UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

CENTRO DE POSTGRADOS

MAESTRÍA EN AGRONOMÍA

MENCIÓN SISTEMAS AGROPECUARIOS

PROYECTO DE INNOVACIÓN PRESENTADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAGISTER EN AGRONOMÍA

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN A BROTES DE EXPLANTES DE *Vanilla sp.* A NIVEL DE CULTIVO *in vitro* EN EL CIPCA, CANTÓN AROSEMENA TOLA, NAPO.

AUTORA: MARIANA ANDREÍNA VALLE SUÁREZ

DIRECTORA DEL PROYECTO: MSc. SANDRA SORIA RE

PUYO- ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Mariana Andreína Valle Suárez, certifico libremente que los criterios y opiniones que constan en el Proyecto de Innovación titulado "Establecimiento de un protocolo para la inducción a brotes de explantes de *Vanilla sp.* a nivel de cultivo in vitro en el CIPCA, cantón Arosemena Tola, Napo" son de mi exclusiva responsabilidad, respetando fuentes de información de terceros, así como de pensamientos inéditos y que los resultados derivados del proceso de investigación son propiedad de la Universidad Estatal Amazónica para hacer uso del contenido con fines académicos o de investigación .



Mariana Andreína Valle Suárez

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

Centro de Postgrados

AVAL

Quien suscribe Sandra Luisa Soria Re, Directora del Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Innovación titulado: Establecimiento de un protocolo para la inducción a brotes de explantes de *Vanilla* sp. a nivel de cultivo in vitro en el CIPCA, cantón Arosemena Tola, Napo a cargo de Mariana Andreína Valle Suárez egresada de la primera cohorte de la Maestría en Agronomía mención Sistemas Agropecuarios de la Universidad Estatal Amazónica.

Certifico haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de Innovación y considero cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la normativa vigente de la institución por lo que se encuentra listo para ser sustentado.

Por lo antes expuesto se avala el Proyecto de innovación para que sea presentado ante la Dirección de Posgrado como forma de titulación como Magister en Agronomía mención Sistemas Agropecuarios y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para que a si conste, firmo la presente a los 31 días del mes de octubre de 2018.

Atentamente,



Sandra Luisa Soria Re

DIRECTORA DEL PROYECTO DE INNOVACION

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

En nuestra calidad de tribunal de sustentación del proyecto de innovación titulado, "Establecimiento de un protocolo para la inducción a brotes de explantes de *Vanilla sp*. a nivel de cultivo *in vitro* en el CIPCA, cantón Arosemena Tola, Napo" de la autora Mariana Andreína Valle Suárez, maestrante en Agronomía, Mención en Sistemas Agropecuarios, certificamos que reúne los requisitos y méritos suficientes, para su aprobación. Los miembros del tribunal que examinamos el presente documento, aprobamos el proyecto de investigación.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

.....

Dr. C. Javier Domínguez, PhD.

.....

Dr. C. Yoel Rodríguez, PhD.

.....

Dra. C. Karina Carrera, PhD.

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND

Oficio No. 063-IL-UEA-2018

Puyo, 20 de noviembre de 2018

Por medio del presente **CERTIFICO** que:

El trabajo de titulación correspondiente a la ING. VALLE SUÁREZ MARIANA ANDREINA, con C.I. 1718477605, con el Tema: **"Establecimiento de un protocolo para la inducción a brotes de explantes de *Vanilla* sp. a nivel de cultivo In vitro en el CIPCA, Cantón Arosemena Tola"**, de la Maestría en Agronomía, Mención Sistemas Agropecuarios, Directora de proyecto Ing. Sandra Soria Re, MSc, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 1%, Informe generado con fecha 20 de noviembre de 2018 por parte del director, conforme archivo adjunto.

Particular que comunico para los fines pertinentes

Atentamente,

Ing. Italo Marcelo Lara Pilco MSc.
ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Estatal Amazónica, por brindarme la oportunidad de estudiar la Maestría en Agronomía, mención Sistemas Agropecuarios.

A la Dirección del Centro de Postgrados, coordinación de la Maestría y a todos los docentes que replicaron sus conocimientos; lo cual me permitirá continuar creciendo profesionalmente.

Enormes agradecimientos a mi directora de tesis, Ing. Sandra Soria Re, MsC., por depositar su esperanza en mí; su apoyo incondicional y ser una guía de conocimientos durante el proceso de investigación.

Un agradecimiento al personal de los laboratorios de Biotecnología Vegetal y de Biología y Entomología de la Universidad Estatal Amazónica por su apoyo y ayuda.

A mis compañeros de aula, especialmente al Ing. Wilfrido de la Cruz por el apoyo con el material vegetativo de esta investigación, así también a Laura por su amistad, ánimo y confianza durante el periodo estudiantil.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios, por darme la fortaleza y sabiduría necesaria para que mis sueños se sigan haciendo realidad. A mis padres Ángel Serafín Valle y Mariana de Jesús Suárez por enseñarme a seguir el camino de la superación, y a no desmayar hasta conseguir sueños. A mis hermanos por el cariño y apoyo moral que siempre me brindan y finalmente a mi compañero de vida, Rodrigo, por el amor y paciencia que me brinda día a día. Todos son mi vida, inspiración y mi motivo de superación. Con amor les dedico este trabajo.

Mariana Andreína Valle Suárez

RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

Vanilla sp., es una especie de orquídea de importancia comercial, que en la provincia de Pastaza no está explotada, por sus características podría ser un cultivo alternativo para los agricultores. Es una especie vulnerable, que se propaga por esquejes, permite la aplicación de técnicas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos vegetales. Con esta investigación se propone desinfectar explantes nodales, y estandarizar el medio de cultivo para su introducción. Se evaluaron dos protocolos de desinfección. El primero con tres tratamientos a concentraciones de 1, 1.5 y 2% de cloro comercial por 15 minutos. El segundo con variaciones de concentración al 10, 15 y 20% de cloro más la inmersión de explantes en una solución fungicida (Bravo 720 ®) al 1% durante 5 minutos seguida de cinco enjuagues con agua destilada estéril.

Se determinó que la desinfección al 20% con cloro durante 20 minutos más el fungicida, presentó mayor sobrevivencia de explantes hasta el día 21. Para inducir a brotes fueron repicados a un medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), suplementado con sacarosa al 3%, agar al 0,8% y concentraciones factoriales inversamente proporcionales de 0 a 5 mg/L de Bencil Amino Purina (BAP) y Kinetina (KN). A los siete días de transferidos los explantes, se obtuvo como resultado que a concentraciones de 4 mg/L de BAP y 1 mg/L de KN brotaron un total de 33,33% divididos en 11,11% de explantes con brotes y raíz; y 22,22% que desarrollaron solo brotes. El 66,67% restante no reaccionaron favorablemente al medio probado.

Palabras claves: Vainilla, desinfección de explantes, inducción a brotes, cultivo de tejidos.

ABSTRACT AND KEYWORDS

Vanilla sp. is an orchid species of commercial importance, which in the province of Pastaza is not used, by its characteristics could become an alternative crop for farmers. It is a vulnerable species, which is propagated by cuttings and allows application of biotechnological techniques, such as the plant tissues culture. This research proposes to disinfect vanilla nodal explants, and to standardize a culture medium for shoot induction. Two disinfection protocols were evaluated. The first with three treatments at a concentration of 1%, 1,5% and 2% of chlorine for 15 minutes. The second one with variations of chorine concentration to 10%, 15% and 20% plus the explants immersion in a fungicide solution (Bravo 720 ®) at 1% for 5 minutes and rinsed five times with sterile distilled water.

It was determined that disinfection with 20% chlorine for 20 minutes plus the fungicide, wich showed the highest explants´ survival until day 21, to induce shoots development were repicated to a culture medium of Murashige and Skoog (1962), supplemented with 3% sucrose, 0,8% agar and inversely proportional factorial concentrations of 0 to 5 mg/L de Benzyl Amino Purine (BAP) y Kinetine (KN). Seven days after transfer shoot induction was achieved with 4 mg/L of BAP and 1 mg/L of KN. A total of 33,33% sprouted explants were divided into 11.11% with shoots and root; 22,22% developed only buds and 66,67% did not react well to the tested medium.

Key words: Vanilla, explants´ disinfection, shoot induction, tissue culture

TABLA DE CONTENIDO, FIGURAS Y TABLAS

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS .....
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN .....
AGRADECIMIENTOS .....
DEDICATORIA .....
RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES .....
ABSTRACT AND KEYWORDS .....
CAPÍTULO I 1
INTRODUCCIÓN 1
Problema 3
Hipótesis 4
Objetivos 4
Objetivo General 4
Objetivos Específicos 4
CAPÍTULO II 5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 5
2.1. *Vanilla* sp. 5
2.1.1. Características generales 5
2.1.2. Clasificación Botánica 5
2.1.3. Descripción botánica 5
2.1.4. Enfermedades y plagas 6
2.1.5. Principales compuestos 7
2.1.6. Métodos de Reproducción 7
2.1.7. Propiedades y usos 8
2.2. Cultivo *in vitro* 8
2.2.1. Selección del material vegetal 9
2.2.2. Establecimiento de un cultivo primario 9
2.2.3. Fase de inducción a brotes 11
2.2.4. Fase de multiplicación 11
2.2.5. Fase de enraizamiento 11
2.2.6. Fase de acondicionamiento y aclimatación 11
2.3. Factores hormonales 11G

2.3.1. Auxinas 12
2.3.2. Citoquininas 12
2.3.3. Giberelinas 13
2.3.4. Etileno 13
2.3.5. Ácido Abscísico 14
CAPÍTULO III 15
MATERIALES Y MÉTODOS 15
3.1. Localización de la investigación 15
3.2. Tipo de investigación 16
3.3. Métodos de investigación 16
3.3.1. Obtención y selección de las plantas madre 16
3.3.2. Selección y desinfección del explante 17
3.3.3. Inducción de brotes 22
3.4. Diseño experimental y tratamiento de datos 23
3.5. Recursos Humanos y materiales. 24
CAPÍTULO IV 25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 25
4.1. Metodología de desinfección del material vegetal 25
4.1.1. Protocolo de desinfección del experimento uno 25
4.1.2. Protocolo de desinfección del experimento dos 28
4.1.3. Identificación de microorganismos contaminantes 31
4.2. Protocolo de desinfección 34
4.3. Inducción de brotes 36
CONCLUSIONES 37
RECOMENDACIONES 38
BIBLIOGRAFIA 39
ANEXOS 47

FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Fuente: Robalino 2018 15
Figura 2. Mapa de ubicación del punto de muestreo del material vegetativo. Fuente: Robalino 2018..... 17
Figura 3. Ramas seleccionas de vainilla. Fuente: Valle 2018 17
Figura 4 Cortes en los segmentos nodales. Fuente: Valle 2018 18
Figura 5. (A) Agua corriente. (B) Solución con detergente. (C) Agua destilada. Fuente: Valle 2018..... 18
Figura 6. Explantes en soluciones de cloro comercial a diferentes concentraciones. Fuente: Valle 2018..... 19
Figura 7. Proceso de desinfección. (A) Preparación de soluciones. (B) Tratamiento de alcohol, cloro comercial y fungicida. Fuente: Valle 2018..... 21
Figura 8. (A) Preparación. (B) Medios de cultivo a diferentes concentraciones de hormonas. Fuente: Valle 2018..... 23
Figura 9. Contaminación en el protocolo de desinfección uno de explantes de *Vanill*a sp. 27
Figura 10. Protocolo de desinfección dos para explantes nodales de vainilla..... 30
Figura 11. Frascos control sin presencia de contaminación. Fuente: Valle 2018 31
Figura 12. *Aspergillus* sp., observado en el microscopio con el objetivo 100X 32
Figura 13. *Fusarium* sp., observado en el microscopio con el objetivo 100X..... 33
Figura 14. Levadura, observado en el microscopio con el objetivo 100X..... 33
Figura 15. Bacterias, observado en el microscopio con el objetivo 100X 33
Figura 16. Protocolo recomendado de desinfección de explantes de vainilla. 35
Figura 17 . Porcentaje de explantes con brotes. 36

TABLAS

Tabla 1. Tratamientos a diferentes concentraciones de cloro comercial, para desinfectar explantes de vainilla 19
Tabla 2. Tratamiento a diferentes concentraciones de cloro comercial para dosificar a los explantes de vainilla 20
Tabla 3. Diferentes concentraciones de hormonas, para inducir a brotes de explantes de *Vanilla* sp. 22
Tabla 4. Resumen según el protocolo de desinfección 23
Tabla 5. Análisis de varianza del protocolo de desinfección uno 25
Tabla 6. Tabla de frecuencia para el número de frascos contaminados y porcentaje de contaminación de explantes desinfectados de vainilla 26
Tabla 7. Análisis de varianza del protocolo de desinfección dos, de explantes nodales de *Vanilla* sp. 29
Tabla 8. Tabla de frecuencia para el número de frascos contaminados y porcentaje de contaminación, de explantes nodales de *Vanilla* sp. 29

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla* sp.*)*, es una especie de orquídea utilizada para la producción de vainillina natural a nivel mundial, México tuvo el monopolio de este producto por casi tres siglos (Bermúdez, 2015). Después la producción fue liderada por Madagascar con un total del 40% y actualmente Indonesia produce el 44% de la vainilla a nivel mundial. El principal mercado es Estados Unidos que adquiere más de la mitad de la producción, seguido por países europeos como Inglaterra, Alemania y Francia según la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (SAGARPA, 2017).

