



DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE DESINFECCIÓN DE VAINILLA
(*Vanilla spp.*) PARA MICROPROPAGACIÓN IN VITRO

Poldy Natalia Rey Ramirez

ID:616499

Darwin Fernando Alvarado Paloma

ID:614471

Natalia Andrea Romero (Ingeniera Agrónoma)

Villavicencio, Meta

Noviembre 24 de 2021

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE DESINFECCIÓN DE VAINILLA (*Vanilla*
spp.) PARA MICROPROPAGACIÓN IN VITRO

Poldy Natalia Rey Ramirez

ID:616499

Darwin Fernando Alvarado Paloma

ID:614471

Trabajo de grado como requisito para optar el título de
Ingeniero en agroecológica

Natalia Andrea Romero (Ingeniera Agrónoma)

Línea de investigación

Innovación y desarrollo rural grupo de investigación GITSAI

Semillero de investigación Agrosistemas Sostenibles De la Orinoquía colombiana
(ASOC)

Ingeniería agroecológica

Unidad de Ciencias Agropecuarias

Corporación Universitaria Minuto De Dios

Villavicencio Meta Colombia

Noviembre 24 de 2021

Dedicatoria

A dios todo poderoso por darnos fuerza de soportar cada obstáculo presente en nuestro proceso de preparación y haber podido culminar con éxito esta nueva etapa de nuestras vidas.

A nuestros padres Rosa Ramirez, Stella Paloma, Jorge Rey y Raul Alvarado, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de nuestros estudios, además de cada consejo recibido para forjar nuestra personalidad y preparación como profesionales.

A mi hijo, Martin Ruiz, quien me presto el tiempo que le pertenecía y apporto su comprensión para alcanzar mis metas.

A mi hermana, Valentina Alvarado, de quien me siento muy orgulloso y a quien dejo como ejemplo mi esfuerzo y dedicación que me llevaron a poder sacar adelante mi profesión como ingeniero agroecólogo.

Agradecimientos

A la ingeniera agrónoma Natalia Andrea Romero Dávila directora de trabajo de grado por su apoyo, paciencia, dedicación y compromiso como profesional.

A la ingeniera agrónoma Nubia Estella Cruz Casallas, por su apoyo en el proceso en el proceso de investigación y sus invaluable conocimientos.

A los biólogos Martha Lucia Velasco Belalcázar y Carlos Alberto Hernández Medina, por compartir sus valioso conocimientos y aportes en el área de la fitopatología.

A la estudiante de ingeniería agroecológica Marlys Johanna Peñaloza Trujillo, por su valiosa contribución para la consecución del material vegetal utilizado en gran parte de nuestra investigación.

Contenido

Lista de tablas	8
Lista de figuras	9
Lista de anexos.....	13
Resumen	14
Abstract.....	15
Introducción.....	16
CAPÍTULO I	18
1 PROBLEMA	18
1.1 Planteamiento del problema.....	18
1.2 Formulación de pregunta	18
1.3 Objetivos.....	19
1.3.1 Objetivo general	19
1.3.2 Objetivos específicos.....	19
1.4 Justificación.....	19
CAPÍTULO II	21
2 MARCO REFERENCIAL.....	21
2.1 Cultivo in vitro	24
2.2 El cultivo de Vainilla en Colombia.....	28
2.3 Antecedentes	30
2.4 Marco teórico	32
2.4.1 Cultivo in vitro de orquídea y vainilla en Colombia	32
2.4.2 Hormonas de ácido indolacético.....	34
2.4.3 Hormonas Giberelinas.....	34
2.4.4 Deforestación.....	35
2.4.5 Deforestación por agricultura y ganadería	36
2.4.6 Deforestación en Colombia	37
2.4.7 Deforestación en la Orinoquia.....	38
2.4.8 Perdida de orquídeas por tráfico ilegal	39
2.5 Legal.....	39

CAPÍTULO III	45
3 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	45
3.1 Ubicación localización de área de estudio	45
3.1.1 Zona de recolección de material vegetal.....	46
.....	¡Error! Marcador no definido.
3.1.2 Ubicación Geográfica del área de estudio.	47
3.1.3 Siembra de plantas madre.....	47
3.1.4 Recolección de materia vegetal.....	48
3.1.5 Desinfección del laboratorio	49
3.1.6 Desinfección de materia vegetal.....	49
3.1.7 Segundo tratamiento de desinfección de esquejes	51
3.1.8 Tercer tratamiento de desinfección de esplantes.	51
3.1.9 Desinfección de semillas.....	53
3.1.10 Segundo tratamiento de desinfección de vaina (semilla).	53
3.1.11 Tercer tratamiento de desinfección de vaina (semilla).....	54
3.1.12 Preparación de medios de cultivos sólido y liquido	54
3.2 Tipo de investigación	55
CAPÍTULO IV.....	59
4 ANALISIS DE RESULTADO	59
4.1 Resultados eficiencia y eficacia de tres métodos de desinfección en explantes y vaina (semilla) de vainilla recolectados en campo y de dos medios de cultivo (sólido y liquido).	59
4.1.1 Primer tratamiento de desinfección.....	60
4.1.2 Segundo tratamiento de desinfección.....	66
4.1.3 Tercer tratamiento de desinfección.	72
4.2 Identificar la presencia de hongos fitopatógenos en los explantes establecidos en dos medios de cultivos (sólido y liquido).	75
4.3 Análisis de diseño experimental	79
4.3.1 Diseño experimental	79
Conclusión.....	92
Recomendaciones	93
Referencias	94
Anexos	104

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Taxonomía de Vainilla spp.</i>	22
<i>Tabla 2. Principales especies de vainilla.</i>	29
<i>Tabla 3. Microorganismos asociados a la vainilla.</i>	30
<i>Tabla 4. Normatividad legal vigente.</i>	39

Lista de figuras

<i>Figura 1. Mapa unidades de paisajes Villavicencio-Meta.</i>	9
<i>Figura 2. Primera recolección de material vegetal en la vereda Lourdes y segunda recolecta de raíces en la vereda Barcelona.</i>	47
<i>Figura 3. Granja Agroecología Minuto de Dios.</i>	47
<i>Figura 4. Esquejes de vainilla sembrados.</i>	48
<i>Figura 5. Recolección de esquejes y raíces.</i>	48
<i>Figura 6. Desinfección de los laboratorios.</i>	49
<i>Figura 7. Primer tratamiento de desinfección donde se aplica hipoclorito en disolución al 30% y jabón ecológico 30%.</i>	51
<i>Figura 8. Segundo tratamiento de desinfección donde se aplica hipoclorito en disolución al 40%, jabón ecológico (pursue) 40% y etanol en disolución al 70%.</i>	51
<i>Figura 9. Tercer tratamiento de desinfección donde se aplicó tego en disolución al 5%, tween 20 en disolución 5%, etanol disolución al 70%, peróxido de hidrogeno 4% e hipoclorito sodio 5%.</i>	52
<i>Figura 10. Primer tratamiento de desinfección de vaina (semilla).</i>	53
<i>Figura 11. Pasos para la preparación de medios de cultivo.</i>	55
<i>Figura 12. Diseño experimental desinfección medio de cultivo sólido.</i>	57
<i>Figura 13. Diseño experimental desinfección medio de cultivo líquido.</i>	58
<i>Figura 14. Explante contaminado con micelio al octavo día.</i>	61
<i>Figura 15. Contaminación con micelio blanco en medio líquido a los 12 días.</i>	63
<i>Figura 16. Muestra contaminada de semilla a los 60 días.</i>	64

<i>Figura 17. Explante sin contaminación día de siembra (A) y explante contaminado (B) día 24.</i>	67
<i>Figura 18. Explante recién sembrado.</i>	69
<i>Figura 19. Muestra de siembra sin contaminación.</i>	71
<i>Figura 20. Muestra suplementada con 12 mg AIA 30 días después de sembrada.</i>	73
<i>Figura 21. Explantes en medio liquido sin contaminación 30 días después de siembra.</i>	75
<i>Figura 22. Purificación de hongo en PDA.</i>	76
<i>Figura 23. Se observa en el microscopio conidios de coloración amarilla de hongo pestalotiopsis spp.</i>	77
<i>Figura 24. Se observa en el microscopio conidios de coloración verde de hongo aspergillus spp.</i>	77

Lista de figuras

<i>Gráfica 1.Resultado de contaminación del primer tratamiento de desinfección explante en medio de cultivo sólido.....</i>	61
<i>Gráfica 2.Resultado de contaminación del primer tratamiento de desinfección de explantes en medio de cultivo líquido.....</i>	62
<i>Gráfica 3.Resultado de contaminación del primer tratamiento de desinfección para vaina semilla en medio de cultivo sólido.</i>	64
<i>Gráfica 4.Resultado de contaminación del segundo tratamiento de desinfección explante para medio de cultivo sólido.</i>	67
<i>Gráfica 5.Resultado de contaminación del segundo tratamiento de desinfección explante en medio de cultivo líquido.</i>	68
<i>Gráfica 6.Resultado de contaminación del segundo tratamiento de desinfección en medio sólido.</i>	70
<i>Gráfica 7.Resultado de contaminación del tercer tratamiento de desinfección en medio de cultivo sólido.</i>	73
<i>Gráfica 8.Análisis de varianza para tiempo.</i>	81
<i>Gráfica 9.Sumas de cuadrados tipo III.</i>	81
<i>Gráfica 10. Cuadro medio esperados (CME).....</i>	82
<i>Gráfica 11.Denominadores de prueba-f.....</i>	82
<i>Gráfica 12.Análisis de residuos.</i>	82
<i>Gráfica 13.Análisis de varianza para contaminación.</i>	82
<i>Gráfica 14.Sumas de cuadrados tipo II.</i>	83
<i>Gráfica 15.Cuadrados medios esperados (CME).</i>	83

<i>Gráfica 16. Análisis de residuos.</i>	<i>84</i>
<i>Gráfica 17. Dispersión para tiempo 1.</i>	<i>86</i>
<i>Gráfica 18. Análisis de varianza para contaminación- suma de cuadro tipo II....</i>	<i>87</i>
<i>Gráfica 19. Medias por minuto cuadrados para contaminación con intervalos de confianza del 95,0%.</i>	<i>88</i>
<i>Gráfica 20. Dispersión por código de nivel.</i>	<i>89</i>
<i>Gráfica 21. ANOVA Gráfico para Contaminación.</i>	<i>90</i>
<i>Gráfica 22. Medias y 95,0% de Fisher LSD.</i>	<i>90</i>
<i>Gráfica 23. Gráfico de Interacciones.</i>	<i>91</i>

Lista de anexos

Anexo 1. <i>Ficha técnica pursue</i>	104
Anexo 2. <i>Ficha técnica tween 20</i>	105

Resumen

El objetivo de esta investigación es desarrollar un protocolo de desinfección de explantes y vainas (semilla) y la evaluación de medios de cultivos sólido y líquido, para la propagación *in vitro* de *Vanilla spp.*, con el fin de disminuir los problemas de contaminación en laboratorio en plantas provenientes directamente de campo; los medios de cultivo sólido se prepararon con Murashige & Skoog (MS), sacarosa, agar, carbón activado, formaldehído suplementado con dos reguladores de crecimiento (AIA) ácido indolacético y (GEB) giberelina) en concentraciones de 0, 2, 12 y 25 mg para cada uno y para los medios de cultivos líquidos se suprimió la adición de agar.

Los procesos de desinfección efectuados consistieron en probar diferentes concentraciones y tiempo de exposición al hipoclorito de sodio, tween 20, jabón ecológico (pursue), etanol 70%, Tego 5% y peróxido de hidrógeno 3%. Para este fin se realizaron tres montajes experimentales de la siguiente forma: primero se implementó Hipoclorito en disolución al 30% y jabón ecológico (pursue) 30%; el segundo Hipoclorito en disolución al 40%, jabón ecológico (pursue) 40% y etanol en disolución al 70% y el tercero Tego en disolución al 5%, tween 20 en disolución 5%, etanol 70%, peróxido de hidrógeno 3% e hipoclorito de sodio 5%.

Los resultados obtenidos indicaron que el mejor tratamiento de desinfección fue el tercero (Tego en disolución al 5%, tween 20 en disolución 5%, etanol 70%, peróxido de hidrógeno 3% e hipoclorito sodio 5%), mientras que en los dos primeros (1. Hipoclorito en disolución al 30% y jabón ecológico (Pursue) 30%. 2. Hipoclorito en disolución al 40%, jabón ecológico (Pursue) 40% y etanol en disolución al 70%) tratamientos implementados se presentó el 100% de contaminación transcurridos ocho días después de su siembra.

Palabras clave: In vitro, Vanilla spp., protocolo, desinfección, propagación.

Abstract

The objective of this research is to develop a protocol for the disinfection of explants and pods (seed) and the evaluation of solid and liquid culture media, for the in vitro propagation of *Vanilla* spp, in order to reduce contamination problems in the laboratory in plants coming directly from the field; the solid culture media were prepared with Murashige & Skoog (MS), sucrose, agar, activated carbon, formaldehyde supplemented with two growth regulators (AIA) indolacetic acid and (GEB) gibberellin) in concentrations of 0, 2, 12 and 25 mg for each one and for the liquid culture media the addition of agar was suppressed.

The disinfection processes carried out consisted in testing different concentrations and exposure time to sodium hypochlorite, tween 20, ecological soap (pursue), ethanol 70%, Tego 5% and hydrogen peroxide 3%. For this purpose, three experimental setups were carried out as follows: first, hypochlorite in 30% solution and ecological soap (pursue) 30%; second, hypochlorite in 40% solution, ecological soap (pursue) 40% and ethanol in 70% solution; and third, Tego in 5% solution, tween 20 in 5% solution, ethanol 70%, hydrogen peroxide 3% and sodium hypochlorite 5%.

The results obtained indicated that the best disinfection treatment was the third one (Tego in 5% solution, tween 20 in 5% solution, ethanol 70%, hydrogen peroxide 3% and sodium hypochlorite 5%), while in the first two (1. hypochlorite in 30% solution and ecological soap (Pursue) 30%), the second one (2. hypochlorite in 30% solution and sodium hypochlorite in 5% solution, ethanol 70%, hydrogen peroxide 3% and sodium hypochlorite 5%) was the best disinfection treatment. Hypochlorite solution 40%, ecological soap (Pursue) 40% and ethanol solution 70%) treatments implemented showed 100% contamination eight days after planting.

Key words: In vitro, *Vanilla* spp., protocol, disinfection, propagation.

Introducción

El género *Vanilla* pertenece a la familia Orchidaceae, la cual consta de más de 110 especies (Bory et al., 2008) citado por (Cardona et al, 2012), donde se destacan pocas especies por su importancia económica *Vanilla planifolia* Andrews, *V. tahitensis* J.W. Moore y *V. pompona* Schiede, cultivadas comercialmente para la producción de extractos de vainilla natural, el saborizante más utilizado en la industria alimenticia y la segunda especia de mayor costo en el mercado mundial después del azafrán (Havkin et al, 1997) citado por (Cardona et al., 2012).

La vainilla es una planta aromática que posee la particularidad de ser la única especie comestible de la familia Orchidaceae (Bythrow 2005) citado por (Gamboa, 2014); esta familia ha adquirido gran importancia a nivel mundial, dado que cada región y país presenta una flora orquideológica propia y las variedades presentan diversidad en tamaños, colores y formas de sus flores, convirtiéndolas en plantas apetecidas por muchos cultivadores e investigadores, para su clasificación, descripción morfológica, propagación, conservación y preservación.

La vainilla es una planta trepadora de la familia de las orquídeas (*Vanilla* spp.), con sus flores grandes y vainas de color negro que cubre una cantidad numerosa de semillas muy pequeñas. Originaria de México y producida en diferentes partes del mundo, es apreciada por poseer olor y sabor característicos por lo que se utiliza para aromatizar una gran variedad de productos (Bermúdez J. 2016).

Los procesos de reproducción de orquídea incluyen técnicas que permitan usar adecuadamente los recursos genéticos permitiendo la remultiplicación vegetal in vitro para la conservación ex situ de especies de interés ambiental, social, cultural y económico. Sin embargo, la recolección de material vegetal en campo y los procesos de desinfección para el establecimiento de explantes y semillas en medios de cultivo varían según la especie.

Tradicionalmente la vainilla es propagada de manera sexual por medio de estacas, lo que produce un retraso en el crecimiento, desarrollo y producción de la planta; tanto en sus hábitats naturales como la producción comercial para cubrir la demanda de plántulas de vainilla, es esencial la regeneración vegetativa de esta especie. El problema podría solucionarse implementando un método de propagación más adecuado, como lo es la propagación in vitro, sin embargo, existen pocas investigaciones al respecto y los protocolos de siembra son complicados (Kalimuthu et al., 2006) citado por (Matamoros et al., 2018) de igual forma no se tiene claridad en los procesos de desinfección para materiales extraídos directamente de campo.

En Colombia no se cuenta con un amplio conocimiento del proceso tecnológico de protocolos de propagación y desinfección para la multiplicación in vitro de la orquídea *Vanilla* (*vainilla* sp.). En este sentido, el presente proyecto tiene el propósito de desarrollar un protocolo de desinfección para explantes y vaina (semilla) de vainilla spp. extraído de campo para ser sembrado mediante el método de micropropagación.

El presente trabajo de grado se ejecutó, a través de la financiación del proyecto de investigación “Estudios preliminares para establecer la viabilidad agroeconómica en la producción de las especies *Vanilla phaeantha* Rchb F y *Rodriguezia venusta* mediante la micropropagación in vitro, con fines de reconversión productiva del departamento del Meta C120-1001” en la IX Convocatoria para el Desarrollo y Fortalecimiento de la Investigación de UNIMINUTO.

La Corporación Universitaria Minuto de Dios UNIMINUTO plantea desarrollar sus procesos de investigación asociados con los objetivos de desarrollo sostenibles permitiendo aportar a las comunidades procesos innovadores y productivos en la búsqueda de mejores condiciones para las regiones y sus habitantes, este proyecto se fundamenta en la línea tres de investigación.

CAPÍTULO I

1 PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

La planta de vainilla es originaria de las selvas mexicanas y otras regiones de sur América incluidas las tres cordilleras colombianas, donde se presentan condiciones de bosque húmedo tropical propicias para su desarrollo y reproducción de manera silvestre. En Colombia, se tienen registros de la presencia de poblaciones nativas de *V. planifolia* en los bosques de la región del Pacífico, Urabá, la costa Atlántica, los valles interandinos y la cuenca Amazónica (Ordoñez et al., 2011) citado por (Santana et al, 2012).

La vainilla se ha convertido en un cultivo promisorio en diferentes regiones de Colombia que presentan condiciones agroecológicas apropiadas para su crecimiento y desarrollo (Álvarez et al, 2013). Sin embargo, el área desarrollada para este cultivo en el país es muy pequeña (72 ha) y los rendimientos que se obtienen son bajos frente a los países productores (Damirón et al, 2006), esta condición se debe, al desconocimiento que se tiene del manejo agronómico del cultivo, problemas fitosanitarios, necesidades fisiológicas, requerimientos nutricionales y propagación (Moreno et al, 2011). Citado por (Álvarez et al, 2013).

Según Hernández et al (2010) la contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, produce cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. Puede tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio.

1.2 Formulación de pregunta

¿Los procesos de desinfección implementados garantizan el adecuado establecimiento de explantes y vainas (semilla) de *Vainilla spp.* provenientes de campo en medios de cultivo in vitro sólido y líquido suplementado con dos fitohormonas?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología de desinfección para la propagación in vitro de *Vanilla spp.*

1.3.2 Objetivos específicos

Determinar la eficiencia y eficacia de tres métodos de desinfección en explante y vaina (semilla) de vainilla recolectados en campo.

Comprobar el comportamiento de los explantes establecidos en dos medios de cultivo (sólido y líquido).

Identificar la presencia de hongos fitopatógenos en los explantes establecidos en dos medios de cultivos (sólido y líquido).

1.4 Justificación

En el departamento del Meta, se han incrementado los problemas ambientales, aumentando la pérdida de ecosistemas fundamentales que soportan la biodiversidad y los servicios ecosistémicos, ya sea de aprovisionamiento, regulación, cultura o de soporte (Balvanera, 2012). En la regulación ambiental, las epífitas, entre ellas las orquídeas, juegan un papel importante ya que son esenciales en la estructura y dinámica de la entomofauna asociada, jugando un papel relevante en la productividad de los bosques, captación de agua y ciclaje de nutrientes (Carrión et al., 2012), es por lo anterior, que las orquídeas representan un elevado valor ambiental que no se ha visto protegido, también estas son objeto de múltiples investigaciones que se han centrado en la descripción taxonómica y en los componentes biológicos, permitiendo identificarlas y clasificarlas para poder mostrar la diversidad de cada una de acuerdo a las zonas donde se establecen o existen mayores poblaciones por especie; además las orquídeas

realizan diversas asociaciones simbióticas a lo largo de su ciclo de vida con otros organismos, lo que contribuye directamente en la diversidad de flora y fauna presentes en diferentes áreas del país (Vinasco, 2011).

El instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y la Red Nacional de Jardines Botánicos de Colombia en el año 2013, desarrollaron la Agenda de investigación y monitoreo mediante su “Metodología para la priorización de especies en Colombia como un requerimiento para programas de conservación”, empleando criterios de conservación y de gestión para priorizar las especies en el taller de priorización de especies de plantas para la región de la Orinoquia, que se llevó a cabo en la ciudad de Villavicencio (Meta) en la Universidad de los Llanos, donde lograron consolidar un listado de especies (73 especies) priorizadas entre estas se encuentra la *Vanilla spp. phaeantha Rchb*, por la destrucción de su hábitat; este hecho evidencia que se deben implementar estrategias de preservación que permitan la conservación del germoplasma y que también sirva de proceso de reconversión social con algunas de las víctimas que ha dejado el conflicto armado (Rebeca, 2008).

