



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución - 4.0 Internacional \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Vea una copia de esta licencia en <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>





ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ECOLOGÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

Tesis

Aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro de Vanilla pompona Schiede

Para optar el grado académico de Maestro en Ciencias con mención en
Gestión Ambiental

Autor:

Astrid Domy Gutiérrez Ruiz
<https://orcid.org/0000-0001-5267-6019>

Asesor:

Blgo. M.Sc. Alfredo Iban Díaz Visitación
<https://orcid.org/0000-0002-9130-7598>

Tarapoto, Perú

2023



ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ECOLOGÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

Tesis

Aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro de Vanilla pompona Schiede

Para optar el grado académico de Maestro en Ciencias con mención en
Gestión Ambiental

Autor:

Astrid Domy Gutiérrez Ruiz

Sustentado y aprobado el 18 de octubre del 2023, ante el honorable
jurado:



Presidente de Jurado
Lic. Dr. Fabián Centurión Tapia



Secretario de Jurado
Ing. M.Sc. Alfonso Rojas Bardalez



Miembro de Jurado
Blgo. M.Sc. Luis Eduardo Rodríguez
Pérez



Asesor
Blgo. M.Sc. Alfredo Ibán Díaz
Visitación

Tarapoto, Perú

2023



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para estudiar y escuchar la sustentación y defensa del Trabajo de Tesis, modo presencial, presentado por:

Bach. Astrid Domy Gutiérrez Ruiz

Con el asesoramiento del Blgo. M.Sc. Alfredo Iban Díaz Visitación.

“Aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro de Vanilla pompona Schiede”

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo, así como los conocimientos demostrados por el sustentante, lo declaramos:

APROBADO

Con el calificativo (*)

DECEISEIS (16)

En consecuencia, queda en condición de ser considerado APTO por el Consejo Universitario y recibir el Grado Académico de Maestro, de conformidad con lo estipulado en el Artículo 30° del Reglamento de Tesis de la Escuela de Posgrado de la UNSM.

Tarapoto, 18 de octubre de 2023.

Lic. Dr. Fabián Centurión Tapia
Presidente

Ing. M.Sc. Alfonso Rojas Bardalez
Secretario

Blgo. M. Sc. Luis Eduardo Rodríguez Pérez
Vocal

Blgo. M.Sc. Alfredo Iban Díaz Visitación
Asesor

(*) De acuerdo con el Artículo 40° del Reglamento General de Ciencia, Tecnología e Innovación (RG - CTI) la Universidad Nacional de San Martín, estas deberán ser calificadas con términos de: BUENO, MUY BUENO, EXCELENTE, también considerar la nota




ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ECOLOGÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

Tesis

Aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro de Vanilla pompona Schiede

Para optar el grado académico de Maestro en Ciencias con mención en
Gestión Ambiental

Los suscritos declaran que el presente trabajo de tesis, es original en su contenido y forma.


.....
Astrid Domy Gutiérrez Ruiz
Ejecutor


.....
Blgo. M.Sc. Alfredo Ibán Díaz Visitación
Asesor

Tarapoto, Perú

2023

Declaratoria de autenticidad

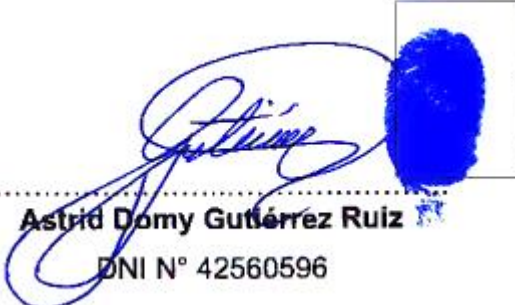
Astrid Domy Gutiérrez Ruiz, con DNI N° 42560596, egresado de la Escuela Posgrado, Programa de Maestría en Ciencias, con mención en Gestión Ambiental, Facultad de Ecología de la Universidad Nacional de San Martín, autor de la tesis titulada: **Aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro de Vanilla pompona Schiede.**

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencias de las fuentes bibliográficas consultadas.
3. Toda la información que contiene la tesis no ha sido auto plagiada;
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados ni copiados, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por lo antes mencionado, asumo bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndome a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín.

Tarapoto, 18 de octubre del 2023.



Astrid Domy Gutiérrez Ruiz
DNI N° 42560596

Ficha de identificación

<p>Título del proyecto:</p> <p>Aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro de Vanilla pompona Schiede</p>	<p>Área de investigación: Ciencia Tecnología y Ambiente</p> <p>Línea de investigación: Calidad Ambiental</p> <p>Sublínea de investigación: Manejo sostenible de suelos y cultivos</p> <p>Grupo de investigación: 215-2022-UNSM/CFT/FE</p> <p>Tipo de investigación: Básica <input type="checkbox"/>, Aplicada <input checked="" type="checkbox"/>, Desarrollo Tecnológico <input type="checkbox"/></p>
<p>Autora:</p> <p>Astrid Domy Gutiérrez Ruiz</p>	<p>Facultad de Ecología Escuela de Posgrado https://orcid.org/ 0000-0001-5267-6019</p>
<p>Asesor:</p> <p>Blgo. M.Sc. Alfredo Iban Díaz Visitación</p>	<p>Dependencia local de soporte: Facultad de Ecología Escuela de Posgrado Unidad de Posgrado https://orcid.org/0000-0002-9130-7598</p>

Dedicatoria

A mis queridos padres Astriht y Edgar por todo el esfuerzo y sacrificio en mi educación continua, y por su amor incondicional hacia mi persona y a mis hijos.

A mi amado esposo Antonio por su apoyo incondicional y comprensión en todo momento de nuestras vidas.

A mis amados hijos Facundo Gabriel y Gilmar Mateo, por su comprensión y apoyo en cada momento de su existencia.

A mi tía Domi por el amor incondicional y el apoyo que me brinda al estar complementando a educación de mis hijos.

A mi querido hermano Edgar Luis, que me alegra la existencia con su cariño y con las locuras que hace con mis hijos.

Astrid Domy Gutiérrez Ruiz

Agradecimientos

Agradezco a la Empresa Corporación G y G E.I.R.L., por las facilidades y apoyo brindado en la realización de esta tesis de investigación.

A mi asesor Blgo. M.Sc. Alfredo Iban Díaz Visitación, por las recomendaciones y orientación para la realización del presente trabajo.

Índice general

Ficha de identificación	7
Dedicatoria	8
Agradecimientos.....	9
Índice general.....	10
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN A LA INVESTIGACIÓN	18
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	18
2.1. Antecedentes de la investigación	18
2.2. Bases teóricas.....	21
2.1.1. Descripción general de la especie en estudio	21
2.1.2. De las fitohormonas.....	22
2.1.3. De los segmentos nodales.....	24
2.2. Definición de términos básicos	26
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Ámbito y condiciones de la investigación.....	28
3.1.1 Contexto de la investigación.....	28
3.1.2 Material vegetal.....	28
3.1.3 Métodos	29
3.1.4 Metodología para la desinfección	29
3.1.5 Metodología del cultivo <i>in vitro</i>	29
3.1.6 Diseño experimental y análisis estadístico	30
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES.....	37

	11
RECOMENDACIONES.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS	42

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de los principales reguladores de crecimiento vegetal.....	23
Tabla 2 Protocolos de desinfección	29
Tabla 3 Medio de cultivo para el desarrollo de los brotes.....	30
Tabla 4: Análisis de Varianza.....	35
Tabla 5: Medidas Comparativas.....	35
Tabla 6: Comparaciones en parejas de Tukey.....	35

Índice de figuras

Figura 1. Mejor protocolo de desinfección	32
Figura 2. Resultados de número de brotes	33
Figura 3. Brotes de Vanilla pompona Schiede	34
Figura 4. Planta madre de Vanilla pompona Schiede	42
Figura 5. Ápices del espécimen madre de Vanilla pompona Schiede	43
Figura 6. Segmentos nodales colectados de Vanilla pompona Schiede	43

RESUMEN

El género *Vanilla* tiene gran potencial para la comercialización sus capsulas de las cuales extraen la esencia de vainilla natural para uso alimenticio y cosmético. La especie en estudio no cuenta con una metodología para la micropropagación ya que el interés es reciente, por lo que en esta investigación se tuvo como objetivo la aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro, probando el protocolo de desinfección de los segmentos nodales con NaClO en distintas concentraciones (T₁ 0,5%, T₂ 1,0%, y T₃ 1,5%). Se emplearon segmentos nodales provenientes del plantel genético del vivero de Corporación G y G E.I.R.L., los cuales pasaron por el proceso de desinfección limpiando con alcohol y colocando en frascos estériles para continuar la esterilización en la cámara de flujo laminar, siendo el mejor resultado de 1,5% de NaClO. Para establecer el mejor medio de cultivo se trabajó con cuatro medios teniendo como base M&S (T₁, T₂, T₃, y T₄) y como constantes los aditivos de 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 0,4 mg/L de tiamina, 20 g/L de sacarosa, 10 g/L de agar (pH entre 5,4 a 5,6); con 0,5 ml/L de 6-bencilaminopurina en T₂, con 1 ml/L de 6-bencilaminopurina y 0,5 ml/L de ácido naftalen acético en T₃, y con 1,5 ml/L de 6-bencilaminopurina y 1 ml/L de ácido naftalen acético en T₄; de los cuales se obtuvo que el mejor resultado es el tratamiento T₃ (1 ml/L de BAP y 0,5 ml/L ANA) que nos dio como resultado 5,56 brotes promedio.

Palabras clave: *V. pompona*, brotes, segmentos nodales, cultivo in vitro.

ABSTRACT

The *Vanilla* genus is of great potential for the commercialization of its capsules from which the natural vanilla essence is extracted for food and cosmetic use. The species under study does not have a methodology for micropropagation since the interest on it is recent, so the objective of this research was the application of phytohormones in nodal segments for in vitro propagation, testing the protocol of disinfection of nodal segments with NaClO at different concentrations (T₁ 0.5%, T₂ 1.0%, and T₃ 1.5%). Nodal segments from the genetic stock of the Corporación G y G E.I.R.L. nursery were used, which underwent the disinfection process by cleaning with alcohol and placing them in sterile flasks to continue sterilization in the laminar flow chamber. The best result was 1.5% NaClO. To establish the best culture medium, four media were used with M&S as a base (T₁, T₂, T₃, and T₄) and as constants the additives of 0.5 mg/L nicotinic acid, 0.4 mg/L thiamine, 20 g/L sucrose, 10 g/L agar (pH between 5.4 and 5.6); with 0.5 ml/L 6-benzylaminopurine at T₂, with 1 ml/L 6-benzylaminopurine and 0.5 ml/L naphthalene acetic acid at T₃, and with 1.5 ml/L 6-benzylaminopurine and 1 ml/L naphthalene acetic acid at T₄. The best result was obtained with the T₃ treatment (1 ml/L BAP and 0.5 ml/L ANA), which gave an average of 5.56 shoots.