El cultivo de la vainilla al ser una actividad productiva con fines agroindustriales, de alto valor agregado, requiere un cierto nivel de conocimiento sobre el manejo agronómico que en algunos casos es incipiente, este cultivo se inserta dentro de sistemas de producción agroforestales y puede constituir una fuente de ingresos significativa y complementaria para los agricultores, debido a que las características de la planta en forma, color, gusto y aroma son atractivas (Córdova, Montoya y Díez, 2012).

En Ecuador existe una alta biodiversidad del género *Vanilla* pero paradójicamente en el país es poco explotada, existen plantaciones dentro de sistemas agroforestales con fines de biocomercio en la provincia de Napo. No se conocen iniciativas productivas aún en la provincia de Pastaza por lo que puede considerarse como un recurso alternativo para la agricultura agroecológica, que propicie seguridad alimentaria, tomando en cuenta que Pastaza cuenta con las características topográficas, climáticas y altitudinales favorables para el cultivo y de hecho existen varias especies del este género como parte de diversidad florística que la provincia posee; por ello, el manejo apropiado de esta orquídea puede tener un impacto social, económico, y ecológico importante.

La importancia social del cultivo radica en el hecho de que no necesita áreas extensas de terreno para su siembra, aprovechando tutores como árboles de cítricos o arbustos. Además, permite emplear mano de obra familiar ya que el proceso de polinización es manual, para lo cual es necesario tener herramientas y habilidades prácticas; lo que abre la puerta a una producción de vainilla con un alto potencial (Vargas, 2015).

Desde el punto de vista económico, la vainilla es la segunda especie más cara del mundo después del azafrán. Debido a sus excelentes características la vainilla es utilizada en el ámbito alimenticio, especialmente como saborizante para la elaboración de dulces, postres y perfumería; sin embargo, por su costo se utiliza en su mayoría vainillina artificial, lo que demuestra que la producción y comercialización de vainilla permitirá acceder a un nicho de mercado específico que abarca el ámbito de la cocina gourmet y perfumería que se estima insatisfecho aún (Azofeifa, Vásquez y García, 2014).

Se puede indicar también que tiene una importancia ecológica ya que la vainilla al ser una orquídea de bosque tropical, con hábito hemi-epífito, que se desarrolla en el sotobosque, se sostiene de sus raíces aéreas sobre troncos de árboles tutores y crece hasta alcanzar el dosel, desarrolla raíces de anclaje en materia orgánica en descomposición y se conoce que desarrolla complejas interrelaciones con microorganismos del sustrato y con micorrizas para optimizar la absorción de nutrientes. si bien su flor es grande y atractiva también es efímera; sin embargo, como otras orquídeas posee una biología reproductiva y dinámicas de crecimiento complejas, lo que permite valorizar los bosques y los recursos naturales, atribuyendo salud a los bosques y brindando la posibilidad de formar zonas de reserva forestal al disminuir la presión sobre la explotación de los bosques (Díez, 2014).

La reproducción sexual de la vainilla por medios convencionales produce resultados desalentadores, debido a que existen barreras de autoincompatibilidad física en la estructura floral y su medio natural de polinización es a través de insectos que en la actualidad parecen no estar presentes en los ecosistemas de bosque húmedo tropical y bosque muy húmedo donde se desarrollan, razón por la que se requiere el manejo de la polinización manual para lograr la producción de frutos, y a su vez semillas que mantienen la característica de poseer un bajo poder de germinación, motivo por el cual a nivel de agricultores la vainilla se propaga únicamente de forma asexual a través de esquejes de longitud variable según la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (SAGARPA, 2014 y Azofeifa-Bolaños, Rivera-Coto, Paniagua-Vásquez, Cordero-Solorzano, 2018).

Con estos antecedentes se busca la estandarización de un protocolo para la desinfección de los explantes para introducción e inducción a brotes de explantes de *Vanilla* sp. con la finalidad de a futuro lograr su propagación y preservación de la planta, mediante el

establecimiento de cultivo *in vitro* de tejidos de vainilla a través de métodos convencionales como: es la micropropagación.

La micropropagación consiste en cultivar células, tejidos u órganos vegetales en medios de cultivo estandarizados, bajo condiciones asépticas, temperatura, humedad y luz controladas; y, además, esta técnica ofrece muchas aplicaciones prácticas para la agricultura, la horticultura y la industria química, al eliminar enfermedades para obtener plantas sanas, mejorar plantas y en ciertos casos la producción de metabolitos secundarios (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Este aislamiento de órganos vegetales como son las yemas axilares en este caso, bajo las condiciones necesarias que requiere el explante, permitirá la inducción a brotes a partir de segmentos nodales, lo cual generará respuestas para determinar las condiciones adecuadas para la introducción de material proveniente de campo y un protocolo para iniciar con el proceso de microprogación de la planta de vainilla.

En la provincia de Pastaza, no existe un invernadero, plantaciones o entidad que cuente con el número significativo de plantas necesarias para la implementación de cultivos de vainilla a pequeña y mediana escala para quienes deseen realizar la siembra de la vainilla, siendo la agricultura una de las actividades con mayor relevancia en la economía del país.

Además, en la literatura consultada no se ha registrado en la provincia Pastaza, estudios referentes al cultivo *in vitro* de vainilla, por lo que al ser una especie vulnerable se recurre al uso de estas técnicas, donde se determinará el protocolo de desinfección y el medio de cultivo adecuado para el inicio de la micropropagación.

Con este antecedente se estandarizarán las herramientas necesarias para impulsar a futuro el que los agricultores puedan sembrar este cultivo que es la base para incentivarlos a tomar en cuenta esta especie.

Por lo que el problema de la investigación está relacionado:

Problema

¿Cómo lograr la desinfección de explantes de material vegetativo de *Vanilla* sp., para cultivo *in vitro* en el Centro de Investigación y Conservación Amazónica (CIPCA), debido a su vulnerabilidad en condiciones naturales para procesos de conservación de la especie?

Hipótesis

Con todas estas consideraciones, el presente trabajo se propone como hipótesis:

La desinfección de los explantes de *Vanilla* sp., en determinadas concentraciones, permitirá lograr la asepsia *in vitro* para entonces inducir a brotes en ensayos utilizando reguladores de crecimiento.

Para comprobar esta hipótesis, se plantean como objetivos los siguientes:

Objetivos

Objetivo General

Establecer un protocolo para la inducción a brotes de explantes de *Vanilla sp.* a nivel de cultivo *in vitro* en el CIPCA.

Objetivos Específicos

- Proponer una metodología de desinfección del material vegetal, para mantener el control de la contaminación microbiana en el medio de cultivo.
- Estandarizar el medio de cultivo para la inducción a brotes *in vitro* de la planta de vainilla, mediante ensayos con reguladores de crecimiento.

CAPÍTULO II
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Vanilla* sp.

2.1.1. Características generales

La vainilla (*Vanilla* sp.*)*, es una planta nativa de México, denominada también como vainilla fina o vaina de vainilla, es la única orquídea aromática sin fines ornamentales, cultivada principalmente por la presencia de sus capsulas de los cuales se obtiene el extracto saborizante y aromatizante de vainilla, cuyo principio activo es la vainillina (Gamboa, 2014).

El cultivo de la vainilla se desarrolla propiamente en un clima cálido húmedo, altitud de hasta 800 msnm, lluvia de 2000 mm anuales, temperatura de aproximadamente 24 °C y suelo acompañado de materia orgánica y drenaje adecuado (Elorza et al., 2007).

2.1.2. Clasificación Botánica

De acuerdo con Fouché y Jouve (1999) la taxonomía de la vainilla la identifica como un miembro del:

Reino: Plantae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Género: *Vanilla*

Con 110 especies, de las cuales tres producen frutos comestibles: *V. tahitensis*, *V. pompona y V. planifolia;* esta última es la de mayor interés (Cid y López, 2011).

2.1.3. Descripción botánica

Fernández- Concha (2012), afirma que la vainilla es una orquídea enredadera, de hábito trepador, que presenta la siguiente descripción botánica:

2.1.3.1. Tallo

Posee un tallo cilíndrico, lisos y conformado por entrenudos, lugar de donde nacen las raíces, y que le permite tener la capacidad de sujeción y anclaje a materia orgánica. Son axilares por lo que crecen opuestas a las hojas y pueden extenderse a varios metros de distancia por la superficie de árboles o tutores con los que se trabaja (Kelso-Bucio, Ba, Sánchez-Morales, Reyes-López, 2012).

2.1.3.2. Hojas

Fernández- Concha (2012) indica que las hojas de la planta de vainilla son elipticas, oblongas y de consistencia coriácea; de forma que los márgenes foliares divergen desde la base hasta el centro, para luego hacer convergencia apicalmente.

2.1.3.3. Flor

De color amarillo verdoso, que pueden llegar a medir hasta 5 cm de ancho; caracterizada por ser hermafrodita, dado que las características como el tamaño de la flor, requiere transferir el polen de la antera al estigma, mediante polinización manual, para producir la semilla debido a la presencia de estructuras para favorecer la autoincompatibilidad en la fecundación y debido también a que los insectos polinizadores han disminuido (Soto, 2009 y Cid y López, 2011).

2.1.3.4. Fruto

Se produce después de la polinización, aproximadamente a los nueve meses de maduración, es una vaina que puede oscilar de 15 a 20 cm de largo, denominadas también como habas de vainilla y son producidas solo cuando la planta está madura. Carece de olor; sin embargo, es el órgano más importante ya que en él están presentes los compuestos aromáticos de la planta (Hernández, 2011).

2.1.4. Enfermedades y plagas

Las enfermedades en la planta de vainilla pueden darse por el manejo inadecuado del cultivo. La pudrición de raíz y tallo, es causada por un hongo dañino denominado como *Fusarium oxysporum* (Schltdl.) que puede permanecer en el suelo por tiempos prolongados. Los

problemas inician con la presencia de lesiones café oscuro, hasta que hay necrosis y muerte del tejido (Jiménez, Schmidt, Quesada, Moreira, 2015).

Además, Vargas y Gamez (2014) afirma que *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz & Sacc.), es un hongo que genera manchas irregulares de color café oscuro en hojas, tallos y flores de la planta de vainilla.

Se ha visto afectado por distintas plagas como la presencia del chinche rojo cuyo nombre científico es *Tenthecoris confusus* (Hsiao and Sailer) que se alimenta de la savia de la planta permitiendo la entrada de hongos y bacterias, cuya sintomatología empieza con la pudrición de hojas hasta secamiento y defoliación total de la planta. El gusano peludo con nombre científico *Plusia aurífera* (Hübner), se alimenta de los cogollos de la planta generando heridas en la planta lo cual repercute en el crecimiento lento y la no generación de nuevos brotes (Vargas y Gamez, 2014).

2.1.5. Principales compuestos

Vainillina es el compuesto orgánico, metil protocatequinico (4–hidroxi–3-metoxibenzaldehído), formado por el 85% del total de sustancias volátiles que se encuentran en las vainas de la planta, los cuales producen el aroma característico y sabor de vainilla, cuando sus enzimas reaccionan en los procesos de curado. El porcentaje restante se distribuye en la planta y corresponde a ácidos, fenoles, ésteres, eugenol y compuestos de carbonilo (Shruthi, 2013).

2.1.6. Métodos de Reproducción

La reproducción sexual de la vainilla en su medio natural es poco exitosa y solo el 0.1 al 1% de sus flores son fecundado, debido a la estructura del estigma de la flor, así como también al escaso número de insectos polinizadores presentes en el ecosistema, por lo que cada flor tiene que ser auto polinizada manualmente para formar un fruto (Menchaca et al., 2011).

La vainilla se propaga únicamente de forma asexual por lo que la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-SAGARPA (2014), indica que la reproducción de la planta de vainilla generalmente se realiza por esquejes o bejuco, debe de ser por lo menos de 80 cm de longitud con cuatro o cinco yemas viables.

2.1.7. Propiedades y usos

Las propiedades que ofrece la planta se derivan de los compuestos orgánicos que están presentes y se concentran en el fruto. Las infusiones de las vainas de vainilla provocan una pérdida de peso en donde el aceite favorece a la digestión. Las concentraciones de hidroxibenzaldehído combaten la depresión por lo que se considera como un elevador del ánimo, con efectos calmantes que contrarrestan la melancolía, ansiedad y la hiperactividad. Además, el eugenol presente en la vainilla brinda propiedades analgésicas y asépticas, y es utilizado generalmente para la elaboración de pasta dental. El extracto o aceite de vainilla activan las hormonas estrógenas actuando como regulador de la menstruación (Uchida, 2011).

Geetha y Shetty (2000) señalan que la vainillina a más de las propiedades terapéuticas y de estimulante aromático; tiene una amplia utilidad a nivel mundial, principalmente en la industria alimenticia como condimento, en la elaboración postres, panes, galletas, bebidas, cocteles, chocolates; saborizante para la preparación de helados y en la industria cosmética para perfumes, cremas; agroindustria, etc.

2.2. Cultivo *in vitro*

La biotecnología, a través del cultivo de tejidos *in vitro* permite establecer protocolos para la micropropagación de diferentes explantes, para la proliferación de brotes en medios de cultivo artificiales y condiciones ambientales controladas, obteniendo plántulas o clones, es decir plantas genéticamente iguales al material parental cultivado (Bartolini y Lallana, 1995).

Las fases de las técnicas de cultivo *in vitro* incluyen la selección del material vegetal, el establecimiento de un cultivo primario, inducción a brotes, multiplicación o micropropagación, enraizamiento, acondicionamiento y aclimatación (Calva y Pérez, 2005).

