

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE PRACTICA DE ESPECIALIDAD

RESPUESTA DE TRES EXPLANTES DE VAINILLA (*Vanilla planifolia*) A DIFERENTES FRECUENCIAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Karla Susana González Luna

CARTAGO, 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 por Karla Susana González Luna
como requisito parcial para optar al título de Bachiller en
Ingeniería en Biotecnología

Miembros del Tribunal

M.Sc. Tomás Palma
Profesor Asesor

M.Sc. Silvana Alvarenga
Lectora

Lic. Jaime Brenes
Lector

Dedicatoria

Al que observa mi caminar,
guía mis pasos y
no me deja atrás.

*Hay un puente que une
lo que hago
con lo que me gustaría ser.*

A los seres que me dieron
un hogar
en el cual crecer y
un ejemplo
en el cual creer.

*El esfuerzo es saludable e
indispensable
pero, sin resultados,
no significa nada.*

Agradecimientos

A mis padres,
por apoyarme al partir en busca de sueños,
por sus preocupaciones y esfuerzos, y
sobre todo, por el sencillo hecho de tenerlos a mi lado.

A don Tomás Palma y Wayner Montero
por su colaboración en la realización de este proyecto.

A Estela, Ubannia, Elieth, Kro, Silvin y
demás amistades que la universidad me dio,
en su compañía transcurrieron
grandes momentos de lucha, desarrollo y alegría.
En especial para Adrián J. Z. por todo
lo que me ha brindado
en este tiempo.

Índice

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Índice	IV
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
Resumen	IX
Abstract	X
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. Revisión de literatura	4
3.1. Origen	4
3.2 Importancia de la vainilla	5
3.3 Historia y situación actual de la vainilla en Costa Rica	6
3.4 Botánica	7
3.5. Variedades	9
3.6. Requerimientos ecológicos	10
3.7. Micropropagación	10
Organogénesis	11
Factores que afectan la organogénesis	14
3.8 Cultivo <i>in vitro</i> de vainilla	20
3.9 Sistema de Inmersión temporal	21
3.9.1 Funcionamiento del sistema	22
3.9.2 Material necesario para el sistema RITA [®]	23
3.9.3 Principales ventajas del sistema RITA [®]	24
3.9.4 Mejoras en relación con el medio semi-sólido	25
4. Materiales y métodos	26
4.1 Ubicación del proyecto	26
4.2 Material experimental	26
4.3 Sistema de cultivo	26

4.4 Medio de cultivo -----	27
4.5 Tratamientos -----	27
4.6 Condiciones físicas de crecimiento-----	28
4.7 Variables a evaluar -----	29
4.8 Análisis Estadístico-----	30
5.Resultados y discusión -----	31
5.1 Supervivencia-----	31
5.2Número y área de callo-----	31
5.3 Porcentaje y tiempo de brotación -----	35
5.4 Número de brotes -----	37
5.5 Longitud de brotes -----	41
5.6 Número y longitud de raíces -----	43
6.Conclusiones -----	46
7. Recomendaciones -----	47
8.Literatura Citada-----	48
Anexo A -----	52
Anexo B -----	54
Anexo C -----	55
Anexo D -----	56

Índice de cuadros

CUADRO 1. TRATAMIENTOS PARA DETERMINAR LA RESPUESTA DE TRES EXPLANTES DE VAINILLA (VANILLA PLANIFOLIA) A DIFERENTES FRECUENCIAS DE INMERSIÓN EN EL SISTEMA (RITA®).....	28
CUADRO A1. ANÁLISIS DE VARIANZA EN UNA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE VAINILLA (VANILLA PLANIFOLIA) A DIFERENTES FRECUENCIAS DE INMERSIÓN EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.	52
CUADRO A2. PRUEBA DUNCAN EN UNA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE TRES EXPLANTES DE VAINILLA (VANILLA PLANIFOLIA) A DIFERENTES FRECUENCIAS DE INMERSIÓN EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL, A LAS OCHO SEMANAS DE SIEMBRA.....	52
CUADRO A3. PRUEBA DUNCAN EN UNA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE TRES EXPLANTES DE VAINILLA (VANILLA PLANIFOLIA) A DIFERENTES FRECUENCIAS DE INMERSIÓN EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL, A LAS OCHO SEMANAS DE SIEMBRA.....	53

Índice de figuras

FIGURA 1. <i>VANILLA PLANIFOLIA</i> EN FLORACIÓN.....	5
FIGURA 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>VANILLA PLANIFOLIA</i>	9
FIGURA 3. FASES DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMÁTICO RITA®	22
FIGURA 4. FÓRMULA DE MEDICIÓN DEL ÁREA DE CALLO.....	30
FIGURA 5. NÚMERO DE CALLOS ORIGINADOS EN EL EXPLANTE ÁPICE RADICAL DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	33
FIGURA 6. CRECIMIENTO DEL ÁREA DE CALLO A PARTIR DE MERISTEMOS RADICALES DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.	33
FIGURA 7. INDUCCIÓN DE CALLO A PARTIR DE ÁPICES RADICALES DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	34
FIGURA 8. TIEMPO DE BROTAÇÃO EN MICROESTACAS Y ÁPICES DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.	36
FIGURA 9. PORCENTAJE DE BROTAÇÃO DE MICROESTACAS Y ÁPICES DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL A LAS 4 SEMANAS DE SIEMBRA.	36
FIGURA 10. PROMEDIO DE BROTES POR EXPLANTE DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.	38
FIGURA 11. NÚMERO TOTAL DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE MICROESTACAS DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL A LAS 8 SEMANAS DE SIEMBRA.	39
FIGURA 12. LONGITUD PROMEDIO DE BROTES EN MICROESTACAS Y ÁPICES DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.	39
FIGURA 13. RESPUESTA MORFOGÉNICA EN ÁPICES DE TALLO Y MICROESTACAS DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS EN TRES FRECUENCIAS DE INMERSIÓN.....	40

FIGURA 14. LONGITUD PROMEDIO DE LOS BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE MICROESTACAS DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.	42
FIGURA 16. PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO EN MICROESTACAS Y ÁPICES DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.	44
FIGURA 17. PROMEDIO DE RAÍCES EN MICROESTACAS Y ÁPICES DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	44
FIGURA 18. LONGITUD PROMEDIO DE RAÍCES EN MICROESTACAS Y ÁPICES DE VAINILLA (<i>VANILLA PLANIFOLIA</i>) CULTIVADOS A 2, 4 Y 6 INMERSIONES DIARIAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.	45
FIGURA 19. COMPONENTES DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL SIMPLIFICADO UTILIZADO EN EL CULTIVO DE <i>VANILLA PLANIFOLIA</i> . (A) PROGRAMADOR AUTOMÁTICO REGULADOR DE LA FRECUENCIA Y DURACIÓN DE LAS INMERSIONES. (B) ESTANTE Y RECIPIENTES CONECTADOS AL SISTEMA. (C) COMPRESOR DE AIRE A UN LITRO POR MINUTO Y POR RITA CON UNA PRESIÓN DE 0,2 BAR.	54
FIGURA 20. CULTIVO DE EXPLANTES DE <i>VANILLA PLANIFOLIA</i> EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL SIMPLIFICADO.	55
FIGURA 21. DESARROLLO DE EXPLANTES DE <i>VANILLA PLANIFOLIA</i> EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL SIMPLIFICADO.	55

Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes periodos de inmersión temporal

Karla Susana González Luna

Resumen

En el laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos; se desarrollo un estudio sobre la respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) al ser cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal. Las inmersiones en el medio de cultivo tuvieron una frecuencia de 2, 4 y 6 veces al día con una duración de 2 minutos cada una. Los explantes fueron ápices de tallo, microestacas y ápices de raíz para un total de 9 tratamientos evaluados. El medio de cultivo utilizado fue un M&S suplementado con 1 mg L⁻¹ de Benciladenina (BA), 30 g L⁻¹ de sacarosa y 1 g L⁻¹ de caseína hidrolizada. Después de 8 semanas de evaluación se obtuvo que los ápices de raíz sometidos a 4 inmersiones/día formaron callo con un área promedio de 5 mm². En cuanto al tiempo de brotación, las microestacas reaccionaron más rápidamente que los ápices de tallo, presentándose brotación entre los primeros 15-28 días después de la siembra. Estos dos últimos explantes cultivados a 4 inmersiones/día desarrollaron el número promedio mayor de brotes por explante (2.1 y 2.2 respectivamente); pero la longitud promedio mayor (11.2 mm) se presentó en los brotes desarrollados a partir de las microestacas sometidas a 2 inmersiones/día. El porcentaje de enraizamiento obtenido osciló entre 5% y 22.5%, la mejor respuesta se presentó en las microestacas sin influencia de la frecuencia de inmersión.

En general para el cultivo en el Sistema de Inmersión Temporal Simplificado de vainilla, para el desarrollo de callo se podría utilizar ápices de raíz cultivados a 4 inmersiones/día; para obtener brotación y enraizamiento directamente, los explantes microestacas y ápices de tallo se cultivan en a 4 inmersiones/día.

Palabras clave: Vainilla, inmersión temporal, frecuencia, ápices, microestacas.

Abstract

Keys words:

1. Introducción

Desde tiempos precolombinos la vainilla ya era usada como alimento o medicina; actualmente el derivado de esta planta (vainillina) se produce a nivel mundial en grandes cantidades para diversas industrias, donde se aprecia por su aroma y poder fijador (Alatorre, 2002).

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es una orquídea originaria de los bosques tropicales de México, América Central, las Antillas y algunos países de América del Sur (Jiménez, 1990). Esta planta se desarrolla satisfactoriamente bajo las condiciones climáticas de Costa Rica; en 1681 se observó algunos cultivos, pero no fue hasta la década de 1970 en que se dieron los primeros cultivos y para el año 1985 se establecieron las primeras plantaciones comerciales (Ocampo, 1987). Costa Rica ofrece ventajas comparativas para el cultivo de la vainilla, derivadas principalmente de su cercanía relativa con el mayor consumidor mundial que es Estados Unidos.

La propagación sexual de la vainilla es difícil bajo condiciones naturales al tener la flor los órganos sexuales separados por una membrana llamada rostelo que impide la polinización natural y se tardaría de 310 a 570 días para obtener plántulas completas en invernadero (Parra, 1987 citado por Alatorre, 2002); es por esto que la multiplicación de vainilla se realiza en forma asexual a través de esquejes de tallos. En los últimos años el cultivo *in vitro* ha constituido una alternativa para la producción de plantas a través de la micropropagación, lo que ha beneficiado a los productores de este cultivo, ya que una limitante del cultivo es la obtención de material vegetativo con características de alta productividad; aun así, se buscan nuevas tecnologías que permitan la automatización y mejoren los protocolos para la aclimatización de las plantas.

La técnica de inmersión temporal (RITA[®]) se ha utilizado con éxito para la propagación de piña, caña de azúcar, banano, plátano, especies forestales y ornamentales. Con el empleo de este sistema los coeficientes de multiplicación se incrementan en un rango de 20 a 70% en dependencia de la especie y las condiciones del cultivo. De igual forma, la calidad intrínseca de los brotes aumenta, permitiendo alcanzar niveles de supervivencia superiores al 95 %. Para lograr una mayor efectividad en el sistema se evalúan diferentes variables *in vitro* como son el tiempo y frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo, la presencia de retardantes del crecimiento en el medio de proliferación, condiciones ambientales, duración de la fase de proliferación y genotipo, entre otros (CIRAD, 2001).