Key words: *Vanilla pompona*, shoots, nodal segments, in vitro culture.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN A LA INVESTIGACIÓN

La Vanilla es un género que está dentro de la familia Orchidaceae clasificado por Swartz, en 1799, su nombre deriva del español “Vainilla” (pequeña vaina) en alusión a la forma del fruto. Tiene una distribución muy especial a diferencia de los otros grupos de esta misma familia, debido a que se trata de un género que se encuentra en regiones tropicales en casi todos los continentes (América, África y Asia); la *Vanilla pompona* Schiede en nuestro país se encuentran en diversos departamentos tales como San Martín y Madre de Dios (Damian y Janovec, 2018). Dentro del fruto en forma de vaina encontramos minúsculas semillas de 0,3 mm, de diámetro de la cual se extrae una esencia popular denominada vainilla, utilizada en la preparación de tortas, cremas, helados, chocolates, etc. y en la industria farmacéutica para la extracción de la esencia utilizada en cremas, perfumes, sahumerios (Vatteone, 2017).

Se conocen varias especies del género Vanilla de las cuales quince son oriundas de México y Centroamérica, siendo las más cultivadas con fines productivos la *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona* (Flores et al., 2017).

En el Alto Mayo, existen humedales los cuales albergan vegetación arbórea de aguajales y renacales, los mismos que fungen de forofitos sobre los que crecen diversidad de orquídeas epífitas entre ellas la *Vanilla pompona* Schiede, asimismo, existe gran presión antrópica sobre estos espacios que se vienen perdiendo por la deforestación, la destrucción de los hábitats la extracción ilegal hace que muchas especies de la familia Orchidaceae desaparezcan rápidamente (Plan Nacional de Conservación de Orquídeas 2019).

La vainilla es una planta muy susceptible a contraer plagas y/o enfermedades, en la mayoría de los casos producida por hongos en especial por el *Fusarium oxysporum*, lo que ocasiona en hojas la aparición de clorosis, y el pudrimiento de los tallos y raíces, lo que puede producir la muerte de toda la planta (Adame García et al 2015, mencionado por Hernández, 2020). Es importante planificar mecanismos para salvaguardar y conservar el plantel genético de la Vanilla (fitogenético) por lo que se está formando protocolos para la conservación y propagación de la Vanilla aplicando el mejoramiento genético (Bautista, 2022).

Por su parte Gätjens et al. (2018), menciona que la vainilla en la mayoría de los casos se reproduce por cortes de esquejes recolectados de la misma planta madre, lo que genera una demora en el crecimiento de la especie vegetal y en la elaboración, además que los cortes de esquejes en muchos casos no llegan de desarrollarse, esta acción es más para producción de plantas a pequeña escala ya que la planta madre al ser diseccionada está expuesta a contraer enfermedades como hongos, bacterias, entre otros. En cuanto a la propagación de la vainilla por semillas tiene su limitante ya que en muchos casos estas no llegan a germinar, prosperan poca cantidad y en el crecimiento mueren, lo que no permite una propagación adecuada de esta especie. El cultivo *in vitro* es una técnica más adecuada de reproducir plántulas de vainilla en mayor cantidad, se hace mención que existen diversas técnicas que se han desarrollado para la propagación de *Vanilla planifolia*, las cuales están orientadas a la producción de brotes y de protocormos, obtenidos del ápice de la vainilla, yemas y nodos.

El problema planteado en la investigación se basa en como influenciará la aplicación de fitohormonas en segmentos nodales en permitir la propagación *in vitro* de la *Vanilla pompona* Schiede, considerando que en la hipótesis la aplicación de fitohormonas tiene un efecto significativo sobre la propagación *in vitro*, es decir incrementará la propagación.

Los objetivos son el de aplicar fitohormonas en segmentos nodales para la propagación *in vitro* de *Vanilla pompona* Schiede, asimismo determinar el efecto del ácido bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalen acético (ANA), en los segmentos nodales, evaluar la formación de plántulas producidas a partir de los segmentos y determinar una metodología de propagación *in vitro*.

Por lo que se evaluó el efecto del ácido naftalen acético (ANA) y del ácido 6-bencilaminopurina (BAP) en la formación de plántulas a partir de segmentos nodales de la *Vanilla pompona* Schiede, cuya aplicación genera el incremento de la propagación de plántulas, y la disminución del tiempo necesario para la propagación *in vitro* de Vainilla.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Antecedentes internacionales

Arenas (2019), generó un protocolo para la elaboración de medio de siembra MS (Murashige y Skoog) con la finalidad de producir explantes de *Vanilla planifolia* G. Jackson con la finalidad de solucionar la dificultad del envejecimiento del explante en distintos medios de siembra con diversas concentraciones de MS al 100%, 70%, 40% y 10 %, de igual manera con el empleo de sacarosa (azúcar), agregado a esta agua de coco. Se obtuvo que en el tratamiento al 40 % demoró en aparecer hongos contaminantes en el medio de cultivo.

Flores et al. (2017), se realizó el desarrollo *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks comparando dos técnicas de propagación *in vitro*, el convencional que es cultivo *in vitro* en medio semisólido, y el cultivo *in vitro* en medio líquido en el cual las plantas están sumergidas durante cierto tiempo. Indujeron a la germinación de semillas en medio semisólido Murashige y Skoog (MyS) alternando el uso del carbón activado, y en condiciones de luz por periodo de tiempo o en oscuridad total. Posteriormente de cinco cambios de medio de cultivo se propagaron los brotes obtenidos, cambiando con el incremento de hormonas en el sistema de inmersión temporal. Usando ambos métodos, se evaluó el tamaño alcanzado, la cantidad de brotes generados a los 30 días de cultivo y la capacidad de formación. Estos resultados mostraron que el 90% de las semillas de las cápsulas de vainilla que están entre los de 9 a 10 cm de longitud, brotaron las semillas a los dos meses de oscuridad en el cultivo. De esta evaluación no se identificó diferencias notables entre la cantidad de brotes y la capacidad de formación de brotes en ambas técnicas de propagación (convencional y SIT), siendo la inmersión temporal, la que generó un mejor crecimiento en el mismo tiempo de cultivo. Sin embargo, los resultados logrados coincidieron en el uso de las dos alternativas para la propagación *in vitro* de vainilla.

Carranza (2020), desarrollaron una investigación para generar un protocolo de micropropagación *in vitro* donde se evaluó el efecto de distintos concentrados orgánicos. Este proceso de propagación *in vitro* inicia con la germinación de semillas, de las mismas que se obtuvo protocormos, estos se sembraron en medio de cultivo MS con

adición de concentrados orgánicos naturales los cuales fueron plátano, piña, agua de coco y MS testigo, con esto poder para generar la morfogénesis. Consecutivamente con la finalidad de estimular la rizogénesis de los brotes y posterior adaptación, se emplearon las auxinas en los tratamientos (AIB y AIA). En cuanto a los resultados obtenidos, estos indican que la germinación comenzó a los sesenta (60) días del cultivo in vitro, y que la incorporación de concentrados orgánicos naturales originó notable diferencia en el crecimiento de los brotes, resultando más eficaz el tratamiento con plátano. A esto suma la adición de 0,5 mg L⁻¹ de AIA que ayudó al enraizamiento y la pre aclimatación in vitro. El resultado nos indica que la adición de concentrados orgánicos naturales, ayudan a promover la morfogénesis de plántulas de vainilla, sin tener la urgencia de usar reguladores de crecimiento sintéticos en las primeras fases de la propagación in vitro.

Chacón (2017), evaluaron la formación asimbiótica de orquídeas *Rodriguezia longifolia*, *Bletia catenulata*, *Epidendrum secundum*, y *Epidendrum spilatum* en medio de cultivo MS con tres concentraciones orgánicas y un medio testigo: pulpa de piña, agua de coco, y pulpa de plátano. Las capsulas recolectadas donde se obtuvieron las capsulas proceden del distrito Pillcopata, en la provincia Paucartambo, departamento Cusco. Obtuvieron el tiempo que toma la germinación de las semillas y su reacción ante las concentraciones orgánicas, esto comparado con el medio de cultivo testigo, asimismo se instaló de forma artificial la germinación de las semillas en cinco fases diferentes el embelesamiento, la variación de la oxidación por la evolución de protoplastidios en cloroplastos, el comienzo de la división celular, la generación de los protocormos y la aparición de los órganos vegetativos. Los resultados de esta investigación indican que el medio de cultivo enriquecido con concentraciones orgánicas de piña se obtuvieron una mayor respuesta de germinación asimbiótica en las siguientes especies de orquídeas *Rodriguezia longifolia*, *Bletia catenulata* y *Epidendrum spilatum*, a diferencia del medio MS enriquecido con concentraciones orgánicas de plátano tuvo una mejor respuesta a la germinación de semilla de *Epidendrum secundum*, el que tuvo el menor rendimiento para la germinación fue el medio enriquecido con concentración orgánica de agua de coco, los tiempos de desarrollo de las semillas para el *Epidendrum secundum* fue de 5 semanas, para la *Bletia catenulata* 8 semanas, para el *Epidendrum spilatum* 11 semanas, y para la *Rodriguezia longifolia* fue de 12 semanas.

Aucapiña (2016), menciona que establecieron un protocolo para el empleo del ácido giberélico (AG3), el ácido indol butírico (IBA) y la kinetina (Kin) en orquídeas del Ecuador mediante la propagación in vitro de orquídeas de las especies de *Epidendrum*

schistochilum, *Epidendrum jamiesonis*, y *Oncidium ornithorhynchum*, para lo cual se evaluaron cual sería la concentración más adecuada en bioensayos de *Solanum lycopersicum* (tomates), después se continuó realizando el establecimiento del porcentaje semillas de orquídeas germinadas para lo que se empleó las giberelinas, las primeras semillas fueron sembradas en medio Knudson C Modificado Plus al cual se le adicionó 130 μ L de cada solución de hormonas, con esto se estableció una dosis de 0,1 mg/L para el *Epidendrum* y de 0,2 mg/L para la *Oncidium*, de la misma manera se evaluó el efecto del ácido indol butírico (IBA), la kinetina (Kin), y la mezcla de ambos (IBA y Kin) en el crecimiento de protocormos de las orquídeas *Epidendrum jamiesonis* y *Epidendrum schistochilum* sembrados en el medio de cultivo "Orchid Maintenance Medium" agregando 130 μ L de hormona. Para el empleo de la kinetina (Kin) se empleó una concentración óptima de 0,01 mg/L para obtener tamaño en brotes y 0,4 mg/L para cantidad de brotes, de igual manera, estableciendo un equilibrio entre las auxina-citoquinina en la especie *Epidendrum schistochilum* es 7,5 mg/L IBA x 0,1 mg/L Kin, en cuanto a *Epidendrum jamiesonis* se obtiene un superior resultados a 3 mg/L IBA x 0,4 mg/L Kin. Sin embargo, existe un mayor crecimiento en cuanto a la cantidad de brotes, crecimiento radicular y foliar (hojas) en el cruce de hormonas que al ser usadas por separado.