La conservación de los recursos genéticos de *Vainilla* sp., mediante el establecimiento del cultivo *in vitro*, es otra alternativa fundamental para incrementar la población de plantas, y por ende impedir un posible peligro de extinción en la naturaleza (Azofeifa, Vásquez y García, 2014). A través del cultivo *in vitro* se pueden emprender acciones de conservación, como alternativa a los sistemas tradicionales en bancos, jardines botánicos o huertos clonales (Bello, García e Iglesias, 2015)

2.2.1. Selección del material vegetal

Flores, Jiménez y Chacón (2009), afirman que la obtención de los explantes constituye la herramienta fundamental para el desarrollo de la micropropagación, por lo que la planta madre o donadora, debe estar bajo invernadero condición que le permita tener las mejores características, y pueda considerarse libre de enfermedades debido al desarrollo bajo condiciones controladas y de manejo fitosanitario.

Además, Cancino-Escalante, Quevedo, Villamizar, Carvajal (2015), aseguran que la supervivencia de los explantes depende de la selección del material vegetal ya que su elección está influenciada por factores como la época del año, el estado fisiológico de la planta, condiciones ambientales y su morfología.

2.2.2. Establecimiento de un cultivo primario

Se establece el explante libre de contaminantes externos, a través de metodologías de desinfección superficial y/o sistémica, también se pueden presentar problemas de necrosis y oxidación del material vegetal que deben solventarse modificando la composición del medio de cultivo con antioxidantes (Lidoy, 2014).

García, Mesa y Ocampo (2015) indican que hay que tomar en cuenta que uno de los problemas en cultivo *in vitro*, es la presencia de microrganismos contaminantes que perjudican la viabilidad y por ende el crecimiento y desarrollo de los explantes; razón por la cual el proceso de desinfección es primordial; ya que permite minimizar e incluso eliminar a los microoganismos hasta lograr la asepsia total en el material introducido.

Para establecer explantes libres de contaminación se usan sustancias o agentes desinfectantes, como etanol (C_2H_5OH), hipoclorito de sodio (NaClO) o su forma de cloro comercial, hipoclorito de calcio ($Ca(ClO)_2$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y cloruro de mercurio ($HgCl_2$); también se han usado fungicidas de contacto y/o sistémicos y antibióticos en la planta madre, explantes o medio de cultivo (Bogado, Vera, Ayala, Sansberro y Luna, 2016).

Los alcoholes actúan destruyendo la membrana celular, por reducción de su tensión superficial, y desnaturalizando las proteínas. Su eficacia está basada en la presencia de agua, ya que así penetra mejor en las células y bacterias permitiendo el daño a la membrana y rápida desnaturalización de las proteínas, con la consiguiente interferencia con el

metabolismo y lisis celular. Su acción es rápida, principalmente en concentraciones de 70% permite su mejor penetración en el protoplasma bacteriano (Diomedi, et al., 2017).

Solano (2013), afirma que el hipoclorito de sodio (NaClO). Además, Antón y Andrés (2015), indican que cuando es diluido con agua es conocido como cloro o lejía. El efecto del cloro sobre los microorganismos está en función de su concentración, este efecto puede centrarse en la inhibición de la síntesis del ADN, inhibición de síntesis proteica y la ruptura de la membrana celular.

El hipoclorito de calcio, es un polvo granuloso de color beige claro, conocido como cal clorada o cal muerta. Se utiliza en concentraciones altas como desinfectante para eliminar microorganismos (Aguirre, 2016).

López et al. (2014) asegura que el peróxido de hidrógeno, es un compuesto líquido incoloro, conocido como agua oxigenada. Es bactericida, esporicida, según su concentración. Es de fácil aplicación y no presenta toxicidad residual. Su mecanismo de acción no está totalmente ilustrado; sin embargo, está involucrado en la oxidación de grupos sulfidrílicos de las proteínas microbiana.

El cloruro de mercurio o bicloruro de mercurio es una sal soluble en agua, utilizada como desinfectante para el control de la contaminación de hongos y bacterias endógenas; sin embargo, al ser de elevada toxicidad, debe ser usado con cautela ya que puede causar intoxicación para los organismos acuáticos y el personal que lo manipula; por lo tanto, se lo emplea cuando se han agotado las posibilidades con los otros compuestos de uso frecuente en los laboratorios. (Beltrán y Mesa, 2014).

Los fungicidas son sustancias que se utilizan para controlar las enfermedades en plantas, ya que previenen y eliminan el desarrollo de hongos. Existen fungicidas de contacto y sistémicos. Los fungicidas protectantes actúan sobre la superficie de la planta y evitan que los esporangios germinen y penetren a las células, mientras que los fungicidas sistémicos se absorben mediante el follaje o las raíces y tienen la capacidad de moverse del lado superior de la hoja al inferior, pero no de hoja a hoja. Los fungicidas sistémicos afectan varias etapas de la vida de los hongos (Pérez y Forbes, 2014).

2.2.3. Fase de inducción a brotes

El explante desinfectado, cortado en tamaño y forma apropiada respetando las técnicas de manipulación aséptica, es colocado en el medio de cultivo que contenga un equilibrio nutricional suplementado con fuentes de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento, entre otros; para la iniciación de brotes (Lidoy, 2014).

2.2.4. Fase de multiplicación

El desarrollo de brotes con hojas formadas, se le denomina como proliferación, debido a que los brotes nuevos se forman a partir del explante original, los brotes son subcultivados, bajo condiciones de asepsia, con el objetivo de aumentar gradualmente el número de plántulas, que puede tener un crecimiento exponencial (Hine y Abdelnour, 2013).

2.2.5. Fase de enraizamiento

La formación del sistema radical, es el resultado del enraizamiento, en donde el brote tiene aproximadamente un tamaño de 2 centímetros de altura y requiere un cambio del balance hormonal para favorecer el crecimiento de raíces y lograr la obtención de la plántula completa, en ciertos casos se consiguen resultados favorables al eliminar los reguladores de crecimiento, se requiere la adición de carbón activado en el medio de enraizamiento para favorecer el desarrollo radicular (Rojas, Cuzquén y Delgado, 2014).

2.2.6. Fase de acondicionamiento y aclimatación

Las plántulas enraizadas se siembran en recipientes pequeños con sustrato estéril, con la finalidad de lograr su adaptación al medio exterior, manejando progresivamente el aumento de la intensidad de luz y disminución de humedad (Izquierdo y Quione, 2001). Para el acondicionamiento se adaptan diferentes microinvernaderos para que la planta desarrolle raíces verdaderas, las hojas activen su capacidad fotosintética, soporten la curva térmica y de humedad ambiental diaria, momento en el cual las plántulas pasan a procesos de aclimatación en invernadero y finalmente a campo abierto.

2.3. Factores hormonales

El crecimiento y desarrollo de los explantes en las fases de inducción a brotes, multiplicación y enraizamiento requieren de factores hormonales que pueden influir en la fisiología de la

planta. Las hormonas son reguladores de crecimiento que se sintetizan en concentraciones bajas y en cualquier parte de la planta, los cuales integran estímulos externos y pueden ejercer su función en el mismo órgano de la planta o en otro; regulando eventos fisiológicos definidos (Garay, Paz, García, Álvarez y Gutierrez, 2014).

Existen los siguientes grupos de hormonas vegetales:

2.3.1. Auxinas

Según Jiménez (2015), las hormonas participan durante el crecimiento de la planta, ya que intervienen en los procesos de elongación y división celular, principalmente en el desarrollo del tallo, crecimiento de raíces, floración y desarrollo de frutos. Se han observado niveles de auxinas endógenas en todos los tejidos vegetales, siendo su síntesis mucho mayor en aquellos tejidos que están en crecimiento, como los meristemos apicales, hojas jóvenes o frutos.

Además, las auxinas intervienen en la síntesis del etileno, que es un inhibidor del crecimiento radicular, controlando de esa forma el desarrollo adecuado de las mismas. Se ha visto que esta hormona también tiene un papel importante a la hora de regular los tropismos (movimientos durante el crecimiento provocados por un estímulo direccional como puede ser la gravedad, la presencia de luz o el contacto). Las auxinas controlan el crecimiento del tallo y regulan la dirección de éste por efecto de los tropismos, ya que la auxina que se produce en el ápice, en vez de ser transportada a la base es dirigida hacia el lado sombreado (Jiménez, 2015).

Según Vega-Celedón, Canchignia, Gonzáles, Seeger (2016) indica que de las moléculas que integran este grupo de hormonas, el ácido indol acético, es el más utilizado; sin embargo, existen otras formas como el 4 cloro indolacético, ácido fenil acético, ácido indol butírico, ácido indol propiónico. También existen auxinas sintéticas con aplicaciones a la agricultura como ácido naftalenacético, ácido 2 metóxi; 3,6 di cloro benzoico, ácido 2,4 diclorofenoxibutírico (2,4-DB) o el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético.

2.3.2. Citoquininas

El nombre de esta hormona deriva del término citocinesis que hace referencia a la división celular. Al igual que las auxinas interviene en los procesos de elongación y división celular, mediante un incremento de la plasticidad de las paredes celulares (Villatoro, 2014).

Estimulan procesos metabólicos, bioquímicos, fisiológicos y de desarrollo de la planta. Disminuyen la dominancia apical, permitiendo el crecimiento de ramificaciones laterales (ramas) e iniciación de yemas (follaje). También interviene en el movimiento o transporte de nutrientes y metabolitos (Leytón, 2018).

Leytón (2018), también indica que hay citoquininas de origen natural y sintético. Las de origen natural son derivados de las purinas, como kinetina, n-bencil adenina y zeatina, y las de origen sintético son las procedentes de la difenilurea (Forclorfenuron). Los dos tipos de citoquininas cumplen funciones biológicas similar; sin embargo, su diferencia está en la concentración requerida para tal actividad, siendo las de origen sintético más potentes que las de origen natural.

2.3.3. Giberelinas

Son moléculas ácidas diterpenos tetracíclicos naturales, cuya estructura básica está constituida por un anillo giberelano; Actúa como estimulante de crecimiento, especialmente en la elongación del tallo, germinación de semillas, esparcimiento de hojas, desarrollo de inflorescencia y floración; esto se debe a la inducción de la división celular, pues acortan la interface del ciclo celular al inducir a las células a sintetizar ácido desoxirribonucleico (Ortega, Ocampo, Martínez, Pérez, Sánchez, 2013).

Las giberelinas (AG) promueven el crecimiento celular debido a que incrementan la hidrólisis del almidón, fructanos y sacarosa, originando fructosa y glucosa. Estas hexosas contribuyen a la formación de la pared celular y disminuyen el potencial hídrico de la célula, lo que favorece la entrada del agua y provoca la expansión celular (Viasus, Álvarez y Alvarado, 2013).

Dentro de este grupo de moléculas las giberelinas con mayor actividad biológica se encuentran la GA1, GA3, GA4 y GA7, las cuales juegan un papel en diversos procesos del crecimiento de las plantas que incluyen, desarrollo de la semilla, elongación de los órganos, y control del tiempo de la floración (Rivas, Foroughbakhch, Reyes y Benavides, 2016).

2.3.4. Etileno

Balaguera, Salamanca, García y Herrera (2014), señalan que es la única hormona vegetal gaseosa, cuya biosíntesis se aumenta en plantas sometidas a factores de estrés como sequía, presencia de plagas, temperaturas inadecuadas; regula la maduración y senescencia de

productos de las plantas a nivel molecular, bioquímico y fisiológico ya que estimula la expresión de genes que codifican para las enzimas relacionadas con los cambios durante la maduración y/o senescencia. El etileno tiene un papel doble en la postcosecha, por un lado, ocasiona que los frutos adquieran características organolépticas óptimas para su consumo, pero también es responsable de la senescencia de los tejidos, generando efectos desfavorables en la calidad.

2.3.5. Ácido Abscísico

El ácido abscísico (ABA), es una hormona que actúa en contra del estrés a la planta, y donde su concentración se vuelve significativa, es considerada como una herramienta de adaptación frente a varias formas de estrés ambiental que altera las funciones de la planta. Se caracteriza por ejecutar estrategias para minimizar los efectos negativos inducidos por la deficiencia de agua, pueden ser las modificaciones morfológicas, mecanismos fisiológicos y finalmente procesos bioquímicos. El aumento significativo en la síntesis del ácido abscísico durante el estrés hídrico, específicamente la sequía, hace que se le denomine como "la hormona del estrés"(Huánuco, Gutierrez y Muller, 2017).

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización de la investigación

El presente estudio se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación, Posgrado y Conservación de la Biodiversidad Amazónica (CIPCA), de la Universidad Estatal Amazónica. Este laboratorio está localizado en el Km. 44 de la vía Puyo – Tena, en el cantón Arosemena Tola, Napo, como se aprecia en la figura 1. Las coordenadas de ubicación son las siguientes: latitud 1° 14´ 18" S, longitud 77° 53´ 7" O y altitud 570 metros sobre el nivel del mar (msnm).

