



UNIVERSIDAD ECOTEC

FACULTAD DE INGENIERIAS, ARQUITECTURA Y CIENCIAS DE LA
NATURALEZA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TITULO DE TRABAJO

Evaluar el uso de citoquinina y auxina en micropropagación in vitro de vainilla
(*Vanilla tahitensis*) en Daule, 2024

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título
de

INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR

JURADO GÓMEZ DAYANA YAMILETTE

TUTOR

PEREZ ALMEIDA IRIS BETZAIDA
ROSAS HERNANDEZ JOSÉ IBRAHIN

SAMBORONDÓN – ECUADOR

2024

Dedicatoria

A mi mamá Angelica Gómez, por su amor incondicional, su apoyo constante y sus enseñanzas que han sido la base de cada logro. Sin su aliento y sacrificio, este trabajo no habría sido posible

A mi papá Alex Jurado, gracias por creer en mí incluso en los momentos más difíciles y por ser un modelo de dedicación y perseverancia. Este logro es también un testimonio de todo lo que me has enseñado y de la influencia positiva que has tenido en mi vida.

A mis abuelos en especial a mi querido abuelito Félix Gómez (+), cuya memoria y sabiduría han sido una fuente inagotable de inspiración en mi vida. Aunque ya no estás físicamente con nosotros, tu amor, tu fortaleza y tus enseñanzas continúan guiándome en cada paso que doy, te llevo en mi corazón y en mi mente, y tu legado será una guía constante en todo lo que emprenda.

Agradecimientos

A mis docentes Miss Marianela Barona, Dr. Cesar Alcacer, Dra. Iris Pérez, por su apoyo y comprensión durante cada etapa de este viaje académico. Sus palabras de ánimo y sus consejos han sido una fuente invaluable de motivación.

Finalmente, a mis amigos Oscar, Odalis, Lisseth, Michelle, Paula, Carlos, Milton, Paulo, Jhalmar, Fabricio, Yandry, Jeremy y demás compañeros quienes han compartido conmigo tanto los desafíos como los triunfos, y han enriquecido mi experiencia con su amistad y colaboración.

Gracias a todos por ser una parte fundamental de este logro



ANEXO No. 9

**PROCESO DE TITULACIÓN
CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL TUTOR**

Samborondón, 06 de agosto de 2024

Magíster

Erika Ascencio Jordán

Unidad Académica: Facultad de Ingenierías, Arquitectura y Ciencias de la Naturaleza

Universidad Tecnológica ECOTEC

De mis consideraciones:

Por medio de la presente comunico a usted que el trabajo de titulación TITULADO: EVALUAR EL USO DE CITOQUININA Y AUXINA EN MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE VAINILLA (*Vanilla tahitensis*) EN DAULE 2024, fue revisado, siendo su contenido original en su totalidad, así como el cumplimiento de los requerimientos establecidos en la guía para su elaboración, por lo que se autoriza al estudiante JURADO GÓMEZ DAYANA YAMILETTE, para que proceda con la presentación oral del mismo.

Atentamente,



Escaneado digitalmente por:
**JOSE IBRAHIN
HERNANDEZ ROSAS**

José Hernández Rosas, PhD.

Tutor(a)



ANEXO No. 12

CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL TUTOR PARA LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CON INCORPORACIÓN DE LAS OBSERVACIONES DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Samborondón, 12 de agosto de 2024

Magíster

Erika Ascencio Jordán

Unidad Académica: Facultad de Ingenierías, Arquitectura y Ciencias de la Naturaleza

Universidad Tecnológica ECOTEC

De mis consideraciones:

Por medio de la presente comunico a usted que el trabajo de titulación TITULADO: : EVALUAR EL USO DE CITOQUININA Y AUXINA EN MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE VAINILLA (*Vanilla tahitensis*) EN DAULE 2024; fue revisado y se deja constancia que el estudiante acogió e incorporó todas las observaciones realizadas por los miembros del tribunal de sustentación por lo que se autoriza a: **JURADO GÓMEZ DAYANA YAMILETTE**, para que proceda a la presentación del trabajo de titulación para la revisión de los miembros del tribunal de sustentación y posterior sustentación.

Atentamente,

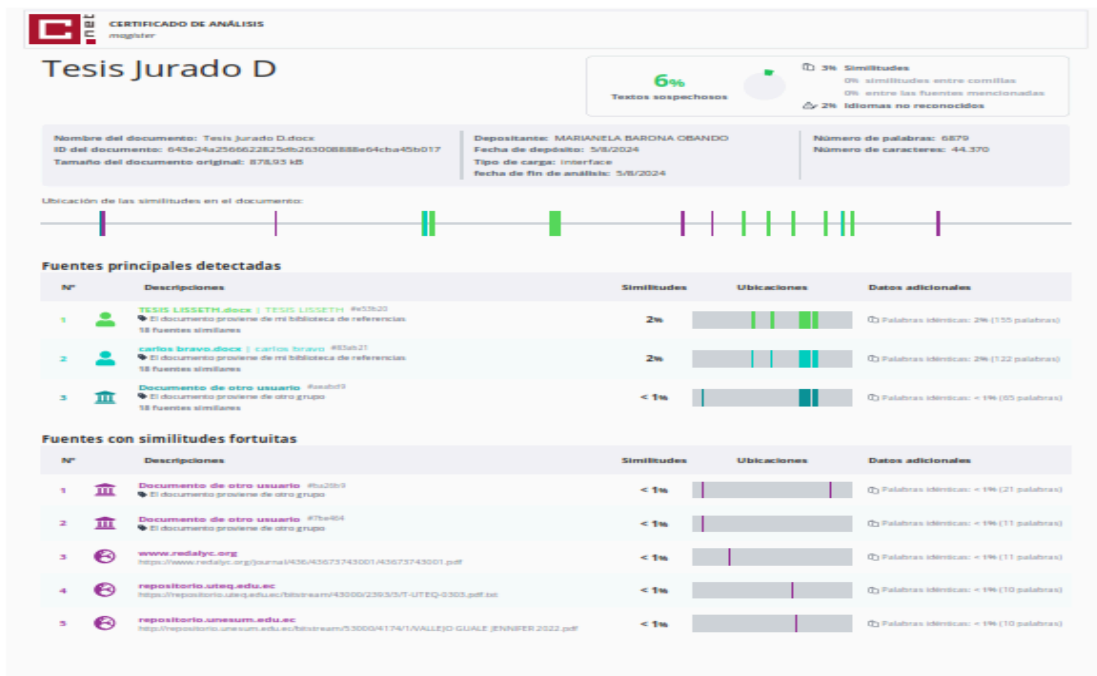


José Hernández Rosas, PhD.
Tutor(a)

ANEXO No. 10

**PROCESO DE TITULACIÓN
CERTIFICADO DEL PORCENTAJE DE COINCIDENCIAS
DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Habiendo sido revisado el trabajo de titulación TITULADO: EVALUAR EL USO DE CITOQUININA Y AUXINA EN MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE VAINILLA (*Vanilla tahitensis*) EN DAULE 2024, elaborado por JURADO GÓMEZ DAYANA YAMILETTE fue remitido al sistema de coincidencias en todo su contenido el mismo que presentó un porcentaje del (6%) mismo que cumple con el valor aceptado para su presentación que es inferior o igual al 10% sobre el total de hojas del documento. Adicional se adjunta print de pantalla de dicho resultado.



Atentamente,



Jose Ibrahin
HERNANDEZ ROSAS

José Hernández Rosas, PhD.
Tutor(a)

Resumen

El presente estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos in vitro AGROVITROPARIS, en Guayaquil, Parroquia Pascuales, con coordenadas Latitud 2°03'58.9" S y Longitud 79°55'02.2" W. Se seleccionaron orquídeas de la especie *Vanilla thaitensis* de viveros en Santo Domingo como plantas madre. Se tomaron yemas axilares y apicales como explantes. Después de pesar los reactivos con precisión, y las dosis de citocinas y auxinas de los tratamientos ya establecidos se mezclaron 300 ml de agua destilada con la solución madre, que contenía macronutrientes, micronutrientes, quelatos de hierro, y azúcares. El objetivo fue determinar la mejor concentración de citocinas y auxinas para el crecimiento de brotes *in vitro* de *Vanilla tahitensis*. Los resultados mostraron que los tratamientos con Zeatina y TDZ fueron los más efectivos en longitud y número de brotes, superando a otros reguladores evaluados. TDZ también tuvo el mayor promedio en número de hojas, seguido por BAP, Zeatina y K, que mostraron valores intermedios sin diferencias significativas entre ellos. El análisis de varianza no reveló diferencias significativas, pero los resultados de Tukey sugieren que TDZ es prometedor para mejorar la producción y longitud de raíces, consistente con estudios previos. También se recomienda usar Zeatina para mejorar la producción y longitud de brotes, así como el número de brotes. Zeatina puede ser una gran alternativa o complemento al TDZ, especialmente para diversificar los reguladores de crecimiento. BAP y K que pueden considerarse en condiciones moderadas, cuando se busca un equilibrio entre costo y eficacia o cuando TDZ y Zeatina no están disponibles.

Palabras claves: Crecimiento, Longitud, Número de brotes, Número de hojas.

Abstract

The present study was carried out in the AGROVITROPARIS *in vitro* tissue culture laboratory, in Guayaquil, Pascuales Parish, with coordinates Latitude 2°03'58.9" S and Longitude 79°55'02.2" W. Orchids of the species *Vanilla thaitensis* were selected. from nurseries in Santo Domingo as mother plants. Axillary and apical buds were taken as explants. After weighing the reagents accurately, and the doses of cytokines and auxins of the already established treatments, 300 ml of distilled water was mixed with the mother solution, which contained macronutrients, micronutrients, iron chelates, and sugars. The objective was to determine the best concentration of cytokines and auxins for the *in vitro* shoot growth of *Vanilla tahitensis*. The results showed that treatments with Zeatin and TDZ were the most effective in length and number of shoots, surpassing other regulators evaluated. TDZ also had the highest average number of leaves, followed by BAP, Zeatina and K, which showed intermediate values without significant differences between them. Analysis of variance revealed no significant differences, but Tukey's results suggest that TDZ is promising for improving root production and length, consistent with previous studies. It is also recommended to use Zeatin to improve shoot production and length, as well as the number of shoots. Zeatin can be a great alternative or complement to TDZ, especially to diversify growth regulators. BAP and K that can be considered in moderate conditions, when a balance between cost and effectiveness is sought or when TDZ and Zeatin are not available.