La *Vanilla spp.* al encontrarse amenazada, requiere con urgencia establecer procedimientos que garanticen la preservación y conservación de su germoplasma, para de esta manera, protegerla de su posible extinción en la región de la Orinoquia.

Los procesos de desinfección son fundamentales para disminuir los riesgos asociados a la contaminación por patógenos que se pueden presentar durante los procesos de propagación convencional e in vitro, con el fin de garantizar material vegetal que cumplan con los requisitos fitosanitarios establecidos por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) durante la producción, distribución y comercialización del germoplasma. Es por esto que este proyecto de grado busca establecer un protocolo de desinfección que permita la multiplicación in vitro de *Vanilla spp.* Garantizando la inocuidad del material vegetal durante el proceso de micropropagación, a través de la implementación de una metodología de investigación mixta.

CAPÍTULO II

2 MARCO REFERENCIAL

La familia Orchidaceae comprende 20,000 especies de las cuales 7,000 se distribuyen en los trópicos. Dicha familia se considera la base del orden *Asparagales* (plantas monocotiledóneas), su aparición se estima de 76 a 119 millones de años, a partir de estudios moleculares de reloj biológico. La sistemática de la familia Orchidaceae es tan compleja que dentro del género *Vainilla* se reconocen diferentes cantidades en cuanto al número de especies: 110 especies (Rodríguez, 2012).

La mayoría de las orquídeas presenta una única antera fértil y mucho más raramente dos o tres, En la mayoría de los casos, el polen se encuentra aglutinado en unidades discretas llamadas polinias, El color, número, formato y textura de las polinias varía de acuerdo con el grupo taxonómico de orquídeas el gineceo consiste de tres lóbulos estigmáticos, siendo que parte del lóbulo estigmático mediano se torna no-receptiva, esta región no receptiva es llamada rostelo y puede secretar una sustancia pegajosa que auxilia en el proceso de polinización adhiriendo las polinias al polinizador. En otras orquídeas, parte del rostelo se convierte en una superficie destacable que, cuando es removida por los polinizadores, se lleva adheridas a las polinias (Singer, 2009).

Según Mancilla (1997) la vainilla es el único fruto comestible dentro de la familia de las orquidáceas, que son las fanerógamas más abundantes y antiguas del mundo. Actualmente, se sabe que existen más de 50 especies en el mundo. La clasificación taxonómica es la siguiente como se observa tabla 1:

Tabla 1. Taxonomía de *Vainilla* spp.

Orden	Orchidales
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae Lindley
Tribu	Vanilleae Blume
Subtribu	Vanilleae Lindley
Grupo	Acrotoneae-Polycondreae
Subgrupo	Vanillineae
Género	Vainilla Swartz
Especie	planifolia Andrews

Fuente: Mancilla (1997).

Según Damirón (2004):

Indica la morfología y fisiología de la planta de *vainilla* lo siguiente:

Esta planta pertenece a la familia de las Orquídeas, tribu de las ofrideas, cuyas especies habitan en regiones tropicales de América y Asia. Puede describirse brevemente como sigue: Planta herbácea trepadora, tallo cilíndrico poco ramificado, largo, flexible, succulento, verde; produce hojas opuestas alternas subsésiles, de forma oblonga-elíptica lanceolada, ápice agudo acuminado, de 10 a 20cm. De longitud, 4 a 8cm. de ancho y 1 a 2 mm. de espesor, de consistencia carnosa y superficie lustrosa cutinizada, principalmente en el haz. En los nudos, al lado opuesto de la hoja, desarrolla pares de raíces advertencias aéreas con las cuales se adhiere a los árboles u otros soportes. Las inflorescencias se producen en racimos axilares de diez a veinte flores colocadas en espiral. La flor está compuesta por tres sépalos, tres pétalos de color amarillo a verde

pálido y una columna central formada por el estambre y el pistilo soldados, envueltos por un pétalo modificado y alargado al que se le da el nombre de "labelo". Existe también una pieza floral denominada "rostelo" que se interpone entre los sacos de polen y el estigma limitando la polinización. El ovario es tricarpelar. El fruto es una cápsula o vaina carnosa, dehiscente, de sección transversal ligeramente triangular, de quince cm. de longitud, con semillas por millares muy pequeñas, de color oscuro casi negro, globosas con la testa sólida. Las raíces desarrollan sin brotes profundizar en el suelo extendiéndose superficialmente a varios metros de distancia.

Mientras que la Descripción botánica de la planta según Lorenzo (2011):

Raíces: es una planta enredadera con raíces aspiradoras que nacen de, existen dos tipos (subterráneas y adventicias).

Tallos: es una liana de tallo simple o ramificado, cilíndrico, verde

Carnoso, con entrenudos en zig-zag. Que se adhieren por medio de raíces

Adventicias a los troncos de los tutores.

Las hojas: se extienden por toda la planta, oblongas, de color verde oscuro y coriáceo, agudas en el ápice, de posición alterna, con una longitud de 5 a 25 centímetros por 2 a 5 centímetros de ancho, cóncavos o convexos, gruesas y carnosas, pues constituyen el órgano principal de almacenamiento de la planta.

Las flores: son hermafroditas, es decir que tienen tanto estigmas como estambres. No obstante, ambos órganos están separados por una membrana que hace imposible la auto fecundación. La inflorescencia sale de las axilas de la hoja; el eje corto y succulento, lleva de 4 a 20 flores carnosas, verduscas o amarillentas. Los botones florales van madurando en forma escalonada y abren de una a dos horas cada mañana, en la tarde mueren y al día siguiente abrirán otras nuevas.

El fruto: es una capsula carnosa, casi cilíndrica, mide de 15 a 20 centímetros de largo, es de color verde oscuro brillante, al madurar los frutos tornan amarillentos, comenzando por el ápice, se suavizan y tienden a abrirse en dos válvulas longitudinales. Si se deja en la planta, en la superficie de las vainas se forman gotas de bálsamo de vainilla.

2.1 Cultivo in vitro

En la década de los 80s los procedimientos de cultivo descritos no hacían referencia al control en el desarrollo de las plantas in vitro. Se ha conocido, a partir de diferentes evidencias, que el desarrollo de plantas in vitro; por ejemplo, sus crecimiento y características fisiológicas y morfológicas están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes (Cañal et al., 2001).

En esta línea, Pérez y Jiménez (2011) señalan que diferentes estrategias in vitro han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar el contenido de metabolitos secundarios en plantas e incluso han permitido la obtención de nuevos compuestos de gran interés en la industria farmacéutica, fundamentalmente.

Pero Según (castillo s.f), para los procesos de propagación in vitro el explante más frecuentado son las yemas vegetativas de plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladoras de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

El cultivo in vitro se trata de un sistema de propagación clonal, es decir, que mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado; Debido a que se realiza todo el proceso en un laboratorio bajo ambientes controlados, es un sistema totalmente independiente de las condiciones externas, por lo que no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales. El espacio que se requiere es mínimo, y el tiempo en que puede realizarse el proceso es relativamente corto. Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus y viroides (Domínguez et al., 2008)

Para (Lyndsey, 2008) las técnicas de in vitro involucran principalmente el uso de crecimiento lento y crioconservación en nitrógeno líquido para almacenar germoplasma, pero también hay aplicaciones importantes en otras áreas, incluida la recolección, multiplicación e intercambio de germoplasma. Las técnicas de crecimiento lento para el almacenamiento a medio plazo de cultivos están relativamente bien desarrolladas y es factible el establecimiento de un banco genético activo in vitro.

4.1.3 El cultivo de vainilla

El cultivo de *vainilla* según Mendoza et al. (2008), está asociado a sistemas agroforestales que integran árboles de soporte o forófitos que ayudan a mantener los ciclos biogeoquímicos naturales, preservan el paisaje, la biodiversidad local, la capacidad de regeneración de la selva. Desde el punto de vista ambiental, el rendimiento de vainilla está condicionado por la interacción entre la especie, y la cantidad y calidad de recursos ecológicos, hídricos, edáficos y luminosos que proporciona dicho agroecosistema.

El cultivo de vainilla a nivel mundial ha sido considerado de interés; de acuerdo con Herrera-Cabrera (2018), La *vainilla (Vanilla planifolia)* es uno de los cultivos tropicales originarios de México más importantes a nivel comercial, aunque en los últimos 25 años el volumen de producción y el rendimiento del cultivo han disminuido considerablemente; debido al bajo conocimiento sobre paquetes tecnológicos y a los conocimientos ancestrales es sobre los sistemas de producción y a la dificultad de acceder a más información que permita medir y establecer los rendimientos de producción a través de manejo agrícola tecnificado.

Según Barrera et al., (2009) realizaron la caracterización de los sistemas de producción de *Vanilla planifolia* A., bajo naranjo y en malla sombra (al 50% de luminosidad), a través de la identificación de las variables climáticas y técnicas que inciden en el rendimiento de las plantaciones de vainilla en la región del Totonacapan, Puebla, Veracruz. Los resultados señalan que en el rendimiento de la *vanilla spp.*, la característica de mayor incidencia es el número de flores polinizadas por maceta, por lo

que en *vanilla* les con un manejo adecuado deben de polinizarse de cinco a siete flores por maceta y en *vanilla* les donde el aspecto de las plantas no es vigoroso deben de polinizarse de tres a cuatro flores por maceta.

La producción de La *vainilla*, en México se propaga comercial y exclusivamente de forma asexual por medio de esquejes. Los esquejes son tramos de bejucos, que se obtienen de las propias plantaciones comerciales de los productores. Estos esquejes no deben tener daños o síntomas de enfermedades ni de plagas, para evitar, su proliferación futura en la plantación y deberían ser certificados libres de enfermedades virales. La vainilla se presta para cultivo orgánico siempre y cuando se practiquen los principios básicos de un buen cultivo (manejo cultural). (Elorza,2010). Muchas veces los productores por falta de conocimiento sobre el manejo adecuado del cultivo de vainilla descuidan sus huertas hasta el punto de perder por completo el cultivo (Basurto, et al. 2007).

4.1.4 Cultivo in vitro de vainilla

La vainilla ha sido considerada como un cultivo de especial cuidado y protección, por esto, se han venido adelantando técnicas de cultivo in vitro que permitan la conservación de esta planta debido a la afectación de su hábitat natural. Muchos trabajos se han realizado buscando optimizar su cultivo y usos. Menchaca et al., (2011), concuerdan en que el cultivo de la *vainilla* se lleva a cabo ampliamente por medio de propagación clonal, de manera asexual por cortes de tallos y la producción de frutos se realiza por autopolinización. Esta práctica inhibe la variación genética y la emergencia de nuevos individuos por recombinación sexual. Por lo anterior, se considera necesario realizar cruza por propagación sexual entre especies para obtener nuevos individuos con características deseables para el cultivo.

Asimismo, Bello et al. (2015), evaluaron el efecto de cuatro concentraciones (0, 10, 20 y 30 g L⁻¹) de dos agentes osmóticos: manitol y polietilenglicol (PEG), y cuatro

concentraciones (0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹) de dos inhibidores del crecimiento vegetal: ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PAC), sobre la supervivencia y crecimiento in vitro de plantas de vainilla planifolia. Los resultados de estos cultivos in vitro mostraron valores menores en las variables evaluadas de crecimiento, cuando fueron incrementadas las concentraciones de los agentes osmóticos e inhibidores en el medio de cultivo. Los tratamientos con PAC mantuvieron 100 % de supervivencia de los brotes.

Del mismo modo, Lozano et al. (2015), basándose en las metodologías de cultivo de yemas axilares y el uso de fitorreguladores que ayuden a aumentar el número de ejemplares buscaron identificar la idónea concentración de regulador del crecimiento en la cual se desarrollen mejor el número de brotes, por lo cual realizaron lo siguiente: se cultivaron in vitro, yemas axilares de *vainilla*. Estas fueron sometidas a diferentes tratamientos con reguladores del crecimiento, los cuales fueron N6-Bencilaminopurina (BAP), Kinetina (Kin), meta-Topolin (mT) y Thiadiazuron (TDZ). Se utilizó el medio de cultivo MS compuesto por sales inorgánicas y vitaminas del Murashige y Skoog, adicionado con glicina 2 mg L⁻¹, mioinositol 100 mg L⁻¹, 20 g L⁻¹ de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.2 con NaOH y/o HCl 1N previo a la adición de 5.1 g L⁻¹ de agar Powder Micropropagation Type II (Caisson Lab. Inc.). Se evaluaron las variables número de brotes por explante y altura de los brotes. Los explantes fueron subcultivados cada 30 días, dando a los 90 días un segundo tratamiento de BAP (2.22 µM), para estimular la diferenciación de brotes indefinidos. Obteniendo el mejor resultado en el tratamiento correspondiente a BAP 8.88 µM después de 120 días de cultivo, teniendo un promedio de 6.1 brotes por explante con una altura promedio de 5.59 cm por brote. La utilización de 8.88 µM de BAP fomenta tanto la formación de brotes adventicios como el desarrollo de estos.

Del mismo modo Barcia (2020) estudió seis dosis de BAP (0,50 ml/L, 1,00 ml/L, 1,50 ml/L, 1,75 ml/L, 2,00 ml/L y 2,50 ml/L) más un tratamiento testigo con cinco repeticiones, se usó el diseño completamente al azar, de acuerdo con los resultados se concluyó lo siguientes: 1) La dosis de 2,0 ml de BAP permitió la mejor micropropagación del cultivar de vainilla con 5 y 6 brotes a los 60 y 90 días después de la siembra; 2) La

mayor longitud de la raíz se presentó con la dosis de 1,75 ml con 7 cm de longitud; 3) En la variable altura de planta y número de hoja, la dosis de 2,0 ml presentó la mayor altura de planta con 18 cm y 6 cm a los 90 y 60 días de la siembra y el mayor número de hoja con 7 y 5 hojas a los 90 y 60 días de la siembra y 4) En el análisis económico de los tratamientos del ensayo, el mayor beneficio neto se produjo con el tratamiento 2 (BAP en dosis de 1,0 ml).

2.2 El cultivo de Vainilla en Colombia

En Colombia, se tienen registros de la presencia de poblaciones nativas de *V. planifolia* en los bosques de la región del Pacífico, Urabá, la costa Atlántica, los valles interandinos y la cuenca Amazónica; así como de cultivos comerciales en algunos municipios de la región de Urabá y el occidente antioqueño, en sistemas agroforestales y cobertizos de techo-sombra (Santa et al., 2012).

Por otro lado, para el caso colombiano, el cultivo de *vainilla* es altamente promisorio, pero se requiere mayor conocimiento de su manejo agronómico y de los microorganismos que crecen asociados a su rizosfera, de los cuales depende esta planta para su nutrición y crecimiento Álvarez et al., (2013). En la misma línea, Cardona et al (2012) señalan que el cultivo de *vainilla* (*Vanilla planifolia*) es una actividad agroindustrial promisoriosa, de alto valor agregado para el sector rural colombiano. Sin embargo, el nivel de conocimiento que se tiene sobre su manejo agronómico y en especial fitosanitario es muy incipiente.

En Colombia se realizó un estudio, donde Cardona et al., (2012), afirma que uno de los problemas que afecta los planes de expansión de este cultivo, es la pudrición basal del tallo. Para este caso, los autores plantean determinar el agente causal de esta enfermedad en plantaciones de vainilla bajo cobertizos de techo sombra en el occidente de Antioquia. A partir de tejido de tallo infectado se obtuvieron 20 aislamientos, cinco de los cuales fueron seleccionados para realizar pruebas de patogenicidad. Los resultados indicaron que el agente causal de la pudrición basal de las plantas de vainilla en Colombia corresponde al hongo *Fusarium oxysporum f. sp. vanillae*. Adicionalmente, se

identificaron los hongos *Phoma sp.*, *Lasiodiplodia sp.* y *Bionectria sp.*, siendo necesario en el futuro determinar si están asociados a alguna patología de este cultivo.

Según Carrillo (2005), Afirma que la federación nacional de cafeteros en Colombia cuenta con algunas características muy esenciales que las proyectan como principal de atención, gracias a su estructura, características de manejo y resultados obtenido; la federación nacional de cafeteros sería un excelente modelo para una futura agremiación de cultivadores de *vainilla*.

Según Gamboa (2014), en su estudio *Vainillas colombianas y su microbiota. II. Diversidad, cultivo y microorganismos endófitos* identifico las *vainilla* como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Principales especies de vainilla.

Especie	Distribucion / Referencia
<i>Vanilla calyculata</i>	Valle, 1200m; Soto-Arenas (2010)
<i>Vanilla columbiana</i>	Caquetá (Chiribiquete), Cauca, Chocó, Córdoba 50-600 m; Valle del Magdalena.
<i>Vanilla dressleri</i>	Soto-Arenas (2010)
<i>Vanilla espondeae</i>	Pacífico, valle del Magdalena.
<i>Vanilla grandiflora</i>	Amazonia colombiana, cerca a fronteras con Perú, Brasil y Venezuela.
<i>Vanilla helleri</i>	Molineros-Hurtado et al. (2011)
<i>Vanilla boismannii</i>	Soto-Arenas (2010)
<i>Vanilla inodora</i>	Cundinamarca 2000 m.
<i>Vanilla latifolia</i>	Meta, 460 m.
<i>Vanilla latisegmenta</i>	Vaupés; MBG (2010)
<i>Vanilla metbonica</i>	MBG (2010), Soto-Arenas (2010)
<i>Vanilla mexicana</i>	MBG (2010)
<i>Vanilla odorata</i>	Amazonas, Antioquia, Cauca, Risaralda, Valle 150-1025 m.
<i>Vanilla palmarum</i>	Vaupés, cerca a Mitú; MBG (2010)
<i>Vanilla penicillata</i>	Caquetá (Chiribiquete), 550 m.
<i>Vanilla planifolia</i>	Amazonas, Antioquia, Bolívar, Valle, Vichada, 10-1470 m.
<i>Vanilla pompona</i>	Sucre, 340 m; MBG (2010) Soto-Arenas (2010)
<i>Vanilla ribeiroi</i>	Soto-Arenas (2010)
<i>Vanilla spruce</i>	Amazonia colombiana.
<i>Vanilla trigonocarpa</i>	Soto-Arenas (2010)

Fuente: (Gamboa, 2014).

En este mismo estudio Gamboa (2014), recopila los principales microorganismos endófitos asociados a la *Vainilla* que representan hongos beneficios que puedan

beneficiar entre ellos mismos haciendo una simbióticos para hacer control biológico frente aquellos organismos patógenos como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Microorganismos asociados a la vainilla.

Microorganismo	Especie	Tejido	Rol en la literatura
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja sana, raíz	Patógeno
<i>Arthroglyphis</i> sp.	<i>Vanilla</i> sp.	Raíz	Dermafito
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Vanilla</i> sp.	Tallo	Endófito, saprófito
Bacteria (bacilo Gram -)	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja sana	
<i>Bissectria</i> sp.	<i>Vanilla odorata</i>	Hoja joven	Patógeno
<i>Biscogniauxia atropunctata</i>	<i>Vanilla</i> sp.	Hoja	Saprotrofo, epifito
<i>Colletotrichum boninense</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	Tallo	Patógeno
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja sana	Endófito, patógeno
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja enferma y hoja sana.	Endófito
	<i>Vanilla</i> sp.	Tallo	
<i>Cosmopora</i> sp.	<i>Vanilla</i> sp.	Epifito	
<i>Diaperle eucalyptorum</i>	<i>Vanilla</i> sp.	Tallo	Patógeno
<i>Fusicarium ocyperum</i> E. sp. <i>lati</i>	<i>Vanilla odorata</i>	Hoja sana	Patógeno
<i>Fusicarium ocyperum</i> E. sp. <i>melonis</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja sana	Patógeno
<i>Fusicarium sulavi</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja sana y raíz	Patógeno
	<i>Vanilla calyculata</i>	Fruto	
<i>Fusicarium</i> sp. (Probablemente <i>F. ocyperum</i> E. sp. <i>nautilus</i>)	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja enferma	Patógeno, endófito
<i>Fusicarium</i> sp.	<i>Vanilla odorata</i>	Hoja sana	
	<i>Vanilla</i> spp.	Tallo y raíz	Endófito
<i>Hypoxena rizens</i>	<i>Vanilla</i> sp.	Tallo	
<i>Lasiotrichia venezuelensis</i>	<i>Vanilla</i> sp.	Tallo	Patógeno, endófito
Micelios estériles (más de 40)	<i>Vanilla</i> spp.	Raíz, tallo y hoja	Endófitos
<i>Nyctotricum</i> sp.	<i>Vanilla calyculata</i>	Fruto	
<i>Penicillium</i> spp.	<i>Vanilla odorata</i>	Raíz	
	<i>Vanilla</i> spp.	Hoja sana y tallo	Endófito
	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja enferma	Endófito,
<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Vanilla calyculata</i>	Fruto	patógeno
	<i>Vanilla</i> sp.	Hoja sana	
<i>Pestalotiopsis theae</i>	<i>Vanilla</i> sp.	Hoja	
<i>Phialocephala</i> sp.	<i>Vanilla odorata</i>	Raíz	Endófito
	<i>Vanilla</i> sp.		
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Vanilla planifolia</i>	Raíz	Patógeno,
	<i>Vanilla</i> sp.		endófito
<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Vanilla</i> sp.	Raíz	Patógeno, endófito
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	Raíz	
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Vanilla odorata</i>	Tallo	Endófito
	<i>Vanilla</i> spp.	Hoja y raíz	
<i>Volutella</i> sp.	<i>Vanilla</i> sp.	Hoja	Patógeno
<i>Xylaria</i> spp.	<i>Vanilla planifolia</i>	Hoja enferma	Saprotrofo,
	<i>Vanilla</i> spp.	Raíz	endófito

Fuente: (Gamboa, 2014).

