

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE PROPAGACIÓN,
PRODUCCIÓN DE RAÍCES Y FORMACIÓN DE CALLOS
PROTOCÓMICOS A PARTIR DE MERISTEMOS
RADICALES DE VAINILLA (*Vanilla planifolia*)**

CARLOS LUIS ACUÑA MATAMOROS

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Agronomía
como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**

2009

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE PROPAGACIÓN,
PRODUCCIÓN DE RAÍCES Y FORMACIÓN DE CALLOS
PROTOCÓMICOS A PARTIR DE MERISTEMOS
RADICALES DE VAINILLA (*Vanilla planifolia*)**

CARLOS LUIS ACUÑA MATAMOROS

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Agronomía
como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**

2009

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE PROPAGACIÓN,
PRODUCCIÓN DE RAÍCES Y FORMACIÓN DE CALLOS
PROTÓMICOS A PARTIR DE MERISTEMOS
RADICALES DE VAINILLA (*Vanilla planifolia*)**

CARLOS LUIS ACUÑA MATAMOROS

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Biol. Omar Gätjens Boniche, M.Sc.

Asesor

Ing. Agr. Sergio E. Torres Portuguez, M.Sc.

Jurado

Ing. Agr. Tomas Palma Zúñiga, M.Sc

Jurado

Ing. Agr. Fernando Gómez Sánchez, MAE.

Coordinador
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Arnoldo Gadea Rivas, M.Sc.

Director
Escuela de Agronomía

2009

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo, a Dios,
a mis padres Luis Angel y Marlene
y a mi esposa Eliana Andrea.

AGRADECIMIENTO

A DIOS Todo Poderoso y al Divino niño Jesús de Praga por darme la fuerza y la perseverancia que me ayudaron a levantarme ante los obstáculos y culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mis padres, Luis Angel y Marlene, y a mis hermanos, Luis Diego y Wendy, por su apoyo incondicional en mis estudios y mi formación personal, y las palabras de animo de mi madre cada vez que las necesité.

A mi esposa Eliana Andrea, por su apoyo y motivación durante toda la carrera y en especial en este trabajo.

A mi primo Luis Enrique y mi suegra Liliana, por sus palabras y sus consejos.

Al Biol. Omar Gätjens que como asesor hizo posible la realización de este estudio.

Al Ing. Sergio Torres, al Ing. Tomas Palma y a Wayner Montero que con sus conocimientos fueron guía y soporte para la elaboración de esta investigación.

A los colegas del Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del ITCR-SSC, por su apoyo y ayuda en la elaboración de este trabajo, en especial a Jaime Soto.

A mis amigos, Marco S, José David R, Mario A, Claudio V, Melissa C y compañeros de carrera por todas las experiencias de vida compartidas durante estos años y por el apoyo que me han prestado.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
TABLA DE CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos	2
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. Origen y distribución de la vainilla	4
2.2. Descripción taxonómica del género <i>vanilla</i>	4
2.3. Descripción botánica de <i>vanilla planifolia</i>	5
2.4. Principales enfermedades de la vainilla.....	6
2.5. Requerimiento agroclimáticos de las plantas de vainilla.....	7
2.6. Importancia económica y social de la vainilla	7
2.7. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>vanilla planifolia</i>	8
2.8. Transformación genética realizada en plantas de <i>vanilla sp.</i>	11
3. MATERIALES Y METODOS	16
3.1. Ubicación del proyecto.....	16
3.2. Producción de raíces como material de micropropagación de vainilla en medio líquido.	16

3.3. Efecto del fotoperíodo y la consistencia del medio de cultivo en la formación de “pre-callos” de vainilla.	17
3.4. Efecto de dos reguladores de crecimiento sobre la formación de pre-callos de vainilla.	18
3.5. Efecto del fotoperíodo y dos reguladores de crecimiento sobre la formación de callos protocórmicos de vainilla.	19
3.6. Determinación del fenotipo del callo protocórmico de vainilla para realizar la transformación genética.	21
3.7. Determinación de la persistencia y desarrollo de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos a partir de los pre-callos.	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Producción de raíces como material de micropropagación de vainilla en medio líquido.	23
4.2. Efecto del fotoperíodo, la consistencia del medio de cultivo y dos reguladores de crecimiento en la formación de pre-callos de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>).	32
4.3. Efecto del fotoperíodo y dos reguladores de crecimiento sobre la formación de callos protocórmicos de vainilla a partir de “pre-callos tipo 9”.....	37
4.4. Determinación del fenotipo del callo protocórmico de vainilla para realizar la transformación genética.	46
4.5. Determinación de la persistencia y desarrollo de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos a partir de los pre-callos.	48
5. CONCLUSIONES	49
6. RECOMENDACIONES.....	50
7. LITERATURA CITADA.....	51
ANEXOS.....	57

LISTA DE CUADROS

Número	Titulo	Página
1	Tratamientos para evaluar la formación de “pre-callos” de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>).	19
2	Tratamientos para evaluar la respuesta de los callos protocórmicos de vainilla colocados previamente en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH, durante 2 y 4 semanas.	20
3	Cantidad y porcentaje de formación de los diferentes callos protocórmicos de vainilla obtenidos para la prueba con un pretratamiento previo de 15 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L Caseína hidrolizada. Periodo de evaluación 8 semanas de crecimiento.	39
4	Volumen promedio de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos a partir de los tratamientos para la prueba con un pretratamiento previo de 15 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L Caseína hidrolizada. Periodo de evaluación ocho semanas de crecimiento.	40
5	Cantidad y porcentaje de formación de los diferentes callos protocórmicos de vainilla obtenidos con un pretratamiento previo de 15 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada en oscuridad. Periodo de evaluación a las 16 semanas de crecimiento.	41
6	Volumen promedio de los tratamientos para la formación de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos para la prueba con un pretratamiento previo de 15 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L Caseína hidrolizada. Periodo de evaluación 16 semanas de crecimiento.	42
7	Cantidad y porcentaje de formación de los diferentes callos protocórmicos de vainilla obtenidos en los diferentes tratamientos, con un pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada. Para un periodo de evaluación de 8 semanas de crecimiento.	43

Número	Titulo	Página
8	Promedio del volumen de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos en los diferentes tratamientos experimentales para la prueba con un pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada. La evaluación se realizó a las 8 semanas de crecimiento.	44
9	Cantidad y porcentaje de formación de los diferentes callos protocórmicos de vainilla obtenidos en los tratamientos experimentales para la prueba con un pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en un medio líquido MS suplementado con 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada en condiciones de oscuridad. La evaluación se realizó a las 16 semanas de crecimiento.	45
10	Volumen promedio de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos en los tratamientos evaluados, para la prueba con un pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada. La evaluación se realizó a las 16 semanas de crecimiento.	46

LISTA DE FIGURAS

Número	Titulo	Página
1	Promedio de brotes por explante obtenidos para cada subcultivo en los medios de cultivo MS líquidos. Los tres primeros subcultivos suplementados con 1 mg/L BAP, el cuarto subcultivo no contenía reguladores de crecimiento. ...	23
2	Crecimiento de microestacas con raíces del primer subcultivo después de dos meses en medio líquido MS + 1mg/L BAP, en oscuridad. La flecha señala raíces desarrolladas.	24
3	(A) Explante “material maduro con raíz”, (B) Explante “brote nuevo con raíz”. Las flechas señalan el explante.	25
4	<i>Vainilla planifolia</i> en crecimiento, segundo subcultivo con MS + 1mg/L BAP. (A) Raíz mostrando crecimiento normal, (B) raíz mostrando la presencia de estructura “pre-callos”, (C1) explante “material maduro con raíz” con un brote normal, la flecha marca una “raíz con pre-callos” ya diferenciada, (C2) ampliación del tallo de la “raíz con pre-callos” diferenciada.	26
5	Promedio de raíces por explante obtenidos para cada subcultivo. El periodo de crecimiento por cada subcultivo es de 2 meses. Los 3 primeros subcultivos con MS líquido suplementados con 1 mg/L BAP en oscuridad, el cuarto subcultivo sin regulador de crecimiento.	29
6	Formación y generación de múltiples brotes a partir de una raíz con pre-callos. (A1 y A2) en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP en oscuridad, (B1 y B2) en medio líquido MS sin regulador de crecimiento y con 1 g/L caseína hidrolizada en luz.	31
7	Plántulas listas para aclimatar provenientes de propagación en medio líquido. Duración de crecimiento de 6 semanas en medio MS sólido sin regulador de crecimiento con 1 g/L de caseína hidrolizada.	32
8	Clasificación morfológica y porcentaje de formación de los diferentes tipos de “pre-callos” observados, considerando los componentes y condiciones físicas.	36

Número	Título	Página
9	Cuadro de clasificación fenotípica de callos protocórmicos de <i>Vanilla planifolia</i> . Evaluación realizada a las 8 semanas de crecimiento.	38
10	Ejemplos de callos protocórmicos que se consideran los más adecuados como material biológico para realizar la transformación genética de <i>Vanilla planifolia</i> , obtenidos en la semana 8 y 16 de cultivo.	47

RESUMEN

Existen problemas asociados al cultivo de la vainilla, como los relacionados al control de las plagas y enfermedades, tales como la pudrición de raíces generado por el hongo *Fusarium sp.* Por tal razón, el perfeccionamiento de la biotecnología permite desarrollar metodologías de transformación genética no tradicional que podrían ser usadas como técnicas alternativas para el mejoramiento genético de la vainilla, los cuales pueden brindar resistencia a plagas y enfermedades, como también de mejorar aspectos agronómicos de producción.

El objetivo general de esta investigación fue de desarrollar un sistema de propagación, producción de raíces y formación de callos protocórmicos a partir de meristemas radicales como base para la transformación genética de vainilla (*Vanilla planifolia*). Además, se determinaron los componentes y condiciones físicas del medio de cultivo para la formación de “pre-callos” y callos protocórmicos, para efecto de este trabajo de investigación se define un “pre-callo” como la formación de un abultamiento que se generó a partir de los meristemos radicales de vainilla como una estructura transitoria, ya que al modificar sus condiciones de crecimiento pueden generar dos vías, como PLB's o como callos protocórmicos. También se determinó el fenotipo apropiado del callo protocórmico de vainilla, que será utilizado como material biológico para realizar la transformación genética de esta especie. La micropropagación *in vitro* de vainilla se realizó en un medio de cultivo MS líquido suplementado con 1mg/L de BAP en oscuridad, este se subcultivo en tres ocasiones y para el cuarto subcultivo se baso en un medio de cultivo MS líquido sin reguladores de crecimiento en oscuridad para generar la producción de raíces. Se determinó que durante la micropropagación de la vainilla se produjo en promedio 4,78 brotes/explante durante el segundo subcultivo en un medio de cultivo MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP en oscuridad y para la producción de raíces se produjo 4,47 raíces/explante en un medio de cultivo MS líquido sin reguladores de crecimiento suplementado con 1 g/L de CH en oscuridad. Al colocar brotes de estos subcultivos a un medio sólido MS sin reguladores y con 1 g/L de caseína hidrolizada en luz, se reduce a la mitad el tiempo de obtención de plantas para aclimatar (seis semanas) con una altura de 10 cm aproximadamente, con un grosor de 0,41 cm en promedio y entre 3 y 4 hojas con raíces bien formadas. Para la inducción de los “pre-callos” y callos protocórmicos de vainilla, se trabajó con explantes de secciones terminales de raíces de aproximadamente 5 mm de longitud, provenientes de un sistema de propagación en medio líquido en oscuridad, para las cuales se realizaron pruebas con diferentes reguladores de crecimiento BAP (1 mg/L) y 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) y en presencia de luz y oscuridad. Para la formación de “pre-callos” se determinó que hay una gran variedad de tipos de estructuras, se utilizó como material de partida para los callos protocórmicos el “pre-callo tipo 9” el cuál creció en un medio de cultivo MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en oscuridad, por ser una estructura muy homogénea e indiferenciada con un 90% de formación. El medio de cultivo que permitió desarrollar el callo protocórmico ideal y en mayor

cantidad (72% de formación) se generó con el pretratamiento de 4 semanas en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH, los cuales posteriormente se subcultivaron en medio MS sólido con 0,5 mg/L de 2,4-D en oscuridad hasta un periodo de 16 semanas de crecimiento.