En el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del CIDASTH; ubicado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede San Carlos; desde hace 15 años, se realizan investigaciones en este cultivo. A través del presente estudio se pretende mejorar la metodología para propagar *in vitro* vainilla (*Vanilla planifolia*) mediante el Sistema de Inmersión Temporal Simplificado (RITAS[®]), analizando tres diferentes explantes a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el medio de cultivo cada una de dos minutos de duración.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Determinar la respuesta de tres explantes de vainilla (Vanilla planifolia) a tres diferentes periodos de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal (RITA[®]).

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el porcentaje de sobrevivencia de tres explantes de vainilla cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal.
2. Determinar el área de callo formado a partir de tres explantes de vainilla cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal.
3. Determinar el porcentaje y el tiempo de brotación en tres explantes de vainilla cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal.
4. Establecer la altura y el número promedio de brotes por explante de vainilla cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal.
5. Cuantificar la longitud y el número promedio de raíces en tres explantes de vainilla cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal.

3. Revisión de literatura

3.1. Origen

La vainilla presenta un origen y una distribución Pantropical, aunque se dice que es un cultivo autóctono de México y Centroamérica en donde se localizan cultivares primitivos congéneres silvestres y poblaciones silvestres (Guerra, 1992). En Guatemala se ha encontrado en forma silvestre en bosques vírgenes, a alturas que oscilan entre 305 y 1218 m.s.n.m. (Gutiérrez, 1982).

Su nombre se deriva del término azteca nahua “tlilxochitl”, que significa “flor negra”. Su nombre hace referencia al fruto fermentado y secado, ya que la flor de esta orquídea es de color blanco. Los aztecas fueron los primeros en hacer uso de la vainilla durante la colonia, los españoles conocieron su agradable sabor y particular aroma al saborearla en el chocolate que preparaban los aztecas. Cuando decidieron llevarla al viejo mundo, observaron que las plantas de vainilla no lograban producir la vaina. Esto se debía a la falta de polinización, tarea realizada por un abejorro del género Melipona que sólo existía en Mesoamérica. Sin éxito trasladaron al abejorro a Europa y trataron de aclimatarlo. Un esclavo de la isla La Reunión, antes conocida como isla Borbón, estudió la actividad de este insecto y logró realizar la polinización manualmente. A partir de entonces la vainilla se extendió por todo el mundo (Gutiérrez, 1982).

3.2 Importancia de la vainilla

La vainilla es un cultivo de exportación, pues la vainilla que se obtiene de sus frutos es considerada hoy el saborizante natural de mayor importancia en el ámbito mundial. Se usa en la industria alimenticia, refresquera, licorera, farmacéutica, de perfumería y cosméticos, y en menor cantidad en la industria tabacalera y de artesanías (Alatorre, 2002).

Las industrias de productos lácteos, helados, bombones, dulces, pasteles y perfumes, son las más consumidoras de vainilla en su forma natural como extracto o esencia, o dispersa en una base de azúcar de dextrosa (Tencio, 1992).



Figura 1. *Vanilla planifolia* en floración¹.

A nivel mundial luego de la década de los 60's, la producción de la vainilla decayó por un periodo de 20 años. Esta situación se debió a factores como la caída de precios internacionales por un aumento de la producción de países africanos y asiáticos, y la introducción al mercado mundial de grandes volúmenes de ethil-vainillina y cumarina, sustitutos de la vainilla a precios más bajos.

¹ Tomada de www.flora.eeb.uconn.edu/acc_num/198500001.html

El primer competidor de la vainilla fue un saporífero, elaborado mediante el uso del eugenol contenido en el aceite del clavo de olor; esta sustancia fue sustituida rápidamente por la vainillina, de obtención mucho más económica, confeccionada a partir del licor del sulfito de desecho procedente de las fabricas de papel y de extractos de alquitrán de hulla (Camacho, 1988).

Sin embargo, a principios de 1980 comienza a surgir en el mercado internacional la tendencia al consumo de los productos naturales, que no representan ningún riesgo para la salud humana, puesto que los sustitutos de la vainilla le han endosado características cancerígenas. Esto marcó pauta para que reiniciara el interés por el cultivo y consumo de la vainilla (Alatorre, 2002).

3.3 Historia y situación actual de la vainilla en Costa Rica

En Centroamérica se han localizado cultivares y poblaciones silvestres de vainilla (Guerra, 1992). En 1961, ocurrió en Costa Rica el establecimiento de los primeros cultivares, pero, es hasta la década de 1970 es que se realizan siembras experimentales para determinar las principales labores culturales. De esta manera se establecen las primeras plantaciones comerciales alrededor del año 1985 (Jiménez, 1990).

Para el año 1990 existían en el país un total de 54.6 ha sembradas con vainilla distribuidas en tres zonas: la Zona Norte, con 40% del área de siembra, que incluye los cantones de Upala, San Carlos y Sarapiquí; la Zona Sur, con el 37.55%, en donde se incluyen lugares como: Dota, Tarrazú, Aguirre, Buenos Aires, Corredores, Osa y Pérez Zeledón; y la Zona Atlántica representada por Guácimo y Guápiles, con el 14.45% (Arias, 1990).

3.4 Botánica

Taxonomía

La vainilla es una orquídea tropical que pertenece al género Vanilla de la familia Orchidaceae, tribu ofridia (Jiménez, 1990). Se conocen más de 50 especies, de ellas las más utilizadas son: planifolia, fragans y pompona (León, 1987).

Descripción de la planta

Es una planta epífita, perenne, siendo un bejuco, de tallo monopódico, verde, fotosintéticamente activo, suculento, cilíndrico y sarmentoso, formado por entrenudos de 10 a 15 cm de largo y de 10 a 15 mm de diámetro. La altura que puede alcanzar esta planta trepadora varía de 10 a 15 metros (Alatorre, 2002).

Tallos

Los tallos pueden ser simples o ramificados, de aquí es donde salen las hojas y las raíces, son grandes, suculentos, verdes y carnosos (Cordero, 1986).

Hojas

Las hojas son enteras, planas, ovales, oblongas y terminadas en punta, son alternas paralelinerves, gruesas y cerosas de 15 a 18 cm de diámetro y de 5 a 7 cm de ancho, nacen de cada uno de los nudos del bejuco, en oposición con las raíces aéreas modificadas, son subsésiles, provistas de un peciolo corto que forma una especie de canaladura, sus nervaduras son paralelas y oscuras, se vuelven prominentes cuando la hoja se seca (León, 1987; Luelmo, 1987).

Raíces

Las raíces adventicias son carnosas y largas, sirven a la planta para adherirse al tutor, pero tienen una estructura exterior llamada velamen que les permite absorber y retener el agua. Las raíces subterráneas se llaman trazadoras ya que se extienden en un radio de hasta 8 cm, a través de ellas adquieren los nutrientes del humus del suelo (León, 1987).

Flores

Las inflorescencias de la vainilla son racimos axilares, cada planta produce de 10 a 20 racimos y cada racimo de 10 a 20 flores. La flor mide alrededor de 5 cm, es hermafrodita, de color blanco, ligeramente amarillo verdoso y poco abiertas. La flor está formada por tres pétalos y tres sépalos, un pétalo modificado y alargado en forma de labio, el labelo, es más corto que las otras partes y posee lóbulos crenulados. El ovario permanece derecho y se vuelve pendiente luego de la floración. Una planta puede dar hasta 200 raíces al mismo tiempo con 1000 ó 4000 flores (Jiménez, 1990; Tencio, 1992; Luelmo, 1987).

Fruto

Luego de la fertilización el ovario se elonga y crece hasta 30 cm por semana, en cuatro u ocho semanas el fruto alcanzará su longitud total. El fruto es una cápsula carnosa, larga, succulenta, ligeramente triangular y deshiscente. Mide de 15 a 25 cm de largo por 8 o 14 mm de diámetro, de color verde oscuro brillante y al madurar se reblandece y cambia a un color verde brillante amarillento. Tarda de 3 a 10 meses en madurar (Jiménez, 1990).

Semillas

Las semillas son muy pequeñas y redondas; miden de 0.24 a 0.33 mm y en un fruto se estima puede haber hasta 100 000. Carecen de endosperma y son fértiles solo si son producto de polinización natural (Cordero, 1987).

3.5. Variedades

Para el cultivo de la vainilla es de gran importancia escoger las variedades más productivas y las más resistentes a las enfermedades, y que se adapten a nuestras condiciones tropicales; entre estas podemos hablar de: Vanilla planifolia, V. pompona y V. tahitensis.



Figura 2. Características morfológicas de Vanilla planifolia².

² Tomada de www.ridwaydb.mobot.org

3.6. Requerimientos ecológicos

La vainilla se desarrolla preferiblemente en un clima húmedo cálido, donde las lluvias sean frecuentes pero no excesivas; en términos generales una precipitación de 2000 mm anuales y una humedad relativa del 80% es suficiente para el adecuado desarrollo (Guerra, 1992; Ocampo, 1987). La vainilla resiste desde 700 hasta 4200 mm máximo, las lluvias muy fuertes afectan la producción de flores y la maduración de las vainas (Anlew, 1974).

La temperatura media anual óptima para su crecimiento es de aproximadamente 21°C, con un promedio mínimo de temperaturas entre 7°C y 12°C, las cuales resiste por un periodo corto y un promedio máximo de 28°C a 32°C (Guerra, 1992).

El cultivo puede realizarse desde el nivel del mar hasta los 600 – 800 m.s.n.m. Geográficamente su cultivo se restringe entre los 25° latitud norte y 25° latitud sur, situándose las mejores condiciones para que prospere en latitudes comprendidas entre los 15° y 20°, fuera de estos límites la vainilla solo vegeta (Alatorre, 2002; Guerra, 1992).

3.7. Micropropagación

La micropropagación abarca una serie de técnicas de cultivo en un medio estéril de distintos segmentos (explantes) de la planta, a los que se les proporciona artificialmente las condiciones físicas y químicas con el fin de regenerar plantas enteras (Flores, 1998; Alvarenga, 2001). De esta forma se puede utilizar como explante el cotiledón, hipocótilo, tallo, hoja, raíz, meristemas, yemas axilares, embriones, inflorescencias, pétalos, óvulos y el polen (Montero, 2001).

La micropropagación se ha constituido es una técnica muy eficiente para producir plantas enteras fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta madre de la que derivaron y libres de plagas y enfermedades (Flores, 1998; Palma *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo de los tejidos, estos pueden tomar dos rutas alternas en cuanto a su diferenciación a partir de las cuales se pueden desarrollar las diferentes técnicas de propagación *in vitro* (Alatorre, 2002; Montero, 2001; Palma *et al.*, 2003).

Organizado: se inicia mediante órganos que siguen su crecimiento manteniendo sus características estructurales.

Desorganizado: se comienza con fragmentos u órganos que producen tejidos sin estructura definida (callo) a partir de los cuales se forman embriones o brotes adventicios para la regeneración de plantas.

Organogénesis

Según Endress (1994), la organogénesis son todos los procesos morfológicos en los cuales las estructuras en su forma natural forman órganos no-autónomos en el explante (protoplastos, células, callos, fragmentos de tejido, fragmentos de planta).

Desde el punto de vista funcional la característica más importante de la organogénesis, es el potencial organogenético de los explantes. La organogénesis se presenta bajo cuatro vías morfogenéticas que conducen a la rizogénesis o formación de raíces, caulogénesis o formación de yemas, callogénesis o formación de callo y la embriogénesis somática (Navarro, 1996).

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática se puede definir como el proceso mediante el cual se originan embriones a partir de células que no son el producto de la unión de gametos (Abdelnour *et al* 2001; Palma, 1995). Los embriones somáticos son estructuras bipolares con eje radical apical, y no poseen conexiones vasculares con el tejido materno ya que generalmente están aislados por una epidermis (Orellano, 1997).