Ariza (2018), realizaron una investigación con la finalidad de medir el resultado del uso de la fécula de maíz y de dos reguladores de crecimiento el 6-bencilaminopurina (bap) y el ácido naftalenacético (ana) para la germinación de semillas de orquídea *Prosthechea sp.*, de la cual su población en hábitat se encuentra desapareciendo y entra en peligro de extinción en San Rafael, zona rural de Fusagasugá Cundinamarca, Colombia, esto debido a la deforestación de los bosques y la extracción ilegal de la especie, para tratar de generar una alternativa de propagación parte de las semillas se sembraron mediante el cultivo *in vitro* en medio MS, con adición de almidón en 0, 10 $\text{g}\times\text{L}^{-1}$, 6-Bencilaminopurina BAP en 0, 0,5, 1 y 2 $\text{mg}\times\text{L}^{-1}$, y ácido naftalenacético ANA (0, 0,5, 1 y 2 $\text{mg}\times\text{L}^{-1}$), estuvieron un tiempo de tres meses, el método estadístico empleado fue un diseño al azar con un arreglo factorial de 2x4x4, que incluyen 32 tratamiento y 5 repeticiones, se pudo conseguir en los resultados que los tratamiento que tenían aditivos de almidón lograron los mejores resultados en la germinación, y el medio que tenía BAP (2 $\text{mg}\times\text{L}^{-1}$) y ANA (0,5 $\text{mg}\times\text{L}^{-1}$) el mejor resultado.

Vasco (2020), la técnica de propagación *in vitro* de tejidos vegetales se emplea para mejorar y efectivizar los procesos de germinación de semillas, el crecimiento de las plantas y hasta el desarrollo, ya sea para la investigación, la producción en masa y la

conservación de las especies vegetales; en la investigación se logró establecer los reguladores de crecimiento más aptos para estimular la formación y crecimiento de raíces de *E. ibaguense*, evaluando el efecto de distintas concentraciones de ANA, IBA, AIA, 2,4-D, siendo el que obtuvo mejores resultados en la estimulación de raíces fue el ANA en concentraciones de 1,0, 5,0, y 0,2 mgL⁻¹, después fue el IBA en concentración de 1.0 mgL⁻¹ y a esto se agregó la evaluación de las mezclas de sustratos en el desarrollo de las plántulas sin raíz, siendo las mezclas las siguientes: a) fibra de coco: turba 1:1, b) fibra de coco: turba: compost 1:1: 0,2, c) fibra de coco: turba: compost 1:1: 0,5, d) fibra de coco: cascarilla de arroz quemada 1:1; obteniendo que el 80% de las plántulas sobrevivieron en su fase de endurecimiento con la mezcla fibra de coco: turba 1:1.

2.2. Bases teóricas

2.1.1. Descripción general de la especie en estudio

Nomenclatura

Reino	:	Plantae
Orden	:	Asparagales
Familia	:	Orchidaceae
Subfamilia	:	Vanilloideae
Tribu	:	Vanilleae
Subtribu	:	Vanillinae
Género	:	Vanilla
Especie	:	Pompona
Sub especie	:	Grandiflora
Nombre Científico	:	<i>Vanilla pompona</i> subsp. <i>grandiflora</i> (Lindl.) Soto Arenas, Lankesteriana 9(3): 340 (-341) (2010).

Descripción

Vatteone de Scappini (2017), menciona que el género clasificado por Swartz en 1799, su nombre deriva del español "vainilla" (pequeña vaina) en alusión a la forma del fruto. Se encuentra descrita 110 especies en zonas tropicales tanto en América como en África. Soto-Arenas 2009, Soto-Arenas y Dressler 2010, además este tipo de orquídea se encuentra en distintos y variados bosques húmedos subtropicales / tropicales de tierras bajas (bosques caducifolios, subdeciduos, perennifolios, montañas bajas, bosques de galería), en sabanas o bosques cálidos de pino y encino, y también las zonas inundadas. Dentro del fruto en forma de vaina encontramos minúsculas semillas

blancas como polvo, redondeadas de 0.3 mm de diámetro, de la cual se obtiene la esencia conocida como vainilla. Son plantas monopodiales, trepadoras, terrestres-epifitas, consideradas la más grande (en altura o longitud) de la familia orchidaceae.

Cameron (2011), *Vanilla pompona* es una de las especies más variables del género, y su taxonomía sigue siendo un tema de debate. Por ejemplo, aunque la mayoría de los botánicos generalmente consideran que *V. grandiflora* y *V. pittieri* son especies distintas, en 2010 el difunto Miguel Soto Arenas informó que eran dos de las tres subespecies de esta especie: *V. pompona* subsp. *pompona* (nativa de México), *V. pompona* subsp. *grandiflora* (amplia en América del Sur) y *V. pompona* subsp. *pittieri* (generalizado en Costa Rica, Honduras y otras partes de América Central). Se necesita más investigación del material recolectado en la naturaleza para desentrañar si alguna de estas subespecies debe ser elevada al rango de especie, como históricamente han sido clasificadas, o si pueden ser híbridos.

Trabajando en Perú, Ethan Householder y sus colegas observaron que los frutos de *V. pompona* subsp. *grandiflora* son extremadamente aceitosas y de secado lento, pero emiten una fuerte fragancia a vainillina cuando maduran. Las plantas crecen en pantanos de palmeras inundados y florecen dos veces al año: durante treinta días alrededor de abril y nuevamente durante treinta días en septiembre y octubre.

Goicochea (2019), indica que la variedad de Vanilla que se está evaluando es *Vanilla pompona* Schiede subsp. *grandiflora* (Lindl.) Soto Arenas, *Lankesteriana* 9(3):340 (2010). Cuya sinonimia homotípico es *Vanilla grandiflora* Lindl., *Gen. Sp. Orchid. Pl.:* 435 (1840), y sinónimo heterotípico es *Vanilla lutescens* Moq. *Ex Dupuis, Rev. Hort.* (Paris), sér. 4, 5: 121 (1856).

2.1.2. De las fitohormonas

Alcantara et al. (2019), mencionan que la hormona vegetal o fitohormonas son una mezcla de sustancias producidas internamente por las plantas, estas actúan en las plantas en pequeñas concentraciones y el principal producto se realiza a nivel celular, modificando las variables de crecimiento vegetal y consintiendo el manejo interno. Existen compuestos que son producidos de manera sintética a través de la extracción química de otros organismos, estos se denominan reguladores vegetales, siendo más fuertes que sus semejantes naturales. Para la aplicación de estos reguladores es importante tener en cuenta ciertos aspecto tales como el momento adecuado de la

aplicación, la cantidad adecuada, la susceptibilidad y estado de las plantas, así como otros aspectos no tan significativos pero que son relevantes para el crecimiento, esto debido a que para cada especie vegetal se necesita ciertas características específicas para el crecimiento que puede ser afectado por la cantidad del mismo en el medio de cultivo; para controlar la actividad y crecimiento bioquímico de las plantas los reguladores vegetales son los insumos más usados en la industria en lo que va de los últimos años.

Bisht et. al. (2018), mencionan a los reguladores de crecimiento que estos son catalogados por su estructura molecular, la acción en los vegetales, el efecto estimulante e inhibidor, y otras clasificaciones; a continuación, presentamos la tabla que muestra la lista de los principales reguladores de crecimiento que vienen siendo más empleados para el crecimiento de las plantas en general. De estas tenemos varias fitohormonas que se dividen en familias, como son las auxinas, que se puede encontrar con muchos compuestos con estructura y actividad similar. Asimismo, existen reguladores como el etileno que son sustancias específicas y no se conocen otras que cumplan una actividad similar.

Tabla 1

Clasificación de los más conocidos reguladores del crecimiento vegetal

Fitohormonas	Tipos Encontrados	Efecto a nivel vegetal	Efecto a nivel celular	Precursor orgánico
Auxinas	AIA AIB 2,4-D Ácido α -naftalenacético (NAA) (sintético)	Constitución y alargamiento de los tallos Obtención de distintas raíces aéreas Incremento de la supremacía apical	División y alargamiento de la célula. Diferenciación de la célula Promueve la división de las células meristematicas Incrementa el líquido osmótico de las células. Incrementa permeabilidad celular. Incrementa el rendimiento proteico. Disminuye la presión en la pared de las células.	L-Triptofano
Citoquininas	Kinetina Zeatina 4-hidroxi-fenilet il alcohol 6-Bencilamino purina	Incita el inicio y estiramiento de las raíces. Estimula la senescencia de las hojas Activa el desarrollo fotomorfogenico vegetal. Inicia la formación de brotes axilares a nivel vegetal	Puede comprobar y comenzar la expansión de tejidos vegetales madres. Hace que se logre generar un alto aumento y división celular. Se realiza con mayor abundancia en las células de los ápices radiculares.	Adenina

2.1.3 De los segmentos nodales

Sisaro et al. (2016), mencionan que la producción vegetativa o asexual que se realiza mediante el enraizamiento de los esquejes obtenidos de las lianas, es la forma más frecuente de reproducción clonal, siendo la técnica más realizada para la propagación de cultivos que involucran a la floricultura a los arbustos y plantas ornamentales, ya que este es un método muy fácil de emplear y que permite propagar en un lapso de tiempo más rápido plantas con las mismas características de homogeneidad y de muy buena índole comercial, este procedimiento inicia con la colecta de los esquejes de las plantas que se desean trabajar, las cuales se siembran en un sustrato que tenga las mejores condiciones físicas y ambientales para el desarrollo de la planta para que éstas puedan generar las nuevas raíces y así lograr el crecimiento de la nueva planta.

