

Experiencias alcanzadas en propagación *in vitro* de vainilla, una especie con potencial uso en la amazonía

Experiences in the in vitro propagation of vanilla, a species with potential use in the amazon

Máximo Moreira¹, Oscar Vivanco², Lilibeth Carrión³, Stefanía Cevallos⁴, Paulo Herrera⁵

1 Universidad Técnica Particular de Loja. <https://orcid.org/0000-0002-1833-2674>

2 Universidad Técnica Particular de Loja. <https://orcid.org/0000-0001-7799-6297>

3 Universidad Técnica Particular de Loja. <https://orcid.org/0000-0003-4435-7135>

4 Universidad Técnica Particular de Loja. <https://orcid.org/0000-0001-5638-5112>

5 Universidad Técnica Particular de Loja. <https://orcid.org/0000-0002-3802-4468>

Autor de correspondencia: piherrera@utpl.edu.ec

DOI: <https://doi.org/10.63804/CIBEN.25.bbfs.e12>

Resumen

La vainilla es una orquídea de gran valor económico y cultural. En Ecuador se cultivan *Vanilla tabitensis* y *V. planifolia* como especies introducidas, mientras que *V. odorata* es nativa de la Amazonía. En varias zonas la producción depende de poblaciones silvestres, lo que amenaza los ecosistemas y la conservación del germoplasma. La propagación *in vitro* ofrece una alternativa sostenible. En este estudio se evaluó la introducción y propagación *in vitro* a partir de semillas de *V. odorata* (Tena) y *V. tabitensis* (Santo Domingo). *V. odorata* no respondió a los tratamientos de desinfección, mientras que *V. tabitensis* mostró alto porcentaje de germinación y desarrollo en medio MS al 50% con aditivos específicos y un protocolo de desinfección con agua, alcohol y cloro con Tween 20. Las plántulas se aclimataron en sustrato de musgo, agrolita y composta. El cultivo *in vitro* de *V. tabitensis* demuestra potencial para producción masiva, mientras que *V. odorata* requiere protocolos específicos de desinfección.

Palabras clave: semillas; cultivo *in vitro*; vainilla; desinfección.

Abstract

Vanilla is an orchid of great economic and cultural value. In Ecuador, *Vanilla tabitensis* and *V. planifolia* are cultivated as introduced species, while *V. odorata* is native to the Amazon.

In several areas, production depends on wild populations, which threatens ecosystems and the conservation of germplasm. In vitro propagation offers a sustainable alternative. This study evaluated the in vitro introduction and propagation of *V. odorata* (from Tena) and *V. tahitensis* (from Santo Domingo) from seeds. *V. odorata* did not respond to the disinfection treatments, whereas *V. tahitensis* showed high germination and development in 50% MS medium supplemented with specific additives and a disinfection protocol using water, alcohol, and chlorine with Tween 20. Seedlings were acclimatized in a substrate composed of moss, perlite, and compost. The *in vitro* culture of *V. tahitensis* demonstrates potential for mass production, while *V. odorata* requires specific disinfection protocols.

Keywords: seeds; *in vitro* culture; vanilla; disinfection.

Introducción

Dentro de las orquídeas, el género *Vanilla* es uno de los más reconocidos a nivel mundial por su sabor y fragancia y su alto valor económico. En Ecuador se han reportado cinco especies con amplia distribución (Flanagan et al., 2018; Landy, 2020; Soto & Cribb, 2010) y de ellas se menciona *V. odorata* como posible alternativa de producción, sin embargo, las más producidas en el mundo son *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitense* (Álvarez et al., 2013; Azofeifa-Bolaños & Paniagua-Vasquez, 2015; Bory et al., 2007). El género se caracteriza por presentar una enredadera la cual se forma desde semillas que germinan en el suelo y que durante su etapa inicial son terrestres, y sus raíces viven asociadas con micorrizas (Ordoñez et al., 2012). Para su cultivo no se requieren grandes extensiones de terreno (Ortega, 2018) y se polinizan artificialmente, y resulta una alternativa sustentable ya que se adapta en muchos sitios.