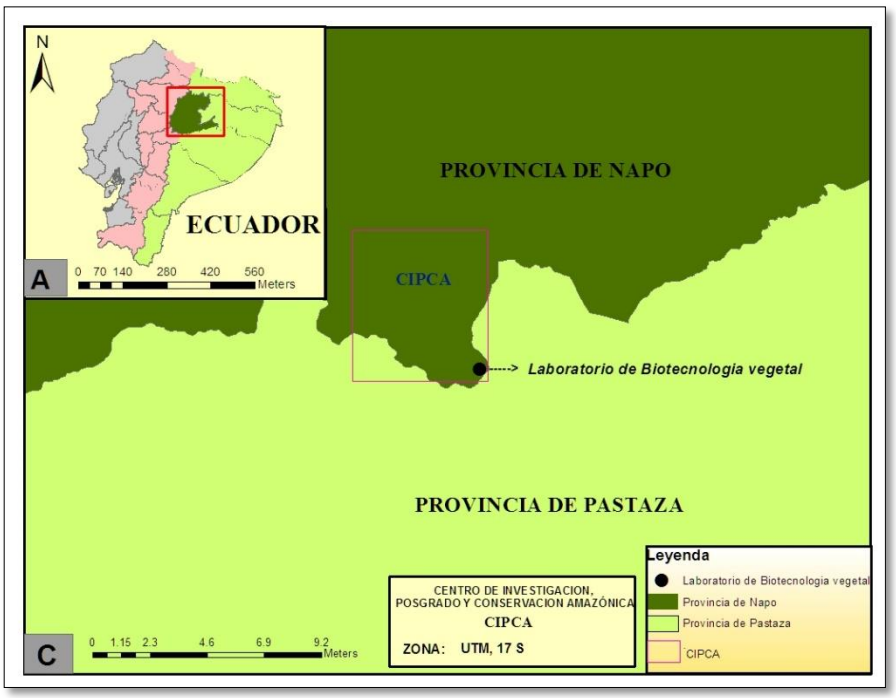


Figura 1. Mapa de ubicación del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Fuente: Robalino 2018

Para la identificación de contaminantes presentes en la fase de introducción se utilizaron las instalaciones del laboratorio de Biología y Entomología, de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en el km. 2. 1/2 vía Puyo a Tena (Paso Lateral), con coordenadas latitud 1° 27´ 42" S, longitud 78° 01´ 53" O y altitud de 935 msnm.

3.2. Tipo de investigación

El tipo de investigación empleado en el presente estudio fue experimental, pues se manipulan las variables bajo condiciones altamente controladas, replicando un fenómeno concreto y observando el grado en que la o las variables implicadas y manipuladas producen un efecto determinado. Los datos que se obtienen provienen de muestras aleatorizadas, de manera que se asume que la muestra es representativa, lo que le permite al investigador establecer hipótesis y contrastarlas a través de un método científico para el caso se estableció el protocolo de desinfección de explantes de vainilla a diferentes concentraciones de cloro comercial, así como de hormonas reguladoras de crecimiento para lograr la inducción a brotes en vainilla.

3.3. Métodos de investigación

En la metodología aplicada en la investigación se controlaron las variables para delimitar relaciones entre ellas, el método experimental está basada en la metodología científica pues los resultados obtenidos provienen de una serie de etapas que se efectúan para obtener un conocimiento válido en el ámbito científico, lo que hace este método es minimizar la influencia de la subjetividad del investigador en el trabajo a través de la recopilación de datos en los tratamientos experimentales y en el control. Las variables que se utilizan pueden ser variables dependientes es decir las que queremos medir o son el objeto de estudio del investigador y las variables independientes es decir las se manipulan para ver la relación con la dependiente. Las variables ambientales están controladas pues las técnicas de micropropagación se ejecutan en laboratorio y por lo tanto se minimiza la variabilidad del ambiente externo.

3.3.1. Obtención y selección de las plantas madre

Las ramas empleadas para la obtención de explantes fueron donadas por el Ing. Wilfrido Juvenal de la Cruz Narváez, de dos plantas en maceta, mantenidas por más de 6 años en un jardín de la parroquia y cantón Puyo, Provincia de Pastaza, cuyas coordenadas de ubicación son las siguientes: Latitud 1° 28´ 56” S, Longitud 78° 0´ 11” O y altitud 922 msnm (figura 2).

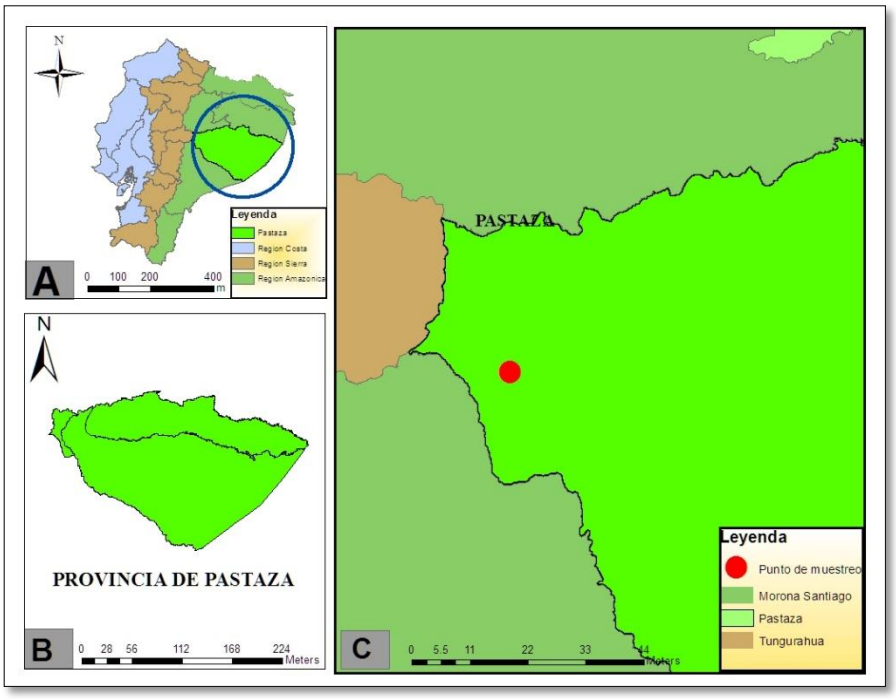


Figura 2. Mapa de ubicación del punto de muestreo del material vegetativo. Fuente: Robalino 2018

El material vegetal donado, presentó las mejores características fenotípicas (anexo 1); sin embargo, no fueron realizados tratamientos fitosanitarios, previos a la obtención de las ramas. Las ramas seleccionadas medían una longitud de dos metros (m) aproximadamente, enrollándolas para el transporte hacia el laboratorio de cultivo de tejidos del CIPCA, evitando el maltrato, y de ellas se obtuvieron los explantes para el cultivo *in vitro* (figura 3).



Figura 3. Ramas seleccionas de vainilla. Fuente: Valle 2018

3.3.2. Selección y desinfección del explante

Siguiendo la recomendación de Rahman-Zuraida et al. (2013), se identificaron los explantes nodales de las ramas de vainilla y con un bisturí se realizaron cortes en los segmentos

nodales, hasta obtener fragmentos de aproximadamente cinco centímetros (cm.). El bisturí fue desinfectado antes y después de cada corte con alcohol al 70% (figura 4).



Figura 4 Cortes en los segmentos nodales. Fuente: Valle 2018

Los explantes se lavaron con agua corriente, seguido se sumergieron en una solución con detergente comercial (marca Deja) al 3% más tres gotas de agente coadyuvante como Tween 80 (marca Lobachemie), los cuales estuvieron en agitación durante 20 minutos; finalmente se lavaron con agua destilada por varias veces, como se ilustra en la figura 5 (Rahman-Zuraida et al., 2013).

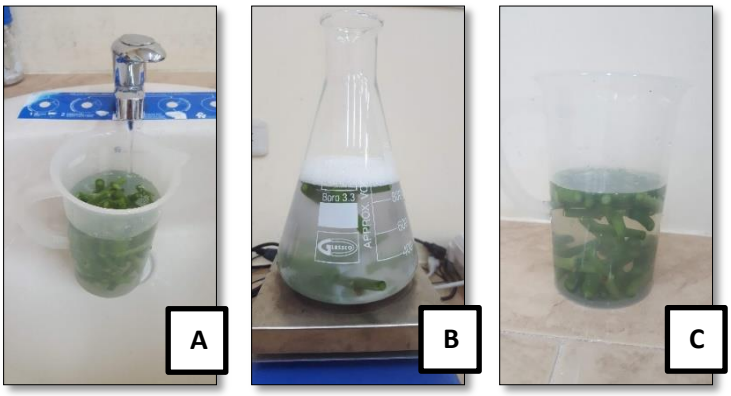


Figura 5. (A) Agua corriente. (B) Solución con detergente. (C) Agua destilada. Fuente: Valle 2018

Para dar cumplimiento al primer objetivo específico planteado, se ejecutó los siguientes protocolos de desinfección del material vegetal, para mantener el control de la contaminación microbiana en el medio de cultivo:

3.3.2.1. Protocolo de desinfección uno.

Las muestras se sumergieron en una solución de alcohol al 70 %, por 3 minutos, se transfirieron los explantes sin enjuague a una solución de cloro comercial, cuya dosificación de hipoclorito de sodio es de 5,25% (marca, Sapolio) al 1, 1,5 y 2% en volumen v/v, durante 15 minutos (figura 6, tabla 1), seguidos de 5 enjuagues con agua destilada estéril; cuatro enjuagues en la sala de preparación de medios y el enjuague final dentro de la cámara de flujo laminar.



Figura 6. Explantes en soluciones de cloro comercial a diferentes concentraciones. Fuente: Valle 2018

Para incrementar la confiabilidad del protocolo de desinfección uno, se realizaron dos réplicas de los tratamientos a diferentes concentraciones de cloro comercial (tabla 1); en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962), marca Phytotech que fue suplementado con sacarosa al 3%, agar (marca Phytotech) al 0,8% y concentraciones de 3 mg/L de kinetina (KN) y 1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA). Sin añadir el agar se ajustó a pH 5,7 – 5,8 respectivamente con NaOH y HCl a una concentración 1 N. Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 121° C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Tabla 1. Tratamientos a diferentes concentraciones de cloro comercial, para desinfectar explantes de vainilla

Tratamiento	Concentración v/v cloro comercial	Tiempo de inmersión
T1	1%	15 minutos
T2	1,5%	15 minutos
T3	2%	15 minutos

La primera réplica con 30 explantes (10 por tratamiento) y la segunda con 54 explantes (18 por tratamiento), esto en función de la disponibilidad de las ramas de vainilla. El proceso de introducción se efectuó en la cámara de flujo laminar, en donde los materiales como

cristalería, pinzas y bisturís fueron previamente autoclavados, mientras que la lámpara de alcohol, fosforera, se desinfectaron superficialmente con alcohol al 70% en la cámara de flujo laminar, previa a la inoculación en los frascos. Se colocó un explante por frasco. Los cultivos se incubaron a 18 ± 1 °C en fotoperiodo de 24 horas, equivalente a 3 000 lux (Rahman-Zuraida et al., 2013).

La cámara de flujo laminar se esterilizó con un barrido de alcohol seguido con la luz ultravioleta durante 30 minutos antes de la inoculación (Morwal, Jadhav, Shinde, Mandge, 2015).

La toma de datos se realizó cada 7 días, donde se evaluó a través de observación directa la presencia o ausencia de microorganismos en desarrollo y de ser el caso desarrollo de brotes.

3.3.2.2. Protocolo de desinfección dos

Las muestras se sumergieron en una solución de alcohol al 70 %, por 3 minutos, sin enjagüe. Estos explantes, se colocaron en una solución de cloro comercial (marca Sapolio) al 10, 15 y 20% en volumen, durante 20 minutos (tabla 2).

Tabla 2. Tratamiento a diferentes concentraciones de cloro comercial para dosificar a los explantes de vainilla

Tratamiento	Concentración v/v cloro comercial	Tiempo de inmersión
Control		
T1		
T2	10%	20 minutos
T3	15%	20 minutos
	20%	20 minutos

A continuación, se sometieron a una solución fungicida agrícola, cuya acción es de contacto o protectante, marca Bravo 720 ®, como ingrediente activo Clortalonil, dosificado al 1% en suspensión acuosa, durante 5 minutos (figura 7), seguidos de 5 enjuagues con agua destilada estéril, cuatro enjuagues en la sala de preparación de medios y el enjuague final dentro de la cámara de flujo laminar.

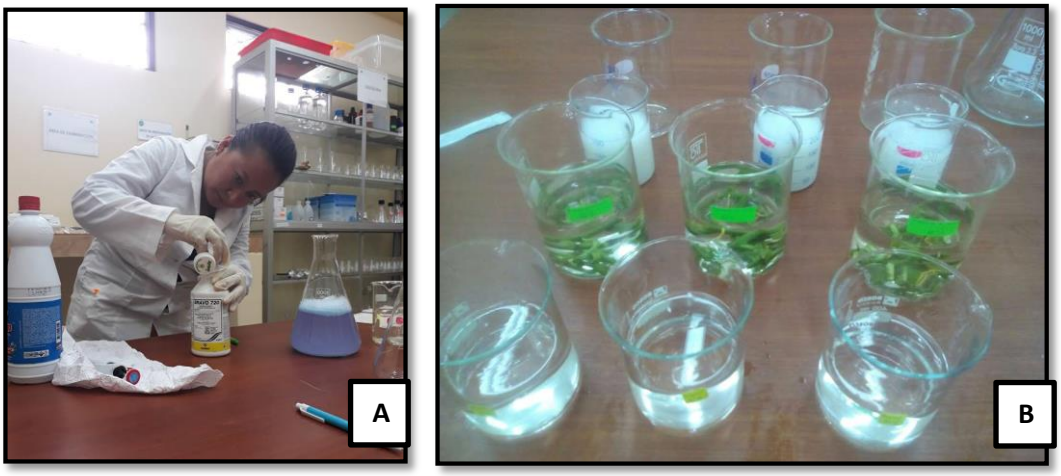


Figura 7. Proceso de desinfección. (A) Preparación de soluciones. (B) Tratamiento de alcohol, cloro comercial y fungicida. Fuente: Valle 2018

En el protocolo de desinfección dos, también se realizaron dos réplicas utilizando el medio de cultivo MS (1962) marca Phytotech que fue suplementado con sacarosa al 3%, agar (marca Phytotech) al 0,8% y concentraciones de 3 mg/L de KN y 1 mg/L de ANA. Con 36 explantes en cada siembra (12 por tratamiento) en función de la disponibilidad de las ramas de vainilla.