Keywords: Growth, Length, Number of shoots, Number of leaves.

Índice General

Dedicatoria	2
Agradecimientos	2
Resumen	3
Abstract	5
Índice de tablas	9
Índice de figuras	10
1. Introducción	10
1.1 Antecedentes del problema	10
1.2 Planteamiento y formulación del problema	12
1.2.1 Planteamiento del problema	12
1.2.2 Formulación del problema	12
1.3 Justificación de la investigación	13
1.4 Objetivo general	13
1.5 Objetivos específicos	13
2. Marco teórico	14
2.1 Estado del arte	14
2.2 Bases teóricas	19
3. Materiales y métodos	21
3.1 Delimitación de la investigación	21

3.1.1 Espacio	21
3.1.2 Tiempo:	22
3.1.3 Población:	22
3.2 Enfoque de la investigación	22
3.1.1 Tipo de investigación	22
3.1.2 Diseño de investigación	22
3.3 Metodología	22
3.3.1 Variables	22
3.3.1.1 Variable independiente	22
3.3.2 Hipótesis	23
3.3.3 Diseño experimental	23
3.3.4 Recursos	24
3.3.5 Métodos y técnicas	25
3.3.6 Análisis estadístico	28
3.4 Cronograma de actividades	29
4. Resultados	29
4.1 Determinar la concentración de regulador de crecimiento citocinas y auxinas sobre el crecimiento de brotes <i>in vitro</i> de micro esquejes estériles en medio MS.	29
4.2.2. Determinar la mejor relación de citoquininas y auxinas sobre el desarrollo foliar	31
4.3 Identificar la dosis optima en el desarrollo radicular	35

5. Discusión	40
6. Conclusiones	43
7. Recomendaciones	45
8. Referencias	46

Índice de tablas

Tabla 1. Tratamientos de estudio	22
Tabla 2. Recursos	23
Tabla 3. Esquema de análisis de varianza	27
Tabla 4. Estadística descriptiva de la longitud de brotes	28
Tabla 5. Estadística descriptiva del número de brotes	29
Tabla 6. Estadística descriptiva del número de hojas	30
Tabla 7. Análisis de la varianza de longitud de brotes	30
Tabla 8. Análisis de la varianza de número de brotes	31
Tabla 9. Análisis de la varianza del número de hojas	33
Tabla 10. Análisis a posteriori de Tukey al 0,05% de la longitud de brotes	34
Tabla 11. Análisis a posteriori de Tukey al 0,05% de número de brotes	34
Tabla 12. Análisis a posteriori de Tukey al 0,05% de número de hojas	35
Tabla 13. Análisis de la Varianza del efecto de los tratamientos sobre el número raíces afectadas.	36
Tabla 14. Promedio de raíces producida por tratamiento.	36
Tabla 15. Análisis de la varianza de la longitud de raíces	37
Tabla 16. Promedio de longitud de raíces por tratamiento	37

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación del ensayo	21
Figura 2. Diagrama de flujo de actividades (Jurado, 2024).	27
Figura 3. Cronograma de actividades del anteproyecto (Jurado, 2024)	28
Figura 4. Longitud de brotes de brotes en relación citoquininas y auxinas.	31
Figura 5. Número de brotes en relación citoquininas y auxinas (Jurado, 2024).	32
Figura 6. Porcentaje del número de hoja por tratamiento en relación citoquininas y auxinas. Jurado, 2024.	33

1. Introducción

1.1 Antecedentes del problema

El cultivo y propagación de *Vanilla* a través de diferentes metodologías son costosos, toman mucho tiempo y no son sustentables económicamente y debido a que su inflorescencia no permite una correcta polinización, haciendo necesario la polinización manual, es necesario el desarrollo de tecnologías y protocolos que permitan la propagación de las plantas de manera más sencilla y efectiva, evitando los riesgos de presencia de enfermedades, patógenos y la calidad de cultivos que son propagados (Gantait, 2017).

Es por eso que se han desarrollado tecnologías mediante la aplicación de la capacidad de la totipotencia que tienen las plantas para su reproducción y con la aplicación de bioestimulantes (Bio Track-O²) se ha generado un impacto positivo en el desarrollo, producción y crecimiento vegetal de la *V. thaitensis*, estas siendo aplicadas en pequeñas cantidades. Estas tienen la capacidad de ser aplicada vía foliar debido a su composición de macronutrientes y hormonas de crecimiento, de esta manera se satisfacen las necesidades de los elementos que necesita absorber y haciendo la producción de material vegetal *in vitro* más fácil (Moreno, 2021).

De esta manera asociando el uso de bio-estimulantes en medio de cultivo favorecerá a la micropropagación con una alta capacidad reproductiva y a partir de una sola planta madre (Zambrano, 2022).

La planta de vainilla puede aumentar su longitud en un rango de 0.5 a 1 m al mes. Puede ser cultivada a través de estacas o semillas, aunque el método preferido es el uso de estacas que tengan una longitud de 0.5 a 1 m. Sin

embargo, la propagación mediante estacas puede verse afectada por enfermedades y la escasez de material vegetativo. Una alternativa para superar estos problemas es el cultivo *in vitro*, como se menciona en el trabajo de Collantes, (1998).

Con el cultivo *in vitro* habría una gran ventaja en la cantidad de plantas producidas, en un menor tiempo y con menos problemas de enfermedades comparado con el método tradicional. Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo tiene por finalidad elaborar un procedimiento de establecimiento y micropropagación de *Vanilla planifolia* utilizando segmentos nodales y yemas axilares (Cordova, 2007).

La aplicación de carbón activado y fitohormonas en dosis de 1 g/L, permitió obtener las mejores vitroplantas con un elevado número de entrenudos, hojas y brotes con un promedio de dos entrenudos, cuatro hojas y dos brotes respectivamente, Así mismo se observó la presencia de raíces adventicias (Ordoñez, 2021).

1.2 Planteamiento y formulación del problema

1.2.1 Planteamiento del problema

La reproducción *in vitro* de vainilla depende en diversos factores que afectan la producción y la disponibilidad de esta planta, es susceptible a enfermedades, plagas y condiciones climáticas adversas, lo que puede ocasionar una producción irregular y una disminución en la calidad de los frutos.

1.2.2 Formulación del problema

¿El uso de reguladores de crecimiento en el proceso de micropropagación *in vitro* de *V. tahitensis* mejoró el desarrollo de raíces y

elongación caulinar?

1.3 Justificación de la investigación

El cultivo de vainilla es la segunda especie más cara del mundo siendo de difícil reproducción por su nivel de especialización para hacerlo, es por esto que mediante la aplicación de diversos medios de cultivos se podrá evaluar la calidad y capacidad de reproducción del cultivo.

Estimulando el crecimiento del sector exportador de vainilla se aumentan los niveles de producción ya que esta técnica proporciona un medio controlado para cultivar *V. tahitensis* en masa.

Esta investigación tiene como finalidad evaluar el desarrollo de segmentos nodales en medios de cultivos con reguladores de crecimiento, para obtener un medio adecuado para mejorar el desarrollo vegetativo

1.4 Objetivo general

Generar un protocolo de regeneración *in vitro* de *V. tahitensis* a través del uso de diferentes dosis de citocinas y auxinas

1.5 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de regulador de crecimiento citocinas y auxinas sobre el crecimiento de brotes *in vitro* de micro esquejes estériles en medio MS.
- Determinar la concentración más adecuada en el crecimiento foliar de los micro esquejes.
- Determinar la mejor relación de citoquininas y auxinas sobre la formación de raíces en micro esquejes.

2. Marco teórico

2.1 Estado del arte

En Kerala, India, se desarrolló un protocolo para la propagación masiva de *Vanilla tahitensis*. Se cultivaron segmentos nodales en medio M&S con BAP y NAA, a 25°C, con luz de 2500 lux y fotoperiodo de 16 horas. Los brotes se subcultivaron en el mismo medio y se enraizaron en un medio con kinetina y NAA. La multiplicación alcanzó una proporción de 1:4,7 en 60-70 días. Las plántulas, aclimatadas en una cámara de nebulización y un invernadero, fueron trasplantadas al campo bajo sombra parcial, logrando una supervivencia del 70-80%. Se produjeron 500 plántulas con este método (Mathew, 2000).

En la Isla de la Reunión y otras zonas tropicales húmedas, la vainilla cultivada es principalmente *Vanilla planifolia*, mientras que el origen de *Vanilla tahitensis* sigue siendo incierto. Los marcadores RAPD ayudaron a distinguir entre las tres especies estudiadas y revelaron bajos niveles de diversidad genética en *V. planifolia* en áreas como Isla Reunión y Polinesia. Además, se identificaron varias introducciones que dieron origen a los cultivares modernos en estas regiones (Besse, 2004).

Se seleccionaron marcadores RAPD específicos para cada especie y se aplicaron exitosamente a los híbridos putativos de *V. planifolia* y *V. tahitensis*. Los resultados sugieren que *V. tahitensis* probablemente no sea un híbrido directo entre *V. planifolia* y *V. pompona*, sino una especie estrechamente relacionada con *V. planifolia*. Estos hallazgos son cruciales para orientar futuros análisis genéticos de vainillas cultivadas en las áreas de introducción (Besse, 2004).