2.3 Antecedentes

Para el desarrollo de esta investigación es importante profundizar en los temas que se abordarán en el transcurso de esta, por ello, se plantean las posiciones de diversos autores frente a la *Vainilla*, generalidades de la especie y su historia, la

desinfección, los protocolos de desinfección con mayor eficacia, la evaluación de los tratamientos de desinfección, los efectos citotóxicos de algunos componentes y conceptualización básica sobre propagación in vitro.

Ana Abdelnour Esquivel y Jean Vincent Escalant, en su libro titulado “CONCEPTOS BASICOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES”, expone el concepto de cultivo de tejidos o propagación In vitro (del latín en vidrio) que abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama In vitro debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. (Abdelnour, & Escalant, 1994). Misterbino Borges García, Edil Estrada Abeal, Idelisa Pérez Rodríguez y Silvio Meneses Rodríguez, en su artículo titulado “Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño” definen el cultivo in vitro, como técnica que consiste en cultivar asépticamente una porción aislada de la planta bajo condiciones de ambiente controlado, para que las células expresen se potencial intrínseco e inducido.

Mitzzy Tiare Arenas Santos, en su tesis de grado titulada “Optimización de un medio de cultivo para la vitropropagación de *Vanilla planifolia* G. Jackson” La reproducción in vitro se utiliza de manera exitosa para la conservación ex situ de especies, así como la reproducción y mejoramiento genético de diversos cultivos. Sin embargo, los medios de cultivo utilizados varían según la especie o variedad usada. Con el objetivo de desarrollar un protocolo de desinfección de explantes y preparación de medio de cultivo MS para la vitropropagación de explantes provenientes de campo y de subcultivos de *Vanilla planifolia* G. Jackson, que resuelvan el problema de contaminación y oxidación de los explantes provenientes de campo.

Karla Susana González Luna, en su informe presentado a la Escuela de Biología de Costa Rica, titulado “Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal” relata el desarrollo de un estudio sobre la

respuesta de tres explantes de *vainilla* que, al ser cultivados en el sistema de inmersión temporal, tuvieron diversos procesos y resultados tales como que, después de 8 semanas de evaluación se obtuvo que los ápices de raíz sometidos a 4 inmersiones/día formaron callo con un área promedio de 5 mm². En cuanto al tiempo de brotación, las micro estacas reaccionaron más rápidamente que los ápices de tallo, presentándose brotación entre los primeros 15-28 días después de la siembra. Estos dos últimos explantes cultivados a 4 inmersiones/día desarrollaron el número promedio mayor de brotes por explante (2.1 y 2.2 respectivamente); pero la longitud promedio mayor (11.2 mm) se presentó en los brotes desarrollados a partir de las micro estacas sometidas a 2 inmersiones/día. El porcentaje de enraizamiento obtenido osciló entre 5% y 22.5%, la mejor respuesta se presentó en las micro estacas sin influencia de la frecuencia de inmersión. (González, 2003).

2.4 Marco teórico

2.4.1 Cultivo *in vitro* de orquídea y vainilla en Colombia

Castañeda et al. (2020), afirma que en Colombia la orquídea *Catleya quadricolor* una especie endémica, se encuentra categorizada en peligro de extinción, debido a actividades antrópicas, para esto se implementó estrategia ex situ, como el cultivo in vitro con el objetivo de contribuir a la conservación de *C. quadricolor* con fines de aprovechamiento económico para una comunidad en el corregimiento de Felidia, Cali. La germinación se observó entre los 30 y 45 días y la formación de hojas a los 90 días en el medio G1, el medio G2 no se observó germinación. A los 120 días, se extrajeron 30 brotes de 1 cm del medio G1, se individualizaron y sembraron 15 brotes por medio C1 y C2. Se evaluó el desarrollo y crecimiento de hojas y raíces en las plantas a los 150 días. El medio C2 obtuvo los mejores resultados, con una longitud promedio de plántula de 17mm, promedio de plántula de 4 a 5 hojas y 4 raíces de 16.6mm de longitud.

Mientras que en el jardín botánico de Bogotá José Celestino Mutis se realizó análisis para las condiciones nutritivas de la germinación asimbiótica y el crecimiento in vitro de cinco orquídeas silvestres nativas en las cuales fueron: *Epidendrum oxysepalum*,

Epidendrum chioneum, *Epidendrum nocturnum*, *Oncidium pyramidale* y *Cyrtorchilum revolutum*. El medio de cultivo basal estuvo compuesto por sales MS reducidas en un 50% enriquecido o no con suplementos orgánicos, auxinas y citoquininas. Al término de dos meses de evaluación, se determinó que el medio de cultivo MS reducido en un 50% en sus sales, mio-inositol, vitaminas, pulpa de banano, sacarosa, canela en polvo y agar fue el más indicado para semillas de, *E. chioneum*, *E. nocturnum*, *O. pyramidale* y *C. revolutum*, provenientes de cápsulas en estado de madurez fisiológica y no dehiscentes (cerradas). En semillas inmaduras de *E. oxysepalum* no se observaron procesos germinativos en ninguno de los dos medios de cultivo de germinación asimbiótica evaluados. El crecimiento in vitro, en términos de índice de incremento de longitud apical, evaluado durante tres meses para protocormos de *E. nocturnum* y *O. pyramidale*, fue favorecido por el empleo del medio de cultivo MS al 50% enriquecido (Martínez y Garzón, 2016)

Según Álvarez et al. (2013) evaluaron la actividad bioquímica in vitro con potencial biofertilizante en microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla. Realizaron confirmación fenotípica de la identidad taxonómica de los microorganismos más eficientes en las diferentes pruebas. Los solubilizadores de fosfato inorgánico más efectivos correspondieron a dos bacterias, una del género *Serratia* y la otra identificada como *Pseudomonas koreensis*. Entre los microorganismos solubilizadores de fosfato orgánico el más eficiente fue el hongo *Plectosphaerella cucumerina*. Los celulolíticos más efectivos fueron los hongos *Penicillium griseofulvum* y *Aspergillus fumigatus*; por su alta actividad proteolítica/amonificante se identificaron las bacterias del complejo *Bacillus cereus* y *Serratia sp.* Finalmente, entre las bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno tres cepas de *Pseudomonas koreensis*, crecieron rápida y abundantemente en el medio selectivo libre de nitrógeno. Para estas bacterias, mediante PCR específico se detectó, la presencia del gen *NifH* responsable de esta actividad metabólica. La diversidad funcional de los microorganismos encontrados abre la posibilidad de ser empleados como biofertilizantes en el cultivo de *vainilla*.

2.4.2 Hormonas de ácido indolacético

La hormona vegetal ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina en las plantas. El AIA controla diversos procesos fisiológicos como la elongación y división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y la gravedad.

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. Pero Carmona (2016) afirma que la auxina más predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares.

Dentro de las auxinas más conocidas a nivel vegetal se encuentra el ácido 3-indol-acético. Las giberelinas, también conocidas como ácidos giberélicos, tuvieron su primera aparición en años cercanos a la década de 1930, cuando algunos científicos analizaron por primera vez algunas fitopatologías relacionadas con el arroz. Dentro de esta investigación se pudo observar la asociación de un hongo que anteriormente era conocido como *Gibberella fujikuroi* como agente etiológico de la enfermedad “bakanae” en con (AIA) que es la principal auxina producida de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido indol-butírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalenacético (NAA). Alcántara et al. (2019).

2.4.3 Hormonas Giberelinas

Citado en (Deaquiz y Burgos, 2013), Las giberelinas (GAs) son hormonas que estimulan la síntesis de enzimas hidrolíticas de α -amilasa, en la capa de aleurona (Davies, 2004), activando la transcripción de los genes que codifican para dichas proteínas (Sponsel y Hedden 2004). Las amilasas degradan el almidón y los productos de la digestión almacenados en la aleurona y el endospermo almidonoso, que luego son movilizados al escutelo para iniciar el crecimiento de las plántulas (Azcón Bieto y Talón, 2000).

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

2.4.4 Deforestación

La deforestación, en lo que llevamos de siglo, ya ha puesto en riesgo la supervivencia de, al menos, 500 especies de mamíferos, aves anfibios y variedades de plantas. Los expertos han analizado los cambios ocurridos entre 2002 y 2012 en una masa forestal que sirve de hogar a más de 11.000 especies, Los resultados son realmente sorprendentes. Los porcentajes totales de especies en situación preocupante aumenta un 15% en el caso de las aves, un 25% en el caso de los mamíferos y un 33% en el caso de los anfibios y plantas exóticas en general un 17,3%, En total, y según los datos recabados, la deforestación de los últimos años habría afectado a entre 198 y 490 especies de anfibios, entre 215 y 253 aves y entre 51 y 131 mamíferos (Chaparro C, 2011).

Según Beltrán et al. (2019) expresa que la selva amazónica representa aproximadamente la mitad de las selvas tropicales restantes del planeta y comprende un ecosistema que desempeña un papel crucial en la regulación del clima de la Tierra. Cambios relativamente pequeños en la cubierta forestal y la productividad podrían tener implicaciones importantes para el ciclo del carbono, las circulaciones atmosféricas, el ciclo hidrológico y el clima. Sin embargo, los bosques y el clima de la Amazonía están siendo amenazados por las tendencias sinérgicas en las economías, que podrían llevar a la sustitución o la degradación severa de más de la mitad de los bosques densos de la cuenca del río Amazonas en 2030.

La deforestación es un problema que se viene presentando desde el siglo pasado, pero según Jean et al. (2016), En las últimas décadas el planeta ha sufrido un acelerado proceso de cambios de cubierta/uso del suelo, debido principalmente a la constante expansión urbana y el establecimiento de nuevas zonas agrícolas. Dicho fenómeno ha impactado de forma negativa la cubierta forestal mundial (deforestación). Las regiones del planeta que exhiben mayores tasas de deforestación son los trópicos (Centro y Sur América, Sur y Sureste de Asia y África).

2.4.5 Deforestación por agricultura y ganadería

En condiciones naturales los bosques húmedos tropicales no se queman debido a sus condiciones de humedad debajo del dosel, y porque los rayos por tormentas eléctricas son raros y ocasionales. En cambio, se sabe que la presencia más continua del fuego llegó de la mano del hombre, y que allá donde haya asentamientos, por agricultura, ganadería u otras actividades humanas, aumentan las conflagraciones. Varios estudios han documentado las prácticas agrícolas de tumba y quema de árboles, que en el pasado provocaron una importante deforestación a pequeña escala, pero causante de una gran pérdida de cobertura forestal. Más adelante la Amazonia se vio azotada por la deforestación a gran escala por la producción industrial de cultivos como soya y palma de aceite o africana (Absalón, 2013).

Un enfoque más detallado en la deforestación para la producción de soya según Altieri (2005), afirma que el área de tierra sojera ha crecido a una tasa anual del 3,2%, y la soya ocupa actualmente una superficie más grande que todo otro cultivo en Brasil, con el 21% del total de la tierra cultivada. Desde 1995 el área sembrada aumentó en 2,3 millones de hectáreas, a un promedio de 320.000 hectáreas por año.

Según Oswaldo et al. (2016). Afirma que, en la región tropical andina, actividades productivas ligadas a la alimentación humana y otras actividades antrópicas afectan notablemente a la permanencia de los ecosistemas nativos como páramos y bosques montanos En esta región históricamente se practica la agricultura y ganadería de

subsistencia o con fines comerciales En muchas áreas agrícolas la degradación de sus recursos complica el problema ambiental, especialmente los suelos por erosión y lixiviación de nutrientes

2.4.6 Deforestación en Colombia

Ocupa el tercer lugar en Sudamérica en cuanto a superficie de bosque después de Brasil y Perú, y es el 5º país en la región respecto a cobertura con bosque primario3 (8.5 millones de hectáreas) (Romero, 2014).

Sin embargo, en los últimos 20 años se ha perdido un gran número de hectáreas de bosques. En 1990 la cobertura boscosa en el país era de 64,442,269 hectáreas, es decir, el 56.5% del territorio nacional. Para 2010 la superficie de cobertura boscosa total había descendido a 59,021,810 hectáreas. De esta manera, en los últimos 20 años se perdieron 5.4 millones de hectáreas de bosque, un área del tamaño de Costa Rica. Las zonas más afectadas son el norte de los Andes, la Región Caribe y la Amazonía. La deforestación tiene impactos muy negativos sobre el país. Por un lado, exagera su riesgo natural. Colombia es el país más vulnerable de la región a eventos climáticos extremos. En 2010 fue el tercer país con más pérdidas asociadas a eventos climáticos La deforestación agrava la situación al aumentar la Bosques con alto grado de biodiversidad que nunca han sido explotados, fragmentados, o influenciados directa o indirectamente por el hombre. erosión y sedimentación de las cuencas y ríos. Por dar un ejemplo, 32% de la deforestación en la cuenca del Magdalena es originada por actividades humanas y el río arrastra anualmente 160 toneladas de sedimentos por kilómetro cuadrado. Esto lo convierte en la cuenca más deforestada de Sudamérica y la décima del mundo (IDEAM, 2013).

Por otra parte, otra consecuencia de la afectación en Colombia, según (Guilhermina, 2007), La deforestación está estrechamente relacionada con fenómenos socioeconómicos y su localización depende de variables geográficas, políticas y económicas. Entender adecuadamente estos fenómenos es indispensable para el diseño

de políticas e instrumentos que busquen atacar o contrarrestar la deforestación en el país. De acuerdo con los modelos económicos de deforestación, el costo de oportunidad de la tierra determina el uso que se le dará; se calculó que entre los años 2005 y 2015 en Colombia se habían perdido aproximadamente 1,5 millones de hectáreas de bosques que equivalen a más de 2,1 millones de campos de fútbol (González et al., 2018). En este periodo, la cobertura boscosa del país se redujo en 1,4 puntos porcentuales, y el Caribe y los Andes son las regiones que mayores pérdidas absolutas tuvieron. Por su parte, relativo a su área total, las regiones que más perdieron bosques durante este período fueron el Pacífico, la Amazonia y el Caribe.

Según Andrade (2020), se identificaron seis núcleos de alta deforestación, los cuales concentraron el 38 % de la deforestación del país: la Amazonia Norte fue la más afectada (23,1 %), seguida de los Andes Centro Norte (8,3 %), el Pacífico Centro (2,1 %), los Andes Sur (2 %), los Andes Norte (1,7 %) y el Pacífico Sur (1 %).

2.4.7 Deforestación en la Orinoquia

La nueva frontera: inversiones en ganado, arroz, palma de aceite, caña de azúcar están transformando las sabanas naturales y los morichales. La cuenca es además rica en petróleo, lo cual atrae una inmensa población flotante y tiene consecuencias ambientales. Deforestación: La Orinoquia tiene la segunda tasa de deforestación más alta del país. Según el Estudio Nacional de Agua, la región va a experimentar problemas hídricos por la pérdida de bosques y la desaparición de humedales. A pesar de su abundante biodiversidad y recursos hídricos, solo 4% de la Orinoquia es parte del Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Y de los 19 espacios con alta diversidad en la región, solo cuatro están en este sistema (Pérez, 2015).

Con el acuerdo de paz y su implementación se han visto transformaciones no deseables en la región Orinoquia, ya que se ha priorizado la demanda de recursos y de territorio, y el crecimiento económico sobre la sostenibilidad ambiental de la región. Una

de las amenazas latentes en este momento es el aumento desproporcionado de la deforestación (López et al., 2021).

2.4.8 Pérdida de orquídeas por tráfico ilegal

Colombia es la ubicación principal para orquídeas en el mundo, pero alrededor del 50 por ciento de las orquídeas nativas del país están amenazadas. Los cálculos estiman que la cantidad total de tráfico anual de orquídeas silvestres es de aproximadamente \$ 6 mil millones como mínimo. La desaparición de la orquídea amenaza la estabilidad de innumerables aspectos del bosque, incluida la pérdida de tipos específicos de avispas y abejas atraídas por una orquídea específica. Los esfuerzos de conservación de Colombia han sido duramente criticados por un experto que señala que incluso el Jardín Botánico de Bogotá no tiene una exposición permanente de orquídeas (Máximo, 2020)

Según Farías et al. (2016), afirma que actualmente en México y otros países de América Latina, existen amplias redes de tráfico ilegal de especies vegetales y la familia Orchidaceae se localiza entre las principales especies de flora con las que se trafica, solo superadas por las cactáceas. Esta actividad con la tala de árboles ha colocado a 189 especies de orquídeas mexicanas en alguna categoría de riesgo y a una especie, *Laelia gouldiana* extinta por completo de la naturaleza.

Según Blanco (2020) dice que alrededor de un total de 1503 especies serían objeto de comercio de acuerdo con los criterios de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. De estas especies un promedio de 600 son objeto de tráfico ilegal de especies. El tráfico de especies exóticas se da especialmente en departamentos como Cauca, Nariño y Chocó.

2.5 Legal

Tabla 4. Normatividad legal vigente.

<p>-Decreto - Ley 2811 de 1974.</p>	<p>“Por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente.”</p> <p>Como está explícito en el Título II “<i>de la flora silvestre</i>”, Capítulo II “<i>de la administración y del manejo</i>”.</p> <p>Artículo 201:</p> <ul style="list-style-type: none">- Para el manejo, uso, aprovechamiento y comercialización de la flora silvestre se ejercerán las siguientes funciones: a.- Reglamentar y vigilar la comercialización y aprovechamiento de especies e individuos de la flora silvestre y de sus productos primarios, de propiedad pública o privada, y la introducción o trasplante al territorio Nacional de individuos vegetales; b.- Conservar y preservar la renovación natural de la flora silvestre; c.- Realizar directamente el aprovechamiento del recurso, cuando razones de orden ecológico, económico o social lo justifiquen; d.- Crear y administrar zonas para promover el desarrollo
-------------------------------------	--

	<p>de especies.(Decreto 2811, 1974, art. 201)</p> <p>De modo que la presente investigación se fundamenta en el cumplimiento a cabalidad de lo expone el decreto.</p>
	<p>“Por medio de la cual se aprueba el Convenio sobre la Diversidad Biológica”</p> <p>En este convenio con uno de los países más biodiversos del mundo (Brasil) se busca preservar la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, mediante, entre otras cosas, un acceso</p>

<p>-Ley 165 de 1994.</p>	<p>adecuado a esos recursos y una transferencia apropiada de las tecnologías pertinentes, teniendo en cuenta todos los derechos sobre esos recursos y a esas tecnologías, así como mediante una financiación apropiada.(Ley 165, 1994, art.1)</p> <p>Es una realidad ineludible la necesidad de preservar efectivamente la biodiversidad presente en nuestro territorio, con esta ley, el reconocimiento, importancia e implementación de normas que regulan la preservación de especies, permite, además, el uso y divulgación correctos de la información de estas.</p>
--------------------------	---

<p>-Ley 299 de 1996 (Julio 26).</p>	<p>“Por la cual se protege la flora colombiana se reglamentan los jardines botánicos y se dictan otras disposiciones”.</p> <p>Artículo 1:</p> <p>La flora colombiana. La conservación, la protección, la propagación, la investigación, el conocimiento y el uso sostenible de los recursos de la flora colombiana son estratégicos para el país y constituyen prioridad dentro de la política ambiental. Son de interés público y beneficio social y tendrán prelación en la asignación de recursos en los planes y programas de desarrollo y en el presupuesto general de la Nación y en los presupuestos de las entidades territoriales y de las corporaciones autónomas regionales. (Ley 299, 1996, art. 1)</p>
	<p>“Por medio de la cual se establecen los requisitos para obtener el Registro del</p>

<p>-Resolución 63625 de 2020. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO</p>	<p>Lugar de Producción de flores o ramas cortadas de las especies ornamentales con destino a la exportación y para el registro de Exportador e Importador de flores o ramas cortadas de las especies ornamentales”.</p>
<p>-Resolución 078006 del 25 de noviembre del 2020</p>	<p>“Por medio de la cual se establece los requisitos para el registro de viveros y o huertos básicos dedicados a la producción y comercialización de material vegetal de propagación para la siembra en el país”.</p>

Fuente: los autores

CAPÍTULO III

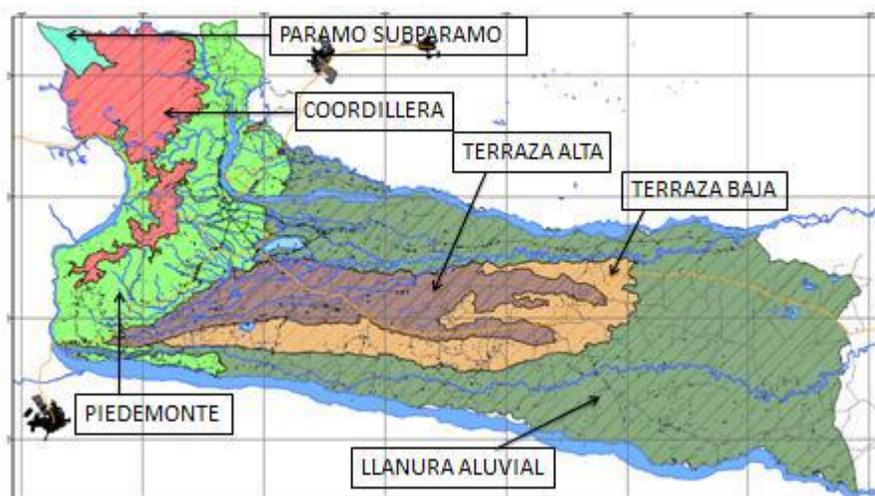
3 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 Ubicación localización de área de estudio

El Municipio de Villavicencio tiene una extensión de 130.084 ha conformadas por 5.454,98 ha de suelo urbano (4,19% del área total) y 124.629,88 ha de suelo rural (95,81%), este último incluye un área suburbana de 10.659,18 ha (8,19%), es decir que tan solo 113.970,70 ha (87,61%) son suelo netamente rural, de acuerdo con la clasificación del suelo definida y según el Plan de Ordenamiento Territorial (2015).