Según Abdelnour *et al.*, (2001) y Giron (1998), la embriogénesis somática puede darse en forma directa o indirecta. En la forma directa el embriode se forma directamente del explante y se caracteriza por la baja frecuencia de producción, mientras que en la embriogénesis somática indirecta ocurre el fenómeno de calogénesis que consiste en una etapa previa a la formación del embriode y se caracteriza por la alta frecuencia de producción.

Desde el punto de vista de la totipotencialidad, en principio todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar embriones somáticos *in vitro*. Sin embargo dependiendo de las especies y de las condiciones de cultivo se ha observado que pocos tipos de explantes son capaces de iniciar la embriogénesis somática. Según Ammirato (1983) citado por Flores *et al.*, (2001), los explantes utilizados con más éxito en varias especies de la mayoría de las familias de plantas son los cotiledones, los hipocótilos y los embriones, pero también se utilizan los ápices, segmentos de hoja e inflorescencias.

Aparentemente los factores químicos más importantes para la embriogénesis somática son las auxinas exógenas, la fuente y la concentración de nitrógeno. Desde el punto de vista de la micropropagación es el sistema más eficiente, en cuanto al número de plantas regeneradas por unidad de tiempo. Por medio de este método se pueden obtener grandes cantidades de plantas al suponerse que por cada célula suspendida en el medio de cultivo se esta diferenciando una planta (Palma *et al.*, 2003).

Rizogénesis

El desarrollo de raíces es el tipo de órganos más frecuente. La rizogénesis puede ser promovida por auxinas, hidratos de carbono, luz (fotoperíodo y oscuridad). Las condiciones cambian de acuerdo con la especie de la planta y en ocasiones según las variedades de una misma especie, por lo cual las variaciones en las concentraciones de auxinas son diferentes (Navarro, 1996).

Callogénesis

El callo puede definirse como el crecimiento desorganizado de una masa de células, que se origina mediante la proliferación de células parenquimáticas del explante inicial (Montero, 2001). Los factores que más pueden afectar la formación del callo son el tipo de explante, ya que hay una mejor proliferación de células cuando este proviene de un tejido joven al tener un mayor potencial para la división celular como para la regeneración de plantas, y el otro factor es el medio de cultivo y sus condiciones tanto físicas como químicas (Palma, 1995).

Caulogénesis

Se define caulogénesis como la formación de brotes a partir de segmentos de la planta o de un callo. En gran número de dicotiledóneas la caulogénesis ocurre mediante el equilibrio adecuado de auxinas y citocininas endógenas, para ciertos casos es necesaria la adición de concentraciones bajas de algún regulador de crecimiento (Street, 1977 citado por Navarro, 1996).

Factores que afectan la organogénesis

En el cultivo de tejidos vegetales para que ocurra un desarrollo organizado con éxito, debe seleccionarse el explante, el medio de cultivo y el control del medio físico (humedad, luz, temperatura y atmósfera gaseosa (Alatorre, 2002).

Cualquiera de estos factores o su combinación puede afectar profundamente la respuesta morfogénica, por lo que es necesario realizar evaluaciones sistemáticas de tales efectos con el fin de establecer un sistema característico de experimentación (Roca *et al.*, 1991).

Explante: la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos y se va a determinar según el objetivo perseguido y la especie a cultivar. En general, cualquier parte vegetal puede servir como inóculo (Endress, 1994). Estos incluyen segmentos de tallo y ápices, secciones de raíz, hojas, inflorescencias, pétalos de flores, tejido ovular y tejidos de plántulas tales como cotiledones, hipocótilos y embriones de semilla; sin embargo, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática *in vitro* (Roca *et al.*, 1991).

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy común que en condiciones idénticas de medio y ambiente, las respuestas *in vitro* del cultivo de un determinado explante de una especie difieran con el cultivar empleado. Además, las respuestas de los explantes pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos; por ejemplo a partir de secciones de tallo cercanas a los ápices caulinares se puede producir mayor cantidad de meristemoides que a partir de la porción baja del tallo. Más aún, puede haber variación en los requerimientos de los reguladores de crecimiento para la organogénesis según el tipo de tejido usado como explante, aunque estos sean de la misma especie (Roca *et al.*, 1991).

Totipotencia: la totipotencia es la capacidad que tienen las células de regenerar un tejido completo. Las células diferenciadas pueden ser inducidas a un proceso de dediferenciación, para formar callo y luego mediante la acción de reguladores de crecimiento puede rediferenciarse (Montero, 2001).

Medio de cultivo: el éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado. Los usados más frecuentemente para promover la organogénesis son los de Murashige y Skoog (1962); el White (1963); el Gamborg (1968), entre otros (Roca *et al.*, 1991).

El medio de cultivo puede ser líquido o semi-sólido, en el medio líquido se elimina la gravedad, la cual tiene gran importancia en el proceso de dediferenciación; pues cuando las células tienen posición fija se produce un fenómeno de polarización que hace que la concentración de sustancias de crecimiento no sea uniforme, situación que no ocurre en el medio líquido; por lo tanto, hay mayor homogenización en la concentración permitiendo así el proceso de dediferenciación (Kuan y Ospina, 1990). Cuando se cultivan tejidos en medio líquido hay contacto directo de estos con el medio, por lo que hay una mayor y más rápida absorción de nutrientes que en el medio sólido. Además, en el caso de que los tejidos produzcan sustancias tóxicas, éstas pueden ser eliminadas por dilución, ya que se diluyen en el total del medio, por lo tanto baja la concentración (Kuan y Ospina, 1990).

En los medios de cultivo la sacarosa es generalmente una de las fuentes carbonadas, en algunos casos la concentración puede alterar la pigmentación del callo. Este efecto también lo hace la proporción auxina – citocinina favoreciendo la formación de yemas. La sacarosa puede asimismo estimular la formación de callo y cambiar la textura de los mismos. La concentración de carbohidratos también afecta el potencial osmótico del medio (Montero, 2001).

La caseína hidrolizada (0.02 – 0.1 %) es una fuente de nitrógeno orgánico no específica, la cual puede afectar cuantitativa y cualitativamente el desarrollo organizado. La caseína hidrolizada a sido comúnmente utilizada para estimular el crecimiento de embriones y se ha sugerido que su efecto se debe a un sinergismo entre los aminoácidos que la componen. En vainilla, este compuesto se ha usado en la germinación *in vitro* de semillas; Granados (1991) mencionado por Alatorre (2002), encontró que a medida que se incrementaba la dosis de caseína hidrolizada en un medio MS (1962), se aumentaba el porcentaje de germinación, sin embargo concluye que su efecto principal no es a nivel de germinación sino en la activación posterior del crecimiento de los protocormos.

El pH óptimo en el medio de cultivo de las especies no esta bien preciso, pero usualmente está entre 5.0 y 6.5. El pH puede influenciar la precipitación y absorción de nutrientes como también de fitohormonas (Roca *et al.*, 1991).

Reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento son compuestos que en pequeñas cantidades y por la naturaleza o estructura de su molécula estimulan, inhiben o modifican el desarrollo de las plantas. Algunos reguladores de crecimiento son: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido absídico, inhibidores y poliaminas (Palma *et al.*, 2002).

Auxinas: son ampliamente utilizadas en la micropropagación de plantas ya que promueven el desarrollo del callo, de las suspensiones celulares de órganos. En diferentes proporciones con citocininas regulan la morfogénesis. Las auxinas promueven el crecimiento a través de la elongación celular (Navarro, 1996). Normalmente se encuentra en las plantas las auxinas naturales como el Ácido Indol Acético (AIA); existen otras auxinas producidas sintéticamente, Ácido Indol Butírico (AIB).

Citocininas: estimulan la división celular y se encuentran en casi todos los tejidos, son particularmente abundantes en los granos, frutas y raíces; son necesarias al igual que las auxinas para la proliferación de callo, favorece la formación directa o indirecta de tallos, estimulan brotes preformados o adventicios a partir de ápices, en altas concentraciones inhiben la formación, desarrollo y crecimiento de raíces, así como pueden suprimir el efecto estimulativo de las auxinas (Palma *et al.*, 2002).

Entre las citocininas más utilizadas en cultivo de tejidos vegetales, se encuentra la benciladenina (BA), utilizada para estimular la proliferación de las yemas laterales. La BA se ha utilizado frecuentemente en el cultivo *in vitro* de la vainilla, haciéndose necesaria para la obtención de brotes vigorosos. Las dosis utilizadas varían pero una concentración arriba de los 5 mg L⁻¹ resulta inhibitoria (Alatorre, 2002).

La diferenciación de yemas se logra subcultivando los callos en un medio que tenga alta relación citocinina – auxina; en cambio, para la diferenciación de raíces se requieren medios con una relación citocinina – auxina baja. En medios con citocinina, algunas veces ocurre la organogénesis directamente del explante (Montero, 2001).

Giberelinas: son hormonas naturales obtenidas a partir del hongo Giberella fujikuroi (Fusarium heterosporium) provocando el gigantismo en el arroz. Estimulan el alargamiento celular de los entrenudos del tallo y los pedúnculos florales. Rompen la dormancia de gran número de semillas y brotes. Son generalmente empleadas en forma de ácido giberèlico (AG₃) (Navarro, 1996).

Factores físicos

Los factores físicos que deben tenerse en cuenta son la temperatura y la luz; el grado higrométrico del aire no tiene mucha importancia puesto que las plantas cultivadas *in vitro* se encuentran en una atmósfera naturalmente saturada (Navarro, 1996).

Luz: Este es el principal factor físico y se ha demostrado que tiene un efecto sobre el desarrollo organizado *in vitro*. Generalmente en los cuartos de crecimiento el fotoperiodo utilizado es de 12 a 16 horas luz con una intensidad lumínica entre los 1000 y 10000 lux (Navarro, 1996). Un cambio de intensidad lumínica puede causar organogénesis y cambios morfogénéticos específicos debido a la longitud de onda de la iluminación (Alatorre, 2002).

Temperatura: generalmente los tejidos vegetales cultivados *in vitro* se mantienen en un rango que va de los 20° C a los 25°C; sin embargo, las temperaturas que estén dentro de los 18 – 28°C son también efectivas. Las fluctuaciones que puedan ocurrir entre la temperatura del día y de la noche pueden estimular la organogénesis (Montero, 2001).

Cultivo de brotes preformados

Mediante el uso de reguladores del crecimiento se estimulan las yemas axilares permitiendo la formación de una planta por cada yema, siendo esto último lo que restringe su eficiencia. Una de las ventajas que presenta este método es que las plantas obtenidas muestran una alta estabilidad genética (Pierik, 1990).

Cultivo de microestacas

La micropropagación de microestacas consiste en estimular con la ayuda de reguladores de crecimiento, el desarrollo de yemas axilares, que normalmente están dormantes por la dominancia apical. La dominancia apical se mantiene porque la corriente alimenticia que asciende por el tallo se dirige a la yema apical y no a las ramas laterales, debido al gradiente auxínico que resulta de la producción de auxina en el ápice (Orellana, 1997).

La aplicación de citocininas causa el inicio de divisiones celulares y la producción de auxina, a la que seguirá automáticamente la liberación de la dominancia apical (Bidwell, 1993). El subcultivo de estos explantes permite la producción de brotes en forma exponencial. Además, el enraizamiento *in vitro* es más fácil de obtener que en brotes producidos por otras biotécnicas (Orellano, 1997).

Cultivo de callos

El callo es un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales se llevan a una desdiferenciación celular, formando una masa amorfa de tejido, como resultado de la proliferación continua y acelerada de las células. La coloración de este tejido también varía, pueden existir callos que carecen de pigmentos, mientras que otros pueden ser de distintos tonos de verdes, amarillo, café o rojo (Hurtado y Merino, 1987).