En un estudio sobre la germinación *in vitro* de vainas auto polinizadas de *Vanilla siamensis* de Tailandia, se evaluó el efecto de distintos medios de cultivo y reguladores del crecimiento. Las semillas germinaron asimbióticamente en condiciones asépticas, destacando el medio New Dogashima (NDM) con sacarosa, agua de coco y agar por su alta tasa de germinación (10,1%). La adición de ácido giberélico (GA3) aceleró el proceso, reduciendo el tiempo de germinación a 7-8 semanas, frente a las 10-11 semanas sin reguladores (Chaipanich, 2020).

Se transfirieron protocormos a medios con diferentes concentraciones de 6-benciladenina (BA) para evaluar su desarrollo. Se observó que 1/2 medio Murashige y Skoog (1/2 MS) proporcionó una mayor tasa de supervivencia en comparación con NDM. Para la formación de brotes, 1/2 MS con 0,5 mg/l de BA resultó ser el medio más adecuado. Tras el subcultivo en 1/2 MS con ácido α -naftalenacético (NAA), las plántulas se desarrollaron completamente en 8 semanas y se aclimataron con éxito en un 91,7%. Este protocolo es útil para la propagación masiva de *V. siamensis*, contribuyendo a su conservación *in vitro* (Chaipanich, 2020).

En un estudio realizado en Politeknik Negeri Jember, Indonesia, se investigaron las limitaciones del desarrollo de la vainilla mediante propagación vegetativa convencional, enfocándose en el uso de esquejes de tallo. Se examinó la capacidad de los explantes para regenerarse y diferenciarse *in vitro*, destacando la importancia del control con citoquininas para una multiplicación eficiente. El objetivo del estudio es analizar el efecto de dos citoquininas, BAP y Kinetina, en la multiplicación de vainilla (Erawati, 2020).

La investigación utilizó un diseño completamente aleatorizado en cultivo de tejidos, aplicando diversas concentraciones de BAP y Kinetin en el medio basal MS. Los resultados mostraron que los reguladores de crecimiento exógenos no influyeron en la aparición de brotes de vainilla. Sin embargo, la adición de 3 mg/L de BAP produjo la mejor multiplicación, con 3 a 4 brotes y longitudes de 2 a 2.5 cm tras 28 días de inoculación (Erawati, 2020).

Este estudio en Java, Indonesia, aborda la escasez de plántulas de vainilla mediante la introducción de cogollos como estrategia sostenible. Realizado en dos laboratorios en Salatiga, Java Central, se aplicó un diseño completamente al azar (CRD) 5 x 3 con dos repeticiones para evaluar distintas concentraciones de BAP y Kinetin. La adición de BAP redujo el tiempo de aparición de las yemas a 8 días, aunque no impactó significativamente la cantidad de cogollos (Mahardhini, 2023).

La aplicación de BAP a 1.44 mg/L incrementó la longitud de las yemas. Se observó una interacción entre Kinetin a 2 mg/L y BAP a 2.4 mg/L, que resultó en un mayor diámetro de yema con una forma de regresión lineal. Además, la combinación de Kinetin a 0 mg/L y BAP a 1.2 mg/L produjo el mayor número de raíces. Estos resultados sugieren estrategias para mejorar la producción sostenible de plántulas de vainilla (Mahardhini, 2023).

Según Villegas (2022), este estudio realizado en México en 2021 se centra en la micropropagación masiva de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). Aunque se ha demostrado la eficiencia de estos sistemas, aún faltan estudios detallados sobre el tiempo, la frecuencia de inmersión y el volumen óptimo en BIT para la

proliferación de brotes de vainilla. El objetivo es caracterizar morfogénicamente la vainilla en BIT y optimizar el proceso de micropropagación para asegurar la estabilidad genética.

Se realizaron tres experimentos variando el tiempo de inmersión (5, 10 y 15 min), la frecuencia de inmersión (6, 12 y 18 h) y el volumen de medio de cultivo (20, 30 y 40 mL/explante). Los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas en los tiempos, la frecuencia y el volumen evaluados. El tiempo de inmersión óptimo fue de 15 minutos, la frecuencia ideal fue de 6 horas, y el volumen adecuado fue de 40 mL por explante (Villegas, 2022).

Comparado con el medio semisólido, el sistema BIT demostró ser 1.8 veces más efectivo en la producción de brotes y 4 veces en el incremento de peso fresco. El BIT generó 36 brotes por explante, mientras que el medio semisólido produjo solo 20 brotes. En conclusión, el sistema BIT optimizó la micropropagación de *V. planifolia*, mostrando una mejora significativa en la formación de brotes preformados (Villegas, 2022).

En México, en 2008, se desarrolló un protocolo completo y eficiente para la regeneración de *Vanilla planifolia* Andrews. El estudio se centró en la micropropagación de vainilla mediante la regeneración de brotes a partir de yemas axilares. Las yemas jóvenes y maduras se cultivaron en medio Murashige y Skoog con diversas concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA) y ácido naftalenoacético (NAA). Se observó que la concentración de citoquininas y la posición de las yemas en el tallo influyeron significativamente en la formación de brotes, siendo la mejor formación lograda con 9.55 μM de BA y suplementos específicos en el medio (Lee, 2008).

Las plantas desarrollaron sistemas radiculares y fueron trasladadas al invernadero con una tasa de supervivencia del 100%. Utilizando yemas jóvenes y maduras, se logró un notable aumento en el número de brotes por explante. La estrategia de emplear todas las yemas de la parte superior del tallo y subcultivar cada 90 días permitió alcanzar una alta tasa de multiplicación, con 1.1 a 1.86×10^5 brotes por yema anualmente. Estos resultados demuestran un método eficiente para la multiplicación masiva de vainilla mediante micropropagación (Lee, 2008).

En Daule, Ecuador, se evaluó el impacto del bioestimulante BioTrack-O2 en el crecimiento de *Vanilla tahitensis*. Se aplicaron cinco concentraciones de BioTrack-O2 en un diseño completamente aleatorio con diez repeticiones, y se analizaron variables como el número de entrenudos, hojas, diámetro del tallo y altura de la planta. La concentración de 0,75 mL/L demostró ser la más efectiva, alcanzando un estado fenológico óptimo a los 90 días con 8 entrenudos y a los 210 días con 17 entrenudos (Paris, 2021).

Además, se observaron alturas de planta de 0,79 m y 1,81 m, diámetros de tallo de 0,48 cm y 0,70 cm, y números de hojas de 9 y 18 a los 90 y 210 días, respectivamente. En conclusión, el uso de bioestimulantes, especialmente a la concentración de 0,75 mL/L, tuvo un impacto positivo en el crecimiento y desarrollo de *V. tahitensis*, mejorando su propagación y establecimiento en el campo (Paris, 2021).

La investigación en Napo, Ecuador, buscó desarrollar un protocolo de micropropagación para *Vanilla odorata* C. Presl como alternativa al método de propagación por esquejes. Se utilizaron yemas axilares de plantas madre de

Tena y se evaluaron dos protocolos de desinfección (PD1 y PD2) durante la fase de establecimiento *in vitro* (Romero, 2021).

El protocolo PD2 demostró mayor eficiencia con menor contaminación (40%) y alrededor del 60% de supervivencia. En la fase de multiplicación, se evaluaron cuatro medios de cultivo con diferentes concentraciones de BAP, y se encontró que las concentraciones de 2.15 y 3 mg/L de BAP promovieron una mayor brotación, con índices de multiplicación de 4 y 3.5 a los 60 días, respectivamente. Estos resultados preliminares permitieron establecer y multiplicar explantes de *V. odorata in vitro* en medios semisólidos (Romero, 2021).

La investigación busca desarrollar un protocolo de desinfección para explantes y semillas de *Vanilla* spp. y evaluar medios de cultivo sólidos y líquidos para la propagación *in vitro*. Se utilizaron diversas combinaciones de hipoclorito de sodio, Tween 20, jabón ecológico, etanol, Tego 5% y peróxido de hidrógeno 3% en tres montajes experimentales. Se probaron medios sólidos con diferentes concentraciones de ácido indolacético (AIA) y giberelina (GEB), así como medios líquidos sin agar (Romero, 2021).

El tratamiento más efectivo fue el tercero, mientras que los dos primeros mostraron contaminación del 100% después de ocho días de siembra. Estos resultados contribuyen a mitigar problemas de contaminación en la propagación *in vitro* de *Vanilla* spp (Romero, 2021)

2.2 Bases teóricas

La vainilla se divide en dos subgéneros: *Vanilla* y *Xanata*. El subgénero *Vanilla* se caracteriza por especies con hojas membranáceas, ausencia de callo

penicilar en el labelo, una columna unida al labelo solo en la base, un estigma cóncavo y una antera subperpendicular. En contraste, el subgénero *Xanata* incluye especies con hojas coriáceas a carnosas y se subdivide en las secciones *Tethya* y *Xanata*. La sección *Tethya* abarca especies africanas y asiáticas sin hojas, así como especies caribeñas sin hojas y con frutos sin aroma (Oliveira, 2022).

La sección *Xanata* se divide en seis grupos, principalmente compuestos por especies americanas, algunas de las cuales producen frutos aromáticos, especialmente en los grupos morfológicos *V. planifolia* y *V. pompona*. Aunque las especies de vainilla tienen una amplia distribución global, las poblaciones locales son pequeñas, lo que dificulta su representación en colecciones biológicas (Oliveira, 2022).

Se ha encontrado evidencia de vainilla en el Viejo Mundo alrededor de 1650-1550 a.C. En el siglo XVI, tras la conquista española de los aztecas, la vainilla fue introducida en Europa, pero no se cultivó fuera de su área de distribución nativa hasta 1832. Fue entonces cuando Edmond Albius, de Isla Reunión, desarrolló una técnica para polinizar manualmente las flores (Oliveira., 2022).

3. Materiales y métodos

3.1 Delimitación de la investigación

La delimitación de la investigación indica con precisión el espacio, el tiempo o período y la población involucrada.