El suelo rural del Municipio de Villavicencio cuenta con una configuración fisiográfica que reúne las siguientes Unidades de Paisaje: páramo, subpáramo, cordillera, piedemonte, terraza alta, terraza baja y llanura aluvial (Chavarro, 2018), cómo se observa en la figura 1.

Figura 1. Mapa unidades de paisajes Villavicencio-Meta.



Fuente: cartografía base POT (2015) Norte.

Según Torres (2018) el paisaje de piedemonte del municipio de Villavicencio, se encuentra en una zona deposicional, correspondiente a una planicie ligeramente inclinada hacia el Oriente y Nororiente (CORPOICA, 2005), y una región montañosa hacia el Occidente y Noroccidente. El municipio se encuentra dividido en 8 comunas, 235 barrios (de los cuales solo 32 son legalizados), 101 asentamientos, 2 zonas de invasión, 7 corregimientos y 61 veredas en total (Villavicencio, 2015).

Geográficamente esta subregión se encuentra entre los 700 y 300 msnm, con temperaturas medias de 23 a 30 °C y un régimen de lluvias bimodal con 3.000 a 4.000 mm de precipitación anual donde se presentan estaciones de lluvia de abril a junio y de agosto a noviembre Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM).

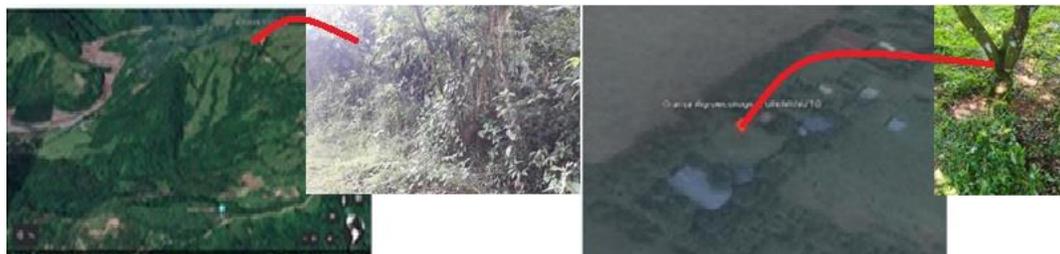
La cobertura vegetal en el piedemonte presenta actualmente pocas áreas de bosque y pasto nativo, por otro lado se observa un predominio de pastos introducidos del género *Brachiaria*, manejados en sistemas de producción intensivos (Rincón, 2010).

3.1.1 Zona de recolección de material vegetal

El material vegetal que se utilizó en el presente trabajo fue colectado en la finca corregimiento santa teresita vereda Lourdes latitud 4°14'43,4"N longitud 73°37'53,1"W, esta zona presentan estructuras de suelo con bosque fragmentado en pastos y cultivos, bosque denso alto y bosque fragmentado con vegetación secundaria, estas condiciones facilitan la presencia de manera natural de la especie *vanilla sp*; la segunda colecta fue realizada en la Granja Agroecológica Minuto De Dios latitud 4° 04' 07" N, longitud 73° 35' 05" W vereda Barcelona, como se muestra en la figura 2.

- Humedad relativa varían entre 76% a 85%.
- Temperatura 24.1°C en junio y 26.3°C en enero.

Figura 2. Primera recolección de material vegetal en la vereda Lourdes y segunda recolecta de raíces en la vereda Barcelona.



Fuente: Google earth (2020).

3.1.2 Ubicación Geográfica del área de estudio.

La investigación se realizó en los laboratorios de la Granja Agroecológica Minuto De Dios, del programa ingeniería Agroecológica Villavicencio-Meta; geográficamente situada latitud 4° 04' 07" N, longitud 73° 35' 05" W vereda Barcelona. En la figura 3 se muestra parte de la infraestructura.

Figura 3. Granja Agroecología Minuto de Dios.



Fuente: <https://m.facebook.com/IngenieriaAgroecologica/photos/a>.

3.1.3 Siembra de plantas madre.

La siembra de las 10 plantas madre se realizó en la Granja Agroecológica Minuto De Dios; como primera actividad se llevó a cabo la desinfección con hipoclorito de sodio disolución al 10% por el método aspersión foliar, adicionalmente se despuntaron los

esquejes para retirar las partes apicales dañadas; estas 10 plantas se establecieron en la zona del plato de los árboles de naranja valencia (figura 4 A), distribuyendo de manera uniforme 3 esquejes (figura 4 B), enterrando el esqueje hasta el primer entrenudo y amarrándolo al tallo con hilo de fibra natural, para garantizar que cuando se genere la simbiosis entre el esqueje y el árbol, dicho hilo se descomponga de manera natural sin generar ningún residuo contaminante, por último se aplicó EM en método aspersión (figura 4 C).

Figura 4. Esquejes de vainilla sembrados.



Fuente: Los autores.

3.1.4 Recolección de materia vegetal

Parte del material vegetal se colecto en la finca corregimiento Santa Teresita vereda (figura 5 A y B) y la otra parte en la Granja Agroecológica Minuto De Dios, extrayéndolo de las plantas madre establecidas en asociación con naranja valencia como se muestra en la figura 5 C).

Figura 5. Recolección de esquejes y raíces.



Fuente: Los autores.

3.1.5 Desinfección del laboratorio

Se inicio con la desinfección de los laboratorios para la asepsia de explantes, vainas (semillas) y para la preparación de medios de cultivos, la cual se llevó a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se realizó la limpieza con la aspersión de soluciones de tego al 10%, hipoclorito 70% y etanol 70%, para la aplicación de cada uno de estos desinfectantes se procedió a limpiar mesones y piso utilizando esponjillas y escoba para remover las impurezas y obtener una buena condición de asepsia, posteriormente la superficie se secó con toalla desechables de papel; este procedimiento se realizó por un periodo de tiempo de 90 minutos.

La cámara de flujo laminar se sometió a un procedimiento de limpieza que consistió en asperjar todas sus superficies con solución de alcohol al 70%, adicionalmente se encendió la luz U.V. por un periodo de tiempo de 60 minutos como se muestra en la figura 6.

Figura 6. Desinfección de los laboratorios.



Fuente: Los autores.

3.1.6 Desinfección de materia vegetal

Es importante que el proceso de inicio de la micropropagación se dé con una adecuada desinfección de las plantas donantes, las cuales se deben someter a una

aspersión superficial con solución desinfectante, con el fin de eliminar los microorganismos que pudieran competir con el crecimiento y desarrollo de explantes en condiciones in vitro, para poder así garantizar la inocuidad del proceso. (Debergh y Zimmerman, 1991).

Según Olmos et al., (2010):

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril.

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio.

3.1.6.1 Primer tratamiento de desinfección de esquejes

El primer tratamiento de desinfección se realizó sometiendo a inmersión las porciones de explantes provenientes de las plantas donantes durante 30 minutos consecutivamente, acompañados de 3 enjuagues con agua destilada, primero en solución de hipoclorito de sodio al 30% con agitación constantemente (figura 7 A) y jabón ecológico (ver anexo 1) al 30% (figura 7 B); esta actividad se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar donde se demuestra en la figura 7.

Figura 7. Primer tratamiento de desinfección donde se aplica hipoclorito en disolución al 30% y jabón ecológico 30%.

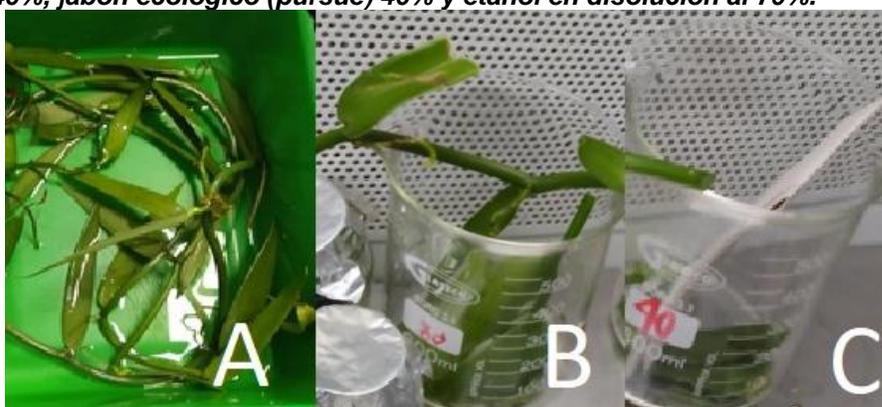


Fuente: Los autores.

3.1.7 Segundo tratamiento de desinfección de esquejes

El segundo tratamiento de desinfección se realizó sometiendo a inmersión las porciones de explantes provenientes de las plantas donantes durante 30 minutos consecutivamente, acompañados de 3 enjuagues con agua destilada, primero en solución de hipoclorito de sodio al 40% con agitación constantemente (figura 8 A) , luego en solución de jabón ecológico (ver anexo 1) al 30% (figura 8 B) y finalmente en solución de etanol al 70% (figura 8 C); esta actividad se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar como se observa en la figura 8.

Figura 8. Segundo tratamiento de desinfección donde se aplica hipoclorito en disolución al 40%, jabón ecológico (pursue) 40% y etanol en disolución al 70%.



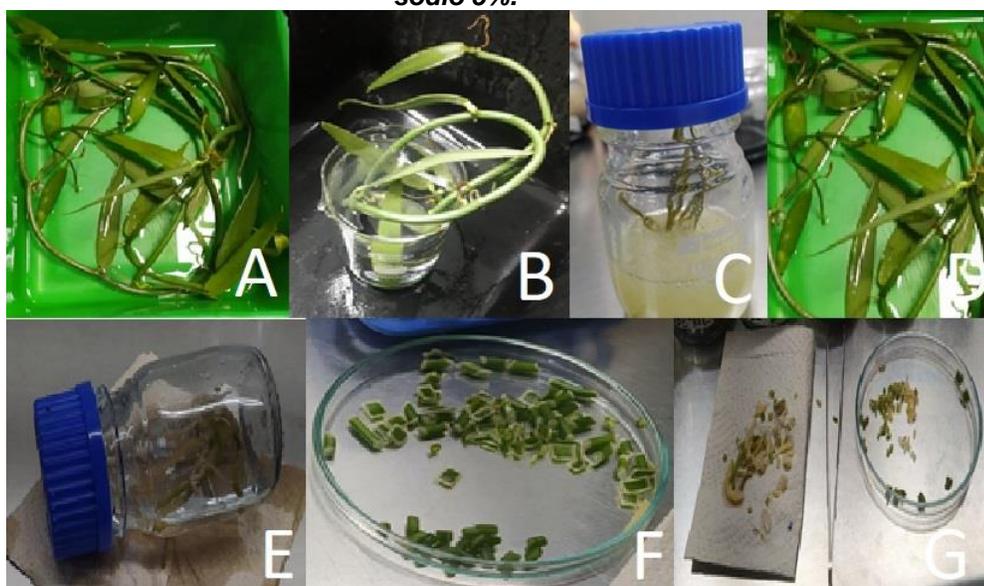
Fuente: Los autores.

3.1.8 Tercer tratamiento de desinfección de esplantes.

El tercer tratamiento de desinfección se realizó sometiendo a inmersión las porciones de los explantes provenientes de las plantas donantes durante 10 minutos consecutivamente, acompañados de 3 enjuagues con agua destilada, primero en solución de tigo 5% con agitación constante (figura 9 A), luego en solución de tween 20 (ver anexo 2) al 5% (figura 9 B), luego en solución de etanol al 70% (figura 9 C); posteriormente se adiciono al material vegetal peróxido de hidrogeno al 4% (figura 9 D) y se agito durante 30 segundos, se enjuago 3 veces con agua destilada, finalmente se adiciono hipoclorito de sodio al 5% durante 30 segundos (figura 9 E) y se enjuago 3 veces con agua destilada; esta actividad se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

Posteriormente, los explantes desinfectados se colocaron en caja Petri, donde se cortaron con ayuda de bisturí en fragmentos de entre 0.1 a 0.3 cm de longitud (figura 9 F), para luego dejarlos en secado durante 10 minutos (figura 9 G) y proceder a sembrarlos en recipientes de vidrio con dimensiones de 71.8 mm de diámetro en base y una altura de 79.4 mm los cuales tiene la capacidad de almacenar hasta 231 ml, previamente autoclavados; la actividad de corte y siembra se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

Figura 9. Tercer tratamiento de desinfección donde se aplicó tigo en disolución al 5%, tween 20 en disolución 5%, etanol disolución al 70%, peróxido de hidrogeno 4% e hipoclorito sodio 5%.



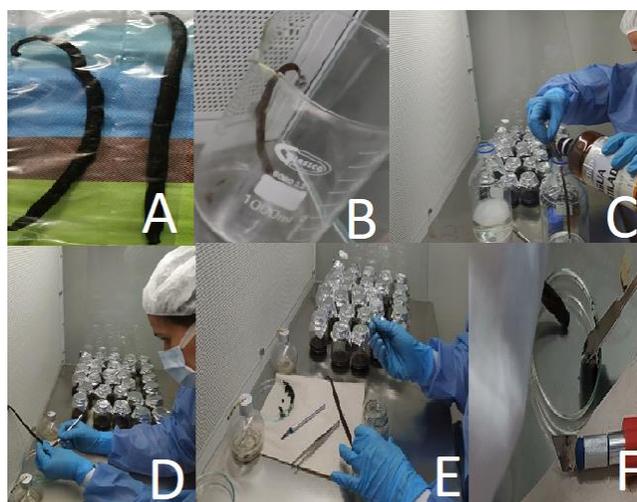
Fuente: Los autores.

3.1.9 Desinfección de semillas

3.1.9.1 Primer tratamiento de desinfección de vaina (semilla).

La desinfección se realizó sometiendo a inmersión la vaina (semilla) durante 30 minutos consecutivamente (figura 10 B), acompañados de 3 enjuagues con agua destilada (figura 10 C), primero en solución de hipoclorito de sodio al 30% con agitación constantemente y jabón ecológico (ver anexo 1) al 30%; esta actividad se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar como se observa en la figura 10.

Figura 10. Primer tratamiento de desinfección de vaina (semilla).



Fuente: Los autores.

3.1.10 Segundo tratamiento de desinfección de vaina (semilla).

Se realizó sometiendo a inmersión de vaina (semilla) durante 30 minutos consecutivamente, acompañados de 3 enjuagues con agua destilada, primero en solución de hipoclorito de sodio al 40% con agitación constantemente, luego en solución de jabón ecológico (ver anexo 1) al 30% y finalmente en solución de etanol al 70%; esta actividad se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

3.1.11 Tercer tratamiento de desinfección de vaina (semilla).

En este tratamiento se realizó sometiendo a inmersión de vaina (semilla) durante 10 minutos consecutivamente, acompañados de 3 enjuagues con agua destilada, primero en solución de tigo 5% con agitación constantemente, luego en solución de tween 20 (ver anexo 2) al 5%, luego en solución de etanol al 70%; posteriormente se adiciono al material vegetal peróxido de hidrogeno al 4% y se agito durante 30 segundos, se enjuago 3 veces con agua destilada, finalmente se adiciono hipoclorito de sodio al 5% durante 30 segundos y se enjuago 3 veces con agua destilada; esta actividad se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

Posteriormente, los explantes desinfectados se colocaron en caja Petri, donde se cortaron con ayuda de bisturí en fragmentos de entre 0.1 a 0.3 cm de longitud, para luego dejarlos en secado durante 10 minutos y proceder a sembrarlos en recipientes de vidrio con dimensiones de 71.8 mm de diámetro en base y una altura de 79.4 mm los cuales tiene la capacidad de almacenar hasta 231 ml, previamente autoclavados; la actividad de corte y siembra se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

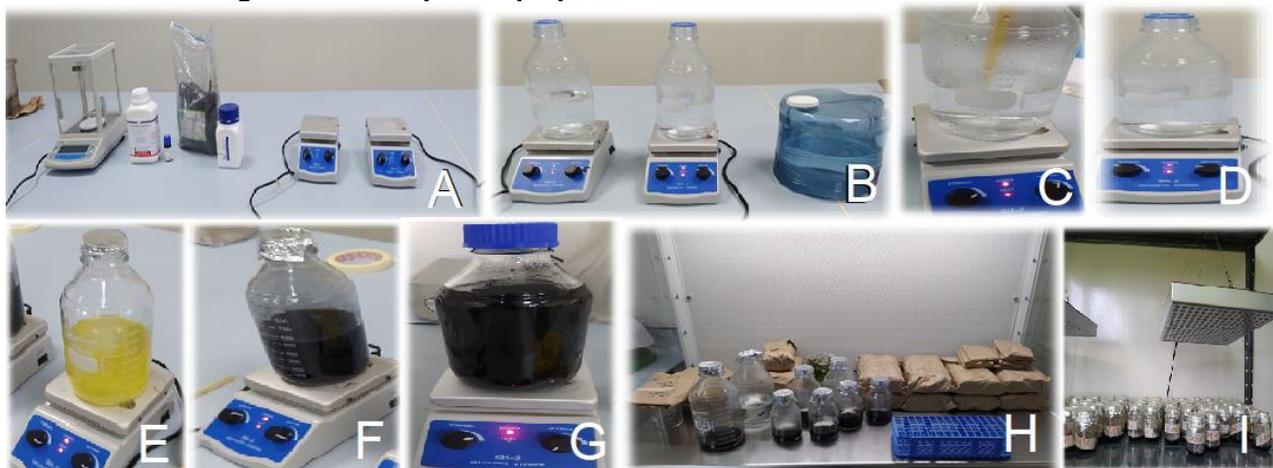
3.1.12 Preparación de medios de cultivos sólido y liquido

El medio de cultivo usado fue Murashige y Skoog suplementado con dos reguladores de crecimiento, acido indolacético y giberelina (figura 11 A). Para preparar un litro de solución madre, se toman dos recipientes de vidrio con tapa rosca azul 1.000 ml, se deposita 500 ml de agua destilada en cada uno (figura 11 B), cada uno de ellos se ubicó en placa calefactora con agitador magnético de laboratorio SH-2 llevándolos a una temperatura constante de 80°C (figura 11 C), para poder adicionar 7.5 gr/ml de agar (solo se adiciono a una solución madre) (figura 11 E), carbón activado 1.5 gr/ml (figura 11 F), sacarosa 15 gr/ml, formaldehido 0.05 gr/ml; dejando la mezcla en agitación durante 15 minutos con el objetivo de homogenizar la solución (figura 11 H), ya terminada la solución se colocó 3 minutos 3 veces en el autoclave y luego se coloca en placa

calefactora con agitador magnético de laboratorio SH-2 durante 3 minutos 3 veces; finalmente se medie el pH y se estandariza en un valor 5.5.

Se dividieron las soluciones madres en frascos de 250 ml para ser suplementadas con los reguladores de crecimiento ácido indolacético y giberelina en concentraciones equivalentes a 2, 12 y 25 mg, adicionalmente se establece un testigo sin adicionar de reguladores de crecimiento ; se procede luego a llevarlos a la cámara de flujo laminar para ser servidos 25 cc en recipientes de vidrio con dimensiones de 71.8 mm de diámetro en base y una altura de 79.4 mm y capacidad de 231 cc (figura 11 I), estableciendo 7 tratamientos con 10 repeticiones cada uno para un total de 70 muestras.

Figura 11. Pasos para la preparación de medios de cultivo.



Fuente: Los autores.

3.2 Tipo de investigación

A través de un diseño experimental multifactorial, se realizaron pruebas con tres tratamientos de desinfección de explantes y vainas (semillas) provenientes de campo para la micropropagación de la *Vainilla spp.*, para esto se trabajó una solución de Murashige & Skoog (MS), carbón activado, formaldehído, sacarosa y agar suplementada con ácido indol acético y giberelina. En proporción de 0, 2, 12 y 25 mg para cada uno.

Para un total de 42 tratamientos con 10 repeticiones, para el proceso de desinfección de explantes en solución madre sólida y líquida.

Para un total de 14 tratamientos con 10 repeticiones, para el proceso de desinfección de vainas (semilla) en solución madre sólida.

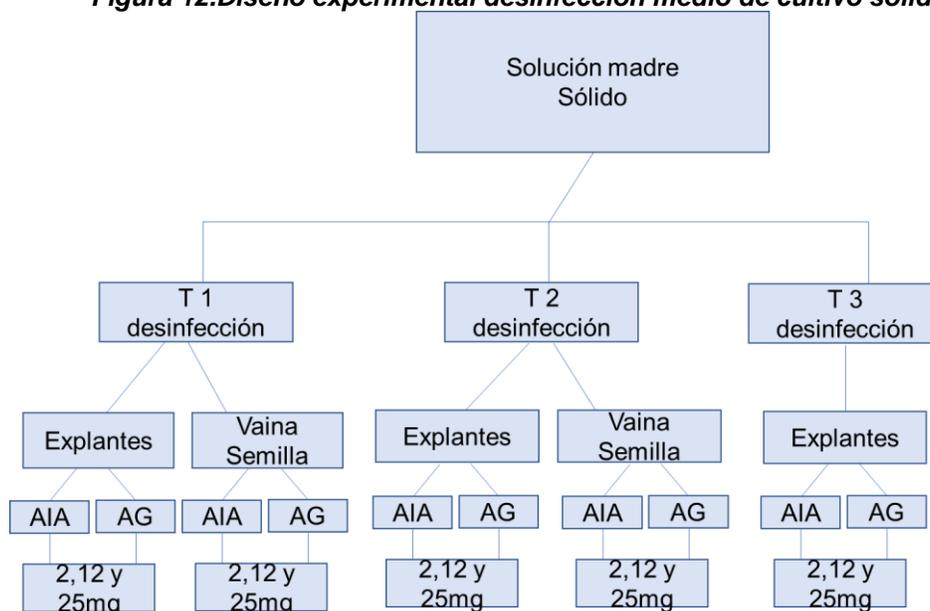
Las variables para evaluar para cada uno de los tratamientos son las siguientes:

- Numero de muestras contaminadas.
- Porcentaje de contaminación sólido (explantes y semilla).
- Porcentaje de contaminación líquido (explantes y semilla).

