




## Effect of different concentrations of benzylaminopurine for the *in vitro* propagation of *Vanilla tahitensis* (J. W. Moore)

## Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina en la propagación *in vitro* de *Vainilla tahitensis* (J. W. Moore)

Laura Lucia Parismoreno-Rivas<sup>1</sup>, Bryan Stalin Barcia-Jalca<sup>1</sup>, Reina Concepción Medina-Litardo<sup>1</sup>, Iris Betzaida Pérez-Almeida<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias, Guayaquil, Guayas, EC 090601, Ecuador.

<sup>2</sup>Universidad ECOTEC, Centro de Estudios para el Desarrollo Sostenible (CEDS), Km 13.5 vía Samborondón, Samborondón, Guayas, EC 092301, Ecuador.

\*Corresponding author

E-mail address: [iperez@ecotec.edu.ec](mailto:iperez@ecotec.edu.ec) (I. B. Pérez-Almeida)

Article history:

Received: 16 January 2024 / Received in revised form: 20 March 2024 / Accepted: 28 March 2024 / Published online: 19 April 2024.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.2.34>

### ABSTRACT

The establishment of an efficient *in vitro* propagation protocol is still ongoing for *Vanilla tahitensis* (J. W. Moore), an underdeveloped but economically attractive crop in Ecuador. The objective of the research was to evaluate the application of different concentrations of cytokine benzylaminopurine (BAP) in its *in vitro* culture. The effect of six concentrations of BAP was studied (0.50, 1.00, 1.50, 1.75, 2.00 and 2.50 mg/L), and a control treatment, with five repetitions, using a completely randomized design. The 2.0 mg/L concentration of BAP allowed the best micropropagation of the vanilla producing 5 and 6 shoots at 60 and 90 d after sowing. The greatest length of roots was achieved with 1.75 mg/L (7 cm). Regarding plant height and leaf number, the 2.0 mg/L concentration showed the highest plant height with 18 and 6 cm at 90 and 60 d after sowing, and the highest number of leaves with 7 and 5 leaves, respectively. This research reports a successful *in vitro* culture protocol for this species, to promote the development of this crop in Ecuador, due to its outstanding possibilities for commerce at the international market.

**Keywords:** bud proliferation, cytokines, *in vitro* culture, plant tissue culture, vanilla.

## RESUMEN

El establecimiento de un protocolo eficiente de propagación *in vitro* aún está en curso para *Vanilla tahitensis* (J. W. Moore), un cultivo poco desarrollado, pero económicamente atractivo en Ecuador. El objetivo de la investigación fue evaluar la aplicación de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en su cultivo *in vitro*. Se estudió el efecto de seis concentraciones de BAP (0,50, 1,00, 1,50, 1,75, 2,00 y 2,50 mg/L) más un tratamiento testigo, con cinco repeticiones, utilizando un diseño completamente al azar. La concentración de 2,0 mg/L de BAP permitió la mejor micropropagación de la vainilla produciendo 5 y 6 brotes a los 60 y 90 d después de la siembra. La mayor longitud de raíces (7 cm) se obtuvo en la concentración de 1,75 mg/L. En cuanto a la altura de la planta y el número de hojas, en la concentración de 2,0 mg/L se logró la mayor altura de planta con 18 y 6 cm a los 90 y 60 d después de la siembra, y el mayor número de hojas con 7 y 5 hojas, respectivamente. Esta investigación reporta un protocolo exitoso de cultivo *in vitro* de esta especie, para promover el desarrollo de este cultivo en el Ecuador, debido a sus altas posibilidades comerciales para el mercado internacional.

**Palabras claves:** citoquininas, cultivo *in vitro*, cultivo de tejidos vegetales, proliferación de brotes, vainilla.

## 1. Introducción

La vainilla está entre los cultivos de especias más valiosos a nivel mundial, siendo uno de los saborizantes más utilizados en la industria alimentaria (Bory *et al.*, 2008). Es una orquídea perenne trepadora con un tallo grueso, verde y cilíndrico. En 2019 se produjeron aproximadamente 7.715 ton de vainilla en granos (FAOSTATS, 2021), con un valor de 1.089 billones de USD, aunque su precio a nivel mundial se considera muy volátil. Madagascar es el principal productor y exportador del mundo (FAOSTATS, 2021).

Las únicas fuentes naturales de los compuestos para la elaboración de la esencia de vainilla se obtienen a partir del curado de las vainas frutales de dos especies de la familia Orchidaceae, *Vainilla planifolia* Jacks. ex Andrews, también llamada tipo “Bourbon”, y *V. tahitensis* J. W. Moore o tipo “Tahitiano”, aunque se han descrito unas 110 especies dentro de este género (Bory *et al.*, 2007).

La esencia o vainillina es ampliamente usada en la manufactura de alimentos, bebidas, perfumes y farmacéuticos (Gallage y Moller, 2015). Más del 95% de la vainilla comercial proviene del tipo “Bourbon”; sin embargo, las propiedades aromáticas distintivas de la vainilla tipo “Tahitiano” la establecen como un producto apetecible y su cultivo está incrementando notablemente en ciertas áreas del mundo, especialmente en la región del Pacífico. Los granos de *V. tahitensis* pueden contener hasta diez veces más ácido p-hidroxibenzoico que *V. planifolia*; también se detectan ácido anísico, aldehído anísico, y heliotropina (Ranadive, 1992). Así pues, las abundantes oleorresinas de rico y dulce sabor de *V. tahitensis* son el otro recurso de soporte para el mercado gourmet (Bory *et al.*, 2008), erigiéndose como nuevo recurso comercial.

Aun siendo un producto de alta demanda en el mundo, requerido por la industria alimenticia, con altos precios de venta y compra, el Ecuador ha estado limitado a importarla; siendo actualmente Santo Domingo de los Tsáchilas, en la Provincia de Santo Domingo, el único lugar donde se realiza cierta producción de vainilla con fines de exportación (Rosenfeld y Camilo, 2017). No obstante, la implementación de cultivos de vainilla en el país contribuiría a ventajas de orden social, económico y ambiental.

El manejo comercial del cultivo de vainilla incluye un régimen estricto de propagación asexual vía cortes de segmentos de tallos o esquejes recolectados de plantas sanas de crecimiento vigoroso. Además, se realiza polinización manual por medios artificiales obligando a la autopolinización de flores para producir cápsulas o vainas (Bory *et al.*, 2008). Ambos procedimientos de propagación resultan costosos y laboriosos.