Azofeifa (2017), hace mención a los diferentes métodos para la propagación mediante el cultivo in vitro los que posibilitan la producción de las especies por medio de los explantes de las plantas entre ellos los brotes apicales, segmentos de hojas, segmentos nodales, yemas axilares, masas de callo, protocormos, y segmentos radiculares. Para lograr este proceso y que sea óptimo se tiene que elaborar un proceso inicial para la desinfección de los explantes que asegure la sobrevivencia del material vegetal que en algunos casos son únicas y muy difíciles de obtener en los viveros, tal es el caso de especies que estén en peligro de extinción y su proceso de reproducción sea lento.

Suárez (2020), menciona que la técnica de micropropagación de cultivo in vitro asexual reside en la multiplicación en condiciones controladas en completa desinfección usando medios de cultivo sintéticos en recipientes de vidrio, esta tecnología ha demostrado la ayuda al avance científico dentro de la biotecnología, poniendo a disposición la posibilidad de trabajar con plantas a partir de pequeñas células independientes, conocer los reguladores de crecimiento, y obtener plantas de distintas técnicas y así poder reproducir estas de manera masiva.

La producción tradicional de plantas es importante ya que pretende mantener por un largo tiempo un genotipo vegetal y puede desarrollarse bajo condiciones controladas sin necesidad de equipos profesionales y con trabajadores con poco o escaso conocimiento. La propagación de plantas mediante el cultivo in vitro es un poco más complicada que la tradicional ya que se debe cumplir con ciertas fases para la asepsia de las plantas, además de contar con equipamiento que es costoso y además de ellos se necesita personal calificado. Una de las ventajas de emplear esta metodología para

la propagación de plantas es que se puede obtener grandes cantidades en un menor tiempo las cuales tienen una igualdad en sus características genéticas obteniendo plantas sanas y libres de patógenos, la desventaja es que para cada planta a querer producir se debe establecer protocolos para la desinfección y siembra y en muchos casos esto demora ya que son pruebas que se deben desarrollar y el material vegetal saber ser escaso. En la actualidad se emplean tres métodos de propagación de especies vegetales que se pueden usar según la especie que se desea reproducir, entre estos tenemos:

- 1) *La micropropagación a partir de explantes con meristemos preexistente*, esta forma consiste en la reproducción de tallos de meristemos terminales y axilares continuando con el enraizamiento de cada una de ellas de manera individual, el meristemo es un conjunto de células que tienen la particularidad de poder realizar la división celular y diferenciación en tejidos individuales como raíces y partes de una planta, este método es uno de los más empleados ya que se puede obtener plantas iguales a la madre con las mismas características fenotípicas y genotípicas, lo que asegura la calidad de las plantas lo que es recomendable en la producción a escala comercial. Para esto se debe considerar cinco fases, la fase 0 es el acondicionamiento de la planta madre de la cual vamos a obtener el material vegetal para introducir al proceso, la fase 2 es el establecimiento del cultivo estéril el cual se desarrolla mediante la desinfección del explante, la fase 3 la multiplicación del explante cultivado el cual tiene elevados niveles de citocininas con la finalidad de inducir el crecimiento de más yemas laterales, fase 4 el enraizamiento, este busca conseguir de los cortes de las nuevas yemas generadas de los explantes formen raíces y brotes de la planta para que pueda sobrevivir en condiciones ex vitro, y la última es la fase 5 que es la siembra o trasplante de las plántulas obtenidas en el laboratorio a condiciones de ex vitro donde se espera obtener el mayor número de plantas de excelente calidad y acondicionadas a su nuevo ambiente natural.
- 2) *La organogénesis*, trata de la formación de nuevos tallos de origen adventicio de explantes que no tienen meristemo preexistente, esta puede ocurrir de acuerdo al proceso morfogénético que da origen a los nuevos tallos y depende de las células que tenga el explante.
- 3) *La embriogénesis somática*, este método se trata de la formación de embriones a partir de tejidos que no son resultado de cruce de gametos sexuales en la

fecundación, los cuales comparten características similares con los embriones zigóticos,

2.2. Definición de términos básicos

ANA: Es una fitohormona auxina que promueve el alargamiento y formación de raíces, ácido naftalénacético.

BAP: es una hormona vegetal que está dentro del grupo de las citoquininas, que promueve la aparición e incremento de células vegetales, y yemas, bencil amino purina.

Cultivo de tejidos: es la multiplicación de una planta a partir de un fragmento o corte pequeño llamado explante (tejido vegetal), del cual se puede llegar a obtener una nueva planta entera idéntica o similar a la planta madre.

Epífito: Planta que crece de forma natural sobre otra planta, pero no depende de ella para su alimentación ni tampoco la lastima.

Embriogénesis somática: se denomina a la constitución de un embrión, el cual se genera de una célula vegetal, esto sin ser necesario el cruce o fecundación de las plantas (cruce de gametos femenino y masculino).

Explante: Hartmann y Kester, (1995), manifiesta que es parte de una planta que se emplea para iniciar el proceso de micropropagación, siendo la unidad básica para la producción de cultivo in vitro siendo denominados como estacas, nodos, semillas, acodos.

Forofito: Planta que actúa como hospedador o soporte de un epífito y este no le causa daño.

Medio de cultivo: Es la mezcla de componentes químicos que después de mucha investigación se ha podido establecer que en este medio se logra realizar la multiplicación de plantas a gran escala en condiciones de asepsia.

Murashige & skoog 1962 (MS): es una combinación de sustancias que forman el denominado medio de cultivo MS, siendo verificado su efectividad en la propagación de dicotiledóneas y monocotiledóneas, por lo que es el más empleado para la propagación de cultivo de tejidos vegetales.

Plántula: es la formación de la nueva estructura vegetal en la primera fase de su desarrollo, desde que germinan las semillas o el explante, hasta la formación de las hojas principales.

Segmento Nodal (estaca): fragmento de tallo con yemas que se separa de una planta y se introduce en el sustrato o medio de cultivo para que forme una nueva planta, este proceso se trata de una réplica idéntica de la planta madre ya que el corte es genotípicamente igual.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ámbito y condiciones de la investigación

3.1.1 Contexto de la investigación

El área donde se realizó la investigación fue el laboratorio de cultivo in vitro de la empresa Corporación GyG E.I.R.L., el cual brindó las facilidades de emplear los equipos e insumos necesarios que fueron la base fundamental para el desarrollo de la investigación.

Los equipos empleados fueron:

- Cámara de flujo laminar
- Phmetro
- Balanza analítica
- Autoclave
- Estereoscopio
- Computadora de escritorio
- Impresora
- Cámara fotográfica

Los insumos y reactivos empleados fueron:

- Murashige & Skoog MS
- Acido nicotínico (mg/L)
- Thiamina HCl (mg/L)
- Sacarosa g/L
- 6-bencilaminopurina (ml/L)
- Ácido naftalen acético (ml/L)
- Agar (g/L)

3.1.2 Material vegetal.

El espécimen de *Vanilla pompona* Schiede pertenece a las plantas madre del plantel genético del vivero registrado de la empresa Corporación G y G E.I.R.L. mediante RDE N° 450-2021/GRSM/ARA/DEACRN y mediante RDE N° 449-2021/GRSM/ARA/DEACRN, del cual se colectó los segmentos nodales necesario para su siembra en el cultivo in vitro (ver Anexo 01 Figura 04).

Los segmentos nodales colectados fueron extraídos de los ápices del espécimen madre esto para mantener la asepsia del material colectado (ver Anexo 01 Figura 05), ya que tendrá menor cantidad de patógenos externos, además que esta parte apical se obtienen mejores resultados en propagación es especies vegetales (ver Anexo 01 Figura 06).

3.1.3 Métodos

3.1.4 Metodología para la desinfección

Se cortaron 48 segmentos nodales de 7 cm., cada una conteniendo 1 nudo con su yema correspondiente, estas fueron separadas en grupos de 16 para ser sometidas a protocolos (T₁, T₂, y T₃).

Los segmentos nodales fueron desinfectados con alcohol a 96 grados haciendo frotaciones suaves con trozos de algodón, seguido se procedió a lavarlas con detergente y enjuagando 3 veces, este proceso se desarrolló en el área de preparación de medios.

Continuando con el proceso de desinfección se llevó a la cámara de flujo laminar los segmentos nodales, los cuales se separaron en grupos de 16 los mismos que se colocaron en frascos previamente esterilizados. A cada frasco se le adiciono 200 ml de solución de fungicida previamente preparada (Benomyl) por un tiempo de 10 minutos. Se elimino el contenido y adicionó 200 ml de solución detergente por 10 minutos; pasado ese tiempo se mantuvo en hipoclorito de sodio (T₁ de 0,5, T₂ de 1,0 y T₃ de 1,5 %), a diferentes concentraciones por un tiempo de 10 minutos, finalmente se enjuagó cada frasco 4 veces con agua destilada previamente esterilizada (Ver Tabla 02).

Tabla 2
Protocolos de desinfección

Insumos	T ₁	T ₂	T ₃
Benomyl g/L	50	50	50
Detergente ml/L	75	75	75
Hipoclorito de Sodio %	0,5	1	1,5

3.1.5 Metodología del cultivo *in vitro*

Los segmentos nodales desinfectados fueron sembrados, previo corte en bisel de la parte inferior del segmento nodal y horizontal de la parte superior, éstos fueron colocados en un medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), con adición de 0,4 mg/L

de tiamina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 20 g/L de sacarosa, 10g/L de agar con un pH entre 5.4 - 5.6; con 0.5 ml/L de 6-bencilaminopurina en T₂, con 1 ml/L de 6-bencilaminopurina y 0.5 ml/L de ácido naftalen acético en T₃, y con 1.5 ml/L de 6-bencilaminopurina y 1 ml/L de ácido naftalen acético en T₄, esto según se indica en la tabla 03.

Tabla 3
Medio de cultivo para el desarrollo de los brotes

Reactivos	Medios de Multiplicación			
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Macro y micronutriente MS (Murashige and Skoog)	C	C	C	C
Acido nicotínico (mg/L)	0,5	0,5	0,5	0,5
Thiamina HCl (mg/L)	0,4	0,4	0,4	0,4
Sacarosa g/L	20	20	20	20
6-bencilaminopurina (ml/L)	0	0,5	1	1,5
Ácido naftalen acético (ml/L)	0	0	0,5	1
Agar (g/L)	10	10	10	10
pH	5,4 – 5,6			

Una vez listo el medio de cultivo se vierte en frascos cuadrados o circulares largos, los cuales son sellados y esterilizados mediante el empleo de la autoclave a un equivalente de 15 libras de presión durante un periodo de 15 minutos, a 121 °C.