El proceso de introducción se efectuó en la cámara de flujo laminar, siguiendo el protocolo establecido en el protocolo de desinfección 1 y se sembró un explante por frasco.

La toma de datos se realizó cada 7 días, donde se evaluó a través de observación directa la presencia o ausencia de microorganismos en desarrollo y de ser el caso desarrollo de brotes.

3.3.2.3. Identificación de contaminantes

En el laboratorio de Biología y Entomología se prepararon medios de cultivo Agar papa dextrosa (PDA) de marca Arca Difco y Murashige y Skoog (marca Phytotech), siguiendo las instrucciones de los envases de los medios de cultivo respectivamente. A estos medios se les reguló el pH a 7. A continuación fueron incubación a 121 ° C, durante 20 minutos. Los Medios de cultivo fueron dispensados en cajas de Petri de 90 mm.

Con un asa se tomó una muestra de los microorganismos contaminantes del protocolo de desinfección uno, de introducción de vainilla; y fueron sembrados e incubados durante 4 días.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó tinción de Gram (López-Jácome, et al., 2014) para el caso de bacterias. Mientras que para hongos se prepararon placas con la técnica de cinta adhesiva (Peraza y Candelero, 2017), para ello se colocó la superficie de la cinta sobre una de las colonias de hongos en desarrollo y se pegó sobre la placa portaobjetos, finalmente se observó en el microscopio óptico (marca Motic, modelo B1 advanced series).

Para dar cumplimiento al segundo objetivo específico planteado, se ejecutaron la siguiente metodología para la estandarización del medio de cultivo para la inducción a brotes *in vitro* de la planta de vainilla:

3.3.3. Inducción de brotes

Una vez establecida la metodología de desinfección de los explantes; se transfiere el explante libre de contaminantes, a un medio Murashige y Skoog modificado, para ello se eliminó las partes oxidadas, evitando el maltrato y dejando intacto el explante.

3.3.3.1. Medio de cultivo para la inducción a brotes

Al medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962), marca Phytotech, se suplementó con sacarosa al 3%, agar marca Phytotech al 0,8% y concentraciones variables de 0 a 5 mg/L de bencil amino purina (BAP) y kinetina (KN), en concentraciones factoriales inversamente proporcionales (tabla 3).

Tabla 3. Diferentes concentraciones de hormonas, para inducir a brotes de explantes de *Vanilla* sp.

Tratamiento	BAP	KN
Control	0 mg/L	0 mg/L
T1	1 mg/L	5 mg/L
T2	2 mg/L	4 mg/L
T3	3 mg/L	3 mg/L
T4	4 mg/L	2 mg/L
T5	5 mg/L	1 mg/L

Sin añadir el agar se ajustó a pH 5,7 – 5,8 respectivamente con NaOH y/o HCl 1 N (figura 8). Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 121°C. a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Los cultivos se incubaron a 18 ± 1 °C bajo fotoperiodo de 24 horas, equivalente a 3 000 lux (Rahman-Zuraida, et al., (2013).

La toma de datos se realizó cada 7 días, donde se evaluó a través de observación directa la presencia de brote

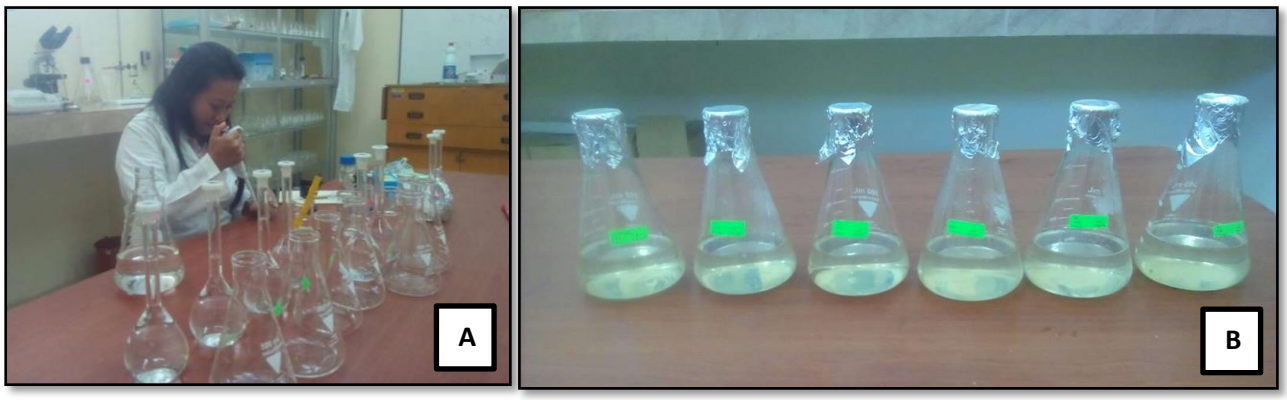


Figura 8. (A) Preparación. (B) Medios de cultivo a diferentes concentraciones de hormonas. Fuente: Valle 2018

3.4. Diseño experimental y tratamiento de datos

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado para cada protocolo de desinfección. Se realizaron dos protocolos de desinfección, cada uno con dos réplicas, como se resumen en la tabla 4. Con los datos del conteo de la presencia o ausencia de microorganismos, realizado semanalmente, se procedió al análisis de varianza y a la determinación de tablas de frecuencia porcentual de contaminación en los dos protocolos de desinfección. Se verificaron los frascos con desarrollo de brote en el cultivo para inducción y también se determinó el porcentaje de eficiencia en función del regulador, en la réplica 1 del protocolo de desinfección dos, pues concluyó el tiempo de investigación, se enfatiza que el trabajo desarrollado es preliminar a llegar a las fases de proliferación, enraizamiento y climatización del proceso de cultivo *in vitro*. En cada tratamiento se mantuvieron dos frascos control solo con medio de cultivo, donde se verificó si el proceso de autoclavado fue el correcto.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significación de rango múltiple de Tukey al 5% para las variables que resultaron significativas con la ayuda del paquete informático SPSS versión 20.

Tabla 4. Resumen según el protocolo de desinfección

Protocolo de desinfección	Réplica		N° Explantes sembrados	
	I	**II**		
Experimento 1	1	2	30	54
Experimento 2	1	2	36	36

3.5. Recursos Humanos y materiales.

3.5.1. Recursos Humanos

Estudiante de la maestría de agronomía mención Sistemas Agropecuarios, directora del proyecto de innovación, propietario del material vegetal, colaboradores en los laboratorios de Biotecnología vegetal del CIPCA y Biología y Entomología de la UEA.

3.5.2. Materiales y equipos

Se utilizó material de protección corporal: gorro, mandil, zapatones. Materiales de laboratorio como tijeras de acero inoxidable, pinzas, mango de bisturí, bisturí, vidriería, lámpara de alcohol, fosforera, papel aluminio, fundas autoclavables y estantería con lámpara halógenas de luz blanca. Insumos como alcohol al 70%, detergente comercial (marca Deja), Tween 80/ jabón líquido verde (marca Lobachemie), cloro comercial (marca Sapolio), medio de cultivo Murashige y Skoog para 10 L y agar para cultivo de plantas (marca Phytotech), sacarosa (azúcar de mesa, marca San Carlos), bencil amino purina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y kinetina (KIN) (marcan Lobachemie), hidróxido de sodio (NaOH) para regular pH disponible en el laboratorio.

Los equipos empleados fueron: pH metro (marca Thermo Scientific, modelo Orion 3 star), balanza (marca Ohaus), hornilla (marca Durex), autoclave horizontal (marca Tuttnaver 2540), cámara de flujo laminar (marca Biobase) y microscopio (marca Motic, modelo B1 advanced series).

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación, muestra la primera fase del establecimiento del cultivo *in vitro* de explantes nodales procedentes de la planta de *Vanilla* sp. A continuación, se describe los resultados obtenidos:

4.1. Metodología de desinfección del material vegetal

4.1.1. Protocolo de desinfección del experimento uno

En el análisis de varianza para el protocolo de desinfección del experimento 1, se encuentra una diferencia significativa y alta para la prueba de rango múltiple de Tukey al 5%, para los tres tratamientos estudiados según la desinfección de explantes probados, frente a la evaluación de la contaminación a los 7, 14 y 21 días respectivamente y para el tipo de contaminación por microorganismos (MO) (tabla 5).

Tabla 5. Análisis de varianza del protocolo de desinfección uno

Variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F Calculado	Significación
7días		2	0,19	4,5	,014*
	0,381	81	0,042		
	3,429	83			
	3,81				
14días		2	2,476	19,5	,000**
	4,952	81	0,127		
	10,286	83			
	15,238				
21días		2	1,714	20,25	,000**
	3,429	81	0,085		
	6,857	83			
	10,286				

*Significativo para la prueba de rango múltiple de Tukey al 5%.
**Altamente significativo para la prueba de rango múltiple de Tukey al 5%.

Destacándose que a los 7 días los microorganismos inician el desarrollo en el medio de cultivo afectando la sobrevivencia del explante de vainilla introducido in vitro, en cada evaluación se retiran las unidades experimentales contaminadas.

A los 14 días se alcanzó el pico máximo de desarrollo de los microorganismos, descendiendo en número de frascos contaminados hacia el día 21. En el periodo evaluado se alcanzó el 100% de contaminación por lo que la aplicabilidad de este protocolo no fue la deseada. Este comportamiento de los MO, indica que si bien se bajó la población microbiana en el explante probablemente quedaron esporas de hongos y/o células bacterianas en los pliegues de inserción del peciolo foliar sobre el tallo, que se incubaron para desarrollar las colonias que afectaron el proceso de introducción *in vitro.*

En la tabla seis de frecuencias resumida para el periodo de evaluación a los 7, 14 y 21 días en función del número de frascos contaminados y porcentaje de contaminación, se identificó que, a los 7 días de evaluación, existieron 4 explantes contaminados, correspondientes al 4,8 % de colonias de microorganismos desarrolladas, los mismos que se codificaron como explantes eliminados para la evaluación a los 14 días. En la segunda evaluación se presentó el pico de contaminación más alto con 68 explantes correspondiente al 81% de explantes con colonias de microorganismos desarrollados. A su vez este material se eliminó por lo que en la evaluación del día 21 se observa la presencia de 12 explantes con colonias de microorganismos, lo que representa el 14,2% del material vegetal con colonias, condición que determinó el 100% de explantes afectados descartando la eficiencia de este protocolo de desinfección probado.

Tabla 6. Tabla de frecuencia para el número de frascos contaminados y porcentaje de contaminación de explantes desinfectados de vainilla

Variables	**7 días**		**14 días**		**21 días**	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
No contaminados	80	95,2	12	14,3		
Contaminados	4	4,8	68	81,0	12	14,3
Eliminados			4	4,8	72	85,7
Total	84	100,0	84	100,0	84	100,0

Al desglosar los porcentajes de contaminación (figura 9) en la evaluación realizada a los siete días 14 y 21 días después de la introducción de los explantes *in vitro*, se destaca que del 4,8% de explantes contaminados a los siete días fueron divididos en el 3,60% de frascos con contaminación causada por hongos y el 1,20% con colonias bacterianas; logrando un total de 95,2% de material vegetativo libre de microorganismos. Los explantes contaminados fueron eliminados en la evaluación a los 14 días, apareciendo la presencia de 14,2% de

frascos no contaminados y un pico de 81% de frascos contaminados con microorganismos que se desglosa en 72,6% de frascos con hongos y 8,4% con bacterias.

En la evaluación del día 21 se eliminaron el 85,7% de explantes acumulados y se presentó todavía contaminación causada únicamente por hongos en un 14,3%, lo que determina que en la curva de desarrollo de los microorganismos se presentó la máxima contaminación a los 14 días; en todas las evaluaciones existió mayoritariamente la presencia de colonias de hongos y en menor proporción bacterias que aparecieron en las evaluaciones de los 7 y 14 días, las cuales no son agresivas y probablemente son de origen sistémico, es decir provienen de la planta madre de la cual se obtuvieron los explantes.

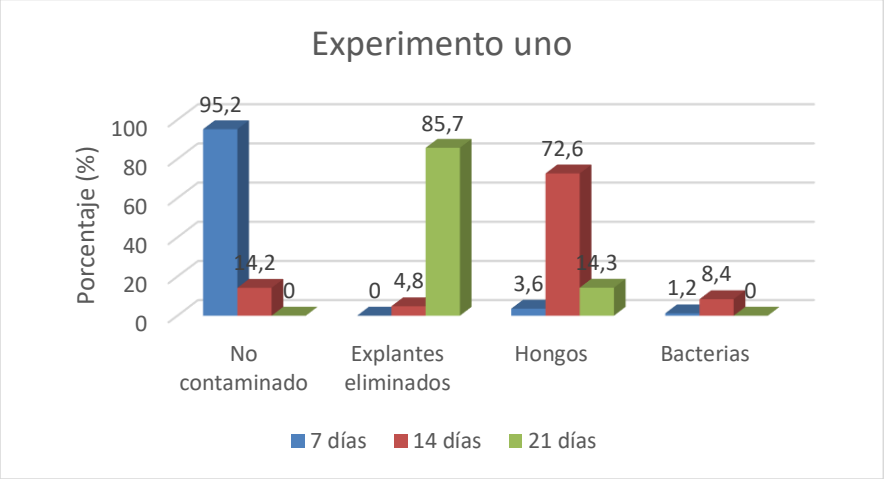


Figura 9. Contaminación en el protocolo de desinfección uno de explantes de *Vanilla* sp.