Según Hurtado y Merino, 1987, la inducción del callo ocurre colocando el explante en contacto con un medio de cultivo que promueva y mantenga un crecimiento y una división celular continuas. La proliferación del callo se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal: hoja, raíz, polen, embriones, semillas, entre otros.

El cultivo del callo se puede dividir en las siguientes etapas:

- Inducción: las células inician el crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- Proliferación celular: el callo aumenta su masa celular al máximo.
- Inducción de la diferenciación: en esta etapa se obtienen meristemos (apicales y radiculares), embrioides, tejido vascular, entre otros.
- Envejecimiento y pérdida de la capacidad del crecimiento acelerado.

3.8 Cultivo *in vitro* de vainilla

Entre los primeros trabajos reportados sobre el cultivo *in vitro* de vainilla, se encuentra el realizado por G. Bouriquet en 1947 según Knudson (1950); en dicho trabajo se logró la germinación *in vitro* de semillas de vainilla en un medio de cultivo especial, a 27° C y condiciones de oscuridad o luz difusa.

En los años siguientes la micropropagación de la vainilla se ha logrado empleando ápices de raíces aéreas, ápices de yemas axilares, de tallos vegetativos, segmentos de tallo conteniendo nudos con yemas axilares y embriones maduros e inmaduros. A pesar de estas investigaciones, el cultivo *in vitro* de la vainilla no está tan bien establecido si lo comparamos con el resto de especies ornamentales de la misma familia (Krikorian, 1994 citado por Alatorre, 2002).

En el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (CIDASTH), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos; el cultivo de la vainilla se ha estudiado desde hace más de 15 años. En dichos estudios se han obtenido resultados que incluyen protocolos de micropropagación para esta especie, donde se usan como explantes ápices de tallo, de raíz y yemas nodales.

3.9 Sistema de Inmersión temporal

En el cultivo *in vitro*, el uso de medios líquidos ha presentado grandes ventajas en varias especies, sin embargo en algunas se produce vitrificación de los explantes, es por esta razón que se consideró la opción del diseño de sistemas de inmersión temporal, que evitan la exposición constante del explante al medio de cultivo, mediante un sistema que pone en contacto el explante con el medio en forma intermitente cada cierto período de tiempo (Teisson *et al.*, 1994 citado por Flores *et al.*, 2002).

El sistema de inmersión temporal se inicio con el empleo de unidades de filtración comercial que se modificaron con un tubo de silicón, inyectando presión de aire al compartimiento inferior se logra que el medio de cultivo ascienda y moje periódicamente los explantes. El laboratorio Biotrop del CIRAD en Montpellier desarrollo y patentó otros diseños, cuyo nombre comercial es RITA (Recipiente para Inmersión Temporal Automático) (Flores *et al.*, 2002).

3.9.1 Funcionamiento del sistema

El sistema de inmersión temporal funciona mediante 4 fases que se explican a continuación:

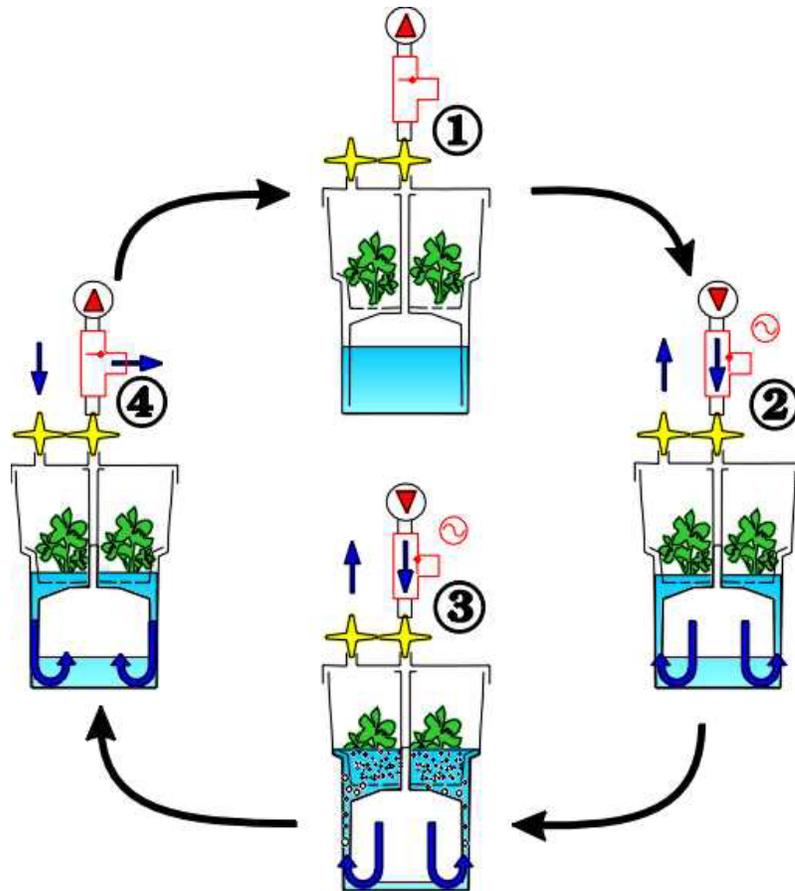


Figura 3. Fases del Sistema de Inmersión Temporal Automático RITA^{®3}.

³ Tomada de www.cirad.fr

Fase emergida. Esta fase es la de mayor duración.

1. Los explantes están colocados sobre un disco de esponja de poliuretano.

Fase sumergida. La duración de esta fase se define por experimentación pero siempre es muy corta: Puede variar de 1 minuto por día hasta 4 veces 15 minutos por día.

2. Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes.

3. El aire inyectado permite la oxigenación del medio. El aire de la parte alta se renueva totalmente.

4. Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran, y el medio vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes (CIRAD, 2001).

3.9.2 Material necesario para el sistema RITA®

Alimentación de aire: es necesario tener una bomba o un compresor inyectado un litro de aire por minuto y por Rita® con una presión de 0,2 bar. El aire que entra en cada Rita® está esterilizado por los filtros.

Automatización: Se realiza gracias a un reloj que permite la programación por cada minuto, un dispositivo de distribución de aire con una electroválvula tres vías y boquillas (CIRAD, 2001).

3.9.3 Principales ventajas del sistema RITA®

- a. Disminución del costo de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio.
- b. Permite una mejor nutrición mineral. Un contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene sobre los explantes.
- c. Fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente.
- d. Renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión.
- e. Mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas.
- f. Control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia.
- g. Protección de cada recipiente contra la contaminación por los filtros. Manipulación individual fácil. Abolición de los riesgos de contaminación cruzada (CIRAD, 2001).

3.9.4 Mejoras en relación con el medio semi-sólido

Café

Micropropagación por microestacas: Misma tasa de multiplicación por una duración reducida a la mitad.

Embriogénesis somática: De la célula embriogénica al embrión germinado. El coste de manipulación está dividido por diez: de 2000 a 3000 embriones germinados por Rita[®] listos para ser aclimatados (Berthouly *et al.*, 1995 citado por CIRAD, 2001).

Banano

Desarrollo y germinación de embriones somáticos: 700 hasta 1000 plántulas por Rita[®] listas para ser aclimatadas

Micropropagación por meristemas: La tasa de proliferación a los 20 días es multiplicada por 2,5 (Escalant *et al.*, 1994 citado por CIRAD, 2001)

Hevea

Desarrollo de embriones somáticos: 100 hasta 400 por Rita[®] listos a germinar sobre medio sólido (Etienne *et al.*, 1997 citado por CIRAD, 2001).

Papas

Microtuberización: Un promedio de 3 microtubérculos en 10 semanas por cada micro estaca proveniente de un solo nudo. Más de 50 % de los microtubérculos tienen un peso de más de 0,5gr (Teisson *et al.*, 1998 citado por CIRAD, 2001).

4. Materiales y métodos

4.1 Ubicación del proyecto

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del Centro de Investigación en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo (CIDASTH), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos.

4.2 Material experimental

Con el propósito de determinar el tipo de explante más adecuado para propagar vainilla (*Vanilla planifolia*) se evaluaron tres tipos de explantes, los cuales se tomaron de plantas micro propagadas en el laboratorio. Dichos explantes fueron *microestacas*: sección del tallo con un nudo en el que esta una yema axilar; *ápices de tallo*: sección terminal del tallo que contiene el meristemo apical más una porción del tallo con uno o dos nudos y; *ápice de raíz*: sección terminal de la raíz que contiene el meristemo radical más una sección de la raíz.

4.3 Sistema de cultivo

Se utilizó el sistema de inmersión temporal simplificado (RITA[®]) desarrollado por el CIRAD (Montpellier, Francia). Como recipientes se utilizaron frascos de un litro de capacidad. Cada frasco se conectó a un sistema de aire proveniente de un compresor, el cual se accionó por un programador automático para el control de la frecuencia y duración de las inmersiones; la frecuencia dependió del tratamiento (dos, cuatro y seis inmersiones diarias) y la duración fue de dos minutos cada una. El sistema permaneció conectado al compresor a un litro de aire por minuto y por Rita[®] con una presión de 0,2 bar. El aire entrante o saliente de cada recipiente se esterilizó a través de filtros miliporo (tamaño del poro 1 µm) de manera que cada uno se manipuló de forma independiente sin riesgos de contaminación.

4.4 Medio de cultivo

Para cultivar los explantes (ápices de tallo, microestacas y meristemas radicales) de *Vanilla planifolia*, se utilizó el medio de cultivo que contiene las sales de Murashige y Skoog (M&S, 1962) a una concentración del 100%; además, dicho medio se suplementó con 1 mg L⁻¹ de Bencil Adenina (BA), 30 g L⁻¹ de sacarosa y 1 g L⁻¹ de caseína hidrolizada a un pH de 5.7. El medio de cultivo se esterilizó por autoclave (20 minutos/litro de medio, a 121°C). A cada recipiente se agregó doscientos mililitros de medio de cultivo y se cultivo 40 explantes por cada uno de ellos.

4.5 Tratamientos

Para el cultivo en el sistema de inmersión temporal de vainilla (*Vanilla planifolia*) se utilizaron tres diferentes explantes (ápices de tallo, microestacas y meristemas radicales), los cuales se cultivaron por separado para determinar en cada uno el efecto de 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el medio de cultivo. Los tratamientos implementados se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Tratamientos para determinar la respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión en el sistema (RITA®).

Tratamiento	Explante	Número de inmersiones/día
1	Ápice de tallo	2
2	Ápice de tallo	4
3	Ápice de tallo	6
4	Micro estaca	2
5	Micro estaca	4
6	Micro estaca	6
7	Ápice de raíz	2
8	Ápice de raíz	4
9	Ápice de raíz	6

Microsoft Word 2000

4.6 Condiciones físicas de crecimiento

El sistema se mantuvo en un cuarto bajo un fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad; como fuente de luz se empleó lámparas de luz fluorescente con intensidades lumínicas de 2000 lux. Los cultivos se incubaron a 25 ± 1 °C y a una humedad relativa del 90%.