Palabras Clave: *Vanilla planifolia* cultivo de tejidos, micropropagación, producción de raíces, “pre-callos”, callos protocórmicos,

ABSTRACT

There are some problems about vanilla culture, such as plague control and diseases, such as rot root related to fungus *Fusarium* sp. Therefore, it is very important to improve biotechnology, so not traditional genetic transformation technologies can be developed, so they can be used as alternative techniques for vanilla genetic improvement, that will make them more resistant to plagues and diseases and improve agrológic production.

In this investigation the general objective is to develop a new multiplication system, root production and formation of “protocorm-calli” culture based on root tip, as a base for vanilla genetic transformation (*Vanilla planifolia*). In addition to, some components and culture physical conditions were determined to create “pre-callus” and “protocorm-calli”. In this work a “pre-callus” is an formation of hemispherical mound that’s been generated from vanilla root tip, as a transitory structure, because when it’s been modified its growing conditions appears two ways: PLB’s or “protocorm-calli”. An appropriate vanilla “protocorm-calli” phenotype was determined to be used as biological material to make the genetic transformation as well. The vanilla in vitro multiplication was made in a liquid MS medium for three different times, supplemented with 1mg/L BAP in a dark place. The forth time this subculture was based in liquid MS basal medium, without growth regulated in a dark place to generate root production. During the vanilla multiplication there was a average of 4.78 shoots during the second subculture in liquid MS basal medium supplemented with 1 mg/L BAP in a dark place and for roots production there were produced 4,47 roots in a liquid MS basal medium supplemented without growth regulator supplemented with 1 g/L de CH in a dark place. Place these subcultures in a solid MS basal medium without growth regulator supplemented with 1 g/L of CH in light reduces half time the plants to get acclimatized (six weeks) with about 10 cm tall, with 0,41 cm thickness approximately, and between 3 an 4 leaves in a well formed roots. For vanilla “pre-callus” and “protocorm-calli” induction, it was worked with root terminals sections explant in about 5 mm length, to come from a propagation system in dark liquid MS basal medium, with different growing regulator BAP (1mg/L) and 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) in dark and light presence. For “pre-callus” formation it was determined a huge variety of structures types, it was used the “9 Type pre-callus” which grew in a MS basal medium supplemented with 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH in the dark place, because it’s a very homogenous and undifferentiated structure with 90% formation. The culture medium which allowed to develop the ideal and most quantity of “protocorm-calli” (72% formation) was generated with the pre-treatment of 4 weeks in a liquid MS medium supplemented with 1 mg/L BAP and 1 g/L CH, and later it was subculture in a MS solid medium with 0,5mg/L of 2,4-D in a dark place for a 16 weeks growth period.

Keywords: *Vanilla planifolia*, tissue culture, multiple shoots, root production, “pre-callus”, protocorm.

1. INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es originaria de las regiones húmedas tropicales de México y América Central, pero también se encuentra en forma silvestre en los bosques de América del Sur (Soto 1999). Esta planta se cultiva en países como Madagascar, las Islas Comores, las Islas Borbonas, las Filipinas, Indonesia, Haití, Uganda y en cantidades pequeñas en países como México y Costa Rica. (USAID/ Fundación Chemonics Colombia 2003). Se estima que la producción mundial de vainas verdes de vainilla es de alrededor de 3500 toneladas por año y cerca de 300 toneladas son utilizadas solo en los Estados Unidos (Kalimuthu *et al.*, 2006). La vainilla y los diferentes extractos y esencias que se fabrican a partir de ella, son los saborizantes naturales más utilizados en las industrias de bebidas y confituras (CNP 2003).

Muchas tecnologías utilizadas en Costa Rica para el cultivo de la vainilla son tradicionales, lo cuál genera una baja producción, debido principalmente a una escasa cosecha, falta en la mejora de las semillas e irregularidades en la densidad de siembra (Sarma 2001). También hay otro tipo de problemas asociados al cultivo de la vainilla, como los altos costos de producción, relacionados al control de plagas y enfermedades, tales como la pudrición del tallo provocado por el hongo *Phytophthora meadii*, pudrición de raíces generado por *Sclerotium rolfsii*, así como otras enfermedades relacionados al hongo *Fusarium sp* (Sarma 2001).

Generalmente la vainilla es propagada por medio de estacas, que al colectarlas de la planta madre se genera en éstas un retraso en el crecimiento, desarrollo y producción. Para cubrir la demanda de plántulas de vainilla, es esencial la regeneración rápida de esta especie. El problema podría solucionarse implementando un método de propagación más adecuado, como lo es la propagación *in vitro*, sin embargo existen pocas investigaciones al respecto y los protocolos son complicados (Kalimuthu *et al.*, 2006).

Las metodologías de transformación genética no tradicional podrían ser usadas como técnicas alternativas para el mejoramiento genético de la vainilla, siempre que se puedan llevar a cabo relativamente rápido y puedan permitir la producción de plantas con las características comerciales requeridas (Díaz *et al.*, 1996).

La transformación genética permite introducir en las plantas genes provenientes no sólo de otras especies vegetales muy alejadas desde el punto de vista evolutivo, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales (Díaz *et al.*, 1996). Un método de transformación genética muy difundido es la biobalística, la cuál utiliza micropartículas de oro o tungsteno cubiertas con ADN, que son aceleradas por un gas comprimido para introducirlas así en las células vegetales. Esta técnica, sin embargo, posee algunas limitaciones. En este sentido algunas especies oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, generada por paredes celulares con cutículas endurecidas, lignificadas o superficies vellosas. Sin embargo, la principal limitación del método continúa siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente la información genética transferida (Díaz *et al.*, 1996).

1.1. Objetivo general

- Desarrollar un sistema de propagación, producción de raíces y formación de callos protocórmicos a partir de meristemos radicales como base para la transformación genética de vainilla (*Vanilla planifolia*).

1.2. Objetivos específicos

- Desarrollar una metodología para la producción de raíces como material de micropropagación de vainilla en medio líquido.

- Determinar el efecto del fotoperíodo y la consistencia del medio de cultivo en la formación de pre-callos de vainilla (*Vanilla planifolia*).
- Determinar el efecto de dos reguladores de crecimiento (BAP y 2,4-D) sobre la formación de pre-callos de vainilla.
- Determinar el efecto del fotoperíodo y dos reguladores de crecimiento (BAP y 2,4-D) sobre la formación de callos protocórmicos de vainilla
- Determinar el fenotipo del callo protocórmico de vainilla para realizar la transformación genética.
- Determinar la persistencia y desarrollo de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos a partir de los pre-callos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución de la vainilla

Las especies del género *Vanilla* se distribuyen a través de todos los continentes, excepto en Australia. La mayoría (52 especies) se encuentran en el trópico de América, en el sur de Asia y Nueva Guinea se encuentran 31 especies, en África 17 especies, en las islas del Océano Índico siete especies y tres especies en el área del Pacífico (Bory *et al.*, 2008).

La distribución natural de la *Vanilla planifolia* se origina desde el este de México en las zonas de bosque tropicales, hasta Costa Rica, así como también en Las Antillas (Bory *et al.*, 2008). La densidad demográfica de *V. planifolia* puede ser muy baja, aproximadamente una planta por Km². Estas plantas silvestres llegan a florecer y generar la germinación de sus semillas, sin embargo esto no sucede con frecuencia (Soto 1999). Estas observaciones sugieren una tasa reducida de la reproducción sexual de las plantas silvestres, por lo cuál en cultivos comerciales este tipo de propagación es poco eficiente (Schlüter *et al.*, 2007).

2.2. Descripción Taxonómica del género *Vanilla*

El género *Vanilla* pertenece a la familia Orchidaceae, la cuál cuenta con más de 800 géneros distribuidos en más de 25,000 especies (Bory *et al.*, 2008).

Del género *Vanilla* se conocen más de 110 especies, de las cuales solo tres son cultivadas por su importancia comercial (*V. planifolia*, *V. tahitensis*, *V. pompona*). Según Duval *et al.*, (2006), el 95% de la vainilla comercial es de la especie *planifolia*, en cuanto a las otras dos especies, la *Vanilla tahitensis* se cultiva en zonas del Océano Pacífico, y aunque se ha observado que es más resistente contra enfermedades, las vainas que produce presentan una calidad inferior (Berger 2007). Se ha observado que esta especie tiene mucha relación con *V. planifolia* (Soto 1999; Duval *et al.*, 2006). Por último, la *V. pompona*,

conocida como vainillón, se cultiva localmente o se cosecha de forma silvestre y está distribuida en Centroamérica y las Antillas (Duval *et al.*, 2006).

2.3. Descripción Botánica de *Vanilla planifolia*

La vainilla es una planta perenne suculenta, la cuál requiere de un árbol o una ayuda artificial para su crecimiento (tutor). Las raíces aéreas adventicias se adhieren al árbol fácilmente (Philip y Nainar 1986). La planta puede crecer a una altura de 10 a 20 metros, pero en los cultivos comerciales las plantas se mantienen a baja altura para facilitar la polinización manual y para la cosecha de las vainas (Berger 2007).

En países como Puerto Rico, se observó que la reproducción sexual de la vainilla en condiciones naturales, produjo menos de un 1% de vainas. En Centroamérica se describen ámbitos similares, entre un 1% y un 3% (Berger 2007), y en México, se reporta un menor porcentaje, una vaina por cada 100 a 1000 flores (Soto 1999). La reproducción asexual se da por medio de estacas, las cuales tienen entre 8 a 12 nudos, estas son recolectadas de plantas sanas que produzcan vainas vigorosas (Bory *et al.*, 2008). Este método de propagación es lento, laborioso y consume mucho tiempo, lo cuál lo convierte en una técnica poco rentable, debido a que el corte de los tallos provoca un retraso en el crecimiento de la planta madre (Janarthanam y Seshadri 2008).

Para que la planta de vainilla llegue a producir flores, necesita cerca de dos a cuatro años desde su fase de establecimiento para que comience la producción de fruto, a partir de este momento la planta puede producir por un período de 5 a 6 años. Cada planta tiene cerca de 10 a 20 racimos de flores, de las cuales se desarrollan de 15-20 flores por cada uno. Después de la polinización manual, de 8 a 12 de estas flores por racimo se convertirán en vainas (Berger 2007).

