

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Maestría Académica en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad



**Empleo de Biorreactores de Inmersión Temporal  
(BIT) para la multiplicación *in vitro* de vainilla  
(*Vanilla planifolia* Andrews) y su caracterización  
morfológica**

**Estudiante:**

**Lic. Juan Gabriel Villegas Ramírez**

**Tutor**

**MSc. Tomás Palma Zúñiga,**

**2021**

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad



**Empleo de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)  
para la multiplicación *in vitro* de vainilla (*Vanilla  
planifolia* Andrews) y su caracterización morfogénica**

Candidato

**Lic. Juan Gabriel Villegas Ramírez**

Tutor

**MSc. Tomás Palma Zúñiga,**

[Firma]

Asesora

**MSc. Mónica Palma Jiménez, MSc.**

[Firma]

Asesor

**Dr. Fabián Echeverría Beirute, PhD.**

[Firma]

Diciembre, 2021

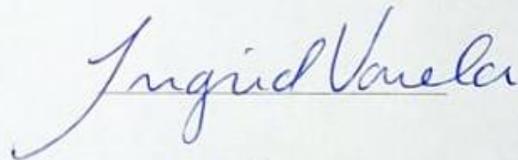
**Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad**

**Eje temático de *Biotecnología***

**“Empleo de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) para la multiplicación *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) y su caracterización morfogénica”**

Tesis sometida a consideración del tribunal evaluador como requisito para optar al grado de Magister Scientiae en Ciencia y Tecnología Sostenible, bajo el eje temático de Biotecnología.

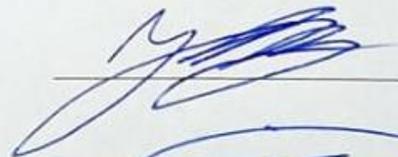
1. Dra. Ingrid Varela Benavides,  
gestora de la maestría.



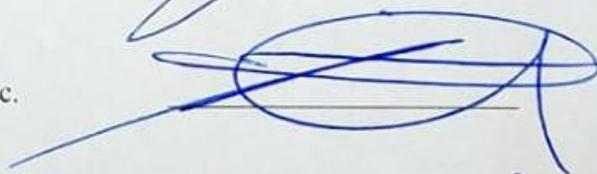
2. Dr. Tomás Palma Zúñiga, tutor.



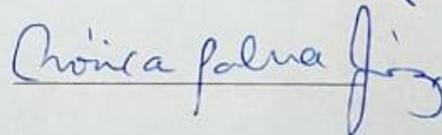
3. Dr. Fabián Echeverría Beirute, coord. Área.



4. Dr. Cristian Moreira Segura, GMSc.



5. MSc. Mónica Palma Jiménez, lectora.



Diciembre, 2021

TEC | Tecnológico  
de Costa Rica



## Tabla de contenidos

TABLA DE CONTENIDOS .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE CUADROS .....	8
ÍNDICE DE CUADROS DE ANEXOS .....	9
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	10
AGRADECIMIENTOS.....	11
DEDICATORIA.....	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT .....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MARCO TEÓRICO.....	18
4. METODOLOGÍA .....	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
6. CONCLUSIONES .....	49
7. RECOMENDACIONES.....	51
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
9. ANEXOS .....	59

## Índice de figuras

Figura 1 Distribución de los tratamientos utilizados en el estudio de micropropagación de <i>Vanilla planifolia</i> en los primeros tres ensayos mediante el BIT. Tratamientos evaluados: T1 Tiempo de inmersión. T2. Frecuencia de inmersión. T3. Volumen de medio y 5 repeticiones cada uno. La R indica el número de repetición.....	25
Figura 2 Número de brotes de <i>Vanilla planifolia</i> como respuesta al tiempo de inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra. ....	32
Figura 3. Longitud de raíces (cm) de <i>Vanilla planifolia</i> como respuesta al tiempo de inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra. ....	33
Figura 4 Número de brotes de <i>Vanilla planifolia</i> como respuesta a la frecuencia de inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra. ....	34
Figura 5 Número de hojas <i>Vanilla planifolia</i> como respuesta a la frecuencia de inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra. ....	34
Figura 6. Número de brotes de <i>Vanilla planifolia</i> como respuesta al volumen de medio de cultivo en inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra. ....	36
Figura 7 Longitud de brotes de <i>Vanilla planifolia</i> como respuesta al volumen de medio de cultivo en inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra. ....	37
Figura 8 Número de hojas en brotes de <i>V. planifolia</i> como respuesta al volumen de medio de cultivo en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.....	37
Figura 9 Incremento del peso fresco de brotes de <i>V. planifolia</i> como respuesta al volumen de medio de cultivo en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.....	38
Figura 10 Efecto de los sistemas BIT y medio semisólido en: (a) número de hojas (b) incremento en peso fresco (gramos) (c) número de brotes, con la respectiva desviación estándar, en <i>V. planifolia</i> , 6 semanas después de iniciada la siembra.....	40
Figura 11. Morfología de estructuras regeneradas a partir de explantes de <i>V. planifolia</i> en BIT. (a) Estímulo del brote apical señalado con las flechas. (b) Estímulo de brotes axilares (bax) y formación de las raíces antes de su transformación en meristemos del brote. (c) Estímulo de brotes	

adventicios que inician la formación de “cluster” (cl). (e) Las flechas indican la transformación de meristemas de raíz en meristemas vegetativos a partir de una masa de tejido meristemático. (f). Regeneración de estructuras en una terminal de raíz indicado por las flechas. Escala de la barra, a, b, c, d y e, 1 cm; f, 0.5 cm..... 45

Figura 12 Análisis histológico de rutas morfogénicas en *V. planifolia* obtenidas en sistemas de inmersión temporal y en secciones longitudinales. (a) Estructura que muestra el desarrollo del meristemo apical del brote (mab) y el desarrollo de la yema axilar (ya), se observan primordios foliares. (b) Aumento de (a) para mostrar las células meristemáticas densamente teñidas (cm) y las bandas procambiales señaladas mediante flechas. (c) formación de un brote (br) en la parte terminal de la raíz, las bandas procambiales se señalan con flechas (d) Aumento de (c) para mostrar la diferenciación de la raíz (r) formada en la región de la parte media 6 semanas después de la siembra en un BIT. Escala de la barra 200  $\mu\text{m}$  = a y c. 50  $\mu\text{m}$  = b y d..... 46

Figura 13 Análisis histológico de rutas morfogénicas en *V. planifolia* como respuesta a sistemas de cultivo BIT. (a) Las flechas indican la formación de estructuras organogénesis que conducen a la formación de “un cluster”, (b) Aumento de (a) para resaltar la formación de grupos de células meristemáticas densamente teñidas (cm) y las bandas procambiales (bp) indicado por flechas. (c) mostrando con flechas un grupo de células meristemáticas organizadas. (d) Diferenciación de múltiples estructuras a partir de meristemoides localizado en la parte distal de la raíz 6 semanas después de la siembra en un BIT. Escala de barra 200  $\mu\text{m}$  = a y d.; 50  $\mu\text{m}$ . b y c. .... 47

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Variables evaluadas en la investigación del efecto del tiempo, la frecuencia y el volumen del medio de cultivo, en la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i> en un biorreactor de inmersión temporal en Santa Clara de San Carlos.....	27
Cuadro 2 Serie de alcohol de concentración ascendente para deshidratar los tejidos vegetales ..	29
Cuadro 3 Etapas para desparafinar y teñir los tejidos vegetales.....	30

## Índice de cuadros de anexos

Cuadro A 1 Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para el número y longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces, e incremento del peso fresco <b>en el estudio de tiempo de inmersión</b> de la micropropagación de <i>Vanilla planifolia</i> , en BIT. Santa Clara, San Carlos, evaluados 6 semanas después de la siembra. ....	59
Cuadro A 2 Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para el número y longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces, e incremento del peso fresco <b>en el estudio de frecuencia de inmersión</b> de la micropropagación de <i>Vanilla planifolia</i> en BIT, Santa Clara, San Carlos, evaluados 6 semanas después de la siembra. ....	60
Cuadro A 3 Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para el número y longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces, e incremento del peso fresco <b>en el estudio de volumen</b> en BIT en la micropropagación de <i>Vanilla planifolia</i> . Santa Clara, San Carlos, evaluados 6 semanas después de la siembra. ....	61
Cuadro A 4 <b>Prueba de t</b> para las variables número y longitud de brote, número de hojas, longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces e incremento en peso fresco 6 semanas después de la siembra. Se presenta la media $\pm$ desviación estándar. ....	62
Cuadro A 5 Resultados de la multiplicación de <i>Vanilla planifolia</i> en BIT con tres tiempos de inmersión, variables en las que se encontró diferencias estadísticas 6 semanas después de la siembra.....	63
Cuadro A 6 Resultados de la multiplicación de <i>Vanilla planifolia</i> en BIT con tres frecuencias de inmersión. variables en las que se encontró diferencias estadísticas 6 semanas después de la siembra.....	64
Cuadro A 7 Resultados de la multiplicación de <i>Vanilla planifolia</i> en BIT con tres volúmenes de medio por explante. Variables en las que se encontró diferencias estadísticas 6 semanas después de la siembra. ....	65

## **Declaración de autenticidad**

Yo, Juan Gabriel Villegas Ramírez, costarricense con cédula de identidad N° 114870069, declaro que los resultados obtenidos en este proyecto de investigación son inéditos y absolutamente originales.

## **Agradecimientos**

Al culminar este proyecto agradezco:

Primero que todo a mi amigo, tutor y mentor, el Sr. Tomás Palma Zúñiga, por todo su apoyo y continua anuencia en la colaboración de esta investigación.

Al Instituto Agropecuario Costarricense S.A. (IACSA) y a la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI) por toda la colaboración brindada, en equipo, materiales e instalaciones para la ejecución y éxito de este proyecto.

A Mónica Palma Jiménez, asesora de esta tesis y coordinadora del Centro de Investigación en Agroindustria Biotecnología y Veterinaria (CIABIV) centro perteneciente a la ETAI. Por toda su ayuda técnica en el documento y colaboración constante en la logística de los laboratorios para la ejecución del proyecto.

A Fabian Echeverria Beirute, asesor de esta tesis, quien compartió su conocimiento y experiencia durante toda la investigación, además destaco la total ayuda brindada, así como la anuencia y disposición para colaborar en este proceso, cumpliendo un rol fundamental como miembro del programa de posgrado.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo (CIDASTH) Centro perteneciente al Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), por su colaboración y aporte de material *in vitro* de vainilla, el cual complementó el material base para la ejecución de la investigación.

Y también quiero agradecer a todas las personas que de forma directa e indirecta participaron en el éxito de este proyecto de investigación.

## **Dedicatoria**

Este trabajo es dedicado a mis padres, ellos son los que en algún momento sacrificaron, apoyaron y motivaron para que yo continuara mi educación y llegara hasta donde he llegado hoy, y más...

## Resumen

La presente investigación se realizó en el Centro de Investigación de Agroindustria Biotecnología y Veterinaria (CIABIV) de la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI) en Santa Clara de San Carlos en el periodo 2019-2021. El objetivo fue el de establecer una metodología para incrementar el coeficiente de multiplicación de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) por medio de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) e identificar las rutas morfogénicas a través de la histología.

Para los efectos, se utilizó material vegetal proporcionado por la ETAI y el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) para su evaluación en los BIT. Se realizaron tres ensayos: (1) tiempo de inmersión, con tres tratamientos: 5, 10, 15 min/inmersión; (2) frecuencia de inmersión con los tratamientos de 6, 12 y 18 horas, y (3) volumen de medio de cultivo considerando como tratamientos: 20 ml, 40 ml y 60 ml de medio/explante. Como unidades experimentales se usaron 15 unidades BIT con 10 explantes de vainilla con tres nudos cada uno. Se utilizó un medio de cultivo conteniendo las sales Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1 mg/l de BA y 1 mg/l de caseína hidrolizada. Las condiciones del cuarto de crecimiento se controlaron con un fotoperiodo de 16 horas, una temperatura de 27 C° +/- 3 y una humedad relativa de 70 %.

Los mayores coeficientes de multiplicación se obtuvieron con las variables tiempo de inmersión de 15 minutos, frecuencia de inmersión de cada 6 horas y volumen de 40 ml/explante. Al comparar dichas condiciones obtenidas en los BIT con el medio semisólido se pudo comprobar mediante una prueba de *t* de student que el BIT superó en 16 brotes al medio convencional, a las 6 semanas después de la siembra.

Para el estudio histológico, las plantas de vainilla obtenidas de los BIT se fijaron en formaldehído: alcohol: ácido acético (FAA) (1:1:8 v/v) durante 24 horas, la deshidratación se realizó gradualmente con etanol y se finalizó con xileno. Los tejidos se infiltraron en paraplast® y posteriormente fueron cortados en secciones de 10 µm usando un micrómetro rotatorio. La tinción de los tejidos se realizó con Safranina y Fast Green y se observaron en un microscopio compuesto. Tanto en BIT como en medio semisólido se evidenció la respuesta de una ruta organogénica.

**Palabras Clave:** Vainilla, Biorreactores de Inmersión Temporal, Multiplicación, Organogénesis.

## Abstract

This research was carried out at the Center for Research in the Centro de Investigación de Agroindustria Biotecnología y Veterinaria (CIABIV) of the Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI) in Santa Clara de San Carlos. The objective was to establish a methodology to increase the multiplication coefficient of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) by means of Temporary Immersion Bioreactors (TIB) and to identify the morphogenic routes through histology.

For this purpose, it began with the introduction of the plant material provided by the ETAI and the Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) and the evaluation in the TIB. For this, three trials were carried out with three treatments each, where the immersion time was evaluated, with three treatments: 5, 10, 15 min / immersion; Furthermore, the frequency of immersion every 6, 12 and 18 hours was studied and finally the volume of culture medium was determined considering as treatments: 20 ml, 40 ml and 60 ml of medium / explant. 15 TIB units were used, with 10 vanilla explants with three nodes each as the experimental unit. A culture medium containing Murashige and Skoog (MS) salts supplemented with 1 mg / l of BA and 1 mg / l of hydrolyzed casein was used. The conditions of the growth room were controlled with a photoperiod of 16 hours, a temperature of 27 ° C +/- 3 and a relative humidity of 70%.

With the conditions in which the study was carried out, the highest multiplication coefficients in response to the best immersion time was 15 minutes, the best immersion frequency was every 6 hours and the best volume was 40 ml / explant . When comparing these conditions obtained in the TIB with the semi-solid medium, it was possible to verify by means of a t de student test that the TIB exceeded the conventional medium in 16 shoots, at 6 weeks after sowing.

For the histological study, the vanilla plants obtained from the TIB were fixed in formaldehyde: alcohol: acetic acid (FAA) (1: 1: 8 v / v) for 24 hours, dehydration was carried out gradually with ethanol and was finished with xylene. The tissues were infiltrated in paraplast® and subsequently cut into 10 µm sections using a rotary micrometer. Tissue staining was performed with Safranin and Fast Green and observed under a compound microscope. Both in TIB and in a semi-solid medium, the response of an organogenic pathway was evidenced.

**Key Words:** Vanilla, Temporary Immersion Bioreactors, Multiplication, Organogenesis.

## 1. Introducción

La importancia de la vainilla cada vez es más relevante en el mundo, en la región Pan tropical, se representa un grupo de lianas del género *Vanilla* ex Miller que comprende 126 especies pertenecientes a la familia Orchidacea. Su cultivo es utilizado como fuente de extractos para perfumería y como saborizante de alimentos, especialmente la *Vanilla planifolia* (Andrews) (Soto y Dressler, 2010; Azofeifa *et al.*, 2019; Damian y Mitidieri, 2020). Las vainas de vainilla producen una sustancia conocida como vainillina (3-metoxi-4 hidroxibenzaldehído) que la caracteriza y es el compuesto primario de dicha planta (Toth *et al.*, 2011).

En los últimos años se ha incrementado la demanda del cultivo de vainilla, además, con la poca oferta a nivel mundial, se han generado precios exorbitantes nunca alcanzados. Por ejemplo, en el año 2018, un kilogramo de vainilla pura “vainilla verde” llegó a costar \$600 dólares (US), lo cual lo hace un cultivo muy atractivo (Gelki, 2019).

Asociado a esta demanda de producción, los métodos de propagación de la vainilla limitan la disponibilidad para que los agricultores inicien una plantación. Los métodos de propagación más utilizados son: 1) semillas, 2) esquejes, o 3) multiplicación *in vitro*. En el caso de las semillas, usualmente no germinan, por lo que la propagación por esquejes de tallos es más frecuente. Sin embargo, dicho método requiere mano de obra y tiempo, además que no se garantiza la sanidad del material, debido a que las plantaciones establecidas con estos esquejes se ven afectadas principalmente por la marchitez provocada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, que ocasiona la necrosis de raíces y tallos (Adame *et al.*, 2015).

Atendiendo la afectación por el hongo *Fusarium* sp, Philip y Nainar (1986) reportan resultados positivos por medio de micropropagación utilizando terminales de raíz. Posteriormente se publican otros protocolos de cultivo de tejidos que producen masivamente plantas de vainilla libres de plagas y enfermedades mediante organogénesis a partir de yemas axilares (Geoge y Ravishankar 1997), o embriogénesis somática y organogénesis mediante la inducción del callo (Janarthanam y Sheshadri 2008). En estos estudios de micropropagación, se demuestra el estímulo directo de reguladores de crecimiento como benziladenina utilizando en explantes de ápices de tallos de vainilla (Abebe *et al.*, 2009; Gantait *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2013). También se evidencia que la adición de reguladores del crecimiento como el ácido naftalenacético (NAA) y la 6-bencilaminopurina (BAP) en el medio (MS) Murashige y Skoog (1962) ha sido rutinario en la micropropagación de la vainilla y recientemente se informa de aditivos como lo es lignosulfonato de calcio (Ca-LIGN) y el lignosulfonato de sodio (Na-LIGN) sobre la multiplicación y regeneración del cultivo a partir de brotes de *V. planifolia*. (Wan *et al.*, 2020).