Las variables evaluables se someterán a un análisis de varianza (ANOVA) para probar si se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos planteados.

En la figura 12, se observa el diseño experimental planteado para los tres tratamientos de desinfección que son: T1 hipoclorito en disolución al 30% y jabón ecológico (pursue) 30%; T2 hipoclorito en disolución al 40%, jabón ecológico (pursue) 40% y etanol en disolución al 70% y T3 tego en disolución al 5%, tween 20 en disolución 5%, etanol 70%, peróxido de hidrogeno 3% e hipoclorito sodio 5%; evaluando la eficiencia en explantes y vaina (semilla), sembrados en solución madre sólida (Murashige & Skoog (MS), sacarosa, agar, carbón activado, formaldehido), suplementado con dos reguladores de crecimiento (AIA) ácido indolacético y (GEB) giberelina en concentraciones de 0, 2, 12 y 25 mg.

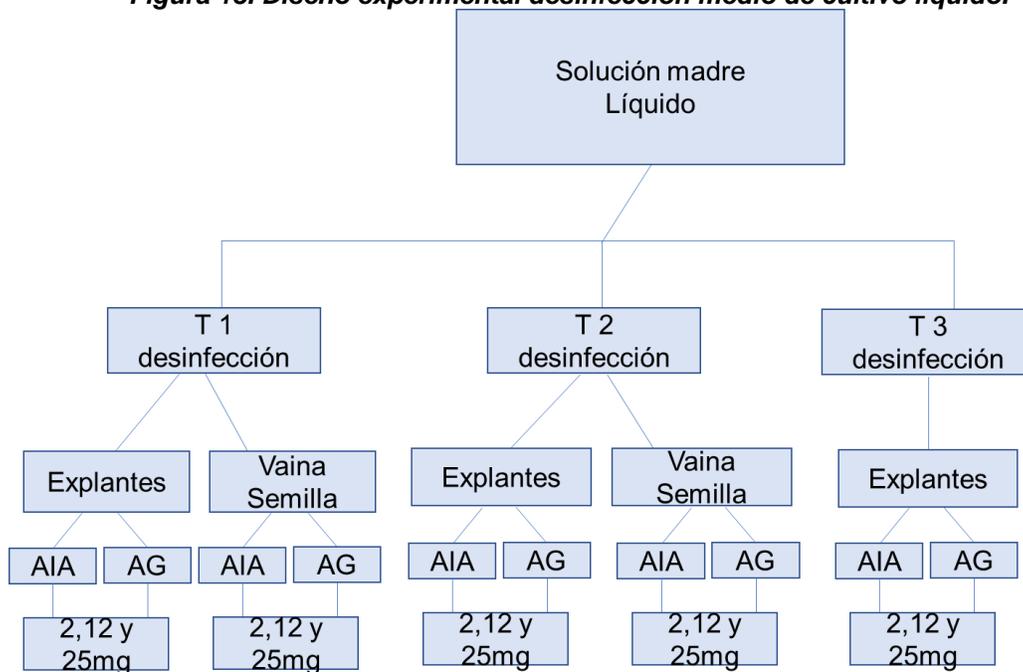
Figura 12. Diseño experimental desinfección medio de cultivo sólido.



Fuente: Los autores.

En la figura 13, se observa el diseño experimental planteado para los tres tratamientos de desinfección que son: T1 hipoclorito en disolución al 30% y jabón ecológico (pursue) 30%; T2 hipoclorito en disolución al 40%, jabón ecológico (pursue) 40% y etanol en disolución al 70% y T3 tego en disolución al 5%, tween 20 en disolución 5%, etanol 70%, peróxido de hidrogeno 3% e hipoclorito sodio 5%; evaluando la eficiencia en explantes, sembrados en solución madre líquida (Murashige & Skoog (MS), sacarosa, carbón activado, formaldehido), suplementado con dos reguladores de crecimiento (AIA) ácido indolacético y (GEB) giberelina en concentraciones de 0, 2, 12 y 25 mg.

Figura 13. Diseño experimental desinfección medio de cultivo líquido.



Fuente: Los autores

Como se muestra en las figuras 12 y 13, se tiene diferentes tratamientos y múltiples variables a evaluar permitiendo interacción entre ellas, las cuales se correlacionan a través de una ANOVA con un grado de confiabilidad del 95% para el análisis multifactorial categorico.

CAPÍTULO IV

4 ANALISIS DE RESULTADO

4.1 Resultados eficiencia y eficacia de tres métodos de desinfección en explantes y vaina (semilla) de vainilla recolectados en campo y de dos medios de cultivo (sólido y líquido).

La propagación in vitro de tejidos, está fundamentada en el proceso de realizar un cultivo aséptico en recipientes de vidrio transparente, esta técnica se basa en aprovechar las características únicas de las células vegetales y la capacidad de desdiferenciación y totipotencia bajo condiciones de asépticas y la presencia de soluciones nutritivas balanceadas que permitan el proceso de regeneración celular para obtener una nueva planta idéntica a la planta donante de tejidos. Para lograr el correcto desarrollo de este proceso se debe tener en cuenta que el explante (material vegetal de hojas, tallo, raíces o yemas), extraído de campo o de un cultivo de tejidos cuente con un excelente proceso de desinfección que garantice la inocuidad de estos y evite procesos de contaminación en los medios de cultivo y en los tejidos vegetales (Krikorian, 1993).

Los medios de cultivo (soluciones madre) y los promotores de crecimiento con los que se suplementan, y posteriormente donde se siembran los explantes, también son el medio ideal para la proliferación de microorganismos contaminantes o limitantes para el desarrollo de los tejidos vegetales o las semillas que se establecen para su remultiplicación in vitro, es por esto que los procesos de desinfección que garanticen la inocuidad superficial del material vegetal son fundamentales para el desarrollo en el medio de cultivo. Cada uno de los pasos para el establecimiento de los explantes debe contar con la correcta desinfección desde la preparación de los medios de cultivo, la desinfección de instrumentos, áreas de trabajo la restricción a estos sitios y el adecuado uso de la cámara de flujo laminar, así mismo la limpieza de la parte superficial del material vegetal (Szabados, 1993)

Hasta la fecha no se ha encontrado una metodología exacta de desinfección para cada familia de plantas o en específico para cada especie, siendo este uno de los procesos que para algunos casos, presentan mayor dificultad debido a que no se pueden generalizar los procesos de desinfección, evidenciando la importancia de experimentar con diferentes procesos, debido a que soluciones en concentraciones muy bajas o diluidas no presentan efectividad controlando los microorganismos, mientras concentraciones muy elevadas o sin disolución queman los explantes.

Para dar cumplimiento al primer objetivo específico se evaluaron tres tratamientos de desinfección para explantes y vainas (semillas) de *vanilla spp.* provenientes de campo, con el fin de establecer el protocolo de desinfección más adecuado para la propagación in vitro.

Para cumplir el segundo objetivo específico se evaluaron dos medios de cultivo, el primero sólido y el segundo líquido, cada uno de ellos en interacción con los tres tratamientos de desinfección sugeridos en el cumplimiento del primer objetivo.

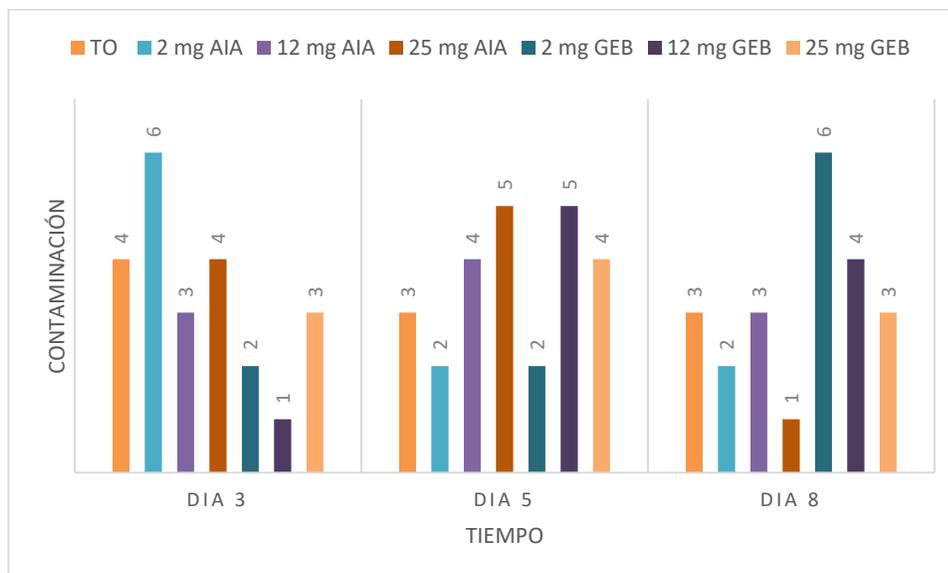
4.1.1 Primer tratamiento de desinfección.

En el primer tratamiento de desinfección de explantes y vaina (semilla) se utilizó primero solución de hipoclorito de sodio al 30% con agitación constantemente y luego jabón ecológico al 30%.

4.1.1.1 Primer tratamiento de desinfección explante en medio de cultivo sólido

En la implementación de este tratamiento de desinfección, se identificó un acelerado proceso de contaminación de los explantes sembrados en todos los tratamientos evaluados, sin mostrar una diferencia significativa entre ellos, manifestando el 100% de contaminación de las muestras al octavo día, como se evidencia en la gráfica 1.

Gráfica 1. Resultado de contaminación del primer tratamiento de desinfección explante en medio de cultivo sólido.



Fuente: Los autores.

Figura 14. Explante contaminado con micelio al octavo día.



Fuente: Los autores.

En la Figura 14, se evidencia presencia de microorganismo tipo hongo en los explantes, sin embargo, no se presentó oxidación ni muerte de los mismos; el micelio del

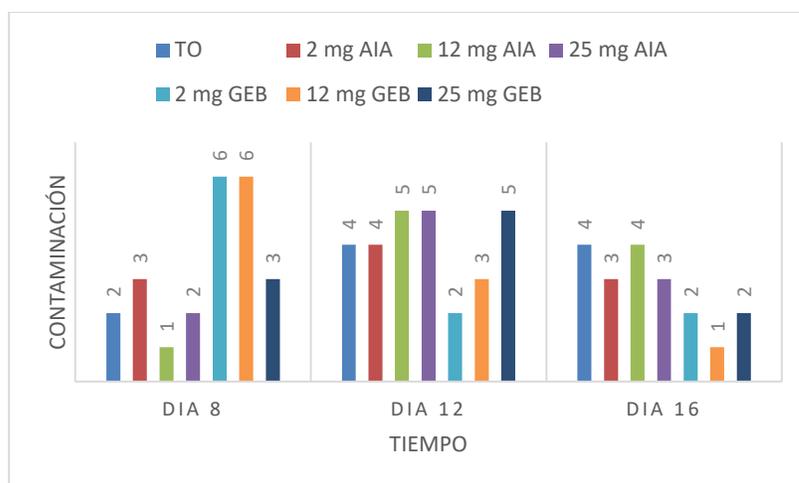
hongo se diseminó de manera acelerada en cada uno de los tratamientos e interacciones evaluadas.

Esto concuerda con (Olmos et al., 2010) donde esta teoría confirma que este primer tratamiento la planta madre fue un material vegetal adulta, donde fue difícil de regenerar.

4.1.1.2 Primer tratamiento de desinfección para explantes en medio de cultivo líquido.

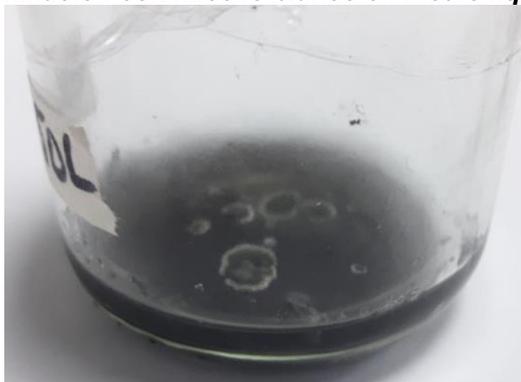
En este tratamiento al medio de cultivo no se le adiciona agar, sin embargo, los explantes evidenciaron un proceso de contaminación progresiva sin mostrar una diferencia significativa entre ellos, presentando al día 16 la presencia de hongos en el 100% de las muestras, como se observa en la gráfica 2.

Gráfica 2. Resultado de contaminación del primer tratamiento de desinfección de explantes en medio de cultivo líquido.



Fuente: Los autores

Figura 15. Contaminación con micelio blanco en medio líquido a los 12 días.



Fuente: Los autores.

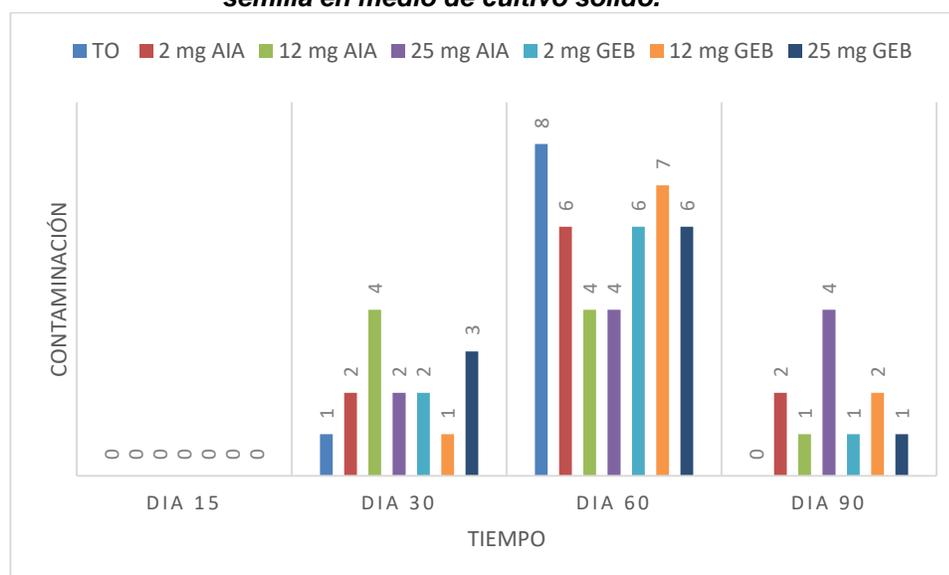
En la figura 15, se observa presencia de microorganismos tipo hongos en los explantes, sin presentar muerte; el micelio de color blanco verdoso del hongo se diseminó de manera acelerada en cada uno de los tratamientos evaluados, mostrando una totalidad de muestras contaminadas del 100%, pasado 16 días de la siembra.

Según García et al, (2009), Se afirma que se pudo producir micelio en este protocolo, por la falta de luz y temperatura, estos son los factores que nos está afectando en el brote de los explantes.

4.1.1.3 Primer tratamiento desinfección para vaina (semilla) en medio de cultivo sólido.

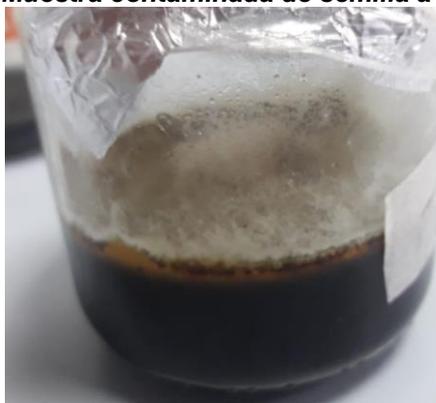
En la implementación de este tratamiento de desinfección se pudo identificar que ninguno de los explantes sembrados se contaminó durante los primeros 15 días, sin embargo en el periodo comprendido entre los 15 días posteriores y hasta el día 60 el proceso de contaminación se aceleró, sin mostrar diferencias significativas en los tratamientos y concentraciones de los reguladores de crecimiento suplementados, hasta manifestar el 95.8% de contaminación de todas las muestras el día 30, sobreviviendo un tratamiento testigo, un tratamiento suplementado con 12mg de AIA y un tratamiento suplementado con 2mg con GEB.

Gráfica 3. Resultado de contaminación del primer tratamiento de desinfección para vaina semilla en medio de cultivo sólido.



Fuente: Los autores.

Figura 16. Muestra contaminada de semilla a los 60 días.



Fuente: Los autores.

En la Figura 13, se evidencia presencia de macroorganismo tipo hongo que cubre la semilla y se encuentra diseminado en toda la superficie del medio de cultivo.

En este protocolo según López M (2018). Se afirma que el momento ideal para sembrar las semillas es cuando las cápsulas empiezan a madurar y antes de que muestren grietas en la corteza exterior, por tal motivo la semilla se encuentra en un proceso lento en germinar.

Según Azofeifa Bolaños, Rivera Coto, Paniagua Vásquez, Cordero Solórzano, Salas Alvarado (2019) en el documento titulado “Desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogénico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews” para seleccionar los desinfectantes en el establecimiento in vitro, realizaron un experimento donde evaluaron dos condiciones. La primera en campo (invernadero) donde desinfectaban la superficie externa de los segmentos nodales (nudos) y los entrenudos de las plantas de vainilla, con fibras de algodón absorbente estéril, con dos productos: solución de alcohol 70%, kilol (2,5 ml/l) y agua como testigo; y en laboratorio, la desinfección trabajada fue con: hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,35% y con cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,20%. En este estudio se presentó contaminación por microorganismos tipo hongo y bacterias (patógenos) que no fueron controlados con los procesos de desinfección implementados; aunque el proceso de desinfección que implementaron es diferente al de este estudio, se evidencia que las diferencias técnicas implementadas para controlar la aparición de patógenos que afecten el desarrollo de los explantes presentan efectividad para controlar algunos patógenos comunes pero no todos los que puedan estar presentes en el material vegetal.

Es importante resaltar que a diferencia del estudio mencionado anteriormente, en esta investigación se obtuvieron las partes vegetales directamente de campo y se realizó solamente el proceso de desinfección en laboratorio, por lo cual se pudo presentar una mayor incidencia de contaminación de explantes en el proceso de propagación in vitro.

Los métodos de desinfección buscan eliminar los microorganismos (patógenos) causando un mínimo daño a las estructuras vegetales que no generen afectación en sus procesos de regeneración. Existen diferentes compuestos que son usados y/o recomendados para garantizar la asepsia, entre los que más se utilizan está reportado

el hipoclorito de sodio (cloro comercial al 2% o al 5%) esto se pueden explicar porque el hipoclorito de sodio contribuye a la desinfección de los explantes ya que el mecanismo de acción del compuesto permite el daño de la membrana celular de las bacterias, originando la lisis del microorganismo (Sánchez y Sáenz, 2005) citado por (Ramírez et al., 2014). Con el uso de este compuesto también es importante destacar la acción de acuerdo con la concentración y los tiempos de exposición al producto.

El hipoclorito de sodio (NaClO), es un compuesto químico ampliamente utilizado por sus propiedades desinfectantes. Es un compuesto altamente tóxico por lo cual se vende en concentraciones relativamente bajas a nivel comercial (0,5 a 5,25%) debido a los efectos tisulares que podría causar cuando no se manipula correctamente (Juárez y Lucas., 2001) citado por (Causil et al., 2017) esto afecta el tejido generando necrosis o procesos oxidativos acelerados que conllevan a la pérdida del material vegetal.

En la investigación “Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*” los autores (García et al., 2015), observaron que los porcentajes más altos de contaminación se alcanzaron cuando el agente desinfectante fue el NaClO; con pérdidas, en la mayoría de los casos, de hasta del 100% de las muestras, principalmente por la aparición de hongos. Lo que confirma la hipótesis que cuando se trabaja con material extraído directamente de campo, se aumenta el riesgo de contaminación convirtiéndose en uno de los principales factores que afecta el establecimiento de los explantes (Abdelnour et al., 2011) citado por (García, 2014).

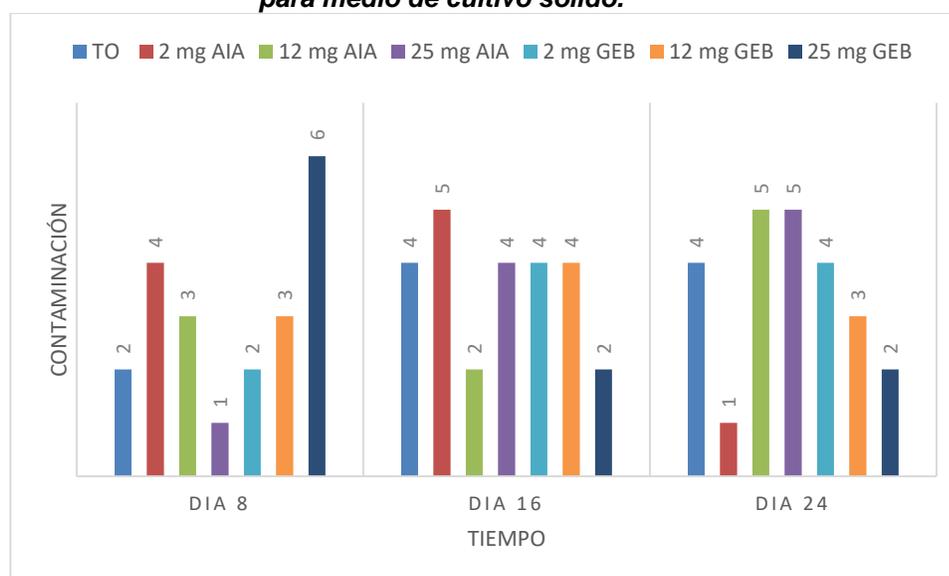
4.1.2 Segundo tratamiento de desinfección.