La planta de vainilla requiere condiciones especiales de crecimiento para la formación de sus frutos o vainas, este proceso dura aproximadamente nueve

meses. Las vainas se cosechan cuando aún están verdes, posteriormente es necesario un proceso elaborado conocido como curado (fermentación), este proceso tarda de tres a seis meses y es un proceso necesario para obtener el sabor característico de la vainilla (Vainillina) (Berger 2007).

2.4. Principales enfermedades de la vainilla

La Vainilla es atacada por muchas enfermedades, afectando varias secciones de la planta. El mayor problema lo ha presentado el hongo *Fusarium sp*, el cuál ocasiona la podredumbre de la raíz (Anandaraj *et al.*, 2001).

La fusariosis una enfermedad muy común en las plantaciones de vainilla, es causado por el hongo *Fusarium oxysporum* siendo la enfermedad más seria en el cultivo de la vainilla. Esta enfermedad predomina en plantaciones jóvenes, especialmente en los periodos de alta humedad. La infección inicia en el eje de las hojas extendiéndose hacia el interior de la región del nudo provocando pudre y secado el tallo. La infección puede originarse por heridas generadas en las raíces, generalmente provocado por el pisoteo del personal de campo o por la poda de las plantas (USAID/ Fundación Chemonics Colombia, 2003).

La pudrición del tallo es provocado por *Phytophthora meadii*, el cuál causa la pudrición de la vainas, hojas y tallos en la planta de vainilla. En casos severos, todas las vainas pueden estar infectadas provocando la pudrición completa de los frutos de la planta. La enfermedad es más severa durante las altas precipitaciones y en suelos con un pobre drenaje (Anandaraj *et al.*, 2001).

La pudrición de raíces es causado por el hongo *Sclerotium rolfsii*, esta infección se observa durante los periodos de altas precipitaciones. Inicialmente, la pudrición por *S. rolfsii* daña los meristémicos de las raíces, de ahí se extiende en todo el sistema radical, seguido de amarillamiento y marchites en las vainas. En muchos de los casos la vaina se muere (Anandaraj *et al.*, 2001).

2.5. Requerimiento Agroclimáticos de las plantas de vainilla

Las plantas de vainilla crecen mejor en las regiones tropicales húmedas. El sol directo puede provocar daños en su follaje, pero también el exceso de sombra es perjudicial para la planta, por lo que esta planta crece generalmente entre las sombras de los árboles, los cuales reducen cerca de la mitad de la intensidad del sol. En condiciones de sequía la planta puede morir fácilmente. En cultivos comerciales, también se pueden utilizar mallas artificiales para crear las condiciones correctas de luz para su crecimiento (Berger 2007).

La planta de vainilla crece bien a nivel del mar, y a altitudes de más de 760 m.s.n.m, con temperaturas entre los 20 a 30° C (Berger 2007). Soto (1999) menciona que las plantas de *Vanilla planifolia* en forma silvestre se encuentran en bosques perennifolios o húmedos sobre terrenos con mucha pendiente, frecuentemente entre los 250 y 750 metros de altitud. A pesar de las altas precipitaciones, siempre mayores a 2,500 mm, estos bosques son muy ventilados y con suelos secos. También se ha visto en bosques a 400 m.s.n.m.

2.6. Importancia Económica y Social de la vainilla

Vanilla planifolia es una de las especias más importantes cultivadas alrededor del mundo y es comercialmente sembrada por sus vainas, de las cuales se extrae la vainillina (Geetha y Shetty 2000).

La esencia de la vainilla, se utiliza comúnmente para saborizar helados, bebidas suaves, como condimento de comidas, en cosméticos y en la industria de perfumes (Kalimuthu *et al.*, 2006). La vainillina concretamente como esencia, es un sabor muy versátil, en cualquier concentración es aceptable, y la mayoría de las personas disfrutan de su sabor, siendo uno de los más populares del mundo.

Se estima que la producción mundial de vainilla abarca más de 37,525 hectáreas y una producción anual de aproximadamente 4,403 toneladas

(Janarthanam y Seshadri 2008). El comercio de la vainilla se enfrenta a grandes dificultades debido a la competencia de la vainillina de biosíntesis y a la baja de los precios inducido por el aumento de la producción (Duval *et al.*, 2006).

De las 1,191 toneladas importadas por los Estados Unidos entre los meses de enero a julio del 2009, Madagascar exportó más de la mitad de la vainilla con 828 toneladas, Uganda con 140 toneladas e Indonesia con 114 toneladas. Debido a varias enfermedades de la planta y la fuerte competencia internacional, incluyendo las nuevas regiones cultivadas, el precio de la vainilla fermentada es de aproximadamente \$27/Kg (ITC 2009).

2.7. Cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia*

Algunos protocolos de micropropagación de vainilla han reportado el uso de segmentos de tallo con yemas axilares, como lo realizado por Konowicz y Jarrick (1984), utilizando como medio MS básico (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 1 g de caseína hidrolizada y 0,5 mg/L de 6-Benzilaminopurina (BAP) en medio sólido. Estos investigadores determinaron que a esta concentración de BAP se obtenían brotes más largos con producción de raíces, esto durante un periodo de propagación de cinco subcultivos.

Konowicz y Jarrick (1984) realizaron pruebas para inducir la formación de callos de vainilla utilizando como explante segmentos de tallo. Estos segmentos fueron sembrados en medio de cultivo MS básico suplementado con el regulador de crecimiento ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D) y 6-Benzilaminopurina (BAP) en concentraciones de 0,5 mg/L, 5 mg/L y 10 mg/L, en condición de oscuridad durante 12 semanas. A partir de estas pruebas no se observó la formación de callos. También en el mismo trabajo Konowicz y Jarrick (1984) utilizaron segmentos de raíces, los cuales fueron transferidos utilizando conjuntamente 5 mg/L de kinetina y 5 mg/L de 2,4-D, manteniendo los cultivos en oscuridad. Un 21% de estos explantes formaron pelos radicales, no se dio

generación de callo y los materiales se tornaron cafés, necrosándose después de 12 semanas.

Para el establecimiento de diferentes explantes de vainilla se han utilizado varios medios de cultivo como por ejemplo el Knudson, MS, Gamborg's y SH., sin embargo el MS (Murashige y Skoog, 1962) fue el medio de cultivo que mostró mejor crecimiento e inducción de plántulas. Parece que para la vainilla, el medio basal constituido por altas concentraciones de sales como las del MS es esencial en los distintos estados del cultivo. Por lo que el medio de cultivo MS es el más usado en distintos estudios (Phillip y Nainar 1986).

En un estudio realizado por George y Ravishankar (1997), estos autores determinaron que la combinación de medio líquido y medio sólido, favorecía la multiplicación de brotes en *V. planifolia* en dos etapas. En la primera etapa de iniciación de brotes, se colocan los brotes axilares en un medio MS sólido suplementado con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L ANA durante 13 semanas con un promedio de 5,7 brotes por explante. Los brotes formados los transfieren en una segunda etapa de propagación en un medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de ANA de 2 a 3 semanas con un promedio de 7 brotes por explante, los cuales se subcultivaron en medios sólidos.

Sin embargo Geetha y Shetty (2000) obtuvieron de 8 a 10 brotes de vainilla por micro estaca variando la composición de los medios de cultivo, en una primera etapa utilizaron un MS básico con 3% de sacarosa, adicionando como regulador de crecimiento 1 mg/L de BAP, durante un periodo de 3 a 4 meses, con subcultivos cada 4 semanas, durante esta etapa generaron brotes y también utilizaron la misma composición del medio de cultivo para formación de raíces y regeneración de plántulas para su posterior aclimatación. En una segunda etapa utilizaron un medio con baja concentración de sales como lo es el medio basal Nitsch, con 2% de sacarosa, suplementado con el regulador de crecimiento BAP a 0,5 mg/L, este medio es utilizado como medio de propagación masiva ya que se

forman racimos de brotes. También se ha informado que a partir de la utilización de nudos axilares se han obtenido un máximo de 6 brotes de vainilla por explante, en medio de cultivo MS sólido suplementado con 2 mg/L de Ácido Indol-3-acético (AIA), 0,5 mg/L de Kinetina y 0,5 mg/L Benzil Aminopurina (BAP) (Kalimuthu *et al.*, 2006).

Philip y Nainar (1988), observaron que en cultivos *in vitro* de *Vanilla planifolia* se puede revertir la tendencia natural del meristemo radical para inducir la producción de brotes. Esto ocurre probablemente a que el centro quiescente de los meristemos radicales cambia para formar meristemos apicales, de modo que se llegan a formar múltiples brotes. Por lo cuál se desarrolló una metodología de meristemos de raíces aéreas en medio MS líquido, suplementado con 2 mg/L de Ácido Indol-3-acético (AIA) y 0,2 mg/L de Kinetina, a los 3 meses en cultivo, la caliptra se parte, exponiendo pequeñas protuberancias esféricas. También se observó que al colocar meristemos radicales bajo las mismas condiciones pero en medio sólido, el explante forma varias ramificaciones, a partir de los cuales se desarrollaron nuevos meristemos, produciendo posteriormente múltiples brotes. Después de un periodo aproximado de nueve meses de cultivo, se generaron plántulas con tallos bien formados, distinguiendo hojas y raíces para cada uno de los explantes, cada explante de raíz formó de 5 a 40 plántulas. De los 400 meristemos de raíces aéreas de *Vanilla planifolia* cultivadas por Philip y Nainar (1986), 375 produjeron múltiples plántulas directamente de la zona meristemática sin una interfase de callo, reduciendo al mínimo la posibilidad de cambios epigenéticos inducidos en las plantas resultantes.

De acuerdo a lo estipulado por Philip y Padikkala (1989), quienes estudiaron la acción potencial de las auxinas en la regulación del crecimiento de la raíz de *V. planifolia*, generalmente concentraciones bajas de auxina en el medio de cultivo promueven la formación de brotes a partir de los meristemos radicales. Al parecer un equilibrio crítico entre el Ácido Indol-3-acético (AIA) endógeno y el exógeno determina el desarrollo de los explantes. Por ejemplo, hay

investigaciones que revelan que la organogénesis puede ocurrir sin AIA en el medio de cultivo, ya que la misma planta lo puede producir por si misma.

Janarthanam y Seshadri (2008) desarrollaron una metodología para la formación de callos de vainilla utilizando hojas como explantes, los cuales formaron callos en un medio basal MS con 1 mg/L de 2,4-D, y 0,4 mg/L de Ácido Naftalenacético (ANA). Al momento de tener el callo formado, para regenerar plántulas, se cambio el regulador de crecimiento a 3 mg/L de BAP con 0,25 mg/L de ANA. Esta metodología planteada por Janarthanam y Seshadri (2008) para la propagación masiva de plántulas de *Vanilla planifolia*, donde se obtuvo la generación de 100,000 plántulas en 8 subcultivos, las cuales provienen de callos formados a partir de hojas de *V. planifolia*.