A pesar del éxito de la micropropagación en medios semisólidos para la obtención de plantas libres de enfermedades, surgen limitaciones con esta técnica biotecnológica. Primero, se requiere de subcultivos frecuentes cuando el medio de cultivo se agota; además los volúmenes de medio de cultivo que se solidifican con agar son relativamente pequeños y van desde los 10 a 30 ml según el frasco de cultivo, lo que ocasiona gastos de mano obra y problemas de contaminación por

manipulación; así como la reducida tasa de multiplicación. Por tal razón, la alternativa de uso de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) han permitido minimizar los costos de producción y la contaminación por manipulación en distintos cultivos tropicales. Su avance radica en que se brinda un contacto uniforme con todo el explante, además el medio de cultivo líquido se puede sustituir sin cambiar de frasco. Finalmente, los frascos que contienen los explantes pueden tener capacidad que van desde 1 a 10 litros, lo que permite un mayor número de explantes por recipiente (Watt, 2012).

Se ha diseñado un gran número sistemas de inmersión temporal con diferentes tipos de frascos y mecanismos que impulsan y agitan el medio de cultivo. Algunos de ellos pueden ser mecánicos o neumáticos, como en el caso de los sistemas Rita<sup>®</sup>, Matis<sup>®</sup>, Setis<sup>®</sup> BIT<sup>®</sup>, BIG<sup>®</sup> etc.; y que fueron ilustrados y descritos en detalle por Etienne y Berthouly (2002) y Paek *et al.* (2001 y 2005). Los sistemas de Biorreactores de Inmersión Temporal o sistemas Twin Flasks (BIT<sup>®</sup>) que se utiliza en el presente estudio han sido propuestos en Cuba por Escalona *et al.* (1999).

Los estudios de micropropagación de vainilla en SIT y específicamente en frascos gemelos o BIT, no identifican las rutas morfogénicas<sup>1</sup> que se presentan cuando se utilizan estos sistemas. En el presente estudio, el uso de la histología permite observar si las rutas de organogénesis o embriogénesis son las que se manifiestan *in vitro* y así posteriormente conocer los métodos de control de los factores físicos y químicos (Alatorre, 2002; Palama *et al.*, 2010).

Considerando estos antecedentes se proponen los siguientes objetivos:

---

<sup>1</sup> Según Radice (2010) entiéndase por procesos morfogénicos en micropropagación cuando existen dos rutas: 1) embriogénesis somática mediante el cual se obtiene una estructura similar al embrión cigótico sin que se realice la fecundación de los gametos y 2) la organogénesis en el que se obtiene un tallo, una raíz o una flor que inicia a partir de una célula o un grupo de células mediante la interacción de reguladores de crecimiento endógenos del medio de cultivo y factores físicos que permiten una división activa.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Determinar el efecto del tiempo, la frecuencia y el volumen del medio de cultivo en un biorreactor de inmersión temporal, y su efecto en las rutas morfogénicas durante la micropropagación de *Vanilla planifolia*, en Santa Clara de San Carlos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del tiempo, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo en la micropropagación de *Vanilla planifolia*.
- Comparar el sistema convencional con un sistema en medio líquido en inmersión temporal en la micropropagación de *Vanilla planifolia*.
- Caracterizar los procesos morfogénicos que se manifiestan durante la micropropagación de *Vanilla planifolia* en biorreactores de inmersión temporal.

### 3. Marco teórico

#### 3.1. Importancia comercial de la Vainilla

La *Vanilla planifolia*, es una orquídea cultivada por su fruto que tiene gran importancia comercial ya que a través de la fermentación se obtiene el extracto de vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), que es un agente saborizante y el componente primario de la vainilla, responsable de su aroma característico y el cual aumenta la palatabilidad de los alimentos (Toth *et al.*, 2011). La degustación de la vainillina aún en dosis muy altas sigue siendo agradable y posee un umbral de aroma de 10-14 M para los seres humanos (Buccellato, 2005).

La vainilla que se comercializa contiene un 1,5% de extracto de vainillina pura (aproximadamente), este es destinado ampliamente en el comercio culinario, cosmético y también en el farmacológico (Giridhar y Ravishankar 2004; Dausch y Pastore 2005; Hoffman y Zapf 2012). A nivel mundial, alrededor del 60% de la vainillina se utiliza en alimentos y bebidas, el 33% en perfumes y cosméticos y el 7% restante en las industrias farmacéuticas (Priefert *et al.*, 2001).

En la medicina la vainillina comprende actividades multidimensionales. Y se ha evaluado por sus propiedades anticlastogénicas (Odoux *et al.*, 2003), antimutagénicas (Bythrow, 2005) y anticancerígenas (Lirdprapamongkol *et al.*, 2005). También se ha considerado que es capaz de reducir la lesión cromosómica que se produce a través de rayos X y rayos UV (Keshava *et al.*, 1998). Además, también se han evaluado sus propiedades antimicrobianas (Fitzgerald *et al.*, 2003; Tipparaju *et al.*, 2004; Shanmugavalli *et al.*, 2009). Tales atributos hacen de la vainillina un ingrediente eficiente para una variedad de productos alimenticios como lácteos, refrescos, jugos de frutas, entre muchos otros (Walton *et al.*, 2003; Fitzgerald *et al.*, 2004; Gantait y Kundu, 2017).

La vainilla es un bejuco del género *Vanilla* que pertenece a la familia Orchidaceae y en el mundo existen alrededor de 110 especies de ese género. Hasta la actualidad, se conocen solamente tres especies: *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitensis*, que se consideran comerciales por su capacidad de producir vainillina como aromatizante y saborizante (Azoifeifa *et al.*, 2019; Bory. *et al.*, 2008). De estas especies la *Vanilla planifolia* es preferida en el mercado. (Ehlers y Pfister , 1997; Sreedhar, *et al.*, 2007).

#### 3.2. Multiplicación de la vainilla

Uno de los métodos de multiplicación de la vainilla es por semilla, sin embargo, la germinación es muy lenta y baja, otra forma de multiplicación es la multiplicación vegetativa a través de esquejes de tallos, pero resulta en una tasa de multiplicación lenta. Además, este método no es económicamente rentable, ya que la recolección de esquejes de tallo conduce a la interrupción del crecimiento de la planta madre, y disminuye el rendimiento. Como alternativa a la problemática de la propagación convencional por esquejes, se cuenta con la multiplicación *in vitro* utilizando los brotes apicales del tallo y las yemas axilares (Geetha y Sudheer., 2000; Kalimuthu, *et al.*, 2006). Así mismo, debido a que las plantas obtenidas por cultivo de tejidos son genotípicamente idénticas,

aun así, podrían ser sensibles a la agresividad de los patógenos virulentos del suelo (Havkin y Belanger, 2007).

La multiplicación de vainilla *in vitro* debe considerar que una ruta embriogénica por intermedio de un callo puede inducir a variación somaclonal lo que hace poco atractivo para el productor cuando le interesa la obtención de plantas de vainilla para fines comerciales (Jain, 2001). La obtención de plántulas de vainilla mediante el método de embriogénesis indirecta ya fue estudiada por Janarthanam, y Seshadri (2008).

La producción masiva de *V. planifolia* a través de la organogénesis indirecta de brotes es poco conocida y existen numerosas incógnitas biológicas sobre la inducción de esta morfogénesis (Palama *et al.*, 2010). Se busca una ruta organogénica directa que garantice estabilidad genética por ser uno de los objetivos de la micropropagación para el establecimiento comercial de *V. planifolia* (Gantait *et al.*, 2009).

### **3.3. Situación económica de la *Vanilla planifolia***

El principal productor de vainilla es Madagascar que alcanza 75% de la producción mundial. El paso del Ciclón Enawo el 7 de marzo de 2017, por la Isla de Madagascar afectó a una parte importante de la cosecha de este cultivo. En los Estados Unidos, la vainilla de primera calidad proviene principalmente de Madagascar, (Gelski, 2017). El precio para la extracción de vainilla de Madagascar de primer grado alcanzó los \$ 600 por kilogramo (2.2 libras) en 2018 y para el año 2019 se reportó una ligera disminución con precios que oscilan entre \$ 475 y \$ 500 por kilogramo. La disminución de los precios para la extracción de vainilla de segundo y tercer grado generalmente es del 10% al 15% en todos los ámbitos, la lista a nivel productivo la encabeza Madagascar, Indonesia y China para el año 2019 (Gelski, 2019)

### **3.4. La vainilla en Costa Rica**

Las primeras siembras de vainilla en Costa Rica datan del año 1987 con 20 hectáreas de terreno en la Región Huetar Norte (Ocampo, 1987). Basados en los altos precios de la vainilla en los años noventa y con el fin de establecer mejores estándares de vida para las comunidades rurales del país y preservar las zonas alrededor de las reservas biológicas también se iniciaron siembras de vainilla en Quepos y Puerto Jiménez, sin embargo, las plantaciones fueron infectadas por el *Fusarium oxysporum f sp vanillae*, debido a sobre polinización y mal manejo de las plantaciones (Ramírez *et al.*, 1999).

De esta forma la experiencia generada en esta primera etapa junto con la investigación realizada en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), permitió ofrecer a los agricultores de Quepos, microorganismos benéficos que mejoraron la tolerancia de las plantas de vainilla a *F. oxysporum*. (Marín, 2003).

En una tercera etapa, se introduce a Costa Rica un material que se denominó híbrido de Costa Rica descrito por Varela (2011) y considerado un híbrido entre *V. planifolia* y *V. pompona*, como una

alternativa de solucionar al problema de *Fusarium*, actualmente se posee poca trazabilidad de este material y se continúa trabajando en investigaciones sobre este genotipo. (Schluter *et al.*, 2007).

### **3.5. Micropropagación de *V. planifolia* para controlar los problemas fitosanitarios**

La *V. planifolia* se puede propagar convencionalmente utilizando segmentos de tallo, no obstante, este método tiene sus inconvenientes, como el tiempo demandado y la mano de obra intensiva (Mengesha *et al.*, 2012). Este método de propagación por su manipulación hace difícil el control de infecciones por plagas y patógenos microbianos como la pudrición de la raíz y el tallo (*Fusarium oxysporum*), la chinche roja (*Tenthecoris confusus*) y la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Ramos *et al.*, 2014).

Cuando la propagación de *V. planifolia* se realiza por medio de esquejes, y la planta madre está con patógenos, las plantas obtenidas tienen un retraso en el crecimiento, el desarrollo y la producción y en ocasiones pueden morir. Además, este proceso sólo puede realizarse a pequeña escala debido a la exposición de enfermedades que sufre la planta donadora. Por otra parte, el método de propagación sexual de la vainilla tiene como principal limitante la escasa o nula capacidad de germinación de las semillas. Por estas razones, es difícil cubrir la demanda de plantas por medio de esta técnica. La micropropagación por su parte se ha presentado como una técnica que permite solventar la escasez de propágulos y facilita la multiplicación clonal y masiva a mayor escala (Gätjens *et al.*, 2018).

Según Wan *et al.*, (2020) para enfrentar uno de los problemas más importantes de las plantaciones de vainilla debido a la pudrición de la raíz causada por *Fusarium oxysporum f. vainilla* se utiliza la micropropagación con el fin de obtener plantas sanas, el primer resultado de éxito fue reportado Konowics y Janick, (1984) a través de estímulo de brotes preformados, Philip y Nainar, (1986) por inducción de protocormos y ápices radicales; y por regeneración de brotes de vainilla, mediante estímulo de yemas axilares y brotes terminales son reportados por otros autores (Kononowicz y Janick, 1984; Geoge y Ravishankar, 1997; Geetha y Sudheer, 2000; Giridhar y Ravishankar, 2004; Lee *et al.*, 2008; Gätjens, *et al.*, 2018).

### **3.6. Los sistemas de inmersión temporal.**

A pesar de los beneficios de la propagación *in vitro* en medios semisólidos, la tasa de multiplicación es reducida por el número de ciclos de subcultivos. Para superar dicha barrera, los cultivos en medios líquidos en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) ofrecen una alternativa que supera al medio de cultivo semisólido. El BIT es eficiente por que ofrece un entorno estéril y autónomo que aprovecha los sistemas de entrada y salida de nutrientes en estado líquidos. El BIT está diseñado para cultivos intensivos y a menudo ampliados a mayor escala, este brinda la máxima oportunidad para monitorear y controlar las condiciones microambientales, a través de la agitación, aireación y temperatura (Escalona *et al.*, 2006). El primer informe sobre el uso de la micropropagación en estado líquido fue el de Takayama y Misawa (1981), quienes multiplicaron *Begonia* sp utilizando cultivos en agitación. Hoy en día, se han diseñado un gran número de tipos diferentes de reactores que pueden reproducirse internamente o pueden generarse modificaciones

dependiendo de su objetivo. Sus principales diferencias radican en los tipos de recipientes y los mecanismos que proporcionan la aireación del cultivo (no agitado, mecánico o neumático). La mayoría de ellos fueron ilustrados y descritos en detalle por Etienne y Berthouly (2002) y Paek *et al.*, (2001; 2005).

Aunque se han reportado éxitos en diferentes sistemas de cultivo utilizando sistemas de inmersión, la elección del tipo de sistema depende del producto requerido y de la planta a micropropagar, ya sea vía organogénesis o embriogénesis somática, y en gran medida por la experiencia y los recursos para construirlo o comprarlo. Más recientemente, Mehrotra *et al.*, (2007) dan a conocer las diferentes opciones para la propagación de plantas a gran escala en biorreactores, de las que se destaca el control independiente de cada etapa de cultivo. De todos los sistemas disponibles, los que implican inmersión temporal tienen una variedad de características que los hacen muy adecuados para su uso en micropropagación semiautomática. Como su nombre lo indica, los cultivos de plantas no se permanecen constantemente en medios líquidos, lo cual es beneficioso para el crecimiento y la morfogénesis de las plantas. Además, estos sistemas permiten muchas ventajas a las plantas como: el control de la contaminación, el suministro y la mezcla adecuados de nutrientes y oxígeno del medio en cada inmersión, el subcultivo relativamente poco frecuente y la facilidad de cambios de medio se puede lograr sin la manipulación de los explantes. Por estas razones, Ziv (2000: 2005) y Arencibia *et al.*, (2013) han descrito los SIT como el “enfoque de cultivo de tejidos más natural”.

Varios SIT se han utilizado con éxito en los últimos siete años para la micropropagación de una variedad de especies de plantas de valor agrícola, medicinal y de conservación. Algunos de los SIT están patentados y otros son el resultado del ingenio de investigadores que pueden no tener los fondos para comprarlos. El sistema Twin-Flask (BIT®) por ejemplo de Escalona *et al.*, (1999) consta de un contenedor para el cultivo de plantas y un depósito para el medio líquido. Cuando se abre una válvula solenoide y se enciende el aire comprimido, el medio se introduce en el segundo frasco, sumergiendo las plantas. El proceso se invierte cuando se abre otra válvula solenoide y la presión del aire fuerza al medio de regreso al depósito original. El sistema RITA® (recipiente para inmersión temporal automatizada) patentado en Francia, según Alvard *et al.*, (1993) sistema RITA® es un aparato formado por un compartimento superior que contiene los explantes y un compartimento inferior que contiene el medio de cultivo líquido, al aplicar presión de aire al compartimento inferior, el medio se eleva hacia el recipiente superior, pero cuando se deja de hacer presión, éste cae por gravedad y el líquido o medio de cultivo vuelve al compartimento inferior. En consecuencia, los cultivos del compartimento superior se sumergen temporalmente cuando el compartimento superior se inunda con el medio líquido, cuya frecuencia y período de tiempo pueden regularse. Stanly *et al.*, (2010) aplicaron este principio a un sistema de filtración de polisulfona reutilizable Nalgene® conectando cada uno de los dos compartimentos con un tubo equipado con un filtro de 22 µm, a través del cual se aplicó presión para empujar el medio de cultivo hacia el compartimento superior que contenía los explantes. La salida en la parte superior del recipiente permitió que se escapara la presión y el aire que entraba en el recipiente y se filtró a través de una jeringa estéril. La versatilidad de estos sistemas muchas veces queda a la creatividad

y a la disponibilidad de materiales, los éxitos y beneficios de los sistemas semiautomatizados han sido descrito por Watt (2012).

### **3.7. Sistemas de inmersión temporal aplicados a la vainilla.**

En Costa Rica el único informe de investigación publicado en sistemas de inmersión temporal en *Vanilla planifolia* (Andrews) es el de González, (2003), utilizando el Sistema de Inmersión Temporal RITA® de patente francesa. En este estudio, se utilizaron 3 tipos diferentes de explantes; ápices de tallo, microestacas y meristemos radicales. En esta investigación el número de brotes producidos por microestacas y ápices de tallo no se afectó por el tipo de explante, pero puede ser inducido por la frecuencia de inmersión, siendo los explantes cultivados a 4 inmersiones/día los que presentaron mayor respuesta a esta variable. La longitud de los brotes a partir de microestacas y ápices de tallo se afectó significativamente por el tipo de explante, la frecuencia de inmersión. Las microestacas cultivadas a 2 inmersiones/día presentaron la mayor respuesta a estas variables.

En México, Jericó *et al.*, (2014) realizaron una investigación para establecer un sistema de biorreactores para la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) demostrando la inducción de brotes en los dos sistemas evaluados (medio semisólido y en inmersión temporal por gravedad), el biorreactor resultó ser el más eficiente ya que permitió obtener 12 brotes por explante en promedio en comparación con 7 en el medio semisólido, representando un aumento en 42% la tasa de multiplicación.

Recientemente Calvache y Freire, (2019) realizaron una investigación con el fin de establecer un mejor diseño para el desarrollo de un sistema de inmersión temporal semiautomatizado y de tipo frasco gemelo destinado a la micropropagación masal de especies vegetales. En el género *Vanilla* aún no hay informes de micropropagación en BIT, pero si se reporta resultados de investigaciones de Avila, (2018) para la estandarización del sistema de inmersión temporal en la micropropagación *in vitro* de *Cattleya schroederiae* otra especie de la familia Orchidaceae.