El desconocimiento de técnicas adecuadas para obtener material de siembra inicial en campo ha reducido el interés de producir vainilla, provocando que su cultivo comercial en Ecuador no se intensifique, causando desmotivación en los productores por los bajos ingresos económicos obtenidos. Frente a esta realidad es necesario buscar alternativas que permitan desarrollar su propagación con rendimientos económicos favorables para el productor, mediante el uso de técnicas agrícolas y de laboratorio más apropiadas que minimicen costos de producción, además de brindar un aseguramiento productivo y económico.

La propagación convencional de la vainilla usando semillas o esquejes de tallos es intensiva, laboriosa y requiere de mucho tiempo, por lo que se considera que la producción utilizando cultivo de tejidos puede tener considerables ventajas. La micropropagación masiva *in vitro* a partir de semillas o tejidos vivos se perfila como una técnica alternativa para su reproducción controlada bajo condiciones asépticas, ya que favorece altos niveles de proliferación en periodos de tiempos cortos (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales consiste en un grupo de técnicas por medio de las cuales se obtienen plantas completas a partir de una porción vegetal con crecimiento activo (o explante) extraído de una planta donante, seleccionada por sus excelentes y representativas características de la especie y su estado sanitario (Sharry *et al.*, 2015). Este método se ha practicado con éxito en especies hortícolas, ornamentales y especies leñosas. El tamaño de los explantes generalmente es pequeño, ocasionalmente microscópico, y su manipulación debe ser bajo condiciones asépticas; luego de la desinfección es inoculado en medios de cultivo apropiados, bajo condiciones ambientales controladas para su regeneración y desarrollo (Pachón, 2008). A través de la micropropagación *in vitro* se obtiene una descendencia uniforme y las nuevas plantas se ven favorecidas gracias al rápido crecimiento en estas condiciones (Alvarado, 2013).

La elección del medio de cultivo y la adición adecuada de reguladores de crecimiento vegetal son elementos clave para la propagación *in vitro*. Entre estos últimos, las citoquininas son fitoreguladores que intervienen durante todo el ciclo de vida de las plantas; se distribuyen diferencialmente dentro de los tejidos, lo que provoca diferentes procesos morfogénicos como división celular y estimulación de la formación de hojas (Bansal *et al.*, 2024, Manokari *et al.*, 2023). La utilización de un medio de cultivo apropiado permite la reducción de costos y la minimización de manipulaciones necesarias, también posibilita el aumento de los coeficientes de multiplicación (Dhanalakshmi y Stephan, 2014).

Hasta ahora se han encontrado pocas referencias en la literatura científica acerca del cultivo de tejidos de *V. tahitensis*. Entre estos, Mathew *et al.* (2000) señala un protocolo comercialmente viable para la propagación masal *in vitro* de *V. tahitensis*, utilizando bencilaminopurina (1 mg/L) y ácido naftalenacético (ANA) 0.1 mg/L, durante 60 a 70 d de cultivo.

Dado que *V. tahitensis* es un híbrido entre *V. planifolia* y *V. odorata* (Soto-Arenas y Dressler, 2010), se hace referencia a antecedentes de micropropagación de *V. planifolia*, en la cual se han reportado numerosos estudios de multiplicación (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2022), a partir del cultivo de nudos de tallos (Chin *et al.*, 2011; Giridhar *et al.*, 2001), ápices de raíces (Philip y Nainar, 1986), ápices de vástagos (Giridhar *et al.*, 2001, Kalimuthu *et al.*, 2006) y cultivo de callos (Janarthanam and Seshadri, 2008; Chin *et al.*, 2011). Recientemente Manokari *et al.* (2022) indicaron que el uso de nitrato de plata promovió la embriogénesis somática y la regeneración de plántulas en explantes de hojas. Sin embargo, la propagación *in vitro* de plántulas de esta especie aún adolece de efectos negativos en el manejo y baja tasa de supervivencia al trasplante de plántulas. De los fitoreguladores utilizados durante la micropropagación *in vitro*, 6-bencilaminopurina fue importante para iniciación de brotes y multiplicación de vástagos en casi todos los casos (Gantait y Kundu, 2017).

El material vegetal inicial para la micropropagación de *V. tahitensis* es escaso y costoso, constituyendo una limitante para la expansión de la especie como posible cultivo comercial en Ecuador. En este trabajo nos propusimos identificar la concentración óptima de bencilaminopurina, a fin de obtener un alto número de brotes con buen desarrollo en el cultivo *in vitro* de esta especie.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Material vegetal

Se utilizaron cinco plantas madre, o donadoras de explantes, ejemplares de orquídeas de *V. tahitensis*, adquiridas en viveros de Santo Domingo de los Tsáchilas, seleccionadas por su sanidad y vigor, las cuales se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Agrovitroparis, ubicado en la ciudad de Guayaquil, Parroquia Pascuales, coordenadas geográficas son Latitud 2° 03'58.9" S y Latitud 79°55.02.2" W. La investigación se llevó a cabo durante el periodo junio-septiembre de 2020.

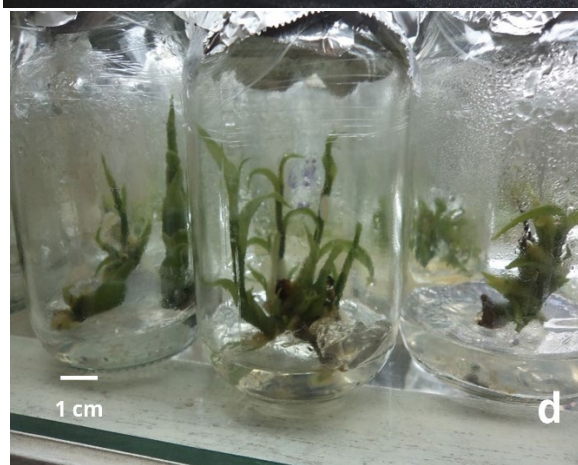
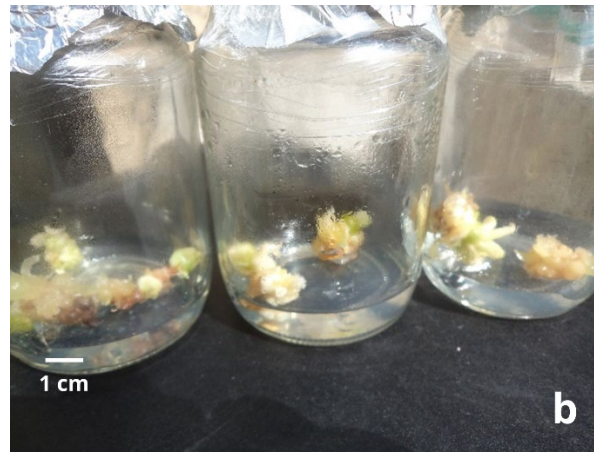
### 2.2. Preparación de medio de cultivo