2.8. Transformación genética realizada en plantas de *Vanilla sp.*

Para llevar a cabo la transformación genética de plantas se requiere además de un sistema de propagación *in vitro* eficiente, un vector de transformación genética apropiado y funcional. Los vectores de transformación genética son aquellos sistemas utilizados como ayuda en transferencia de genes externos hacia el interior de las células del organismo aceptor. Hacia el interior de la célula se han utilizado una gran variedad de vectores con fines experimentales y de forma genérica se pueden clasificar en vectores no virales y vectores virales (Ceña *et al.*, 2003).

Los vectores no virales comprenden técnicas que permiten introducir material genético foráneo a las células. Dichos vectores pueden ser químicos (fosfato cálcico, liposomas) o también vectores físicos (biobalística, electroporación, microinyección). Los vectores químicos fueron los primeros en utilizarse entre 1960 y 1980 (Ceña *et al.*, 2003).

Entre los métodos de transformación más ampliamente utilizados se encuentra el método de *Agrobacterium tumefaciens* y la transferencia directa mediante el bombardeo con micropartículas (biobalística). También existen otros métodos los cuales son poco comunes, como las técnicas de microinyección y de electroporación (Martínez *et al.*, 2004).

El método de transformación de *Agrobacterium* se basa en la utilización del plásmido de ADN presente en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, la cuál causa tumoraciones en la base del tallo de las plantas. En este sistema la bacteria transfiere de manera natural un segmento de ADN foráneo presente en el plásmido (segmento T-ADN) a los cromosomas de las células vegetales que se desean transformar. A partir de su descubrimiento, este sistema se convirtió en el primer método predecible y confiable para transferir ADN foráneo a células vegetales (Salisbury y Ross 1994).

El sistema de *Agrobacterium* posee una serie de ventajas sobre otros sistemas de transformación genética y es considerado como la primera opción para transformar plantas. Entre las ventajas, se pueden mencionar que actualmente se tienen numerosos vectores que contienen una variedad de genes reporteros los cuales codifican para una proteína con alguna actividad enzimática que al estar en contacto con un sustrato químico, presentan una coloración sensible a la luz visible o a luz ultravioleta o infrarroja, por otro lado también se pueden mencionar los genes de selección los cuales codifican para proteínas que poseen resistencia a los antibióticos u herbicidas, permitiendo seleccionar de forma específica los tejidos resistentes que crecen en un medio de cultivo con antibióticos o cultivos expuestos a tratamientos con herbicidas, por lo cuál se puede realizar la combinación más apropiada para insertar genes (Martínez *et al.*, 2004). Otra ventaja es que se pueden transferir fragmentos de ADN más grandes, inclusive cromosomas artificiales de levadura (Hamilton *et al.*, 1996)

Más de 600 especies de plantas son hospederas naturales de *Agrobacterium tumefaciens*. Estas pertenecen en su mayoría a dicotiledóneas y

gimnospermas, y raramente a monocotiledóneas. En los últimos años se han realizado protocolos de transformación genética basados en este vector para plantas monocotiledóneas. El interés en el desarrollo de este tipo de tecnología hizo que se expandiera el rango de hospedantes de *A. tumefaciens* a especies que no son susceptibles en condiciones naturales a este patógeno. Así, se ha puesto énfasis en la utilización de *A. tumefaciens* como vector de transformación en gramíneas y se han desarrollado protocolos en varias especies de este grupo (arroz, maíz, cebada, trigo y gramíneas forrajeras). Actualmente se realizan muchos trabajos en arroz y maíz por su compatibilidad y eficiencia (Díaz *et al.*, 1996).

La metodología de biobalística está diseñada para transformar células completas que forman parte de un órgano o tejido. En esta técnica, el plásmido de ADN a transferir se sitúa sobre la superficie de pequeñas micro partículas de 1 a 3 micras de diámetro de oro o tungsteno que posteriormente son aceleradas, ya sea mediante cargas explosivas, descargas eléctricas, expansión de gases inertes a alta presión (helio), o aire comprimido. La fuerza física del impacto supera la barrera de la pared celular (Christou y Yang 1994; Ceña *et al.*, 2003).

Actualmente la metodología de la biobalística es utilizada en aquellas especies renuentes a la transformación por el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. El bombardeo se realiza sobre órganos o tejidos jóvenes capaces de regenerar una planta *in vitro* completa (Cena *et al.*, 2003).

La metodología de biobalística puede ser utilizada potencialmente en la transformación de células vegetales, lo cual permite crear plantas transgénicas con fines productivos, ya sean estas plantas monocotiledóneas (cebada, centeno, avena, sorgo, maíz, arroz, trigo, avena y caña de azúcar), o bien plantas dicotiledóneas (soja, tabaco y algodón) (Vasil 1994; Ceña *et al.*, 2003).

Entre las ventajas que presenta el método de la biobalística, se destaca un manejo sencillo y relativamente fácil, además se pueden generar en un único disparo integraciones múltiples. Sin embargo, este método presenta también algunas desventajas, entre las cuales cabe mencionar que se puede dar una mayor posibilidad de muerte celular en la zona de impacto, también se pueden generar grandes variaciones en la eficiencia de la expresión de los genes, esto dependiendo de la rigidez de los tejidos, la procedencia del ADN foráneo y la capacidad de transcripción intrínseca. Además, la expresión conseguida por la metodología convencional de biobalística, suele ser transitoria y con una frecuencia relativamente baja, por lo que se requieren de grandes dosis para alcanzar los eventos de transformación (Ceña *et al.*, 2003).

Por su parte, en el método de la electroporación de ADN, los protoplastos vegetales y el ADN se colocan en una cámara, a la que se le aplican breves pulsos eléctricos con un generador, esto permite generar aberturas temporales en la membranas de los protoplastos vegetales, para la entrada de los vectores de transformación genética a la célula, en donde dichos vectores se integran al genoma y se expresan (Salisbury y Ross 1994).

Divakaran *et al* (2008) realizaron aislamientos y fusiones de protoplastos viables de vainilla utilizando hojas *in vitro* de diferentes especies de *Vanilla*, dándose la fusión de protoplastos entre *V. planifolia* y *V. andamanica*. Esta tecnología permitió potencialmente la transferencia de rasgos útiles, como la tolerancia a enfermedades naturales, o la generación de nuevos híbridos con características deseables.

Por otra parte, los autores Malabadi y Nataraja (2007), realizaron pruebas de transformación genética en *Vainilla planifolia* utilizando protocormos o PLB's (Protocorm-like bodys) los cuales se co-cultivaron con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404), conteniendo el vector binario pCAMBIA2301, el cuál contiene como gen selector nptII, que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa

(*nptII*) y el gen marcador de la β -glucoronidasa (*gusA*), con el promotor 35S (CAMV). Los protocormos se obtuvieron a partir de introducciones de meristemos apicales, los cuales fueron sembrados en un medio de cultivo MS con 3% de sacarosa, 1 g/L de caseína hidrolizada y 4 mg/L de putrescina, como regulador de crecimiento. En estas pruebas estos autores informaron que lograron transformar la *V. planifolia*, por ello protocolos utilizados se pueden aplicar a otras variedades de *V. planifolia*, generando una base muy útil para otras mejoras genéticas en orquídeas. Además, este sistema de transformación también se puede utilizar como base para la transferencia de otros transgenes de interés en *V. planifolia*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación del proyecto

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales adscrito al CIDASTH (Centro de Investigación y Desarrollo de la Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo) de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos geográficamente situada a los 10° 20' Latitud Norte y 84° 34' Longitud Oeste.

3.2. Producción de raíces como material de micropropagación de vainilla en medio líquido.

Se trabajó con materiales de *Vanilla planifolia* establecidos en medios de cultivo líquido *in vitro* los cuales fueron facilitados por el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del ITCR, con el fin de obtener raíces para los posteriores ensayos.

Para la etapa de micropropagación y producción de raíces, se utilizaron microestacas con raíces en el primer subcultivo, para los siguientes subcultivos se diferenciaron las microestacas por su madurez fisiológica en “Material maduro con raíz” y “Brote nuevo con raíz”, esto con el propósito de determinar cuál explante presenta una mayor cantidad de brotes y raíces. Durante los primeros tres subcultivos, se utilizó el medio de cultivo líquido que contiene las sales de MS (Murashige y Skoog 1962) a una concentración del 100%; además, dicho medio se suplementó con 1 mg/L de Bencil Aminopurina (BAP) y 30 g/L de sacarosa a un pH de 5,7. Para el cuarto subcultivo se eliminó el regulador de crecimiento (BAP) con el fin de que se llegaran a producir raíces.

Durante la etapa de propagación y formación de raíces, se utilizó un agitador orbital a 120 r.p.m., el cuál fue acondicionado para evitar el ingreso de

luz, por lo que el crecimiento de las plantas se generó en oscuridad. Los cultivos se incubaron a 25 ± 1 °C y a una humedad relativa del 90%.

Entre las variables a evaluar se cuantificó el número de brotes mayores a tres cm de longitud en cada explante (“Material maduro con raíz” y “Brote nuevo con raíz”) y se obtuvo un promedio por cada unidad experimental. Además se cuantificó el promedio de raíces con al menos tres cm de longitud formados en cada brote.

3.3. Efecto del fotoperíodo y la consistencia del medio de cultivo en la formación de “pre-callos” de vainilla.

Para efecto de este trabajo de investigación se define un “pre-callos” como la formación de un abultamiento que se generó a partir de los meristemos radicales de vainilla que fueron expuestos a diferentes reguladores de crecimiento en un período menor de cuatro semanas, ya que es una estructura transitoria que al modificar sus condiciones de crecimiento puede formar PLB's o callos protocórmicos. Para la inducción de los “pre-callos” de vainilla, se trabajó con explantes de secciones terminales de raíz de aproximadamente 5 mm de longitud, provenientes de un sistema de propagación en medio líquido en oscuridad.

Para evaluar el efecto del fotoperíodo de las terminales de raíz que se mantuvieron en condiciones de luz, se utilizó el cuarto de crecimiento el cuál posee un fotoperíodo de 16 horas luz. Como fuente de luz se emplearon lámparas de luz fluorescente con intensidades lumínicas de 2000 lux. Los tratamientos que necesitaron de oscuridad fueron cubiertos de tal forma que no estuvieran expuestos a la luz. Los cultivos se incubaron a 25 ± 1 °C y a una humedad relativa del 90%.

La consistencia del medio de cultivo se evaluó midiendo el crecimiento de lo “pre-callos” en medios de cultivo sólidos y medios de cultivo líquidos. Los medios de cultivo sólidos se les agregó 5,7 g/L de agar-agar como gelificante y los medios

de cultivo líquidos no se les adicionó el gelificante que permite la solidificación del medio de cultivo.

3.4. Efecto de dos reguladores de crecimiento sobre la formación de pre-callos de vainilla.

Durante la etapa de formación de “pre-callos” de vainilla se colocaron los meristemos radicales de forma invertida (geotropismo negativo) para los medios de cultivo sólidos como lo mencionan los autores Philip y Nainar (1988), en un medio MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 1 mg/L de BAP como testigo, este se consideró como tal debido a que se utilizó anteriormente en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos (Alatorre 2002). Como variantes se realizaron pruebas con 2,4-D a distintas concentraciones (0,5 mg/L, 1 mg/L y 1,5 mg/L). Para las pruebas en medio líquido se utilizaron los mismos reguladores de crecimiento pero sin tomar en cuenta el efecto de geotropismo negativo. Además, al medio de cultivo se le agregó 30 g/L de sacarosa y 1 g/L de caseína hidrolizada (CH) a un pH de 5,7. Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave con un período de 30 minutos a 121°C.