### **3.8. Rutas morfogénicas y la evidencia histológica**

Durante la micropropagación las células del explante pueden seguir diversas rutas mediante las cuales se forman embriones, brotes, raíces y/o flores como respuesta a estímulos físicos y químicos (Radice, 2010), está la regeneración que origina diferentes rutas morfogénicas que comprenden fases similares denominadas por De Klerk *et al.*, (1997) como fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización.

Recientemente se han publicado los resultados de los eventos morfogénicos que se presentan durante la micropropagación de plantas y que se pueden controlar manipulando las rutas de señalización que se relaciona mediante la interacción de reguladores del crecimiento, los cortes o heridas practicadas en las plantas y la muerte celular programada, sin embargo se requiere más evidencia de como las células recuperan su capacidad de proliferación (Mironova y Xu, 2019); este tema es tan importante que ha sido motivo de revisión en donde se consideran los factores que intervienen en el proceso de regeneración así como los mecanismos que lo controlan (Bidabadi y Jain, 2020).

En condiciones físicas y químicas adecuadas, un explante se induce a la formación de órganos ya sea a través de un callo o en su ausencia, si se forman brotes, raíces o flores esta ruta se denomina organogénesis directa y si se induce a la formación de embriones somáticos este proceso se denomina embriogénesis directa (Radice, 2010). Hicks (1980), fue el primero en describir el concepto de morfogénesis directa o indirecta.

La organogénesis es una ruta para la micropropagación de plantas que comprende el desarrollo de brotes, ya sea apical o con formación de raíces a partir de explantes de manera directa o partir de un callo, en este proceso la mitosis tiene como función básica la formación de células en una división activa que responden a señales del desarrollo, estas células que se dividen, o meristemoides, se asemejan a los meristemas reales y van a mantener la unión vascular con el callo del cual se origina con el tejido que le da origen; cuando no hay nexo entre las bandas procambiales y el tejido vascular del explante que le dio origen, el proceso morfogénico que se manifiesta es la embriogénesis somática (Lara *et al.*, 2003).

Philip y Nainar (1987), fueron los primeros en informar del proceso morfogénico que ocurren cuando un meristemo de raíz se transforma en meristemas vegetativos mediante un estudio de histogénesis y organogénesis iniciando con meristemas radicales cultivadas *in vitro* y cuyo explante se obtuvo de plantas de vainilla de 7 años, y las divisiones localizadas en la periferia de estas raíces resultaron de una serie de meristemoides que dieron origen a brotes.

Alatorre (2002), a través de un estudio histológico en un híbrido de vainilla (*V. planifolia* x *V. pompona*) encontró que, en ápices de raíces, la desintegración de la caliptra conduce a cambios en la actividad del centro quiescente que en presencia de bencil adenina promueve la división meristemática que presentan las células pequeñas con citoplasma denso y núcleos grandes como etapa importante en la organogénesis *in vitro*.

Además de los procesos organogénicos de estímulo de brotes, el uso de thidiazuron en plántulas de vainilla obtenidas *in vitro*, muestran otras respuestas morfogénicas cuando se subcultivan los callos en un medio de diferenciación en donde se desencadena un estímulo del metabolismo celular a nivel de la iniciación de la fotosíntesis, la glucólisis y síntesis de compuestos fenólicos seguido de síntesis de aminoácidos, proteínas y la degradación de azúcar, estas contribuciones son importantes para entender cómo es que se lleva a cabo la diferenciación de protocormos y la formación de brotes en organogénesis (Palama *et al.*, 2010).

Los procesos morfogénicos que se manifiestan durante la micropropagación se han reportado como estímulo de brotes preformados, estímulo de brotes adventicios y formación de protocormos en medios convencionales semisólidos y no en medios de inmersión temporal por ésta razón los resultados obtenidos en la presente investigación pueden contribuir a dilucidar el método de micropropagación adecuado en vainilla y en BIT, considerando los factores estudiados y su evidenciada mediante la histología para potenciar la vía morfogénica más eficiente en cuanto a coeficiente de multiplicación

## **4. Metodología**

### **4.1. Ubicación del proyecto**

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Agroindustria, Biotecnología y Veterinaria (CIABIV) de la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI), Santa Clara, San Carlos, Alajuela. Y el periodo de estudio fue 2019-2020.

### **4.2. Material experimental**

Se realizó con material de vainilla del CIABIV y se recibió colaboración con plantas *in vitro* por parte del laboratorio de biotecnología del Instituto Tecnología de Costa Rica (ITCR) sede San Carlos, también se realizó multiplicación e introducción para tener el material necesario que garantizara el éxito de los experimentos.

### **4.3. Se seleccionó yemas de vainilla para realizar introducción y preparar explantes *in vitro***

Para tener plántulas *in vitro* adicionales a las aportadas por el Laboratorio de Biotecnología del ITCR, se introdujo material de vainilla del invernadero de la ETAI, considerando características de vigor, sanidad y tamaño. Los nudos seleccionados se trasladaron al laboratorio en donde se les procedió a limpiar, se utilizó un cepillo de cerdas suaves, un jabón líquido neutro y se removió las capas de la hoja que cubre a las yemas axilares. Posteriormente se realizaron varios lavados con el fin de remover residuo de jabón usando agua destilada estéril.

### **4.4. Fase I. Establecimiento aséptico**

Una vez lavados los nudos de vainilla, se disectaron las yemas aproximadamente de 1 cm de diámetro. Seguidamente se inició la fase I de desinfección, mediante inmersión de las yemas en etanol de 96% V/V durante 1 minuto, más dos gotas de tween 20 por cada 100 ml de etanol, lo que permitió una mayor superficie de contacto del alcohol con el tejido que garantizó su desinfección. Posteriormente, las yemas se trasladaron a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl al 3 % i.a.- cloro comercial), durante 15 minutos. A esta solución también se le agregó una gota de tween 20 por cada 100 ml de cloro. Estos procesos de desinfección se llevaron a cabo dentro de un lavador ultrasónico (BANCO ES375H).

Las yemas se trasladaron a una cámara de flujo laminar (Marca ESCO, Modelo Labculture), en donde se le practicaron tres lavados con agua destilada estéril con el fin de remover los residuos de cloro. Finalmente, las yemas se redujeron a 5 mm de diámetro en la base y se sembraron en un medio de cultivo que contenía las sales Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de bencil adenina (BA) y enriquecido con 1 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada y 1 ml L<sup>-1</sup> de Plant Preservation Mixture (PPM) el cual es un biocida de amplio espectro formulado para uso en el Cultivo de Tejidos Vegetales. Para la siembra *in vitro*, se utilizaron tubos de ensayo de 15 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro con un volumen de 15 ml del medio descrito.

#### 4.5. Medio de cultivo en medio semisólido

Se utilizaron dos medios de cultivo, uno solidificado con Agar® en el método convencional (medio-semisólido) y otro en estado líquido; en medio semisólido se usaron 4.4 g L<sup>-1</sup> de Agar®. Se usó el medio de cultivo con las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) enriquecido con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de bencil adenina (BA), 1 mg L<sup>-1</sup> caseína y 1 ml L<sup>-1</sup> de PPM. El pH se ajustó a 5,7 y posteriormente se esterilizó en autoclave durante 29 minutos /litro de medio de cultivo, a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 psi.

#### 4.6. Medio de cultivo para BIT

El medio de cultivo dispensado en el sistema de biorreactores de inmersión temporal fue el mismo al que se usó en medio semisólido, en esta ocasión carente de Agar®.

#### 4.7. Fase II. Estímulo de brotes preformados y adventicios

La segunda fase de la micropropagación consistió en el estímulo de brotes preformados y adventicios, ejecutada un mes después de la fase I.

#### 4.8. Tratamientos para evaluar la respuesta de vainilla en un Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT)

Para determinar las respuestas de la vainilla en BIT, se ejecutaron cuatro experimentos con los que se seleccionó, el mejor tiempo de inmersión (ensayo 1), la mejor frecuencia de inmersión (ensayo 2), el mejor volumen de medio (ensayo 3) y se realizó una comparación del sistema BIT con el método convencional en medio semisólido (ensayo 4). En cada uno de los primeros 3 ensayos se evaluaron tres tratamientos con cinco repeticiones que se describen en la Figura 1.

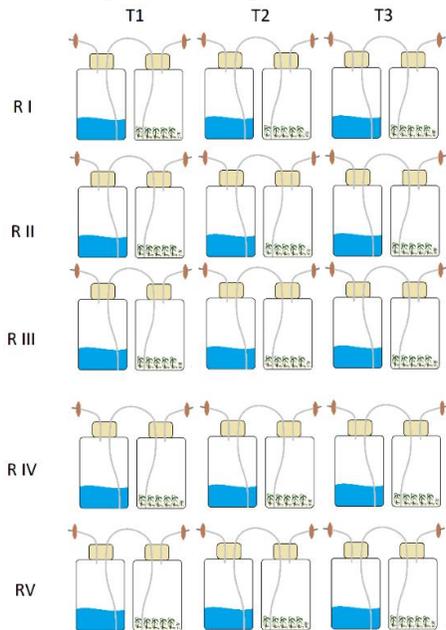


Figura 1 Distribución de los tratamientos utilizados en el estudio de micropropagación de *Vanilla planifolia* en los primeros tres ensayos mediante el BIT. Tratamientos evaluados: T1 Tiempo de inmersión. T2. Frecuencia de inmersión. T3. Volumen de medio y 5 repeticiones cada uno. La R indica el número de repetición.

#### **4.8.1. Componentes del sistema BIT para este experimento**

A continuación, se describen brevemente los componentes del sistema BIT los cuales están separados en dos áreas: la parte mecánica y la parte electrónica. La parte mecánica se conformó por un compresor DeWALT® de 6 gal de aire caliente, mangueras neumáticas y unidades de acople rápido de mangueras, frascos Nalgene® transparentes de 2 litros, tapas con conectores “fitting” (para conectar el interior con el exterior del frasco), mangueras de silicón autoclavable, filtros miliporo de 0,22 µm hidrofóbicos y autoclavables y electroválvulas 5:3 punto centro cerrado con silenciadores de aire y válvulas de presurización de aire. La parte electrónica se programó con un controlador de tiempos por medio de una hoja de cálculo en Excel y ajustaron los tiempos de inmersión y frecuencias de inmersión en horas, minutos y segundos para los tres tratamientos de forma independiente durante los ensayos. A continuación, se detallan los ensayos que se realizaron.

#### **4.9. Ensayo 1: Tiempo de inmersión**

En este estudio, se determinó el mejor tiempo de inmersión según los siguientes tres tratamientos: 5, 10 y 15 minutos. En esta etapa de multiplicación, el volumen fue de 300 ml por unidad BIT (30 ml por planta) como constante. La frecuencia de inmersión utilizada como constante fue de cada 12 horas. Se utilizaron 10 explantes por recipiente de cultivo, con cinco repeticiones. Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante 6 semanas.

#### **4.10. Ensayo 2: Frecuencia de inmersión**

Se evaluaron tres frecuencias de inmersión según los siguientes tratamientos: cada 6, 12 y 18 horas. Se utilizó 10 minutos como mejor tiempo de inmersión según lo obtenido en el experimento uno y se estableció como constante el volumen de 30 ml/explante. Diez explantes se introdujeron como unidad experimental y cada tratamiento fue replicado 5 veces. Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante 6 semanas.

#### **4.11. Ensayo 3: Volumen del medio de cultivo**

En esta etapa se evaluaron tres volúmenes de medio: 20, 30 y 40 ml por explante. La unidad experimental se conformó por 10 explantes. De tal modo que por cada tratamiento se dispensó 200 ml, 300 ml y 400 ml en cada unidad BIT. El tiempo y frecuencia de inmersión se seleccionó de los ensayos anteriores, donde se cuantificó los mejores resultados en las variables evaluadas. Para cada tratamiento se utilizó 5 repeticiones. Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante 6 semanas.

#### **4.12. Ensayo 4: Evaluación de medios de cultivo en BIT vs medios solidificados**

Una vez culminado los ensayos 1, 2 y 3 se procedió a realizar la comparación del medio líquido con el medio semisólido. En el sistema BIT se consideró el tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio que mejores resultados mostraron. Se comparó con medios de cultivos solidificados con agar durante seis semanas.

#### 4.13. Condiciones físicas del cuarto de crecimiento

En todos los casos, el cuarto de crecimiento contó con las siguientes condiciones físicas: la temperatura se reguló mediante aire acondicionado a  $27 \pm 3\text{C}^\circ$ . La intensidad lumínica fue de 3000 lux, fotoperiodo de 16 horas luz y la humedad relativa fue de 80% en promedio.

#### 4.14. Variables e indicadores

A continuación, se enumeran las variables que se utilizaron con su respectiva unidad de medida.

Cuadro 1. Variables evaluadas en la investigación del efecto del tiempo, la frecuencia y el volumen del medio de cultivo, en la multiplicación *in vitro* de *V. planifolia* en un biorreactor de inmersión temporal en Santa Clara de San Carlos.

Variable	Abreviatura	Unidad de medida
Número de brotes	nb	número
Longitud de brote	lb	milímetros (mm)
Número de hojas del brote	nh	número
Longitud de la lámina foliar del brote	llf	milímetros (mm)
Número de raíces	nr	número
Longitud de raíces	lr	milímetros (mm)
Peso fresco inicial	pfi	gramos (g)
Peso fresco final	pff	gramos (g)
Incremento de peso	ipf	gramos (g)

Los instrumentos utilizados para medir las variables anteriores fueron: una balanza analítica (Sartorius modelo TE214S,) y una regla graduada milimétricamente.

## **4.15. Estadística**

### **4.15.1. Diseño experimental**

Se realizaron cuatro experimentos. En todos los ensayos se utilizó un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento.

### **4.15.2. Análisis estadístico del estudio**

Para cada uno de los tres primeros experimentos, se realizó un análisis de varianza mediante el programa Statistical Analysis System (SAS, University Edition). En los primeros tres ensayos se realizó un ANOVA mientras que para el cuarto ensayo se utilizó una prueba *t de student*. Todos los análisis estadísticos utilizaron un nivel de confianza del 95%.

#### **Determinación del efecto de tiempo, frecuencia y volumen de medio de cultivo en BIT sobre variables morfológicas en *V. planifolia***

Para cada uno de los tres primeros experimentos, se realizó un análisis de varianza mediante el programa Statistical Analysis System (SAS). Al resultar diferencias significativas o altamente significativas, las medias de tratamiento se ajustaron a un modelo de regresión mediante el uso del modelo =  $Y_{ij} = \text{trat rep}$ ; según instrucciones para el análisis SAS, con el fin de explorar y cuantificar la relación de dependencia entre las variables de respuesta y las variables independientes en este caso el tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión o volumen de medio de cultivo.

#### **Determinación del sistema de cultivo (BIT vs semisólido) sobre las variables morfológicas de *V. planifolia*.**

Para el cuarto experimento se procedió a realizar una prueba de comparación *t de student*, con el objetivo de determinar las respuestas de las variables morfológicas de *V. planifolia* teniendo como tratamientos el sistema BIT versus el sistema convencional de medio semisólido.

### **4.15.3. Modelo estadístico**

El modelo estadístico que consideró para evaluar el tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + E_{ij}$$

En donde:

- $Y_{ij}$  = Variable de respuesta
- $\mu$  = Media general
- $M_i$  = Efecto del tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión o volumen de medio
- $E_{ij}$  = Error experimental

### **4.15.4. Población**

Se consideró como la población para este estudio la totalidad de plantas de *Vanilla planifolia* utilizadas en el experimento realizado en el laboratorio del Centro de Investigación en Agroindustria, Biotecnología y Veterinaria (CIABIV).

#### 4.15.5. Muestra

El espacio muestral consistió en las 150 plantas de vainilla que se utilizaron para realizar la evaluación dentro de los biorreactores de inmersión temporal durante la evaluación de los 4 experimentos. Cada unidad experimental consistió en los 10 brotes u observaciones.

#### 4.15.6. Histología

Para evidenciar las respuestas morfogénicas obtenidas en los ensayos de vainilla en los BIT se practicó la histología de las estructuras obtenidas en la micropropagación en BIT siguiendo los siguientes pasos:

- **Selección del material vegetal**

Se seleccionaron brotes de vainilla con las siguientes características: explantes con tres nudos y con un tamaño y color homogéneo, mismos que presentaron respuestas morfogénicas en los sistemas incubados en los medios de cultivo.

- **Fijación**

Los tejidos seleccionados se disectaron hasta alcanzar un tamaño de 2 cm y se sumergieron en una solución fijadora FAA (formaldehído, alcohol, acético) por 24 horas; esta solución se obtuvo por la mezcla alcohol de 70 % (90ml), ácido acético (5 ml) y formalina al 40 % (5 ml).

- **Deshidratación**

Transcurridas las 24 horas en FAA, los tejidos se deshidratan colocándolos en una serie de alcohol de concentración ascendente según detalla en el Cuadro 2.

Cuadro 2 Serie de alcohol de concentración ascendente para deshidratar los tejidos vegetales

<b>Solución</b>	<b>Contenido</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
<b>1</b>	Agua	30
<b>2</b>	Etanol 70°	60
<b>3</b>	Etanol 80°	60
<b>4</b>	Etanol 95°	60
<b>5</b>	Etanol 100°	60
<b>6</b>	Etanol 100°	60
<b>7</b>	Xilol	60
<b>8</b>	Parafina	30
<b>9</b>	Parafina	30
<b>10</b>	Parafina	30

- **Infiltración**

Se utilizó parafina la cual se colocó en una estufa (THERMO, PR305045G) a una temperatura de 58 °C para mantenerla en estado líquido. Los tejidos se colocaron tres veces en parafina y luego en un molde, con una aguja caliente se ubicó el tejido en el centro de tal forma que ocupe la

posición correcta para su corte histológico. Al solidificar la parafina se adhiere al cubo de madera cuyas dimensiones fueron las permitidas por el sujetador del micrótopo.

- **Cortes de los tejidos**

El corte de los tejidos se realizó en un micrótopo rotatorio (Leica RM2125 RTS) cuyo grosor de corte se ajustó a 10 micras.

