Hernández-Ruíz, J., Herrera-Cabrera, B., & Delgado-Alvarado, A. (2019). Variación morfológica del labelo de *Vanilla pompona* (Orchidaceae) en Oaxaca, México.

Revista Mexicana de Biodiversidad, 90(2).
<https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2209>

Indacochea-Ganchozo, B., Parrales-Villacreses, J., Castro-Piguave, C., Vera-Tumbaco, M., & Gabriel-Ortega, J. (2017). Aclimatación in vitro de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(2), 124–134. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2017.080200124>

Inderiati, S., & Ratnawati, R. (2019). In vitro propagation of vanilla (*Vanilla Planifolia* Andr.) on different concentration of cytokinins. *Agroplanta*, 8(12), 14–17.

Janarthanam, B., & Seshadri, S. (2008). Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(2), 84–89. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9123-4>

Jiménez, Á., López, D., García, D., Arenas, O., Rivera, J., Lara, M., & Silva, A. (2017). Diversidad de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y sus perfiles bioclimáticos en México. *Revista de Biología Tropical*, 65(3), 975–987. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i3.26809>

Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, LXXIII(1), 1–24.

Krikorian, A. (1993). Medios de Cultivo: Generalidades, composición y preparación. In *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (pp. 42–59).

Laguna-Ibarra, Y., Cueva-López, J., Tamariz-Angeles, C., & Olivera-Gonzales, P. (2019). Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *senecio calvus* (asteraceae), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21(2), 111–121.

- Loaiza, L. (2019). *Estudio preliminar para la reproducción asexual in vitro de vainilla (Vanilla tahitensis) en diferentes medios de cultivos asépticos.*
- Lozano, M., Peche, J., & Menchaca, R. (2015). Cultivo in vitro de yemas axilares de *Vanilla planifolia* con diferentes citocininas. *Rev.Biologico Agropecuaria Tuxpan.*, 4(6), 1153–1165.
https://www.academia.edu/24131704/Cultivo_in_vitro_de_yemas_axilares_de_Vanilla_planifolia_con_diferentes_citocininas
- Macas, R. (2019). Propagación de vainilla (*Vanilla tahitensis*) en diferentes medios de cultivo in vitro. In *Universidad de Guayaquil*. Universidad de Guayaquil.
- Martínez, L., & Gago, M. (2008). Micropropagación vegetal. In *Universidade de Vigo*.
http://revbigi.webs.uvigo.es/images/revbigi/2008/Rebigi_2008_07.pdf
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.
- Nagesh, K. (2008). High frequency multiple shoot induction of *Curculigo orchioides* Gaertn.: Shoot tip V/S rhizome Disc. *Taiwania*, 53(3), 242–247.
[https://doi.org/10.6165/tai.2008.53\(3\).242](https://doi.org/10.6165/tai.2008.53(3).242)
- Noorhazira, S., Nuraini, S. M. A., Laila, N., & Kharul, A. M. A. R. (2018). The effect of different nutrient media on in vitro shoot and root proliferation of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *African Journal of Biotechnology*, 17(39), 1241–1246.
<https://doi.org/10.5897/ajb2018.16610>
- Quintana, M., & Aguilar, J. (2020). Desarrollo de cultivos sostenibles de Vainilla en Ecuador. *Revista de Investigación Talentos*, 7(1), 64–72.
<https://doi.org/10.33789/talentos.7.1.123>

- Ramírez-Mosqueda, M., & Iglesias-Andreu, L. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 52, 154–160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Roskov, Y., Ower, G., Orrel, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., De Walt, R., Decock, W., Niekerken, E., Zarucchi, J., & Penev, L. (2020, November 20). In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life. Annual Checklist*. <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019/info/cite>
- Saldívar-Iglesias, P. (2015). *Cultivo de vainilla (Vanilla planifolia JACKSON)*.
- Sedano, G., Manzo, A., Roldán, R., & Castellanos, J. (2015). Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 451–456.
- Segretín, M. (2007). *Los cultivos celulares y sus aplicacionesII (Cultivos de células vegetales)*. <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos celulares II Euge.pdf>
- Tan, B., Chin, C., & Alderson, P. (2011). An Improved Plant Regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Tissue Cult. & Biotech*, 21(1), 27–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.3329/ptcb.v21i1.9560>
- Villanueva, S. (2017). *Estructura genética de Vanilla planifolia Andrews silvestre en la península de Yucatán, México: implicaciones para la conservación de la especie*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Posgrado en Ciencias Biológicas.
- Zuraida, A., Hassan, K., Liyana, F., Nazreena, O., Sembok, W., Zaliha, W., Mohd, C., Che, Z., Zamri, Z., & Sreeramanan, S. (2013). A Simple and Efficient Protocol for

the Mass Propagation of *Vanilla planifolia*. *American Journal of Plant Sciences*, 4,
1685–1692. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.49205>