4.7 Variables a evaluar

a) Porcentaje de sobrevivencia

Se determinó mediante la relación entre los brotes muertos y el número total de cada tratamiento al inicio de este estudio, multiplicado por 100.

b) Tiempo de brotación

El tiempo de brotación se determinó como el número de días a partir de la siembra en que el 50% de los brotes alcanzó al menos tres mm de longitud.

c) Porcentaje de brotación

Se determinó según el número de explantes de la unidad experimental que produjeron al menos un brote cuatro semanas después de la siembra. Con relación al total de explantes multiplicado por 100.

d) Número de brotes

Se cuantificó el número de brotes mayores a tres mm de longitud en cada explante brotado y se obtuvo un promedio por cada unidad experimental.

e) Longitud de brotes

Se midió la longitud del brote a partir de su inserción en el explante y hasta su extremo apical.

f) Porcentaje de enraizamiento

Se determinó mediante la relación de brotes con al menos una raíz de tres mm de longitud con el número total de brotes del tratamiento.

g) Número promedio de raíces por explante

Se cuantificó el número de raíces formada en cada brote enraizado.

h) Longitud de raíces

Se midió la longitud de las raíces (mm) desde la unión de la raíz con la base del brote hasta su extremo apical.

i) Área de callo

El análisis del desarrollo del callo se realizó mediante mediciones semanales de sobrevivencia y la determinación del área del callo (método de medición no destructivo), en el cual se mide dos longitudes del callo a lo largo y ancho. El área se determina por la siguiente fórmula: $\frac{d_1 \times d_2}{4}$ (mm²).

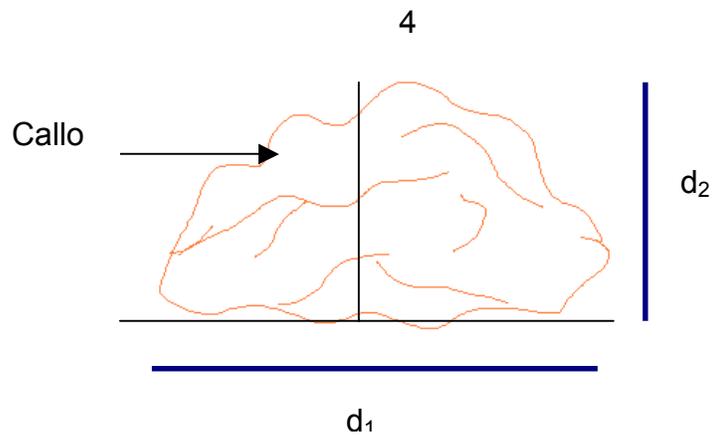


Figura 4. Fórmula de medición del área de callo.

4.8 Análisis Estadístico

Se realizaron 9 tratamientos; cada uno compuesto por 4 repeticiones de 10 unidades experimentales, los cuales se analizaron en base a un diseño experimental irrestricto al azar. El análisis estadístico se basó en un factorial 3x3; el programa de estadística que se empleó fue el SAS (SAS System for Windows V8).

5.Resultados y discusión

5.1 Supervivencia

Esta variable se observó a través de las 8 semanas de evaluación, las microestacas y los ápices de tallo cultivados en el sistema de inmersión temporal con frecuencias de 2, 4 y 6 inmersiones diarias presentaron una supervivencia del 100%. En el caso del cultivo de meristemas radicales la supervivencia fue también del 100% con excepción del tratamiento con 4 inmersiones diarias que presentó un 82.5% de supervivencia, los explantes se murieron por necrosamiento. La supervivencia fue alta, lo cual demuestra que mediante ésta técnica se puede cultivar con un bajo índice de mortalidad siempre y cuando se cumplan las debidas normas de asepsia y de selección del material que se va a cultivar.

5.2 Número y área de callo

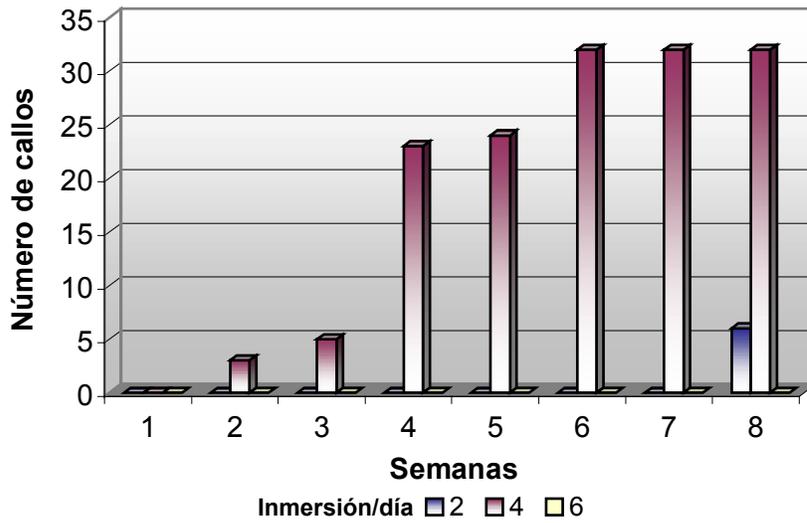
La formación de callo se obtuvo solamente a partir de meristemas radicales de *V. planifolia*, cultivados en el sistema de inmersión temporal utilizando un medio M&S (1962) suplementado con 1 mg L^{-1} de bencil adenina (BA). En la figura 5 se observa que a partir de los ápices radicales cultivados a 4 inmersiones diarias se formó el mayor número de callos, mientras que los ápices radicales cultivados a 6 inmersiones durante las 8 semanas de evaluación no llegaron a formar callo y de los ápices radicales cultivados a 2 inmersiones solamente en un 15% ocurrió callogénesis. Usualmente, se induce la formación de callo a partir de explantes en medios que contengan una proporción alta de auxina – citocinina (Roca *et al.*, 1991); sin embargo Alatorre (2002) obtuvo callos a partir de ápices radicales de *V. planifolia* en un medio que contenía solo BA (1 mg L^{-1}).

El número de callos por frecuencia de inmersión en el medio fue estadísticamente diferente (cuadro A1); los ápices de raíz cultivados a 4 inmersiones/día fueron mejores comparado con los cultivados a 2 y 6 inmersiones diarias en el medio según la prueba Duncan (cuadro A2). Los callos generados a partir de ápices radicales cultivados a 4 inmersiones/día (figura 6) presentaron una curva de desarrollo creciente. El crecimiento no presentó una fase estacionaria, sino que siguió exponencial hasta la séptima semana de evaluación, con un área promedio de 5 mm².

La respuesta que presentaron los ápices radicales cultivados con 2 inmersiones/día en el medio de cultivo, al formar un bajo número de callos posiblemente se debió a un efecto de competencia de los explantes por nutrientes.

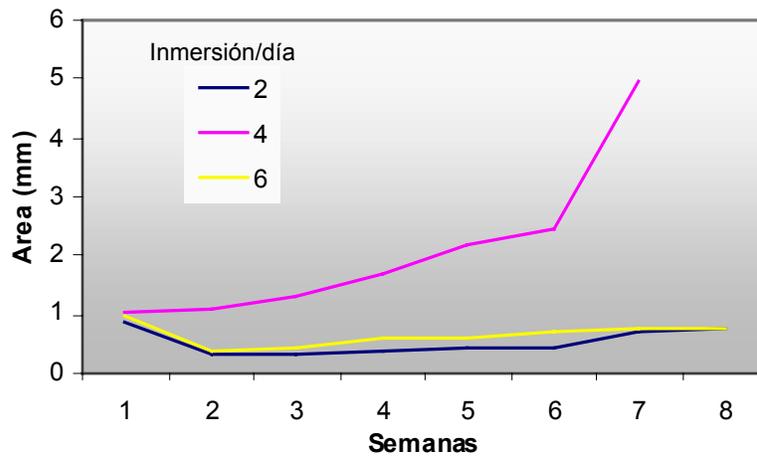
Kozai *et al.*, (1995) mencionado por Castro (2002) y este último, observaron una baja en el coeficiente de multiplicación al tener los explantes una menor disponibilidad de los nutrientes. Con respecto a los ápices radicales cultivados a 6 inmersiones/día, a pesar de que no llegaron a formar callo, presentaron un engrosamiento notable de la parte apical, que es la primera respuesta que se observa en el explante cuando va a formar callo (Alatorre, 2002) (figura 7). Castro (2002) menciona problemas de hiperhidricidad si el explante está mucho tiempo en contacto con el medio, posiblemente ocasionado por una mayor absorción de iones de amonio.

En los callos formados a partir de ápices radicales durante las semanas de evaluación no se desarrollaron brotes o raíces, pero sí se observó organización de los tejidos en estructuras de color amarillo claro. Los resultados obtenidos en cuanto al número y área de los callos, formados a partir de ápices de raíz cultivados a 4 inmersiones/día, son similares a los obtenidos por Alatorre (2002) quien cultivo este explante en el mismo medio pero en el sistema tradicional (medio semi-sólido).



Microsoft Excel 2000

Figura 5. Número de callos originados en el explante ápice radical de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados el Sistema de Inmersión Temporal.



Microsoft Excel 2000

Figura 6. Crecimiento del área de callo a partir de meristemos radicales de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal.



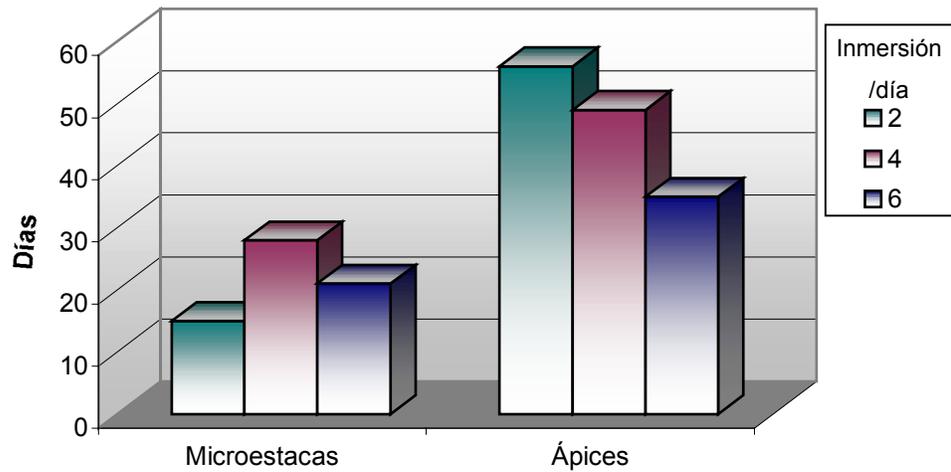
Figura 7. Inducción de callo a partir de ápices radicales de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal.

2 inmersiones; b. 4 inmersiones; c. 6 inmersiones.

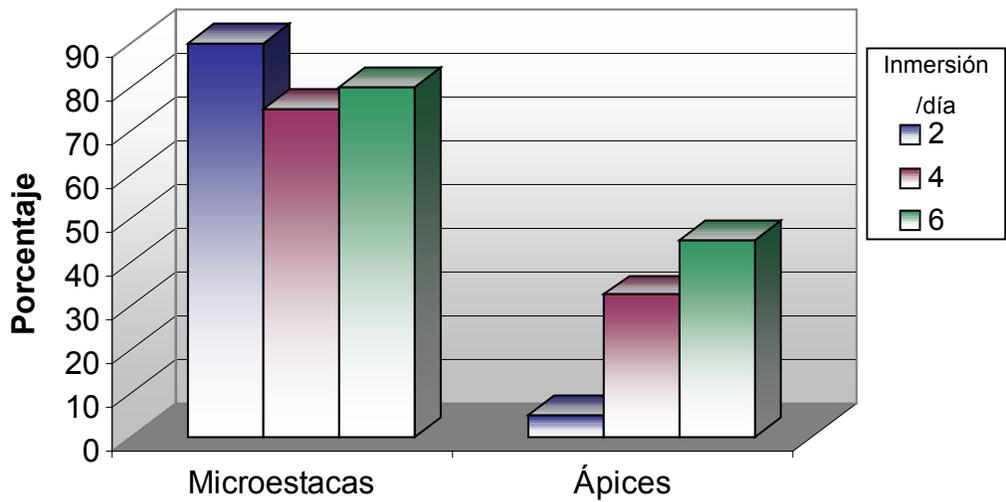
5.3 Porcentaje y tiempo de brotación

Durante 8 semanas se observó el crecimiento y desarrollo de brotes en los explantes utilizados, de los cuales solo los ápices de tallo y las microestacas produjeron brotes. En cuanto al tiempo de brotación, ésta inició en las microestacas a partir de la segunda y la cuarta semana después de la siembra (figura 8), lo que concuerda con Aguilar (1997) y George *et al.*, (1997) citado por Alatorre (2002), el primero obtuvo brotes vegetativos a partir de microestacas a las cuatro semanas de siembra, mientras el último logró brotación múltiple en vainilla entre los 21 – 28 días de cultivo a partir de yemas axilares. Los ápices de tallo vegetativo desarrollaron brotes entre la quinta y la octava semana después de la siembra, en una reciente investigación de Alatorre (2002) se obtuvo brotación a partir de la sexta semana.