Para pegar las cintas al portaobjetos se colocó una gota de adhesivo (glicerina más albumina de huevo en proporción 1:1) y una gota de formalina diluida. Inmediatamente se colocó el portaobjetos sobre la plancha caliente durante unos minutos sin que se llegue al punto de fusión de la parafina, pero observando que la parafina quede transparente. Se dejó enfriar y se dejó de 1 a 2 días a temperatura ambiente. Luego se continuó con el proceso de tinción utilizando safranina y fast green.

- **Tinción histológica**

El portaobjetos conteniendo el corte adherido se sumergió en una serie de frascos con el fin de desparafinar y prepararlo para la tinción. El orden y las sustancias se indican a continuación en el Cuadro 3.

Cuadro 3 Etapas para desparafinar y teñir los tejidos vegetales.

<b>ETAPAS O FASES</b>	<b>SUSTANCIA</b>	<b>DURACIÓN EN MINUTOS</b>
<b>1</b>	Xilol	3
<b>2</b>	Etanol absoluto	3
<b>3</b>	Etanol 95 %	3
<b>4</b>	Etanol 70 %	3
<b>5</b>	Etanol 50 %	3
<b>6</b>	Etanol 30 %	3
<b>7</b>	Agua destilada	1-2
<b>8</b>	Safranina	10
<b>9</b>	Cambios de agua	Hasta que quede incolora
<b>10</b>	Etanol 30 %	3
<b>11</b>	Etanol 70 %	5-10
<b>12</b>	Etanol 95 %	5-10
<b>13</b>	Fast Green en etanol al 95%	5-10
<b>14</b>	Etanol absoluto I	5-10
<b>15</b>	Etanol absoluto II	5-10
<b>16</b>	Etanol absoluto III	Opcional
<b>17</b>	Fenol-xilol	5-10
<b>18</b>	Xilol I	5
<b>19</b>	Xilol II	5
<b>20</b>	Xilol III	5
<b>21</b>	Barniz y portaobjetos	

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Efecto del tiempo de inmersión temporal en el BIT en explantes de *Vanilla planifolia*

Las variables número de brotes y longitud de raíces mostraron altamente significativas cuando se evaluaron a las 6 semanas después de la siembra como respuesta a tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos) tal y como se indican en el Cuadro A 1. Las variables longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar número de raíces e incremento de peso fresco no mostraron diferencias estadísticas al ser evaluadas a las 6 semanas después de la siembra.

El tiempo de inmersión y la variable número de brotes, se ajustaron a un modelo de regresión lineal que se indica en la

Figura 2, lo que evidencia de esta manera que el tiempo de inmersión influyó en el número de brotes de vainilla en BIT. La ecuación de regresión obtenida nos indica que para cada 5 minutos de inmersión adicional se puede esperar que el número de brotes aumente en 5 brotes, con diferencias estadísticas encontradas el  $R^2$  es de 0,66 lo que nos indica un buen ajuste del modelo (Figura 2).

Los frascos gemelos (BIT<sup>®</sup>) fueron propuestos por Escalona *et al.*, (1999) quienes establecieron que la duración y frecuencia de inmersión constituyen los factores más importantes para una micropropagación exitosa, ya que influyen en la absorción de nutrientes y agua, lo cual también se asocia a la hiperhidricidad de los tejidos cultivados (Escalona *et al.*, 2006). La hiperhidricidad es una alteración fisiológica y morfológica que ocasiona en los tejidos un aspecto vidrioso debido a la acumulación de agua apoplástica y aunque la hiperhidricidad puede manifestarse en medios convencionales o semisólidos, es más común en explantes que están sometidos a una inmersión constante o temporal, y a menudo conduce a necrosis (Berthouly y Etienne, 2005). En el presente estudio el tiempo máximo de inmersión fue de 15 minutos, tiempo en el cual a las 6 semanas no manifestaron ningún síntoma de hiperhidricidad en los explantes.

Los tiempos de inmersión varían grandemente y depende de la especie y del sistema de inmersión temporal que se seleccione para la micropropagación de plantas. Los trabajos de micropropagación en sistemas de inmersión temporal en vainilla han sido realizados en los recipientes conocidos como RITA<sup>®</sup> con 2 minutos de inmersión y con diferentes explantes (González, 2003); usando varios tipos de explantes de vainilla (Ramos, 2014), utilizando “cluster” como explante de vainilla provenientes de yemas axilares (Ramírez *et al.*, 2016) y segmentos nodales provenientes de yemas axilares (Spinoso *et al.*, 2017). Y quizás un trabajo de micropropagación en vainilla similar a los biorreactores lo realizó Sreedhar *et al.*, (2009) iniciando con “cluster” como explantes en medios líquidos en agitación. Los tiempos de inmersión en cultivos tropicales y en frascos gemelos son muy variables y van desde 1 minuto en el cultivo de *Psidium guajava* (de Fera *et al.*, 2003) hasta 4 minutos de inmersión en BIT en el cultivo de caña (Peñate *et al.*, 2007), en Musa AAB el tiempo

de inmersión fue de 10 minutos (Basail *et al.*,2011; Basail *et al.*, 2012) y Villegas y Palma (2019) determinaron como 10 min como mejor tiempo de inmersión en el cultivo de *Zingiber officinale*.

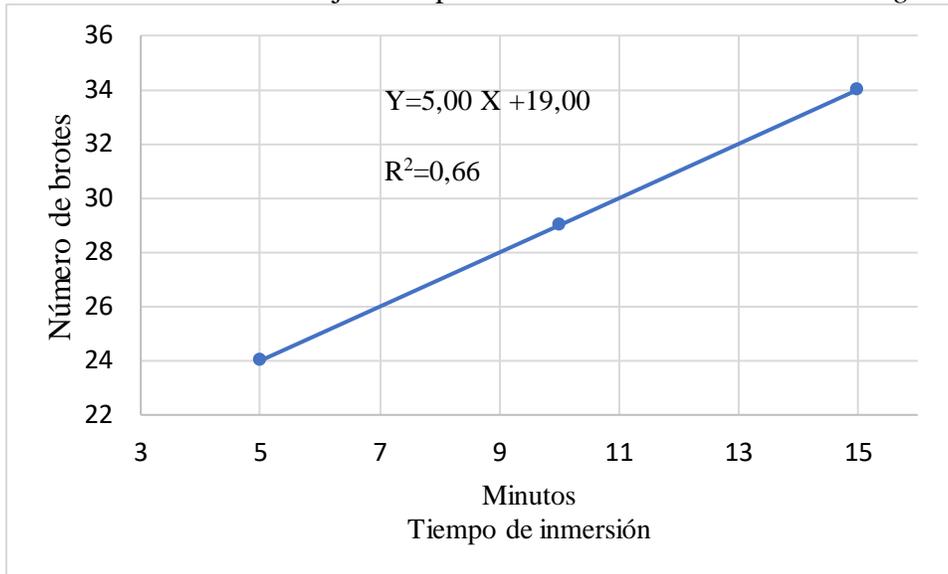


Figura 2 Número de brotes de *Vanilla planifolia* como respuesta al tiempo de inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.

Para determinar el mejor tiempo de inmersión con la variable longitud de raíces, los datos analizados se ajustaron a un modelo lineal de regresión, tal y como se muestra en el Cuadro A 1. El valor de  $R^2$  obtenido en este estudio fue de 0,76 que permite concluir que es una medida práctica del modelo lineal que determina la relación entre longitud de raíces y tiempo de inmersión. La mayor longitud de raíces y el mayor número de brotes se obtuvo con el tratamiento de 15 minutos como tiempo de inmersión para el cultivo de vainilla 6 semanas después de la siembra (Figura 3).

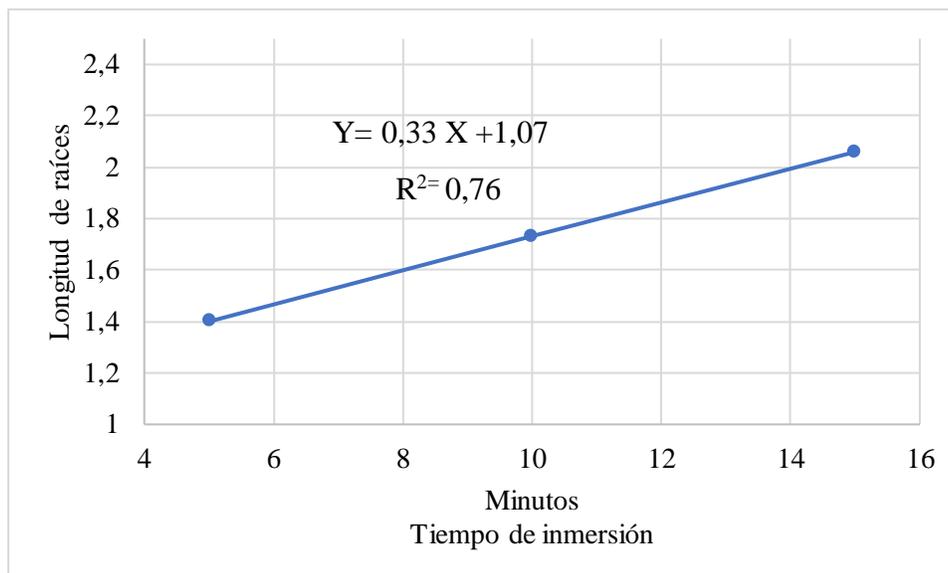


Figura 3. Longitud de raíces (cm) de *Vanilla planifolia* como respuesta al tiempo de inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.

## 5.2. Estudio de la de frecuencia de inmersión temporal en el BIT en explantes de *Vanilla planifolia*

En el estudio de la frecuencia de inmersión en la micropropagación de *V. planifolia* la variable número de brotes se consideró como uno de los parámetros más decisivos para la eficiencia en biorreactores de inmersión temporal tipo frasco gemelo. La respuesta de las variables número de brotes y número de hojas, mostró diferencias altamente significativas tal y como se indican en el Cuadro A 2. Las variables longitud de brotes, longitud de lámina foliar número de raíces y longitud de raíces e incremento de peso fresco no mostraron diferencias estadísticas evaluadas a las 6 semanas después de la siembra.

El número de brotes mostró diferencias significativas al evaluar tres frecuencias de inmersión. Dicha respuesta se ajustó a un modelo de regresión lineal en el que se determinó una disminución de 4,8 brotes por cada 6 horas que se aumente la frecuencia de la inmersión, siendo cuatro inmersiones al día donde se obtuvo 33,7 brotes (Figura 4).

Se evidencia de esta manera la influencia que tiene la frecuencia de inmersión en el número de brotes obteniéndose un  $R^2$  igual a 0,74. Cuando los explantes de vainilla estuvieron sumergidos en el medio de cultivo cada 18 horas el número de brotes obtenidos fue de 24,1. De tal forma que esta variable fue aumentando conforme se incrementó la frecuencia de inmersión del medio de cultivo, siendo la frecuencia de cada 6 horas la que mostró 9.6 brotes más con respecto a la frecuencia de 18 horas (Figura 4).

La respuesta del número de hojas en brotes de vainilla para los tres tratamientos de frecuencias de inmersión, cuantificados 6 semanas después de la siembra se ajustaron a un modelo de regresión lineal (Figura 5). La ecuación de regresión indica que el número de hojas en explantes de vainilla

disminuye en 5,6 por cada 6 horas que los explantes dejen de recibir medio de cultivo. Este resultado nos permite concluir que 6 horas de intervalo entre inmersiones es el mejor tratamiento considerando los factores físicos y químicos establecidos en el presente estudio.

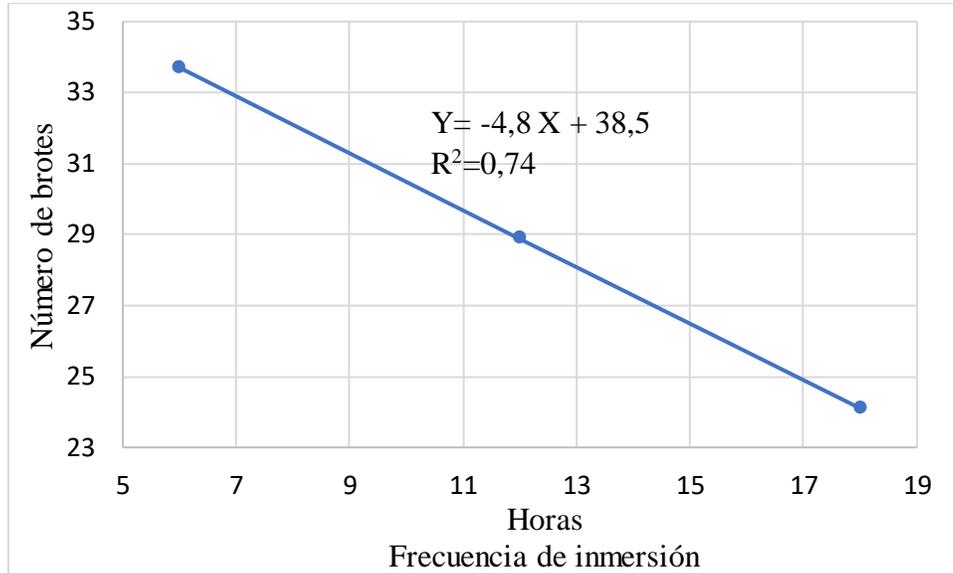


Figura 4 Número de brotes de *Vanilla planifolia* como respuesta a la frecuencia de inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.

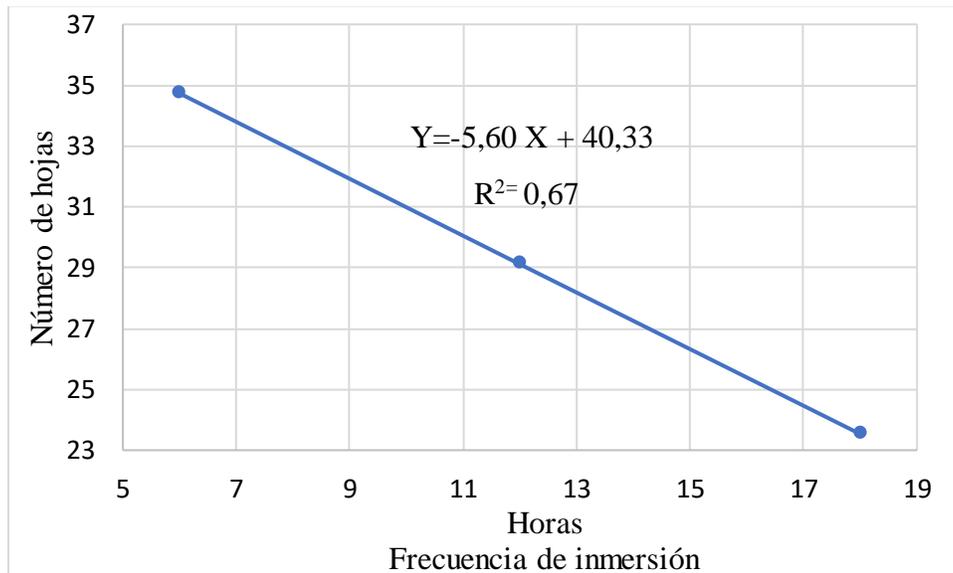


Figura 5 Número de hojas *Vanilla planifolia* como respuesta a la frecuencia de inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.

Los sistemas de inmersión temporal previenen la acumulación de CO<sub>2</sub> y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> los cuales si se acumulan en los envases en medios de cultivo semisólidos en donde tienen efectos perjudiciales sobre los tejidos (Roels *et al.*, 2006), además en los medios líquidos de los biorreactores se presentan procesos fisiológicos mejorados en donde se involucran el contenido de clorofila, el mecanismo de fotosíntesis neta, la transpiración y conductancia estomática, además se renueva la atmósfera interna y el contacto intermitente de las plantas con el medio de cultivo líquido que permite el enriquecimiento del CO<sub>2</sub>. Tal y como lo demostró Aragón *et al.*, (2010), el suministrar 1200 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> con 30 mg l<sup>-1</sup> de sacarosa a baja intensidad de luz (80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) resultó en un mayor desarrollo de hojas y raíces, así como una reducción de la respiración de los cultivos de *Musa sp* en el Sistemas de inmersión temporal. El intercambio gaseoso, fisiológicamente es importante para los cultivos y la vainilla en este caso se ve beneficiado por el sistema de BIT.

Los dos parámetros hasta ahora estudiados en esta investigación, tiempo y frecuencia de inmersión determinan una micropropagación exitosa ya que influyen en la absorción de nutrientes y agua (Basail, *et al*, 2012). La frecuencia de inmersión varía mucho según sea la especie estudiada, el sistema de inmersión temporal empleado y la ruta de morfogénesis tal y como lo demuestra la revisión de Watt, (2012), según McAlister *et al.*, (2005) y Shaik *et al.*, (2010) las frecuencias van desde 30 segundos cada 10 minutos en *Eucalyptus grandis*) en sistemas RITA<sup>®</sup> hasta 30 minutos cada 4 horas en el cultivo de *Lessertia frutescens* en un biorreactor de inmersión temporal mediante burbujeo B.I.B<sup>®</sup>. Para efectos de este estudio no se evaluaron frecuencias más bajas a 6 horas, sin embargo, nos da información para poder replantearnos las ideas y considerar más evaluaciones a futuro.

Las investigaciones realizadas y publicadas en sistemas de inmersión temporal en *V. planifolia* han sido en sistemas RITA<sup>®</sup> y en todos estos sistemas de inmersión temporal la frecuencia de inmersión fue de 4 horas utilizando diferentes tipos de explantes como se evidencia en diferentes publicaciones: “Cluster” (Ramos *et al.*, 2014), Segmentos nodales (Ramírez *et al.*, 2016); yemas axilares desarrolladas a 2 cm de longitud (Spinoso, 2017); microestacas de un nudo, ápices del tallo y secciones terminales de raíz (González, 2003) y “cluster” de 5 brotes en medios líquidos en agitación continua (Sreedhar, 2009).

En otros cultivos tropicales la frecuencia de inmersión varía desde 4 horas en el cultivo de guayaba (de Fera *et al.*, 2003) hasta frecuencias de 3 inmersiones por día en dos cultivares de plátano (Basail *et al.*, 2011; Basail et al, 2012). Todo lo anterior indica que las frecuencias de inmersión son variables y dependen del cultivo que se esté estudiando.

### **5.3. Estudio del volumen en sistema de inmersión temporal de frasco gemelo en la micropropagación de *Vanilla planifolia*.**

Uno de factores determinantes en la propagación utilizando los biorreactores de inmersión es el volumen del frasco gemelo y el medio de cultivo líquido en relación con los explantes seleccionados para iniciar los procesos morfogénicos que conlleva la micropropagación (Watt,

2012). Al estudiar el volumen de medio de cultivo en explantes de tallo con 3 yemas axilares se cuantificaron diferencias altamente significativas en las variables número brotes, longitud de brotes, número de hojas, e incremento de peso fresco a las 6 semanas después de la siembra (Cuadro A 3). Las variables longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces no mostraron diferencias estadísticas durante este tiempo de evaluación.

La respuesta estadística obtenida para el número de brotes con relación al volumen de medio de cultivo en los BIT se ajustó a un modelo de regresión lineal que se indica en la Figura 6. La ecuación de regresión indica que el número de brotes se incrementó con un valor de 5,3 por cada 10 ml de aumento del medio de cultivo por explante, con un  $R^2=$  de 0,75 siendo 40 ml de medio por explante el que permitió la formación de un mayor número de brotes de *V. planifolia* en BIT. Esto nos da información para considerar evaluaciones futuras mayores a 40 ml por explante.

La respuesta estadística obtenida para la variable longitud de brotes con relación al volumen de medio de cultivo en los BIT se ajustó a un modelo de regresión lineal que se indica en la Figura 7. La ecuación de regresión indica que la longitud de brotes se disminuye con un valor de 0,16 por cada 10 ml de medio de cultivo por explante que se incremente, con un  $R^2=$  de 0,65. Para efectos de esta variable la longitud de brotes no incrementó, esto se debe a la respuesta que tiene la planta hacia los reguladores de crecimiento, esto se explica porque la planta aprovecha su energía para generar nuevos brotes y no para incrementar su longitud de brotes, al ser una etapa de multiplicación se considera una respuesta positiva (Palma, 2013).

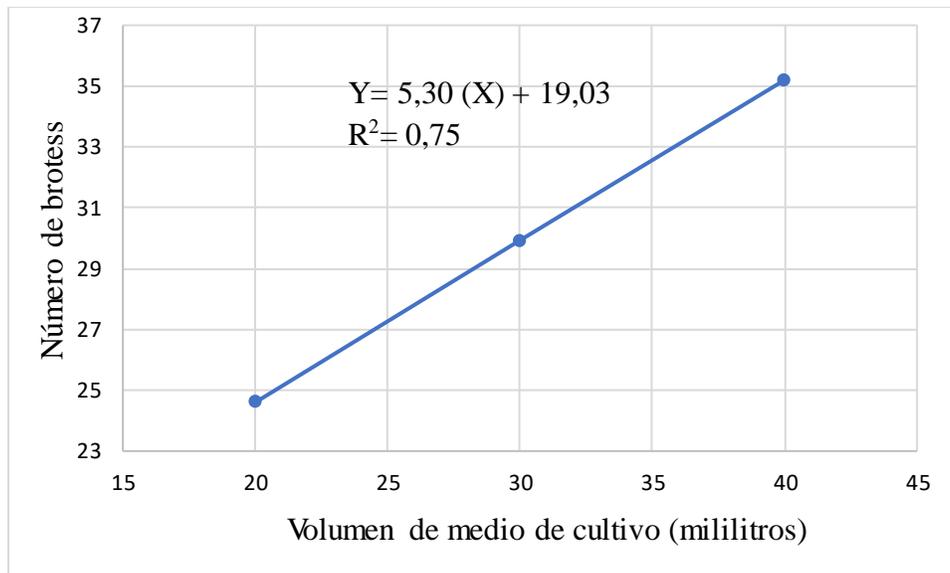


Figura 6. Número de brotes de *Vanilla planifolia* como respuesta al volumen de medio de cultivo en inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.

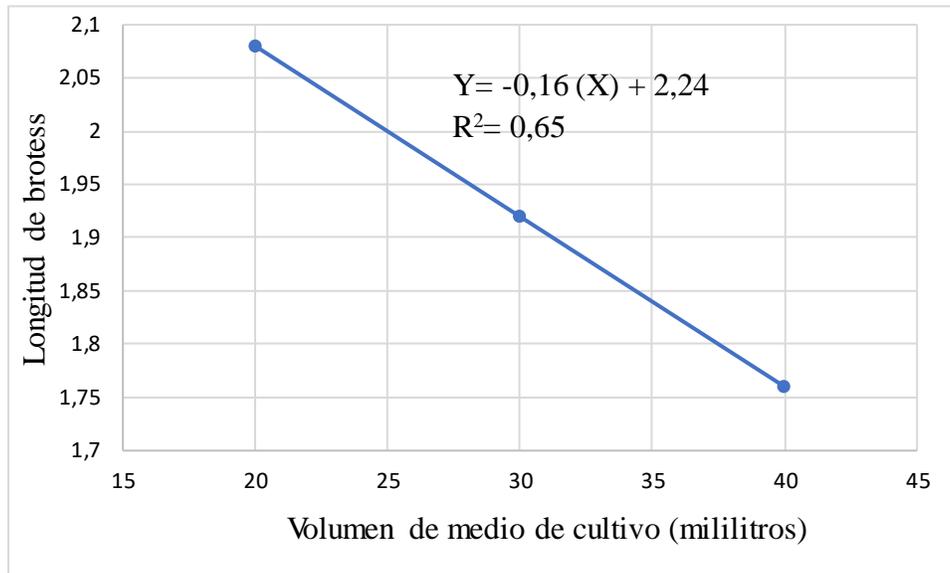


Figura 7 Longitud de brotes de *Vanilla planifolia* como respuesta al volumen de medio de cultivo en inmersión en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.

Al evaluar el número de hojas en brotes de *V. planifolia* como respuesta al volumen de medio de cultivo en los BIT se obtuvo una ecuación ajustada a un modelo de regresión lineal (Figura 8). La ecuación muestra que el número de hojas se incrementa en 3,8 por cada 10 ml de medio de cultivo añadido, resultando como mejor tratamiento el volumen de 40 ml de medio de cultivo por explante. El coeficiente de regresión de 0,76 refleja una alta bondad del ajuste al modelo lineal del número de hojas con relación al volumen de medio de cultivo en los BIT.

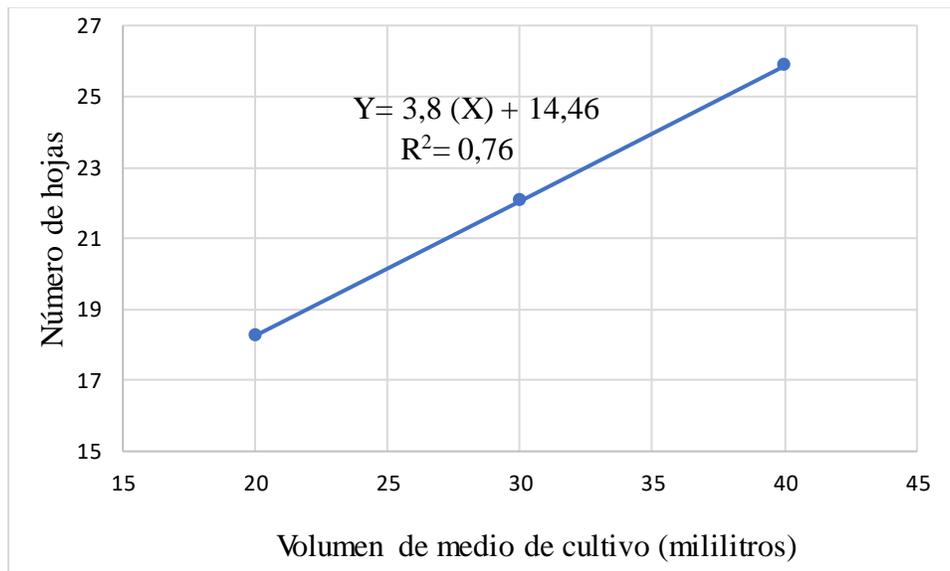


Figura 8 Número de hojas en brotes de *V. planifolia* como respuesta al volumen de medio de cultivo en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.

Después de 6 semanas de cultivo de los explantes de *V. planifolia* se comprobó que el volumen de medio de cultivo influyó de manera significativa en la variable de peso fresco. Dicha respuesta se ajustó a un modelo de ecuación lineal donde por cada 10 ml de medio de cultivo por explante que se incremente en el frasco de cultivo, el peso fresco final aumenta en 5,21 g, así el volumen de 40 ml de medio por explante resultó con la 22,2 g como peso final (Figura 9).

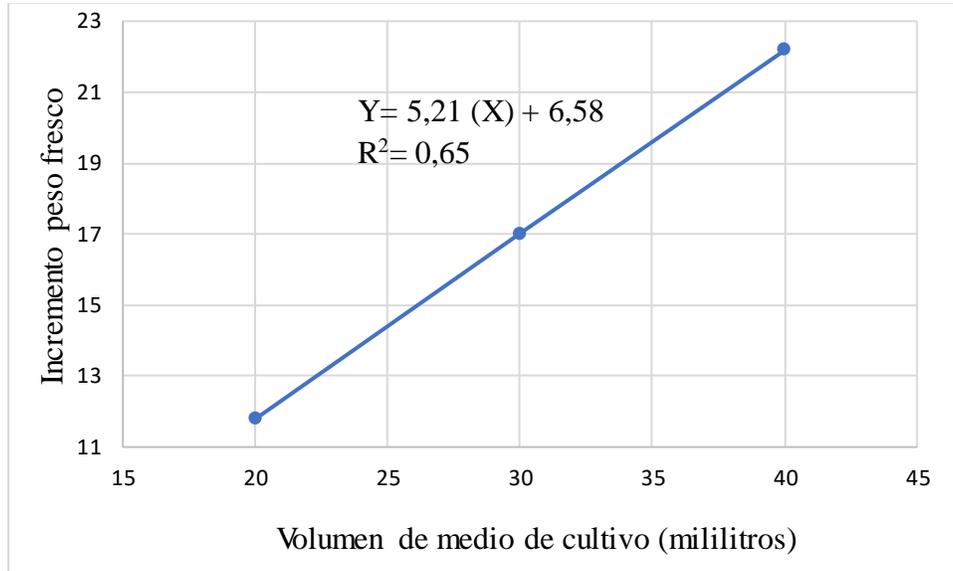


Figura 9 Incremento del peso fresco de brotes de *V. planifolia* como respuesta al volumen de medio de cultivo en biorreactores de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos, 6 semanas después de la siembra.

#### **5.4. Estudio de comparación de la micropropagación de *Vanilla planifolia* en un Sistema de inmersión temporal y un medio semisólido.**

El estudio de respuesta de explantes en la micropropagación de *V. planifolia* por medio de la prueba de contrastes de medias (*t* de student) mostró diferencias estadísticas altamente significativas para las variables número de brotes, número de hojas e incremento de peso fresco cuando se comparó el sistema de inmersión BIT y los explantes sembrados en un medio semisólido (Cuadro A 4).

Después de 6 semanas de crecimiento de los explantes de *V. planifolia*, se comprobó que el sistema de inmersión temporal influyó significativamente en la formación de brotes. El sistema BIT superó en 16 el número de brotes de *V. planifolia* comparado con el sistema de cultivo en medio semisólido. El sistema de cultivo también influyó en el número de hojas cuantificadas en los brotes siendo mayor en el sistema BIT con un promedio de 26 hojas mientras que en el sistema de cultivo semisólido se determinaron 15 hojas. Además, se comprobó la influencia del sistema líquido, para la variable incremento de peso fresco el sistema BIT superó en más de 4 veces el sistema en medio semisólido, para el sistema BIT esta variable presentó un promedio de 26 g de incremento en peso fresco mientras que para el sistema en medio de cultivo semisólido fue de 6 gramos en promedio (Figura 10).

Se ha demostrado que muchas especies micropropagadas en sistemas de inmersión temporal se comportan mejor cuando se comparan con medios de cultivos semisólidos. En el cultivo de la vainilla se obtuvo mayor cantidad de brotes en sistemas de inmersión temporal tipo RITA (Jericó, 2014). El medio de cultivo líquido fue más eficiente que el medio de cultivo sólido en cuanto al número de brotes obtenidos en *Eucalyptus camaldulensis* (Mendonca *et al.*, 2016) y en estudios realizados por Alkhateed *et al.*, (2014) el número de brotes y su enraizamiento fue superior en medios líquidos cuando se micropropagaron tres cultivares de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.).

La eficiencia de los SIT está evidenciada en la revisión realizada por Georviev *et al.*, (2014) en donde establecen el funcionamiento de estos sistemas, así como su diseño tecnológico a través de ejemplos recientes de la aplicación de estos sistemas en micropropagación de plantas tanto a nivel de laboratorio como para escalamiento a nivel comercial. Datos se confirman en los resultados obtenidos en esta investigación.

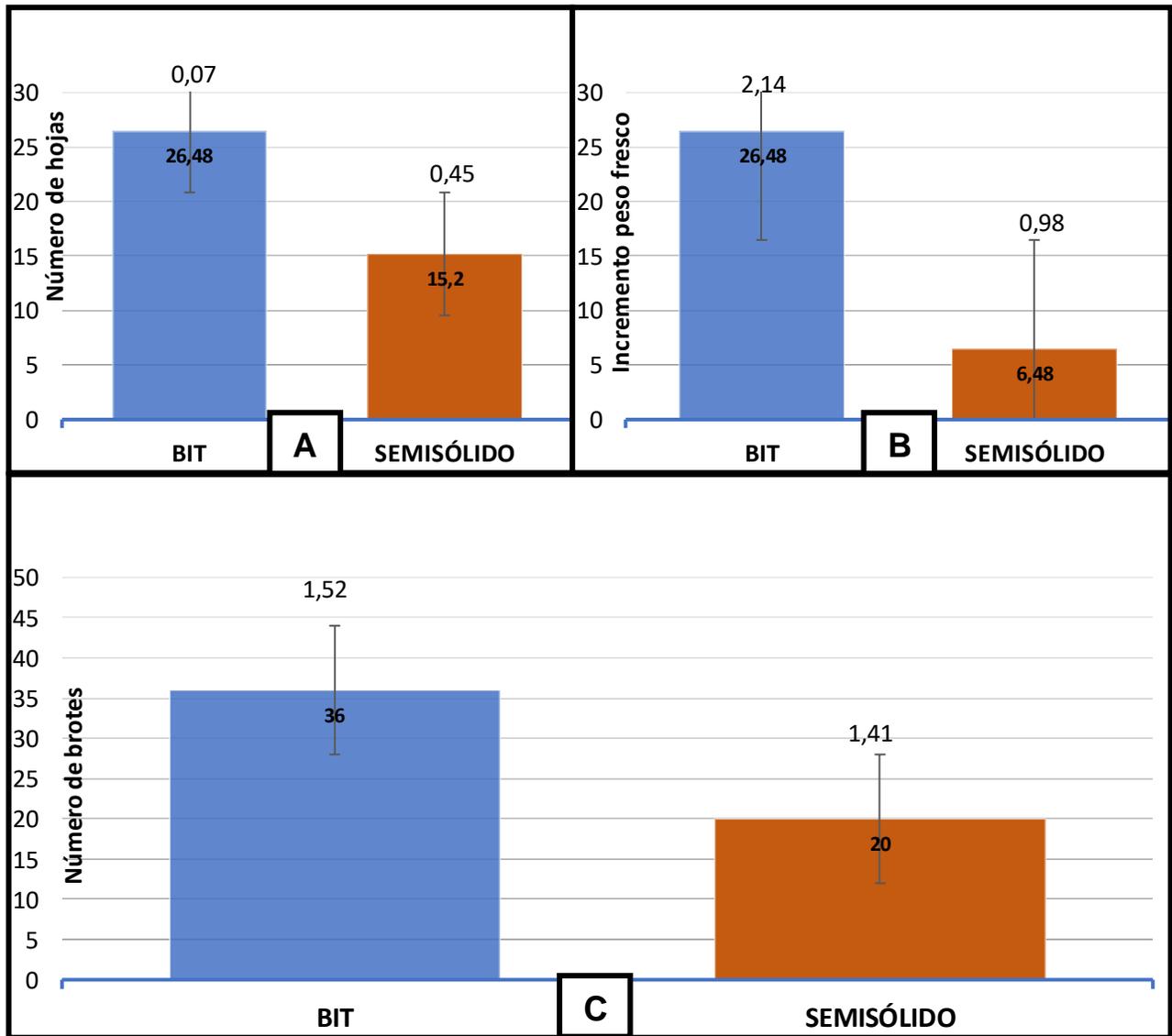


Figura 10 Efecto de los sistemas BIT y medio semisólido en: (a) número de hojas (b) incremento en peso fresco (gramos) (c) número de brotes, con la respectiva desviación estándar, en *V. planifolia*, 6 semanas después de iniciada la siembra.

## **5.5. Respuestas morfológicas de *Vanilla planifolia* obtenidas en los BIT**

### **5.5.1. Respuesta morfológica en el ensayo de tiempos de inmersión en BIT en *V. planifolia***

Las respuestas morfológicas observadas en este estudio comprenden el estímulo de brotes preformados, el estímulo de brotes adventicios con la formación de “cluster” y la transformación del meristemo radical en meristemas vegetativos.

La regeneración de plántulas vía organogénesis directa en meristemas de raíz se observó en los BIT con el tratamiento de 10 min de inmersión y se evidenció mediante histología de infiltración en parafina y tinción de contraste de safranina y fast green. No se observaron estructuras bipolares que es una de las características de la embriogénesis somática. En la Figura 12 se observan conexiones vasculares entre los brotes desarrollados y el tejido meristemático de raíz transformado en una masa meristemática vegetativa, este mecanismo morfológico de formación de brotes en vainilla es otra vía de micropropagación la cual inició dos semanas después de la siembra en los explantes de vainilla en BIT.

Philip y Nainar, (1987) fueron los primeros en informar de los procesos morfológicos que ocurren cuando un meristemo de raíz se transforma en meristemas vegetativos mediante un estudio de histogénesis y organogénesis iniciando con meristemas radicales cultivados *in vitro* y cuyo explante se obtuvo de plantas de vainilla de 7 años, las mismas divisiones localizadas en la periferia resultaron de una serie de meristemoides que dieron origen a brotes. Posteriormente Alatorre, (2002) realizó un estudio histológico en un híbrido de vainilla (*V. planifolia* x *V. pompona*) en medios semisólidos y estableció que, en ápices de raíces, la desintegración de la caliptra conduce a cambios en la actividad del centro quiescente y en presencia de bencil adenina promueve la división meristemática que presenta células pequeñas con citoplasma denso y núcleos grandes como etapa importante en la organogénesis *in vitro*.

Además de los procesos organogénicos de estímulo de brotes, el uso del thidiazuron en plántulas de vainilla germinadas *in vitro*, muestran otras respuestas morfológicas cuando se subcultivan los callos en un medio de diferenciación en donde se desencadena un estímulo del metabolismo celular a nivel de la iniciación de la fotosíntesis, la glucólisis y síntesis de compuestos fenólicos seguido de síntesis de aminoácidos y proteínas y la tercera la degradación de azúcar, estas contribuciones son importantes para entender cómo es que se lleva a cabo la diferenciación de protocormos y la formación de brotes en organogénesis (Palama *et al.*, 2010).

Los procesos morfológicos durante la micropropagación se han reportado como estímulo de brotes preformados, estímulo de brotes adventicios y formación de protocormos en medios convencionales y no en medios de inmersión temporal. Los resultados obtenidos en la presente investigación contribuyen a dilucidar el método de micropropagación adecuado en BIT en el cultivo de vainilla considerando los factores estudiados, mediante evidencia de histología y así potenciar la vía morfológica más eficiente en cuanto a coeficiente de multiplicación.

### **5.5.2. Respuesta morfogénica en el estudio de frecuencia de inmersión en la micropropagación de *V. planifolia* en BIT.**

En el estudio de la determinación de la mejor frecuencia de inmersión de *V. planifolia* con relación al número de brotes, se observaron respuestas morfogénicas similares a las que se encontradas en el estudio del tiempo de inmersión de explantes de *V. planifolia*. Se evidencia un mayor desarrollo de “cluster” si lo comparamos con el estudio de tiempo de inmersión.

Se observaron las primeras manifestaciones de transformación de los meristemos radicales a meristemos vegetativos (Figura 12) y los estudios histológicos evidencia respuestas morfogénicas de organogénesis (Figura 13). Las estructuras observadas coinciden con lo descrito en la literatura por otros como Philip y Nainar (1987). Posteriormente Alatorre (2002) describe los mecanismos organogénesis directa a partir de terminales de raíz del híbrido de Costa Rica, y Palama *et al.*, (2010) describe la embriogénesis somática mediante el uso de thidiazuron.

En el tratamiento de 12 horas de frecuencia de inmersión, se observó un brote con síntomas de hiperhidricidad. Ésta alteración ocasionó en los tejidos un aspecto vidrioso y aunque la hiperhidricidad puede manifestarse en medios convencionales semisólidos es más común en explantes que están sometidos a una inmersión constante, parcial o temporal y a menudo conduce a necrosis (Berthouly y Etienne, 2005), Los tratamientos de frecuencias estudiadas fueron 6, 12 y 18 horas , y el efecto de vitrificación no representó ninguna limitación y no parece estar asociado a los factores de frecuencia en las condiciones físicas y químicas en que se realizó el presente estudio.

### **5.5.3. Respuesta morfogénica en el ensayo del volumen en la micropropagación de *V. planifolia* en SIT**

El estudio de volumen de medio de cultivo por explante evidenció la formación de “cluster” con una limitada producción de raíces. Se determinó además que el medio de cultivo influyó en la formación de biomasa y brotes, las variables fueron ajustadas a una curva de regresión lineal, de tal manera que cada 10 ml de volumen de medio que se incremente en el frasco de cultivo permite que el peso fresco aumente en 6,58 gramos de peso fresco a las 6 semanas después de la siembra.

Además, se evidenció en algunos explantes brotes con síntomas de hiperhidricidad que ya ha sido documentado por otros estudios como una respuesta común cuando los explantes se someten a inmersión parcial o temporal conduciendo a un amarillamiento y posterior necrosis (Berthouly y Etienne, 2005). En este estudio la concentración de biomasa se dio en los brotes lo que se considera positivo ya que el enraizamiento puede estimularse al subcultivar los brotes en un medio de cultivo con una concentración de sales al 50 % y carente de reguladores del crecimiento. (Alatorre, 2002).

#### **5.5.4. Respuesta morfológica en el ensayo de comparación entre el sistema BIT y el medio de cultivo semisólido.**

La biomasa de *V. planifolia* evaluada durante 6 semanas tanto en BIT como medios de cultivo semisólido se concentró en la formación de brotes, superando el sistema BIT en 4 veces el incremento de peso fresco (

Figura 10), el número de raíces formadas en el sistema BIT fue de 6 mientras que el medio semisólido se cuantificó 4. El sistema BIT permitió la formación de “cluster” cuyo análisis histológico determinó una ruta organogénica (Figura 12, Figura 13). Está evidenciado que un explante sigue una ruta organogénica mediante el proceso de desdiferenciación de células que ya se habían diferenciado y luego reorganizan su división celular resultando en la formación de primordios y meristemas de órganos específicos manteniéndose un vínculo vascular entre el explante y el órgano de nueva formación, este mecanismo se denomina organogénesis de novo (Sugiyama, 1999). Los brotes y raíces de las plantas pueden conservar las funciones meristemáticas, aun cuando se elimine parte o todos sus meristemas de la raíz o del tallo, las células vegetales de tejidos u órganos diferenciados tienen la capacidad de producir nuevos brotes y raíces laterales a través de la organogénesis (Zhang *et al.*, 2018; Ikeuchi *et al.*, 2016).

La poca formación de raíces obtenidos en los explantes de *V. planifolia* también fue reportado por Alatorre, (2002) en *V. planifolia* micropropagada en medios semisólidos usando también una concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de benziladenina, lo cual inhibe el desarrollo de raíces pero si estimula la transformación del meristemo de raíz en meristemo de brotes, pero si lo que desea es estimular la formación de raíces se recomienda trasladar los brotes de vainilla a un medio de cultivo carente de citocininas (Alatorre, 2002).

Las rutas morfológicas de *V. planifolia* observadas en los BIT, se desarrollaron en medio de cultivo que se suplementó con BA como citocinina en una concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . La biomasa cuantificada como incremento en peso fresco y en la formación de brotes en presencia de BA en el medio de cultivo pareciera ser uno de los factores determinantes en la formación de brotes preformados, así como el estímulo de brotes adventicios en *V. planifolia*. Se ha determinado que la presencia de BA en el medio de cultivo es uno de los factores que interviene en la organogénesis *in vitro* y el estudio de Zafar *et al.*, (2019) establece como posible explicación de la respuesta específica de la citocinina BA al origen natural de los ribósidos y nucleótidos contenidos en este regulador del crecimiento ya que son más estables si se comparan con otras reguladores de tipo citocinina, además estos investigadores establecieron que en el caso de la micropropagación de *Rauvolfia serpentina* (L) concentraciones de BA mayores a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  disminuyen la capacidad de producir brotes debido a una concentración alta de BA en las células que tenían potencial para formar brotes.

La BA se considera una de las citocininas más eficiente para inducir organogénesis en explantes de segmentos nodales de *Gymnema silvestre*, y cuando se compararon con otras dos citocininas el

tidiazuron (THZ) y Kinetina (Kin), (Isah 2019); no obstante, la kinetina también ha sido utilizada en callos de naturaleza organogénica en dosis de 2 mg L<sup>-1</sup> obtenidos a partir de brotes de *V planifolia* y en interacción con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Hernández *et al.*, 2020).

Para entender cómo se da la actividad de señalización de las citocininas se debe considerar los mecanismos que controlan las vías hormonales en las plantas conocidas como Phosphorelay, estudiado en la planta medicinal *Marchantia polymorpha* (Aki, *et al.*, 2019).

Los procesos morfogénicos que se manifiestan en la micropropagación han considerado la relación de antagonismo y de sinergismo de las auxinas y de las citocininas así como los mecanismos moleculares que se manifiestan en la interacción de estos reguladores, tema que ha sido motivo de revisión por parte de Su, *et al.*, (2011). Además, se ha establecido una posible interacción entre los reguladores endógenos y los reguladores del crecimiento presentes en los medios de cultivo que estimulan eventos morfogénicos durante la micropropagación evidenciados recientemente en *Melicope lunu-ankend* (Rahman *et al.*, 2015) como en *Solanum tuberosum* (Raspor *et al.*, 2020).

En relación con los mecanismos moleculares relacionados con las respuestas morfogénicas in vitro, recientemente Bidabadi y Jain (2020) determinaron la presencia de genes como vía de actividad de las citocininas, tales como las proteínas quinasas de histidina, y las proteínas de fosfotransferencia de histidina que intervienen en la transferencia de la señal de las quinasas de histidina que pueden activar o suprimir la formación de brotes.

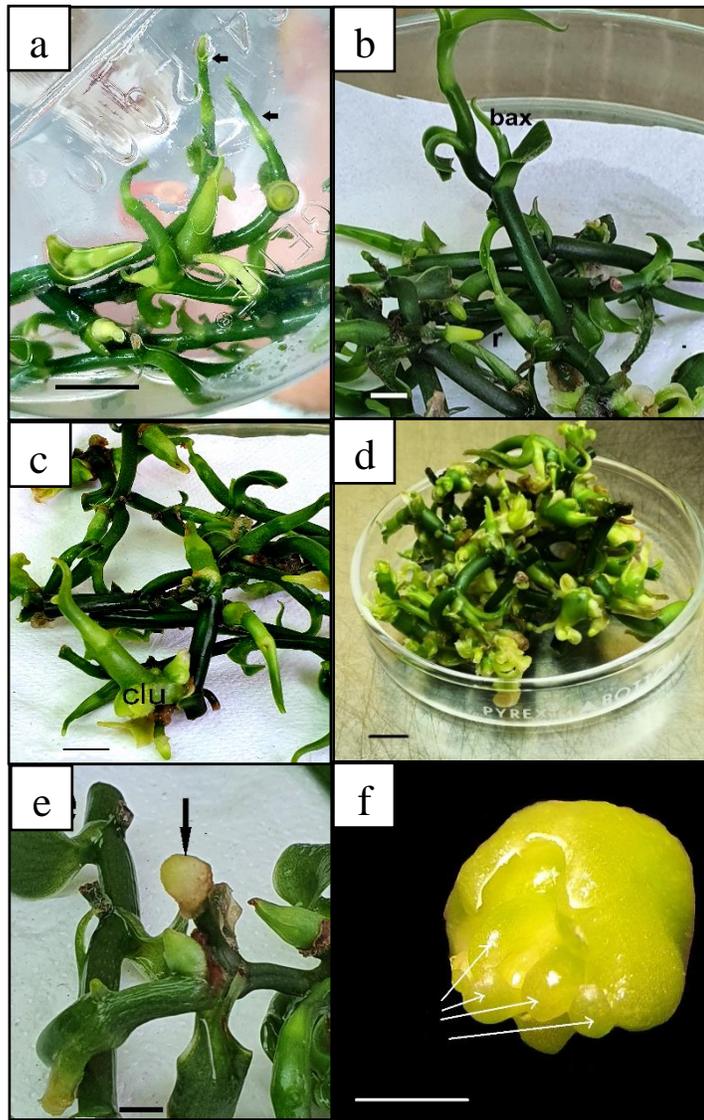


Figura 11. Morfología de estructuras regeneradas a partir de explantes de *V. planifolia* en BIT. (a) Estímulo del brote apical señalado con las flechas. (b) Estímulo de brotes axilares (bax) y formación de las raíces antes de su transformación en meristemas del brote. (c) Estímulo de brotes adventicios que inician la formación de “cluster” (cl). (e) Las flechas indican la transformación de meristemas de raíz en meristemas vegetativos a partir de una masa de tejido meristemático. (f). Regeneración de estructuras en una terminal de raíz indicado por las flechas. Escala de la barra, a, b, c, d y e, 1 cm; f, 0.5 cm.

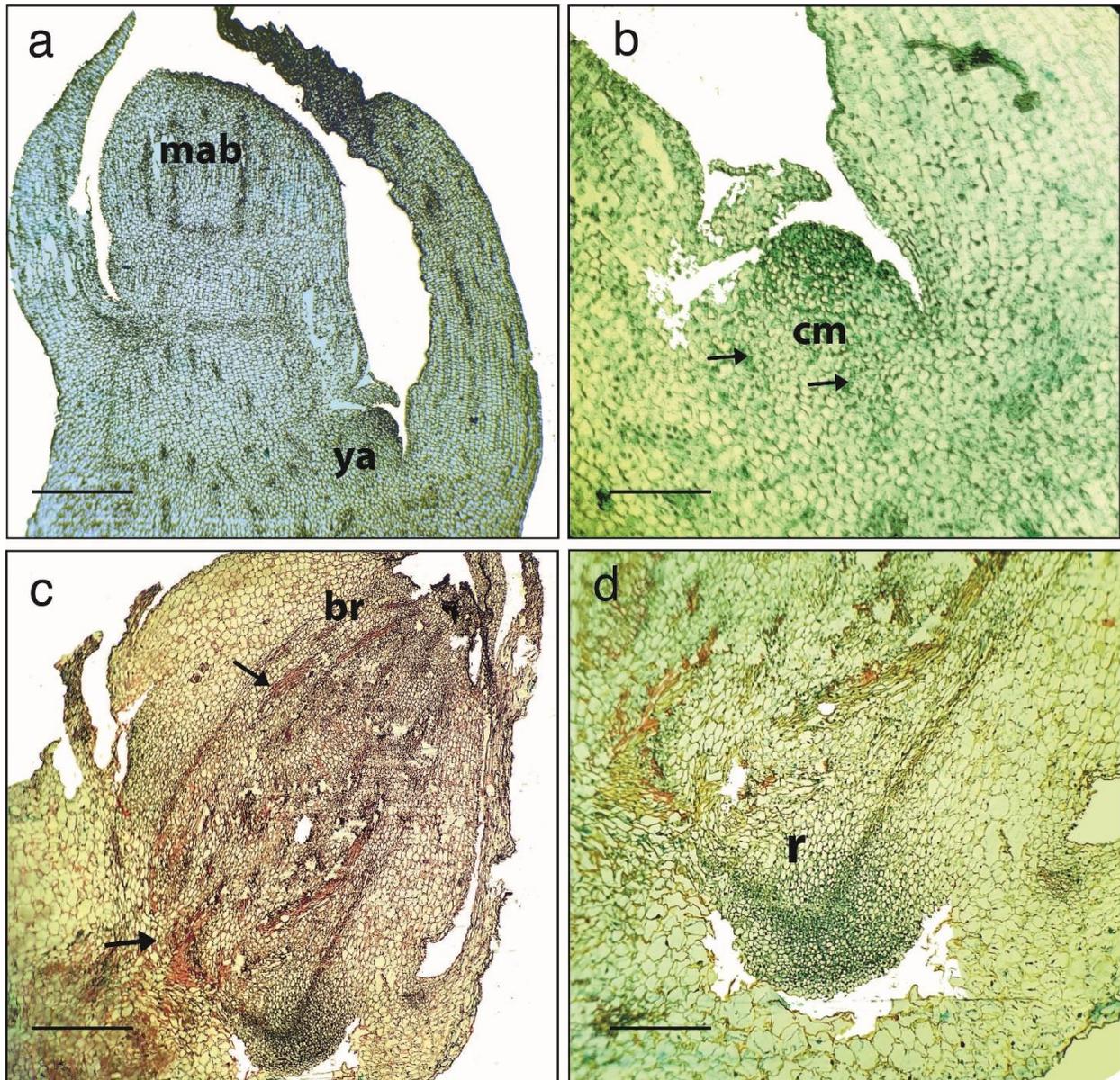


Figura 12 Análisis histológico de rutas morfogénicas en *V. planifolia* obtenidas en sistemas de inmersión temporal y en secciones longitudinales. (a) Estructura que muestra el desarrollo del meristemo apical del brote (mab) y el desarrollo de la yema axilar (ya), se observan primordios foliares. (b) Aumento de (a) para mostrar las células meristemáticas densamente teñidas (cm) y las bandas procambiales señaladas mediante flechas. (c) formación de un brote (br) en la parte terminal de la raíz, las bandas procambiales se señalan con flechas (d) Aumento de (c) para mostrar la diferenciación de la raíz (r) formada en la región de la parte media 6 semanas después de la siembra en un BIT. Escala de la barra 200  $\mu\text{m}$  = a y c. 50  $\mu\text{m}$  = b y d.

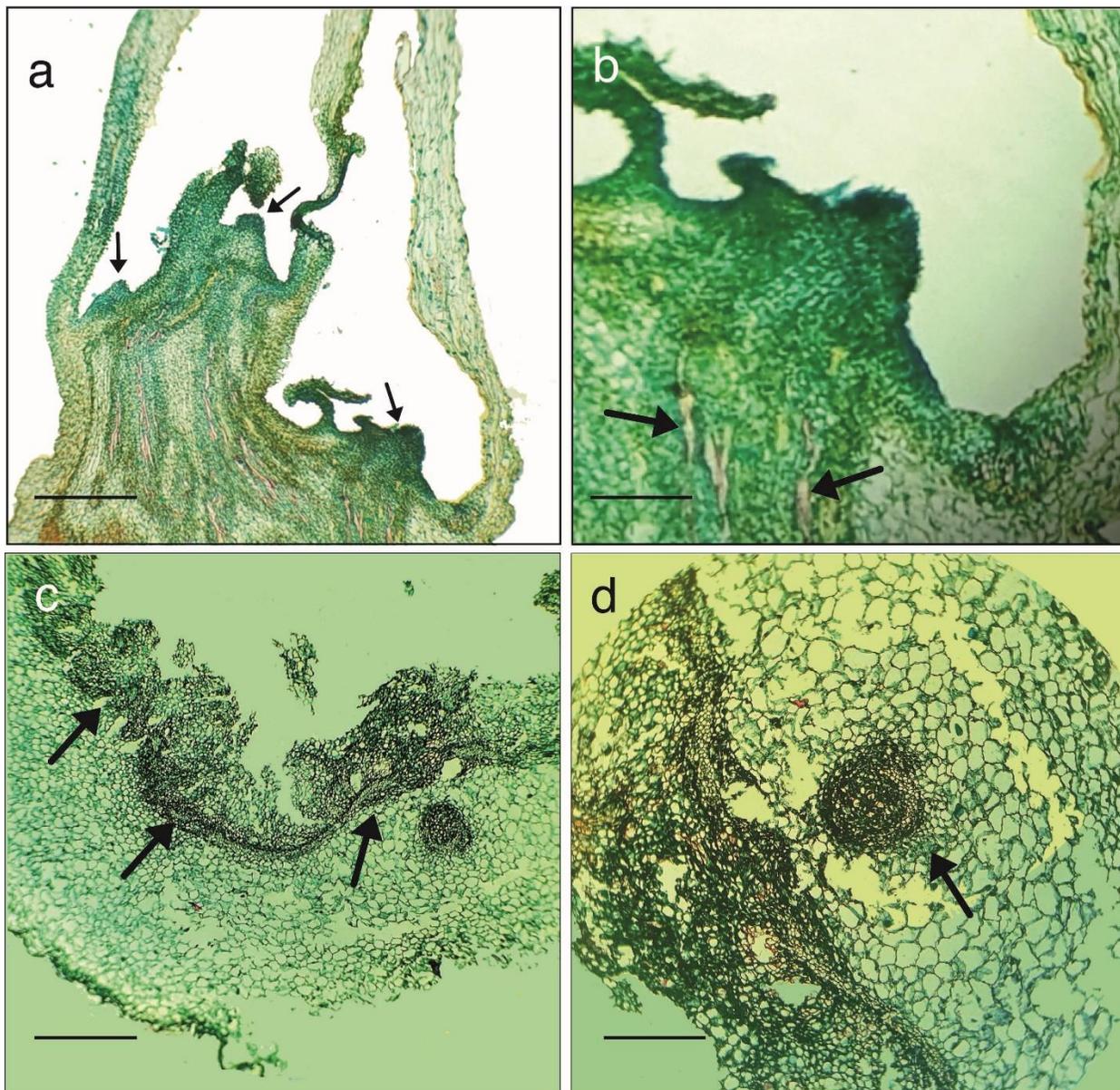


Figura 13 Análisis histológico de rutas morfogénicas en *V. planifolia* como respuesta a sistemas de cultivo BIT. (a) Las flechas indican la formación de estructuras organogénesis que conducen a la formación de “un cluster”,. (b) Aumento de (a) para resaltar la formación de grupos de células meristemáticas densamente teñidas (cm) y las bandas procambiales (bp) indicado por flechas. (c) mostrando con flechas un grupo de células meristemáticas organizadas. (d) Diferenciación de múltiple estructuras a partir de meristemoides localizado en la parte distal de la raíz 6 semanas después de la siembra en un BIT. Escala de barra 200  $\mu\text{m}$  = a y d.; 50  $\mu\text{m}$ . b y c.

La morfología de estructuras regeneradas a partir de explantes de *V. planifolia* en BIT como respuesta a tiempo, frecuencia de inmersión y volumen siguieron las mismas rutas de micropropagación. La morfogénesis en los explantes sembrados inicia con el desarrollo del brote apical seguido del desarrollo de brotes axilares y formación de las raíces que una semana después presentan engrosamientos antes de su transformación en meristemas del brote. A las 6 semanas después de la siembra el desarrollo de brotes adventicios permitió la organización de “cluster”. (Figura 11).

El análisis histológico de las estructuras obtenidas en el presente estudio evidencia a través del vínculo de bandas procambiales la ruta organógena como respuesta de los explantes de *V. planifolia* en los sistemas de inmersión temporal tipo BIT empleado para su micropropagación (Figura 12).

El corte longitudinal de la terminal de la raíz engrosada presentó diferenciación de múltiples brotes a partir de meristemoides formado en la parte distal del extremo de la raíz presente en la Figura 13 c. Fue evidente la formación de una plántula en este proceso de desdiferenciación y rediferenciación (Figura 12 c). Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Philip y Nainar (1988) en medios semisólidos, quienes establecen que las respuestas de transformación de meristemas radicales a meristemas vegetativos en *V. planifolia*, solo se manifiesta en raíces nuevas en interacción del corte realizado y la interacción con auxinas endógenas es lo que induce al centro de quiescencia a la formación de brotes y raíces en estas terminales de raíces. En el presente estudio la transformación de los meristemas de raíz en meristemas vegetativos ocurrió en presencia de benciladenina y caseína hidrolizada en un medio de inmersión temporal muy similar a lo descrito por Philips y Nainar, (1988). El uso de benciladenina en el medio de cultivo para la transformación del meristemo radical en vegetativo concuerda con los resultados obtenidos por Alatorre, (2002), quién establece el efecto de la benciladenina sobre la velocidad de desintegración de la caliptra y formación de estructuras vegetativas en las terminales de raíz. Estas rutas morfogénicas fueron evidenciadas mediante la histología, necesaria ya que se ha reportado que hay altos nivel de variación somaclonal durante la regeneración de callos en *V. planifolia* (Divakaran *et al.* 2015; Ramírez y Iglesias 2016), lo que sugiere que las rutas morfogénicas indirectas originan alta diversidad genética en la *V. planifolia*, otro aspecto que ocasiona variabilidad en la *V. planifolia* es el de subcultivos realizados desde 6 hasta 10 veces y cuando el medio es suplementado con 8.86  $\mu\text{M}$  BAP (Pastelín *et al.* 2019).

## 6. Conclusiones

Con base en las condiciones experimentales y dando respuesta a los objetivos planteados que originó este estudio se concluye:

- i. Las variables morfológicas longitud de brotes y longitud de raíces resultaron con diferencias altamente significativas al evaluar el tiempo de inmersión, el tratamiento de 15 minutos mostró los mayores valores estadísticamente.
- ii. Al evaluar las variables número de brotes y número de hojas se determinaron diferencias significativas al evaluar su respuesta a la frecuencia en que ocurrieron las inmersiones del medio de cultivo. Una frecuencia de 6 inmersiones fue el tratamiento con el que se obtuvieron los mayores valores estadísticamente.
- iii. Las variables longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces e incremento del peso fresco no mostraron valores diferentes estadísticamente cuando se evaluaron tres frecuencias de inmersión.
- iv. Cuando se evaluaron tres volúmenes de medio de cultivo por explante, se cuantificaron diferencias altamente significativas para el número de brotes y de hojas e incremento del peso fresco. Los mayores valores de estas 3 variables se cuantificaron cuando se adicionó 40 ml de medio de cultivo por explante.
- v. Las variables longitud de lámina foliar, número de raíces y longitud de raíces no respondieron estadísticamente a los tratamientos de volumen por explante evaluados en este estudio.
- vi. El número de brotes y hojas, y el incremento de peso fresco resultaron con diferencias estadísticas altamente significativas. El número de brotes que crecieron en el sistema BIT superaron en un 54 % (36 brotes) a los brotes que crecieron en el medio semisólido (20 brotes).
- vii. El incremento en peso fresco de los explantes que crecieron en el sistema BIT superaron en 4 veces (26,48 g) a los explantes que crecieron en un medio de cultivo semisólido.
- viii. Las condiciones físicas que proporciona el sistema de cultivo BIT es más eficiente en sentido de producción de plantas como sistema de micropropagación, en comparación al sistema convencional en medio de cultivo semisólido.
- ix. Los eventos que ocurren durante la regeneración de estructuras de explantes *de V. planifolia* en BIT que fueron evidenciados mediante la histología, evidencian eventos de

organogénesis cuando el meristemo de la raíz se transforma en meristemas vegetativos del brote. Además, se evidencian la ruta de organogénesis con la formación de “cluster” a través de la formación *de novo*.

- x. El uso del biocida ppm (Plant Preservation Mixture) en dosis de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  permitió un desarrollo aséptico del medio de cultivo con 100 % de sobrevivencia.

## 7. Recomendaciones

Con base en las condiciones experimentales y los resultados obtenidos en este estudio se consideran las siguientes recomendaciones

- a) Evaluar la concentración de sales y la carencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo para estimular la formación de raíces en brotes de *V. planifolia* obtenidos en los BIT con los resultados de frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión y volumen de medio por explante obtenidos en este estudio.
- b) Determinar la capacidad máxima de número de explantes por frasco BIT de 2 litros.
- c) Aumentar el tiempo de evaluación de explantes de *Vanilla planifolia* en BIT después de 6 semanas.
- d) Realizar el estudio de respuesta de explantes de *V. planifolia* considerando dosis mayores a  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de benziladenina.

## 8. Referencias Bibliográficas

- Abebe, Z., Mengesha, A., Teressa, A., y Tefera, W. (2009). Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 8(24).
- Adame, G. J., Rodríguez, G. R., Iglesias, A. L. G., Ramos, P. M., Luna, R. M. (2015). Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from in Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93 (3): 669-678. DOI: <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.142>.
- Aki, S., Mikami, T., Naramoto, S., Nishihama, R., Ishizaki, K., Kojima, M., ... y Umeda, M. (2019). Cytokinin signaling is essential for organ formation in *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology*, 60(8), 1842-1854. DOI: [10.1093/pcp/pcz100](https://doi.org/10.1093/pcp/pcz100)
- Alatorre, F. (2002) Estudio morfológico e histológico del híbrido *Vanilla planifolia* Andrews x *Vanilla pompona* Schiede obtenido *in vitro*. Tesis profesional como requisito parcial para obtener el título de: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnica. Chapingo, México. 92p.
- AlKhateeb, A. y Alturki, M. (2014). A comparison of liquid and semi-solid cultures on shoot multiplication and rooting of three date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *Advances in Environmental Biology*, 8(16), 263-269.
- Alvard, D., Cote, F., y Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32(1), 55-60.
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodríguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., y González, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 46(1), 89-94.
- Arencibia, D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., y García, R. (2013). Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Scientia Horticulturae*, 160, 49-53.
- Avila, A. (2018). Estandarización del sistema de inmersión temporal para la micropropagación *in vitro* de *Cattleya Schroederiae*. Universidad de Santander. Trabajo de grado para optar por El título de Microbiólogo Industrial. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Agropecuarias Bucaramanga. 55p.
- Azofeifa, J., Rivera, G., Paniagua, A., Cordero, R., y Salas, E. (2019). Efecto de la desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfológico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 33-49. DOI: <https://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.32360>
- Basail, M., Medero, V., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., López, J., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M., Páz, E., Beovidez, Y., Ortega, A., y Pérez, J. (2011). Multiplicación *in vitro* de 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 11(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/205>
- Basail, M., Medero, V., Otero, E., Torres, M., López, J., Cabrera, M., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M., y Beovidez, Y. (2012). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la propagación *in vitro* del cultivar de plátano vianda INIVITPV06-30 (*Musa* AAB). *Biotecnología Vegetal*, 12(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/150>
- Berthouly M., Etienne H. (2005) Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: Hvoslef-Eide A.K., Preil W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht. DOI: [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_11)
- Bidabadi, S., y Jain, M. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of *in vitro* Plant Regeneration. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 702. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9060702>

- Bory, S., Grisoni, M., Duval, MF y Besse, P. (2008). Biodiversidad y preservación de la vainilla: estado actual del conocimiento. *Recursos genéticos y evolución de cultivos*, 55 (4), 551-571.
- Buccellato (2005) The various uses of *vanilla* in perfumery. *Vanilla: the first international congress*. Allured, Carol Stream, pp 67–70
- Bythrow, D. (2005). Vanilla as a medicinal plant. In *Seminars in integrative medicine* (Vol. 3, No. 4, pp. 129-131). WB Saunders.
- Calvache, C., y Freire, J. (2019). Diseño y desarrollo de un sistema de inmersión temporal semi-automatizado destinado a la micropropagación masal de especies vegetales.
- Damian, A., y Mitidieri, N. (2020). Living in the clouds: A new high-elevation species of Vanilla (Orchidaceae, Vanilloideae) from Perú. *Phytotaxa*, 451(2), 154-160. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.451.2.5>
- Daugusch, A., y Pastore, G. (2005). Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. *Química Nova*, 28(4), 642-645. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000400017>
- de Feria, M., Chávez, M., Quiala, E., y Jiménez, E. (2003). Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*, 3(3). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/246>
- De Klerk, J., Arnholdt, B., Lieberei, R., y Neumann, H. (1997). Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia plantarum*, 39(1), 53-66. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1000304922507>
- Divakaran, M., Babu, K. N., Ravindran, P. N., Peter, K. V., Plant, A. J., y Res, S. (2015). Biotechnology for micropropagation and enhancing variations in Vanilla. *Asian J Plant Sci Res*, 5(2), 52-62.
- Ehlers, D., y Pfister, M. (1997). Compounds of vanillons (*Vanilla pompona* Schiede). *Journal of Essential Oil Research*, 9(4), 427-431. [10.1080/10412905.1997.9700743](https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9700743)
- Escalona, M., Gonzalez, J., Cejas, I., Aragon, C., Capote, I., Rodriguez, R., y Debergh, P. (2006). Temporary immersion bioreactor: An efficient technology for scaling up plant production. in *in vitro cellular y developmental biology-animal* (vol. 42, pp. 13a-13a). 514
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., y Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Etienne, H., y Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology* 97: 104-113 DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02275.x>
- Fitzgerald, J., Stratford, M., y Narbad, A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 113-122. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00059-X)
- Gantait, S., y Kundu, S. (2017). *In vitro* biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9), 196. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2462-1>
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., Das, P. K., y Nandy, S. (2009). Mass multiplication of *Vanilla planifolia* with pure genetic identity confirmed by ISSR. *Int. J. Plant Dev. Biol*, 3(1), 18-23.

- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., Das, PK y Nandy, S. (2009). Multiplicación masiva de *Vanilla planifolia* con identidad genética pura confirmada por ISSR. *En t. J. Plant Dev. Biol*, 3 (1), 18-23.
- Gätjens, O., Acuña, C., Montero, W., Díaz, C., y Torres, S. (2018). Propagación masiva y formación de callos protocórmicos de vainilla a partir de ápices radicales. *Polibotánica*, (45), 157-180. DOI: <https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.12>
- Geetha, S. y Sudheer, S. (2000). *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Curr. Sci.* 79:886–889.
- Gelski J. (2019). Vanilla prices slowly drop as crop quality improves. 2019. Foodbussinesnews.04.22
- Gelski. J. (2017). Vanilla prices shoot up, near \$500 per kilogram. FoodBussinesNews. 02.22
- Geoge, S. y Ravishankar, A. (1997). *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using. Bud explants. *Plant Cell Report*. 16:490-494. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01092772>
- Giridhar, P., y Ravishankar, G. A. (2004). Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. Under influence of thiadiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian Journal of Biotechnology*. 3:113-118- Consultado el día, 15/05/2019. Disponible en: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5837>
- González, L. (2003). Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al Título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. pp 67. Consultado el día, 15/04/2019. Disponible en: <https://hdl.handle.net/2238/216>
- Havkin F. y Belanger, F. (2007). Aplicación de la ingeniería metabólica a las vías biosintéticas de la vainillina en *Vanilla planifolia*. En *Aplicaciones de la ingeniería metabólica de las plantas*
- Hernández, F., Dolce, N., Flores, O., Rascón, M., Ángeles, G., Folgado, R., y González, M. (2020). Avances en la criopreservación de puntas de brote de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.): Evaluación de nuevos factores biotecnológicos y criogénicos. *In vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 1-11.
- Hicks, S. (1980). Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *The Botanical Review*, 46(1), 1-23. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02860865>
- Hoffman, G., y Zapf, M. (2012). Review of vanilla. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles. *Prod* 75:2272–2273 <https://doi.org/10.1021/np3008045>
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., y Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143(9), 1442-1451. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.134668>
- Isah, T. (2019). De novo *in vitro* shoot morphogenesis from shoot tip-induced callus cultures of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Sm. *Biological research*, 52. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0211-1>
- Jain, M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118(2), 153-166. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004124519479>
- Janarthanam, B. y Seshadri, S. (2008). Regeneración de plántulas a partir de callos derivados de hojas de *Vanilla planifolia* Andr. *In vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 44 (2), 84-89.
- Jericó, J., Bello, J., Spinoso, J., y Iglesias, G. (2014). Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *AGRO*.
- Jericó, J., Bello, J., Spinoso, J. y Iglesias, A. (2014). Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agroproductividad*. Año 7 • Volumen 7 • Número 3. Pp 63-68- Consultado el día, 15/04/2019. Disponible en: <https://bit.ly/3rNoxu5>