3.1.1 Espacio

Este trabajo se llevará a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos *in vitro* AGROVITROPARIS, ubicado en la ciudad de Guayaquil, Parroquia Pascuales, cuyas coordenadas geográficas son Latitud 2°03'58.9" S y Longitud 79°55'02.2" W.

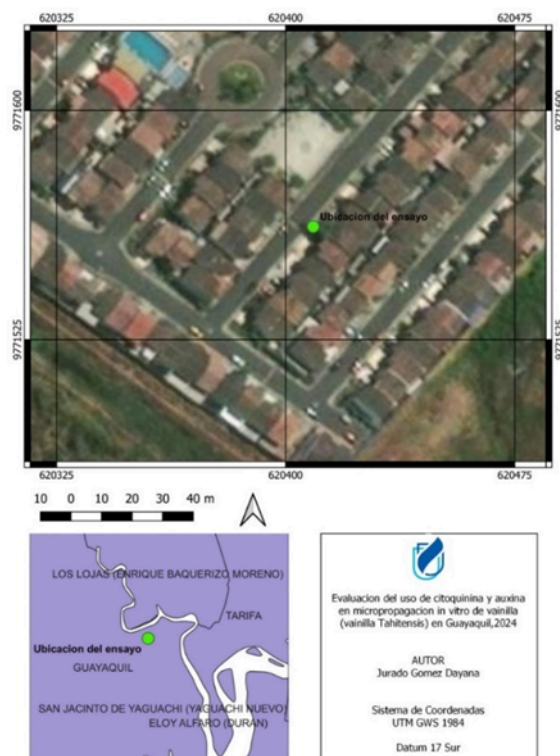


Figura 1. Ubicación del ensayo

Fuente: Google Earth

Jurado, 2024

3.1.2 Tiempo:

Este trabajo tendrá una duración de 4 meses.

3.1.3 Población:

Esta investigación afectará aproximadamente a 30 compañías activas que comercializan el cultivo de vainilla en Ecuador.

3.2 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

- Investigación de campo y laboratorio
- Investigación experimental

Esta investigación tendrá un enfoque aplicado de laboratorio y experimental.

3.1.2 Diseño de investigación

El diseño propuesto para esta investigación será diseño completamente aleatorizado (DCA), del cual se va a evaluar cinco tratamientos y un testigo, con la finalidad de determinar la mejor dosis que incida en el incremento del número de raíces, crecimiento radicular y caulinar de los explantes de vainilla (*Vanilla tahitensis*) mediante una prueba denominada Test de Tukey al 5% de probabilidad.

3.3 Metodología

3.3.1 Variables

Según el tipo de investigación, se incluyen las variables.

3.3.1.1 Variable independiente

Metodología y tratamientos a emplear de las dosis de citocinas y auxinas.

3.3.1.2 Variable dependiente

- Número de raíces
- Crecimiento radicular (Longitud de raíces)
- Elongación caulinar de los explantes (Número de brotes, longitud de los brotes; número de hojas).

3.3.2 Hipótesis

El uso de citocinas y auxinas en una dosis de citocinas 2.00 mg/lit + auxinas 2.00 mg/lit influye con mayor significancia en el crecimiento radicular y caulinar de los explantes de vainilla (*Vanilla tahitensis*) en un medio de cultivo *in vitro*.

3.3.3 Diseño experimental

Tabla 1. Tratamientos de estudio

N°	Hormonas vegetales	
	Citoquininas (mg/L)	Auxinas (mg/L)
BAP	2	0,25
TDZ	2	0,25
K	2	0,25
Zeatina	2	0,25
2 iP	2	0,25
Testigo	0	0

Dosificación de fitohormonas (Jurado, 2024)

Se realiza un diseño de bloques completamente aleatorizado (DCA), que consta con 5 tratamientos y un testigo sumando 6 tratamientos y cinco repeticiones, con dosificaciones distintas de citocinas y auxinas según el tratamiento en el cultivo de vainilla (*Vanilla tahitensis*), lo cual nos da el total de 30 unidades experimentales.

3.3.4 Recursos

Tabla 2. Recursos

Marcador permanente	1.00\$
Papel kraf	6.99\$
Libreta	1.50\$
Esfero	0.75\$
Papel aluminio	3.50\$
Agitador magnético	30.00\$
Micropipeta x3	69.99\$
Alcohol al 75%	8.00\$
Cajas de Petri x20	32.99\$
Hojas de bisturí x100	11.99\$
Autoclave	300.00\$
Probetas	15.99\$
Mechero	17.29\$
Medio de cultivo MS	10\$
Hidróxido de sodio	30\$
Agua destilada estéril x4 gl	49.95\$
Frascos de cristal x20	23.99\$
Papel de aluminio	6.00\$
Cámara vertical	380.00\$
Estereoscopio	178.00\$
Balanza de precisión	429.00\$
Refrigeradora	300.00\$
Estanterías con lámparas fluorescentes	66.00\$

Computadora	950.00\$
Micro estacas de Vanilla tahitensis	15.00\$
Asesoramiento de Dra: Iris Pérez	0.00
Puntas de pipetas x24	16.99\$
Fitohormonas	12.00\$
Mandil	25.00\$
Guantes X50	8.00\$
Mascarillas X100	10.00\$
Erlenmeyer	26.99\$

Jurado, 2024

3.3.5 Métodos y técnicas

3.3.5.1 Método de Selección

Se escogieron orquídeas de la especie *Vanilla thaitensis* seleccionadas como plantas madres, las cuales fueron obtenidas de viveros en Santo Domingo. Se tomaron yemas axilares y apicales como explantes durante el proceso.

3.3.5.2 Proceso de desinfección

En la obtención de explantes a partir de una planta madre seleccionada, se realizaron cortes en yemas apicales y axilares. Antes de la extracción, se desinfectaron los fragmentos para eliminar contaminantes externos, principalmente hongos y bacterias ambientales. El material desinfectado se mantuvo en condiciones de asepsia utilizando cabinas de flujo laminar. Los explantes resultantes se colocaron en tubos de cultivo con medio de iniciación

para controlar su sanidad y viabilidad. La desinfección del material se llevó a cabo con hipoclorito de sodio, seguido de enjuagues con agua esterilizada.

3.3.5.3 Preparación de medios de cultivo

Después de pesar meticulosamente los reactivos en una balanza analítica, se procedió a verter 300 ml de agua destilada y la solución madre, compuesta por macronutrientes, micronutrientes, quelatos de hierro, vitaminas de Morel, inositol y azúcar de coco, en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml.

Posteriormente, se utilizó un agitador magnético hasta lograr la completa disolución de todos los reactivos precipitados. Una vez disueltas las soluciones, se ajustó el volumen en el matraz Erlenmeyer a un litro mediante la adición de agua destilada, seguido de la corrección del pH con unas gotas de NaOH y HCl.

Luego, la solución resultante se transfirió a frascos de 200 mL a una proporción de 30-35 mL por frasco. Cada frasco fue cubierto con papel aluminio y sellado de la misma manera. Finalmente, el medio de cultivo se esterilizó en una autoclave a 121 °C durante 15 min. La cantidad inicial de frascos para cada tratamiento fue de 28 unidades de 200 mL.

3.3.5.4 Corte de explantes

Se cortan los brotes completamente desinfectados en fragmentos de 1-2 cm de longitud.

3.3.5.5 Paso al medio de cultivo

Se coloca los segmentos de brotes en el medio de cultivo estéril en frascos de vidrio previamente esterilizados.

Se aplican la dosis de citocinas y auxinas en el medio de cultivo.

Se comprueba que cada frasco contenga un solo fragmento de brote para evitar la competencia por nutrientes.

3.3.5.6 Crecimiento

Se colocan los frascos en una estufa de cultivo con temperatura y luz controlada.

3.3.5.7 Enraizamiento

Se transfieren los explantes a otro medio que favorezca el enraizamiento, con temperatura y humedad controlada que favorezca el desarrollo de las raíces.

3.3.5.8 Cuidado

Se proporciona cuidado continuo a las plantas jóvenes, asegurándose de mantener condiciones óptimas para su crecimiento.

3.3.5.9 Toma de datos

Se tomarán los datos continuamente, al finalizar el proyecto se hará un análisis de los datos para corroborar que tratamiento tuvo mayor efectividad.

3.3.5.1 Diagrama de flujo de las actividades experimentales a realizar durante su trabajo de titulación

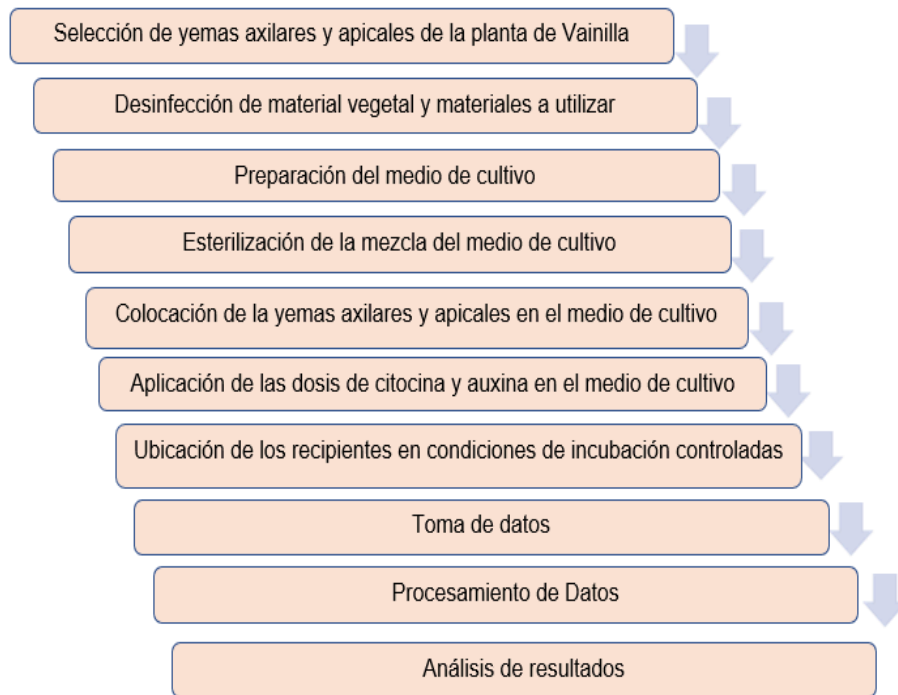


Figura 2. Diagrama de flujo de actividades (Jurado, 2024).