Los escenarios del desarrollo en el área de crecimiento fueron a fotoperiodo equivalente a 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (16/8), a una temperatura de entre 25 ± 1 °C y a una humedad relativa de 90 a 100% durante 20 días.

3.1.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Esta investigación se usó un diseño experimental completamente al azar (DCA), empleando 48 frascos en total, en los cuales se sembraron en cada uno un segmento nodal, siendo 12 segmentos nodales por tratamiento en combinaciones de ANA y BAP preparadas específicamente en frascos de 250 ml, se escogió este tipo de frasco ya que el segmento nodal es por naturaleza gruesa y no habría mayor espacio para el desarrollo de la variable de respuesta que es el segmento de tallo nuevo a desarrollar proveniente del segmento nodal. Se evaluó su desarrolló a los 20 días de transcurrido la siembra.

Se evaluó el crecimiento de los brotes (número de brotes generados por frasco de siembra) estos datos fueron recolectados durante la ejecución de la investigación que fueron procesados utilizando la estadística inferencial ANVA y prueba de Tukey ($p < 0,05$) esto con la finalidad de contrastar las medias obtenidas entre los distintos tratamientos. La información estadística se realizó con el programa Minitab 10.9 para Windows.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la contrastación de la hipótesis la aplicación de la fitohormona en los segmentos nodales, tiene un efecto significativo sobre la propagación in vitro de la *Vanilla pompona* Schiede, logrando obtener resultados óptimos para la propagación de esta especie a partir de segmentos nodales, esto se puede visualizar desde el proceso de desinfección hasta la multiplicación de la misma.

4.1. Desinfección de segmentos nodales

Se usaron 48 segmentos nodales de 7 cm., cada uno conteniendo 1 nudo con su yema correspondiente, los mismos que fueron desinfectados con alcohol a 96 grados haciendo frotaciones suaves con trozos de algodón, seguido se procedió a lavarlas con detergente y enjuagando 3 veces, se continuó el proceso en la cámara de flujo laminar separando en grupos y adicionando 200 ml de solución de fungicida previamente preparada (Benomyl) por un tiempo de 10 minutos, luego se eliminó el contenido y adicionó 200 ml de solución detergente por 10 minutos; pasado ese tiempo se mantuvo en hipoclorito de sodio (T₁ de 0,5, T₂ de 1,0 y T₃ de 1,5 %), a diferentes concentraciones por un tiempo de 10 minutos, finalmente se enjuagó 4 veces con agua destilada.

El mejor tratamiento fue el protocolo de desinfección que contiene una concentración de hipoclorito de sodio al 1,5% (T₃) que influyó notablemente en la cantidad de botellas (frascos) sin contaminantes por agente externo como hongos o bacterias (Figura 01) y también se logró evidenciar que no afectó la formación de brotes a partir de los segmentos nodales, a los 20 días de la siembra.

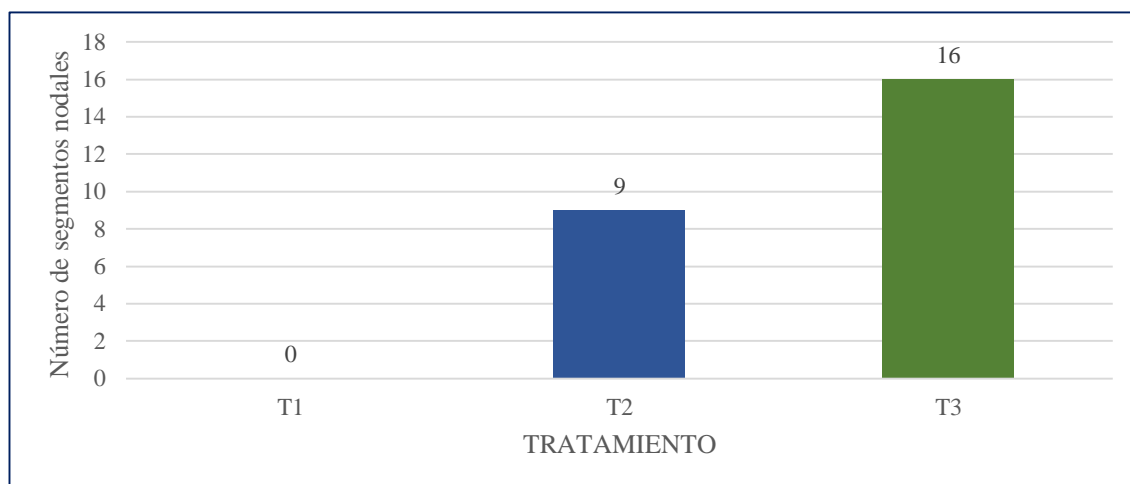


Figura 1
Mejor protocolo de desinfección

4.2. Número de brotes

Los segmentos nodales desinfectados fueron sembrados, previo corte en bisel de la parte inferior del segmento nodal y horizontal de la parte superior, éstos fueron colocados en un medio de cultivo de MyS (1962), con adición de 0,4 mg/L de tiamina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 20 g/L de sacarosa, 10g/L de agar con un pH entre 5.4 - 5.6; con 0.5 ml/L de 6-bencilaminopurina en T₂, con 1 ml/L de 6-bencilaminopurina y 0.5 ml/L de ácido naftalen acético en T₃, y con 1.5 ml/L de 6-bencilaminopurina y 1 ml/L de ácido naftalen acético en T₄.

Los resultados de los tratamientos para el número de brotes como se observa en el figura 02 son para el T₁ de 1,833, el T₂ de 3,583, el T₃ de 7,417, y el T₄ de 4,583 siendo el T₃ con el que se obtuvo mejores resultados, el mismo que corresponde al medio de cultivo M y S Basal (B_{MS}), con adición de 0,4 mg/L de tiamina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 20 gr/L de sacarosa, 10 g/L de agar, 1 ml/L de 6-bencilaminopurina, y 0,5 ml/L de Ácido naftalen acético, a los 20 días de evaluación (ver figura 02).