- Kalimuthu, K., Senthilkumar, R., y 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>
- Keshava, C., Keshava, N., Ong, T y Nath, J. (1998). Efecto protector de la vainillina sobre micronúcleos inducidos por radiación y aberraciones cromosómicas en células V79. Investigación de mutaciones / Mecanismos fundamentales y moleculares de mutagénesis, 397 (2), 149-159.
- Kononowicz H, Janick J (1984) *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*. Hort Science 19:58–59
- Lara, A., Valverde, R., y Gómez, L. (2003). Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense*, 27(1), 37-48. 27(1): 37-48 . [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v27n01\\_037.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v27n01_037.pdf)
- Lee, H., Murguía, J., García, B., Córdova, A, Laguna, A., Mijangos, J, y Santana-Buzzy, N. (2008). *In vitro* propagación clonal de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews'). *HortScience*, 43 (2), 454-458. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.2.454>
- Lirdprapamongkol, K., Sakurai, H., Kawasaki, N., Choo, K., Saitoh, Y., Aozuka, Y., y Saiki, I. (2005). La vainillina suprime la invasión *in vitro* y la metástasis in vivo de las células de cáncer de mama de ratón. *Revista europea de ciencias farmacéuticas*, 25 (1), 57-65.
- Marín, R. (2003) Microorganismos Benéficos. Appl. Revista Crisol. 11–12.
- McAlister B, Finnie J, Watt P, Blake C (2005). Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for the production of commercial *Eucalyptus* clones at Mondi Forests (SA). *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81: 347-358. DOI: [https://doi.org/10.1007/s1-4020-3200-5\\_33](https://doi.org/10.1007/s1-4020-3200-5_33)
- Mehrotra, S., Goel, K., Kukreja, K., Mishra, N. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialisation. *Afr. J. Biotechnol.* 6:1484-1492.
- Mendonça, E., Stein, V., Carvalho, H., Santos, B., Beijo, L., y Paiva, L. (2016). Uso de biorreactores de imersão continua, temporária e meio de cultura semissólido na produção de clones de *Eucalyptus camaldulensis*. *Ciência Florestal*, 26(4), 1211-1224. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509825112>
- Mengesha, A., Ayenew, B., Gebremariam, E. y Tadesse, T. (2012). Micropropagación de *Vanilla planifolia* utilizando almidón de Enset (*Ensete ventricosum* (Welw, cheesman)) como agente gelificante. *Curr Res J Biol Sci* , 4 (4), 519-525.
- Mironova, V., Xu, J. (2019). Una vista unicelular de la regeneración de tejidos en plantas. *Curr. Opin. Planta. Biol.*, 52, 149-154. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.003>
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). Un medio revisado para un crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tejido de tabaco. *Physiologia plantarum* 15 (3), 473-497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ocampo, R. (1987). Seminario sobre el cultivo de especias en Costa Rica: resúmenes de conferencias. In *Seminario sobre el cultivo de especias en Costa Rica San José Costa Rica. 3-4 Setiembre 1987* (No. F01/7298). Colegio de Ingenieros Agrónomos, San José Costa Rica. Programa Cooperativo UCR-IDA.
- Odoux, E., Escoute, J., Verdeil, L y Brillouet, JM (2003). Localización de la actividad de la  $\beta$  - D - glucosidasa y la glucovanillina en la vaina de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Anales de botánica* , 92 (3), 437-444.
- Paek K., Chakrabarty D., Hahn E. (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. In: Hvoslef-Eide A.K., Preil W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht. DOI: [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_6](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_6)
- Paek KY, Hahn E-J, Son S-H (2001). Application of Bioreactors for large-Scale Micropropagation Systems of Plants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:149-157. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0027-9>

- Palama, L., Menard, P., Fock, I., Choi, H., Bourdon, E., Govinden, J., y Kodja, H. (2010). Diferenciación de brotes a partir de cultivos de callos protocolares de *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): respuestas proteómicas y metabólicas en una etapa temprana. *Biología vegetal de BMC*, 10 (1), 82.
- Palma, T. (2013). Micropropagación de cultivos tropicales de importancia económica. Centro de Investigación en Biotecnología, Agroindustria y Veterinaria. Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI).79p
- Pastelín, M., Salinas, J., González, MT., Castañeda Castro, O., Galindo Tovar, M. E., & Bello Bello, J. J. (2019). Evaluation of *in vitro* shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 25(2), 561–567. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00645-9>
- Peñate, L., Concepción, O., Aragón, C., Rodríguez, R., González-Olmedo, J., Escalona, M., Cid, M., y Pina, D. (2007). Evaluación del efecto de tres condiciones de cultivo *in vitro* en la calidad de plántulas de caña de azúcar propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Bioteconología Vegetal*, 7(3). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/374>
- Philip, J., & Nainar, A. (1986). Clonal propagation of *Vanilla planifolia*(Salisb.) Ames using tissue culture. *Journal of Plant Physiology*, 122(3), 211-215. doi:10.1016/S0176-1617(86)80119-5 [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80119-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80119-5)
- Philip, V. y Nainar, S. (1988). Transformación *in vitro* del meristemo de la raíz en brotes y plántulas en *Vanilla planifolia*. *Annals of botany*, 61, 193-199. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087542>
- Philip, V. J., & Nainar, S. A. Z. (1987). Embryogenesis in *Vanilla planifolia*(Orchidaceae). *Beitrag zur Biologie der Pflanzen*.
- Priefert, H., Rabenhorst, J., & Steinbüchel, A. (2001). Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3), 296-314. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530100687>
- Radice S. (2010) Morfogénesis *in vitro* . Capítulo 1. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 2010. II Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología Editores: Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>
- Rahman, A. , Othman, A. , Kamaruddin, F. and Ahmad, A. (2015) Direct Shoot Regeneration from Callus of *Melicope lunu-ankenda*. *Natural Science*, 7, 81-87. DOI: [10.4236/ns.2015.72009](https://doi.org/10.4236/ns.2015.72009).
- Ramírez, C., Rapidel, B., y Matthey, J. (1999, July). Principales factores agronómicos restrictivos en el cultivo de la vainilla y su alivio en la zona de Quepos, Costa Rica. In *XI Congreso Nacional Agronómico, Costa Rica* (pp. 309-313).
- Ramírez, M., & Iglesias, L.. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia*Jacks. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Ramos, A., Iglesias, L., Bello, J., & Lee, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(5), 576-581. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9602-8>
- Raspor, M., Motyka, V., Ninković, S., Dobrev, P. I., Malbeck, J., Ćosić, T., ... & Dragičević, I. Č. (2020). Endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in *in vitro* grown potato: a contribution to potato hormonomics. *Scientific reports*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60412-9>

- Roels S, Noceda S, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodriguez R, Debergh P (2006). The effect of headspace renewal in a Temporary Immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 84:155-163. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9013-y>
- Schlüter, P.M., Arenas, M.A.S. & Harris, S.A. (2007). Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Econ Bot* **61**, 328 [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2007\)61\[328:GVIVPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2007)61[328:GVIVPO]2.0.CO;2)
- Shaik, S., Dewir, Y. H., Singh, N., & Nicholas, A. (2010). Micropropagation and bioreactor studies of the medicinally important plant *Lessertia* (*Sutherlandia*) *frutescens* L. *South African Journal of Botany*, 76(2), 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.005>
- Shanmugavalli, N., Umashankar, V. y Raheem (2009). Actividad antimicrobiana de *Vanilla planifolia*. *Indian J. Sci. Technol* , 2 (3), 37-40. DOI: [10.17485/ijst/2009/v2i3.14](https://doi.org/10.17485/ijst/2009/v2i3.14)
- Soto, M., & Dressler, R. (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. 285-354. [10.15517/lank.v0i0.12065](https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.12065) .
- Spinoso, L., Chavez, A., Bogdanchikova, N., Pérez, A., Morales, V., & Bello, J. (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129, 195–207 <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>
- Sreedhar, RV, Venkatachalam, L. y Bhagyalakshmi, N. (2007). Fidelidad genética de cultivos de brotes micropropagados a largo plazo de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) según lo evaluado por marcadores moleculares. *Revista de biotecnología: Tecnología de nutrición sanitaria*, 2 (8), 1007-1013.
- Sreedhar, V., Venkatachalam, L. & Neelwarne, B. (2009). Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia*). *J Plant Growth Regul* 28, 46–57. <https://doi.org/10.1007/s00344-008-9073-4>
- Stanly C, Bhatt A, & Keng, L. (2010). A comparative study of Curcuma sedoaria and Zinziber zerumbet plantlet production using different micropropagation systems. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 4326-4333.
- Su, H., Liu, B., & Zhang, S. (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant*, 4(4), 616-625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Sugiyama, M. (1999). Organogenesis *in vitro* . *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 61–64. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80012-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80012-0)
- Takayama, S. y Misawa, M. (1981). Propagación masiva de plántulas de *Begonia × hiemalis* mediante cultivo en agitación. *Fisiología vegetal y celular*, 22 (3), 461-467.
- Tan, C., Chin, F., & Alderson, P. (2013). Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5), 626-630. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9526-8>
- Tipparaju, S., Ravishankar, S., & Slade, P. J. (2004). Survival of *Listeria monocytogenes* in vanilla-flavored soy and dairy products stored at 8 C. *Journal of food protection*, 67(2), 378-382. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.2.378>
- Toth, S., Lee, J., Havkin, D., Belanger, C., & Hartman, G. (2011). Volatile compounds in vanilla. *Handbook of vanilla science and technology*, 1, 183-219. [10.1002/9781444329353.ch11](https://doi.org/10.1002/9781444329353.ch11). In Handbook of Vanilla Science and Technology, Daphna Havkin-Frenkel and Faith C. Belnager
- Varela, Q. (2011). Vanilla production in Costa Rica. In Handbook of Vanilla Science and Technology, First Edition, edited by Daphna Havikin-Frenkel and Faith C. Belanger. 2011. Blackwell Publishing Ltd. Consultado el día 20/05/2019 Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119377320>

- Villegas, J., & Palma, T. (2019). *In vitro* multiplication of ginger *Zingiber officinale* Roscoe, cv. 'Grand Caiman' in Temporary Immersion System. *Biotechnología Vegetal*, 19(4), 297-306. Epub 01 de diciembre de 2019. Recuperado en 05 de diciembre de 2021, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2074-86472019000400297&lng=es&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472019000400297&lng=es&tlng=en).
- Walton, J., Mayer, J., Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63, 505-515 [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00149-3)
- Wan, W., Low, Y., Mumaiyizah, B., Chai, Y., Loh, Y., Ong, J., & Lai, S. (2020). Effect of lignosulphonates on *Vanilla planifolia* shoot multiplication, regeneration and metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03099-9>
- Watt, P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14025-14035.. DOI: [10.5897/AJB12.1693](https://doi.org/10.5897/AJB12.1693)
- Zafar, N., Mujib, A., Ali, M., Tonk, D., Gulzar, B., Malik, M., Sayeed, R., & Mangain, J. (2019). Genome size analysis of field grown and tissue culture regenerated *Rauvolfia serpentina* (L) by flow cytometry: histology and scanning electron microscopic study for *in vitro* morphogenesis. *Industrial Crops and Products*, 128, 545-555. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.049>
- Zhang, H.; Zhang, T., Liu, H.; Shi, Y.; Wang, M.; Bie, M.; Li, G.; Zhang, S. (2018). Thioredoxin mediated ROS homeostasis explains natural variation in plant regeneration. *Plant Physiol.*, 176, 2231–2250. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00633>
- Ziv M (2000). Bioreactor technology for plant micropropagation. *Hort. Rev.* 24:1-30.
- Ziv M (2005). Simple bioreactors for the mass propagation of plants. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81:277-285

## 9. Anexos

Cuadro A 1 Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para el número y longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces, e incremento del peso fresco **en el estudio de tiempo de inmersión** de la micropropagación de *Vanilla planifolia*, en BIT. Santa Clara, San Carlos, evaluados 6 semanas después de la siembra.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Long de brotes (cm)</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Longitud lámina foliar (cm)</b>	<b>Número raíces</b>	<b>Long raíces(cm)</b>	<b>Incremento de peso fresco (g)</b>
<b>Trat</b>	114**	0,22 <sup>NS</sup>	18,58 <sup>NS</sup>	0,13 <sup>NS</sup>	27,58 <sup>NS</sup>	0,43**	6,25 <sup>NS</sup>
<b>Error</b>	7,08	0,08	6,69	0,10	15,69	0,03	3,58
<b>Gl trat</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>Gl error</b>	8	8	8	8	8	8	8
<b>CV</b>	8,92	12,61	13,50	21,93	27,63	11,11	58,00

NS=Diferencias no significativas. \*\* Diferencia altamente significativas para  $p < 0,01$ .

Cuadro A 2 Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para el número y longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces, e incremento del peso fresco **en el estudio de frecuencia de inmersión** de la micropropagación de *Vanilla planifolia* en BIT, Santa Clara, San Carlos, evaluados 6 semanas después de la siembra.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Long de brotes (cm)</b>	<b>Nº hojas</b>	<b>Longitud lámina foliar (cm)</b>	<b>Número raíces</b>	<b>Long raíces (cm)</b>	<b>Incremento de peso fresco (g)</b>
<b>Trat</b>	115,8**	0,014 <sup>NS</sup>	161,07 **	0,13 <sup>NS</sup>	4,87 <sup>NS</sup>	0,014 <sup>NS</sup>	3,04 <sup>NS</sup>
<b>Error</b>	5,13	0,207	8,73	0,074	5,28	0,09	2,30
<b>Gl trat</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>Gl error</b>	8	8	8	8	8	8	8
<b>CV</b>	7,76	11,48	19,52	19,52	28,97	42,42	20,55

NS=Diferencias no significativas. \*\* Diferencia altamente significativas para  $p < 0,01$ .

Cuadro A 3 Cuadrados medios, fuente de variación y significancia para el número y longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces, e incremento del peso fresco **en el estudio de volumen** en BIT en la micropropagación de *Vanilla planifolia*. Santa Clara, San Carlos, evaluados 6 semanas después de la siembra.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Long de brotes (cm)</b>	<b>Nº hojas</b>	<b>Longitud lámina foliar (mm)</b>	<b>Número raíces</b>	<b>Long raíces (cm)</b>	<b>Incremento de peso fresco (g)</b>
<b>Trat</b>	168,47 **	134**	72,27**	0,39 <sup>NS</sup>	0,60 <sup>NS</sup>	0,32 <sup>NS</sup>	178**
<b>Error</b>	4,30	0,013	3,93	0,23	1,85	0,12	6,75
<b>Gl trat</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>Gl error</b>	8	8	8	8	8	8	8
<b>CV</b>	7,17	6,30	8,91	36,49	21,94	47,07	13

NS=Diferencias no significativas. \*\* Diferencia altamente significativas para  $p < 0,01$ .

Cuadro A 4 **Prueba de t** para las variables número y longitud de brote, número de hojas, longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces e incremento en peso fresco 6 semanas después de la siembra. Se presenta la media  $\pm$ desviación estándar.

<b>Variables</b>	<b>BIT</b>	<b>Semisólido</b>	<b><math>\mu</math>BIT- <math>\mu</math>Semi*</b>	<b>Valor T</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
<b>Número brotes</b>	35,6 $\pm$ 1,52	20 $\pm$ 1,41	15,60	16,82	0,001
<b>Longitud brotes (cm)</b>	1,68 $\pm$ 0,04	1,42 $\pm$ 0,40	0,26	1,44	0,180
<b>Número hojas</b>	26,00 $\pm$ 0	15,20 $\pm$ 0,45	10,00	54	0,001
<b>Longitud lámina foliar (cm)</b>	1,58 $\pm$ 0,08	1,56 $\pm$ 0,09	0.02	0,37	0,73
<b>Número raíces</b>	6,00 $\pm$ 1,00	4,00 $\pm$ 2,74	2,00	1,53	0,16
<b>Longitud raíces (cm)</b>	0,5 $\pm$ 0	0,68 $\pm$ 0,25	-0,18	-1,62	0,14
<b>Incremento de peso fresco (g)</b>	26,48 $\pm$ 2,14	6,48 $\pm$ 0,98	20,00	19,02	0,001

Cuadro A 5 Resultados de la multiplicación de *Vanilla planifolia* en BIT con tres tiempos de inmersión, variables en las que se encontró diferencias estadísticas 6 semanas después de la siembra.

<b>Tiempos de inmersión</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Longitud de raíces (cm)</b>
<b>5 min</b>	24,00	1,40
<b>10 min</b>	29,00	1,73
<b>15 min</b>	34,00	2,06
<b>Ecuación de regresión</b>	Y=5,00 X+ 19,00	Y=0,33 X +1,07
<b>R<sup>2</sup></b>	0,66	0,76
<b>Fuente de variación</b>		
<b>Tratamiento</b>	114**	0,43**
<b>Error</b>	7,08	0,03
<b>GL tratamiento</b>	2,00	2,00
<b>GL error</b>	8,00	8,00
<b>Coef. variación</b>	8,92	11,11

\*\*diferencias altamente significativas para  $p < 0.001$ . n=10

Cuadro A 6 Resultados de la multiplicación de *Vanilla planifolia* en BIT con tres frecuencias de inmersión. variables en las que se encontró diferencias estadísticas 6 semanas después de la siembra.

<b>Frecuencia de inmersión</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Número de hojas</b>
<b>Cada 6 horas</b>	33,7	34,73
<b>Cada 12 horas</b>	28,9	29,13
<b>Cada 18 horas</b>	24,1	23,53
<b>Ecuación de regresión</b>	$Y = -4,8 X + 38,5$	$Y = -5,6 X + 40,33$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,74	0,67
<b>Fuente de variación</b>		
<b>Tratamiento</b>	115,80**	161,07**
<b>Error</b>	5,13	8,75
<b>GL tratamiento</b>	2,00	2,00
<b>GL error</b>	8,00	8,00
<b>Coef. variación</b>	7,76	19,52

\*\*diferencias altamente significativas para  $p < 0,001$ . n=10

Cuadro A 7 Resultados de la multiplicación de *Vanilla planifolia* en BIT con tres volúmenes de medio por explante. Variables en las que se encontró diferencias estadísticas 6 semanas después de la siembra.

Volumen de medio por explante	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Incremento de peso fresco
20 ml	24,33	2,08	18,26	11,79
30 ml	29,63	1,92	22,06	17,00
40 ml	34,93	1,76	25,86	22,21
Ecuación de regresión	Y=5,30 X+19,03	Y=-0,16 (X) + 2,24	Y=3,8 X +14,46	Y=5,21 X+6,58
R <sup>2</sup>	0,75	0,65	0,76	0,65
<b>Fuente de variación</b>				
Tratamiento	168,47**	134**	72,27**	178**
Error	4,30	0,013	3,93	6,75
GL tratamiento	2,00	2,00	2,00	2,00
GL error	8,00	8,00	8,00	8,00
Coef. variación	7,17	6,30	8,91	13,00

\*\*diferencias altamente significativas para p<0,001. n=10