En el segundo tratamiento de desinfección de explantes y vaina (semilla), se utilizo primero solución de hipoclorito de sodio al 40% con agitación constantemente, luego solución de jabón ecológico al 30% y finalmente solución de etanol al 70%.

4.1.2.1 Segundo tratamiento de desinfección para explantes *en medio de cultivo sólido*.

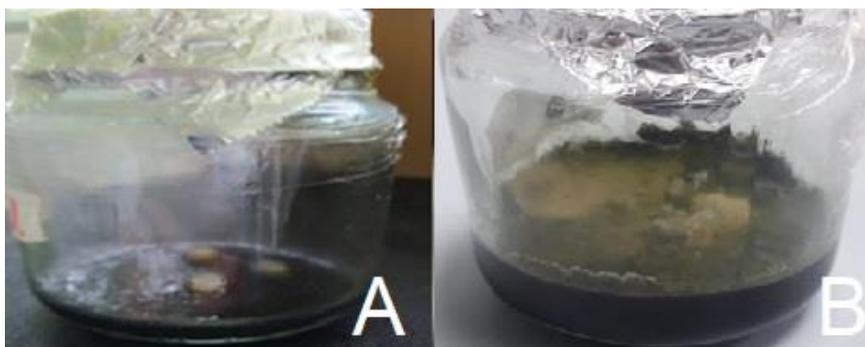
En la implementación de este tratamiento de desinfección, se identificó un acelerado proceso de contaminación de los explantes sembrados en todos los tratamientos evaluados, sin mostrar una diferencia significativa entre ellos, manifestando el 100% de contaminación de las muestras al día 24, como se evidencia en la gráfica 4.

Gráfica 4. Resultado de contaminación del segundo tratamiento de desinfección explante para medio de cultivo sólido.



Fuente: Los autores.

Figura 17. Explante sin contaminación día de siembra (A) y explante contaminado (B) día 24.



Fuente: Los autores.

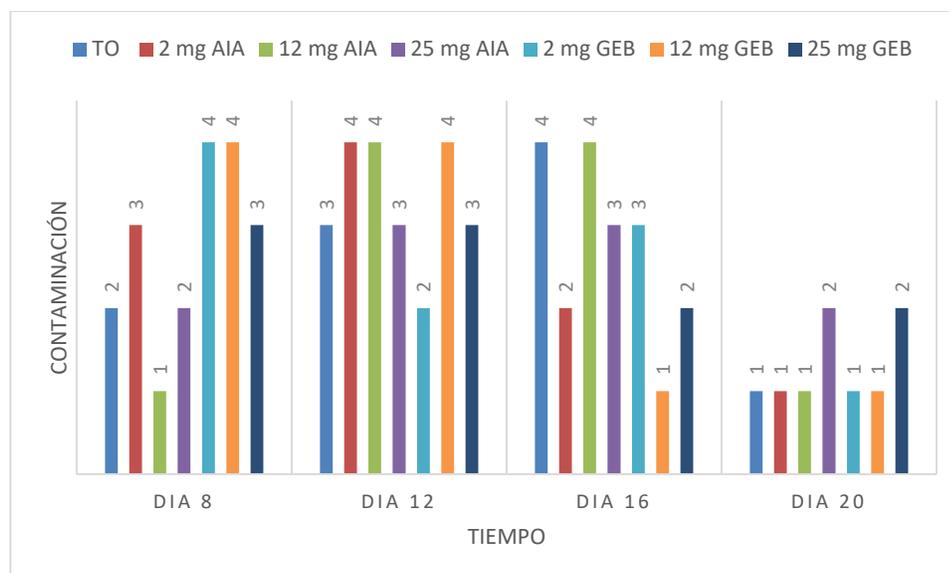
En la Figura 17, se observa a la izquierda (A), explantes sin contaminación el día de la siembra y a la derecha (B) se evidencia presencia de microorganismo tipo hongo en los explantes el día 24, sin embargo no se presentó oxidación ni muerte de los mismos; el micelio del hongo se diseminó de manera acelerada en cada uno de los tratamientos e interacciones evaluadas.

Los primeros intentos por establecer explantes in vitro se observó una alta contaminación por hongos y bacterias según (Salavarreria y Cuevas, 2004) afirma que estos patógenos son introducidos durante la manipulación del tejido en campo.

4.1.2.2 Segundo tratamiento de desinfección para explantes en medio de cultivo líquido.

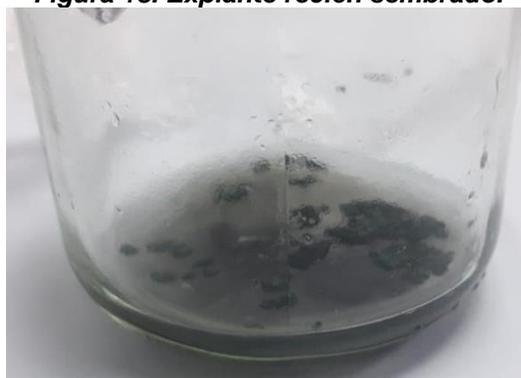
En la implementación de este tratamiento de desinfección, se identificó un acelerado proceso de contaminación de los explantes sembrados en todos los tratamientos evaluados, desde la primera semana sin mostrar una diferencia significativa entre ellos, manifestando el 100% de contaminación de las muestras al día 20, como se evidencia en la gráfica 5.

Gráfica 5. Resultado de contaminación del segundo tratamiento de desinfección explante en medio de cultivo líquido.



Fuente: Los autores.

Figura 18. Explante recién sembrado.



Fuente: Los autores.

En la Figura 18, Se evidencia presencia de microorganismo tipo hongo en los explantes; el micelio de color verde del hongo se disemino de manera acelerada en cada uno de los tratamientos e interacciones evaluadas, mostrando en el total de las muestras contaminación, transcurridos 20 días después de la siembra.

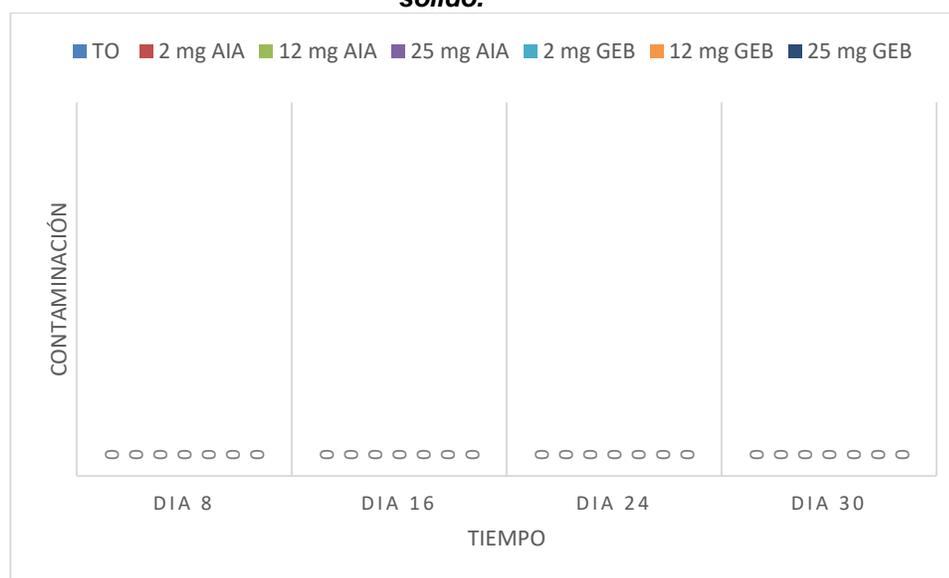
Los cultivos in vitros al realizar una desinfección leve con productos asépticos, generan un alto índice de contaminación microbiana patógeno, bien sea por inoculación del ambiente o por los malos usos entro del laboratorio (Salavarreria y Cuevas, 2004).

Esto nos afirma que la contaminación por hongo es presentada por la falta aséptica de los explantes.

4.1.2.3 Segundo tratamiento de desinfección para vaina (semilla) en medio de cultivo sólido.

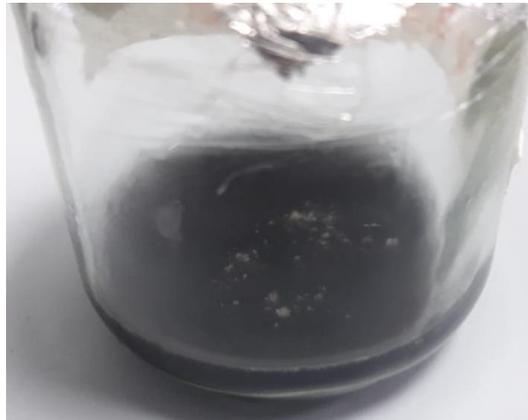
En la implementación de este tratamiento de desinfección se pudo identificar que ninguno de los tratamientos evaluados se contaminó en el transcurso de 30 días de seguimiento.

Gráfica 6. Resultado de contaminación del segundo tratamiento de desinfección en medio sólido.



Fuente: Los autores.

Figura 19. Muestra de siembra sin contaminación.



Fuente: Los autores.

Figura 16, se observa la muestra sin presencia de contaminación día 90, por esta razón se puede determinar que el tratamiento de desinfección fue efectivo sin importar la interacción que se presentó con las diferentes concentraciones de los dos reguladores de crecimientos suplementado.

Por lo anteriormente expuesto no se continuo con la evaluación de otros métodos alternativos de desinfección para vainas (semilla) en medio sólido.

Dentro de las técnicas que más se emplean para el control de la contaminación microbiana en cultivo de tejidos vegetales está la de inmersión de los explantes en etanol, seguido de una inmersión en NaClO de 1 a 3 % (Mroginski et al., 2010) citado por (Pequeño et al., 2015). Sin embargo, este procedimiento que puede ocasionar daño a los tejidos vegetales. Por otro lado, en numerosas plantas, principalmente en especies leñosas, los explantes liberan fenoles dentro del medio de cultivo que se oxidan desarrollándose una tonalidad oscura o marrón en los tejidos y perjudicando su crecimiento en el cultivo in vitro (De Filippis, 2014) citado por (Pequeño, 2015).

En Costa Rica los protocolos de desinfección clásicos que utilizan diversas concentraciones de hipoclorito de calcio $[Ca(ClO)_2]$, NaClO, alcohol y otros, no han logrado la asepsia adecuada para el establecimiento in vitro de vainilla (Araya et al., 2014), lo cual implica una pérdida constante de material genético promisorio que

compromete la supervivencia de las plantas, muchas de las cuales son escasas y únicas. (Azofeira et al., 2019)

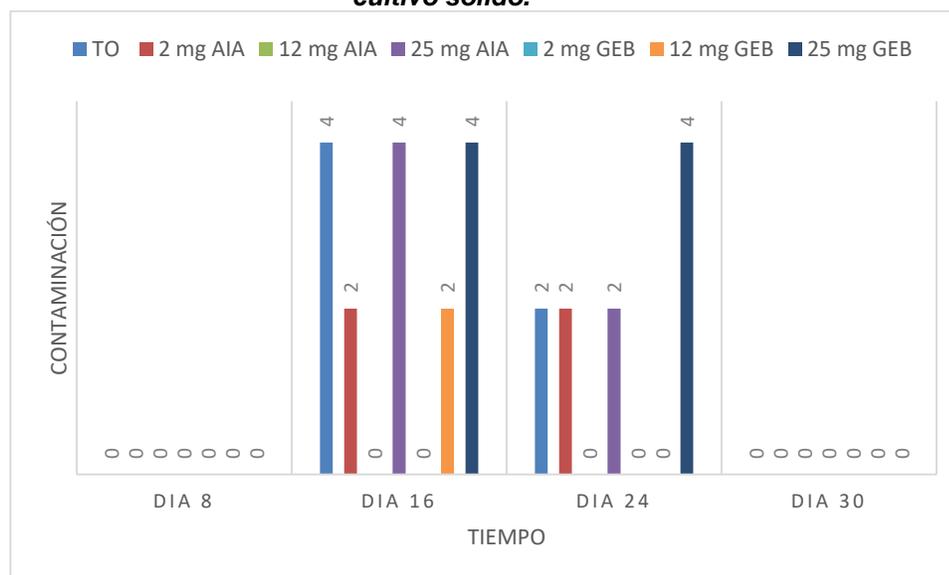
4.1.3 Tercer tratamiento de desinfección.

En el tercer tratamiento de desinfección de explantes, se utilizó primero solución de teogo al 5% con agitación constantemente, luego solución de tween 20 al 5%, posteriormente solución de etanol al 70%, adicionalmente se sumergieron en peróxido de hidrogeno al 4% y finalmente en hipoclorito de sodio al 5%.

4.1.3.1 Tercer tratamiento de desinfección para explantes *en medio de cultivo sólido.*

En la implementación de este tratamiento de desinfección se pudo identificar que ninguno de los explantes sembrados se contaminó durante los primeros 8 días, sin embargo en el periodo comprendido entre los 9 hasta los 24 días se contaminaron 6 muestras del testigo sin suplemento de reguladores de crecimiento, 4 muestras suplementadas con 2 mg de AIA, 6 muestras suplementadas con 25 mg de AIA, 2 muestras suplementadas con 12 mg de GEB y 8 muestras suplementadas con 25 mg de GEB; las muestras suplementadas con 12 mg de AIA y 2 mg de GEB no presentaron ninguna contaminación durante los primeros 30 días, por lo tanto se podría deducir que la interacción entre el tercer método de desinfección en medio de cultivo sólido suplementado con AIA o GEB en las dos concentraciones mencionadas anteriormente, mostraron ser eficientes para evitar la contaminación de los explantes, según lo evidenciado en la gráfica 7.

Gráfica 7. Resultado de contaminación del tercer tratamiento de desinfección en medio de cultivo sólido.



Fuente: Los autores.

Figura 20. Muestra suplementada con 12 mg AIA 30 días después de sembrada.



Fuente: Los autores.

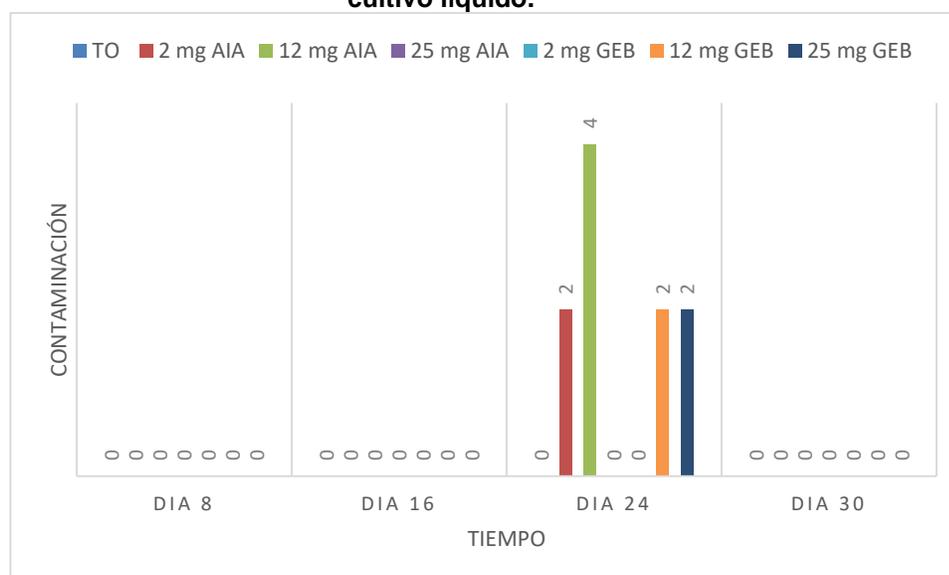
Figura 20, se observa explante de 30 días que fue sometido al tercer proceso de desinfección y posteriormente sembrado en medio de cultivo sólido suplementado con 12 mg de AIA.

Según Abdelnour y Vincent (1994), el tween 20 es importante en la aplicación para la desinfección de explantes porque rompe la tensión superficial y permite que el explante este en mejor contacto con el químico.

4.1.3.2 Tercero tratamiento de desinfección para explantes de medio de cultivo líquido.

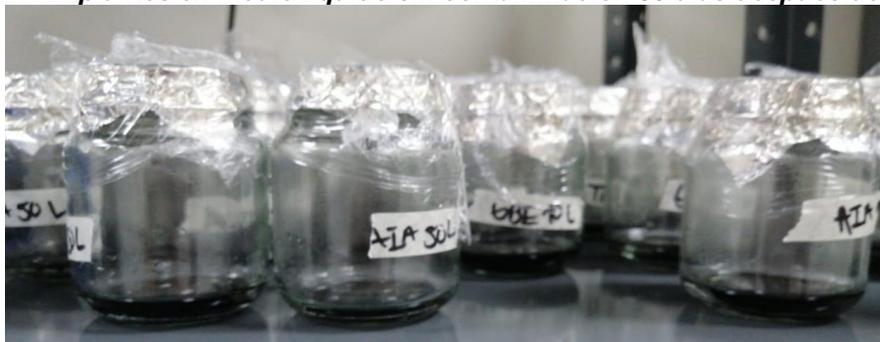
En la implementación de este tratamiento de desinfección se pudo identificar que ninguno de los explantes sembrados se contaminó durante los primeros 16 días, sin embargo en el periodo comprendido entre los 17 hasta los 24 días se contaminaron 2 muestras suplementadas con 2 mg de AIA, 4 muestras suplementadas con 12 mg de AIA, 2 muestras suplementadas con 12 mg de GEB y 2 muestras suplementadas con 25 mg de GEB; las muestras sin suplemento de reguladores de crecimiento y las muestras suplementadas con 25 mg de AIA y 2 mg de GEB no presentaron ninguna contaminación durante los primeros 30 días, por lo tanto se podría deducir que la interacción entre el tercer método de desinfección en medio de cultivo líquido sin suplemento de reguladores de crecimiento y la suplementación con 25 mg de AIA o 2 mg de GEB, mostraron ser eficientes para evitar la contaminación de los explantes, según lo evidenciado en la gráfica 8.

Gráfica 5. Resultado de contaminación del tercer tratamiento de desinfección en medio de cultivo líquido.



Fuente: Los autores.

Figura 21. Explantes en medio liquido sin contaminación 30 días después de siembra.



Fuente: Los autores.

Figura 21, se observan explantes de 30 días que fue sometido al tercer proceso de desinfección y posteriormente sembrado en medio de cultivo liquido suplementado con 25 mg de AIA y 2 mg de GEB.

La validez de la asepsia durante los tratamientos de desinfección para el cultivo in vitro de orquídeas ha sido poco documentada, a pesar de que esta estrategia es un factor importante para lograr el establecimiento y multiplicación óptima de estas especies (Mng'omba et al., 2012). En el caso de la vainilla, existen diversidad de protocolos de micropropagación donde se mencionan procedimientos de desinfección poco efectivos y/o que usan sustancias químicas (fungicidas) en campo durante un tiempo determinado para preparar el material vegetal que se va a extraer, o en otras circunstancias estos productos también son usados en la fase de laboratorio. (Tan et al., 2011; Zuraida et al., 2013; Mujar et al., 2014).

4.2 Identificar la presencia de hongos fitopatógenos en los explantes establecidos en dos medios de cultivos (sólido y liquido).

Para dar cumplimiento al tercer objetivo específico se caracterizaron los hongos presentes en los explantes y vainas (semilla) de *vanilla spp.* provenientes de campo, en un primer intento de identificación se realizaron improntas para ser observadas en

microscopio, sin embargo, con este proceso no se pudieron ver las estructuras de los micelios, por lo tanto se procedió a realizar un proceso de purificación de los mismos.

Se preparó PDA para purificar los hongos y poderlos identificar plenamente sometiéndolos a un proceso de estrés con el cual se pudo garantizar la observación de las estructuras.

Figura 22. Purificación de hongo en PDA.



Fuente: Los autores.

En la figura 19, se observa una caja Petri donde se sembró el hongo que afectó los explantes y semillas en los tres tratamientos de desinfección.

Después de la purificación se procedió a observar las estructuras del micelio, pero estas no se habían desarrollado, por lo que se llevó a un proceso de stress que consistió en sembrarlos en medio de cultivo Spezieller Nährstoff-farmer con el fin de lograr la formación de estructuras de conidias, para poder identificar el hongo; finalmente se identificó el hongo como *pestalotiopsis spp.* como se muestra en la figura 23; este se presentó en los explantes y semillas provenientes de campo sembrados en medios de cultivo sólido y líquido.

Figura 23. Se observa en el microscopio conidios de coloración amarilla de hongo *pestalotiopsis spp.*



Fuente: Los autores.

Se observaron estructuras de conidas de color amarillo con una forma de rectangular, características de *pestalotiopsis spp.*

Las *Vainillas* colombianas y algunos de los microorganismos endófitos naturalmente asociados a ellas. En el cepario del Laboratorio de Biología Tropical hay más de 50 aislamientos de hongos y bacterias para identificación (Gamboa-Gaitán en prep.). en el caso de *pestalotiopsis theae* afecta tejido hoja.

Figura 24. Se observa en el microscopio conidios de coloración verde de hongo *aspergillus spp.*



Fuente: Los autores.

Se observaron por medio del microscopio conidias de forma ovalada de una coloración verde y bordes blancos con un mayor crecimiento en el medio, esto puede indicar que los contaminantes más comunes durante el establecimiento in vitro de explantes procedentes de plantas adultas de campo son hongos asociados o que habitan en el cultivo bajo condiciones naturales.

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Kozakiewicz 1989).

Debido a que las plantas donantes para el proyecto se extrajeron directamente de campo, unas en un bosque secundario húmedo y las otras asociación con cítricos, estas tenían una mayor probabilidad de estar contaminadas y así mismo los procesos de desinfección serían más difíciles de implementar debido a que solo se aplicaron procesos de asepsia en el laboratorio por la dificultad y la perturbación al medio ambiente que implicaría aplicar fungicidas en estas dos puntos donde se colectó el material (Carranza et al., 2015).