3.3.6 Análisis estadístico

En esta investigación usaremos el análisis estadístico descriptivo mediante una prueba denominada Test de Tukey al 5% de probabilidad.

Tabla 3. Esquema de análisis de varianza

Fuentes de variación	GL
Tratamiento (T-1)	4
Repeticiones (T-1)	5
Error experimental	20
Total	29

Jurado, 2024

3.4 Cronograma de actividades

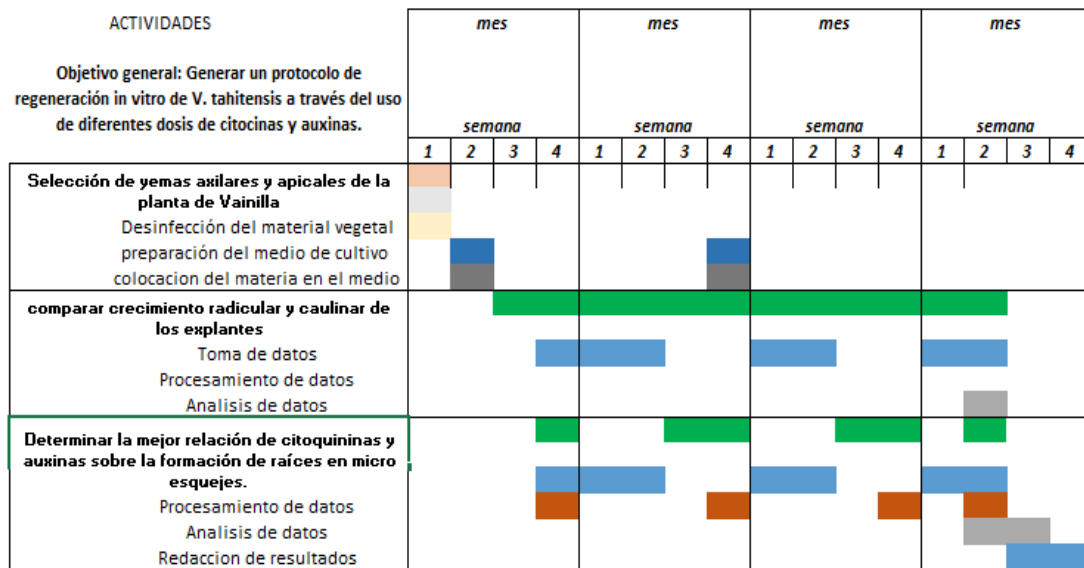


Figura 3. Cronograma de actividades del anteproyecto (Jurado, 2024)

4. Resultados

4.1 Determinar la concentración de regulador de crecimiento citocinas y auxinas sobre el crecimiento de brotes *in vitro* de micro esquejes estériles en medio MS.

En la tabla 4. Se muestra el análisis descriptivo de la longitud de brotes de vainilla

Tabla 4. Estadística descriptiva de la longitud de brotes

Tratamiento	Media	Error típico	Mediana	Moda	Desviación estándar	Varianza de la muestra	Rango	Mínimo	Máximo
BAP	0,78	0,06	0,80	0,90	0,13	0,02	0,3	0,6	0,9
TDZ	3,98	0,28	4,00	--	0,63	0,40	1,7	3	4,7
K	0,7	0,08	0,80	0,50	0,19	0,04	0,4	0,5	0,9

<i>Zeatina</i>	2,04	0,10	2,00	--	0,23	0,05	0,6	1,8	2,4
<i>2iP</i>	0,98	0,07	1,00	1,00	0,15	0,02	0,4	0,8	1,2
<i>Testigo</i>	0,48	0,13	0,50	0,50	0,29	0,09	0,8	0	0,8

BAP= Benzilaminopurina. TDZ= Thidiazuron. K= Kinetina. 2iP = 2-Isopenteniladenina, T.= Tratamiento Jurado, 2024.

Los datos de las evaluaciones de la variable longitud de brotes se presentan en la Tabla 4, donde se puede observar que los tratamientos Zeatina y TDZ presentan la mayor longitud promedio de brotes y son superiores a los demás. Las demás medidas de tendencia central como la mediana y la moda también parecen coincidir con la media. Las medidas de desviación, varianza y la desviación estándar indican que los datos fueron bastante uniformes y se lo puede confirmar con el rango de los mismos.

Tabla 5. Estadística descriptiva del número de brotes

Tratamientos	Media	Error típico	Mediana	Moda	Desviación estándar	Varianza	Rango	Mínimo	Máximo
<i>BAP</i>	2,4	0,24	2,00	2,00	0,55	0,3	1	2	3
<i>TDZ</i>	5,4	0,40	6,00	6,00	0,89	0,8	2	4	6
<i>K</i>	2,4	0,40	3,00	3,00	0,89	0,8	2	1	3
<i>Zeatina</i>	4,4	0,40	5,00	5,00	0,89	0,8	2	3	5
<i>2iP</i>	0,8	0,20	1,00	1,00	0,45	0,2	1	0	1
<i>Testigo</i>	0,8	0,20	1,00	1,00	0,45	0,2	1	0	1

BAP= Benzilaminopurina. TDZ= Thidiazuron. K= Kinetina. 2iP = 2-Isopenteniladenina Jurado, 2024

Los datos de las evaluaciones de la variable número de brotes se presentan en la Tabla 5, donde se puede observar que los tratamientos Zeatina y TDZ presentan el mayor número de brotes, 2iP y el testigo presentaron un número bajo de brotes y dos tratamientos presentaron un nivel medio. Las demás medidas de tendencia central como la mediana y la moda también parecen coincidir con la media. Las medidas de desviación como la varianza y la

desviación estándar indican que los datos fueron bastante uniformes y se lo puede confirmar con el rango de los mismos.

En la tabla 6 se presentan los resultados del análisis descriptivo del número de hojas de vainillas.

Tabla 6. Estadística descriptiva del número de hojas

Tratamiento	Media	Error típico	Mediana	Moda	Desviación estándar	Varianza	Rango	Mínimo	Máximo
<i>BAP</i>	2,4	0,24	2,00	2,00	0,55	0,30	1	2	3
<i>TDZ</i>	3,6	0,24	4,00	4,00	0,55	0,30	1	3	4
<i>K</i>	1,4	0,24	1,00	1,00	0,55	0,30	1	1	2
<i>Zeatina</i>	1,6	0,24	2,00	2,00	0,55	0,30	1	1	2
<i>2iP</i>	1,2	0,20	1,00	1,00	0,45	0,20	1	1	2
<i>Testigo</i>	0,4	0,24	0,00	0,00	0,55	0,30	1	0	1

BAP= Benzilaminopurina. TDZ= Thidiazuron. K= Kinetina. 2iP = 2-Isopenteniladenina
Jurado, 2024

4.2 2. Determinar la mejor relación de citoquininas y auxinas sobre el desarrollo foliar

En la tabla 7. Se detalla en análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre la longitud de brotes

Tabla 7. Análisis de la varianza de longitud de brotes

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	45,23	9	5,03	56,72	<0,0001	
Tratamientos	44,55	5	8,91	100,57	<0,0001	
Repeticiones		0,67	4	0,17	1,90	0,1505
Error	1,77	20	0,09			
Total	47,00	29				

Jurado, 2024.

El análisis de varianza de la variable longitud de brotes que se presenta en la Tabla 6 nos indica que los tratamientos fueron significativos ya que su pvalor es menor que 0.05 (<0.0001), es decir que al menos uno de ellos es

significativamente diferente a los demás. Por lo tanto, es necesario realizar un análisis de comparaciones múltiples.

En la figura 1, se muestra longitud de brotes de brotes en relación citoquininas y auxinas.

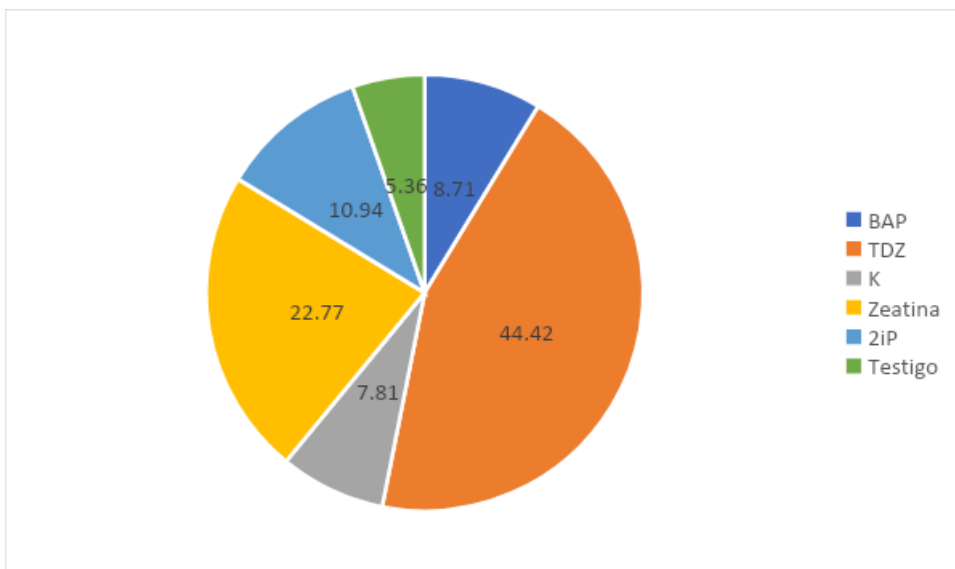


Figura 1. Longitud de brotes de brotes en relación citoquininas y auxinas. Jurado,2024

En cuanto al porcentaje, el tratamiento con TDZ representa el 44.42 % de la longitud de los brotes, que es el mayor porcentaje, mientras que el segundo mayor porcentaje lo representa la Zeatina con 22.77 %. Los demás tratamientos (2iP, BAP, K y el testigo) representan un bajo porcentaje de la longitud de brotes.