Para obtener el “pre-callos” apropiado de vainilla en términos del porcentaje de formación, se realizaron los tratamientos indicados en el cuadro 1. La unidad experimental para los tratamientos que crecieron en medio sólido se basó en frascos de Gerber pequeño con cinco terminales de raíz por frasco con 8 repeticiones, para los tratamientos en medio líquido se utilizaron erlenmeyers de 125 ml de los cuales la unidad experimental constituye de 10 terminales de raíz por erlenmeyer con cuatro repeticiones.

El porcentaje de formación de “pre-callos” se determinó por el cambio producido en el meristemo de la raíz formando una estructura similar a un “pre-callos”, con respecto al total de meristemas de raíces sembradas.

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar la formación de “pre-callos” de vainilla (*Vanilla planifolia*).

Tratamiento	Consistencia del medio	Fotoperiodo	Regulador de crecimiento y concentración
1	Sólido	Luz	BAP 1,0 mg/L
2	Sólido	Oscuridad	BAP 1,0 mg/L
3	Sólido	Luz	2,4-D 0,5 mg/L
4	Sólido	Oscuridad	2,4-D 0,5 mg/L
5	Sólido	Luz	2,4-D 1,0 mg/L
6	Sólido	Oscuridad	2,4-D 1,0 mg/L
7	Sólido	Luz	2,4-D 1,5 mg/L
8	Sólido	Oscuridad	2,4-D 1,5 mg/L
9	Líquido	Luz	BAP 1,0 mg/L
10	Líquido	Oscuridad	BAP 1,0 mg/L
11	Líquido	Luz	2,4-D 0,5 mg/L
12	Líquido	Oscuridad	2,4-D 0,5 mg/L
13	Líquido	Luz	2,4-D 1,0 mg/L
14	Líquido	Oscuridad	2,4-D 1,0 mg/L
15	Líquido	Luz	2,4-D 1,5 mg/L
16	Líquido	Oscuridad	2,4-D 1,5 mg/L

3.5. Efecto del fotoperíodo y dos reguladores de crecimiento sobre la formación de callos protocórmicos de vainilla.

Para efecto de este trabajo de investigación se define un callo protocórmico como la formación de un callo indiferenciado con indicios de protocormos, con presencia o ausencia de pelos radicales. Como material de partida se escogieron los “pre-callos” formados con crecimiento previo de 15 y 30 días en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP y con 1 g/L de CH en oscuridad. Para evaluar el efecto del fotoperíodo los callos protocórmicos que se mantuvieron en condiciones de luz, se utilizó el cuarto de crecimiento el cuál posee un fotoperíodo de 16 horas luz. Como fuente de luz se emplearon lámparas de luz fluorescente con intensidades lumínicas de 2000 lux. Los tratamientos que necesitaron de oscuridad fueron cubiertos de tal forma que no estuvieran expuestos a la luz. Los cultivos se incubaron a 25 ± 1 °C y a una humedad relativa del 90%.

Para evaluar el efecto de dos reguladores de crecimiento sobre la formación de callos protocórmicos de *Vanilla planifolia*, se utilizó el medio de cultivo que contiene las sales MS (Murashige y Skoog 1962), y suplementados con diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento BAP a 1 mg/L y diferentes concentraciones de 2,4-D a 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L, además de agregar 30 g/L de sacarosa y 1 g/L de caseína hidrolizada a un pH de 5,7. Se utilizó como gelificante 5,7 g/L de agar-agar para los subcultivos en medios sólidos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos para evaluar la respuesta de los callos protocórmicos de vainilla colocados previamente en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH, durante 2 y 4 semanas.

Tratamientos	Fotoperíodo de subcultivo en medio sólido	Regulador de crecimiento y concentración
1	Luz	2,4-D 0,5 mg/L
2	Oscuridad	2,4-D 0,5 mg/L
3	Luz	2,4-D 1 mg/L
4	Oscuridad	2,4-D 1 mg/L
5	Luz	2,4-D 1,5 mg/L
6	Oscuridad	2,4-D 1,5 mg/L
7	Luz	2,4-D 3 mg/L
8	Oscuridad	2,4-D 3 mg/L
9	Oscuridad	BAP 1 mg/L

Las variables a evaluar fueron la formación del callo protocórmico ideal y el volumen final de cada callo protocórmicos. Para cada ensayo, se utilizó un diseño factorial 2^2 completamente aleatorizados. En el diseño, se estimó el efecto del regulador de crecimiento a distintas dosis y el efecto de la presencia o ausencia de luz, además de la interacción entre ambos factores. La unidad experimental para el pre-tratamiento de 15 días constó de cinco pre-callos por cada frasco de Gerber pequeño con seis repeticiones, y para los pre-tratamientos de 30 días la unidad experimental constituyó de cinco pre-callos por cada frasco de Gerber pequeño con cinco repeticiones.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + (A \times T)_{kj} + \varepsilon_{ijk}$$

En donde:

A = Efecto del factor del regulador de crecimiento.

T = Efecto de factor condición de fotoperiodo (Luz y Oscuridad).

A x T=Efecto de la interacción entre los factores “regulador de crecimiento” y “condición de fotoperiodo”.

ε = Efecto del error experimental.

Los resultados obtenidos de los mismos se interpretaron a través del uso de la diferenciación de medias (prueba de Tukey)

3.6. Determinación del fenotipo del callo protocórmico de vainilla para realizar la transformación genética.

Para determinar el fenotipo ideal del callo protocórmico, se determinó con base en las características de este con un tipo de tejido indiferenciado, de gran tamaño, de color cremoso y con la presencia o ausencia de pelos radicales. Con base en estas características se determinó cuál tratamiento es el que genera la mayor cantidad de esta estructura que podrían ser ideales para utilizarlo como material biológico en pruebas de transformación genética por medio de biobalística.

3.7. Determinación de la persistencia y desarrollo de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos a partir de los pre-callos.

Para determinar la persistencia y desarrollo de los callos protocórmicos de vainilla, se llevaron a cabo dos pruebas considerando la respuesta de los “pre-callos” de vainilla a los 15 y 30 días previos en medio líquido MS suplementado

con 1 mg/L de BAP y 1 g de CH. Para los tratamientos del cuadro 2, se realizaron dos evaluaciones a las 8 semanas y 16 semanas de crecimiento de los callos protocórmicos de vainilla formados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de raíces como material de micropropagación de vainilla en medio líquido.

La obtención de raíces para llevar a cabo la micropropagación de *Vanilla planifolia* se realizó utilizando microestacas provenientes de plántulas *in vitro* de esta especie. De acuerdo a la figura 1, la tasa de multiplicación promedio obtenida de vainilla para el primer subcultivo fue de 2,86 brotes por explante, durante un período de crecimiento de 2 meses. En este primer subcultivo, las microestacas de vainilla utilizadas provenían de plántulas *in vitro* bajo condiciones de crecimiento en luz, al cambiar las condiciones de crecimiento a oscuridad, los brotes producidos fueron de poca altura y etiolados, como se puede observar en la figura 2(A).

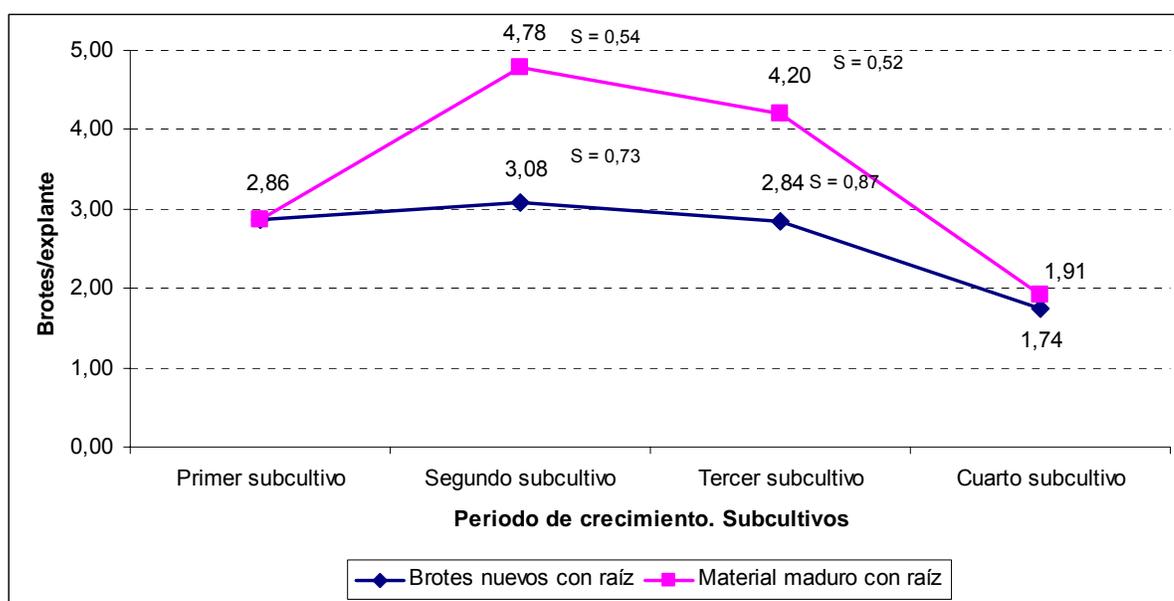


Figura 1. Promedio de brotes por explante obtenidos para cada subcultivo en los medios de cultivo MS líquidos. Los tres primeros subcultivos suplementados con 1 mg/L BAP, el cuarto subcultivo no contenía reguladores de crecimiento.

Así mismo, en la figura 2 (B), se pueden observar el desarrollo de raíces largas y bien formadas, esto se debe posiblemente a que las microestacas al sembrarse en los medios líquidos ya presentaban dicha estructura. Griridhar *et al.* (2001) observaron que al sembrarse microestacas de vainilla en presencia de una citoquinina las mismas presentan un crecimiento lento de raíces. Así mismo, George *et al.* (2008) mencionan que al utilizar altas concentraciones de citoquininas (0,5 mg/L – 10 mg/L) estas generalmente pueden inhibir, retrasar y/o prevenir la formación y el crecimiento de las raíces.