Según Gamboa (2014), La presente investigación que pretende promover el cultivo de la *vainilla* en Colombia y determinar la estructura y composición de la comunidad de microorganismos endófitos naturalmente asociada a ella. Dentro de los resultados que obtuvieron muestran que las vainillas tienen un gran repertorio de bacterias y hongos endófitos asociados a sus tejidos, los cuales fueron muestreados de raíces, tallos, hojas y frutos, tanto de vainillas en cultivo como como silvestres; dentro de esto se identificó el *Aspergillus niger* en la especie *Vanilla sp.* donde la principal afectación se presentó en Tallos siendo Endófitos y saprófito y también reportó *Pestalotia sp.* en las especies de *Vanilla planifolia*, *Vanilla calyculata* y *Vanilla sp.*

Según Azofeira et al. (2019) en los aislamientos fúngicos en el proceso desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogénético de vitroplantas de *Vanilla planifolia Andrews*, el más frecuente fue *Fusarium oxysporum* (28%), seguido de hongos con micelio estéril, *F. solani*, *F. semitectum*, *Fusarium sp.*, *Phoma sp.*, *Alternaria sp.* y *Cladosporium sp.* La supervivencia de *F. oxysporum* y *F. solani* en el experimento, ocasionó la muerte de las plántulas in vitro, motivo por el cual, la presencia de estas especies se consideró nociva.

Según Bautista (2014) que cita:

Los agentes etiológicos reportados en la literatura, en diversas partes del mundo, no corresponden con los resultados de inoculación en plantas sanas, encontrados en este estudio. Las más reportadas son especies y subespecies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. batatis var. Vanillae*, etc.) Que se asocian a pudriciones y marchitamientos de raíz, tallos hojas en vainilla (Curti, 1995; Hernández, 1999; Huerta, 2009; Gleason, 2009).

Por otro lado, como menciona Francisco (2007):

Este hongo *Fusarium oxysporum fsp* y *Mildiu* ataca las raíces adventicias y brotes de la vainilla, la planta muere pues no puede absorber agua y nutrimentos, Suelos degradados, pobres en materia orgánica favorecen la colonización por este hongo, el aumento paulatino del número de propágulos aunado a condiciones ambientales y de manejo favorable desencadena la epifitias; la literatura reporta también antracnosis y roya siendo la mas limitante el fusarium.

4.3 Análisis de diseño experimental

4.3.1 Diseño experimental

El paquete estadístico utilizado es el programa STATGRAPHICS 19 (El StatAdvisor).

4.3.1.1 Atributos de diseño experimental Multi-factor Categórico

Clase de diseño: Multifactorial Categórico.

Nombre del archivo: ANOVA

Diseño Base

Número de factores experimentales: 4

Número de respuestas: 2

Número de ejecuciones: 480

Grados de libertad para el error: 45

Aleatorizar: No

Factores	Niveles	Unidades
Desinfección	3	
Concentración	4	
M. cultivo	2	
R. de crecimiento	2	

Respuestas	Unidades
Contaminación	
Tiempo	Días

Fuente: Los autores.

Diseño experimental para el cual se estimará los efectos de 4 factores categóricos. El diseño es factorial estándar que consiste en todas las combinaciones de los niveles de los factores.

4.3.1.2 Modelos lineales generales

Número de variables dependientes: 2

Número de factores categóricos: 4

A=Concentración

B=Desinfección

C=M. cultivo

D=R. de crecimiento

Número de factores cuantitativos: 0

Gráfica 8. Análisis de varianza para tiempo.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	7322,97	24	305,124	7,08	0,0000
Residuo	19610,0	455	43,0989		
Total (Corr.)	26932,9	479			

Gráfica 10. Suma de cuadrados tipo III.

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl
Concentración	71,0229	3
Desinfección	6496,15	2
M. cultivo	498,169	1
R. de crecimiento	48,7687	1
Concentración*Desinfección*M. cultivo	55,7958	6
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	63,7625	6
Concentración*M. cultivo*R. de crecimiento	54,6063	3
Desinfección*M. cultivo*R. de crecimiento	34,6875	2
Residuo	19610,0	455
Total (corregido)	26932,9	479

Fuente	Cuadrado Medio	Razón-F
Concentración	23,6743	0,55
Desinfección	3248,08	75,36
M. cultivo	498,169	11,56
R. de crecimiento	48,7687	1,13
Concentración*Desinfección*M. cultivo	9,29931	0,22
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	10,6271	0,25
Concentración*M. cultivo*R. de crecimiento	18,2021	0,42
Desinfección*M. cultivo*R. de crecimiento	17,3438	0,40
Residuo	43,0989	
Total (corregido)		

Fuente	Valor-P
Concentración	0,6488
Desinfección	0,0000
M. cultivo	0,0007
R. de crecimiento	0,2880
Concentración*Desinfección*M. cultivo	0,9717
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	0,9606
Concentración*M. cultivo*R. de crecimiento	0,7371
Desinfección*M. cultivo*R. de crecimiento	0,6689
Residuo	
Total (corregido)	

Fuente: Los autores.

Gráfica 11. Cuadro medio esperados (CME).

Cuadros Medios Esperados (CME)

Fuente	CME
Concentración	(9)+Q1
Desinfección	(9)+Q2
M. cultivo	(9)+Q3
R. de crecimiento	(9)+Q4
Concentración*Desinfección*M. cultivo	(9)+Q5
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	(9)+Q6
Concentración*M. cultivo*R. de crecimiento	(9)+Q7
Desinfección*M. cultivo*R. de crecimiento	(9)+Q8
Residuo	(9)

Fuente: Los autores.

Gráfica 12. Denominadores de prueba-f.

Fuente	GI	Cuadrado Medio
Concentración	455,00	43,0989
Desinfección	455,00	43,0989
M. cultivo	455,00	43,0989
R. de crecimiento	455,00	43,0989
Concentración*Desinfección*M. cultivo	455,00	43,0989
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	455,00	43,0989

Fuente: Los autores.

R-Cuadrada = 27,1896 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 23,3491 por ciento

Error estándar del est. = 6,56497

Error medio absoluto = 5,26406

Estadístico Durbin-Watson = 0,565857 (P=0,0000)

Gráfica 13. Análisis de residuos.

	Estimación	Validación
n	480	
CME	43,0989	
MAE	5,26406	
MAPE	51,4135	
ME	5,92119E-17	
MPE	-29,1827	

Fuente: Los autores.

Gráfica 14. Análisis de varianza para contaminación.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	60,1833	24	2,50764	31,34	0,0000
Residuo	36,4083	455	0,0800183		
Total (Corr.)	96,5917	479			

Fuente: Los autores.

Gráfica 15. Suma de cuadrados tipo II.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI
Concentración	0,375	3
Desinfección	55,1542	2
M. cultivo	1,00833	1
R. de crecimiento	0,0333333	1
Concentración*Desinfección*M. cultivo	2,2625	6
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	1,07083	6
Concentración*M. cultivo*R. de crecimiento	0,15	3
Desinfección*M. cultivo*R. de crecimiento	0,129167	2
Residuo	36,4083	455
Total (corregido)	96,5917	479

Fuente	Cuadrado Medio	Razón-F
Concentración	0,125	1,56
Desinfección	27,5771	344,63
M. cultivo	1,00833	12,60
R. de crecimiento	0,0333333	0,42
Concentración*Desinfección*M. cultivo	0,377083	4,71
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	0,178472	2,23
Concentración*M. cultivo*R. de crecimiento	0,05	0,62
Desinfección*M. cultivo*R. de crecimiento	0,0645833	0,81
Residuo	0,0800183	
Total (corregido)		

Fuente	Valor-P
Concentración	0,1978
Desinfección	0,0000
M. cultivo	0,0004
R. de crecimiento	0,5190
Concentración*Desinfección*M. cultivo	0,0001
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	0,0393
Concentración*M. cultivo*R. de crecimiento	0,5992
Desinfección*M. cultivo*R. de crecimiento	0,4468
Residuo	
Total (corregido)	

Fuente: Los autores.

Gráfica 16. Cuadrados medios esperados (CME).

Fuente	CME
Concentración	(9)+Q1
Desinfección	(9)+Q2
M. cultivo	(9)+Q3
R. de crecimiento	(9)+Q4
Concentración*Desinfección*M. cultivo	(9)+Q5
Concentración*Desinfección*R. de crecimiento	(9)+Q6
Concentración*M. cultivo*R. de crecimiento	(9)+Q7
Desinfección*M. cultivo*R. de crecimiento	(9)+Q8
Residuo	(9)

Fuente: Los autores.

R-Cuadrada = 62,307 %

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 60,3188 %

Error estándar del est. = 0,282875

Error medio absoluto = 0,17592

Estadístico Durbin-Watson = 1,24208 (P=0,0000)

Gráfica 17. Análisis de residuos.

	Estimación	Validación
n	480	
CME	0,0800183	
MAE	0,17592	
MAPE		
ME	6,7076E-18	
MPE		

Fuente: Los autores.

Esta ventana resume los resultados de ajustar 2 modelos estadísticos lineales generales para relacionar 2 variables dependientes con 4 factores predictivos. Dado que el valor-P en la primer gráfica ANOVA para tiempo es menor que 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre Tiempo y las variables predictoras con un nivel de confianza del 95,0%.

La segunda gráfica ANOVA para Tiempo prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0,9717, que corresponde a A. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0,05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95,0%. Consecuentemente, debería considerar eliminar A del modelo. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 62,307% de la variabilidad en Tiempo.

El estadístico R-Cuadrada ajustada, el cual es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 60,3188%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,282875. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones seleccionando la opción de Reportes del menú de texto.

El error medio absoluto (MAE) de 5,26406 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa con base en el orden en el que se presentaron en el archivo de

datos. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, hay indicación de una posible correlación serial.

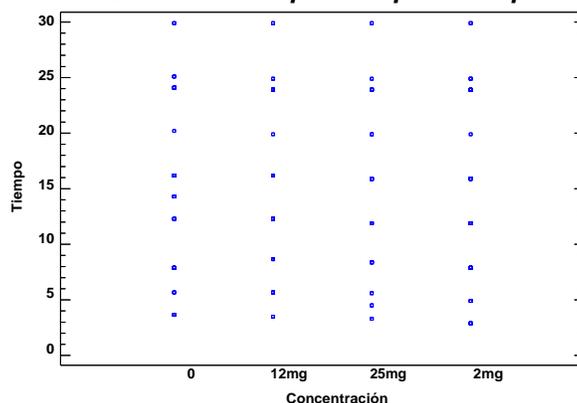
La salida también resume el desempeño del modelo para ajustar los datos, y para predecir cualquier valor retenido fuera del proceso de ajuste.

Se muestra:

- (1) el cuadrado medio del error (CME)
- (2) el error medio absoluto (MAE)
- (3) el porcentaje de error medio absoluto (MAPE)
- (4) el error medio (ME)
- (5) el porcentaje de error medio (MPE)

Cada uno de los estadísticos está basado en los residuos. Los primeros tres estadísticos miden la magnitud de los errores. El mejor modelo dará el valor más pequeño. Los últimos dos estadísticos miden el bias (sesgo). El mejor modelo dará un valor cercano a 0.

En la gráfica 17, se observa la interacción de las concentraciones de las fitohormonas, número de muestras contaminadas y el tiempo después de establecidas en el que se contaminaron, no se muestra una dispersión espacial en la gráfica, esto se explica debido a que los puntos para las 4 concentraciones tienen más o menos el mismo rango, un signo de la dispersión y, por lo tanto, la varianza es similar.

Gráfica 18. Dispersión para tiempo 1.

Fuente: Los autores.

4.3.1.3 ANOVA Multifactorial - Contaminación

Variable dependiente: Contaminación

Factores:

Concentración

Desinfección

M. cultivo

R. de crecimiento

Covariantes:

Tiempo (Días)

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de varios factores para Contaminación. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Contaminación. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores, si es que hay suficientes datos. Las pruebas-F en la gráfica ANOVA le permitirán identificar los factores significativos.

Para cada factor significativo, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La Gráfica de Medias y la Gráfica de Interacciones le ayudarán a interpretar los efectos significativos. Las Gráficas de

Residuos le ayudarán a juzgar si los datos han violado los supuestos subyacentes al análisis de varianza.

Gráfica 19. Análisis de varianza para contaminación- suma de cuadro tipo II.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Tiempo	1,41079	1	1,41079	18,82	0,0000
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	0,434137	3	0,144712	1,93	0,1239
B:Desinfección	36,716	2	18,358	244,85	0,0000
C:M. cultivo	0,620443	1	0,620443	8,28	0,0042
D:R. de crecimiento	0,013997	1	0,013997	0,19	0,6659
INTERACCIONES					
AB	0,446466	6	0,0744111	0,99	0,4297
AC	1,28229	3	0,427429	5,70	0,0008
AD	0,161829	3	0,0539428	0,72	0,5407
BC	2,8887	2	1,44435	19,26	0,0000
BD	0,160103	2	0,0800515	1,07	0,3447
CD	0,0310775	1	0,0310775	0,41	0,5200
RESIDUOS	34,0392	454	0,0749762		
TOTAL (CORREGIDO)	96,5917	479			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Fuente: Los autores.

La gráfica ANOVA descompone la variabilidad de Contaminación en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 5 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Contaminación con un 95,0% de nivel de confianza.

Gráfica 20. Medias por minuto cuadrados para contaminación con intervalos de confianza del 95,0%.

Nivel	Casos	Media	Error Est.
MEDIA GLOBAL	480	0,720833	
Concentración			
0	120	0,737827	0,0250175
12mg	120	0,709538	0,0249976
25mg	120	0,757932	0,0249962
2mg	120	0,678037	0,0250258
Desinfección			
D1	160	0,880624	0,0233635
D2	160	0,994168	0,0216889
D3	160	0,287708	0,0239018
M. cultivo			
Líquido	240	0,68435	0,0178058
Sólido	240	0,757317	0,0178058
R. de crecimiento			
AG	240	0,726241	0,0176877
AIA	240	0,715425	0,0176877
Concentración por Desinfección			
0;D1	40	0,867782	0,0439269
0;D2	40	1,00174	0,0432963
0;D3	40	0,343958	0,0444646
12mg;D1	40	0,886587	0,0441908
12mg;D2	40	0,998069	0,0432967
12mg;D3	40	0,243958	0,0444646
25mg;D1	40	0,906768	0,0444267
25mg;D2	40	0,998069	0,0432967
25mg;D3	40	0,368958	0,0444646
2mg;D1	40	0,861357	0,0442014
2mg;D2	40	0,978795	0,0435695
2mg;D3	40	0,193958	0,0444646
Concentración por M. cultivo			
0;Líquido	60	0,647616	0,0355028
0;Sólido	60	0,828037	0,0353708
12mg;Líquido	60	0,756023	0,035377
12mg;Sólido	60	0,663053	0,0353596
25mg;Líquido	60	0,691039	0,0353943
25mg;Sólido	60	0,824825	0,0354041
2mg;Líquido	60	0,642722	0,0354159
2mg;Sólido	60	0,713352	0,0356486
Concentración por R. de crecimiento			
0;AG	60	0,737827	0,0353649
0;AIA	60	0,737827	0,0353649
12mg;AG	60	0,711829	0,0353673
12mg;AIA	60	0,707247	0,0353892
25mg;AG	60	0,792868	0,035388
25mg;AIA	60	0,722996	0,0353798
2mg;AG	60	0,662441	0,0353632
2mg;AIA	60	0,693633	0,0353802
Desinfección por M. cultivo			
D1;Líquido	80	0,926625	0,0306161
D1;Sólido	80	0,834622	0,0354898
D2;Líquido	80	0,982466	0,0308795
D2;Sólido	80	1,00587	0,0306437
D3;Líquido	80	0,143958	0,0322474
D3;Sólido	80	0,431458	0,0322474
Desinfección por R. de crecimiento			
D1;AG	80	0,87271	0,0319585
D1;AIA	80	0,888537	0,0317468
D2;AG	80	0,987055	0,0307589
D2;AIA	80	1,00128	0,0306152
D3;AG	80	0,318958	0,0322474
D3;AIA	80	0,256458	0,0322474

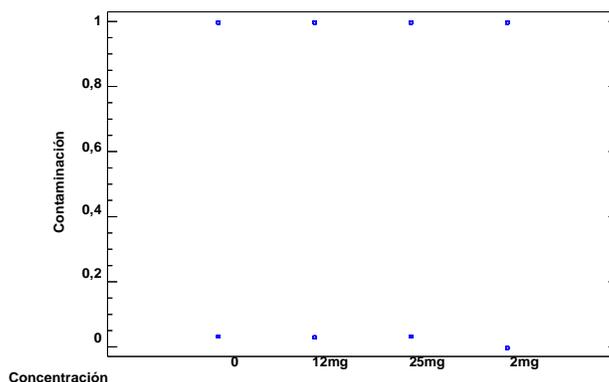
Fuente: Los autores.

Esta gráfica muestra la media de Contaminación para cada uno de los niveles de los factores. También muestra los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad en su muestreo.

Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95,0% para cada una de las medias.

En la gráfica 20, se observa la dispersión por niveles que muestra la igualdad de varianzas, permitiendo comprobar la existencia de algún tipo de relación entre el tamaño de las medidas y el tamaño de las varianzas. Para este análisis de contaminación y concentración de reguladores de crecimiento las varianzas son iguales por eso se ven alineadas horizontalmente.

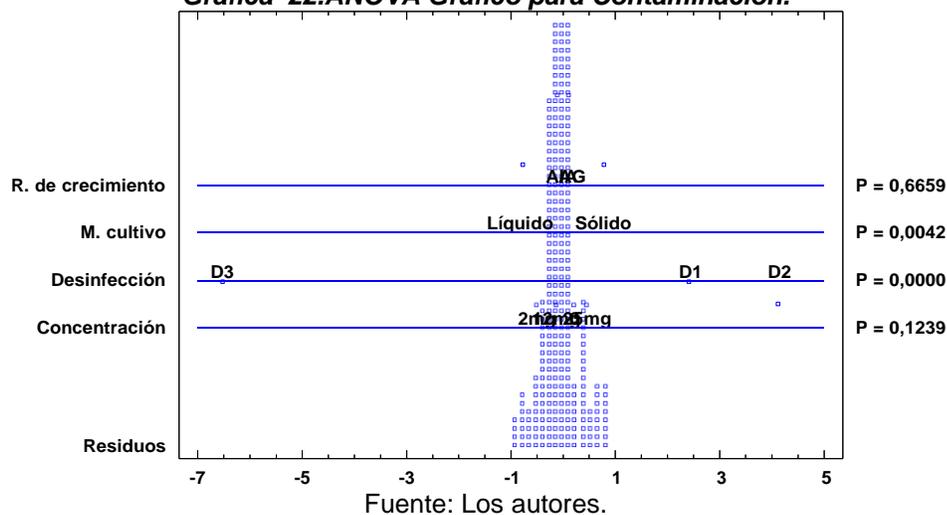
Gráfica 21. Dispersión por código de nivel.



Fuente: Los autores.

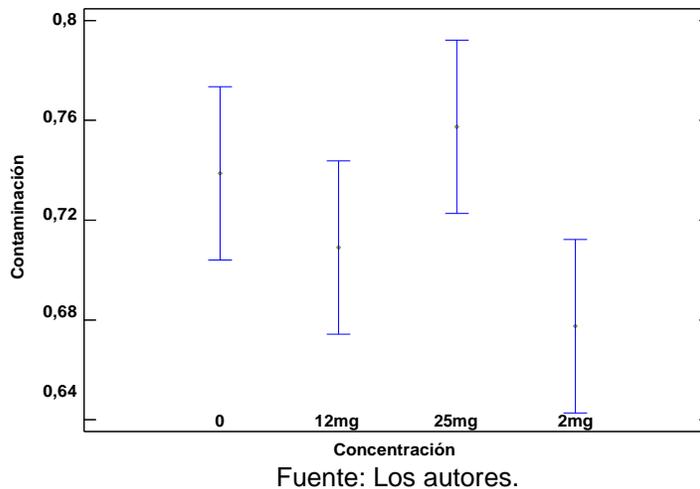
En la gráfica 21, se muestra las interacciones del ANOVA para contaminación, para los valores P menores que 0,05, indicación de una posible correlación serial; en la gráfica puede observarse como los puntos forman aproximadamente una curva de campana, lo que indica que los residuos siguen una distribución normal.

Gráfica 22. ANOVA Gráfico para Contaminación.

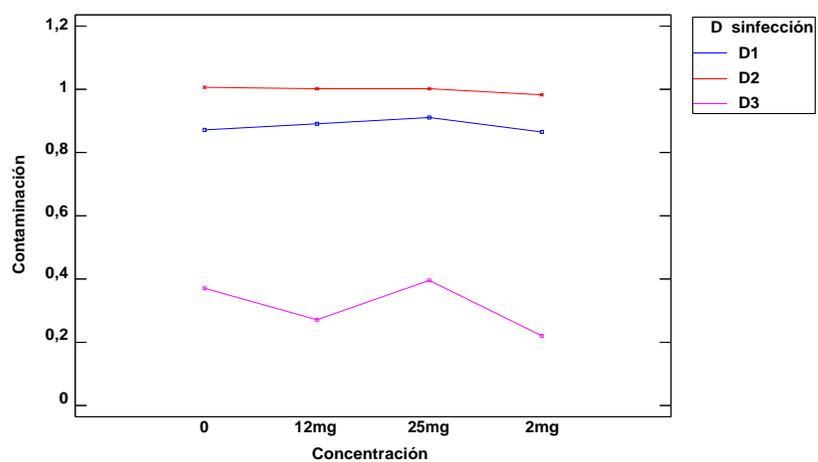


En la gráfica 22, se comprueba que los residuos siguen una distribución normal lo que permite comprobar que las varianzas entre factores son iguales, no existen valores atípicos y la suma de las medias se encuentran en los percentiles.