Por lo tanto, la metodología de desinfección del protocolo para el experimento uno, no tuvo el éxito esperado, pues se obtuvo la pérdida total de los explantes llegando al 100% de contaminación a los 21 días del material introducido. Esto pudo estar dado a que este protocolo de desinfección no tuvo la capacidad de eliminar la presencia de esporas de hongos y células bacterianas en los explantes desinfectados y como consecuencia hubo contaminación. Además, se estableció que la contaminación proviene del explante más no del medio de cultivo puesto que durante el trabajo experimental se mantuvieron dos frascos únicamente con el medio estándar probado que fue MS suplementado con sacarosa al 3%, reguladores de crecimiento y agar al 0,8%.

Se puede exponer, que otra de las posibles causas pudo haber sido que uno de los factores de contaminación repercute en el material vegetativo fue tomando directamente de un jardín, así como la edad de la planta madre, y superó a los seis meses de edad, lo cual no coincide con lo reportado por Rahman - Zuraida et al.,(2013), quien recomiendan cultivar las plantas

de *Vanilla* sp. en macetas por 6 meses y mantenerlas en un invernadero algunas semanas antes de la excisión de los explantes y establecimiento *in vitro*; sin embargo, Lee-Espinosa et al., (2008), reporta que se emplearon plantas de *Vanilla planifolia* de tres años, de cuyas ramas se aprovecharon todas las yemas separándolas en juveniles a las que se encuentran entre el segundo y quinto entrenudo y como yemas maduras la del sexto al noveno entrenudo.

A su vez, Lee-Espinosa et al. (2008), detalla la desinfección de los explantes de vainilla con una concentración de cloro comercial al 2% por dos minutos, sin embargo, plantean que es inexistente, el éxito o fracaso del protocolo empleado, por lo que se asume que las plantas estuvieron manejadas dentro de un invernadero para asegurar la asepsia fitosanitaria de las plantas madres.

Rangel, Hernández y Hernández (2016), aseguran que es necesario establecer otro tratamiento, ya que los microorganismos pueden afectar en diferente magnitud los tejidos, por lo que recomienda incrementar la concentración y prolongar el tiempo de inmersión de cloro comercial por 20 minutos. A su vez señala que a pesar de que el cloro comercial es uno de los productos químicos más empleados para desinfectar tejidos vegetales por su propiedad oxidante y altamente reactivo con aminoácidos, ácidos nucleicos, aminas y amidas su función se puede incrementar con un agente que reduzca la tensión superficial y pueda penetrar los tejidos, por lo que sería necesario adicionar el Tween 80 junto a la solución de cloro comercial, puesto que la vainilla presenta hojas coriáceas (Soto, 2009; Cid y López, 2011).

Es decir, la metodología del protocolo de desinfección uno, no tuvo éxito, motivo por el cual, se buscó estrategias de solución, para dar continuidad a la investigación, por lo que se trabajó con el protocolo de desinfección dos.

4.1.2. Protocolo de desinfección del experimento dos

El análisis de varianza (tabla 7), muestra diferencias estadísticas altamente significativas para los 21 días de evaluación y teniendo en cuenta la contaminación por microorganismos en los tratamientos de cloro comercial probados. Se aprecia que la contaminación de los explantes a los 7 y 14 días fue baja, no existiendo diferencia significativa para los tres tratamientos probados. Este comportamiento está probablemente asociado a la adición del fungicida Bravo 720, aplicado después del cloro comercial como uno de los elementos introducidos que difieren del experimento uno, por lo que puede estar dado a su acción, lo

que disminuyó la carga de esporas principalmente de hongos hasta el día 14, lapso de tiempo en el cual tiende a disminuir la acción del principio activo, observando que a los 21 días hubo un mayor desarrollo de colonias de microorganismo.

Tabla 7. Análisis de varianza del protocolo de desinfección dos, de explantes nodales de *Vanilla* sp.

Variables	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
7días	0,194	2	0,097	1,095	,340 NS
	6,125	69	0,089		
	6,319	71			
14días	0,361	2	0,181	0,405	,668 NS
	30,75	69	0,446		
	31,111	71			
21días	6,75	2	3,375	5,278	,007**
	44,125	69	0,639		
	50,875	71			

NS No significativo para la prueba de rango múltiple de Tukey al 5%.
*Significativo para la prueba de rango múltiple de Tukey al 5%.
**Altamente significativo para la prueba de rango múltiple de Tukey al 5%.

El porcentaje de contaminación a los siete y 14 días de la siembra fue del 9,7% y 19,4% causada respectivamente por hongos; no desarrollándose colonias de bacterias.

A los 21 días la contaminación generada fue por hongos con el 31,9% y el 1,4 % por bacterias; representado esto el 33,33% respectivamente del total de los explantes desinfectados. A partir del día 28 los explantes no contaminados, son considerados como explantes desinfectados, es decir se obtuvo el 37,5 % de explantes sobrevivientes (tabla 8).

Tabla 8. Tabla de frecuencia para el número de frascos contaminados y porcentaje de contaminación, de explantes nodales de *Vanilla* sp.

Variable	7 días		14 días		21 días	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
No contaminados	65	90,3	51	70,8	----------	----------
Explantes contaminados	7	9,7	14	19,4	24	- 33,3
Explantes eliminados			7	9,7	21	29,2
Explante desinfectado					27	37,5
Total	72	100,0	72	100,0	72	100,0

La presencia mínima de contaminación bacteriana en este protocolo de investigación puede estar asociada a que las ramas de vainilla, de las cuales se obtuvieron los explantes, no estuvieron contaminadas con dichos microorganismos, pues la disponibilidad del material vegetal fue limitada y se obtuvieron explantes de diferentes plantas madres.

Como se observa en la figura 10, se pudo determinar que los porcentajes de contaminación son relativamente bajos; sin embargo, a los día 21 se destaca un pico del 31,9% en relación al desarrollo de hongos dentro de los frascos, por lo que se puede asumir que la acción del fungicida en este protocolo de desinfección puede tener una durabilidad de 14 días aproximadamente, coincidiendo con el resultado del protocolo del experimento uno y pudiera estar dado a que este producto tiene acción de contacto; lo cual no concuerda con lo reportado por Zerihum et al., (2009), el cual recomienda realizar un repique del explante a los 15 días, con una nueva desinfección del mismo, en una solución de cloro comercial al 5% por 20 minutos con su respectivo triple enjuague con agua destilada estéril, dentro de la cámara de flujo laminar para disminuir la posibilidad de contaminación hasta el día 21.

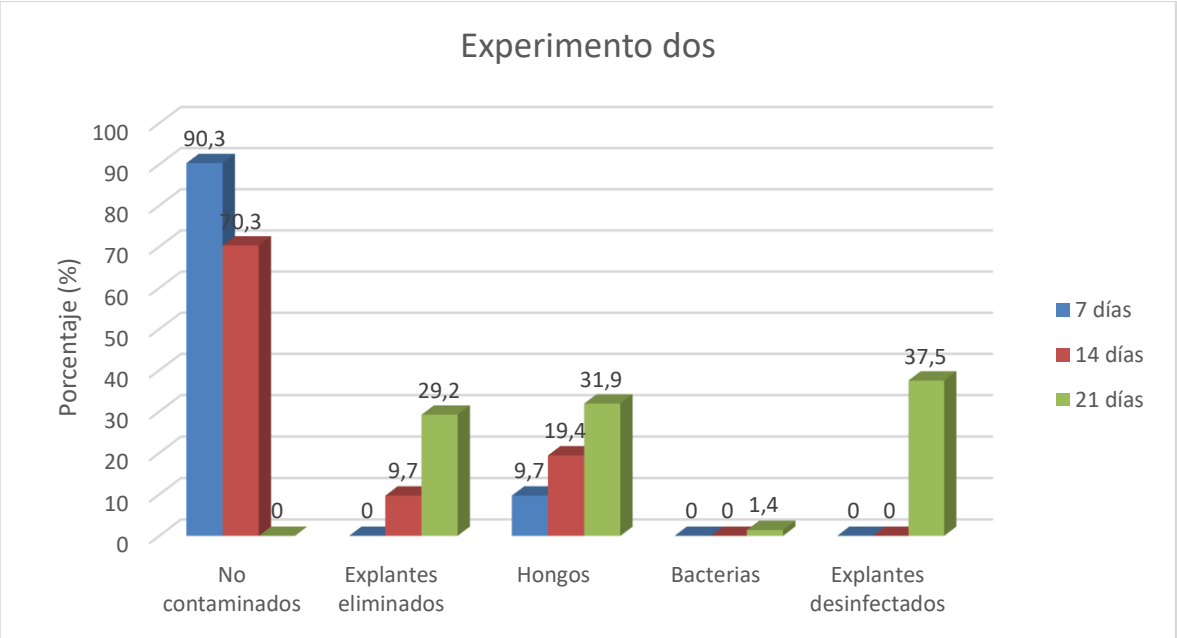


Figura 10. Protocolo de desinfección dos para explantes nodales de vainilla

El material que superó esta fecha ya no presentó problemas de desarrollo microbiano. Al igual que en el protocolo de desinfección uno, se utilizaron dos frascos como control con medio de cultivo sin haber realizado la siembra del explante (figura 11), las cuales no desarrollaron contaminación alguna hasta concluir la investigación, lo que permite inferir

que los agentes contaminantes podrían haber estado en el material vegetal y no por manipulación en la preparación de medios de cultivos.



Figura 11. Frascos control sin presencia de contaminación. Fuente: Valle 2018

Además, se recomienda un proceso de desinfección a la planta madre antes de extraer los explantes, con algún producto que actúe en la desinfección de bacterias, para el material de propagación. Estos resultados concuerdan con Carranza et al. (2013), el cual plantea que para el caso de bacterias se podría realizar un tratamiento preliminar dirigido a la planta madre, reportando además que para disminuir la población microbiana se debe tratar el material con una combinación de Agri - mycin (estreptomicina al 15% más oxitetraciclina al 1,5%, de acción sistémica) y Benlate (Benomilo de acción sistémica para hongos, ácaros y nemátodos) a una concentración de 1 g/L, previa a la excisión de los explantes para su introducción *in vitro*, además coincide con lo reportado por Rahman-Zuraida et al., (2013), con respecto a mantener las plantas madre de vainilla hacia un invernadero bajo condiciones de asepsia pero este grupo de investigadores indica que el tratamiento de los explantes para disminuir la concentración bacteriana es por inmersión en una solución de antibiótico por 20 minutos.

4.1.3. Identificación de microorganismos contaminantes

Los microrganismos causantes de la contaminación de los explantes *in vitro* asociados a la vainilla, según lo observado en el microscopio se encontró: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., levaduras y bacterias.

Aspergillus sp.(figura 12), coincidiendo con el estudio de Martínez, Hernández, Reyes, Vásquez (2013), indica que son hongos filamentosos productores de aflotoxinas que en su ambiente natural desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica y que se desarrollan sobre materia en descomposición, de no existir materia orgánica se vuelve un hongo parasítico; sin embargo, dentro de la biotecnología industrial tiene importantes aplicaciones en la producción de ácido cítrico (Túqueres, et al., 2017).

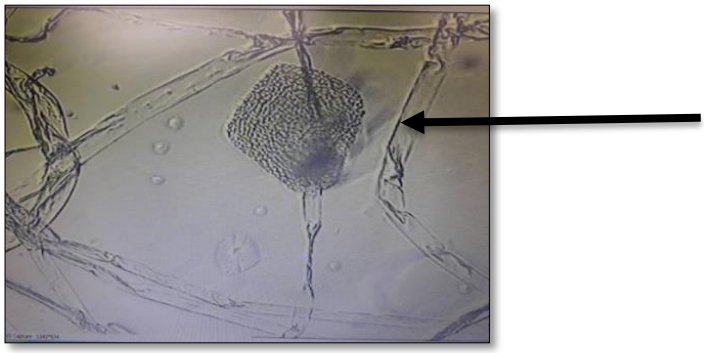


Figura 12. *Aspergillus* sp., observado en el microscopio con el objetivo 100X

Según Díez, (2014) la vainilla desarrolla raíces de anclaje en materia orgánica en descomposición y se conoce que desenvuelve complejas interrelaciones con microorganismos del sustrato que se han descrito como oportunistas, pues son capaces de degradar materia orgánica, pero también de desencadenar eventos fitosanitarios adversos bajo determinadas condiciones ambientales; y, con micorrizas para optimizar la absorción de nutrientes. Por esta razón las ramas de vainilla que proporcionaron los explantes pudieron haber tenido una carga elevada de esporas de diferentes microrganismos, benéficos y perjudiciales, el proceso de desinfección tiene la finalidad de eliminarlos, pero en ocasiones el proceso se vuelve complejo.

El patógeno estuvo presente, *Fusarium* sp. (figura 13), según Vásquez y Castaño, (2017), indican que son un grupo de hongos filamentosos distribuidos ampliamente en el suelo, que cuando ataca plántulas ocasiona mal del talluelo, que se da por la carencia de lignina en el tallo, lo que las hace más susceptibles, permitiendo que el patógeno alcance rápidamente los vasos del xilema, generando destrucción y colapso del tejido. El tejido vascular de una planta enferma se torna de color pardo oscuro, siendo más notable en el punto de unión del peciolo con el tallo.