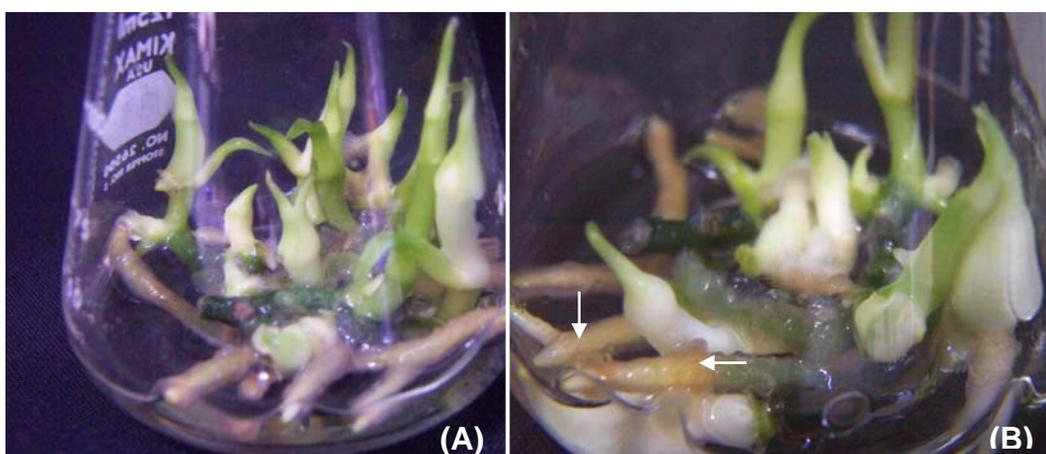


Figura 2. Crecimiento de microestacas con raíces del primer subcultivo después de dos meses en medio líquido MS + 1mg/L BAP, en oscuridad. La flecha señala raíces desarrolladas.

Para el segundo subcultivo se agruparon los explantes de vainilla de acuerdo a su procedencia, esto se hizo para evaluar cuál es la mejor metodología para la propagación y generación de raíces al realizar una serie de subcultivos. En la figura 3 se pueden diferenciar el origen de los materiales de acuerdo al tipo de explante utilizado, es así como en la figura 3 (A) se muestra el tipo de explante “material maduro con raíz” el cuál se caracteriza por ser la microestaca que generó el brote, y en la figura 3 (B) se muestra el tipo de explante “brotes nuevos con raíz”, al ser un brote nuevo que se genera en condiciones de oscuridad este tiende a ser etiolado y presenta una ligera elongación de su tallo y hojas. Las

condiciones de crecimiento para cada tipo de explante fueron las mismas, en medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP en oscuridad.

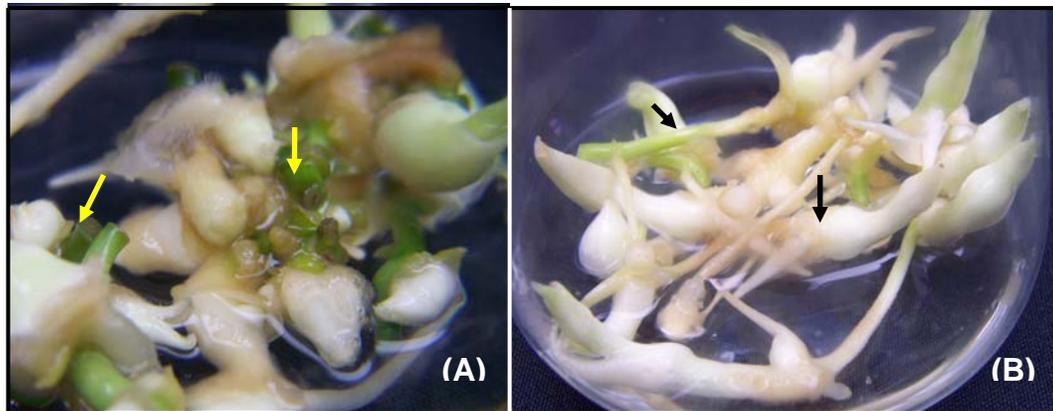


Figura 3. (A) Explante “material maduro con raíz”, (B) Explante “brote nuevo con raíz”. Las flechas señalan el explante.

En la figura 1 se observa un incremento en la generación de brotes por explante a los cuatro meses de 4,78 brotes por explante para el “material maduro con raíz”. Por el contrario al utilizar como explantes los “brotes nuevos con raíz” se obtuvieron 3,08 brotes por explante. Estos resultados podrían estar relacionados con lo mencionado por Styer y Chin (1983) quienes establecen que el estado fisiológico de la planta que da el explante (planta madre) influye significativamente en su capacidad morfogénica. Por ejemplo, se ha encontrado que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas con diferentes edades. Otra posible explicación para las diferencias en el número de brotes generados entre los explantes, se debe a que se empezaron a observar “raíces con pre-callo” en el explante “material maduro con raíz”. Como se puede apreciar en la figura 4 (B), en el tipo de explante “material maduro con raíz”, por lo general se obtuvieron “raíces con pre-callo” y se logró la diferenciación de las mismas. A diferencia de la figura 4 (A) donde se observa el desarrollo de una raíz normal. En la figura 4 (C1), se formaron brotes en algunas “raíces con pre-callo”, como también en la figura 4 (C2), donde se

aprecia el tallo con unos posibles pelos radicales, suponiendo la diferenciación de la “raíces con pre-callos”.

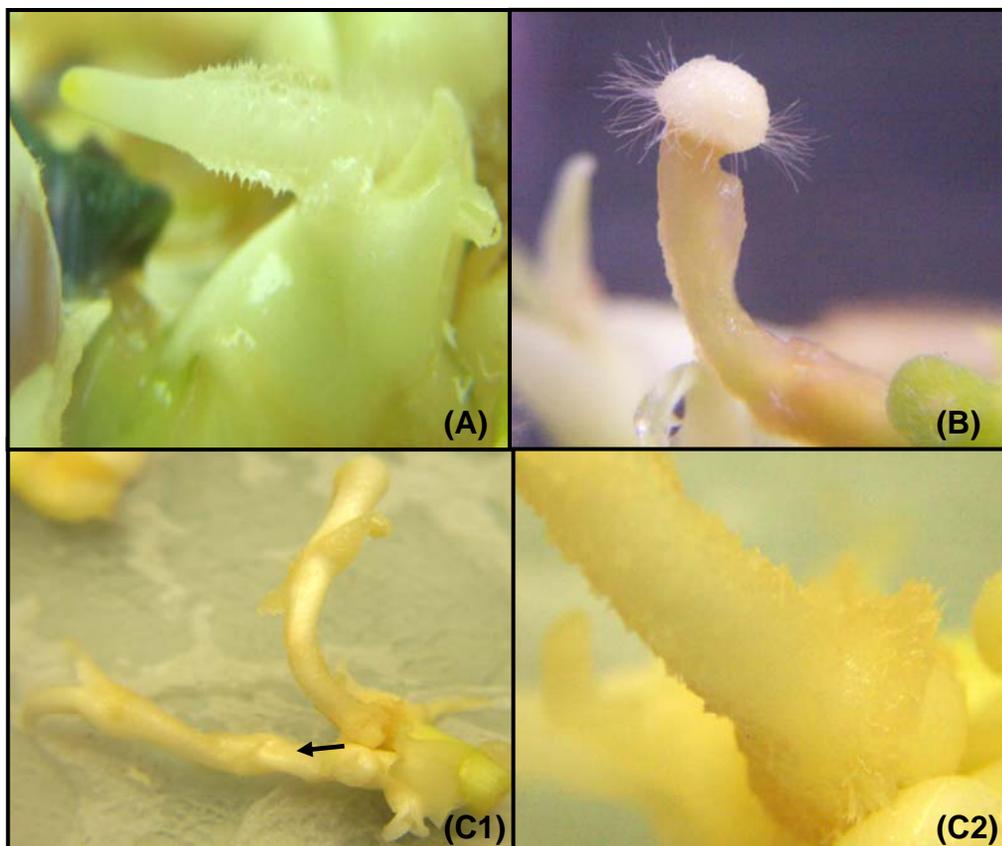


Figura 4. *Vanilla planifolia* en crecimiento, segundo subcultivo con MS + 1mg/L BAP. **(A)** Raíz mostrando crecimiento normal, **(B)** raíz mostrando la presencia de estructura “pre-callos”, **(C1)** explante “material maduro con raíz” con un brote normal, la flecha marca una “raíz con pre-callos” ya diferenciada, **(C2)** ampliación del tallo de la “raíz con pre-callos” diferenciada.

Bertel y Eliasson (1991) investigaron el efecto de citoquininas exógenas en plantas de guisante sobre el crecimiento de la raíz, la Benzylaminopurina (BAP) agregada a la solución de crecimiento inhibió el alargamiento y la formación de raíces laterales y estimuló el abultamiento de las extremidades de la raíz. Este abultamiento en las raíces se pudo haber generado por la relación auxina/citoquinina. Philip y Padikkala (1989) determinaron que el meristemo de raíz de *Vanilla planifolia* sembrado en un medio de cultivo *in vitro*, en el cuál

ocurrió la transformación del meristemo de raíz a brote, mostró un alto nivel de Ácido Indol Acético (AIA). Por lo que la cantidad de auxina presente en la raíz ya formada, más la citoquinina exógena presente en el medio de cultivo, propicia de acuerdo a lo mencionado por Chawla (2002), que al aumentar la concentración de citoquininas se favorece a la proliferación celular, el cuál tiene como resultado la formación de callo o PLB, en el caso concreto de los explantes “material maduro con raíz” de vainilla que poseían “raíz con pre-callos”, proceso que posteriormente conduce a la formación de brotes.

Durante los dos primeros subcultivos (primer y segundo subcultivo) realizados en medios líquidos MS suplementados con 1 mg/L de BAP en condiciones de oscuridad, se observó una multiplicación de brotes, generando por lo tanto una respuesta positiva de los explantes en términos de producción de brotes en el medio de cultivo líquido con agitación. Esto contradice lo mencionado por González (2003) en los primeros dos subcultivos, este autor indica que a mayor frecuencia de inmersión de los explantes de vainilla por la técnica de propagación en RITA[®], los tejidos sufren un nivel de estrés que afecta la respuesta del explante, por lo que a seis periodos de inmersión se generaron pocos brotes (promedio de 2 brotes por explante), pero durante el tercer y cuarto subcultivo si coincide ya que la cantidad de brotes por explante disminuye.

Al observar los resultados del tercer subcultivo, la cantidad de brotes por explante decae en el “material maduro con raíz” y en los “brotes nuevos con raíz” a 4,20 y 2,84 brotes por explante respectivamente, en comparación al subcultivo anterior de 4,78 brotes por explante para el “material maduro con raíz” y 3,08 brotes por explante para “brotes nuevos con raíz” (ver Figura 1). Una posible explicación a esta disminución surge al considerar lo mencionado por Mehrotra *et al.* (2007), quienes explican que una desventaja de la propagación de materiales en medios de cultivo líquido durante el proceso de multiplicación, es el síndrome de la hiperhidricidad, el cuál puede causar pérdidas en la multiplicación.

Una alternativa para evitar que se presente la hiperhidricidad en los explantes, fue planteada por Hvoslef-Eide y Preil (2005), estos autores recomiendan el uso del medio líquido solamente como una parte del esquema de propagación, alternado con una fase sólida para reducir este problema.

Para el cuarto subcultivo se observa un descenso pronunciado en la producción de brotes para los explantes del “material maduro con raíz” y “brotes nuevos con raíz”, 1,91 y 1,74 brotes/explante respectivamente (ver figura 1). Esto se debe a que en el cuarto subcultivo se decidió eliminar el regulador de crecimiento en un medio de cultivo MS básico adicionado con 1 g/L de Caseína Hidrolizada (CH), lo cuál evidencia que el uso del BAP a una concentración de 1 mg/L propicia en gran medida la formación de brotes, por lo que se puede considerar como una fase de propagación para posteriores trabajos. La intención de realizar el cuarto subcultivo sin regulador de crecimiento, fue propiciar la formación de raíces en los explantes de vainilla, ya sean para los “brotes nuevos con raíz” y material “maduro con raíz”, lo cuál se mencionará más adelante.