Se elaboró el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), para lo cual se combinaron los diferentes componentes y las vitaminas de Morel (pantotenato de calcio 0,25 mg/L, mioinositol 12,5 mg/L, ácido nicotínico 0,25 mg/L, piridoxina HCl 0,25 mg/L, tiamina 0,25 mg/L, biotina 0,0025 mg/L); posteriormente se añadió sacarosa (30 g/L) bajo agitación constante usando agua destilada hasta completar el volumen de 1 L (T0 = control). Adicionalmente, se aplicaron las siguientes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) T1 = 0,5; T2 = 1,0; T3 = 1,5; T4 = 1,75; T5 = 2,0; T6 = 2,5 mg/L en el medio de cultivo, para determinar el efecto de esta citocinina sobre el desarrollo caulinar de las plantas de vainilla. Se ajustó el pH a 5,6 con un potenciómetro Hanna Instruments modelo HI 2216

y se colocó el agente gelificante Phytigel (2 g/L). Los diferentes tratamientos se distribuyeron en frascos limpios de 200 mL de capacidad, a razón de 30 – 35 mL por frasco. Se cubrieron con papel aluminio y se esterilizaron en autoclave a 121°C, presión de 15 lb durante 15 min.

### 2.3. Desinfección de material vegetal

En el laboratorio, se separaron los vástagos o brotes, eliminando las hojas y se dividieron en segmentos de hasta dos yemas (Fig. 1), que luego fueron lavados con detergente líquido y enjuagados bajo un grifo de agua y a chorro continuo durante 30 min. El material vegetal seleccionado fue sometido a desinfección superficial utilizando una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10 % (2,5% i.a.), durante 10 min, seguido por 3 - 4 enjuagues en agua esterilizada utilizando la campana de flujo laminar. Luego los explantes se escurrieron y se colocaron en envases esterilizados de vidrio Pyrex hasta la siembra *in vitro*.





**Fig. 1.** Different phases of the *in vitro* culture process of *Vanilla tahitensis*. Disinfected microstakes (a); Culture flasks with callus formation (b); Formation of cauline shoots (c); Vitroplants with roots ready for acclimatization (d); Developed plant (e).

**Fig. 1.** Diversas fases del proceso de cultivo *in vitro* de *Vainilla tahitensis*. Microestacas desinfectadas (a); Frascos de cultivo con formación de callos (b); Formación de brotes caulinares (c); Vitroplantas con raíces listas para aclimatización (d); planta completamente desarrollada (e).

#### 2.4. Siembra del material *in vitro*

Se procedió al corte de las secciones desinfectadas obteniendo explantes consistentes en yemas axilares y apicales de alrededor de 4 a 5 cm para su siembra en los frascos con medio de cultivo estéril, en la cámara de flujo laminar. Los frascos se colocaron en el cuarto de crecimiento a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa del 60%, y fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, suministrado con lámparas fluorescentes con intensidad lumínica de 2000 lux. Luego de 30 d comenzó el proceso de formación de callos y regeneración de nuevos tejidos vegetales iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

#### 2.5. Multiplicación de los brotes

Al observar la formación de brotes con varias hojas (de procedencia axilar o adventicia) en los explantes que lograron establecimiento, luego de 60 d, se procedió a realizar subcultivos manteniendo constante el medio de cultivo para cada tratamiento, al igual que la aplicación de los fitoreguladores de manera periódica, esto es, utilizando los nuevos brotes desarrollados como explantes y subdividiendo el material. De esa manera se logró

un incremento aritmético en el número de explantes, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento se habían optimizado.

## **2.6. Análisis estadístico**

Se empleó el diseño experimental completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento, colocando un (1) explante por frasco, y 5 frascos por tratamiento. Se contabilizó el número de explantes con formación de callos en cada unidad experimental, a partir de los 30 d, También se contó el número de brotes; número de hojas; y altura de la planta (cm) a los 30, 60 y 90 d. Adicionalmente, a los 90 d se midió la longitud de las raíces. Los resultados se reportan en días después de la siembra. Las variables evaluadas fueron sometidas al análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de Duncan al 95% de probabilidad para determinar diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos, utilizando el programa estadístico SAS versión 9.4.

## **3. Resultados**

### **3.1. Número de explantes evaluados con formación de callos a los 30 d de siembra**

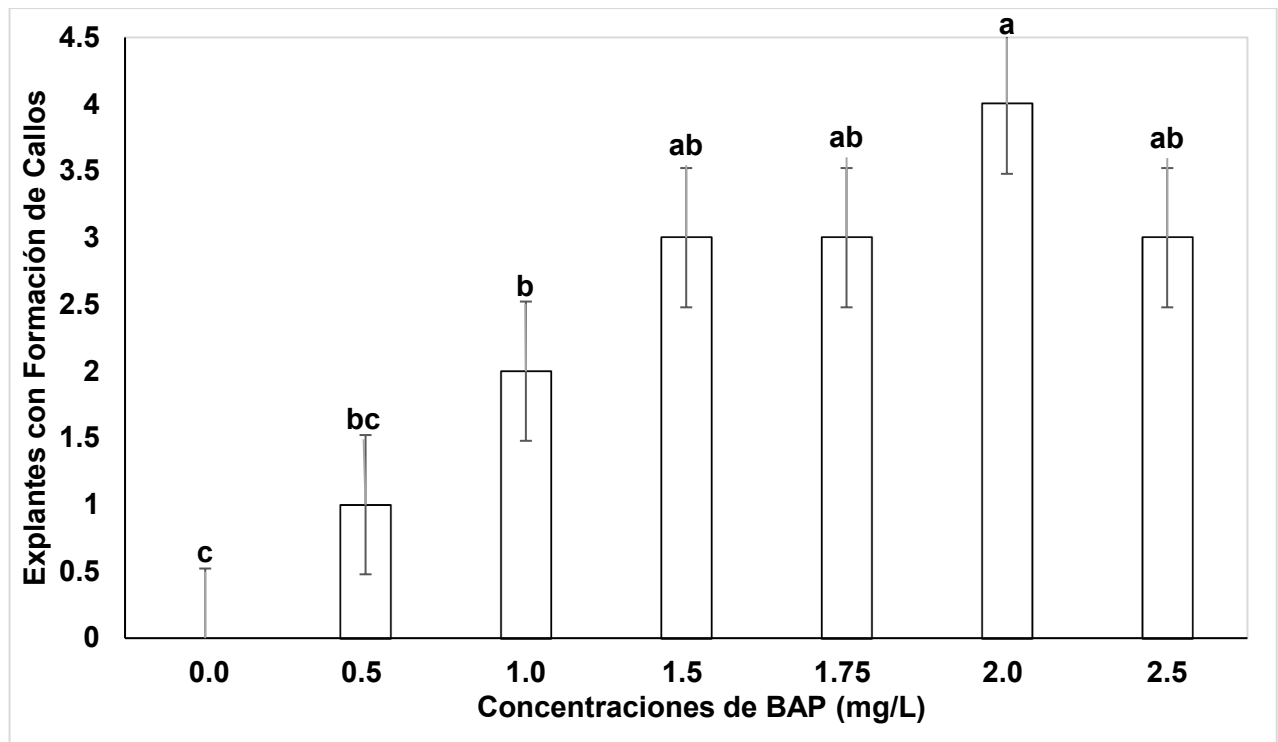
En el tratamiento de 2,0 mg/L se alcanzó el mayor número de explantes con formación de callos con un promedio de 4 callos, presentando una diferencia significativa con respecto al resto de tratamiento de 1,0 y 0,5 mg/L en donde se obtuvieron 2 y 1 brotes respectivamente, así como respecto al testigo (Fig. 2).

### **3.2. Número de brotes a los 60 d de siembra**

La concentración de 2,0 mg/L de BAP reportó el mayor número de brotes a los 60 d después de la siembra con un promedio de 5, difiriendo estadísticamente de los demás tratamientos; mientras que el control y en 0,5 mg/L de BAP, presentaron el menor número con un promedio de 1 brote, siendo estadísticamente 1,0 mg/L de BAP, 1,5 mg/L de BAP, 1,75 mg/L de BAP y 2,5 mg/L de BAP, con un promedio de 2 brotes (Fig. 3).

### **3.3. Números de brotes a los 90 d de siembra**

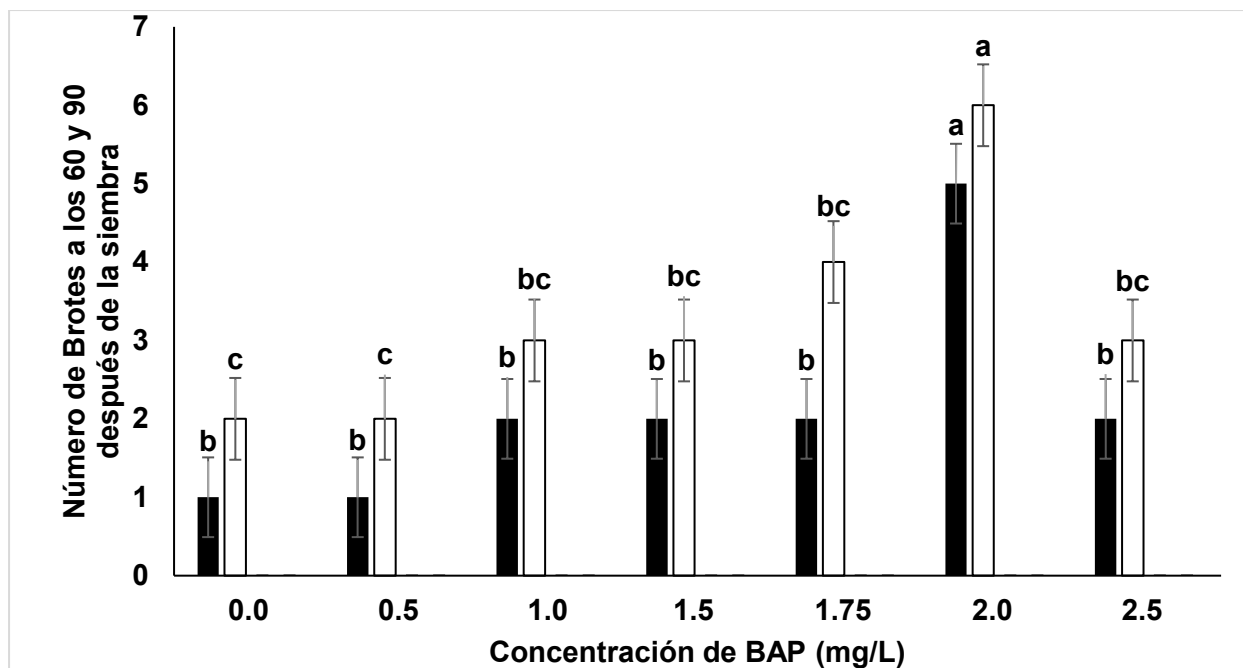
De acuerdo con el análisis de varianza los tratamientos presentaron significancias estadísticas con un promedio general de 1,75 brotes, evaluado a los 60 d, y de 3 brotes, evaluado a los 90 d (Fig. 3).



**Fig. 2.** Effect of different BAP concentrations on the average number of explants with callus formation. Means followed by the same letter are not significantly different. Vertical line shows the standard error.  $F=1.236$ ;  $p\text{ value}=0.0316$ .

**Fig. 2.** Efecto de las distintas concentraciones de BAP sobre el promedio del número de explantes con formación de callos. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes. La línea vertical muestra el error estándar.  $F=1,236$ ;  $p\text{ value}=0,0316$ .





**Fig. 3.** Effect of different BAP concentrations on the average number of shoots obtained at 60 (solid bar) and 90 (empty bar) d after sowing. Means followed by the same letter are not significantly different.  $F=0.974$ ;  $p$  value=0.461 (60 d);  $F=0.571$ ;  $p$  value=0.750 (90 d). Vertical line shows the standard error.

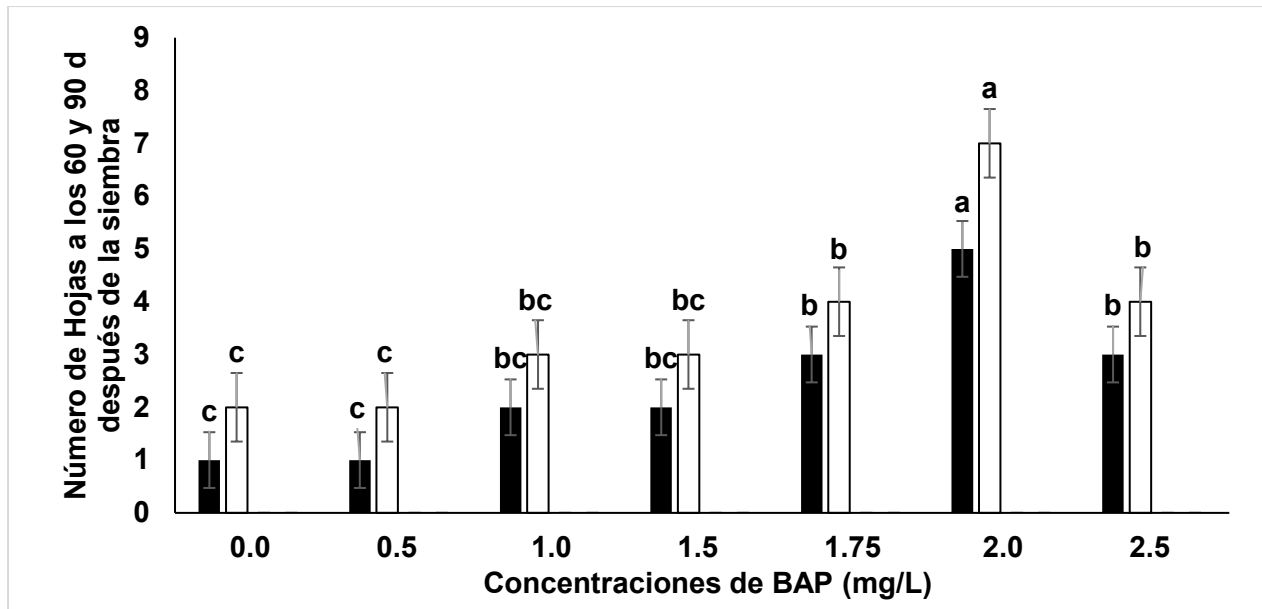
**Fig. 3.** Efecto de las distintas concentraciones de BAP sobre el promedio del número de brotes obtenidos a los 60 (barra sólida) y 90 (barra vacía) d después de la siembra. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes.  $F=0,974$ ;  $p$  value=0,461 (60 d);  $F=0,571$ ;  $p$  value=0,750 (90 d). La línea vertical muestra el error estándar.

### 3.4. Número de hojas a los 60 d de siembra

Según el análisis de varianza los tratamientos presentaron significancias estadísticas, el promedio general de esta variable evaluada a los 60 d fue de 2 hojas/brote, con un coeficiente de variación 4,67% (Fig. 4).

### 3.5. Número de hojas a los 90 d de siembra

La concentración de 2,0 mg/L de BAP reportó el mayor número de hojas con un promedio de 7 hojas/brote, difiere estadísticamente de los demás tratamientos, el menor promedio del número de hojas se obtuvo con 0,5 mg/L de BAP y el control, los cuales mostraron 2 hojas (Fig. 4).



**Fig. 4.** Efecto de las distintas concentraciones de BAP sobre el promedio del número de hojas obtenidas a los 60 (barra sólida) y 90 (barra vacía) d después de la siembra. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes con un valor  $F=0,759$ ;  $p$  value= $0,608$  (60 d).  $F=0,765$ ;  $p$  value= $0,603$  (90 d). La línea vertical muestra el error estándar.

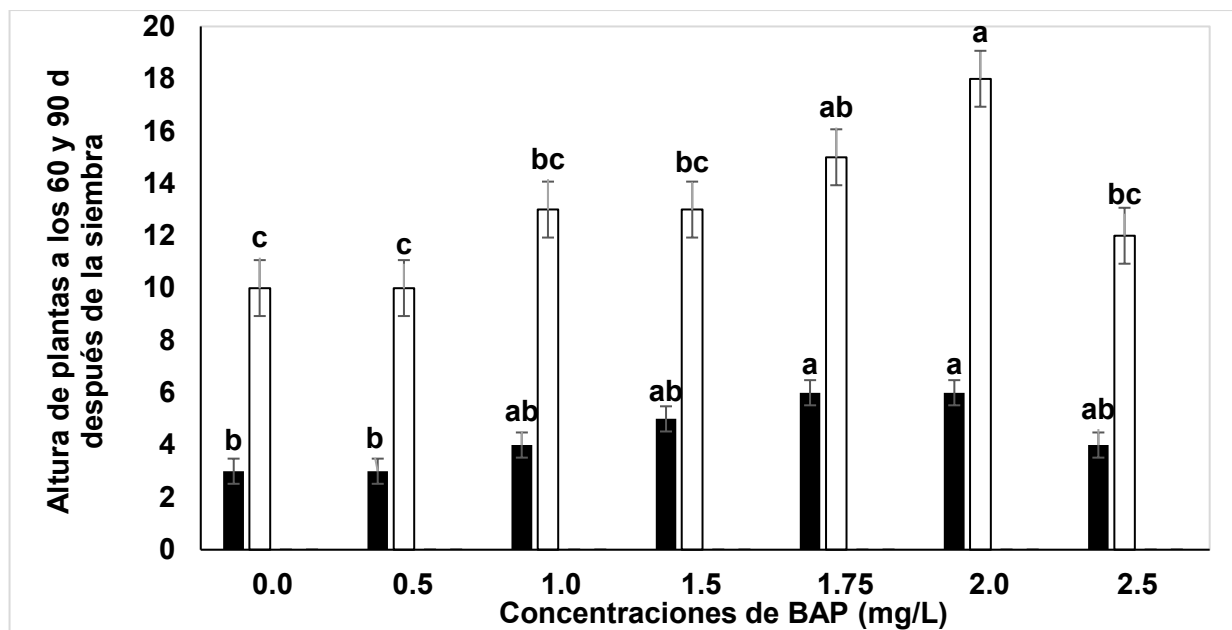
**Fig. 4.** Effect of different BAP concentrations on the average number of leaves obtained at 60 (solid bar) and 90 (empty bar) d after sowing. Means followed by the same letter are not significantly different with an  $F$  value= $0.759$ ;  $p$  value= $0.608$  (60 d).  $F=0.765$ ;  $p$  value= $0.603$  (90 d). Vertical line shows the standard error.

### 3.6. Altura de la planta a los 60 d de siembra

El promedio general de la altura de planta a los 60 d fue de 4,43 cm con un coeficiente de variación de 33,03%. El análisis de varianza indica que los tratamientos presentaron significación estadística al 5 % de probabilidad de la prueba de Duncan (Fig. 5).

### 3.7. Altura de la planta a los 90 d de siembra

En 2,0 mg/L de BAP se reportó la mayor altura de planta con un promedio de 18 cm, estadísticamente igual a 1,75 mg/L de BAP con un promedio de 15 cm, difiriendo estadísticamente de los demás tratamientos. Tanto en 0,5 mg/L de BAP y el testigo alcanzaron la menor altura de planta con un promedio de 10 cm (Fig. 5).

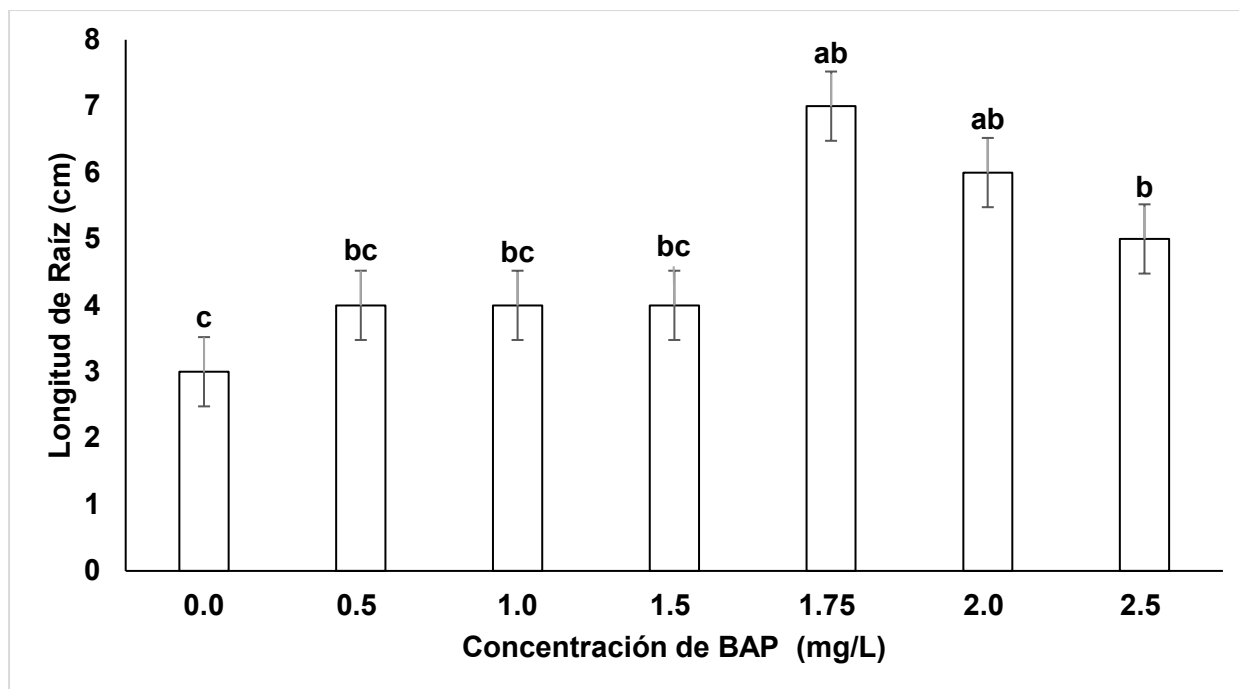


**Fig. 5.** Effect of different concentrations of benzylaminopurine (BAP) on the average plant height obtained at 60 (solid bar) and 90 (empty bar) d after sowing. Means followed by the same letter are not significantly different.  $F=11.333$ ;  $p \text{ value} < 0.001$  (60 d).  $F=8.485$ ;  $p \text{ value} < 0.001$  (90 d). Vertical line shows the standard error.

**Fig. 5.** Efecto de las distintas concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre el promedio de la altura de planta obtenido a los 60 (barra sólida) y 90 (barra vacía) d después de la siembra. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes.  $F=11,333$ ;  $p \text{ value} < 0,001$  (60 d).  $F=8,485$ ;  $p \text{ value} < 0,001$  (90 d). La línea vertical muestra el error estándar.

### 3.8. Longitud de raíces evaluada a los 90 d de siembra

En 1,75 mg/L de BAP se presentó la mayor longitud de raíces con un promedio 5 cm, estadísticamente igual al 2,0 mg/L de BAP con un valor promedio de 6 cm, difieren de los demás tratamientos; el menor valor promedio de longitud de raíces se obtuvo en el tratamiento control con un valor de 3 cm, estadísticamente igual a 0,5 mg/L de BAP, 1,0 mg/L y 1,5 mg/L de BAP, con un promedio de 4 cm c/u (Fig. 6).



**Fig. 6.** Efecto de las distintas concentraciones de BAP sobre el promedio de longitud de las raíces obtenido a los 90 d después de la siembra. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes.  $F=4,301$ ;  $p\text{ value}=0,003$ . La línea vertical muestra el error estándar.

**Fig. 6.** Effect of different concentrations of BAP on the average root length obtained at 90 d after sowing. Means followed by the same letter are not significantly different.  $F=4.301$ ;  $p\text{ value}=0.003$ . The vertical line shows the standard error.

#### 4. Discusión

En la concentración de 2,0 mg/L BAP se alcanzó el mayor número de explantes con formación de callos, con un promedio de 4 callos, en comparación con el testigo que presentó 0 callos. Estos resultados coinciden con Jiménez *et al.* (2006), quien destaca el papel fundamental que juega la citocinina BAP en la formación de callos durante la multiplicación *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. Por otro lado, trabajos realizados por Castillo-Pérez *et al.* (2020) donde evaluaron el efecto de la citocinina 6-BAP y el nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) en *Laelia anceps* subsp. *anceps* obtuvieron como resultado que a mayor concentración de  $KNO_3$  podrían mejorar los resultados de propagación en esta orquídea. Garrido-Gutiérrez *et al.* (2017), mencionan que aplicando 0,5 mg/L de bencilaminopurina (BAP) y 1 mg/L de ácido indolacético (AIA) en el establecimiento *in vitro* de brotes y callos de *Dahlia* sp. obtuvieron callos con explantes de tallos después de 10 d.

Con respecto al número de brotes a los 60 d, la concentración de 2,0 mg/L de BAP se obtuvo el mayor número de brotes a los 60 y 90 d de siembra con promedios de 5 y 6

brotos, siendo inferior a los demás tratamientos que presentaron un valor promedio menor de brotes. Los resultados fueron menores a los reportados por Kalimuthu *et al.* (2006), quien mediante la aplicación de BAP en concentración de 0,5 mg/L desarrollo 6 brotes de *Vanilla planifolia* por explante. Estudios anteriores mencionan que la adición de BAP al medio de cultivo es efectiva para inducir el desarrollo de brotes en diversas especies de orquídeas epífitas (Cazarez-Favela *et al.*, 2016; Robinson *et al.*, 2017). Por otro lado, el uso de la bencilaminopurina radica en su capacidad para estimular la división celular y promover la proliferación de brotes en cultivos de tejidos vegetales. Por otro lado, Parismoreno *et al.* (2021b) señalan que, aplicando la citocinina sintética Thidiazuron (TDZ) en concentración de 0,25 mg/L se obtuvo el mayor número de brotes, con un promedio de 3 brotes/explante de *Phalaenopsis* spp. Trabajos realizados por Salas-Valdivia *et al.* (2023) encontraron que bencilaminopurina en concentraciones de 0; 1; y 3 mg/L en combinación con ácido indolbutírico (AIB) en concentraciones de 0; 0,5; y 1 mg/L o ácido indolacético (AIA) (0; 0,5; y 1 mg/L); así como BAP (2 mg/L) y ácido naftalenacético (ANA) (5 mg/L); y kinetina (KIN) (2 mg/L) en *Ananas comosus* L. Merr encontraron que el mayor número de brotes ( $2,5 \pm 0,49$ ) se dio en el tratamiento con BAP 3 mg/L + AIA 0,5 mg/L.

Con relación al número de hojas, con la concentración de 2,0 mg/L de BAP se promovió el mayor número de hojas con promedios de 5 y 7 hojas a los 60 y 90 d, con relación a los demás tratamientos. Estos resultados son similares a los reportados por Parismoreno *et al.* (2021a) quienes aplicaron el bioestimulante BioTrack- O<sup>2</sup> sobre el desarrollo de *Vanilla tahitensis*, promoviendo el desarrollo de 9 hojas y 18 hojas a los 90 y 210 d.

Con respecto a la altura de la planta, en el tratamiento de 2,0 mg/L de BAP se obtuvieron las mayores alturas de planta con promedios de 6 y 18 cm a los 60 y 90 d en comparación con los demás tratamientos que presentaron menores alturas. Estudios realizados por Dhawan y Bhojwani (1985), mencionan que incorporando BAP al medio de cultivo en concentración de 0,6 mg/L se mejoró la formación y crecimiento de altura de los brotes en un 100 %.

Con relación a la longitud de raíz evaluada a los 90 d, el tratamiento de 1,75 mg/L de BAP promovió la mayor longitud de las raíces con un promedio 5 cm, mientras que en nuestro laboratorio resultados previos indicaron una longitud radical de 1,74 cm cuando se aplicó la concentración de 1 mg/L. Wan Abdullah *et al.* (2020) aplicaron 1 mg/L de BAP en *V. planifolia* obteniendo  $0,83 \pm 0,21$  cm de longitud de raíces promedio en el tratamiento control.

Con el avance en el conocimiento de las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* de *V. tahitensis* se abren las posibilidades para desarrollar protocolos eficientes para la micropropagación *in vitro* de esta orquídea con alta perspectiva en el mercado comercial gourmet debido a sus características específicas.

## 5. Conclusión

La concentración de 2,0 mg/L de BAP permitió la mejor micropropagación de la vainilla en cuanto a número de brotes, altura de planta y número de hojas por brote, variables evaluadas a los 60 y 90 d después de la siembra *in vitro*.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Universidad de Guayaquil por el apoyo para la realización del Proyecto de Investigación FCI-014-2019 titulado “Producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) *in vitro* para la optimización de producción como agricultura urbana del Cantón Guayaquil”.

## Contribución de los autores

Bryan Barcia-Jalca realizó el trabajo experimental; juntamente con Reina Medina-Litardo analizó los datos y escribió el borrador del manuscrito. Laura Parismoreno proporcionó la idea inicial del proyecto, diseñó el estudio y supervisó la investigación. Iris Pérez-Almeida analizó los datos y escribió el manuscrito final. Todos los autores leyeron y aprobaron la versión final del manuscrito.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## Referencias

Alvarado, L., 2013. Medios de cultivo definidos e indefinidos. Instituto Tecnológico de Cd. Altamirano, Cd Altamirano, Gro. México.

Azofeifa-Bolaños, J. B., Paniagua-Vásquez, A., García-García, J. A., 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 25 (1), 189-202.

Bansal, S., Sharma, M. K., Joshi, P., Malhotra, E. V., Latha, M., Malik, S. K., 2024. An efficient direct organogenesis protocol for *in vitro* clonal propagation of *Rubia cordifolia* L. *Industrial Crops and Products*. 208, 117856. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117856>

Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.F., Besse, P., 2007. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genet Resour Crop Evol.* 55, 551-571. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9260-3>

Bory, S., Lubinsky, P., Risterucci, A., Noyer, J., Grisoni, M., Duval, M. F., Besse P., 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany*. 95 (7), 805-815. <https://doi.org/10.3732/ajb.2007332>.

Castillo-Pérez, L., Maldonado-Miranda, J., Alonso-Castro, A., Carranza-Álvarez C., 2020. Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). *Biotechnia*. 22 (1), 32-38. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v22i1.1122>

Cazarez-Favela, T., Graciano-Luna, J., Solís-González, S., Díaz-Ramírez, B., Najera-Luna, J., Montoya-Ayón, J., 2016. Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave and Lex.) WE Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia*. 24, 19-25.

Chin, T., Foan, C., Alderson, P., 2011 Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 105, 457-463. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9866-6>

Dhawan, V., Bhojwani, S.S., 1985. *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala*. *Plant Cell Report* 4, 315.

Dhanalakshmi, S., Stephan, R., 2014. Effect of low-cost macronutrients in the micropropagation of banana (*Musa paradisiaca* L.). *Journal of Natural Product and Plant Resources*. 4 (5), 8-13. <http://scholarsresearchlibrary.com/JN>

FAOSTATS, 2021. Producción y comercio de vainilla: país por producto. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Gallage, N. J., Moller, B., 2015. Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its *de novo* biosynthesis in the vanilla orchid. *Mol. Plant*. 8, 40-57. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.008>

Gantait, S., Kundu, S., 2017. *In vitro* biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiol Plant*. 39, 196. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2462-1>

Garay, A., Sánchez, M., García, B., Álvarez, E., Gutiérrez, C., 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de Educación Bioquímica, México*. 33 (1), 13-22. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952014000100003](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003)

Garrido-Gutiérrez, M., Pérez-Delfín, M., Zavala Castillo, S., 2017. Establecimiento *in vitro* de brotes y callos de *Dahlia* sp. para su posterior uso en la obtención de inulina. *Mexican Journal of Biotechnology*. 2 (2), 130-141. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.2.130>

Giridhar, P., Obul, B., Ravishankar, G., 2001. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. *Current Science*. 81 (9), 1166-1170. <https://doi.org/10.2307/24106431>

Janarthanam, B., Seshadri, S., 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *Vitr. Cell. Dev. Biol- Plant*. 44 (2), 84-89. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9123-4>

Jiménez, V., Castillo, J., Tavares, E., Guevara, E., Montiel, M., 2006. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillar y shoot proliferation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 85, 211 - 217. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9120-4>

Kalimuthu, K., Senthilkumar, R., Murugalatha, N., 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. – a tropical orchid. Current Science. 91 (10), 1401-1403. <http://www.jstor.org/stable/24094066>

Manokari, M., Jayaprakash, K., Cokul Raj, M., Abhijit, D., Mohammad, F., Abdulrahman Abdullah, A., Nirmal, J., Mahipal Singh, S., 2023. In vitro micro-morphometric growth modulations induced by N6 cytokines (Meta-Topolin and 6-benzylaminopurine) in *Ceropegia juncea* Roxb. – A rare medicinal climber. South African Journal of Botany. 157, 656–666. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.04.045>

Manokari, M., Priyadharshini, S., Cokulraj, M., Dey, A., Faisal, M., Alatar, A., Alok, A., Shekhawat, M., 2022. Exogenous implications of silver nitrate on direct and indirect somatic embryogenesis and germination of cold stored synseeds of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. South African Journal of Botany. 150, 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.07.019>

Mathew, K. M., Rao, Y. S., George, G. L., Lakshmanan, R., Madhusoodanan, K. J., 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla tahitensis* Moore. Journal of Spices and Aromatic Crops. 9 (2), 171-173.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Pachón, R., 2008. Memorias Seminario – Taller en cultivo *in vitro* de orquídeas como estrategia de conservación. Jardín botánico José Celestino Mutis. Bogotá, Colombia.

Parismoreno, L., López, H., Medina, R., Pérez-Almeida, I., 2021a. Efecto de bioestimulantes sobre el crecimiento de la Vainilla tahitensis en Daule, Ecuador. Revista Científica Ecociencia. 8(6), 1-30. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.86.606>

Parismoreno, L., Zamora, V., Medina, R., Pérez-Almeida, I., 2021b. Uso de Thidiazuron (TDZ) para la micropropagación de *Phalaenopsis* spp. 6 (2), 58-69. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v6i2.1215>

Philip, V. J, Nainar, S., 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb) Ames using tissue culture. J. Plant Physiol. 122, 211-215. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80119-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80119-5)

Ramírez-Mosqueda, M.A., Bello-Bello, J.J., Armas-Silva, A.A., Rodríguez-Deméneghi, M.V., Martínez-Santos, E., 2022. Advances in Somatic Embryogenesis in Vanilla (*Vanilla*



*planifolia* Jacks.). In: Ramírez-Mosqueda, M.A. (Eds.) Somatic Embryogenesis. Methods in Molecular Biology, vol 2527. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_3)

Ranadive, A.S., 1992. Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. J. Agric. Food Chem. 40 (10), 1922-1924. <https://doi.org/10.1021/jf00022a039>

Robinson, P., Kakati, J., Sebastinraj, J., Suriya, K., 2017. *In vitro* seed germination of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., a potential medicinal orchid from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. Journal of Plant Biotechnology. 44, 343-348. <https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.3.343>

Rosenfeld, M., Camilo, J., 2017. Plan de negocios para producción de Vainilla de Tahití (*Vanilla tahitensis*) en Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, con fines de exportación, <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/2e8914c7-2f42-477d-87ca-3e33c21686f0/content>, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras, (consultado Diciembre, 2023).

Salas-Valdivia, D., Díaz-Godínez, I., Castañeda-Nava, J., Rodríguez-Domínguez, J., 2023. Micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) MD2 variety through axillary bud proliferation. Mexican Journal of Biotechnology. 8 (3),49-62. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.3.49>

Sharry, S., Adena, M., Abedini, W., 2015. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*, <https://doi.org/10.35537/10915/46738>, Universidad Nacional La Plata, Argentina, (consultado Enero, 2024).

Soto-Arenas, M.A., Dressler, R.L., 2010. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. Lankesteriana 9, 283-354.

Wan Abdullah, W. M. A. N., Low, L.-Y., Mumaiyizah, S. B., Chai, Q.-Y., Loh, J.-Y., Ong-Abdullah, J., Lai, K.-S., 2020. Effect of lignosulphonates on *Vanilla planifolia* shoot multiplication, regeneration and metabolism. Acta Physiologiae Plantarum. 42 (7), 107. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03099-9>