A la cuarta semana de sembrado los explantes el porcentaje de brotación en microestacas fue de un 75% a 90 % (figura 9), mientras que en los tratamientos de ápice de tallo el mayor porcentaje fue de un 45% y el menor de un 5%. Las yemas axilares de las microestacas se desarrollaron más rápido que en los ápices de tallo (figura 11 y 12), probablemente debido a la eliminación de la dominancia apical mediante el corte para extraer el explante además de la adición al medio de cultivo de BA (Hurtado, 2001). Según Salisbury *et al.*; (1994) la adición de benciladenina incrementó en grado notable la elongación de las yemas laterales en chícharo.



Microsoft Excel 2000
Figura 8. Tiempo de brotación en microestacas y ápices de vainilla (Vanilla planifolia) a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal.



Microsoft Excel 2000
Figura 9. Porcentaje de brotación de microestacas y ápices de vainilla (Vanilla planifolia) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal a las 4 semanas de siembra.

5.4 Número de brotes

El mayor número de brotes se obtuvo a partir de microestacas cuando estas se cultivaron a una frecuencia de 4 inmersiones/día. El explante ápice de tallo a 4 y 6 inmersiones/día produjo la mayor cantidad de brotes, cuantificándose la menor respuesta con dos inmersiones (figura 10).

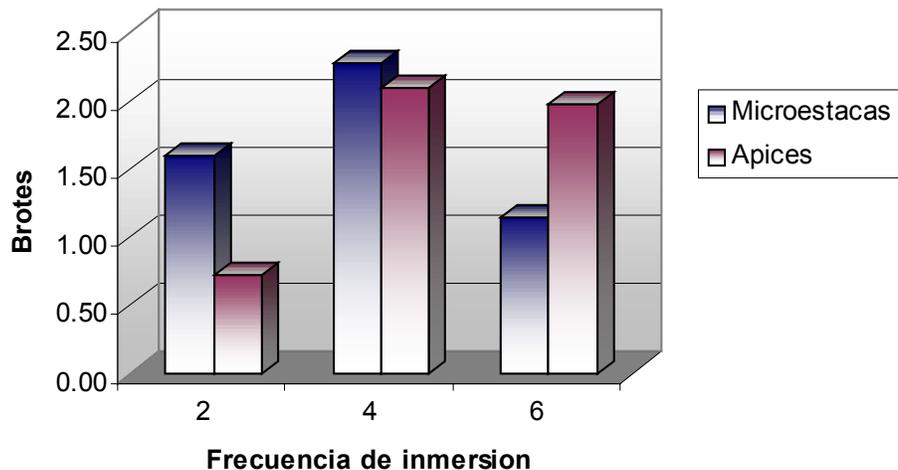
El número de brotes formados a partir de ápices de tallo y microestacas estadísticamente no presentó diferencia significativa (cuadro A2). La frecuencia de inmersión afectó significativamente el desarrollo de brotes en los explantes; la prueba Duncan demostró que los tratamientos cultivados a 4 inmersiones/día permitió la mejor respuesta (cuadro A3). (Alatorre, 2002) reportó no obtener diferencias significativas en el número de brotes producidos al comparar los mismos explantes cultivados en el sistema tradicional (medio semi-sólido).

El efecto de la frecuencia de inmersión en el desarrollo de brotes puede explicarse a la disponibilidad de los nutrientes que a 2 inmersiones/día es más baja. A 6 inmersiones/día no se formó el mayor número de brotes ya que posiblemente a esa frecuencia se pasó del límite ideal para la planta en cuanto a la velocidad de absorción de nutrientes (Salisbury, 1999). También en el sistema de cultivo utilizado a una mayor frecuencia de inmersión puede presentarse efectos como una baja en la concentración de oxígeno, ya que el explante requiere suficiente oxígeno que permita una adecuada respiración, que es fundamental para la absorción activa de iones en los organismos superiores (Salisbury, 1999). Otra posible explicación es el choque osmótico sufrido por los explantes durante cada inmersión en el medio de cultivo, posiblemente a mayor frecuencia los tejidos sufran un nivel de estrés que afecte la respuesta del explante⁵.

⁵ Comunicado personal del MSc. Tomás Palma Z.

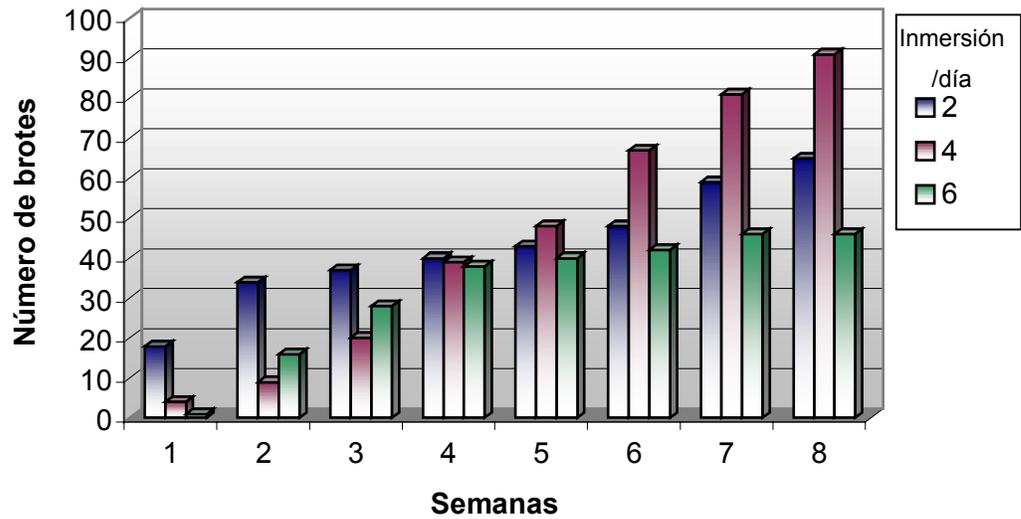
En los ápices de tallo cultivados a 6 inmersiones/día se observó la aparición de manchas café en los explantes a partir de la quinta semana de siembra, al cabo de las 8 semanas un 55% de los explantes presentaron este tipo de daño, aunado a la aparición de un color verde claro. Este mismo explante cultivado a 4 inmersiones/día presentó el mismo problema pero en menor incidencia (42.5 %). Maya (1999) menciona problemas de necrosamiento y muerte por exceso de humedad al cultivar *Bactris gasipaes* a 4 inmersiones/día con una duración de 6 minutos cada inmersión. La aparición de zonas necróticas en los explantes por exceso de humedad podría explicarse por las características propias de la planta, la vainilla en el campo crece comúnmente en lugares epífitos al crecer sobre un tutor donde el agua es escasa, siendo acumuladora (suculenta) (Salisbury, 1994).

Se ha determinado que las condiciones óptimas de inmersión dependen de la especie, pues en el caso de café (*Coffea canefora*) cuando se emplearon cuatro inmersiones al día de 15 minutos cada una, las cuales se aplicaron con éxito a *C. arabica*, hubo un alto porcentaje de hiperhidricidad, el cual se redujo cuando se cambió a dos inmersiones de 1 minuto por día (Castro, 2002).



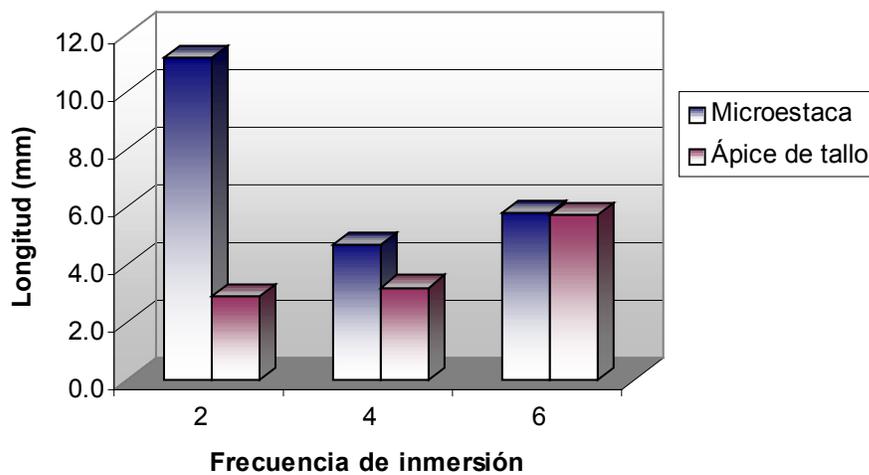
Microsoft Excel 2000

Figura 10. Promedio de brotes por explante de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal.



Microsoft Excel 2000

Figura 11. Número total de brotes obtenidos a partir de microestacas de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal a las 8 semanas de siembra.



Microsoft Excel 2000

Figura 12. Longitud promedio de brotes en microestacas y ápices de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal.

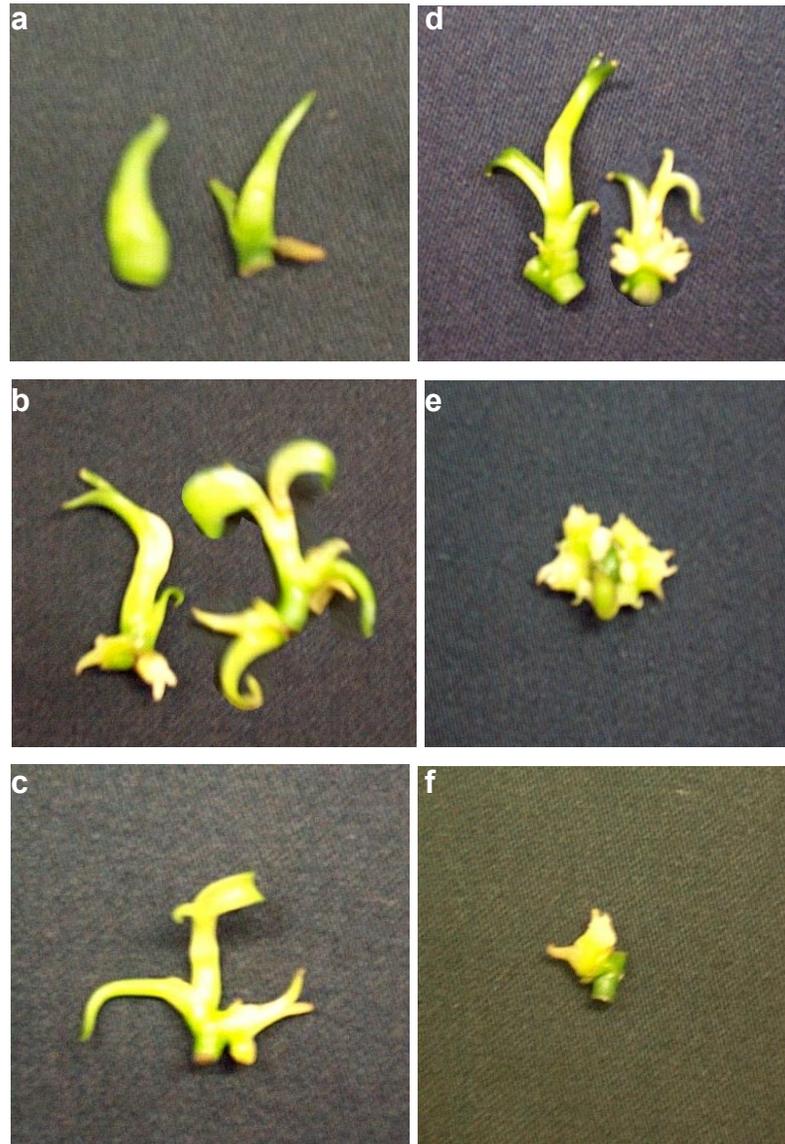


Figura 13. Respuesta morfogénica en ápices de tallo y microestacas de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados en tres frecuencias de inmersión.