En la tabla 8, se muestra el análisis de varianza de numero de brotes de vainillas

Tabla 8. Análisis de la varianza de número de brotes

E.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	92,03	9	10,23	24,74	<0,0001

Tratamientos	87,90	5	17,58	42,53	<0,0001
Repeticiones	4,13	4	1,03	2,50	0,0751
Error	8,27	20	0,41		
Total	100.30	29			

Jurado, 2024.

El análisis de varianza de la variable número de brotes que se presenta en la Tabla 7 nos indica que los tratamientos fueron significativos ya que su pvalor es menor que 0.05 (<0.0001), es decir que al menos uno de ellos es significativamente diferente a los demás. Por lo tanto, es necesario realizar un análisis de comparaciones múltiples.

En la figura 2, se presentan el número de brotes de brotes en relación citoquininas y auxinas.

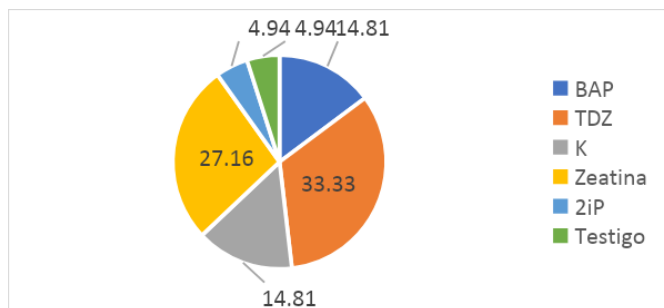


Figura 2. Número de brotes en relación citoquininas y auxinas (Jurado, 2024).

El tratamiento con TDZ representa el mayor porcentaje de número de brotes con 33.33 %, mientras que el segundo mayor porcentaje lo representa la Zeatina con 27.16 %. Un porcentaje importante también es el de los tratamientos K y BAP con 14.81% cada uno. Los demás tratamientos (2iP y el testigo) representan un bajo porcentaje de la longitud de brotes.

En la tabla 9, se detalla el análisis de varianza de numero de hojas de vainillas

Tabla 9. Análisis de la varianza del número de hojas

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32,10	9	3,57	13,54	<0,0001
Tratamientos	30,57	5	6,11	23,22	<0,0001
Repeticiones	1,53	4	0,38	1,46	0,2528
Error	5,27	20	0,26		
Total	37,37	29			

Jurado, 2024.

El análisis de varianza de la variable número de hojas que se presenta en la Tabla 9 nos indica que los tratamientos fueron significativos ya que su pvalor es menor que 0.05 (<0.0001), es decir que al menos uno de ellos es significativamente diferente a los demás. Por lo tanto, es necesario realizar un análisis de comparaciones múltiples.

En la figura 3, se presentan el Porcentaje del número de hoja por tratamiento en relación citoquininas y auxinas.

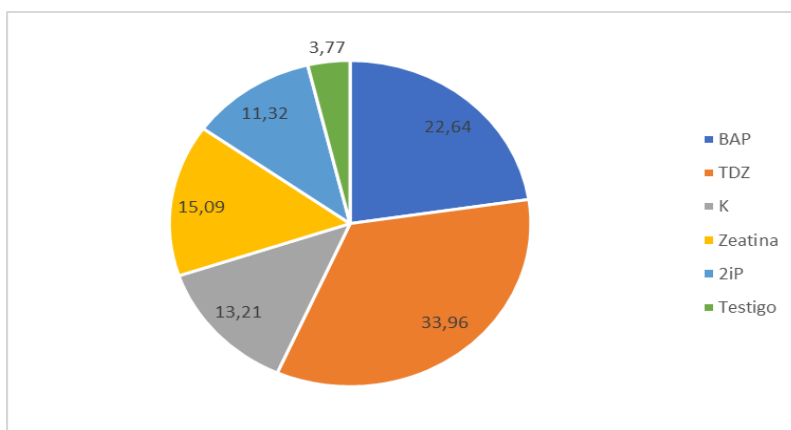


Figura 3. Porcentaje del número de hoja por tratamiento en relación citoquininas y auxinas. Jurado, 2024.

En la Figura 3 podemos observar que el tratamiento con TDZ representa el mayor porcentaje de número de hojas con 33.96 %, mientras que el segundo

mayor porcentaje lo representa BAP con 22.64 %. Los demás tratamientos (2iP, Zeatina, K y el testigo) representan un bajo porcentaje del número de hojas.

4.3 Identificar la dosis óptima en el desarrollo radicular

En la tabla 10. Se exhibe el análisis a posteriori de Tukey al 0,05 % del efecto de los tratamientos sobre la longitud de brotes

Tabla 10. Análisis a posteriori de Tukey al 0,05% de la longitud de brotes

Tratamientos Medias

Testigo	0,48 c
K	0,70 c
BAP	0,78 c
2iP	0,98 c
Zeatina	2,04 b
<u>TDZ</u>	<u>3,98 a</u>

BAP= Benzilaminopurina. TDZ= Thidiazuron. K= Kinetina. 2iP = 2-Isopenteniladenina

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), Jurado, 2024.

Al realizar la prueba de comparaciones múltiples con Tukey al 5% se observa que el tratamiento con TDZ presentó la mayor longitud de brotes (3.98) y es significativamente diferente a los demás tratamientos. Luego sigue el tratamiento con Zeatina el cual presentó en promedio 2.04 hojas y es significativamente superior al resto de tratamientos. Finalmente, un grupo de tratamientos (2iP, BAP y K) junto con el testigo presentaron un nivel estadísticamente igual de la longitud de brotes de vainilla.

En la tabla 11. Se presenta el análisis a posteriori de Tukey al 0,05 % del efecto de los tratamientos sobre el número de brotes.

Tabla 11. Análisis a posteriori de Tukey al 0,05% de número de brotes
Tratamientos Medias

2iP	0,80 c
Testigo	0,80 c
K	2,40 b
BAP	2,40 b
Zeatina	4,40 a
<u>TDZ</u>	<u>5,40 a</u>

BAP= Benzilaminopurina. TDZ= Thidiazuron. K= Kinetina. 2iP = 2-Isopenteniladenina

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) Jurado, 2024.

Al realizar la prueba de comparaciones múltiples con Tukey al 5% se observa que el tratamiento con TDZ, junto con el tratamiento con Zeatina presentaron el mayor número de brotes (5.40 y 4.40 respectivamente) y son significativamente diferentes a los demás tratamientos. Un segundo grupo de tratamientos (BAP y K) presentaron un nivel medio de número de brotes (2.40) y finalmente, el tratamiento con 2iP junto con el testigo presentaron un nivel bajo y son estadísticamente iguales entre ellos en cuanto a la longitud de brotes de vainilla.

En la tabla 12. Se muestra el análisis a posteriori de Tukey al 0,05 % del efecto de los tratamientos sobre el número de hojas.

Tabla 12. Análisis a posteriori de Tukey al 0,05% de número de hojas
Tratamientos Medias

Testigo	0,40 d
2iP	1,20 c
K	1,40 bc
Zeatina	1,60 bc
BAP	2,40 b
<u>TDZ</u>	<u>3,60 a</u>

BAP= Benzilaminopurina. TDZ= Thidiazuron. K= Kinetina. 2iP = 2-Isopenteniladenina

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Jurado, 2024.

Al realizar la prueba de comparaciones múltiples con Tukey al 5% se observa que el tratamiento con TDZ presentó el mayor número de hojas (3.60) y es significativamente diferente a los demás tratamientos. Luego un segundo grupo de tratamientos (BAP, Zeatina y K) siguen al TDZ en cuanto a número de hojas, siendo similares entre ellos. Por último, el tratamiento con 2iP obtuvo el nivel más bajo de número de hojas superando únicamente al testigo.

En la tabla 13, se muestra el Anova del efecto de los tratamientos sobre el número de raíces en condiciones controladas.

Tabla 13. Análisis de la Varianza del efecto de los tratamientos sobre el número raíces afectadas.

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	7,10	5	1,42	1,74	0,1641
Tratamientos	7,10	5	1,42	1,74	0,1641
Error	19,60	24	0,82		
<u>Total</u>	<u>26,70</u>	<u>29</u>			

Jurado, 2024.

En la tabla 13 se presentó que no hubo diferencia estadística entre los tratamientos analizados.

En la tabla 14, se muestra la prueba a posteriori de Tukey al 5% del efecto del uso de hormonas para estimular número de raíces.

Tabla 14. Promedio de raíces producida por tratamiento.
Tratamientos Medias

Testigo	0,40 a
BAP	0,80 a
Zeatina	1,00 a
K	1,20 a
2iP	1,20 a

TDZ 2,00 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)
Jurado, 2024.

En esta tabla se puede observar una diferencia aritmética entre tratamientos, donde el TDZ obtuvo el mayor número de raíces con 2 a diferencia del testigo (0,49).

En la tabla15. Se muestra el Anova de la longitud de raíces (cm) y el efecto de los tratamientos sobre la longitud de raíces.

Tabla 15. Análisis de la varianza de la longitud de raíces

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	43,22	5	8,64	2,57	0,0537
Tratamientos	43,22	5	8,64	2,57	0,0537
Error	80,84	24	3,37		
<u>Total</u>	<u>124,05</u>	<u>29</u>			

Jurado, 2024.

En la tabla 15. Se evidencia que hubo diferencia estadística entre tratamientos.

En la tabla 16. Se muestra la prueba a posteriori de Tukey al 5 % del efecto de los tratamientos sobre la longitud de raíces.