La principal forma de propagación es por segmentos cortados desde el tallo de la planta madre generando clones que producen pérdida de variación genética, y pueden ser susceptibles al ataque de plagas y enfermedades (Adame-García et al., 2015). Aunque se pueden propagar por semillas, no se han realizado muchas investigaciones sobre esto, pero es claro que es una opción para aumentar la variabilidad y por ende la resistencia ante enfermedades, y resistencia a nuevas condiciones ambientales (Castillo, 1991). Por lo antes mencionado, nos planteamos establecer semillas en condiciones *in vitro*, evaluar su germinación y obtener plántulas para aclimatarlas. Con ello a más de conocer procesos biológicos de la especie estamos aportando a una estrategia de desarrollo sustentable.

Metodología

Se colectó cápsulas de dos especies *V. tahitensis* y *V. odorata*. Las de *V. tahitensis* fueron colectadas

en Santo Domingo. *V. odorata* fue colectada en Morona Santiago y Tena. Se registraron datos de procedencia, edad, estado fitosanitario, largo, ancho, estado de la cápsula (cerrada, abierta). Todas las cápsulas fueron almacenadas en refrigeración hasta su procesamiento. De la colecta se tuvieron cápsulas abiertas y cerradas, todas fueron desinfectadas. En el caso de las abiertas se desinfectó sus semillas en agua y jabón por 5min, seguidos de alcohol 70% 5 min, hipoclorito de sodio 2% +3gotas Tween 20 por 15 min y se sembraron. Se dejó un bloque de semillas para exponerlas a UVA durante 12 y 24 horas, y luego sembrarlas. Las cápsulas cerradas se desinfectaron con agua destilada y 3 gotas de Tween 3 min, por 3 veces. Luego, en la cabina de flujo laminar se hizo un corte longitudinal y transversal y se las sumergió en frascos de 250 ml con hipoclorito de sodio al 2% + 3 gotas de Tween, por 5, 15 y 30 min; y también agua oxigenada de 10 vol por 3 y 10 min.; para evitar pérdida de semillas se esperó a que las semillas se asienten en la parte inferior del frasco y se retiró el agua con la ayuda de micropipetas de 100 μ l. Luego se sembraron en los medios.

Se utilizó medio MS (Murashige & Skoog 1962) al 50% de sus sales. Se usaron cuatro medios sólidos y dos semisólidos, con 7 y 4 g de agar/L, respectivamente. Se adicionaron vitaminas: 10 ml de myonositol, 10 ml piridoxina, 10 ml ácido nicotínico, 10 ml tiamina; y, 100 ml de agua de coco y 0,4 g de glicina. El pH se ajustó a 5,80 con NaOH y HCl. Se esterilizó el medio de cultivo en autoclave a 121 °C por 20 minutos. En los medios sólidos se usaron varias hormonas 1ml GA3; 1 ml Kin; 0,5ml Kin+0,5 ml ANA; 0,5 ml ANA, control sin hormonas. En los medios semisólidos se usó 0,5 ml Kin+0,5 ml ANA; control sin hormonas.

Los protocormos de 6 meses fueron transferidos para su enraizamiento a medio MS +0,5 ml Kin+ 0,5 ml ANA, y también, con 100 ml de agua de coco. Luego se aclimataron los brotes enraizados de entre 5-10 cm, para ello se enjuagaron con agua corriente y se sembraron en invernadero en charolas de 50 x 30 x 5 cm, que contenían sustrato estéril de musgo turba y agrolita (1:1). Se aplicaron riegos con agua corriente tres veces por semana y la humedad relativa se mantuvo entre el 70 y 80 %, y con sombra del 50 %. Cuando las plantas alcanzaron 30 cm de altura, éstas se transfirieron a contenedores individuales con tierra negra previamente autoclavada (1:1:1) como sustrato, y se aplicó fungicida (Tecto60®, 1 g L⁻¹) y fertilización foliar (Fertiplus®) una vez por semana durante un mes.