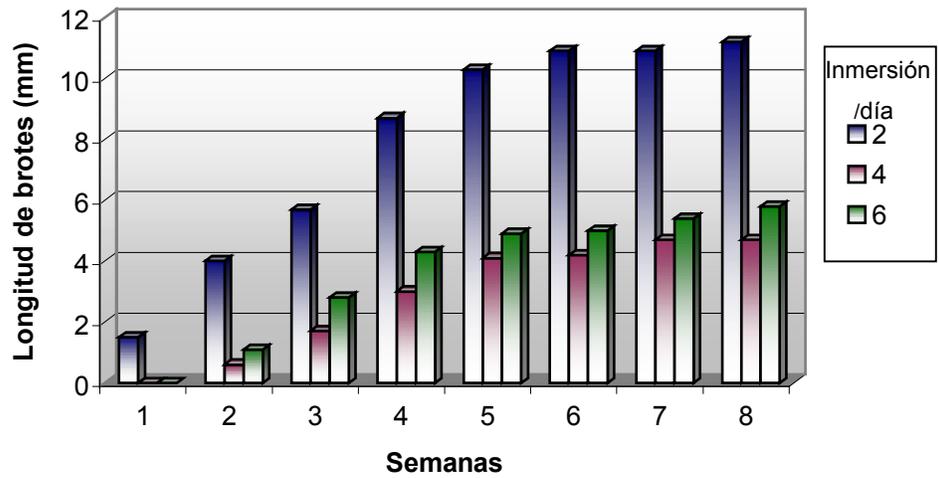
a.b.c. ápice de tallo a 2, 4 y 6 inmersiones/día.
d.e.f. microestaca a 2, 4 y 6 inmersiones/día.

5.5 Longitud de brotes

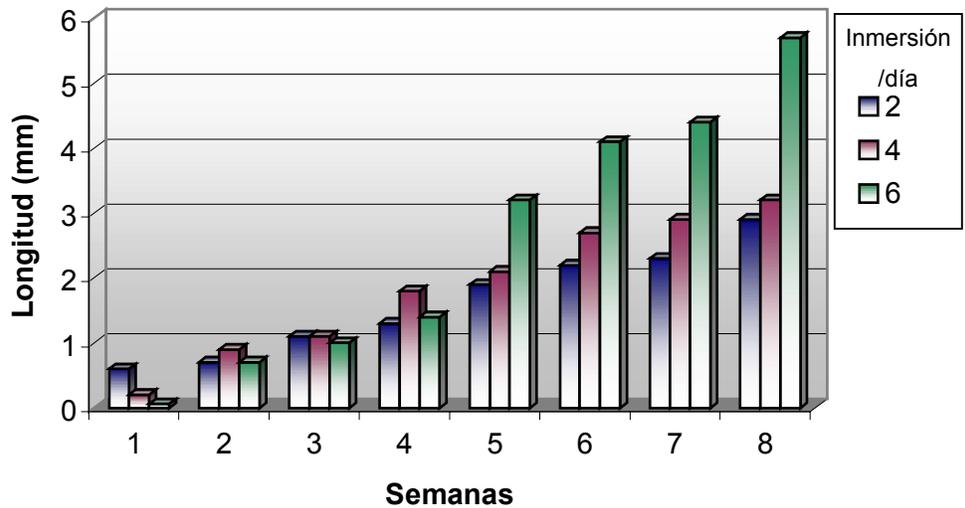
Se determinó la longitud de los brotes producidos por los ápices de tallo y las microestacas (figuras 14 y 15). En el primer caso, la longitud promedio a 2 y 4 inmersiones/día fue de 2.9 y 3.2 mm; mientras que a 6 inmersiones el promedio fue de 5.7 mm, este último dato es similar al obtenido en el cultivo tradicional (5.8 mm) (Alatorre, 2002).

En el caso de las microestacas, se cuantificaron los brotes con mayor longitud (11.2 mm) al ser cultivados a 2 inmersiones/día, a 4 y 6 inmersiones se obtuvieron brotes con una longitud de 4.7 mm y 5.8 mm respectivamente (figura 15). En comparación con los resultados de Alatorre (2002), las microestacas cultivadas a 2 inmersiones/día duplicaron la longitud de los explantes en el tiempo evaluado. Estadísticamente hubo diferencias significativas en la longitud de brotes desarrollados con respecto al tipo de explante y la frecuencia de inmersión en el medio (Anexo A); los mejores resultados se obtuvieron con el explante microestaca y la frecuencia de 2 inmersiones/día (figura 13).

Las microestacas cultivadas a 2 inmersiones/día presentaron la mejor respuesta debido posiblemente a una competencia por los nutrientes que influye en una respuesta inmediata al desarrollo de la yema axilar, además de la presencia del BA que promueve la elongación de estas yemas principalmente durante las primeras semanas (Salisbury, 1994). En la figura 14 también se observa que los brotes desarrollados de microestacas hasta la quinta y sexta semana presentaron un incremento en longitud creciente que se disminuyó en las siguientes semanas. En el caso de ápice de tallo el incremento en longitud de los brotes fue creciente a través de las ocho semanas de evaluación (figura 15).



Microsoft Excel 2000
Figura 14. Longitud promedio de los brotes obtenidos a partir de microestacas de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal.



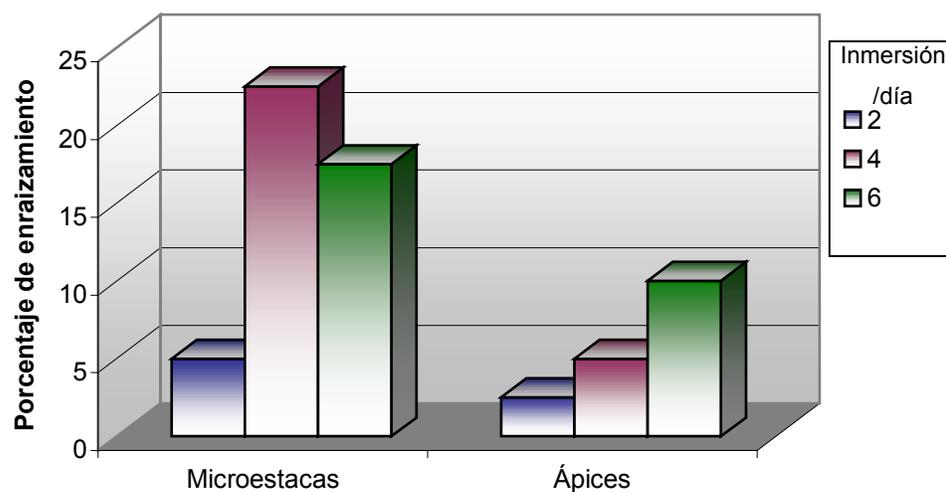
Microsoft Excel 2000
Figura 15. Longitud promedio de los brotes obtenidos a partir de ápices de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal.

5.6 Número y longitud de raíces

El proceso de rizogénesis solo ocurrió en los ápices de tallo y en las microestacas, al menos en los ocho semanas de evaluación. Se observó que las raíces eran de tipo secundario generadas en los nudos, en oposición a las hojas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el número y longitud de raíces de raíces producidas en los explantes microestaca y ápice de tallo, pero estas variables no se afectaron por la frecuencia de inmersión (Anexo A).

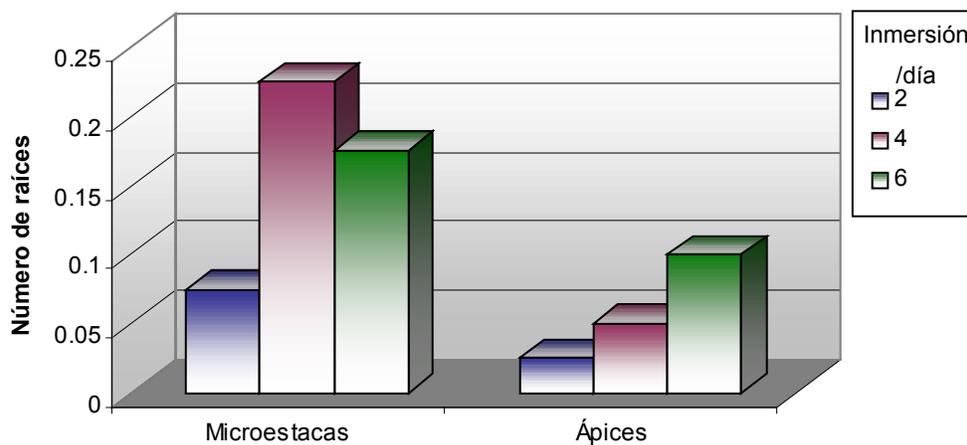
El porcentaje de enraizamiento mayor fue de 22.5% en microestacas cultivadas a 4 inmersiones/día con número máximo fue de 9 raíces de 40 explantes (figura 16 y 17). El menor número de éstas fue a partir de ápices cultivados a 2 inmersiones/día (1 raíz en un total de 40 explantes).

La formación de raíces según George et al., (1997) citado por Alatorre, (2002) podría estar influenciada por la concentración del medio de cultivo, quienes al cultivar en un medio semi-sólido MS suplementado con BA (2 mg L^{-1}) y ANA (1 mg L^{-1}) descubrieron que el máximo número de raíces se obtenía cuando el medio de cultivo estaba concentrado en un 50% y que dicha respuesta se incrementaba claramente al adicionar al medio carbón activado.



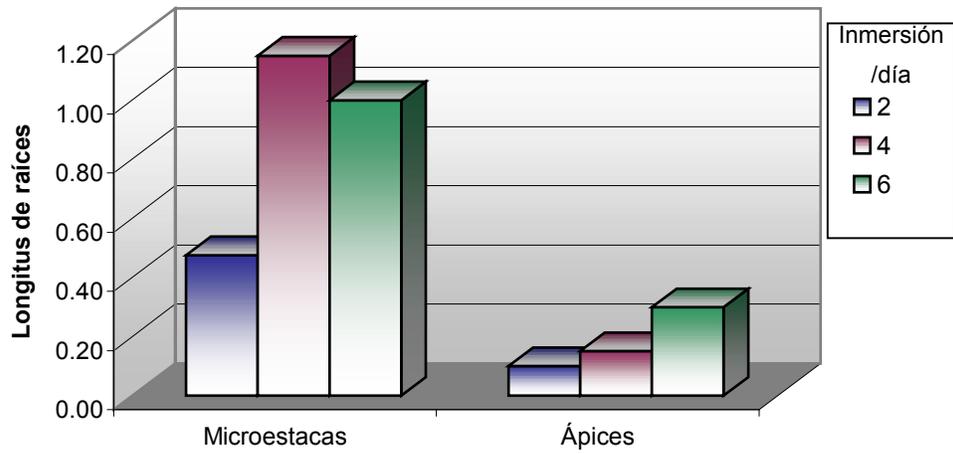
Microsoft Excel 2000

Figura 16. Porcentaje de enraizamiento en microestacas y ápices de vainilla (*Vainilla planifolia*) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal.