Tabla 16. Promedio de longitud de raíces por tratamiento

Tratamientos Medias

Testigo	0,72 b
BAP	1,70 ab
K	1,76 ab
2iP	1,94 ab
Zeatina	2,16 ab
<u>TDZ</u>	<u>4,64 a</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)
Jurado, 2024.

En la tabla 16. Se evidencia que el mejor tratamiento fue el TDZ con 4,64 cm y el testigo fue el que presentó el menor tamaño.

5. Discusión

El estudio evaluó el impacto de varios reguladores de crecimiento, incluyendo BAP (Benzilaminopurina), TDZ (Thidiazuron), K (Kinetina), Zeatina, y 2iP (2-Isopenteniladenina), así como un grupo control (Testigo), en la longitud de los brotes de microesquejes estériles *in vitro*. Los resultados mostraron variaciones significativas entre los tratamientos en términos de longitud media de brotes.

TDZ presentó la longitud promedio más alta de brotes (3,98 cm), seguido por Zeatina (2.04 cm) y luego por 2iP (0.98 cm). Estos resultados indican que TDZ y Zeatina tienen efectos más pronunciados en el estímulo del crecimiento de brotes en comparación con otros reguladores evaluados. Por otro lado, el tratamiento con K mostró la longitud media más baja de brotes (0,7 cm), seguido por BAP (0,78 cm) y el testigo (0,48 cm).

El análisis descriptivo del número de hojas en diferentes tratamientos hormonales revela diferencias significativas en la eficacia de cada uno para promover el crecimiento foliar en plantas. El tratamiento con TDZ (Thidiazuron) mostró la mayor media con 3,6 hojas por planta, seguido de BAP (Benzilaminopurina) con 2,4 hojas por planta. Kinetina, Zeatina y 2iP (2-Isopenteniladenina) presentaron medias de 1,4, 1,6 y 1,2 hojas por planta, respectivamente. El tratamiento testigo, sin aplicación hormonal, tuvo la menor media con 0,4 hojas por planta.

Esta investigación concuerda con otros estudios donde se ha documentado la capacidad diferencial de citocininas y auxinas para promover el crecimiento de brotes *in vitro* en diversas especies vegetales (Smith et al., 2020; Johnson &

Brown, 2019). Además, estudios han destacado la importancia de la concentración y la interacción específica entre los reguladores de crecimiento y los tejidos vegetales para optimizar los resultados de cultivo *in vitro* (Andrade-Andrade et al., 2023; Gómez & Pérez, 2018).

La efectividad de los tratamientos puede variar según las condiciones experimentales específicas y la especie de planta utilizada. La respuesta de los brotes de vainilla a los diferentes reguladores podría estar influenciadas por la capacidad de cada compuesto para inducir la división celular, el alargamiento celular y otros procesos relacionados con el crecimiento (Romero, 2023; Martínez et al., 2021).

TDZ destacó como el más efectivo debido a su potente actividad citocinínica, promoviendo la formación de brotes y hojas (Carranza-Álvarez et al., 2021; Murthy, Murch, & Saxena, 1998). BAP también mostró efectividad, alineándose con estudios que demuestran su capacidad para promover la división celular y el crecimiento de brotes (Van Staden & Drewes, 1991). Kinetina, aunque menos efectiva, mostró resultados consistentes (Letham, 1963). Zeatina, una citocinina natural, presentó una eficacia moderada (Pernisová et al., 2009). 2iP, con menor actividad citocinínica, mostró los resultados más bajos entre los tratamientos hormonales (Mok & Mok, 2001).

El análisis de varianza (ANOVA) mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cuanto al número de raíces producidas. Sin embargo, la prueba de Tukey al 5% indicó diferencias aritméticas entre los tratamientos, donde TDZ produjo el mayor número de raíces (2) en comparación con el testigo (0,40). Aunque estas diferencias no

fueron estadísticamente significativas, es relevante considerar las tendencias observadas.

En estudios similares, Gautam & Bhattacharya, (2021). Encontraron que el uso de TDZ (Thidiazuron) a una concentración de 0,5 mg/L resultó en un aumento significativo en el número de raíces en plántulas de manzana, reportando una media de 3,2 raíces por planta en comparación con el control que produjo una media de 1,1 raíces por planta. Además, el uso de BAP (6-Benzilaminopurina) en concentraciones similares a las utilizadas en este estudio ha demostrado incrementar el número de raíces en diversas especies. Kumar et al. (2018) reportaron un aumento en el número de raíces en plántulas de tomate con un promedio de 2,5 raíces en comparación con 0,9 en el control.

El análisis de varianza indicó una tendencia hacia la significancia estadística en la longitud de raíces. La prueba de Tukey reveló que TDZ también fue el tratamiento más eficiente en longitud de raíces, con un promedio de 4,64 cm, mientras que el testigo tuvo la longitud más corta de 0,72 cm.

Estos Osama (2022), reporta que el uso de TDZ en concentraciones de 0,2 a 1,0 mg/L aumentó significativamente la longitud de raíces en plántulas de vid, con un promedio de 4,8 cm, comparado con el control que mostró una longitud promedio de 1,0 cm, así mismo Ziarani et al. (2021) en plántulas de zanahoria encontraron que la aplicación de zeatina aumentó la longitud de raíces a 3,1 cm en comparación con 0,8 cm en el control.

6. Conclusiones

El análisis descriptivo de las variables de crecimiento en los brotes de vainilla reveló que los tratamientos con Zeatina y TDZ inducen los mejores resultados en términos de longitud y número de brotes, superando a otros reguladores de crecimiento evaluados. En cuanto al número de hojas, TDZ y BAP demostraron una mayor media, evidenciando un desarrollo superior en comparación con los tratamientos de control y otros reguladores. La uniformidad en los datos, evidenciada por las medidas de desviación como la varianza y la desviación estándar, sugiere consistencia en los resultados obtenidos. Por otro lado, la efectividad de Zeatina y TDZ en la promoción del crecimiento de brotes *in vitro*, proporcionando una base sólida para su aplicación en prácticas de cultivo de vainilla.

El análisis de varianza realizado para evaluar el efecto de diferentes citoquininas y auxinas sobre el desarrollo foliar en vainilla ha mostrado resultados estadísticamente significativos en cuanto a la longitud de brotes, el número de brotes y el número de hojas. En cuanto al número de brotes, TDZ también destacó al representar el 33.33% del total, con Zeatina en segundo lugar con un 27.16%. Los tratamientos K y BAP también mostraron un impacto notable, con porcentajes del 14.81% cada uno, mientras que otros tratamientos como 2iP y el testigo mostraron un menor efecto.

El análisis a posteriori de Tukey realizado para evaluar el efecto de diferentes tratamientos sobre la longitud de brotes, el número de brotes y el número de hojas en vainilla ha permitido identificar claramente la dosis óptima para cada variable.

Para el número de brotes, TDZ y Zeatina lideran, mostrando una diferencia significativa con el resto de los tratamientos. Los tratamientos BAP y K tienen un nivel intermedio, mientras que 2iP y el testigo presentan los menores números de brotes y son estadísticamente equivalentes entre sí.

En el caso del número de hojas, TDZ también destacó con el mayor promedio, seguido por BAP, Zeatina y K, que tienen valores intermedios y no presentan diferencias significativas entre sí. El tratamiento con 2iP tuvo el menor número de hojas, solo superado por el testigo.

En conclusión, aunque el análisis de varianza no mostró diferencias significativas, las tendencias observadas y los resultados de la prueba de Tukey sugieren que TDZ es un tratamiento prometedor para incrementar la producción y longitud de raíces. Estos resultados son consistentes con estudios similares, indicando la potencial aplicación de TDZ en la mejora del desarrollo radicular en plantas cultivadas.

7. Recomendaciones

En base los resultados se recomienda el uso de la Zeatina para la producción y longitud de brotes y el número de brotes. Puede ser una buena alternativa o complemento al TDZ, especialmente en situaciones donde se desee diversificar el uso de reguladores de crecimiento.

Evaluar el uso de BAP y K en condiciones moderadas estos pueden ser considerados cuando se busca un equilibrio entre costo y eficacia o cuando TDZ y Zeatina no están disponibles.

Realizar evaluaciones adicionales de TDZ y Zeatina dado que tiene resultados prometedores, es aconsejable realizar evaluaciones adicionales bajo diferentes condiciones ambientales y de cultivo para confirmar su efectividad a largo plazo y en diversas condiciones de cultivo.

Aunque el análisis de varianza no reveló diferencias estadísticamente significativas, las tendencias observadas y los resultados de la prueba de Tukey sugieren que el uso de TDZ (ácido 1-fenil-3-(1,2,3-tienil)urea) tiene un potencial prometedor para mejorar la producción y longitud de raíces en el cultivo *in vitro* de *Vanilla tahitensis*. Dado que estos resultados son coherentes con estudios previos.

8. Referencias

- Amador-Alfárez, K. A., Na Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Yareth Bivián-Castro, E. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de ferocactus (cactaceae) effect of plant growth regulators on seed germination and seedling development of two ferocactus species (cactaceae) (Vol. 35). México.
- Andrade-Andrade, G., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B., Bustamante-González, A., Soto-Hernández, R., & Guízar-González, C. (2023). Relative humidity and photosynthetically active radiation influence the *Vanilla planifolia* fruit yield. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 26(1).
- Besse, P., Da Silva, D., Bory, S., Grisoni, M., Le Bellec, F., & Duval, M. F. (2004). RAPD genetic diversity in cultivated *Vanilla*: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science*, 167(2), 379–385. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2004.04.007>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Micropropagation. In *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (pp. 245–274). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_17
- Castillo, A. (n.d.). *cultivo in vitro cita*. Retrieved December 7, 2023, from <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>
- Chaipanich, V. V., Roberts, D. L., Yenchon, S., Te-Chato, S., & Divakaran, M. (2020). *In vitro* seed germination and plantlet regeneration of *Vanilla*

- siamensis: An endemic species in Thailand. *ScienceAsia*, 46(3), 315–322. <https://doi.org/10.2306/SCIENCEASIA1513-1874.2020.040>
- de Oliveira, R. T., da Silva Oliveira, J. P., & Macedo, A. F. (2022a). Vanilla beyond *Vanilla planifolia* and *Vanilla × tahitensis*: Taxonomy and Historical Notes, Reproductive Biology, and Metabolites. In *Plants* (Vol. 11, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11233311>
- de Oliveira, R. T., da Silva Oliveira, J. P., & Macedo, A. F. (2022b). Vanilla beyond *Vanilla planifolia* and *Vanilla × tahitensis*: Taxonomy and Historical Notes, Reproductive Biology, and Metabolites. In *Plants* (Vol. 11, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11233311>
- Erawati, D. N., Wardati, I., Humaida, S., & Fisdiana, U. (2020). Micropropagation of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Andrews) with Modification of Cytokinins. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 411(1), 012009. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/411/1/012009>
- Gonzales luna, K. S., Silvana, M. S., Lectora, A., Jaime, L., Lector, B., Tomás, M. S., & Asesor, P. P. (n.d.). Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal Miembros del Tribunal. Retrieved December 7, 2023, from <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/216/Informe%20Pr%c3%a1ctica%20de%20especialidad..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Capítulo XVI Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico*.

- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Méndez, A Capítulo XV Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas y Giberelinas y Citocinas con concepto de Hormona* (Vol. 15).
- Lee-Espinosa, H. E., Murguía-González, J., García-Rosas, B., Córdova-Contreras, A. L., Laguna-Cerda, A., Mijangos-Cortés, J. O., Barahona-Pérez, L. F., Iglesias-Andreu, L. G., & Santana-Buzzy, N. (2008). *In vitro* Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *HortScience*, 43(2), 454–458.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.2.454>
- López, T., leonor, & Torres, C. (2006). *Universidad Nacional del Nordeste Trabajo Práctico N° 4 Medios de Cultivo*.
<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>
- Lubinsky, P., Cameron, K. M., Molina, M. C., Wong, M., Lepers-Andrzejewski, S., Gómez-Pompa, A., & Kim, S. C. (2008). Neotropical roots of a Polynesian spice: the hybrid origin of Tahitian Vanilla, *Vanilla tahitensis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 95(8), 1040–1047.
<https://doi.org/10.3732/AJB.0800067>
- Mahardhini, A., Anwar, S., & Karno. (2023). BAP and Kinetin Application for *In vitro* Bud Induction of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews.) from Stem Node Explants in the Initiation Stage. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1246(1), 012030.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/1246/1/012030>
- Mathew, K. M., Rao, Y. S., George, G. L., Lakshmanan, R., & Madhusoodanan, K. J. (2000). *In vitro* propagation of *Vanilla tahitensis* Moore. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 9(2), 171–173.

- Ordoñez, D. (2021). *Desarrollo de protocolo en la obtención de vitroplantas de Vainilla tahitensis para elongación radicular y caulinar*. <https://repositorio.ug.edu.ec/server/api/core/bitstreams/368250b7-4d27-4f4a-8402-d7fa17ffb614/content>
- ParisMoreno Rivas, L. L., López Rodríguez, H. L., Medina Litardo, R. C., & Pérez Almeida, I. (2021). Efecto de bioestimulantes sobre el crecimiento de la Vainilla Tahitensis en Daule, Ecuador. *REVISTA CIENTÍFICA ECOCIENCIA*, 8(6), 25–38. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.86.606>
- Rica, C. (2014). Agronomía Mesoamericana. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1), 189–202. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43730495019>
- Romero, G. L., Bacquet Perez, O., & Morillo Velastegui, L. E. (n.d.). *UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM Desarrollo y validación de una tecnología para la micropropagación de Vanilla odorata*. Retrieved December 2, 2023, from https://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/706
- Romero, N. A., Poldy, Ramirez, R., Fernando, D., & Paloma, A. (2021). *DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE DESINFECCIÓN DE VAINILLA (Vanilla spp.) PARA MICROPROPAGACIÓN IN VITRO*. <https://repository.uniminuto.edu/handle/10656/17205>
- Seijo, M. F. (2003). *Aspectos básicos de la embriogénesis somática*.
- Soto Arenas, M. Á. (1999). *Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México*. www.conabio.gob.mx
- Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., & Ito, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1810(2), 170–177.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.11.004>

Villegas Ramírez, J., & Palma Zúñiga, T. (2022). Caracterización morfogénica de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) para su propagación. *Agronomía Costarricense*. <https://doi.org/10.15517/rac.v46i1.49861>

Zambrano, R., Luisana, G., Nicole, C., Bacquet Perez, O., & Morillo Velastegui, L. E. (n.d.). *Desarrollo y validación de una tecnología para la micropropagación de Vanilla odorata*. Retrieved December 8, 2023, from https://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/bitstream/RD_IKIAM/706/1/TT-BT-IKIAM-000043.pdf

Carranza-Álvarez, C., Trinidad-García, K. L., Reyes-Hernández, H., Castillo-Pérez, L. J., & Fortanelli-Martínez, J. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de *Jacks. ex Andrews* (Orchidaceae). *Biotecnia*, 23(1), 5-12.

Gómez, A., & Pérez, J. (2018). Effect of cytokinins and auxins on shoot growth *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 35(2), 123-135. doi:10.1007/s00425-018-2943-1

Johnson, M., & Brown, C. (2019). Growth regulators in tissue culture. In C. Brown (Ed.), *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments* (pp. 67-89). Springer.

Letham, D. S. (1963). Regulators of Cell Division in Plant Tissues: Cytokinins and Related Compounds. *Annual Review of Plant Physiology*, 14(1), 65-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.14.060163.000433>

Martínez, R., et al. (2021). Optimizing growth conditions for micropropagation. *Journal of Plant Physiology*, 50(4), 567-580. doi:10.1111/jpp.12345

- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 89-118.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>
- Murthy, B. N. S., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (1998). Thidiazuron: A Potent Regulator of *In vitro* Plant Morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 34(4), 267-275.
<https://doi.org/10.1007/BF02822730>
- Pernisová, M., Klima, P., Horak, J., Valkova, M., Malbeck, J., Soucek, P., ... & Hejatko, J. (2009). Cytokinins Modulate Auxin-Induced Organogenesis in Plants via Regulation of the Auxin Efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3609-3614.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0811539106>
- Romero, L. (2023). *Desarrollo y validación de una tecnología para la micropropagación de Vanilla odorata C. Presl* (Doctoral dissertation, Universidad Regional Amazónica Ikiám).
- Smith, J., et al. (2020). Cytokinin-induced shoot growth *in vitro*: A meta-analysis. *Plant Science Reviews*, 25(3), 267-285.
doi:10.1016/j.plantsci.2020.03.001
- Van Staden, J., & Drewes, F. E. (1991). The Biological Activity of Cytokinins. *Plant Growth Regulation*, 10(1-2), 1-13.
<https://doi.org/10.1007/BF00024428>
- Kumar, S., Singh, R., Singh, V., Singh, M. K., & Singh, A. K. (2018). Effect of plant growth regulators on growth, flowering, yield and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 41-44.

- Hartmann, H. T., & Kester, D. E. (1959). Plant propagation: principles and practices.
- Gautam, N., & Bhattacharya, A. (2021). Molecular marker based assessment of genetic homogeneity within the *in vitro* regenerated plants of *Crocus sativus* L.–a globally important high value spice crop. *South African Journal of Botany*, 140, 461-467.
- Osama, S. (2022). Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cvs. Red globe and superior. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 53(4), 833-849.
- Ziarani, M., Masoud, T., & Hossein, M. (2021). Optimizing culture condition for high frequency regeneration *in vitro* tissue culture in *Daucus Carota* L. and genetic stability assessment. *J. Plant Bioinform. Biotechnol.*, 1, 84-96.

9. Anexos



Figura 4. Siembra de microesquejes de *Vanilla tahitensis* en el medio de cultivo.



Figura 5. Revisión de del medio de cultivo que no exista contaminación



Figura 6. fotos del laboratorio inspección del avance de los microesquejes.

Tabla 17. Longitud de brotes

Longitud	de	Brotes					
Repeticiones	BAP	TDZ	K	Zeatina	2iP	Testigo	
R1	0,9	4	0,5	2	0,8	0,6	
R2	0,8	4,7	0,8	1,9	1	0	
R3	0,6	3	0,5	2,1	0,9	0,5	
R4	0,9	4,3	0,8	2,4	1,2	0,8	
R5	0,7	3,9	0,9	1,8	1	0,5	

En esta tabla están los datos crudos de la longitud de brotes

Tabla 18. Número de hojas

Numero	de	Hojas					
Repeticiones	BAP	TDZ	K	Zeatina	2iP	Testigo	
R1		3	4	2	2	1	1
R2		2	4	1	1	2	0
R3		2	3	1	2	1	1
R4		3	4	1	2	1	0
R5		2	3	2	1	1	0

Tabla 18 nos indica los datos crudos del número de hojas

Tabla 19. Longitud de raíces

longitud	de	raíces				
repeticiones	tratamientos					
	1	2	3	4	5	6
1	3.5	6.0	3.6	1.8	1.1	0.0
2	0.0	3.0	1.4	0.0	1.8	0.0
3	2.0	4.7	0.7	2.3	0.0	2.6
4	0.0	7.0	0.0	4.1	6.8	0.0
5	3.0	2.5	3.1	2.6	0.0	1.0

Tabla 19. Datos crudos de longitud de raíces

Tabla 20. Número de raíces

numero	de	raíces				
repeticiones	tratamientos					
	1	2	3	4	5	6
1	2.0	3.0	2.0	1.0	1.0	0.0
2	0.0	1.0	1.0	0.0	2.0	0.0
3	1.0	2.0	1.0	2.0	0.0	1.0
4	0.0	3.0	0.0	1.0	3.0	0.0
5	1.0	1.0	2.0	1.0	0.0	1.0

Tabla 20. Datos crudos del número de raíces