Gráfica 23. Medias y 95,0% de Fisher LSD.



La grafica 23, representa las interacciones de las medias de los tratamientos, para este caso en específico no existe interacción, debido a que en ninguna parte los segmentos lineales se unen.

Grafica 24. Gráfico de Interacciones.

Fuente: Los autores.

Conclusión

- El segundo tratamiento de desinfección de vaina (semilla) establecida en medio de cultivo solido en interacción con los reguladores de crecimientos AIA (acido indolacético) y GEB (giberelina) suplementados en 3 concentraciones equivalentes a 2, 12 y 25 mg cada uno, mostro la mayor eficiencia para evitar contaminación.
- El tercer tratamiento de desinfección de explantes establecido en medio de cultivo solido en interacción con los reguladores de crecimiento AIA (acido indolacético) suplementada en concentración de 12 mg y GEB (giberelina) suplementada en concentración de 2 mg, fue el más eficiente evitando la contaminación en el total de las muestras.
- El tercer tratamiento de desinfección de explantes establecido en medio de cultivo liquido mostro total eficiencia evitando la contaminación, en la interacción con los reguladores de crecimiento AIA (acido indolacético) suplementada en concentración de 25 mg y GEB (giberelina) suplementada en concentración de 2 mg, así como en el testigo sin suplemento de reguladores de crecimiento.
- La contaminación presente en todas las muestras tuvo características constantes la presencia de dos hongos fitopatógenos (*Aspergillus s.p* y *Pestalotia sp*), probablemente relacionado con el material vegetal extraído de campo.

Recomendaciones

- Continuar con la evaluación de los dos reguladores de crecimiento utilizados en las interacciones planteadas en el presente trabajo para determinar su eficiencia en la generación de protocormos y su posterior endurecimiento para la especie *Vanilla spp.*
- Implementar los procedimientos de desinfección y las interacciones en diferentes concentraciones con los dos reguladores de crecimiento utilizados en el presente trabajo, para evaluar su efecto en otras especies de interés económico pertenecientes a la familia *orchidaceae*.

Referencias

Absalón, A. (2013). Salvar la Amazonia, reto ambiental del siglo XXI. [COLOMBIA]. Recuperado de: <https://unperiodico.unal.edu.co/pages/detail/salvar-la-amazonia-reto-ambiental-del-siglo-xxi/?special=1804&cHash=9dc9a1e110dec3ac76446a69fb5d6411>

Alcantara Cortés, J. S., Acero Godoy, J., Alcantara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R, M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. NOVA, 17 (32): 109-129.

Altieri, M. (2005), La soja transgénica en América Latina. Una maquinaria de hambre, deforestación y devastación socio ecológica. [ARGENTINA]. Recuperado de: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-LaSojaTransgenicaEnAmericaLatinaUnaMaquinariaDeHam-1420524.pdf>

Azofeifa-Bolaños, J. B., Rivera-Coto, G., Paniagua-Vásquez, A., Cordero-Solórzano, R., & Salas-Alvarado, E. (2019). Portal de revistas académicas. Desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogenético de vitroplantas de *Vanilla planifolia*. 30 (1). 33-49. Doi: 10.15517/am.v30i1.32360

Balvanera, H. (2012) Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla spp.* planifolia y *V. pompona* endófitos. Vol. 19 (3). [COLOMBIA]. Recuperado de: <file:///C:/Users/jovil/Downloads/vainilla.pdf>

Barcia Jalca, B. S. (2020). Evaluación de diferentes dosis de la citocinina BAP en la propagación in vitro de vainilla tahitensis (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil).

Barrera-Rodríguez, A, I, Herrera-Cabrera, B, E, Jaramillo-Villanueva, J, L, Escobedo-Garrido, J, S & Bustamante-González, A. (2009). Caracterización de los

sistemas de producción de vainilla (*vanilla planifolia* a.) bajo naranjo y en malla sombra en el Totonacapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10: 199 – 212

Basurto, S., Rodríguez, C., Esteban S., Hernández, R., Velázquez, E. (2007). obraestáprotegidaporunalicenciaCreativeCommons4.0.108Manejo orgánico vs manejo convencional en la etapa inicial del cultivo vainilla (*Vanilla planifolia* A.). Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. [MEXICO]. Recuperado de: <https://revistabioagro.mx/index.php/revista/article/view/345/385>

Bello-Bello, Jericó J., García-García, Giovanna G., & Iglesias-Andreu, Lourdes. (2015). Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento in vitro. *Revista fitotecnia mexicana*, 38(2), 165-171. Recuperado en 19 de noviembre de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802015000200006&lng=es&tlng=es

Bermúdez Avendaño, J. L. (2016). Caracterización y estudio de oportunidades para la cadena de suministro de la vainilla mexicana: el caso de los productores en la Selva Lacandona (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Borges García, M., Estrada Abeal, E., Pérez Rodríguez, I., & Meneses Rodríguez, S. (2009). *Revista Colombiana de Biotecnología*. Usos de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. 18 (2). Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11747>

Blanco, K. (2020). Comunicación Científica sobre orquídeas del Complejo Volcánico Doña Juana - Cascabel, Las Mesas, Nariño. [Colombia]. Recuperado de: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Frepository.uniandes.edu.co%2Fbitstream%2Fhandle%2F1992%2F49232%2Fu833999.pdf%3Fsequence%3D1%26isAllowed%3Dy>

Cardona, C. S., Montoya, M. M., & Díez, M. C. (2012). Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Revista Mexicana de Micología*, 35, 23–34.

Carmona, C. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. [CHILE]. Recuperado de: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/31848275/Auxinasgiberelinasycitocininas-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1637529713&Signature=Hch1-SVMbIR07foMkfoTyQADswu29lCh83w6fb0kcoPaGqJSFe~Lc4-2PZdAKUMu~WRU7E-WdkVDZ5lNy0WEWzwUjiMHIrrKote8x5NF1JRW1hCYlke1rJHXcr38IHUZafMCOTvRqCv0LbKy-tYtn66ljvYwTY4T92vPIOwnaniVakMLPBcSYJrHTqAsAjeOxIK3AY58jH6JmykCNf3mBnmP3nN6lRnm0798K1v-GLqPicKb2kdoKdeplePQjtmkXPIF-jvb95h1HhWhqqxE85lJ09BCkyl8HQJfV~OCrCc0AfeiP0cxhMasanpy0t9sh2mZM0w57~KXbkjQ4aEw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Carrillo, C. (2005). MODELO DE ORGANIZACIÓN Y POTENCIAL PARA LOS PRODUCTORES DE VAINILLA EN COLOMBIA. Universidad de los Andes. [COLOMBIA]. Recuperado de: <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/22397/u263469.pdf?sequence=1>

Carrión, et al. (2012). Bioprospección de los recursos nativos de la orquídea *Vanilla spp.* Presente en el Valle del Cauca. [COLOMBIA]. Recuperado de: <file:///C:/Users/jovil/Downloads/vainilla%20valle%20del%20cauca.pdf>

Causil, A., Coronado, J., Verbel, L., Vega, M., Donado, K., & Pacheco, C. (2017). Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). (2017).11(1), 97-104. Doi: <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5662>.

Chaparro, C. (2011). La deforestación en el siglo XXI ha acercado a 500 especies a la extinción. [BRASIL]. Recuperado de: https://www.abc.es/natural/biodiversidad/abci-deforestacion-siglo-acercado-500-especies-extincion-201604221128_noticia.html?ref=https:%2F%2Fwww.google.com%2F

Damirón V. R. 2004. La vainilla y su cultivo. Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria del estado de Veracruz. 50 p. DE LOS PRODUCTORES EN LA SELVA LACANDONA. TESIS. [MEXICO] Recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/14130/1/1080237845.pdf>

Domínguez, R., Manuel, S., González, J., Ma, de la Luz., Rosales, G., Citlalli., Quiñones, V., César., Delgadillo, D., Silvestre., Mireles, O., Silvia, J. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. [MEXICO]. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67404109.pdf>

Elorza, M. (2010). Caracterización fisiológica de la vainilla (*Vanilla Planifolia*A) (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, [México]. Recuperado de: <https://congresoconpat.org/index.php/congresosconpat/conpat2019/paper/viewFile/232/135>

Farías, S. C., Alvarez, C. C., & Castillo-Pérez, L. J. (2016, January 1). Micropropagación de *Stanhopea tigrina* Bateman, orquídea mexicana en peligro de extinción y *Cattleya* sp.... Unknown. https://www.researchgate.net/publication/331829515_Micropropagacion_de_Stanhopea_tigrina_Bateman_orquidea_mexicana_en_peligro_de_extincion_y_Cattleya_sp_orquidea_hibrido_de_interes_comercial

Francisco J. C. (2007). El cultivo de la vainilla y sus principales plagas [Trabajo de grado Universidad Autónoma agraria Antonia Narra] file:///C:/Users/Rocio%20Rey/Downloads/873740.pdf%20(1).pdf

Gamboa, M. (2014). Vainillas colombianas y su microbiota. II. Diversidad, cultivo y microorganismos endófitos. Vol. 19 (3). Recuperado de: file:///C:/Users/jovil/Downloads/vainilla%20(1).pdf

Gätjens-Boniche, O., Acuña-Matamoros, C. L., Montero-Carmona, W., Díaz, C., & Torres, S. (2018). PROPAGACIÓN MASIVA Y FORMACIÓN DE CALLOS PROTOCÓRMICOS DE VAINILLA A PARTIR DE ÁPICES RADICALES VANILLA MASS PROPAGATION AND PROTOCORMIC CALLUS FORMATION FROM ROOT TIPS. Polibotánica, 0(45). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.12>

García Lozano, D., Mesa López, N., & Ocampo Guerrero, M., (2015). Revista Colombiana de Biotecnología. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron* Standardization of the disinfection protocol for the micropropagation of *Aspidosperma polyneuron*. 18 (2). Doi: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277>

González, J., Cubillos, A., Chadid, M., Cubillos, A., Arias, M., Zúñiga, E., ... & Berrío, V. (2018). Caracterización de las principales causas y agentes de la deforestación a nivel nacional período 2005–2015. Programa ONU-REDD Colombia. Recuperado de: <https://library.fes.de/pdf-files/bueros/kolumbien/01993/05.pdf>

Guilhermina, R. (2007) EL DESAFIO DEL DESARROLLO SUSTENTABLE EN LATINOAMERICA. [BRASIL]. Recuperado de: <http://www.ipe.org.pe/portal/wp-content/uploads/2018/02/KONRAD-2013-EI-Desaf%C3%ADo-del-Desarrollo-Sustentable-en-Am%C3%A9rica-Latina.pdf#page=124>

Herrera-Cabrera, B. (2018). Determinación preliminar de componentes de rendimiento para el cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) en la región Totonacapan, México. *Agro Productividad*, 11(3). Recuperado a partir de <https://mail.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/210>

IDEAM. (2013). Causas y consecuencias de la deforestación en Colombia en un rango de 20 años. [COLOMBIA]. Recuperado de: https://www.repository.fedesarrollo.org.co/bitstream/handle/11445/337/KAS%20SOPLA_Deforestacion%20en%20Colombia%20retos%20y%20perspectivas.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Jean, F., Richard, L., Rafael, G., Jairo, L., Andres, P., Evelyn, H. (2017). Evaluación de las tasas de deforestación en Michoacán a escala detallada mediante un método híbrido de clasificación de imágenes SPOT. [MEXICO]. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-04712017000200119&script=sci_arttext

Lorenzo, C. (2011). Análisis de la cadena productiva de la vainilla (*Planifolia Andrews*) en México, el caso del estado de Veracruz 1996-2009. [MEXICO]. Recuperado de: <file:///C:/Users/Natalia/Desktop/868471.pdf>

López, C. L. Á., Vega, N. W. O., & Montoya, M. M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293-305.

Lyndsey, A. (2008). Conservación in vitro. Volumen 43, Número 1. [ITALIA]. Recuperado de: <https://academic.oup.com/biolinnean/article-abstract/43/1/31/2654312>

Mancilla R. T. (1997). Descripción taxonómica de Orquídeas. Puerto Rico.

Martínez, P., & Garzon, S. (2016) Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para las conservaciones ex situ. [COLOMBIA]. Recuperado de: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/519/pdf>

Máximo, A. (2020). Colombia Ilustrada “Amenaza de peligro de existencia en variedades de la Orquídea”. [COLOMBIA]. Recuperado de: <https://colombiailustrada.com/2019/01/05/persiste-el-atractivo-de-las-orquideas-silvestres-de-colombia/>

Menchaca G, R. A., Ramos P, J. M., Moreno M, D., Luna R, M., Mata R, M., Vázquez G, L. M., & Lozano R, M. A. (2011). Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. Revista Colombiana de Biotecnología, 13(1), 80-84. Recuperado a partir de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22945>

Mogrinski, A. & Roca, M. (S.F). ESTABLECIMIENTOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES DE IN VITRO. [ARGENTINA]. Recuperado de: <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo2.pdf>

Moreno, M. (2009). Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla spp.* planifolia y *V. pompona*. Recuperado de: [file:///C:/Users/jovil/Downloads/vainilla%20invitro%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/jovil/Downloads/vainilla%20invitro%20(1).pdf)

Mosquera-Espinosa, A. T., Otero, J. T., Molineros, F., Vásquez, E., & Flanagan, N. S. (2012). Bioprospección de los recursos nativos de la orquídea *Vanilla spp.* presente en el Valle del Cauca Potencial microbiano para el aprovechamiento sostenible de especies de *Vanilla*. Acta Agronómica, 61(5), 37-38.

Olmos, S., Luciani, G., Galdeano, E. (2010). Micropropagación. [ARGENTINA]. Recuperado de: [file:///C:/Users/Natalia/Desktop/bio WEBPartelV/Cap1.pdf](file:///C:/Users/Natalia/Desktop/bio_WEBPartelV/Cap1.pdf)

Oswaldo, J., Hugo, C., Pedro, Z., Pablo, Q., Angel, P., Carlos V. (2016). RELACIÓN ENTRE DEFORESTACIÓN Y VARIABLES TOPOGRÁFICAS EN UN CONTEXTO AGRÍCOLA GANADERO, CANTÓN CUENCA. [ECUADOR]. Recuperado de: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/administrador,+jadan_o_et_al_1.pdf

Pérez, W. (2015). Orinoquia. [COLOMBIA]. Recuperado de: https://www.wwf.org.co/donde_trabajamos/orinoquia/#:~:text=Deforestaci%C3%B3n%3A%20La%20Orinoqu%C3%ADa%20tiene%20la,y%20la%20desaparici%C3%B3n%20de%20humedales.&text=Y%20de%20los%2019%20espacios,cuatro%20est%C3%A1n%20en%20este%20sistema.

Quintero, G., Herrera, J., Alvarado, O. (2013). Efecto de la aplicación de giberelinas y 6-bencilaminopurina en la producción y calidad de fresa (*Fragaria x Ananassa Duch.*) [COLOMBIA]. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1316-33612013000300007&script=sci_arttext
giberelina

Ramírez, C., & Bruno, R. (1999). PRINCIPALES FACTORES AGRONOMICOS [MÉXICO]. Recuperado de: file:///C:/Users/jovil/Downloads/vainilla%20invitro%20(1).pdf

Ramírez Correa, L., Granados Moreno, J., & Carreño González, N., (2014) Hemeroteca UNAD, Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro. DOI:10.22490/21456453.944

Rebeca, A. (2008). Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla spp.* planifolia y *V. pompona*. [MEXICO]. Recuperado de: file:///C:/Users/jovil/Downloads/vainilla%20invitro%20(1).pdf

Romero, H. (2014). Deforestación en Colombia: Retos y perspectivas. [COLOMBIA]. Recuperado de: https://www.repository.fedesarrollo.org.co/bitstream/handle/11445/337/KAS%20SOPLA_Deforestacion%20en%20Colombia%20retos%20y%20perspectivas.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Rosero, J. (2010). DIVERSIDAD DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS EN UN BOSQUE HÚMEDO TROPICAL (BH-T) DEL DEPARTAMENTO DEL CHOCÓ COLOMBIA. Vol. 15 N.º 2. Recuperado de: <file:///C:/Users/jovil/Downloads/orqu%C3%ADdeas%20general%202.pdf>

Rozo, P., Carmona, M., Vallejo, H., Chala, M., Cárdenas, W., Hincapie A., Pachon, P., Cervantes, H. (2021). INFORME DEFORESTACIÓN Y VULNERABILIDAD CLIMÁTICA DE LA REGIÓN ORINOQUIA. [COLOMBIA]. Recuperado de: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Informe-Deforestaci%C3%B3n-y-Vulnerabilidad-Clim%C3%A1tica-Orinoquia%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Informe-Deforestaci%C3%B3n-y-Vulnerabilidad-Clim%C3%A1tica-Orinoquia%20(1).pdf)

Salavarreria, L., Cuevas, C. (2004) Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch). [VENEZUELA]. Recuperado de: <chrome-extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fdia.net.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F2221549.pdf>

Salazar. (2012). cultivo in vitro de orquídeas con distribución en Guatemala. [Guatemala]. Recuperado de: <file:///C:/Users/jovil/Downloads/protocolos-para-cultivo-in-vitro-de-orquideas-de-guatemala.pdf>

Singer, R. (2009). Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. Acta biológica colombiana, 14(4s), 337-350.

Villalobos, V. M., & Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, 127-141.

Vinasco, M. (2011). Determinación y evaluación de productos de la biodiversidad con potencial comercial en un grupo organizado de productores en la zona de influencia del Corredor Ecoarqueológico del sur del Huila. [COLOMBIA]. Recuperado de: <file:///C:/Users/jovil/Downloads/orqu%C3%ADdeas%20diversidad.pdf>

Anexos

Anexo 1. Ficha técnica pursue.

AMWAY COLOMBIA
TRANSVERSAL 18 No 96-41 Piso 4
TELEFONO: 57- 1- 6444420



PURSUE Limpiador Desinfectante

Acción 3 en 1: Limpia, Desinfecta y Desodoriza: Limpia, desinfecta y desodoriza paredes de pisos y baños. Sin fragancia ni colorantes. Elimina malos olores y es efectivo contra un amplio espectro de bacterias, virus y hongos, los inhibe y controla su crecimiento. Versátil, puede utilizarse en superficies no porosas como pisos, paredes, paredes y mesones en hogares y áreas no críticas de instituciones y hospitales, así como en superficies que tengan contacto con alimentos. Su fórmula concentrada hace que un litro de Pursue rinda 100 litros de solución diluida.



Puede usarse para desinfectar una gran variedad de superficies duras como pisos, además desinfecta superficies que están en contacto con alimentos tales como mesones, utensilios y vidrios sin requerir enjuague con agua potable.

ACTIVOS	% por peso	FUNCIÓN
Sales de amonio cuaternario (solución 80% Agua-Alcohol): Alquil Dimetil Bencil Cloruro de amonio, Octil Decil Cloruro de amonio, Dodecil Dimetil cloruro de amonio y Dioctil Dimetil Cloruro de amonio	4,8	Desinfectante
Paret 25-12 (Alcohol Etoxilado)	3,5	Agente de Limpieza

1. ESPECTRO DE ACCIÓN:

A continuación se describe el espectro de acción y la dilución correspondiente del desinfectante PURSUE, basados en el estudio de eficacia microbiológica para la formulación LONZA S-38F, desinfectante-Limpiador - Superficies de Contacto con Alimentos¹, que en el estudio corresponde al producto Pursue. La formulación eliminó efectivamente las bacterias listadas a continuación según lo especificado en los estándares de las pruebas de rendimiento.

• Acción Desinfectante.

- a) *Desinfección de superficies altamente contaminadas:* Uso en hospitales y ambientes médicos (en superficies duras no porosas de áreas no críticas); para alcanzar la CMI (*Concentración Mínima Inhibitoria*) se requiere una concentración de 594 ppm; se recomienda una concentración de 770 ppm, equivalentes a 20 mL por litro de agua (Añada

¹ FORMULACIÓN LONZA S-38F Desinfectante/Limpiador y Sanitizador - Superficies de Contacto con Alimentos. USFL – 16635. Lanza Inc. Fair Lawn, NJ 07410, USA.

Anexo 2.Ficha técnica tween 20.

Información de seguridad voluntaria apoyándose en el formato de ficha de datos de seguridad conforme al Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (REACH)



Tween® 20 Ph.Eur.

número de artículo: **9127**
 Versión: **2.0 es**
 Reemplaza la versión de: 19.06.2015
 Versión: (1)

fecha de emisión: 19.06.2015
 Revisión: 26.08.2019

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificador del producto

Identificación de la sustancia	Tween® 20
Número de artículo	9127
Número de registro (REACH)	Según reglamento (CE) n° 1907/2006 [REACH], no es obligatorio de registrar la sustancia
Número CE	500-018-3
Número CAS	9005-64-5

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados: producto químico de laboratorio
 uso analítico y de laboratorio

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Carl Roth GmbH + Co KG
 Schoemperlenstr. 3-5
 D-76185 Karlsruhe
 Alemania

Teléfono: +49 (0) 721 - 56 06 0

Fax: +49 (0) 721 - 56 06 149

e-mail: sicherheit@carlroth.de

Sitio web: www.carlroth.de

Persona competente responsable de la ficha de datos de seguridad : Department Health, Safety and Environment

e-mail (persona competente) : sicherheit@carlroth.de

1.4 Teléfono de emergencia

Nombre	Calle	Código postal/ciudad	Teléfono	Sitio web
Servicio de Información Toxicológica Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses	Jose Echegaray nº 4 Las Rozas	28232 Madrid	+34 91 562 0420	

1.5 Importador

Teléfono:

Fax:

Sitio web: