



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE AGRONOMÍA**

**AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A LAS  
RAÍCES DE LA VAINILLA (Spp.): POTENCIAL  
GERMINATIVO SIMBIÓTICO**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTOR: KIMBERLY CAROLINA JARAMILLO AGUAYO**

**DIRECTOR: BIOL. MARJORIE JAZMIN SALAZAR ORELLANA, MGS.**

**MACAS - ECUADOR**

**2025**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE AGRONOMÍA**

**AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A LAS RAÍCES DE  
LA VAINILLA (Spp.): POTENCIAL GERMINATIVO SIMBIÓTICO**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTOR: KIMBERLY CAROLINA JARAMILLO AGUAYO**

**DIRECTORA: BIOL. MARJORIE JAZMIN SALAZAR ORELLANA, MGS.**

**MACAS - ECUADOR**

**2025**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**

**“Aislamiento de hongos endófitos asociados a las raíces de la  
Vainilla (spp.): Potencial Germinativo Simbiótico”**

Kimberly Carolina Jaramillo Aguayo

Universidad Católica de Cuenca

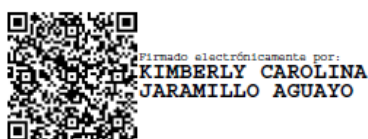
Biol. Marjorie Jazmín Salazar Orellana, Mgs.

11 de marzo de 2025

### **Declaratoria de autoría y responsabilidad**

**Kimberly Carolina Jaramillo Aguayo** portadora de la cédula de ciudadanía N° 1400654891. Declaro ser la autora de la obra: **“Aislamiento de hongos endófitos asociados a las raíces de la Vainilla (spp.): Potencial Germinativo Simbiótico”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

**Macas, 27 de febrero de 2025.**



---

Kimberly Carolina Jaramillo Aguayo

C.I.: 1400654891

## Certificación del tutor

Certifico que el presente trabajo de titulación denominado "AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A LAS RAICES DE LA VAINILLA (spp.): POTENCIAL GERMINATIVO SIMBIÓTICO" realizado por: Kimberly Carolina Jaramillo Aguayo con documento de identidad 1400654891, previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma, ha sido asesorado, orientado, revisado y supervisado durante su ejecución bajo mi tutoría en todo el proceso, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación que exige la Universidad Católica de Cuenca, por lo que está expedito para su presentación y sustentación al el respectivo tribunal.

Cuenca, 11 de marzo de 2025

Atentamente,  
DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



Firmado  
digitalmente por  
MARJORIE  
JAZMIN  
SALAZAR  
ORELLANA

Blga. Jazmin Salazar Orellana

CI: 0703228841

TUTOR

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

### **Dedicatoria**

A Dios, que con su guía y providencia me ha permitido alcanzar este logro.

A mi tía cuyo apoyo incondicional y fe en mi capacidad han sido una fuente de inspiración y motivación constante. Su amor y dedicación han sido fundamentales a lo largo de este camino.

### **Agradecimiento**

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Cooperación Alemana GIZ por su valioso apoyo y financiamiento a esta investigación, que ha sido posible gracias a su participación en el proyecto: **Fortalecimiento de la Cadena de Valor de Vainilla (*Vanilla odorata*.) y Canela Amazónica (*Ocotea quixos*) en Morona Santiago.**

También quiero agradecer a todos aquellos que han influido en mi camino, compartiendo su sabiduría, experiencia y pasión, que han contribuido a mi crecimiento profesional y personal.

## Índice de contenido

I.	Introducción .....	12
II.	Planteamiento del problema .....	14
III.	Justificación .....	16
IV.	Objetivos.....	17
1.	Objetivo general.....	17
2.	Objetivos específicos.....	17
V.	Hipótesis .....	17
VI.	Marco teórico .....	17
1.	<i>Vanilla</i> .....	17
1.1.	Tipos de Vanillas comercializables .....	18
2.	Mercado .....	19
2.1.	Principales importadores de Vanilla.....	20
2.2.	Países productores de Vainilla .....	21
3.	Descripción botánica .....	21
4.	Taxonomía .....	22
5.	Hábitat de la <i>Vanilla odorata</i> .....	23
6.	Propagación tradicional de Vainilla.....	23
7.	Hongos endófitos en Orquídeas.....	23
8.	Micorrizas .....	24
7.1.	Las micorrizas y su relación con las orquídeas .....	25
7.2.	Clasificación de micorrizas.....	25
7.3.	Beneficio de las micorrizas en vainilla .....	25
9.	Colecta de material vegetativo .....	26
10.	Cultivo <i>in vitro</i> .....	26



10.1.	Cultivo in vitro de Vainilla .....	26
10.2.	Germinación simbiótica y no simbiótica de semillas .....	27
VII.	Metodología.....	28
1.	Identificación de micorrizas en Vainilla.....	28
1.1.	Equipos y Materiales.....	28
1.2.	Métodos .....	29
VIII.	Resultados.....	42
1.	Desarrollo de protocolos de desinfección de raíces .....	42
2.	Aislamiento de hongos endófitos. ....	42
2.1.	ENSAYO # 01 .....	42
2.2.	Ensayo # 02.....	43
2.3.	Ensayo # 03.....	43
2.4.	Ensayo # 04.....	43
3.	Germinación simbiótica .....	48
3.1.	Siembra de semilla de vainas inmaduras .....	49
3.2.	Siembras de semillas de vainas maduras .....	50
IX.	Discusión .....	53
1.	Factores que podrían haber influido en la falta de germinación. ....	55
2.	Futuras investigaciones .....	56
X.	Conclusiones .....	58
XI.	Bibliografía .....	59

## Resumen

El género *Vanilla* comprende especies de plantas hemiepífitas de alto valor económico debido a la producción de vainas con un distintivo aroma generado por la vanillina. Sin embargo, la extracción indiscriminada y la degradación de su hábitat natural amenazan su conservación. En Ecuador, la producción de *Vanilla odorata* se ha implementado en diversas provincias, incluyendo Morona Santiago; no obstante, su cultivo enfrenta limitaciones debido a la escasez de material de propagación. Esta investigación evaluó el potencial de hongos endófitos como agentes simbióticos en la germinación in vitro de *V. odorata* mediante técnicas de microbiología y biotecnología. Se aislaron 997 cepas fúngicas, de las cuales el 10,53 % presentó contaminación bacteriana. Del total restante, 213 cepas exhibieron características morfológicas compatibles con hongos endófitos. Adicionalmente, se identificaron otras especies fúngicas, incluyendo *Aspergillus niger*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.* y *Penicillium spp.*, que fueron excluidas del estudio. Aunque no se observó germinación en la totalidad de los ensayos, dos cepas indujeron cambios morfológicos en las semillas sembradas in vitro; sin embargo, el tiempo experimental limitado impidió obtener resultados concluyentes. Se recomienda que futuras investigaciones optimicen las condiciones experimentales y amplíen la caracterización de la diversidad de hongos endófitos asociados a *V. odorata*, con el fin de contribuir a su conservación y propagación sostenible.

*Palabras clave:* Hongos endófitos, biodiversidad fúngica, germinación simbiótica, orquídeas, propagación in vitro

### Abstract

The genus *Vanilla* encompasses hemiepiphytic plant species of high economic value due to the production of pods with a distinctive aroma generated by vanillin. However, indiscriminate extraction and habitat degradation threaten its conservation. In Ecuador, the production of *Vanilla odorata* has been implemented in several provinces, including Morona Santiago; however, its cultivation faces limitations due to the scarcity of propagation material. This research evaluated the potential of endophytic fungi as symbiotic agents in the *in vitro* germination of *V. odorata* using microbiological and biotechnological techniques. A total of 997 fungal strains were isolated, of which 10.53% showed bacterial contamination. From the remaining strains, 213 exhibited morphological characteristics consistent with endophytic fungi. Additionally, other fungal species were identified, including *Aspergillus niger*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, and *Penicillium spp.*, which were excluded from the study. Although no germination was observed in all the trials, two strains induced morphological changes in the seeds sown *in vitro*; however, the limited experimental time prevented the acquisition of conclusive results. Future research is recommended to optimize experimental conditions and expand the characterization of the diversity of endophytic fungi associated with *V. odorata*, in order to contribute to its conservation and sustainable propagation.

*Keywords:* Endophytic fungi, fungal biodiversity, symbiotic germination, orchids, *in vitro* propagation

## I. Introducción

A nivel mundial la familia Orchidaceae constituye aproximadamente 28,000 especies, siendo los países tropicales los que albergan mayor diversidad. (INABIO, 2023). Estas se encuentran divididas ecológicamente en dos grupos de acuerdo a su tipo de hábitat: terrestres y epífitas.

Ecuador tiene más de 4,500 especies de orquídeas, de las cuales 1,700 son endémicas (MAATE, 2023). Además, el país cuenta con cuatro de las cinco subfamilias que existen en el mundo según datos publicados por el Ministerio de Turismo (2023). Debido a esta biodiversidad el Ecuador es considerado un referente para la investigación científica. En reconocimiento a su invaluable patrimonio natural, fue declarado como el “País de las Orquídeas” (Ministerio de Turismo, 2023).

Una problemática actual en la conservación de las orquídeas es su extracción con fines comerciales y turísticos, provocando la pérdida de grandes áreas de hábitat; sumando a esto, su compleja germinación natural. Motivo por el cual, los estudios recientes se han enfocado en el desarrollo de protocolos de germinación para conservar estas especies (Pomavilla, 2018).

Dentro de la familia de las orquídeas, el género *Vanilla* destaca por su importancia económica. Esta es una planta hemiepífita, lo que significa que necesita de un tutor o soporte para crecer. Su aroma característico proveniente de la molécula de *Vanillina*, presente en sus vainas, la concentración de esta sustancia mide la calidad del cultivo.

Actualmente, la *vanilla* es considerada por muchos como el “oro verde”, debido a su alto valor en el mercado y su amplia aplicación en diversas industrias. Es la segunda especia más valiosa en el mundo, después del azafrán, gracias a su particular aroma y sabor, es utilizada por varias industrias; entre ellas la perfumería, cosmetología, gastronomía, repostería, licorería, panificación e incluso la confitería (FAO, 2018). La gran demanda mundial de vanilla ha elevado su precio en el

mercado, alcanzando aproximadamente 500 dólares por kilogramo de vainilla beneficiada (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

El cultivo de *Vanilla* en el Ecuador, se ha venido implementando desde hace varios años, tanto a nivel privado como en asociaciones: En 2019, la empresa Vainuz de Santo Domingo de los Tsáchilas exportó 300 kg de *Vainilla tahitiensis* a varios países del continente y la Unión Europea (Programa Bioeconomía, 2021).

En la Región Amazónica, los cultivos se han implementado en la provincia de Napo, con el apoyo de la Asociación Kallari (Fundación Pachamama & GIZ, 2021). Asimismo, en la provincia de Pastaza, la producción se lleva a cabo en los cantones de Mera, Santa Clara y Pastaza con la colaboración de la Fundación Pachamama, es preciso señalar que en la provincia de Morona Santiago se ha implementado en los últimos años su cultivo a cargo de pequeños productores, que han recibido capacitaciones por parte de la Fundación Pachamama y la Asociación Kallari (Fundación Pachamama & GIZ, 2021).

La producción de *Vanilla* tiene un impacto significativo en los ámbitos social, cultural, económico y ambiental. Cuando se cultiva bajo sistemas agroforestales, contribuye a la conservación de flora y fauna natural dentro del ecosistema. La necesidad de producir agroecológicamente en la actualidad es relevante, ya que mercados como el de la Unión Europea, consumen productos libres de deforestación y cultivados sin agroquímicos.

## II. Planteamiento del problema

La producción con mayor proyección futura es el cultivo de *Vanilla*, sin embargo, al ser un cultivo relativamente nuevo en la región, presenta diversas limitaciones.

La provincia de Morona Santiago, se caracteriza por su mega-diversidad, con una gran variedad de flora y fauna silvestre, siendo una de las provincias más grandes de la Región Amazónica, con una extensión de aproximadamente de 25,690 Km<sup>2</sup> (INEC, 2022). Actualmente, existen varias fuentes de producción, pero son muy pocas, debido a que sus suelos son inceptisoles, ya que las constantes precipitaciones dificultan la acumulación de materia orgánica, es por ello, que es crucial desarrollar fuentes de producción económicamente rentables, que no afecten los ecosistemas que cada vez son más degradados y que aporten a la comunidad mediante la generación de empleo. Sumando a esto, la escasez de material de propagación para el cultivo, se ha convertido en un limitante, ya que para obtener plántulas se debe sacrificar plantas en producción o extraer ejemplares silvestres, siendo necesaria la implementación de nuevas técnicas de propagación vegetativa.

Entre las técnicas biotecnológicas disponibles se encuentra la germinación simbiótica *in vitro*, una técnica que permite la propagación de plantas en un entorno controlado y estéril. Esta técnica ya ha sido empleada en *Vanilla planifolia* mediante el uso de hongos simbióticos, lo que ha demostrado ser una herramienta valiosa para mejorar la producción y la calidad de la Vainilla. Aunque las plantas epífitas son fáciles de germinar de manera asimbiótica, las pérdidas que presenta este método son altas, ya que muchas plántulas no se establecen durante la etapa de aclimatación. Actualmente, los productores no utilizan la geminación simbiótica, debido a la falta de conocimiento y acceso a la tecnología. No obstante, su implementación puede ser clave para la producción comercial y su conservación.

Es preciso señalar que esta especie podría estar en peligro de extinción, no solo por su difícil germinación sexual, sino por la destrucción de su hábitat natural y su extracción indiscriminada.

Actualmente, existen pocos protocolos validados y estandarizados para micropropagar otras especies de *Vanilla*, y una limitada disponibilidad de información sobre los mismos. Esto se debe a que la mayoría de los estudios se han enfocado en especies comerciales como: *Vanilla planifolia* y *Vanilla tahitensis*. Sin embargo, es importante desarrollar protocolos para micropropagar otras especies de vainilla, ya que esto podría ampliar las opciones para la producción y el comercio de vainilla, y promover la conservación de la biodiversidad. Es necesario profundizar en la interacción entre las especies de la familia Orchidaceae y los hongos endomicomicorrizicos, ya que son indispensables para la germinación y absorción de nutrientes, lo que resulta en plantas más sanas, vigorosas y de calidad; por lo tanto, es fundamental identificar la correlación entre el hongo-planta y mejorar los métodos de conservación de la diversidad biológica de la vainilla en la provincia. La implementación de nuevas técnicas, como la germinación simbiótica podría ser clave para aumentar la producción de plántulas y garantizar la implementación de cultivos sostenibles.

### III. Justificación

La familia Orchidaceae se encuentran muy ligadas a las micorrizas para su germinación, dicha simbiosis entre la raíz de las orquídeas y los hongos formadores de micorrizas intervendrían en la distribución y diversificación de las plantas, siendo una relación de beneficio mutuo, ya que los hongos benefician la absorción de agua, nutrientes, y otorgan resistencia al estrés hídrico y salino, protección en contra de patógenos, entre otros beneficios (Otero, Ackerman, & Bayman, 2012).

Las micorrizas agrupan diversos hongos que cumplen funciones esenciales, como la fijación de nutrientes, y agua, son bioestimulantes del crecimiento vegetal y controladores de patógenos mediante competencia, es decir las micorrizas y las vainillas no pueden estar separadas sin afectar su desarrollo (Otero, Ackerman, & Bayman, 2012).

En la actualidad, la *Vanilla* es un cultivo de gran importancia; además de ser la segunda especie exportada en el mundo. La tendencia del mercado internacional de la demanda de vaina de *Vanilla* orgánica es amplia por su excelente aroma, por lo que el uso de agroquímicos no es compatible con los estándares del mercado, es por ello que se prevé la necesidad de desarrollar sustratos agroecológicos que mejoren la calidad de la producción. En este contexto, se busca fortalecer la sostenibilidad del cultivo y su producción asegurando la rentabilidad económica y su impacto positivo en el desarrollo de las comunidades. (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

Como parte de este enfoque, se plantean varias actividades como: la captura, aislamiento, desinfección de hongos micorrízicos de la raíz de *Vainilla sp.*, con el fin de identificar hongos micorrízicos con potencial germinador de semillas y posteriormente sirvan como la base para futuras investigaciones en el campus, permitiendo el uso de herramientas biotecnológicas que permitan establecer estrategias para la propagación y conservación de este cultivo.



## IV. Objetivos

### 1. Objetivo general.

Aislar hongos micorrízicos de las raíces del género *Vanilla* (*Orchidaceae*) como potenciales germinadores simbióticos mediante técnicas de cultivo *in vitro*.

### 2. Objetivos específicos.

1. Obtener cepas de hongos micorrízicos aislados de las raíces del género *Vanilla*;
2. Establecer medios simbióticos mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*;
3. Evaluar el potencial germinativo de los hongos micorrízicos inoculados en el cultivo simbiótico mediante el registro de porcentaje de germinación.

## V. Hipótesis

Uno o dos hongos micorrízicos aislados y purificados de la raíz del género *Vanilla* tendrán potencial germinador de la semilla en cultivo *in vitro*.

## VI. Marco teórico

### 1. Vanilla

Según Dressler (1981), la planta de *Vanilla* pertenece a la familia *Orchidaceae*. Guevara & Martel (2018), describen a esta planta como perenne, trepadora llega a los 5m de altura (Fundación Pachamama & GIZ, 2021). Las plantas de la familia *Orchidaceae* se caracterizan principalmente por su asociación con los hongos micorrízicos (Alomía, 2014).

La *Vanilla* es una especia y la única orquídea que se cultiva sin fines ornamentales, se encuentra distribuida en zonas tropicales alrededor del mundo (Ballesteros & Pazmiño, 2021). De las vainas beneficiadas se obtiene la *Vanillina*, es una especia exquisita en aromas lo que la hace muy apetecida por varias industrias entre ellas la cosmetológica, alimenticia, medicinal, entre otras (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

Sánchez (2015) destaca que la producción de este cultivo requiere de muchos cuidados y al ser tan laborioso, causa en relación de su peso, a ser uno de los productos más caros a nivel mundial después del azafrán (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

### ***1.1. Tipos de Vanillas comercializables***

Las dos especies comercializadas mayormente son la *Vanilla planifolia* en un 90% de volumen a nivel mundial y *Vanilla tahitensis* (Fundación Pachamama & GIZ, 2021). Macas (2019), afirma que la *Vanilla tahitensis* se la conoce como especie pero es un híbrido, resultado del cruzamiento entre *V. planifolia* y *V. odorata*.

La *Vanilla odorata*, se encuentra a lo largo del continente tropical americano. En el Ecuador esta planta se localiza en la Región Amazónica. La especie *Vanilla odorata* está en peligro de extinción, según el registro en la lista roja de la IUCN (Romero, 2022). Es preciso resaltar que en la provincia de Morona Santiago se distribuye en varios ecosistemas naturales, en los últimos años, pequeños productores han implementado sistemas de cultivo intensivo y agroforestal (Fundación Pachamama & GIZ, 2021).

El programa de Bioeconomía implementado en la provincia de Morona Santiago permitió identificar dos especies de vainilla en su habitat natural a lo largo de la cuenca del río Upano; *Vanilla odorata* y *Vanilla Pompona*. Además, se registró la presencia de estas especies en la parroquia Chupianza, ubicada en el cantón Santiago de Méndez (Programa Bioeconomía, 2021).

## 2. Mercado

La vainilla es un producto muy apetecido comercialmente, varios países a nivel mundial optan por utilizar la vainilla dentro de su línea de producción, algunas industrias prefieren utilizar la *Vanillina* artificial por razones de costo, pero otras prefieren 100% natural (Ballesteros & Pazmiño, 2021). Sin embargo, alrededor del 10% de los productos procesados utilizan *Vanillina* natural (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

La promoción de la exportación de vainilla a través de una cadena de suministros eficiente, estrategias innovadoras y la divulgación de información a productores sobre el mercado internacional, permite potenciar el desarrollo de este sector. De esta manera los productores pueden aprovechar el conocimiento sobre el mercado potencial de vainilla a nivel internacional y aprovechar al máximo sus oportunidades de crecimiento (Ballesteros & Pazmiño, 2021). La demanda de vainilla a Nivel mundial sigue en aumento, pero la oferta es limitada, ya que no existen canales de comercialización adecuados. La dinámica del mercado juega un papel importante debido a las nuevas tendencias de consumo y oportunidades de nichos de mercado (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

En Ecuador, existen muy pocas empresas que se dedican a la producción del cultivo de vaina de vainilla y por tal razón, la cantidad producida es pequeña en comparación con la oferta de otros países (Trade Map, s.f.) De acuerdo con Espinoza (2020), la vaina tiene un alto costo debido al proceso del cultivo. Por lo anteriormente mencionado el costo de un kilogramo de la vaina puede costar entre \$180 y \$400. En nuestro país el valor recaudado al año es aproximadamente de \$54,000 (Ballesteros & Pazmiño, 2021). Las dos empresas que actualmente se encuentran en el negocio de la producción de vainilla en el Ecuador son Kallari que se encuentra en la amazonia en la Provincia del Napo y Vainuz Vainillas del Ecuador en Santo Domingo. En 2021, la vainilla se comercializó con

un total de \$973 millones, cuyo principal exportador fue Madagascar con \$619 millones (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

Anteriormente las ganancias de Vainilla en el Ecuador no superaban los \$2 millones, mientras que en el 2022 las exportaciones aumentaron y sus ingresos alcanzaron los \$40,1 millones. Los principales compradores de vainilla ecuatoriana en el 2021 fueron Estados Unidos, Lituana, Canadá, Republica Checa y Panamá. El Observatorio de Complejidad Económica- OEC, cataloga al Ecuador en el puesto número 94 de exportadores de vainilla a nivel mundial, esto quiere decir que representa el 4% en este mercado (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

A nivel mundial la *Vanilla planifolia* domina el mercado con un 90% de la comercialización. Sin embargo, la *Vanilla odorata*, está comenzando a ganar reconocimiento, de acuerdo con la experiencia de los productores locales y sus prometedoras características organolépticas. Para promover y promocionar su posicionamiento en el mercado, se busca un valor agregado a través por su denominación de origen, su cultivo agroecológico libre de deforestación y su producción a cargo de pequeños productores entre ellos los pueblos y nacionalidades, buscando fomentar la equidad de género; todas estas características pueden representar una ventaja competitiva para su consolidación en el mercado internacional. (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

### **2.1. Principales importadores de Vanilla**

Según Ballesteros & Pazmiño (2021), la vainilla es un producto altamente comercializado y demandado a nivel mundial. Aunque algunas industrias optan por utilizar esencia de vainilla artificial debido a costos, otras prefieren la vaina de vainilla totalmente natural.

Es notable que solo el 10% de los productos procesados con vainilla contienen esencia natural, mientras que el 90% restante utiliza versiones sintéticas. Además, en los últimos años, la demanda de este producto ha aumentado significativamente. En este sentido Estados Unidos lideró

la importación de vainilla en el 2017 con \$527,210 , en 2018 con \$617,524 y en 2019 con \$521,455, consolidándose como el principal importador durante estos años (Ballesteros & Pazmiño, 2021).

## **2.2. Países productores de Vainilla**

Es importante destacar que, entre las vainillas comercializadas a nivel mundial, la *Vanilla planifolia* es la más predominante, cubriendo aproximadamente el 90% del volumen total. Esta especie es originaria de México, Otra variedad notable es la *Vanilla tahitensis*, cuyo país de origen es Tahití (Fundación Pachamama & GIZ, 2021).

Al realizar un análisis comparativo entre los tres principales países productores vainilla a nivel mundial, Madagascar se destaca, en el 2016, su producción fue de 2,823 toneladas, seguido de 3,111 toneladas en 2017 y 3,102 toneladas en 2018.

Investigaciones realizadas en la producción de Vainilla en el cantón Morona de la Provincia de Morona Santiago indican un potencial significativo con una aceptación del 85,6% con una demanda actual proyectada de 7509 unidades (5cc c/u) de esencia de vainilla a una tasa de crecimiento del 7,43% anual (Rodríguez, et., al 2024).

## **3. Descripción botánica**

**Raíz:** Tiene dos tipos de raíz, subterráneas conocidas como trazadoras, se desarrollan en un radio de 8 cm. estas absorben macro y micro nutrientes del suelo (Macas, 2019). Mientras que las raíces adventicias son carnosas y alargadas, que le ayudan a sujetarse de los forofitos, poseen un tejido especial que les sirve para la absorción y retención de agua (Macas, 2019)

**Tallo:** Es flexible, con un diámetro de 0,5 cm a 1,0 cm, de forma cilíndrica de color verde brillante (Fundación Pachamama & GIZ, 2021)

Hojas: Son largas de 12 cm, su ancho es de 2 cm aproximadamente (Fundación Pachamama & GIZ, 2021). Las hojas de esta planta son acuminadas y estrechamente lanceoladas dependiendo del lugar donde se encuentren sus hojas pueden llegar a ser más cortas y anchas (Romero, 2022).

Inflorescencia: Son vistosas, sus sépalos y pétalos son de tonalidad verde amarillento, la garganta no presenta tonos de color amarillo, su pétalo inferior o labelo es de color blanco medio amarillo, los bordes son lacerados y fimbriados (Romero, 2022).

Fruto: Romero G (2022), menciona que son en forma de capsula y sincárpicos. Estas vainas subcilíndricas, de coloración verde oscuro, presentan un diámetro de 1 cm, su longitud es de 23 cm y 1,4 cm de grosor aproximadamente, puede pesar alrededor de 13,50 gramos al ser cosechada (Fundación Pachamama & GIZ, 2021).

Semillas: Las semillas de *Vainilla* no poseen endospermo, estas se encuentran dentro de la vaina, son redondas y pequeñas, su tamaño es de 0,24 a 0,33 mm, cada vaina tiene alrededor de 100,000 semillas, la fertilidad de estas depende si hubo o no polinización (Macas, 2019).

#### **4. Taxonomía**

Según la ITIS 43714 (2009) la Taxonomía de la *Vanilla planifolia* es la siguiente:

Reino: Plantae,

Subreino: Traceobionta

División: Magnoliophyta,

Clase: Liliopsida

Subclase: Lillidae,

Orden Orchidales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia; Vanilloideae

Tribu: Vanilleae

Subtribu: Vanillinae

Género: *Vanilla*

Especie: *Planifolia*. B. D. Jackson (Cornejo, 2010).

Nombre Común: Vainilla

Del mismo modo, la taxonomía de la especie de *Vanilla odorata* es la misma, esta es conocida como *Vanilla* silvestre, ya que su variedad no ha sido identificada (Fundación Pachamama & GIZ, 2021).

### **5. Hábitat de la *Vanilla odorata***

La especie *Vanilla odorata* requiere un clima tropical cálido húmedo para su óptimo desarrollo. Las temperaturas ideales para su crecimiento oscilan entre 16°C y 33°C, y se desarrolla en una amplia gama de altitudes, desde el nivel del mar hasta los 2065 msnm (Romero, 2022).

### **6. Propagación tradicional de Vainilla**

La germinación natural de semillas de *Vanilla* es extremadamente baja, lo que obliga a recurrir a técnicas de reproducción asexual para asegurar la disponibilidad de plantas. La propagación por esquejes es uno de los métodos más utilizados, pero presenta desafíos significativos, como la laboriosidad del proceso y el riesgo de enfermedades o debilitamiento de la planta madre. Como consecuencia, la escases de material de propagación no logra satisfacer la creciente demanda de plantas de vainilla, lo que representa un desafío importante para la industria (Romero, 2022).

### **7. Hongos endófitos en Orquídeas.**

Los hongos endofíticos desempeñan un papel crucial en el ciclo vital de las orquídeas, contribuyendo a su crecimiento, desarrollo y salud general. Estos hongos habitan en diversos tejidos

de las plantas, incluidas las raíces, y pueden influir en procesos como la germinación de las semillas y la tolerancia al estrés. Estudios recientes han puesto de relieve la diversidad de hongos endófitos asociados a distintas especies de orquídeas, revelando sus beneficios potenciales y su importancia ecológica.

En las orquídeas, los hongos endofíticos, específicamente los micorrízico ayudan a la germinación de las semillas, mejorando la absorción de nutrientes y el crecimiento (Rahayu et al., 2024).

La investigación ha identificado varios hongos endófitos, como especies de *Penicillium* y *Fusarium*, en diferentes especies de orquídeas, incluidas *Vanda* y *Phalaenopsis* (Rahayu et al., 2024) (Michael et al., 2023).

Los hongos endófitos pueden proteger a las orquídeas de patógenos y herbívoros, aunque algunos pueden actuar ellos mismos como patógenos latentes (Hernandez-Ramirez et al., 2023). El entorno ecológico y la composición genética de la planta huésped influyen significativamente en la distribución y estructura de la comunidad de estos hongos.

Aunque los beneficios de los hongos endófitos están bien documentados, es esencial tener en cuenta los riesgos potenciales que plantean, ya que algunos pueden no aportar ninguna ventaja e incluso podrían dañar a la planta huésped. Es necesario seguir investigando para comprender plenamente estas complejas interacciones y sus implicaciones para la conservación y el cultivo de orquídeas.

## **8. Micorrizas**

La micorriza es una simbiosis mutualista entre el micelio de un hongo y las raíces de una planta, esencial para el desarrollo y establecimiento exitoso de ambos organismos en los ecosistemas



(Alomía , 2014). Con una historia evolutiva de aproximadamente 469 millones de años (Van der Heijden et al., 1998), se estima que alrededor del 80% de las plantas forman uniones micorrízicas.

### ***7.1. Las micorrizas y su relación con las orquídeas***

Romero et al (2022), sustenta que las plantas de la familia Orchidaceae son mixótrofas; este suceso se visualiza en la germinación de la semilla y en su fase vegetativa, siendo necesaria la interacción entre la familia Orchidaceae y micorrizas, ya que hace posible la germinación de las semillas y absorción de nutrientes (Jacquemyn et al., 2017).

### ***7.2. Clasificación de micorrizas***

Según varios autores, existen diversos tipos de micorrizas en función de las estructuras, tradicionalmente se diferencia entre dos grandes grupos, las ectomicorrizas y las endomicorrizas, entre las que predominan las micorrizas arbusculares. Esta distinción se realiza básicamente en función de que las hifas de los hongos se desarrollen o no en el interior de las células corticales de la raíz. Alomía (2014), menciona que las micorrizas son clasificadas dependiendo si alrededor de la raíz de planta se forma o no una capa de hifas. Por consiguiente, la micorriza Monotropoide, las ectomicorrizas y la micorriza Arbustoide forman dicha franja fúngica, mientras que las micorrizas Arbuscular, Ericoide y Orquideoide, no establecen ese manto, pero a su vez desarrollan unas estructuras fúngicas entre o adentro de las células del córtex de la raíz intracelular (Alomía , 2014).

- **Micorriza Orquideoide**

Alomía (2014), plantea que la micorriza Orquideoide es un ejemplar específico y exclusivo de la familia Orchidaceae, el cual forma conjuntos de hifas llamadas “pelotones” en el tejido cortical.

### ***7.3 Beneficio de las micorrizas en vainilla***

Las micorrizas ofrecen un sin número de beneficios, entre ello, mejora la absorción de macro y micronutrientes (N, P, K y Ca) del suelo, por medio de hifas externas y transportadores, ubicados en los filamentos cilíndricos extra radicales (Hoyos C & Rodríguez C, 2013).

Hoyos & Rodríguez (2013), menciona que las hifas son capaces de explorar zonas del suelo de difícil acceso por los rizomas, incrementando la capacidad de absorber agua y a su vez aumentar la resistencia al estrés hídrico.

Según Aguilar & Gonzáles (2011), afirman que las micorrizas benefician a las vainillas al incrementar su resistencia ante posibles hongos patógenos existentes en el suelo gracias a su efecto antagonista. Por lo anteriormente señalado Aguilar & Gonzáles (2011), sostienen la teoría de que cuando una raíz es micorrizada es difícilmente infectada por un hongo patógeno.

## **9. Colecta de material vegetativo**

Hoyos & Rodríguez (2013), describen que para la colecta, se efectúa una exploración visual del lugar designado para la toma de muestras de las raíces. Es preciso disponer de vainillas sin contaminación por parte de patógenos, o desnutrición (Romero et al., 2022).

## **10. Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* consiste en sembrar plántulas, tejidos, células u órganos de origen vegetal en un laboratorio bajo condiciones de asepsia, minimizando el tiempo y la contaminación, consiguiendo resultados más eficientes de diferentes especies de flora, siendo una gran alternativa para la conservación (Romero, 2022).

### **10.1. Cultivo *in vitro* de Vainilla**

En la actualidad existen algunas investigaciones que han aportado varios protocolos para la micropropagación de *Vainilla planifolia* *in vitro*, los mismos que han dado resultados favorables. Flores et al (2017), resalta su estudio donde obtuvieron en 60 días el 90% de germinación de semillas inmaduras obtenidas de 9 capsulas de 10 cm de largo, de las cuales no hubo diferencias entre brotes en los dos métodos: medio semisólido y en medio líquido usando biorreactores de inmersión. Por

otra parte, Ordoñez et al., (2016) establecieron un protocolo obteniendo germinación desde los 45 a 75 días demostrando que no existió especificidad entre los tratamientos, pero el tratamiento con mayores brotes fue el de avena agar + *Rhizoctonia*.

### **10.2. Germinación simbiótica y no simbiótica de semillas**

La germinación de semillas de la familia *Orchidaceae* se realiza mediante la técnica del cultivo *in vitro*, utilizando recipientes de plástico o vidrio, con medios de cultivo específicos para su germinación y desarrollo (Molina, 2012).

- **Germinación simbiótica**

El medio de cultivo *in vitro* utilizado en esta técnica es Avena Agar, con Extracto de Levadura. En este proceso, se toma un fragmento de hongo micorrízico previamente aislado y se siembra con las semillas, esta técnica se utiliza para propagar orquídeas terrestres (Molina, 2012). El hongo se desarrolla y coloniza las semillas estableciendo una relación simbiótica con el fin de nutrir los protocormos, hasta que generen hojas y sean autotróficos (Molina, 2012).

Las plantas micorrizadas son más resistentes a condiciones adversas del medio en relación a las plantas sembradas de manera asexual. Sin embargo, el inconveniente es encontrar al hongo específico para que la simbiosis pueda ocurrir y evitar el parasitismo y muerte de las semillas (Molina, 2012).

- **Germinación asimbiótica**

Molina (Molina, 2012) destaca que esta técnica se emplea en la propagación de orquídeas tropicales las cuales crecen fácilmente a diferencia de las orquídeas de zonas templadas. Este tipo de germinación necesita de compuestos orgánicos e inorgánicos que cumplan la función del hongo micorrízico.

## VII. Metodología

### 1. Identificación de micorrizas en Vainilla

Previo al desarrollo de la investigación se gestionó los permisos respectivos emitidos por la autoridad competente, Ministerio de Ambiente Agua y Transición Ecológica (MAATE).

#### 1.1. Equipos y Materiales

**Tabla 1**

*Materiales y equipos empleados durante el estudio*

EQUIPOS	MATERIAL	MATERIAL DE CAMPO	REACTIVOS
Cámara de flujo laminar	Guantes	Alcohol al 70%	PDA
Autoclave	Cajas Petri	Agua destilada	Avena agar
Estereomicroscopio	Bisturís	Bisturí	Phytamax
Incubadora	Pinzas	GPS	Estreptomicina
Microondas	Mecheros	Cooler	Medio fim
Erien Meyer	Tubos falcom 5ml	Fundas ziploc	Azul de metileno
Balanza	Asas microbiológicas	Toallas de papel	Azul de lacto fenol
	Probeta	Fichas de información	Tetrazolium
	Puntas		

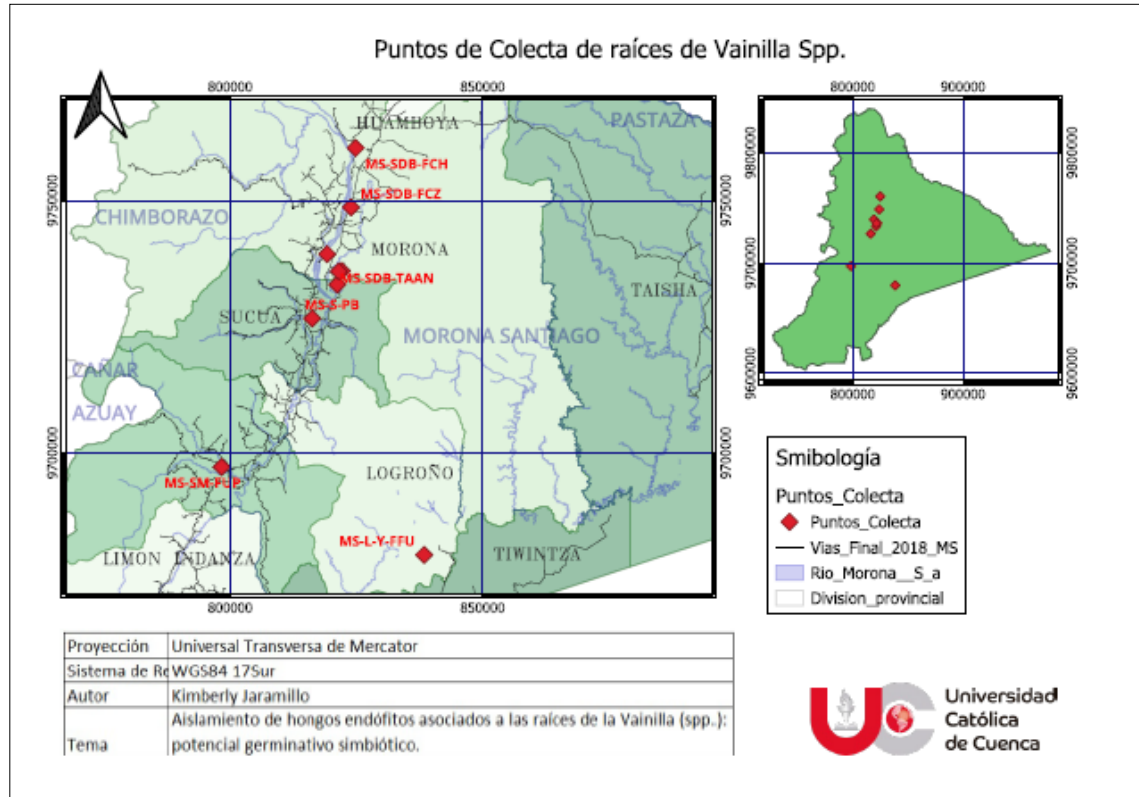
*Fuente:* Autor.

## 1.2. Métodos

- Fase de Campo

Figura 1

Mapa con los sectores de colecta



*Nota.* La figura 1 representa los lugares de donde se tomó las muestras de raíz.

### ***Colecta del material vegetativo***

#### ***Protocolo 1: Colecta Raíces aéreas***

Se colectaron hasta 3 muestras de raíces aéreas por planta, con una longitud de 5cm, cuyas terminaciones presentan una coloración verde agua o verde limón, muestreando un total de 37 plantas. Se realizó el corte con un bisturí previamente desinfectado con alcohol al 70% antes y después de cada corte, a continuación, se envolvieron en una servilleta humedecida con agua destilada, para evitar la deshidratación de la raíz. Estas se colocaron en fundas ziploc y se etiquetaron correctamente, colocando: nombre del lugar, fecha y coordenadas geográficas.

protocolo adaptado a (Salazar, 2017). Posteriormente se trasladaron en un cooler al laboratorio de Bioeconomía y Agricultura de Precisión y se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su procesamiento.

**Figura 2**

*Colecta de raíz aérea y etiquetado de planta*



A)

B)

*Nota.* El gráfico representa: A) colecta de raíces. B) etiquetado de las plantas de las cuales se tomó las muestras de raíz.

*Protocolo 2: Colecta raíz terrestre*

La raíz terrestre se encuentra en el sustrato, donde se desarrolla y crece permitiendo que la planta de vainilla se desarrolle y prospere. Se recolectaron raíces terrestres de plantas de *Vanilla odorata*, *Vanilla pompona*, *Vanilla planifolia*, spp, las mismas que se encuentran ubicadas en fincas del Valle del Upano, de la provincia de Morona Santiago, las coletas de raíz se realizan durante varias salidas de campo en un periodo de un año.

El corte de raíz terrestre se realizó empleando un bisturí esterilizado, posteriormente estas se envuelven en una servilleta y se colocan dentro de una funda ziploc debidamente etiquetada y se trasladan al Laboratorio de Bioeconomía y Agricultura de Precisión la Universidad Católica de

Cuenca sede Macas, las muestras eran transportadas dentro de un cooler con bolsas de gel refrigerante para mantener la cadena de frío. adaptado de Alomía (2014).

- **Fase de laboratorio**

***Desinfección de raíces***

***Protocolo 3: Desinfección raíces áreas***

La desinfección de las raíces aéreas se realizó mediante un lavado con agua corriente, para retirar las impurezas, seguido de la adición de Tween 20 para asegurar una correcta distribución del agente tensioactivo. Posteriormente se realizaron tres enjuagues.

La desinfección se llevó a cabo con una solución compuesta por 5ml de etanol al 96% y 5ml de hipoclorito de sodio al 5%, aforada a 100 ml con agua destilada, y se dejó actuar durante 1 minuto. Finalmente, se filtró y enjuagó tres veces con agua destilada estéril dentro de la cabina de bioseguridad para eliminar residuos del desinfectante. (Salazar, 2017).

**Figura 3**

*Desinfección de raíz aérea*



A)

B)

*Nota.* El gráfico representa: A) Colocar Tween 20 para lavar las raíces. B) Enjuague de las raíces.

*Protocolo 4: Desinfección raíces terrestres*

Las raíces terrestres de vainilla se lavaron utilizando un cepillo de dientes, con agua corriente y tween 20, inmediatamente se cortaron en segmentos de 5cm y se procedió a desinfectar con etanol al 70% por 30 segundos, después se colocó cloro al 1% por 3 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril por tres veces dentro de la cabina de flujo laminar.

**Figura 4**

*Desinfección de raíz terrestre*



A)

B)

*Nota.* Este grafico representa A) Cepillar la raíz con un cepillo cuidadosamente. B) Lavar las raíces agitando con agua y tween 20.

***Aislamiento de hongos endófitos de raíz de vainilla***

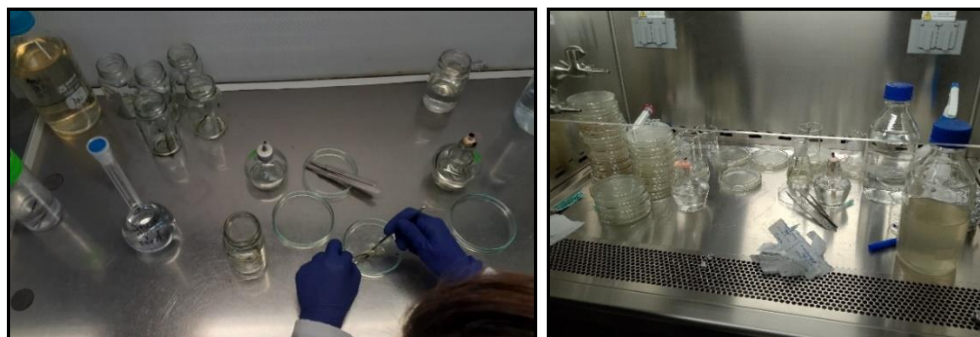
*Protocolo 5: Aislamiento de hongos endófitos*

Una vez desinfectadas las raíces, se colocaron en una caja Petri de vidrio y se realizó cortes en pequeños trozos o segmentos de raíz, con la finalidad de liberar los hongos micorrízicos, después se adicionó el medio Fungal Isolated Media (FIM) (Anexo 1) enriquecido con Estreptomicina para evitar la proliferación de bacterias. Culminada la siembra se procedió a sellar la caja con para film y se incubó a 30°C en oscuridad por 24 horas (Salazar, 2017).



### Figura 5

#### Aislamiento de Hongos de raíz de vainilla



A)

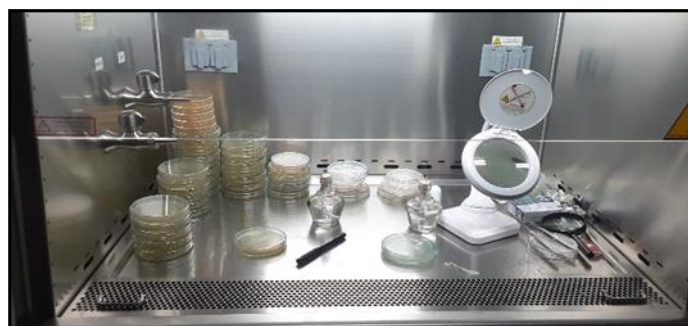
B)

*Nota.* El gráfico representa, A) Corte de la raíz. B) Sellado de cajas Petri.

De la caja Petri sembrada inicialmente, la muestra se separó y subcultivó los hongos, colocándolo inmediatamente un pedazo de medio con presencia de micelio a una caja Petri con agar PDA enriquecido con estreptomicina. Se selló y se incubó a 25°C, revisando el crecimiento diario y registrando las novedades.

### Figura 6

#### Aislamiento de hongos en PDA



*Nota.* El gráfico representa los hongos aislados de raíces de vainilla en el medio de cultivo PDA.

#### **Desinfección de vainas**

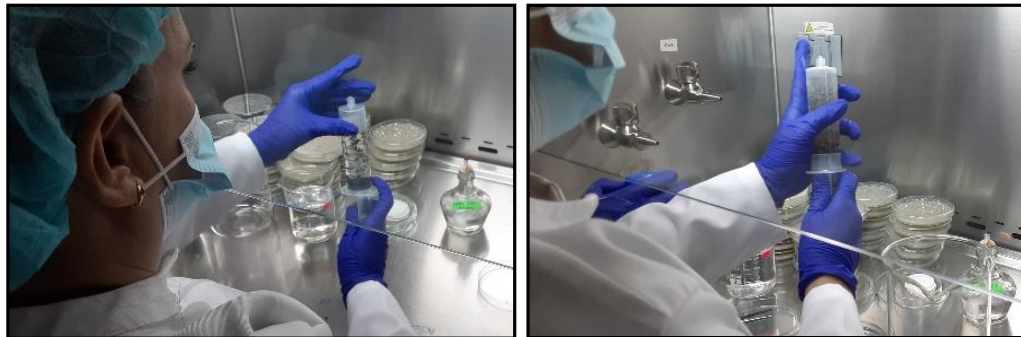
La germinación Simbiótica se realizó utilizando semillas de vainas de vainilla que habían alcanzado la madurez fisiológica.

Protocolo 6: Desinfección vainas de color verde

La desinfección de semillas se realizó usando cloro al 2% por 10 segundos ejerciendo presión con una jeringa plástica, las semillas se enjuagaron 3 veces usando agua destilada estéril (Salazar, 2017).

**Figura 7**

*Desinfección de semilla inmadura*



A)

B)

*Nota.* El siguiente gráfico A) y B) representa la desinfección de la semilla inmadura.

Para este ensayo se utilizó dos protocolos de escarificación de la semilla, con cloro y flameación.

**Figura 8**

*Desinfección de vainas inmaduras*



*Nota.* El gráfico representa las vainas de vainilla sumergidas en agua destilada estéril y tween 20.

Protocolo 7: Desinfección de semillas de vainas verdes y escarificación con Cloro

La desinfección se realizó colocando las semillas extraídas, dentro de un vaso de precipitación y colocando en cloro al 4% durante 80 minutos, posteriormente se sumergieron en etanol al 70% durante 5 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril.

**Figura 9**

*Desinfección de semillas con hipoclorito*



*Nota.* El gráfico representa la desinfección de semillas de vainilla sumergidas en hipoclorito.

Protocolo 8: Flameación de vaina verde

Se colocó las vainas de Vainilla dentro de un vaso de precipitación de 2000ml con agua destilada estéril con unas pocas gotas de Tween 20 y durante 10 minutos (ver, figura 8) y 3 lavados con agua destilada estéril. Dentro de la cabina de flujo laminar se sumergió la vaina en alcohol al 96% e inmediatamente se flameó, se repitió este proceso 3 veces.

**Figura 10**

*Flameación de vaina verde*



A)

B)

*Nota.* Figura A y B flameación de vainas verdes.

*Protocolo 9: desinfección de semillas de color café*

El protocolo de desinfección de semilla en este ensayo fue el de escarificación con cloro, siendo la única diferencia, el utilizar semillas de vainas que presentan coloración café, en lugar de las vainas de color verde; las semillas se colocaron dentro de un vaso de precipitación y se adicionó cloro al 4% por 80 minutos, posteriormente se sumergieron en etanol al 70% durante 5 minutos y finalmente se realizó 3 enjuagues con agua destilada estéril dentro de la cabina de bioseguridad.

**Figura 11**

Desinfección de vainas cafés



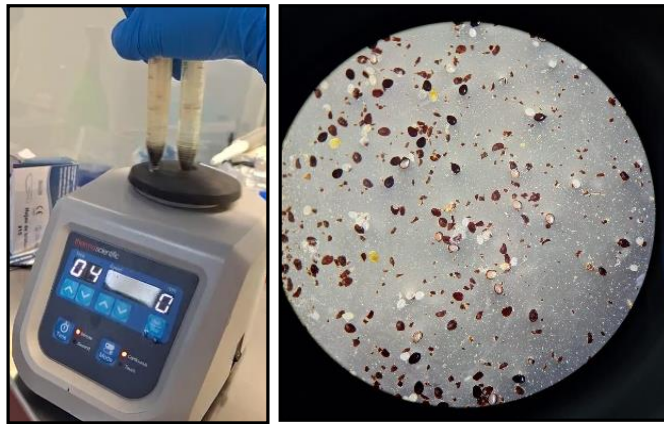
A)

B)

*Nota.* El gráfico representa: A) Corte longitudinal de la vaina madura. B) Colocación de las semillas de la vaina madura en un recipiente para realizar la desinfección

**Protocolo 10: Escarificación con Lija**

Se lavaron las vainas de vainilla con agua destilada estéril y tween 20, se enjuagaron y se colocaron en cloro al 3% por 15 minutos, dentro de la cámara de bioseguridad se realizó un corte transversal de la vaina para extraer las semillas, estas se depositaron sobre un pedazo de papel lija de agua número 360, se adicionaron unas gotas de agua destilada estéril y se procedió a friccionar suavemente con delicadeza por 1 minuto hasta retirar la testa. Culminado este proceso, las semillas se colocan dentro de un tubo falcom de 50ml con agua destilada estéril, se continúa con tres lavados con alcohol al 95% y se centrifugo a 400 rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante de semillas, se lavó con cloro al 3 % más una gota de tween 20, se agitó empleando un vortex durante 5 minutos, finalmente se enjuagan las semillas con agua estéril. Para la siembra después del proceso de desinfección se agrega a las semillas agua destilada estéril.

**Figura 12***Escarificación con lija*

A)

B)

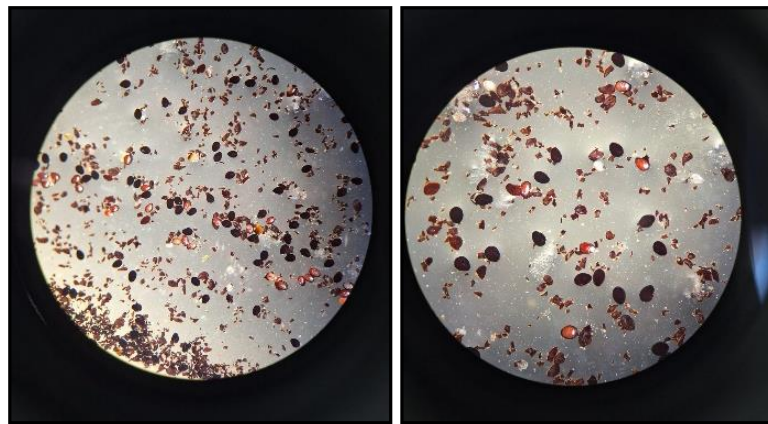
*Nota.* El grafico representa: A) Desinfección de semillas en el Bortex para eliminar el mucilago. B) Semillas desinfectadas y escarificadas.

**Protocolo 11: Viabilidad de Semillas de Vainilla**

Para garantizar la viabilidad de las semillas después de realizar el protocolo de desinfección y la escarificación se colocó una porción de las semillas en tubos de Eppendorf de 1,5 mL, se añadió sal de tetrazolium al 1%, hasta conseguir un volumen de 1mL. Utilizando papel aluminio se cubrieron los tubos por 48 horas, culminado este periodo se procedió a revisar con la ayuda de un microscopio las semillas. Los embriones viables de vainilla se colorearon de rosa intenso y los que no eran viables no se tiñeron.

### Figura 13

*Tinción de semillas con tetrazolium*



A)

B)

*Nota.* El grafico representa: A) y B) Tinción de semillas de vainilla con tetrazolium.

### ***Siembra simbiótica de vainilla***

#### *Protocolo 12: Siembra de semillas de vainas verdes*

Se sembraron las semillas desinfectadas en cajas Petri que contenían medios de cultivo diferentes; Phytamax suplementado con sacarosa 30 g/l y Avena Agar sin adición de sacarosa, usando un asa de laboratorio como medida de siembra para cada caja dentro de una cabina de flujo laminar para garantizar la asepsia.

A las cajas que contenían el medio de cultivo Avena Agar se inoculó 1cm, cuadrado de agar PDA que contenía crecimiento fúngico previamente aislado de las raíces, se cubrieron con papel aluminio y se incubaron a 32°C. Estas se revisan cada dos días para controlar el crecimiento y si presentan contaminación.

**Figura 14***Siembra de semillas de vainas verdes*

A)

B)

*Nota.* El gráfico representa: A) Siembra de un pedazo de hongo con semillas de vaina verde, por flameación. B) Siembra de un pedazo de hongo con semillas de vaina, por escarificación.

*Protocolo 13: Siembra de semillas de vaina madura*

Una vez que las semillas de vainilla fueron desinfectadas con cloro al 4% y etanol al 96%, se enjuagaron con agua destilada dentro de la cámara de bioseguridad y se procedió a la siembra con la ayuda de una micropipeta colocando 100 microlitros por 3 ocasiones. Se agregó un pedazo de medio de cultivo PDA con crecimiento fúngico, en medio Phytamax y Avena Agar, se envolvieron con papel aluminio y se incubaron a 30°C durante 90 días.

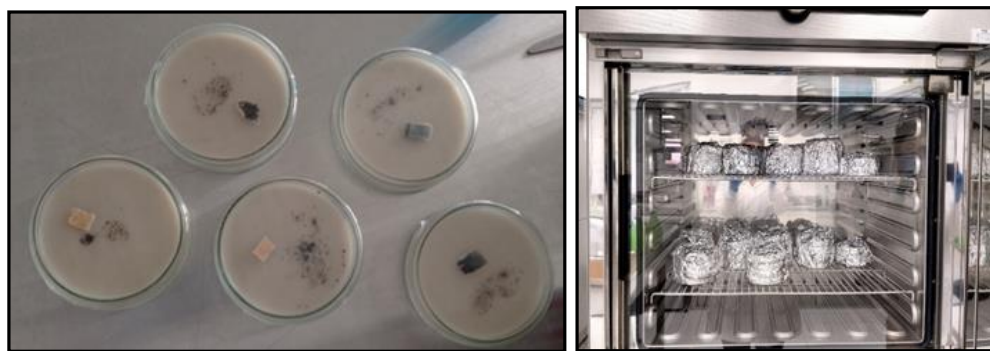
Para esta parte del estudio, se usó la técnica de siembra con pipeteo.

Se seleccionaron 72 hongos que se fueron inoculando a las cajas Petri que contenían las semillas previamente en los medios de cultivo Avena agar y Phytamax para los testigos, se envolvieron con papel aluminio y se incubaron 32°C por 90 días en la estufa.



**Figura 15**

*Siembra de semillas maduras*



A)

B)

*Nota.* El gráfico representa: A) Siembra de un pedazo de hongo con semillas maduras. B) Siembras de envueltas en papel aluminio y puestas en incubacion a 32°.

## VIII. Resultados

A continuación, se presenta los resultados de la investigación de acuerdo a los objetivos planteados.

El proceso de desinfección tanto de las raíces aéreas como terrestres permitió que durante esta investigación se cuente con un total de 213 cepas de hongos que presentaron características morfológicas de hongos micorrízicos y 679 que no presentaron las características. Teniendo un total de 997 hongos aislados y un porcentaje de contaminación de 10,53% de hongos contaminados, ver figura 16.

### 1. Desarrollo de protocolos de desinfección de raíces

La investigación sugiere que mantener los niveles de contaminación del 10% es deseable para una micropropagación eficaz, ya que tasas más altas pueden conducir a pérdidas sustanciales y una viabilidad reducida de las plantas (Jiménez Gonzales, A et., 2017).

### 2. Aislamiento de hongos endófitos.

#### 2.1. *ENSAYO # 01*

En este ensayo, se aislaron un total de 95 cepas de hongos, algunas presentaron contaminación, pero las que mostraron características similares a los hongos endófitos con potencial micorrízicos sembraron con la semilla.

De los 95 hongos aislados 59 muestras fueron descartadas debido a presencia de bacterias y el crecimiento del micelio no tenían semejanza a los hongos micorrízicos.

En este ensayo, se aislaron un total de 95 cepas, 31 hongos aislados presentaron contaminación, pero las que mostraron características similares a los hongos endomicorrizicos se sembraron con la semilla.

De los 95 hongos aislados 59 muestras fueron descartadas debido presencia de bacterias y el crecimiento del micelio no se parecían a los hongos endomicorrízicos.

Las 36 muestras de hongos presentaron las características de crecimiento como hongos endomicorrízicos,

Para este ensayo se utilizó el protocolo 1 de colecta para raíz aérea adaptado.

## **2.2. Ensayo # 02**

Las muestras de raíces colectadas de tres lugares, de estas. Se aislaron un total 145 muestras de hongos, 62 de ellas fueron descartadas debido a que estas presentaban bacterias y las características del crecimiento del micelio y estructuras no correspondía a los hongos a investigar. 41 muestras de hongos presentaron las características de crecimiento radial tal y como la literatura caracteriza a los hongos micorrízicos.

## **2.3. Ensayo # 03**

En este ensayo se utilizó el protocolo 1 de colecta de raíz aérea y el protocolo 2 de colecta para raíces terrestres.

En este ensayo se colectaron raíces de 6 fincas, 1 parque Botánico y 1 Asociación Tsapau.

El protocolo de desinfección de raíz aérea para este ensayo fue el protocolo 3 y el protocolo 4.

Se aislaron alrededor de 500 hongos de los cuales se descartaron 426, de estos 8 aislamientos se contaminaron con bacterias y los 420 se descartaron por no presentar las características de hongos endófitos, solo 72 cepas presentaron características de hongos endomicorrízicos.

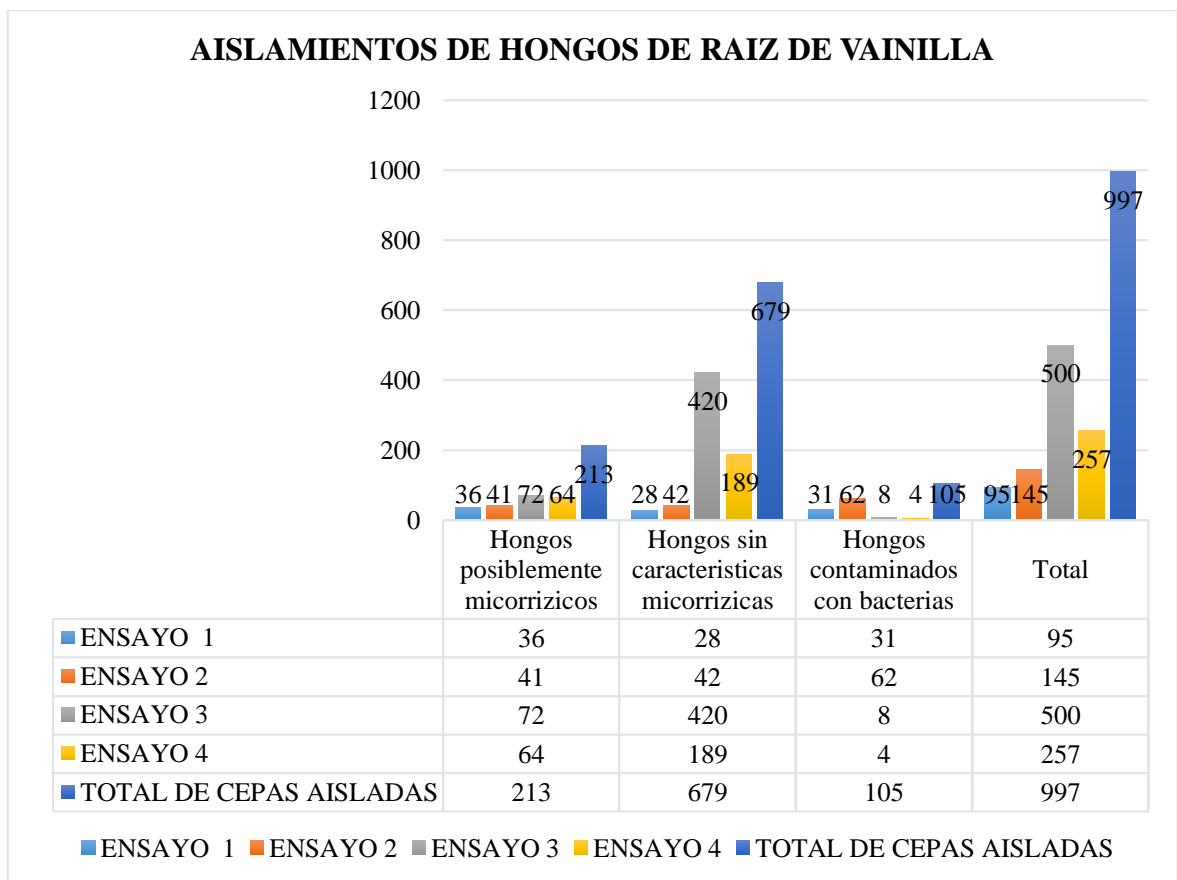
## **2.4. Ensayo # 04**

Para este último ensayo las raíces colectadas fueron tomadas de acuerdo al protocolo de colecta para raíz aérea ,adaptado de Salazar (2017) y el protocolo de colecta para raíz terrestre adaptado de Alomía (2014).

Para este ensayo se determinó realizar la colecta de raíces de vainilla, en dos fincas. Se escogieron un total de 257 cepas de hongos por su crecimiento radial. Además de presentar hifas tabicadas que fueron observadas a través del microscopio usando la tinción azul de lacto fenol y azul de metileno que sirvió para seleccionar 64 cepas fúngicas por presentar características de hongos endófitos micorrízicos.

**Figura 16**

*Aislamientos de hongos endófitos de raíz de vainilla*





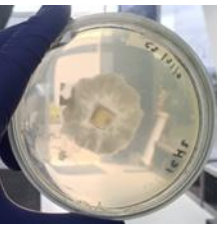

*Nota.* El gráfico representa los aislamientos de hongos durante cada ensayo. El total de cepas puras con características de hongos micorrízicos, los hongos sin características micorrízicas, el total de hongos contaminados con bacterias y el total de hongos realizados durante todos los ensayos.

Se realizaron varios aislamientos de hongos utilizando varias colectas de raíces de orquídeas. Aunque se aislaron varios hongos, no se obtuvo el hongo específico que germine las semillas de

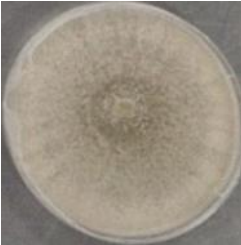


vainilla odorata. Se utilizaron diferentes raíces de *Vanilla*, incluyendo: *V. planifolia*, *V. odorata*, *V. pompona*.

**Tabla 2**

Cepas con características de hongos endófitos utilizados para la siembra con la semilla.

CÓDIGO	CEPAS PURAS	DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA	ESPECIE DE VAINILLA	CRECIMIENTO EN DÍAS
1AH4		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado Apariencia algodonoso	<i>Vanilla Planifolia</i>	2 días
1CH5		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado Apariencia algodonoso	<i>Vanilla planifolia</i>	2 días
5HC1		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen plano Apariencia aterciopelado	<i>Vanilla odorata</i>	2 días
WM1.5H2		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen plano Apariencia afelpado	<i>Vanilla odorata</i>	5 días

---




M1.10H4		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen plano Apariencia aterciopelado	<i>Vanilla pompona</i>	4 días
SLM4H4.1		Color blanco gris, Crecimiento radial, Forma circular, Margen un poco elevado Apariencia afelpado	<i>Vanilla odorata</i>	4 días
M1.1H1		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen plano Apariencia aterciopelado	<i>Vanilla odorata</i>	7 días
M6.1HD		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado Apariencia afelpado	<i>Vanilla odorata</i>	5 días
SLM4,2H4		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen plano Apariencia afelpada	<i>Vanilla odorata</i>	8 días
TAAM1.1H1		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen plano Apariencia afelpada	<i>Vanilla pompona</i>	4 días

---

---

M3H4		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado Apariencia afelpada	<i>Vanilla pompona</i>	8 días
M1.3H2(A)		Color negro, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado Apariencia afelpada	<i>Vanilla odorata</i>	8 días
SLTARTM1		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado Apariencia afelpada	<i>Vanilla odorata</i>	7 días
YPRTM1H2		Color negro, Crecimiento radial, Forma circular, Margen plano Apariencia aterciopelada	<i>Vanilla odorata</i>	8 días
TAAM2		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado Apariencia afelpada	<i>Vanilla pompona</i>	5 días
M1.1H8		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen plano Apariencia aterciopelada	<i>Vanilla planifolia</i>	5 días

---

RTM4H1		Color blanco, Crecimiento radial, Forma irregular, Margen elevado, Apariencia afelpada	<i>Vanilla odorata</i>	3 días
YPM1.6H2		Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado, Apariencia aterciopelada	<i>Vanilla odorata</i>	5 días
F6P4H8		<b>Color blanco, Crecimiento radial, Forma circular, Margen elevado, Apariencia aterciopelada</b>	<i>Vanilla odorata</i>	<b>3 días</b>

Fuente: Autor.

*Nota:* El gráfico representa un ejemplo de cepas de hongos con su respectiva identificación, sus características macroscópicas y el número de días.

### 3. Germinación simbiótica

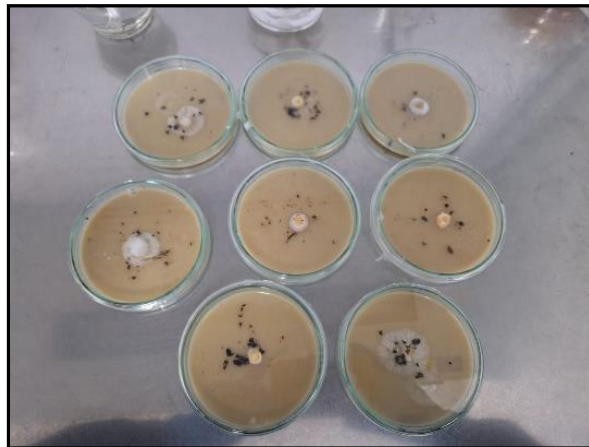
Después de las pruebas morfológicas y escogiendo los hongos que presentaban características de los géneros de hongos endófitos asociados a las raíces de orquídeas, se realizaron pruebas de germinación simbiótica con 213 hongos.

En el caso del proceso de desinfección de las vainas tanto en estado maduro, como inmaduro, permitió contar con semillas para la fase de germinación simbiótica. El porcentaje de germinación fue de 0% y básicamente se presentó contaminación bacteriana.



**Figura 17**

*Semillas sembradas en medios de cultivo*



*Nota.* El gráfico representa una muestra de siembras de hongos aislados con las semillas de vainilla a los 15 días.

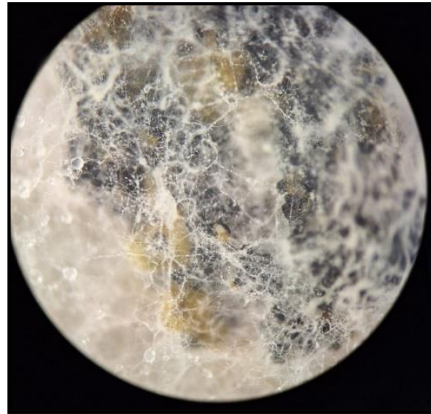
### **3.1. Siembra de semilla de vainas inmaduras**

En los Ensayos 1 y 2 se sembraron las cepas de hongos usando vainas inmaduras. En el ensayo **(E1)** Se recalca que, a los 3 días de haber inoculado el hongo con las semillas, el hongo cubrió todas las semillas sin posibilidad de poder observar la germinación simbiótica **(GS)**.

La segunda siembra se realizó con los nuevos hongos aislados del Ensayo # 02, para esta prueba de germinación se utilizó dos protocolos de desinfección de semillas, el de escarificación con cloro y el de flameación. De las 41 muestras sembradas en avena agar, transcurrido un mes, los hongos cubrieron en su totalidad a las semillas y solo una siembra presentaba características positivas M5CH5 (F), pero a la semana el hongo cubrió abrasivamente a la muestra.

**Figura 18**

*Hongo M5CH5 (F)*



*Nota:* La figura representa, la siembra del hongo con la semilla M5CH5(F), cuya codificación significa Muestra 5C hongo 5 por flameación.

### **3.2. Siembras de semillas de vainas maduras**

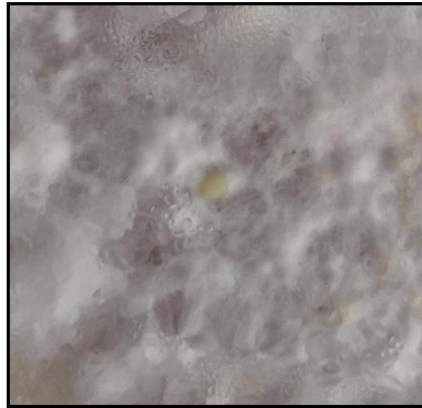
Después de no tener resultados positivos en las dos primeras siembras y al haber revisado más investigaciones se decidió realizar nuevas colectas. Las siembras se revisaban cada 15 días y no presentaban contaminación.

De los 72 hongos sembrados con la semilla 6 hongos presentaron crecimiento abrasivo, otros no cubrían a la semilla, y otros no presentaron crecimiento.

Entre los resultados esperados posiblemente positivos con referencia al potencial como hongos micorrízicos, se obtuvo que la cepa con código TAAM M2 H1, a los 75 días de la siembra presentaron cambio de coloración en la semilla y crecimiento (ver figura 21), sin embargo, por el tiempo no se pudo definir y continuar con el proceso de crecimiento.

**Figura 19**

*Siembra TAAM M2 H1*



*Nota.* El gráfico representa, siembra TAAMM2H1, cambio de coloración en la semilla.

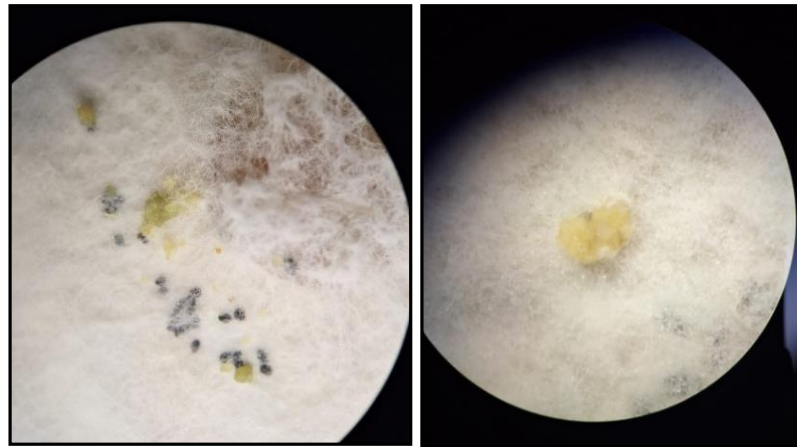
Para esta última siembra se utilizó. El protocolo de desinfección de semilla por escarificación con lija, una porción de semillas de vainilla escarificada se la tinsionó con tetrazolium para constatar que la semilla sea viable; en 48 horas las semillas colocadas en tetrazolium se tornaron de una coloración rosada lo que indicaba que aparentemente eran factibles (Ver Figura 13).

A los 62 días de la siembra una caja presentó el crecimiento de protocormos, y se colocaron a cada uno en una caja Petri con un pedazo de hongo lo que ocasionó que el hongo se active y cubra en su totalidad a las semillas.

Finalmente se puede decir que de las muestras de hongos aisladas y sembrados con la semilla solo dos presentaron presencia de protocormos de coloración verde agua.

**Figura 20**

*Siembra de hongo con semilla de vainilla*



A)

B)

*Nota.* El gráfico representa: A) y B) La presencia de posibles protocormos en la siembra.

La micoteca cuenta con una colección de 108 cepas de hongos para la Conservación de la Biodiversidad Ruth Moore.

## IX. Discusión

Es importante destacar que la tasa de contaminación de los aislamientos en nuestro estudio fue de 10,53% lo que sugiere que la técnica de aislamiento utilizado fue efectiva en minimizar la contaminación. Esto está en línea con los resultados obtenidos por Salazar (2017) quien utilizó la técnica de desinfección de raíces; en su Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional el Cajas.

Pese a que en este estudio no se obtuvo germinación de semillas de *Vanilla odorata* utilizando hongos endófitos de la raíz de Vanilla, existen estudios previos que han reportado resultados positivos en este sentido.

Por ejemplo Alomía (2014) encontró que cepas de hongos endófitos de raíces de *Vanilla* fueron capaces de germinar semillas de *Vainilla calyculata* y *Vanilla rivasii*, esta última presentó índices mayores de germinación. De manera similar Stewart & Zettler (2002), utilizaron cepas del género *Ceratorhiza*, aisladas de las orquídeas *H. quinquiseta*, el resultado de esta germinación fue superior al 60% en semillas de orquídeas *Habenaria repens* así como en *Habenaria macroceratitis*. Estos resultados sugieren que la capacidad de los hongos endófitos para germinar semillas de la familia *Orchidaceae* puede variar dependiendo de la cepa y las condiciones experimentales. Sin embargo, en este estudio no se encontraron resultados significativos en ese sentido.

Aunque se esperaba que la relación entre el hongo micorrízico y la semilla de *Vanilla odorata* promoviera la germinación, nuestros resultados mostraron que no hubo germinación en ninguna de las condiciones evaluadas, esto podría deberse a que no se obtuvo la presencia de un hongo adecuado que promueva la germinación de semillas de orquídeas con un hongo específico, como lo señala Otero et al., (2012) que la especificidad del hongo puede variar entre las especies, Masuhara &

Katsuya, (1994), dicen que bajo condiciones *in vitro* esto puede variar, ya que los hongos que normalmente en el ambiente no se relacionen con la semilla, en condiciones de laboratorio estos pueden promover la germinación (Rasmussen, 2002). Esto contrasta con los resultados de Alomía (2014), quien reporto una tasa de germinación de semillas de *V. calyculata* y *V. rivasii* pero no se logró germinar las semillas de *Vanilla odorata*, así mismo señalo que la *Vanilla odorata* tiene un índice de 49% de germinación lo que dificulta la misma, esto se puede deber a que las semillas de *Vanilla odorata* tienen una cubierta muy dura a diferencia de las demás *Vanillas* y orquídeas.

A pesar que solo dos cajas presentaron indicios de formación de protocormos, no se pudo observar germinación debido al tiempo limitado en la investigación. Es importante destacar que la germinación de semillas de vainilla es un proceso lento y requiere de varios factores para que se consiga la germinación como lo es la humedad, temperatura, luz, así como lo explica Ziv, Schwartz, & Fleminger, (1987) en su investigación en la cual explica las implicaciones de esto y lo complicado de este estudio.

Si bien es cierto al trabajar con organismos vivos el tiempo es un factor determinante para el éxito en una investigación, ya que depende de varias cosas como se mencionó desde el principio, el hongo adecuado para que se establezca la simbiosis, la viabilidad de las semillas, además de los nutrientes adecuados del medio de cultivo, son consideraciones que se deben tomar en cuenta y que interfieren en el éxito del estudio.

De acuerdo con (Alomía , 2014), las semillas de *V. odorata* presentan una testa demasiado dura, lo que hace un poco difícil la penetración del hongo impidiendo la simbiosis entre el hongo-semilla, a diferencia de la *V planifolia* y las orquídeas terrestres como se muestra en el estudio de (Navarro, Martínez , Salmeron, Pedraza , & Chávez, 2025).

Finalmente se puede decir que se aislaron 997 hongos, de los cuales se escogieron 213 para ser inoculados con la semilla, por presentar hifas tabicadas, crecimiento radial y coloración del

micelio, características que presentan los hongos del género *Tulasnella* y su a *Ceratobasidium* (Alomía , 2014), pero al final solo 2 hongos mostraron actividad (TAANM2H1 y RUV5H2R). Sin embargo, los cambios morfológicos que se presentaron en las semillas, no fueron suficiente evidencia para asegurar que la hipótesis fue positiva, por el contrario, esto nos deja aún más inquietudes y motivación para continuar trabajando en este estudio, con el fin de comprender cómo germina o que es lo que requiere este tipo de semillas. Siendo una de las principales metas lograr su germinación y obtener plantas nuevas y más fuertes filogénicamente.

Otro punto que analizar según Otero., et al. (2012) en su estudio las características morfológicas de los hongos micorrízicos, el destaca que los hongos especializados en la germinación muchas veces solo están en plantas *in situ* y llega a la conclusión de que los hongos germinadores a veces pierden o no llegan a estar presentes en vainillas que han sido trasplantadas, esto podría ser una de las limitantes en nuestro estudio ya que por motivos de permisos ambientales y la escasees de plantas autóctonas de vainilla que antes encontrábamos en la cuenca del rio Upano no se pudo contar con estas muestras de raíces y más bien por eso se optó por utilizar plantas de vainilla que fueron trasplantadas en las fincas donde se llevó la colecta de raíz.

En general varios autores señalan que la presencia de hongos micorrízicos puede ser beneficiosa para la germinación y crecimiento de semillas de la familia Orchidaceae. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar la cepa específica de hongos y las condiciones óptimas para obtener mejores resultados.

### **1. Factores que podrían haber influido en la falta de germinación.**

Incompatibilidad entre el hongo y la semilla, es posible que los hongos aislados en nuestro estudio no sean compatibles con las semillas de vainilla, debido a que se necesita un hongo específico que sea compatible con la semilla para que exista la germinación, como lo explica (Ordoñez et al.,

2016). En nuestro estudio se esperaba que la semilla una vez que se encuentra con el hongo vaya cambiando su morfología y cumpla con las etapas de germinación normal.

Es fundamental evaluar la viabilidad de las semillas, antes de iniciar el proceso de germinación, ya que esto garantiza un resultado exitoso y optimiza las posibilidades de obtener plantas saludables y vigorosas, al verificar la viabilidad, se asegura que se están utilizando semillas de alta calidad, lo que evita pérdidas de tiempo, recursos y aumenta la eficiencia del proceso. En nuestro estudio pudo haber influenciado mucho la calidad de la semilla, a pesar que se realizó la tinción con tetrazolium para aseverar su viabilidad como lo realiza Alomía (2014), en su investigación. En este se explica el proceso de escarificación con lija y posteriormente se aplica el tetrazolium para detectar la actividad metabólica de las células vivas de las semillas mediante la reacción química que tiñe de rojo o rosado las áreas viables. Pero en las semillas de vainillas se puede decir que esta técnica es poco efectiva debido a que son semillas escleróticas con una testa muy gruesa y de color negro es por esto que se las escarifica con una lija número 360 para retirar la testa de la semilla.

A pesar de obtener resultados favorables con respecto al proceso de germinación, el estudio proporciona información valiosa sobre diversidad de hongos presentes en la raíz de vainilla y las condiciones de siembra que se utilizaron. esto puede ser útil para futuras investigaciones en este campo.

## **2. Futuras investigaciones**

Será beneficioso que estudios futuros se enfoquen en evaluar la compatibilidad de los hongos aislados y la semilla de vainilla.

Optimizar las condiciones de siembra para la semilla. Evaluar la calidad de semilla y su capacidad para germinar.



Investigar la competencia entre los hongos asilados y otros microorganismos presentes en el medio de siembra.

## X. Conclusiones

En conclusión, esta investigación ha demostrado que los dos protocolos de desinfección utilizados para el aislamiento hongos endófitos de raíz aérea y terrestre fueron positivos, lográndose aislar un total de 997 hongos, y se sembró 213 hongos con crecimiento radial entre ellos los de coloración, blanca, beige, gris y negro de los cuales solo 2 siembras (TAANM2H1 y RUV5H2R) presentaron cambios morfológicos en la semilla que podría deberse a la posible presencia de protocormos, por lo que se sugiere realizar más pruebas de germinación con los hongos aislados y nuevas semillas.

Dentro de los aislamientos realizados, por su morfología pudimos identificar cepas que correspondían a los hongos: *Fusarium rosado*, *Fusarium negro*, *Fusarium blanco*, *Trichoderma spp*, *Aspergillum*, *Aspergillus niger* *Penicillum*, y algunas levaduras.

En la micoteca Ruth Moore del CIITT, se han preservado 108 cepas de hongos.

## XI. Bibliografía

- Aguilar, J., & Gonzáles, D. (2011). *Las micorrizas, nuestras aliadas ocultas*. (La vida en la tierra) Obtenido de [http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Ferti/Ferti\\_2004\\_17\\_9\\_13.pdf](http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Ferti/Ferti_2004_17_9_13.pdf)
- Alomía, Y. (2014). *Hongos micorrízicos en Vanilla spp. (Orchidaceae) y su potencial para la germinación de semillas*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Palmira - Colombia. Obtenido de <http://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21630/38603857.pdf>
- Ballesteros, M., & Pazmiño, S. (2021). *Potencial exportable de vainilla de la subpartida arancelaria 09051000 hacia la Unión Europea en el periodo 2015-2019*. Tesis de grado, ESPE Universidad de las Fuerzas Armadas, Quito - Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec>
- Cornejo, Y. (20 de Septiembre de 2010). *Aislamiento identificación y potencial micorrizico de hongos endorrizoféricos en la orquidea Vanilla planifolia Jacks y ex Andrews*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo. Obtenido de <https://repositorio.chapingo.edu.mx>
- Dressler, R. L. (1981). The orchids: natural history and classification. *Cophy right*, 332.
- Espinoza, M. (5 de Febrero de 2020). Vainuz produce vainilla en Santo Domingo y ya empezó a exportar. *Líderes*. Obtenido de <https://www.revistalideres.ec>
- FAO. (2018). *Food and Agriculture Organization of Unuted Nations*. Obtenido de <http://www.fao.org>
- Flores et al. (2017). *Germinación in vitro de semillas de Vanilla planifolia Jacks y comparación de métodos de micropropagación*. Obtenido de [mtgarnao1@hotmail.com](mailto:mtgarnao1@hotmail.com)
- Fundación Pachamama & GIZ. (2021). *Guía para el manejo de Vainlla Amazónica: Sistema Chakra*. Quito, Ecuador.

Guevara, E., & Martel, J. (Noviembre de 2018). *Producción y comercialización de Vainilla orgánica*. Tesis de grado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla. Obtenido de <https://repositorioinstitucional.buap.mx>

Hernandez-Ramirez, F., Damon, A., Fernández Pavía, S. P., Guillén-Navarro, K., Iracheta-Donjuan, L., Zarza, E., & Castro-Chan, R. A. (2023). Community Richness and Diversity of Endophytic Fungi Associated with the Orchid *Guarianthe skinneri* Infested with “Black Blotch” in the Soconusco Region, Chiapas, Mexico. *Diversity*, 15(7), 807. <https://doi.org/10.3390/d15070807>

Hoyos C, L. R., & Rodríguez C, A. D. (2013). *Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquideas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquideas*. Tesis de titulación, Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Quito. INABIO. (16 de Noviembre de 2023). Instituto nacional de Biodiversidad. Quito, Ecuador. Obtenido de <http://inabio.biodiversidad.gob.ec>

INEC. (2022). *Base de Datos - Censo de Población de Población y Vivienda*. Obtenido de [www.ecuador encifras.gob.ec](http://www.ecuador.encifras.gob.ec)

ITIS 43714. (2009). *Integrated Taxonomic Information System. Vanilla planifolia*. Obtenido de <http://www.itis.gov>

Jacquemyn et al. (2017). Biogeography of orchid mycorrhizas. In: Tedersoo, L. (eds). *Springer International Publishing AG*, 159-177. doi:[https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_8)

Jimenez González, A., Zhindón Ganchozo, B. A., Indacochea Ganchozo, B. S., & Ramos Rodríguez, M. P. (2017). Protocolos de desinfección de explantes durante la micropropagación de *Cenchrus odorata* L. *I*(2), 01-06. doi:10.47230/UNESUM-CIENCIAS.V1.N22017.4

MAATE. (Mayo de 2023). Ministerio de Ambiente y Transición Ecológica. Quito, Ecuador. Obtenido de <http://www.ambiente.gob.ec>

- Macas, R. (2019). *Propagación de Vainilla (Vanilla tahitiensis) en diferentes medios de cultivo In vitro*. Tesis de grado, Universidad de Guayaquil, Guayaquil. Obtenido de <https://repositorio.ug.edu.ec>
- Masuhara, G., & Katsuya, K. (1994). MASUHARA, G. & KATSIn situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstien) Hara (Orchidaceae). *The New Phytologist*, 127(4), 711-718. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb02974.x
- Michael, M., Sukarno, N., Mursidawati, S., Sandra, E., & Rahayu, N. (2023). Isolasi dan Identifikasi Cendawan Endofit Akar Angrek Epifit dan Hemiepifit. *Jurnal Sumberdaya Hayati*. <https://doi.org/10.29244/jsdh.9.4.152-163>
- Ministerio de Turismo. (mayo de 2023). Ministerio de Turismo. Obtenido de <http://turismo.gob.ec>
- Navarro, F., Martínez , P., Salmeron, I., Pedraza , M., & Chávez, A. (2025). Germinación de orquídeas: la clave esta en la relación con los hongos. *Revista Digital Universitaria (RDU)*, 26(1). doi:10.22201/ceide.16076079e.2025.26.1.7
- Ordoñez et al. (2016). *Especificidad del hongo micorrizico (Rhizoctonia sp.) en Phalaenopsis sp., Cymbidium sp., Thrichoceros antenifer, Oncidium excavatum, y Cyrtochilum sp.* doi:<https://doi.org/10.18537/mskn.07.01.08>
- Otero, J., Ackerman, J., & Bayman, P. (2012). La vainilla y los hongos formadores de micorrizas. *ResearchGate*. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/236345957>
- Pomavilla, Y. (2018). *Evaluación de la actividad promotora de la germinación de cuatro cepas de hongos endófitos de raíces de Epidendrum sp. en la germinación de dos especies del mismo género*. Universidad de Cuenca, Cuenca. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/30633>
- Programa Bioeconomía. (2021). *Cadena de Valor de Vainilla*. (D. G. GmbH, Editor) Obtenido de La bioeconomía en la practica: <https://www.bivica.org>

- Rahayu, N. D., Sukarno, N., Listiyowati, S., Rafi, M., Sandra, E., Mursidawati, S., & Risna, R. (2024). Isolasi dan Identifikasi Cendawan Endofit Akar Anggrek Epifit *Vanda* sp. dan Anggrek Terrestrial *Spathoglottis plicata*. *Jurnal Sumberdaya Hayati*, 10(4), 198–204. <https://doi.org/10.29244/jsdh.10.4.198-204>
- Rasmussen, H. (2002). Recent development in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil*, 244, 149-163. doi:10.1023/A:1020246715436
- Rodríguez Sánchez, M., Vásquez Erazo, E., & Solis Muñoz, J. (2024). Pre-factibilidad comercial, de derivados de vainilla y canela amazónica: Macas - Ecuador. *Runas Journal of Education and Culture*, 5. doi:10.46652/runas.v5i19.186
- Romero et al. (2022). Hongos formadores de micorrizas aislados a partir de raíces de la orquídea *Rodriguezia granadensis* (LINDL.) RCHB. F. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 25(1:e2086), 2. doi:http://doi.org/10.31910/rudca.v25.n1.2022.2086
- Romero, G. (2022). *Desarrollo y validación de una tecnología para la micropropagación de Vanilla odorata C. Presl*. Tesis de grado, Universidad Regional Amazónica IKIAM, Tena. Obtenido de <http://www.ikiam.edu.ec>
- Salazar, M. J. (2017). *Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional El Cajas*. Tesis de maestría, Universidad de Cuenca, Cuenca. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec>
- Salazar, S., Botello, E., & Quintero, J. (2020). Optimización de la prueba de tetrazolio para evaluar la viabilidad en semillas de *Solanum lycopersicum* L. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3), e1344. doi:10.21930/rcta.vol21\_num3\_art:1344
- Sánchez, O. (Julio de 2015). Subfamilia Vanilloideae. *ResearchGate*. doi:10.13140/RG.2.1.4584.5605

Stewart, S., & Zettler, L. (2002). Symbiotic germination of three semi aquatic rein orchids (Habenaria repens, H. quinquiseta, H. macroceratis) from Florida. *Aquatic Botany*, 72(1), 25-35.

Van der Heijden et al. (5 de Noviembre de 1998). Mycorrhizal fungal diversity, ecosystem variability and productivity. *ResearchGate/ Nature*, 69 - 72. doi:<https://doi.org/10.1038/23932>

Victoria, T., Bonilla, A., & Sanchez, O. (2006). Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agronómica*, 55(1). Obtenido de [www.redalyc.org/articulo.oa?id=169920320004](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169920320004)

Ziv, M., Schwartz, A., & Fleminger, D. (1987). Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro; Implications for hardening. *Plant Science*, 52, 124-127. doi:10.1016/0168-9452(87)90114-2