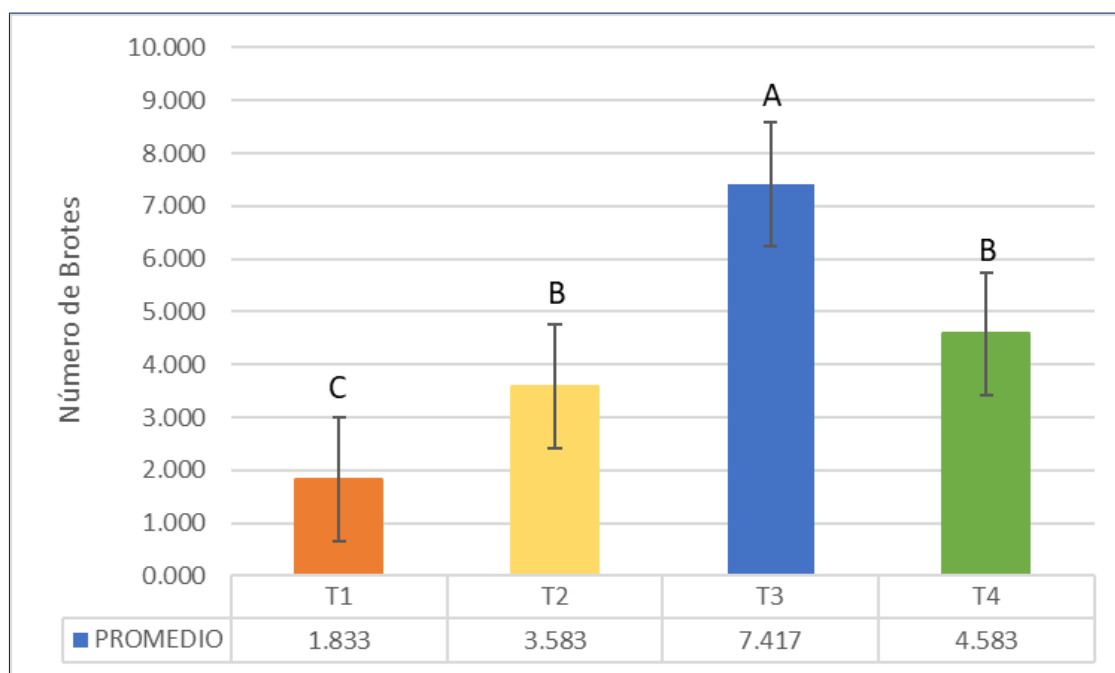


Figura 2
Resultados de número de brotes

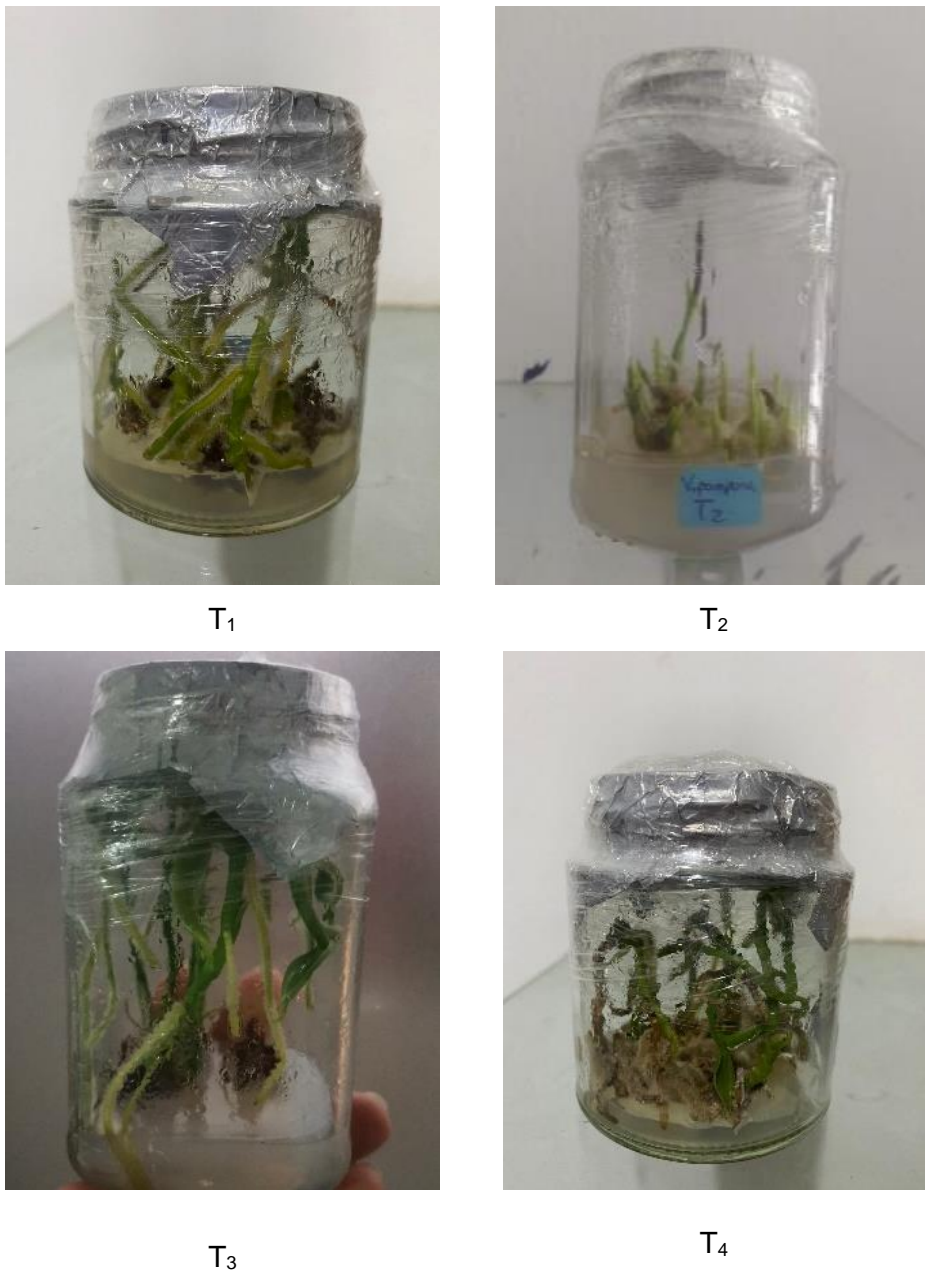


Figura 3
Brotos de *Vanilla pompona* Schiede

Considerando el análisis estadístico que se realizó empleando el programa Minitab, se obtuvo que el T₃ es el que presenta mejores resultados con una media de 7,417 y una desviación estándar de 1,621 que es la más alta de los cuatro tratamientos. Esta información es verificada empleando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95% obteniendo que el que tiene mayor nivel de confianza es el T₃. (Ver tabla 04, 05, y 06)

Tabla 4
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	196.6	65.521	28.71	0.000
Error	44	100.4	2.282		
Total	47	297.0			

Tabla 5
Medias comparativas

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	12	1,833	1,467	(0,954; 2,712)
T2	12	3,583	1,564	(2,704; 4,462)
T3	12	7,417	1,621	(6,538; 8,296)
T4	12	4,583	1,379	(3,704; 5,462)

Desv.Est. agrupada = 1,51069

Tabla 6
Comparaciones en parejas de Tukey
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
T3	12	7,417	A
T4	12	4,583	B
T2	12	3,583	B
T1	12	1,833	C

4.3. Discusión de resultados

En esta investigación el mejor tratamiento de desinfección contiene benomyl 50 g/L, detergente 75 ml/L, y una concentración de 1,5% (T₃) de hipoclorito de sodio, que influye notablemente en la cantidad de botellas libres de contaminantes por microorganismos a los 20 días de la siembra, resultado que es similar a las investigaciones realizadas por Villard, *et al.*, 2014, que emplearon la concentración al 0,5% de hipoclorito de sodio lo que no afectó la germinación de cultivo *in vitro* de las plantas; Araya et al., 2014 que utilizaron distintas cantidades de Ca (ClO)₂ que es el hipoclorito de calcio, así como el hipoclorito de sodio NaClO, el alcohol y entre otros insumos; y Reyes 2015, que emplearon en orquídeas la lejía NaClO al 10% de concentración, jabón líquido, el C₂H₆O al 70%, el agua oxigenada, cloruro de benzalconio, ampicilina y los fungicidas, en distintas mezclas obteniendo buenos resultados.

De esta investigación se obtuvo que el T₃ fue con el que se obtuvo mejores resultados, el mismo que corresponde al medio de cultivo M y S Basal (B_{MS}), con incremento de 0,4

mg/L de tiamina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 20 g/L de sacarosa, 10 g/L de agar, 1 ml/L de 6-bencilaminopurina, y 0,5 ml/L de Ácido naftalen acético, del cual se puede obtener promedio 7,417 brotes por segmento nodal de *Vanilla pompona* Schielde sembrado, siendo esta la mejor técnica para la producción *in vitro* de esta especie, resultado que es similar a las investigaciones realizadas por Lee 2008 donde para obtener *Vanilla planifolia* Andrews emplean la multiplicación de clones mediante proceso de cultivo *in vitro* las yemas o brotes axilares (Z1=jóvenes y Z2=maduras), logrando una media de $18,57 \pm 2,44$ y $11,00 \pm 1,04$ brotes por explante en yemas Z1 y Z2, equitativamente, con $9,55 \mu\text{M}$ de 6-bencil-amino-purina (BAP) en el medio Murashige y Skoog (MS), enriquecido con mio-inositol ($554.9 \mu\text{M}$), vitaminas (5 ml L^{-1}), antioxidantes y sacarosa (20 g L^{-1}); asimismo Cazarez, *et. al.* 2018, para obtener en ***Prosthechea citrina*** durante la etapa de organogénesis añadieron BAP (Bencil Amino Purina) a los tratamientos con medio de cultivo MS en distintas dosis de $1,0$ a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ logrando que las plantas comiencen a brotar; Vasco 2020 obtuvo como parte de su evaluación del crecimiento de raíces mediante el cultivo *in vitro* de plántulas de las orquídeas *Epidendrum ibaguense* estableció el regulador de incremento más apropiado para estimular el crecimiento de raíces siendo la adición de ANA en distintas dosis de $1,0$ $5,0$ y $0,2 \text{ mgL}^{-1}$; y Macas 2019 manifiesta que de la multiplicación de *Vanilla tahitensis* en distintos medios de cultivo *in vitro*, el que obtuvo el mejor resultado fue el tratamiento de MS + BAP + G3 del grupo 1, que mostró el mayor número de entrenudos y elevada cantidad de hojas obteniendo tres entrenudos y dos hojas correspondientemente.

CONCLUSIONES

- La aplicación de las fitohormonas ácido bencilaminopurina (BAP) en concentración de 1 ml/L y de ácido naftalen acético (ANA) en concentración de 0,5 ml/L, influyó positivamente en el desarrollo de las plantas para la propagación in vitro de *Vanilla pompona* Schiede.
- El efecto de la aplicación del ácido bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalen acético (ANA) en los segmentos nodales de *Vanilla pompona* Schiede fue favorable con el tratamiento T3 el mismo que corresponde al medio de cultivo M y S Basal (BMS), con adición de 0,4 mg/L de tiamina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 20 g/L de sacarosa, 10 g/L de agar, 1 ml/L de 6-bencilaminopurina, y 0,5 ml/L de Ácido naftalen acético, a 20 días de la evaluación.
- La aplicación de ácido bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalen acético (ANA) permitió la formación de plántulas producidas a partir de los segmentos nodales de *Vanilla pompona* Schiede con un promedio de 7,417 brotes por segmento nodal, siendo la mejor técnica para realizar la reproducción in vitro de la especie.

RECOMENDACIONES

- Emplear el proceso de desinfección al 1,5% de hipoclorito de sodio (NaClO) para asepsia y/o limpieza de los segmentos nodales de la especie *Vanilla pompona* Schiede.
- Emplear como medio de cultivo M y S Basal (B_{MS}), con aditamento de 0,4 mg/L de tiamina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 20 g/L de sacarosa, 10 g/L de agar, 1 ml/L de 6-bencilaminopurina, y 0,5 ml/lit de Ácido naftalen acético para la generación de brotes.
- Se recomienda el uso de esta metodología para el cultivo *in vitro* de la especie *Vanilla pompona* Schiede.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adame-García, J., Rodríguez-Guerra, R., Iglesias-Andreu, L., Ramo-Prado, JM., Luna-Rodríguez, M. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93(3):669-678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>
- Arditt, Joseph. *Micropropagation of Orchids* Second edition. Vol I. Blackwell Publishing. 2009. 2 pp. ISBN: 978-1-444-30040-6
- Arenas, Mitzy. *Optimización de un medio de cultivo para la vitropropagación de Vanilla planifolia G. Jackson*. Tesis para obtener el título de licenciada en ingeniería agrohidráulica. 2019.
- Ariza, C., et al. *Efecto del almidón y dos fitorreguladores sobre la germinación de Prosthechea sp.* Revista tiempo & economía, vol 1, núm. 2. Colombia. 2017.
- Aucapiña, Ch., y López, P. *Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel in vitro*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Ecuador. 2016.
- Azofeifa-Bolaños, J., et al. *Desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogénico de vitroplantas de Vanilla planifolia Andrews*. *Agron. Mesoam.* 2018. 30(1):33-49.
- Bautista Aguilar, J.R. *Conservación y caracterización de germoplasma in vitro de Vanilla spp. con resistencia a Fusarium oxysporum f. sp. Vanillae*. Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. Universidad Veracruzana. Mexico. 2022.
- Chacón, M., et al. *Propagación in-vitro de cuatro especies de orquídeas nativas de la región Cusco*. Escuela Profesional de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Perú. 2017.
- Cameron, K. *Vanilla Orchids, Natural History and Cultivation*. Published in 2011 by Timber Press, Inc. ISBN-I3: 978-0-88192-989-8

- Carranza, C., et al. *Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews (Orchidaceae)*. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Biotecnia. México. 2020.
- Damián, A., Janovec, J. *El género vanilla en el Perú*. Científica. Universidad Científica del Sur. Perú. 2018. Pág. 165 p.
- Flores, Oscar et al. *Germinación in vitro de semillas de Vanilla planifolia Jacks y comparación de métodos de micropropagación*. Avances en Investigación Agropecuaria. 2017. 21(2): 69-83. ISSN 0188789-0.
- Gätjens-Boniche, O., et al. *Propagación masiva y formación de callos protocórmicos de vainilla a partir de ápices radicales*. México. Polibotánica No 45. 2018. 157-177 pp. ISSN electrónico: 2395-9525
- Goicochea, A, et al. *Orquídeas de Perú: Relación de especies y sus sinónimos*. Primera Edición. Moyobamba, Perú. 2019. ISBN: 978-612-47895-1-9.
- Hernández-Martínez JL, Carranza-Álvarez C, Maldonado-Miranda JJ and Martínez-Soto D. 2020. Isolation of Fusarium from vanilla plants grown in the Huasteca Potosina Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 475-484.
- Herrera-Cabrera, B.E., Hernández, M., Vega, M. & Wegier, A. *Vanilla pompona*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017. e.T105878897A105878899. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T105878897A105878899.en>. Downloaded on 20 May 2020.
- Lozano Rodríguez, Miguel, et al. *Cultivo in vitro de yemas axilares de Vanilla planifolia Andrews con diferentes citocininas*. México - Tuxpan. Revista Biológico Agropecuarioa. 2015. 1153-1165 pp. ISSN 2007-6940
- Macas, R. *Propagación de Vainilla (Vanilla tahitensis) en diferentes medios de cultivo in vitro*. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias. Ecuador, Guayaquil. 2019
- Suárez Padrón, Isidro Elías. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad de Córdoba. Córdoba, Colombia. 2020. ISBN 978-958-5104-09-9.

Vasco, C. *Evaluación del enraizamiento in vitro y aclimatación de plántulas de la orquídea Epidendrum ibaguense*. Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas Tecnología en Gestión y Producción Hortícola. Cajicá, Cundinamarca. 2020.

Vatteone de Scappini, A. *“Ka’aguy Yvoty” Orquídeas naturales de nuestros bosques*. Colombia. Editora Litocolor. 2017. 390 pp. ISBN 9789996704079

Vilcherrez Atoche, Joe Abdul. Efecto de la harina de plátano y el agua de coco en medios de cultivo para la micropropagación de orquídeas *Cattleya maxima* y *Epidendrum sp.* Lambayeque Perú. 2019

Zelenko, Harry, y Bermúdez, Pablo. *Orchid’s species of Perú*. 1ra Edición. Quito-Ecuador. Published by zai Publications. 2009. 58-65 pp. ISBN 9780966134469

ANEXOS

Anexo 1



Figura 4
Planta madre de *Vanilla pompona* Schiede



Figura 5
Ápices del espécimen madre de *Vanilla pompona* Schiede

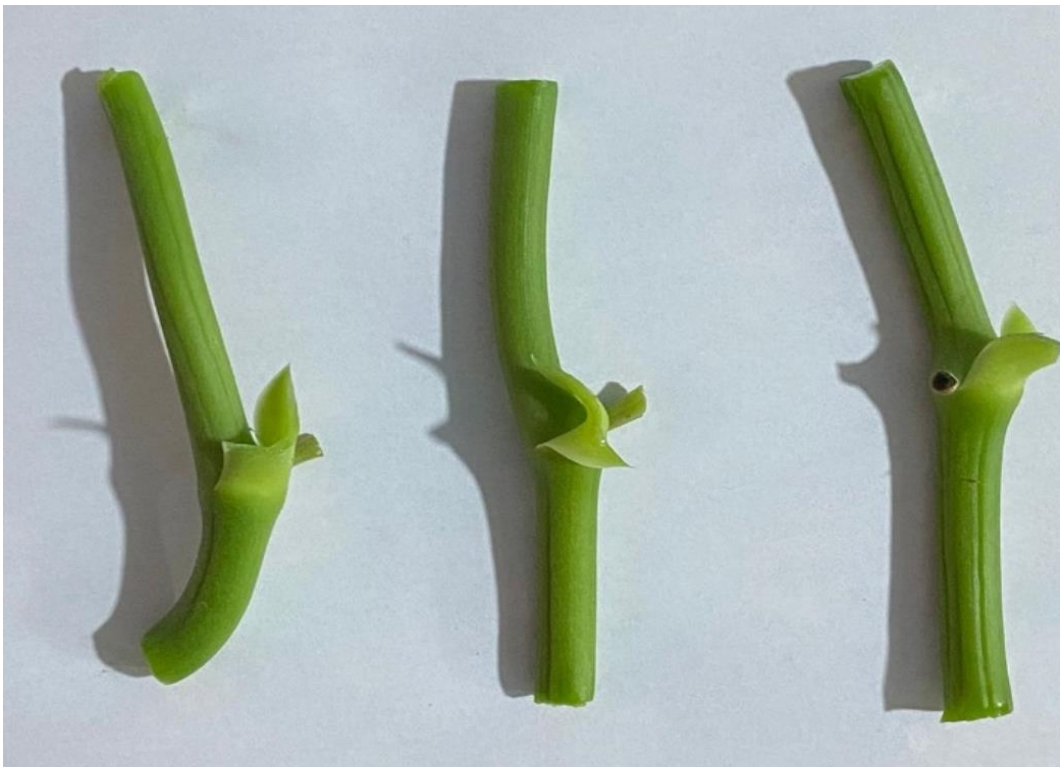


Figura 6
Segmentos nodales colectados de *Vanilla pompona* Schiede

Anexo 2

ANOVA de un solo factor: T1; T2; T3; T4

Crecimiento de brotes

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	T1; T2; T3; T4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	196.6	65.521	28.71	0.000
Error	44	100.4	2.282		
Total	47	297.0			

Resumen del modelo

S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)	R-cuad. (pred)
1.51069	66.19%	63.88%	59.76%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	12	1.833	1.467	(0.954; 2.712)
T2	12	3.583	1.564	(2.704; 4.462)
T3	12	7.417	1.621	(6.538; 8.296)
T4	12	4.583	1.379	(3.704; 5.462)

Desv.Est. agrupada = 1.51069

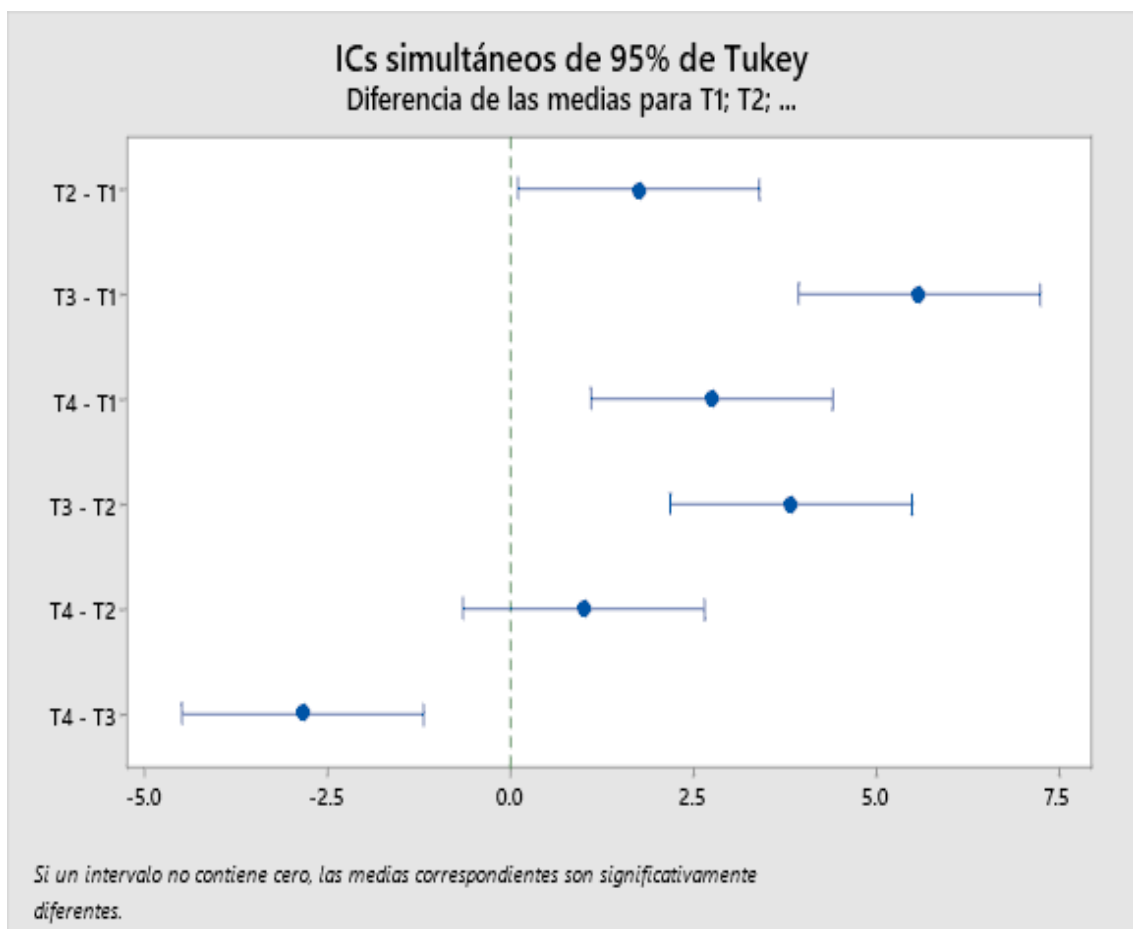
Comparaciones en parejas de Tukey

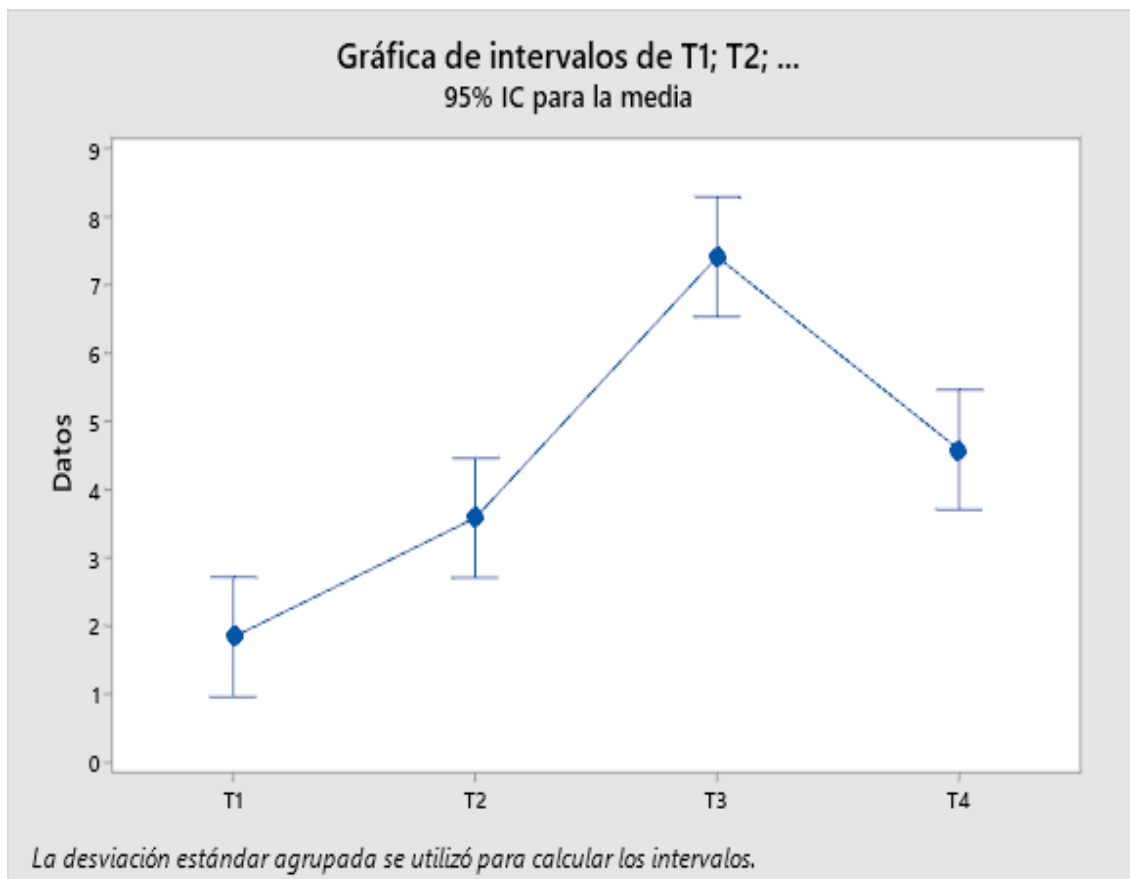
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor N Media Agrupación