Microsoft Excel 2000

Figura 17. Promedio de raíces en microestacas y ápices de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal.



Microsoft Excel 2000

Figura 18. Longitud promedio de raíces en microestacas y ápices de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones diarias en el Sistema de Inmersión Temporal.

6. Conclusiones

- En el sistema RITA el porcentaje de sobrevivencia puede ser alto si se siguen adecuadamente los protocolos de asepsia y se escoge correctamente el material a sembrar. En los tratamientos la sobrevivencia fue de un 100%, a excepción de los ápices de raíz cultivados a 4 inmersiones/día con un 82.5%.
- La formación de callo en vainilla (*Vanilla planifolia*) se logra a partir de ápices de raíz cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal Simplificado a 4 inmersiones/día a la sexta semana de siembra.
- 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 mejor 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 y la frecuencia de inmersión; las microestacas cultivadas a 2 inmersiones/día presentaron la mejor respuesta a estas variables.
- El número y la longitud de las raíces de *V. planifolia* a partir de microestacas y ápices de tallo, se vieron afectadas por el tipo de explante siendo la microestaca el que presentó el mayor número de raíces desarrolladas sin embargo, estas variables no se afectaron por la frecuencia de inmersión en el medio de cultivo.

7. Recomendaciones

- Al contar con poco estudio sobre el cultivo de la vainilla en el Sistema de Inmersión Temporal; se hace necesario posteriores evaluaciones no solo sobre diferentes frecuencias de inmersión, sino también sobre la duración de la frecuencia, la cantidad de medio de cultivo por recipiente y la densidad de la siembra.
- Durante las 8 semanas de evaluación los ápices de raíz sometidos a 4 inmersiones/día formaron callo, pero no se logro observar el desarrollo de brotes o raíces, aunque sí de posibles tejidos organizados; para lograr determinar bien la respuesta de este explante en el sistema utilizado se recomienda evaluar por un período más largo además de realizar procesos histológicos.
- El desarrollo de brotes y de raíces en *V. planifolia* es afectado por una serie de variables como reguladores de crecimiento y concentración del medio de cultivo; sería de gran interés realizar estudios utilizando otros reguladores y otras concentraciones del medio que en la literatura han sido utilizados con éxito pero en medio semi-sólido.
- El protocolo del cultivo *in vitro* de la vainilla podría mejorarse mediante pruebas donde se cultiven los explantes en medio semi-sólido y en inmersión temporal mediante combinaciones simultáneas de estos.

8.Literatura Citada

- Alatorre C. F. 2002. Estudio morfogénico e histológico del híbrido *Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona* Schiede obtenido *in vitro*. Tesis. Bach. Agr. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 86 p.
- Alvarenga, S. 2001. Manual: Laboratorio cultivo de tejidos I. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 62 p.
- Anlew, L. 1974. Posibilidades del cultivo de la vainilla en Guatemala. Ciudad de Guatemala. 215 p.
- Arias, H. V. 1990. Aspectos generales del mercado de la vainilla. Ministerio de agricultura y ganadería. Dirección General de Mercado Agropecuario. San José, Costa Rica. 25 p.
- Bidwell, R. 1993. Fisiología vegetal. 2 ed. México. AGT Editor S.A. 780 p.
- Castro, D; Díaz, J; Montoya, N. 2002. Propagación clonal de bananos en Biorreactores de Inmersión Temporal. Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología. Rionegro, Colombia. Consultado en: <http://www.inia.cl/at/espanol/v62n1/ART07.htm>
- CIRAD (Centro Internacional de Investigación Agronómico para el desarrollo). 2001. Sistemas de Inmersión Temporal. Ventajas. Montpellier. Francia. Consultado el 21/10/2002 en: www.cirad.fr/produits/rita/es/internet.htm
- Cordero, F. 1986. El cultivo de la vainilla. Guía agropecuaria. (Costa Rica). 4(8):49-54
- Endress, R. 1994. Plant cell biotechnology. Springer-Verlag. Berlín, Alemania. 353p.

- Flores, V. E. M. 1998. La planta: Estructura y función. 2^a ed. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 504 p.
- Flores, M; Abdelnour, A; Alvarenga, S. 2002. Cultivo de tejidos II: Manual de laboratorio. Escuela de biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 52 p.
- Giron, I. 1998. Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción masal. Tesis. MSc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Guerra A., F. 1992. Caracterización morfológica de 10 introducciones de vainilla (*Vanilla sp.*). Tesis. Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Santa Clara, Costa Rica. 38 p.
- Gutiérrez, G..A. 1982. El cultivo de la vainilla. Unidad de Recursos Genéticos, Turrialba, Costa Rica
- Hurtado, D; Merino, M. 2001. Cultivo de tejidos vegetales. México. Editorial Trillas, S. A. México. 232 p.
- Jiménez, F. 1990. Evaluación de características morfológicas en desarrollo vegetativo de 10 introducciones de vainilla (*Vanilla sp.*). Alajuela, Costa Rica. P 1 – 53.
- Kuan, C; Ospina, I. 1990. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos. Departamento Técnico Agropecuario. Instituto Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica. 86 p.

- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Editorial ICA. San José, Costa Rica. 127 p.
- Luelmo, J. 1987. Proyecto piloto para la introducción del cultivo de la vainilla en la zona norte. MIDEPLAN. San José, Costa Rica. 127 p.
- Maya, I. (Compilador). 1999. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria. Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. Colombia. Consultado el 10 de noviembre del 2002 en : <http://www.pronatta.gov.co>
- Montero, W. 2001. Estudio morfogénico e histológico de *Echinacea purpurea in vitro*. Tesis para optar Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 60 p.
- Navarro, W; Perea, M. 1996. Técnicas in vitro para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. Editorial de la Universidad Nacional (EUNA). Heredia, Costa Rica. 105 p.
- Ocampo, R. A. 1987. Seminario sobre el cultivo de especias en Costa Rica. Colegio de Ingenieros Agrónomos. San José, Costa Rica. 10 p.
- Orellano, A. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla King*). Tesis. M.Sc. Programa de enseñanza para el desarrollo y la conservación. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Palma, T. 1995. Manual de práctica de biotecnología de plantas. Departamento de Agronomía. Instituto Tecnológico de Costa Rica. San Carlos, Costa Rica.

- Palma, T; Montero, W. 2002. Curso de biotecnología orientada a la micropropagación de especies tropicales: curso impartido para profesores del Colegio Técnico Agrícola de Pital, San Carlos. San Carlos, Costa Rica. Editorial Tecnológica. 50 p.
- Pierk, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mateo-Sagasta, L. 3 ed. Artes Gráficas Palermo, SL. España. 326p.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 143-160 p.
- Salisbury, F; Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica, S. A. de C. V. 4° edición. Estados Unidos. 756 p.
- Solano, W. 2001. Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en biorreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de Coffea arabica por embriogenesis somática. Tesis para optar por Lic. Agr. Universidad de Costa Rica, San José. Costa Rica.
- Tencio, M. G. 1992. Respuesta de la vainilla (*Vainilla fragans*) *in vitro* al ácido acetil salicílico (ASA). Tesis para optar por Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Santa Clara, Costa Rica. 45p.

Anexo A

Cuadro A1. Análisis de varianza en una evaluación de la respuesta de vainilla (Vanilla planifolia) a diferentes frecuencias de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal.

Fuentes de variación	GL	Numero de brotes	Longitud de brotes	Número de raíces	Longitud de raíces	Área de callo
Explante	2	11.39**	163.4**	0.10**	2.55*	19.51**
Frecuencia de inmersión	2	1.83**	12.29*	0.004	0.23	8.36**
Explante*FI	4	1.21**	22.7*	0.0036	0.16	8.36**
Error	27	2.40	18.1	0.18	6.55	4.76

* Diferencia significativa ** Diferencia altamente significativa (95%).

Cuadro A2. Prueba Duncan en una evaluación de la respuesta de tres explantes de vainilla (Vanilla planifolia) a diferentes frecuencias de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal, a las ocho semanas de siembra

Explante	Número de brotes	Longitud de brotes	Número de raíces	Longitud de raíces	Área de callo
Ápice de tallo	1.69 a	4.07 b	0.058 b	0.875 b	0.000 b
Microestaca	1.68 a	7.37 a	0.183 a	0.183 a	0.000 b
Ápice de raíz	0.00 c	0.00 c	0.000 b	0.000 b	2.208 a

Letras distintas muestra diferencia significativa $\alpha = 0.05$

Cuadro A3. Prueba Duncan en una evaluación de la respuesta de tres explantes de vainilla (Vanilla planifolia) a diferentes frecuencias de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal, a las ocho semanas de siembra.

Frecuencia de inmersión/día	Número de brotes	Longitud de brotes	Número de raíces	Longitud de raíces	Área de callo
2	0.78 c	4.74 a	0.058 a	0.19 a	0.26 b
4	1.55 a	2.73 c	0.092 a	0.43 a	1.70 a
6	1.04 b	3.96 b	0.092 a	0.43 a	0.25 b

Letras distintas muestra diferencia significativa $\alpha = 0.05$

Anexo B

Sistema de cultivo



Figura 19. Componentes del Sistema de Inmersión Temporal Simplificado utilizado en el cultivo de *Vanilla planifolia*. (a) Programador automático regulador de la frecuencia y duración de las inmersiones. (b) Estante y recipientes conectados al sistema. (c) Compresor de aire a un litro por minuto y por RITA con una presión de 0,2 bar.

Anexo C

Cultivo en el Sistema de Inmersión Temporal Simplificado



Figura 20. Cultivo de explantes de *Vanilla planifolia* en el Sistema de Inmersión Temporal Simplificado.

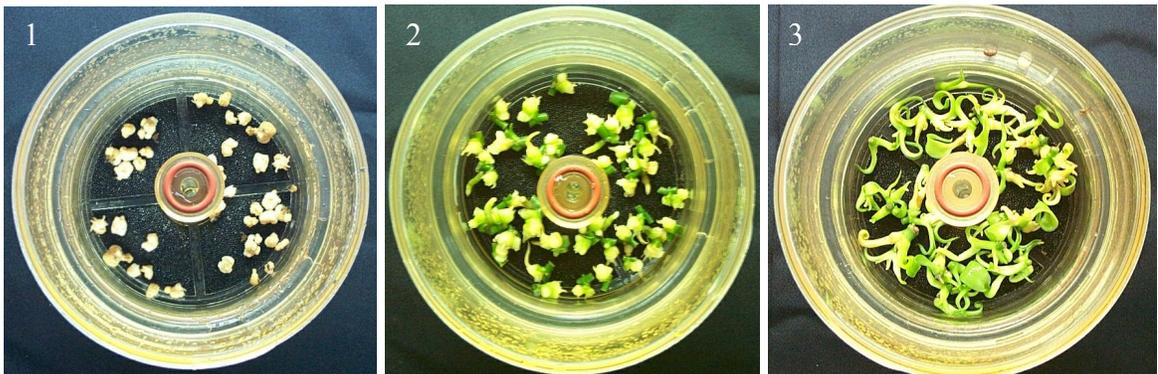


Figura 21. Desarrollo de explantes de *Vanilla planifolia* en el Sistema de Inmersión Temporal Simplificado.

- (1) Ápice de raíz a 4 inmersiones/día. (2) Microestacas a 4 inmersiones/día.
(3) Ápices de tallo a 6 inmersiones/día.

Anexo D

Formato digital