En trabajos realizados anteriormente con vainilla *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos, se logró un mayor crecimiento de esta especie en medios líquidos en agitación, para lo cuál se utilizó un agitador de movimiento orbital, el cuál permite al parecer una aireación adecuada de los explantes, con la intención de obtener e incrementar el número de raíces obtenidas por microestacas (Palma 2007). Según lo mencionado por Mehrotra *et al.* (2007) el crecimiento y la tasa de multiplicación de brotes y raíces en medios líquidos se incrementa por la aireación, debido a que el movimiento continuo del medio proporciona el suficiente suministro de oxígeno al tejido, lo cuál lleva en última instancia a un crecimiento más rápido.

En la figura 5 se muestra que los valores promedio para el número de raíces formadas por explante disminuye paulatinamente a partir del primer,

segundo y tercer subcultivo, a diferencia del cuarto subcultivo en el cuál se observa un aumento en la producción de raíces. Lo anterior se puede explicar al tener en cuenta que los tres primeros subcultivos contaban con la presencia de BAP en el medio de cultivo lo cuál ejerció una acción inhibitoria en la formación de raíces (George *et al.*, 2008), mientras que en el cuarto subcultivo se suprimió dicho regulador de crecimiento.

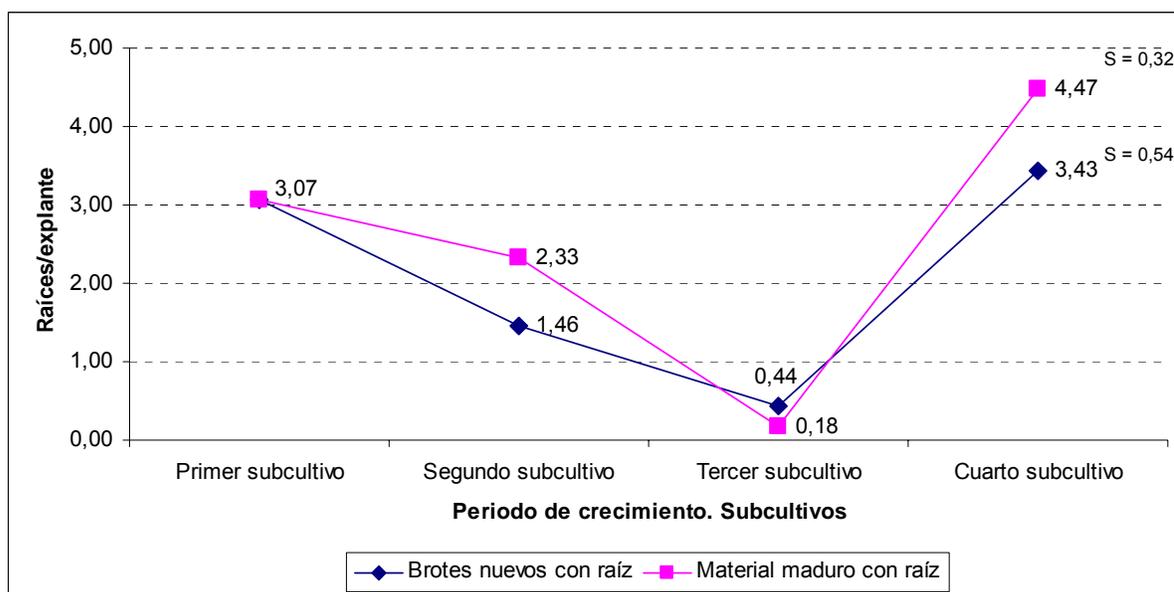


Figura 5. Promedio de raíces por explante obtenidos para cada subcultivo. El periodo de crecimiento por cada subcultivo es de 2 meses. Los 3 primeros subcultivos con MS líquido suplementados con 1 mg/L BAP en oscuridad, el cuarto subcultivo sin regulador de crecimiento.

Al eliminar el BAP durante el cuarto subcultivo, se incrementó la cantidad de raíces para los explantes de “material maduro con raíz” y “brotos nuevos con raíz”, 4,47 y 3,43 raíces por explante respectivamente. Autores como George *et al.*, (2008) mencionan que en ocasiones más de un subcultivo en un medio libre de citoquininas puede ser necesario para que se de la generación de raíces.

Giridhar *et al.*, (2001) observaron que los cultivos de brotes *in vitro* de *Vanilla planifolia*, que crecieron en el medio sólido MS suplementado con 2 mg/L

de la auxina Ácido 3-Indol Butírico (AIB) produjeron 3,2 raíces por explante. En otro estudio realizado con Vainilla *in vitro*, la mayor cantidad de raíces por brote que obtuvieron George y Ravishankar (1997) fue de 3,6 raíces por explante, en un medio de cultivo sólido con la mitad de las sales de un MS suplementado con 2% de carbón activado.

Con los datos presentados anteriormente, al sacar el regulador de crecimiento del sistema en el cuarto subcultivo, se logró producir una mayor cantidad de raíces. Mehrotra *et al.* (2007) determinan que al estar en contacto cercano los explantes con el medio líquido, este puede estimular y facilitar la absorción de nutrientes para mejorar el crecimiento de las raíces.

De acuerdo a las figuras 1 y 5, el número de raíces por explante va disminuyendo paulatinamente a partir del segundo y tercer subcultivo, mientras que se incrementa el número de brotes por explante, efecto que sin embargo disminuye drásticamente en el cuarto subcultivo al eliminar el BAP.

Al colocar las estacas con raíces o bien los meristemos radicales en un medio de cultivo MS líquido suplementado con 1 mg/L BAP y 1 mg/L de caseína hidrolizada, bajo condiciones de agitación y en oscuridad, se obtuvo un 100% en la formación de pre-callos a partir de los meristemos radicales de vainilla. En figura 6, se observa la formación de las raíces con pre-callos se presentó entre el primer y segundo subcultivo (Figuras A1 y A2). Posteriormente, a partir de la formación de estas estructuras y para favorecer la multiplicación y regeneración de las plantas, se cambiaron las condiciones de crecimiento a un medio líquido MS sin regulador de crecimiento y con 1 g/L de caseína hidrolizada bajo condiciones de luz en un agitador orbital. En la figura 6 (B1 y B2) se observa la formación de una gran cantidad brotes a partir de los pre-callos de *Vanilla planifolia* generados a su vez a partir de los meristemos de la raíz.

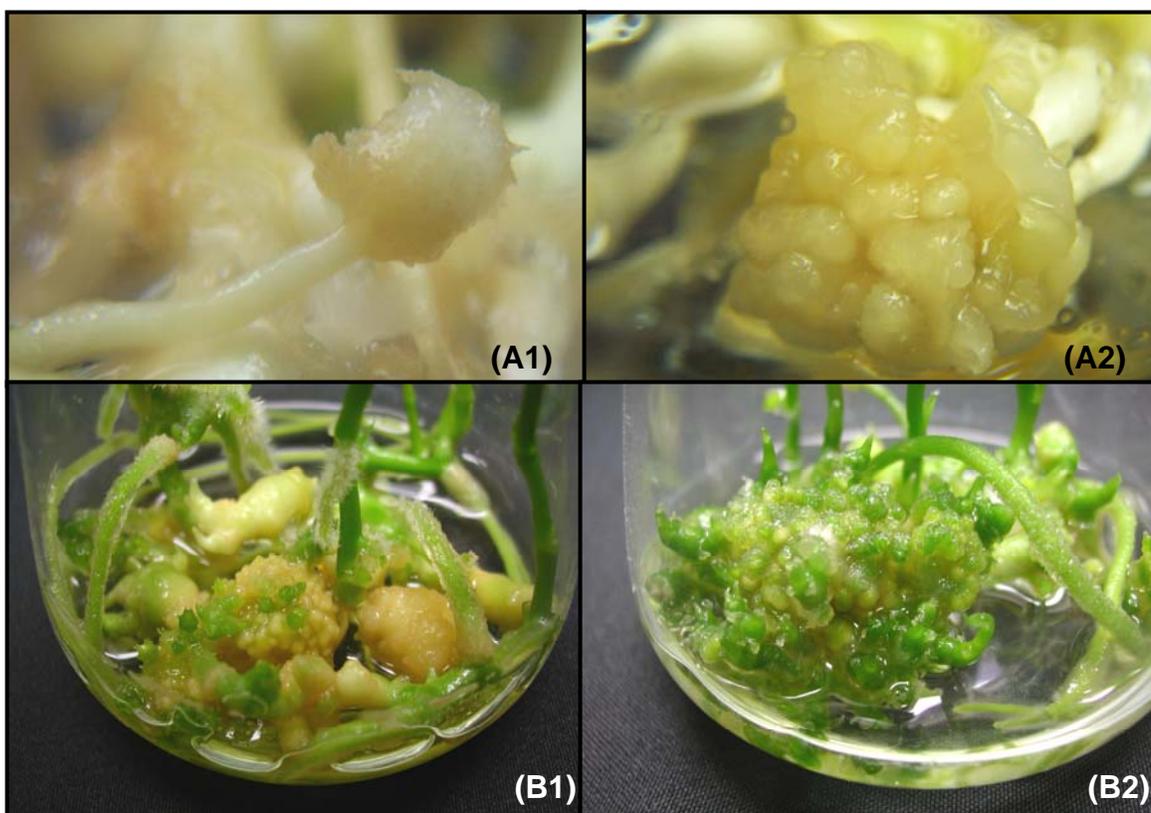


Figura 6. Formación y generación de múltiples brotes a partir de una raíz con pre-callo. **(A1 y A2)** en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP en oscuridad, **(B1 y B2)** en medio líquido MS sin regulador de crecimiento y con 1 g/L caseína hidrolizada en luz.

Las plántulas obtenidas a partir de los materiales de vainilla propagados fueron colocadas en un medio de cultivo MS sólido sin reguladores de crecimiento para su posterior aclimatación, lo cuál redujo a la mitad el tiempo de obtención de plántulas para aclimatar. Las plantas obtenidas a las seis semanas tenían entre 7 y 10 cm de altura, con tallos de 0,41 cm de diámetro en promedio, entre 3 y 4 hojas y con raíces bien formadas (Figura 7). Estas plántulas fueron cultivadas en un medio MS sólido sin reguladores de crecimiento y suplementado con 1 g/L de caseína hidrolizada. Según Alatorre (2002), durante una evaluación a las ocho semanas de diferentes explantes de vainilla cultivados en un medio MS sólido sin regulador de crecimiento y suplementado con 1g/L de CH, se observó una longitud de 0,9 cm en el brote al utilizar como explante el ápice del tallo vegetativo, en

tanto que al utilizar microestacas como explante obtuvo 0,27 cm de longitud del brote. Es importante indicar que bajo las condiciones de propagación y regeneración optimizados para *V. planifolia* en este trabajo de investigación, la obtención de plántulas para la aclimatación fue de aproximadamente seis semanas, lo cual redujo a la mitad el tiempo necesario para la obtención de plántulas para aclimatar, en comparación con la metodología tradicional de multiplicación en medio sólido. Estos resultados permiten la utilización de esta metodología como un medio para la propagación masiva de plantas de vainilla.