T3	12	7.417	A
T4	12	4.583	B
T2	12	3.583	B
T1	12	1.833	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





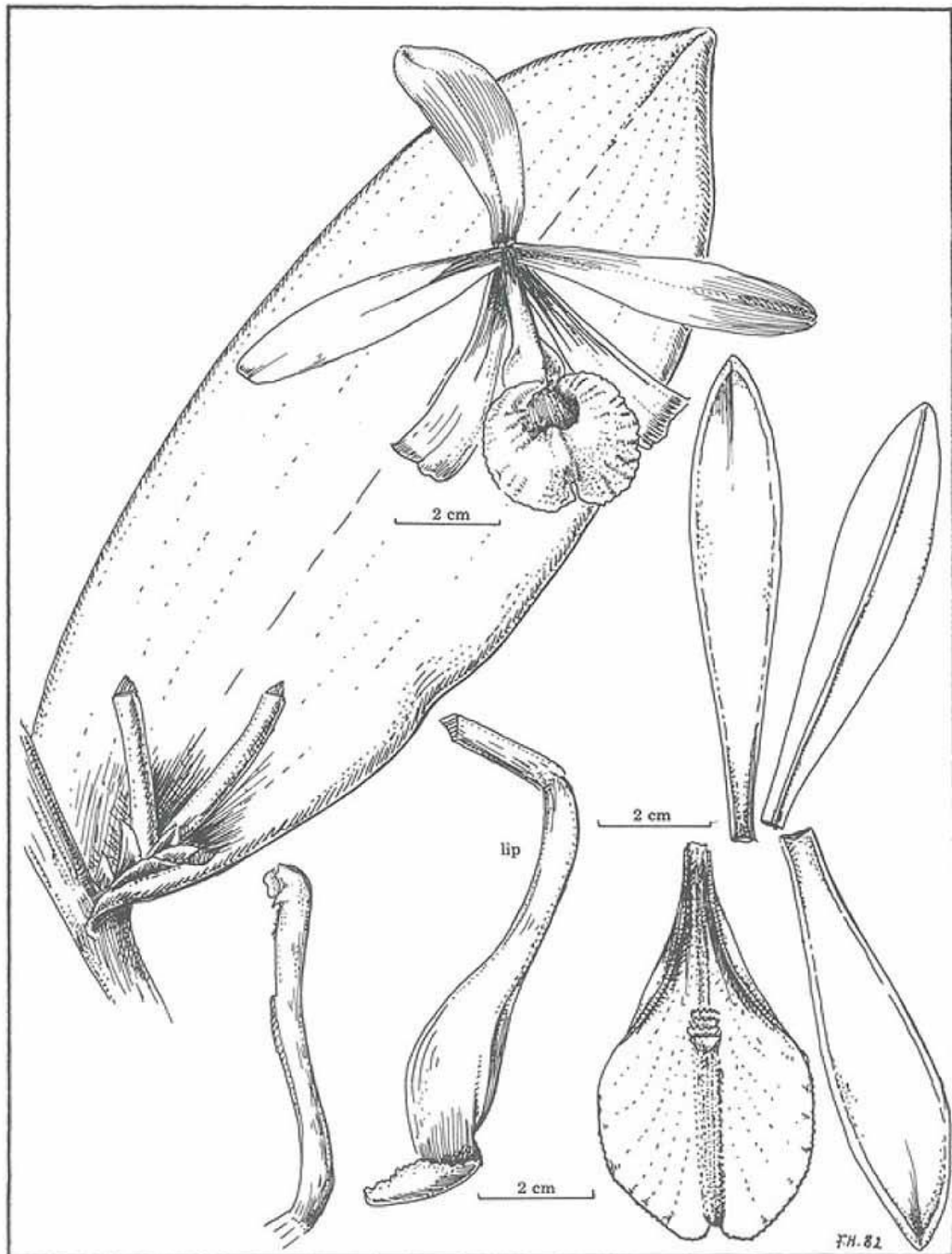
Anexo 3

RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE BROTES DE *Vanilla pompona* Schiede A LOS 20 DÍAS DE LA SIEMBRA EN CULTIVO IN VITRO

TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	PROMEDIO
T1	3	2	3	0	0	2	0	4	2	3	0	3	1.833
T2	2	4	2	5	5	1	4	5	3	4	2	6	3.583
T3	6	5	9	6	6	8	8	9	7	9	6	10	7.417
T4	4	6	5	3	4	6	5	4	2	5	7	4	4.583

Anexo 4

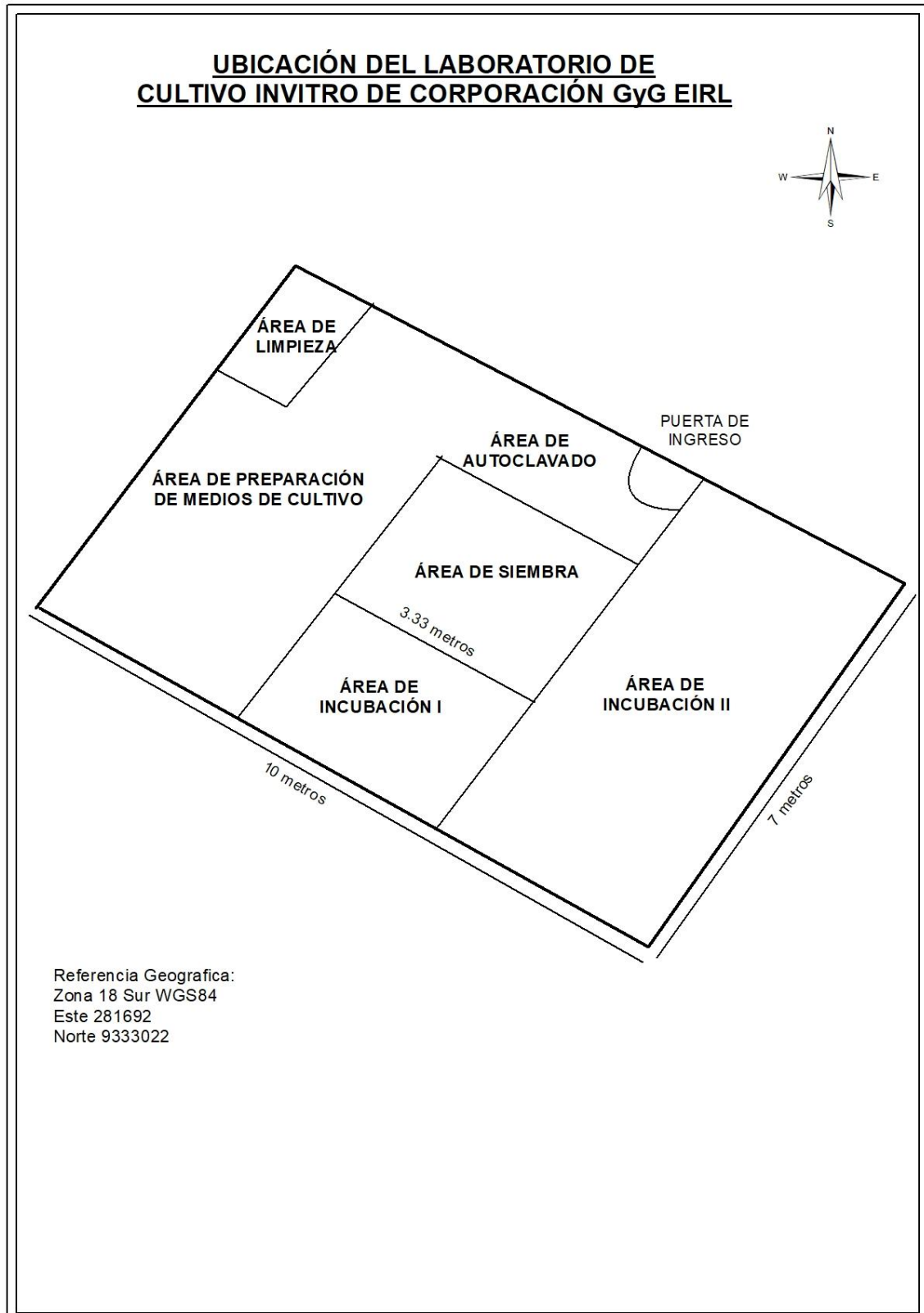
Lámina de *Vanilla pompona* Schiede



VANILLA POMPONA Schiede
Text on reverse side

PLATE 1195
Icones Plantarum Tropicarum

Anexo 5

CROQUIS DEL CAMPO EXPERIMENTAL: Laboratorio de cultivo de tejidos de la empresa Corporación G y G E.I.R.L.

Aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro de Vanilla pompona Schiede

por Astrid Domy Gutiérrez Ruiz

Fecha de entrega: 17-abr-2024 08:35a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2352691624

Nombre del archivo: MEST._GEST.AMB._-Astrid_Domy_Guti_rrez_Ruiz_v1_17-04.docx (3.76M)

Total de palabras: 8751

Total de caracteres: 46056

Aplicación de fitohormonas en segmentos nodales para la propagación in vitro de Vanilla pompona Schiede

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsm.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	tesis.unsm.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	1library.co Fuente de Internet	2%
4	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	2%
5	repository.unimilitar.edu.co Fuente de Internet	1%
6	Submitted to Universidad Nacional de San Martín Trabajo del estudiante	1%
7	revistas.utadeo.edu.co Fuente de Internet	1%
8	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%