Figura 13. *Fusarium sp.*, observado en el microscopio con el objetivo 100X

Se visualizó un tipo de levadura pastosa (figura 14), que, según Espinoza, (2015) son hongos que se forman en medios de cultivo, constituidas por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoides, elipsoides o alargadas y que tienen acción sobre la degradación de carbohidratos principalmente a través de procesos de fermentación, por lo que el medio de cultivo afectado tiende a volverse líquido.



Figura 14. Levadura, observado en el microscopio con el objetivo 100X

A través de tinción Gram se determinó la presencia de bacterias baciliformes de reacción Gram negativa, que aparecieron a los 21 días en el medio de cultivo y están afectando probablemente a los tejidos vasculares de los explantes (figura 15).



Figura 15. Bacterias, observado en el microscopio con el objetivo 100X

4.2. Protocolo de desinfección

Para la realización del protocolo de desinfección de explantes nodales, para el proceso de propagación in vitro de vainilla, se deben realizar la siguiente metodología en cada una de las fases.

1. **Seleccionar las ramas y realizar cortes en los explantes nodales**. - se debe elegir plantas madres que presenten las mejores características fenotípicas, cuyo tamaño sea aproximadamente de dos metros de largo.

2. **Antes y después de cada corte desinfectar el bisturí.** - Realizar la desinfección con alcohol al 70%, tantas veces, se realice los cortes para obtener el explante.

3. **Identificar las ramas para la obtención de explantes de vainilla**. - Los cortes serán de los explantes nodales, obteniendo fragmentos de aproximadamente 5 cm, con un solo nudo; y se repite tantas veces, como sea necesario.

4. **Lavar los explantes con agua corriente. –**Para disminuir de impurezas, provenientes del lugar de colecta; y se lo realiza tantas veces, como sea necesario.

5. **Sumergir en una solución con detergente comercial. –** Pesar 24 gramos del detergente y disolver en 800 ml de agua destilada, seguidamente añadir 3 gotas de Tween 80, y mantener en agitación durante 20 minutos.

6. **Enjuague con agua destilada.** - Para eliminar la solución de detergente comercial.
7. **Sumergir las muestras en una solución de alcohol al 70%.** - Durante tres minutos.
8. **Colocar en una solución de cloro comercial. –** En una probeta añadir 70 ml de cloro comercial, y aforar a 350 ml de agua destilada, más tres gotas de Tween 80, posteriormente depositar el material a desinfectar y agitar durante 20 minutos.

9. **Seguidamente introducir los explantes en una solución fungicida agrícola.** - (Bravo 720 ®) al 1% durante 5 minutos.

10. **Realizar cinco enjuagues con agua destilada estéril.** - Cuatro en la sala de preparación y una en la cámara de flujo laminar. Posteriormente se siembra los explantes en el Medio de Cultivo MS, anteriormente preparado.

A continuación, se esquematiza el protocolo de desinfección dos modificado en función de las observación y resultados preliminares de la presente investigación (figura 17).

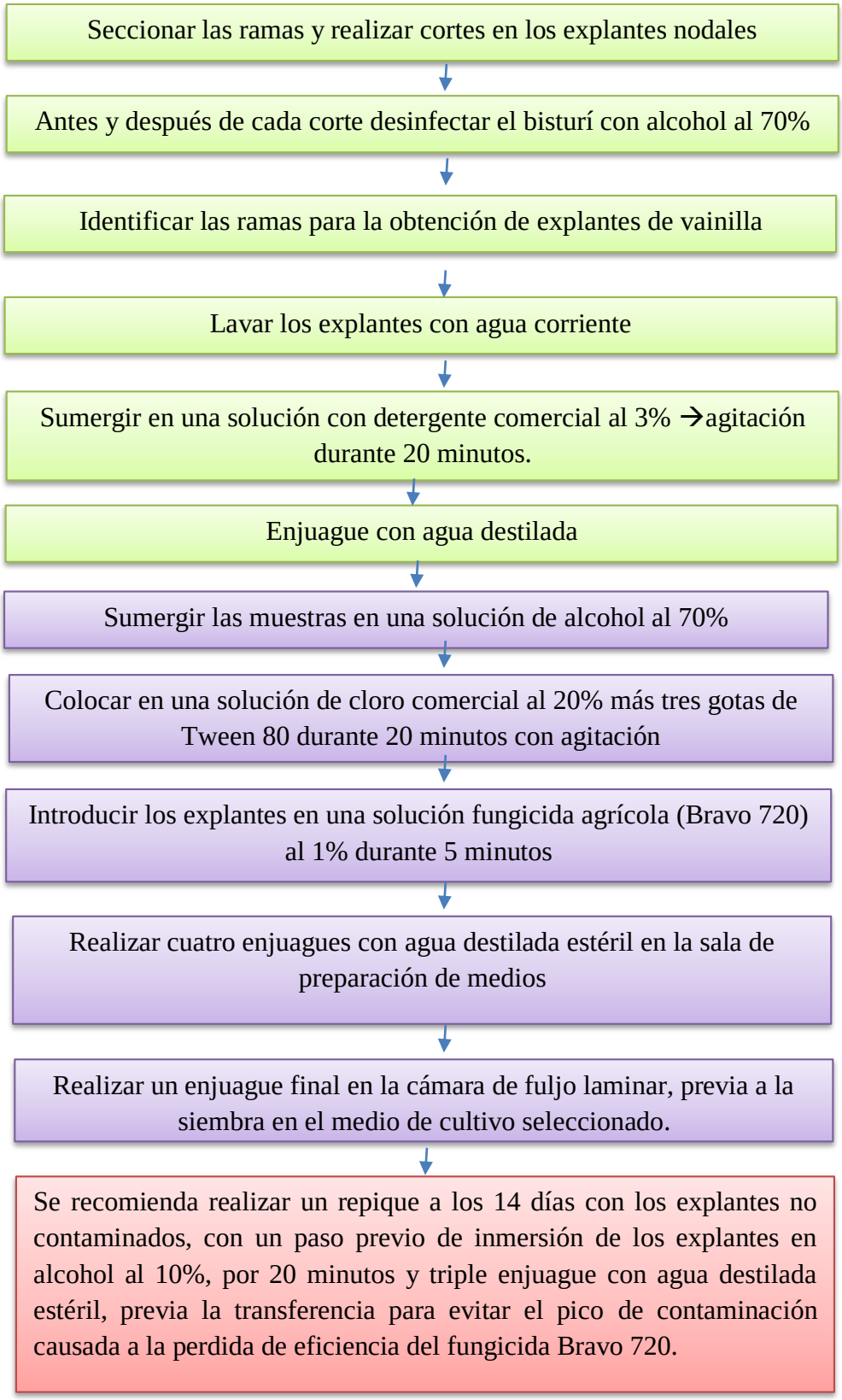


Figura 16. Protocolo recomendado de desinfección de explantes de vainilla.

4.3. Inducción de brotes

Una vez desarrollado el objetivo específico número uno, en el cual se obtuvieron los explantes de cultivo con vainilla en estado aséptico, se continúa con el objetivo dos correspondiente a la fase de inducción a brotes. A través de un repique se eliminó parte oxidada del explante, para ello se transfirió a un medio de cultivo con concentraciones variable de las hormonas kinetina y Bencil Amino Purina.

A los días 7 de transferidos los explantes se obtuvo como resultado que a concentraciones de 4 mg/L de Bencil amino purina y 1 mg/L de kinetina brotaron un total de 33,33% divididos en 11,11% de explantes con brotes y raíz; y el 22,22% desarrollaron solo brotes. El 66,67% restante no reaccionaron favorablemente al medio probado (figura 16). Con estos resultados se verifica que es factible la inducción a brotes de explantes de vainilla, sin embargo, se deben continuar las pruebas pues los resultados obtenidos difieren con lo expuesto por Rahman-Zuraida et al., (2013), quienes recomiendan que para la obtención de hasta 55 nuevos brotes a partir del explante original empleando medio MS diluido a la mitad de su concentración suplementado con 1 mg/L BAP después del tercer subcultivo.

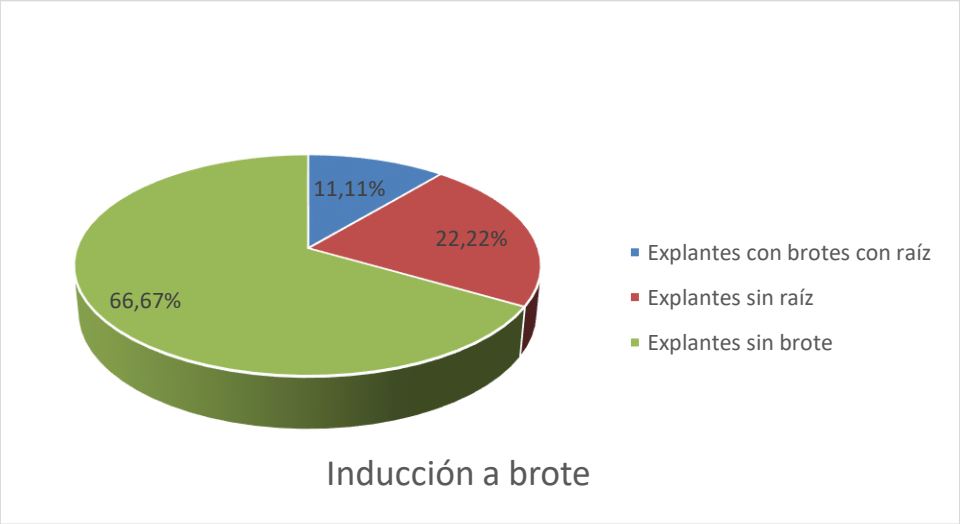


Figura 17 . Porcentaje de explantes con brotes.

CONCLUSIONES

El protocolo de desinfección del experimento uno, presentó el 100% de contaminación, metodología no recomendable para la propagación de vainilla. Por lo que se considera que el mejor protocolo de desinfección es el experimento dos que a los 21 días demostró un 37,5% de explantes desinfectados.

El protocolo de desinfección ideal, corresponde a la colocación de una solución de cloro comercial al 20% más tres gotas de Tween 80 durante 20 minutos con agitación, más la introducción de los explantes en una solución fungicida agrícola (Bravo 720) al 1% durante 5 minutos.

Se obtuvo el 33,33% de explantes brotados, en el medio de cultivo MS suplementado con sacarosa al 3%, 4 mg/L de BAP complementado con 1 mg/L de KN y 0,8 % de agar.

RECOMENDACIONES

La presente investigación representa una fase inicial del establecimiento del cultivo *in vitro* de *Vanilla* sp., por lo que se sugiere dar continuidad al proceso de micropropagación, pues se sabe que el ciclo completo de micropropagación de vainilla requiere de un trabajo experimental continuo de por lo menos 18 a 24 meses, pues hay interés de masificar el cultivo por parte de diferentes entidades públicas de la región amazónicas.

Realizar un repique a los 14 días en el proceso de desinfección recomendado, con los explantes no contaminados, con un paso previo de inmersión de los explantes en alcohol al 10%, por 20 minutos y triple enjuague con agua destilada estéril, previa la transferencia para evitar el pico de contaminación causada a la perdida de eficiencia del fungicida Bravo 720.

BIBLIOGRAFIA

Aguirre, M. (2016). *Propuesta del manejo de productos químicos en la Empresa Pública Municipal De Agua Potable, Alcantarillado Sanitario Y Pluvial En "Aguapen-E.P"*. Recuperado el 25 de agosto de 2018, de: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18174/1/TESIS%20MOISES%20AGUIRRE%20BORBOR%20PDF.pdf

Antón, J., Andrés, D. (2015). *Física y Química (pp. 104).* Madrid, España. Editorial Editex, S.A. Recuperado el 25 de agosto de 2018, de: https://books.google.com.ec/books?id=Rr3gCwAAQBAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false

Azofeifa-Bolaños, J., Rivera-Coto, G., Paniagua-Vásquez, A., Cordero-Solórzano, R. (2018). *Selección cualitativa del esqueje en la sobrevivencia y desarrollo morfogenético de Vanilla planifolia Andrews*. Agronomía Mesoamericana, vol. 29, núm. 3, 2018. Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43756297010

Azofeifa, J., Vásquez, A. y García. J. (2014). *Importancia y Desafíos de la Conservación de Vanilla spp. (Orquidaceae) en Costa Rica*. Recuperado el 8 de febrero de 2018, de: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v25n01_189.pdf

Balaguera, H., Salamanca, F., García, J., Herrera, A. (2014). *Etileno y retardantes de la maduración en la poscosecha de productos agrícolas. Una revisión*. Recuperado el 31 de agosto de 2018, de: http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v8n2/v8n2a12.pdf

Bartolini, B., y Lallana, V. (1995). *Términos comúnmente usados en cultivo de tejidos.* Recuperado el 9 de febrero de 2018, de: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/WEBFV_2010/FVpdf/Terminos_CT.pdf

Bello, J., García, G., Iglesias, L. (2015). *Conservación de vainilla (Vanilla planifolia Jacks.) Bajo condiciones de lento crecimiento in vitro*. Recuperado el 3 de febrero de 2018, de: http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/38-2/6a.pdf

Beltrán, D., Mesa, N. (2014). *El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (*Aniba perutilis *Hemsley)*. Recuperado el 27 de agosto de 2018, de: https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/44302/46056

Bermúdez, J. (2015). *Estudio de la cadena de suministro de la producción de vainilla en México.* Recuperado el 6 de octubre de 2018, de http://www.web.facpya.uanl.mx/vinculategica/Revistas/178197%20ESTUDIO%20DE%20LA%20CADENA%20DE%20SUMINISTRO%20DE%20LA%20PRODUCCION%20DE%20VAINILLA%20EN%20MEXICO.pdf

Bogado, F., Vera, C., Ayala, P., Sansberro, P., Luna, C. (2016). *Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de Grevillea robusta*. Recuperado el 25 de agosto de 2018, de: http://www.cienciasagronomicas.unr.edu.ar/journal/index.php/agronom/article/view/116/176

Cancio-Escalante, G., Quevedo, E., Villamizar, C., Díaz, C. (2015). *Propagación* in vitro *de materiales seleccionados de* Rubus glaucus *Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia*. Recuperado el 27 de noviembre de 2018, de: https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/54262/54102.