Se tomaron datos cada 15 días de contaminación por bacterias; la formación de protocormos y su germinación; también el enraizamiento y crecimiento de los brotes, y su sobrevivencia en la aclimatación. Para analizar los datos se evaluó su normalidad y luego se establecieron diferencias entre los tratamientos usando el programa R.

Resultados y discusión

En las cápsulas cerradas de *V. tabitensis* se observaron tratamientos de desinfección que no presentaron contaminación, mientras que en las cápsulas abiertas ningún tratamiento controló la contaminación, tanto en medio sólido como semisólido. Por otra parte, todas las cápsulas de *V. odorata* se contaminaron, por tanto, no se pudo obtener semillas y plántulas libres de contaminación de esta especie. Los tratamientos efectivos fueron con Cloro al 2% con 3 gotas de Tween por 5 a 30 minutos aplicados a las cápsulas que se hizo el corte dentro de la cabina, resultados similares han sido observados (Chaipanich et al, 2020). También los tratamientos con agua oxigenada controlaron la contaminación de forma eficaz, anteriores trabajos mencionan su uso eficiente como desinfectante. Se estableció que el efecto de la desinfección influye positivamente en el porcentaje y velocidad de germinación de las semillas.

Analizando desde los tratamientos de desinfección, se observó germinación en algunos de los tratamientos, tanto en medios sólidos como líquidos. Los tratamientos de desinfección en los que se observó mayor germinación fueron con Cloro al 2% durante 15min y 10min con un 27% y 18%, respectivamente. El hipoclorito de sodio a más de su acción como desinfectante tiene su acción escarificante (Calle y Pucha, 2023). También los tratamientos con agua oxigenada de 10vol por 10 y 3 minutos generaron germinación del 7% y 5 %, respectivamente. Es sabido que que el agua oxigenada debilita la testa de las semillas y favorece la germinación.

Por otra parte, se relacionó la germinación con los medios de cultivo y sus hormonas, encontrando que tanto el medio sólido como semisólido con 0,5ml Kin+ 0,5ml ANA mostraron los mayores porcentajes de germinación acumulada independientemente del tratamiento de desinfección. Esto denota que es la combinación de hormonas (Kin y ANA) las responsables de inducir germinación en *V. tabitensis*, lo cual concuerda con otro estudio (Pradeep et al. 2009). La adaptación de las plántulas a condiciones de invernadero es relativamente sencilla y no presenta problemas, siendo importante mantener alta humedad en el sustrato.

Los resultados de esta investigación son un aporte a la propagación de vainilla a través de semillas, lo cual sirve de pautas para producción y conservación de estas especies.

Conclusiones

El protocolo de introducción in vitro, requiere de una desinfección de la cápsula y luego de una nueva desinfección de las semillas, esta segunda parte se la debe realizar en la cabina de

flujo laminar.

Las semillas germinan en 45 días, luego de haberlas desinfectado y sembrado en medios de cultivo, y se debe usar 0,5ml Kin + 0,5ml ANA.

La germinación se da en medio sólido y líquido, pero mejores resultados se observaron en el sólido.

Las plántulas se adaptan bien en el proceso de aclimatación

Referencias bibliográficas

Chaipanich, V. V., Roberts, D. L., Yenchon, S., Sompong, T. C., & Divakaran, M. (2020). In vitro seed germination and plantlet regeneration of *Vanilla siamensis*: An endemic species in Thailand. *ScienceAsia*, 46(3), 315-322.

Pansarin, E. R. (2021). Unravelling the enigma of seed dispersal in *Vanilla*. *Plant Biology*, 23(6), 974-980.

Pradeep Kumar, T., Stephen, F., & Alex, S. (2009). Studies on in vitro seed culture in vanilla. *Indian Journal of Horticulture*, 66(4), 547-548.