Calva, G., Pérez, J. (2005). *Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro.* Recuperado el 5 de febrero de 2018, de: http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf

Carranza, M., Reyes, H., Mora, W., Cevallos, O., Escobar, A., Cadme, M., Nieto, J., Morante, J. (2013). *Propagación clonal in vitro de Swietenia macrophylla King (CAOBA).* Recuperado el 26 de octubre de 2018, de: https://docplayer.es/15396817-Mahogany-swietenia-macrophylla-is-a-widely.html

Cid, T. y López, A. (2011). *Extractos de vainilla: una mezcla de componentes químicos de aroma y sabor*. Recuperado el 6 de febrero de 2018, de: http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5(1)-Cid-Perez-et-al-2011.pdf

Córdova, C., Montoya, M., Díez, M. (2012). *Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia*. Recuperado el 6 de

octubre de 2018, de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802012000100004

Díez, M. (2014). *Ecofisiología de la vainilla Vanilla planifolia Andrews*. Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: http://bdigital.unal.edu.co/49347/1/43054505.2015.pdf

Diomedi, A., Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, I., Medel, M., Quintanilla, M., Riedel, G., Tinoco, J., Cifuentes, M. (2017). *Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología*. Recuperado el 26 de agosto de 2018, de: https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n2/art10.pdf

Elorza, P., López, M., Hernández, A., Olmedo, G., Domínguez, C., Maruri, J. (2007). *Efectos del tipo de tutor sobre el contenido de vainillina y clorofila en vainas de vainilla (Vanilla planifolia Andrews) en Tuxpan, Veracruz, México*. Recuperado el 7 de febrero de 2018, de: http://www.bioline.org.br/pdf?cg07024

Espinoza, V. (2015). *Utilización del jugo de caña de azúcar (Saccharum officinarum L.) como medio de cultivo para la producción de Saccharomyces boulardii L.* Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3185/2/CD0000-28-TRABAJO%20COMPLETO-pdf

Fernández-Concha, G. (2012). *Las enredadas vainillas de la Península de Yucatán.* Recuperado el 26 de noviembre de 2018, de: https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2012/2012-06-22-Carnevali-Vanilla.pdf

Flores, D., Jiménez, V., Chacón, R. (2009). *Cultivo de tejidos en Ficus carica con miniestacas.* Recuperado el 31 de enero de 2018, de: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n2_319.pdf

Fouché, J. y Jouve, L. (1999). *Vanilla planifolia: history, botany and culture in Réunion islan.* Recuperado el 2 de febrero de 2018, de: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885962/document

Gamboa, M. (2014). *Vainillas colombianas y su microbiota II. Diversidad, cultivo y microorganismos endófilos*. Recuperado el 6 de febrero de 2018, de: http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v19n3/v19n3a10.pdf

Garay, A., Paz M., García, B., Álvarez, E., Gutiérrez, C. (2014). *La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana.* Recuperado el 29 de agosto de 2018, de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003

García, D., Mesa, N., Ocampo, M. (2015). *Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de Aspidosperma polyneuron.* Recuperado el 25 de agosto de 2018, de: https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/54277/54113

Geetha, S., Shetty, S. (2000). *In vitro propagation of Vanilla planifolia, a tropical orchid.* Recuperado el 13 de junio de 2018, de: http://www.iisc.ernet.in/currsci/sep252000/geetha.PDF

Hernández, J. (2011). Paquete tecnológico Vainilla (*Vanilla planifolia Jackson)* Recuperado el 13 de junio de 2018, de: file:///C:/Users/PC/Downloads/vainilla_establecimiento%20(3).pdf

Hine, A., Abdelnour, A. (2013). *Establecimiento in vitro del arandano (Vaccinium corymbosum L)*. Recuperado el 22 de mayo de 2018, de: file:///C:/Users/PC/Downloads/1584-5003-1-SM.pdf

Huánuco, L., Gutiérrez, R., Muller, G. (2017). *Estandarización de un protocolo para la cuantificación de ácido abscísico mediante la técnica de Elisa Competitivo*. Recuperado el 31 de agosto de 2018, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162017000100002

Izquierdo, H., Quiones, Y. (2001). *Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas.* Recuperado el 5 de junio de 2018, de: http://www.utm.mx/temas/temas-docs/nfnotas15R2.pdf

Jiménez, F. (2015). *Interacción entre Giberelinas y auxinas en tomate Micro – Tom.* Recuperado el 30 de agosto de 2018, de: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/56378/JIM%C3%89NEZ%20-

%20Interacci%C3%B3n%20entre%20giberelinas%20y%20auxinas%20en%20tomate%20Micro%20Tom.pdf?sequence=1

Jiménez, K., Schmidt, A., Quesada, K., Moreira, I. (2015). *Aislamiento de una bacteria endófita de vainilla (Vanilla planifolia) con actividad biocontroladora in vitro contra Fusarium oxysporum f. sp. Vanillae*. Recuperado el 7 de octubre de 2018, de http://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v28n2/0379-3982-tem-28-02-00116.pdf

Kelso-Bucio, H., Ba, K., Sánchez-Morales, S., Reyes-López, D. (2012). *Estimación in situ del Kc_{ini} de la vainilla (Vanilla planifolia A).* Recuperado el 26 de noviembre de 2018, de: http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n5/v46n5a7.pdf

Lee - Espinosa, H., Murguía, J., García, B., Córdova, A. (2008). *In Vitro Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia *'Andrews')*. Recuperado el 19 de junio de 2018, de: http://hortsci.ashspublications.org/content/43/2/454.full

Leyton, E. (2018). *"Efecto de las citoquininas en la calidad de baya de Vitis vinífera L. var. Red globe en nepeña, Ancash".* Recuperado el 13 de agosto de 2018, de: http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/9926/Leyt%C3%B3n%20Rodr%C3%ADguez%20Edwin%20Leonardo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Lidoy, J. (2014). *In vitro cell culture of Cannabis sativa for the production of Cannabinoids.* Recuperado el 21 de junio de 2018, de: https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2014/119249/TFG_javierlidoylogrono.pdf

López, L., Gutiérrez, M., Lucio, M., Aresté, N., Morató, M., Pérez, S. (2014). *Introducción a los antisépticos.* Recuperado el 26 de Agosto de 2018, de: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0212656714700551

López –Jácome, L., Hernández-Duran, M., Colín- Castri, C., Ortega-Peña, S., Cerón-Gonzáles, G., Franco-Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología.* Recuperado el 27 de septiembre de 2018, de: http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2014/ir141b.pdf

Martínez, H., Hernández, S., Reyes, C., Vásquez, G. (2013). Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200005

Menchaca, R., Ramos, J., Moreno, D., Luna, M., Mata, M., Vásquez, L., Lozano, M. (2011). Recuperado el 27 de noviembre de 2018, de: https://www.researchgate.net/publication/239731007_Germinacion_in_vitro_de_hibridos_de_Vanilla_planifolia_y_V_pompona_In_vitro_germination_of_Vanilla_planifolia_and_V_pompona_hybrids

Morwal, G., Jadhav, S., Shinde, A., Mandge, N. (2015). *Conservation of Vanilla Planifolia by In-Vitro Micropropagation Method*. Recuperado el 25 de mayo de 2018, de: http://www.ijrat.org/downloads/acgt2015/ACGT20.pdf

Murashige, T., Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures.* Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Ortega, L., Ocampo, J., Martínez, C., Pérez, A., Sánchez, J. (2013). *Efecto de las giberelinas sobre el crecimiento y calidad de plántulas de tomate.* Recuperado el 31 de agosto de 2018, de: https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/viewFile/159/151

Peraza, F., Candelero, J. (2017). Manual de prácticas de la asignatura Miología. Recuperado el 31 de octubre de 2018, de: http://www.ittizimin.edu.mx/wp-content/uploads/2018/03/MICOLOGI%CC%81A.pdf

Pérez, W., Forbes, G. (2014). *¿Qué es un fungicida?* Recuperado el 29 de agosto de 2018, de: http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/003862.pdf

Rahman-Zuraida, A., Liyana, K., Nazreena, O., Wan, W., Che, C., Zamri, Z., Sreeramanan, S. (2013). *A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of Vanilla planifolia*. Recuperado el 25 de mayo de 2018, de: http://file.scirp.org/pdf/AJPS_2013082114291629.pdf

Rangel, E., Hernández, E., Hernández, M. (2016). *Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México.* Recuperado el 25 de octubre de 2018, de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000300225

Rivas, E., Foroughbakhch, R., Reyes, M., Benavides, A. (2016). *Determinación de giberelina A4 y trans zeatina ribósido en diferentes órganos de Dasylirion cedrosanum*. Recuperado el 31 de agosto de 2018, de: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263149505023

Rojas, C., Cuzquén, C., Delgado, G. (2014). *Propagación clonal in vitro y enraizamiento de estacas de algodón nativo (Gossypium barbadense L.)*. Recuperado el 10 de junio de 2018, de: http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v62n4/v62n4a04.pdf

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-SAGARPA. (2014). *Producción de la vainilla en tres sistemas de producción en la Sierra Huasteca Potosina.* Recuperado el 18 de agosto de 2018, de: http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/Docs-descargar/FOLLETO_63.pdf

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-SAGARPA. (2017). *Vainilla Mexicana*. Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: http://www.consejagri.mx/images/PLANEACION%20AGRINAL%20MEX/CON%20POTENCIAL%20DE%20MERCADO/Potencial-Vainilla.pdf

Sharry, S., Adema, M., Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro.* Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__.pdf-PDFA.pdf?sequence=1

Shruthi, N. (2013). *Vanilla planifolia: A Review of a Plant Commonly Used as Flavouring Agent.* Recuperado el 18 de mayo de 2018, de: http://globalresearchonline.net/journalcontents/v20-2/42.pdf

Solano, M. (2013). *Modelamiento de la cinética de desinfección superficial de tomates (Lycopersicum esculentum) frescos usando soluciones de cloro*. Recuperado el 25 de Agosto de 2018, de: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=357633710003

Soto, M. (2009). Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género Vanilla. Recuperado el 16 de mayo de 2018, de: http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Vanilla/Reporte%20intermedio/Reporte%20intermedio.pdf

Túqueres, H., Carrera, A., Pomavilla, S., Tenemaza, V., Casco, G., Piedra, A., Changoluisa, D., Bravo, L., Diéguez – Santana, K., Carrera, K., Torres, R. (2017). Isolation of native Aspergillus niger from Ecuadorian Amazon to produce citric acid from sugarcane bagasse. Recuperado el 30 de octubre de 2018, de: https://sciforum.net/paper/view/conference/3899.

Uchida, J. (2011). *Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Vanilla (Vanilla planifolia).* Recuperado el 19 de mayo de 2018, de: http://pacificschoolserver.org/content/_public/Local%20Topics/Pacific%20Islands/Agriculture%20for%20Islands/Specialty%20crops/Vanilla.pdf

Vásquez-Ramírez, L., Castaño-Zapata, J. (2017). *Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (SACC.) W.C. SNYDER & H.N. HANSEN]*. Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v20n2/v20n2a14.pdf

Vargas, J., Gámez, H. (2014). *Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la Sierra Huasteca Potosina*. Recuperado el 7 de octubre de 2018, de: http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/Docs-descargar/FOLLETO_63.pdf

Vargas, J. (2015). *Polinización manual de la flor de vainilla.* Recuperado el 6 de octubre de 2018, de: http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/Docs-descargar/POLINIZACION.pdf

Vega-Celedon, P., Canchignia, H., Gonzáles, M., Seeger, M. (2016). *Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias.* Recuperado el 27 de noviembre de 2018, de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500005

Viasus, G., Álvarez, J., Alvarado, O. (2013) *Efecto de la aplicación de giberelinas y 6-bencilaminopurina en la producción y calidad de fresa (Fragaria x ananassa Duch.).* Recuperado el 31 de agosto de 2018, de http://www.redalyc.org/pdf/857/85730395007.pdf

Villatoro, E. (2014). *EFECTO DE LA CITOQUININA (CPPU) SOBRE EL CUAJE Y RENDIMIENTO DE MINISANDÍA (Cytrullus lannatus, Cucurbitaceae)*. Recuperado el 30 de agosto de 2018, de: http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/06/09/Villatoro-Elmer.pdf

Zerihun, A., Ayelign, A., Alemayehu, T., Wondyfraw, T. (2009). *Efficient in vitro multiplication protocol for Vanilla planifolia using nodal explants in Ethiopia*. Recuperado el 25 de junio de 2018, de: https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/68674/56752

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización de la planta de vainilla.



El tallo, es de color verde, cilíndrico, lisos y flexible, formado por entrenudos de donde nacen las raíces (Kelso-Bucio, et al., 2012)

Hojas, son elípticas, oblongas y de consistencia coriácea. Fernández- Concha (2012)

Flor, de color amarillo verdoso, que llegan a medir hasta 5 cm de ancho (Soto, 2009; Cid y López, 2011).

Fruto, se produce después de la polinización, aproximadamente a los nueves meses de maduración (Hernández, 2011).