Figura 7. Plántulas listas para aclimatar provenientes de propagación en medio líquido. Duración de crecimiento de 6 semanas en medio MS sólido sin regulador de crecimiento con 1 g/L de caseína hidrolizada.

4.2. Efecto del fotoperíodo, la consistencia del medio de cultivo y dos reguladores de crecimiento en la formación de pre-callos de vainilla (*Vanilla planifolia*).

Se definió como “pre-callos” a la formación de un abultamiento que se generó a partir de los meristemas radicales de vainilla que fueron expuestos a

diferentes reguladores de crecimiento 2,4-D en distintas concentraciones (0,5 mg/L, 1 mg/L y 1,5 mg/L) y BAP (1 mg/L), tanto en medio líquido como en medio sólido, y en presencia o ausencia de luz, esta estructura es transitoria, ya que a partir de esta, al modificar sus condiciones de crecimiento pueden generar dos vías, como PLB's o como callos protocórmicos. Philip y Nainar (1988) constataron que al sembrar meristemas de raíz de vainilla en medio líquido MS suplementado con 2 mg/L de Ácido Indole Acético (AIA) y 0,2 mg/L de Kinetina (KIN) durante un periodo de 30 días, se generó la desintegración de la caliptra y el número de células en la región del centro quiescente se incrementa considerablemente resultando en un ensanchamiento en el área del ápice, con un aspecto semiesférico en general.

De los “pre-callos” de vainilla generados, se observó que existe una diversidad morfológica en las estructuras formadas. Para poder describir más adelante el tipo de “pre-callos” utilizado para la inducción de “callos protocórmicos”, se agruparon los mismos en 9 tipos con las mismas características morfológicas descriptivas para cada uno (ver Figura 8).

En la figura 8, se diferenciaron cuatro tipos de pre-callos que crecieron en medio MS sólido. Las características del “pre-callos tipo 1” cuyas condiciones de crecimiento fueron en medio MS sólido con 1 g/L de caseína hidrolizada (CH) en luz para el regulador de crecimiento 2,4-D en las distintas concentraciones de 0,5 mg/L con un 93% de formación de la estructura, 1 mg/L con 98% de formación y 1,5 mg/L con un 95% de formación del “pre-callos tipo 1”, presentaron en forma general un abultamiento en el meristemo radical, con un pequeña masa traslúcida por debajo del abultamiento y con presencia de pelos radicales (se consideran que son pelos radicales por la procedencia del explante, el cuál proviene de terminales de raíz de *Vanilla planifolia in vitro*). Este mismo “pre-callos tipo 1” en luz muestra una ligera coloración amarillenta y en oscuridad por lo general es blanquecino. Las condiciones de crecimiento del “pre-callos tipo 2” se generó en medio MS sólido con el regulador de crecimiento BAP (1 mg/L) y 1 g/L de CH en oscuridad con un

20% de formación, este tipo de pre-callos presenta un abultamiento semiesférico irregular en el meristemo radical, con una coloración blanca traslúcida y con abundantes pelos radicales. El “pre-callos tipo 3” con un 70% de formación de esta estructura, se desarrolló en condiciones de crecimiento en medio MS sólido con el regulador de crecimiento BAP (1 mg/L) y 1 g/L de CH en luz, y se caracteriza por presentar un abultamiento semiesférico homogéneo del meristemo radical con una coloración blanco-cremosa, con presencia abundante de pelos radicales. El “pre-callos tipo 4” se formó en medio MS sólido con el regulador de crecimiento BAP (1 mg/L) y 1 g/L de CH en oscuridad con un 52% de formación. Esta estructura presenta un abultamiento semiesférico homogéneo del meristemo radical de color blanco y con una ligera presencia de pelos radicales en la base del abultamiento.

En la misma figura 8 se identificaron cinco tipos de “pre-callos” que crecieron en medio líquido. Las condiciones de crecimiento del “pre-callos tipo 5” se dieron en medio MS líquido con 1 g/L de CH en luz con el regulador de crecimiento 2,4-D en las distintas concentraciones de 0,5 mg/L con un 78% de formación de estas estructura, 1 mg/L en un 85% de formación y 1,5 mg/L con un 70% de “pre-callos tipo 5”, en este caso el pre-callos presenta un abultamiento semiesférico aplanado compacto de coloración amarillenta sin presencia de pelos radicales. El “pre-callos tipo 6” bajo condiciones de crecimiento en medio MS líquido con 1 g/L de CH en oscuridad con el regulador de crecimiento 2,4-D en las diferentes dosis de 0,5 mg/L se obtuvo un 85% de formación del “pre-callos tipo 6”, con 1 mg/L se obtuvo un 70% de formación y para 1,5 mg/L se generó un 100% de formación, esta estructura presenta un abultamiento aplanado irregular del meristemo radical de color blanquecino, y no cuenta con la presencia de pelos radicales. El “pre-callos tipo 7” en condiciones de crecimiento en medio MS líquido con el regulador de crecimiento BAP a 1 mg/L y 1 g/L de CH en luz, con 70% de formación de esta estructura, se caracteriza por un abultamiento semiesférico aplanado de color blanquecino, no presenta pelos radicales y el resto de raíz es de color verde. El “pre-callos tipo 8” con un 28% de formación de esta estructura la cuál se desarrollo en medio MS líquido con el regulador de crecimiento BAP (1 mg/L), 1 g/L de CH y

en presencia de luz, este presenta un abultamiento semiesférico homogéneo de color blanquecino sin la presencia de pelos radicales y el resto de raíz de color verde. Por último, el “pre-callo tipo 9” con un 90 % de formación de esta estructura se caracteriza por la presencia de un abultamiento semiesférico homogéneo de color blanco y sin presencia de pelos radicales, este pre-callo se desarrolló bajo condiciones de crecimiento en medio MS líquido con el regulador de crecimiento BAP (1 mg/L) y en oscuridad.

Trabajos preliminares en vainilla *in vitro* generaron porcentajes de formación muy bajos de una estructura similar a un “pre-callo” descrito en este trabajo, según lo indica González (2003), quien obtuvo un 15% de formación de callo en el sistema de inmersión temporal RITA[®] con dos inmersiones diarias, también obtuvo un 80% de formación para cuatro inmersiones diarias y no se obtuvo ningún resultado al realizar seis inmersiones diarias. A diferencia de lo anterior y como se puede observar en la figura 8, en el presente trabajo los porcentajes obtenidos para la formación de estructura de “pre-callo” de meristemas radicales son mayores, alcanzando hasta un 100% de formación en el tratamiento de 1,5 mg/L de 2,4-D en medio líquido y bajo condiciones de luz.

Al considerar las características para el “pre-callo tipo 9” descritas en la figura 8, este reúne las condiciones adecuadas al ser de gran tamaño en comparación a los demás, es un tipo de “pre-callo” indiferenciado, de crecimiento homogéneo y sin presencia de pelos radicales, así mismo este “pre-callo tipo 9” se desarrolló bajo las condiciones de crecimiento en medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1g/L de CH en oscuridad, el cuál presenta un 90 % de formación del “pre-callo”.

Clasificación morfológica y porcentaje de Pre-callos <i>Vanilla planifolia</i>							
Pre-callo	Medio sólido			Pre-callo	Medio líquido		
Tipo 1	Luz			Tipo 5	Luz		
	0,5 mg/L 2,4-D 93%	1 mg/L 2,4-D 98%	1,5 mg/L 2,4-D 95%		0,5 mg/L 2,4-D 78%	1 mg/L 2,4-D 85%	1,5 mg/L 2,4-D 70%
	Oscuridad				Oscuridad		
0,5 mg/L 2,4-D 90%	1 mg/L 2,4-D 98%	1,5 mg/L 2,4-D 93%	0,5 mg/L 2,4-D 85%	1 mg/L 2,4-D 70%	1,5 mg/L 2,4-D 100%		
Tipo 2	Oscuridad			Tipo 7	Luz		
	BAP (1 mg/L) 20%				BAP (1 mg/L) 50%		
Tipo 3	Luz			Tipo 8	Luz		
	BAP (1 mg/L) 70%				BAP (1 mg/L) 28%		
Tipo 4	Oscuridad			Tipo 9	Oscuridad		
	BAP (1 mg/L) 52%				BAP (1 mg/L) 90%		

Figura 8. Clasificación morfológica y porcentaje de formación de los diferentes tipos de “pre-callos” observados, considerando los componentes y condiciones físicas.

4.3. Efecto del fotoperíodo y dos reguladores de crecimiento sobre la formación de callos protocórmicos de vainilla a partir de “pre-callos tipo 9”.

En la figura 9 se pueden observar los diferentes callos protocórmicos formados al colocar los “pre-callos tipo 9” en los tratamientos indicados en el cuadro 2.

Los callos por lo general no son de un solo tipo. Hay tipos de callos que difieren en apariencia, color, grado de compactación y potencial morfogénico. En ocasiones el tipo de callo obtenido, su grado de diferenciación celular y su capacidad de regeneración en nuevas plántulas, dependen del origen y la edad del tejido elegido como explante (George *et al.*, 2008). Debido a lo anterior y para efectos de este trabajo, se generó una tabla de clasificación fenotípica de los callos protocórmicos de vainilla (Figura 9). En esta figura se pueden apreciar las distintas clasificaciones de los callos protocórmicos que se observaron.

En las evaluaciones obtenidas para el tipo de callo protocórmico descritas anteriormente, en la prueba de 15 días de pretratamiento en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de caseína hidrolizada (CH) y para el periodo de evaluación de ocho semanas, no se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,3216$) en el porcentaje de formación de los callos protocórmicos entre los tratamientos, ver cuadro 3.

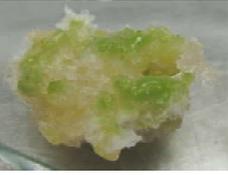
Características	Callos protocormicos <i>Vanilla planifolia</i>			
	Ningun crecimiento	Poco crecimiento	Mediano crecimiento	Mucho crecimiento
Tipo de crecimiento				
	Diferenciado		Poco diferenciado	Indiferenciado
Tipo de callo				
	Blanco cremoso	Cremoso	Verde claro	Verde
Color				
	Nada	Poco	Regular	Mucho
Presencia de pelos radicales				

Figura 9. Cuadro de clasificación fenotípica de callos protocórmicos de *Vanilla planifolia*. Evaluación realizada a las 8 semanas de crecimiento.

Cuadro 3. Cantidad y porcentaje de formación de los diferentes callos protocórmicos de vainilla obtenidos para la prueba con un pretratamiento previo de 15 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L Caseína hidrolizada. Periodo de evaluación 8 semanas de crecimiento.

Tratamiento	Tipo crecimiento	Presencia de pelos radicales	Cantidad	Porcentaje de formación*
0,5 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Bueno	Con	3	10%
	Regular	Con	6	20%
	Regular	Sin	1	3%
	Total			33% a
1 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Con	4	13%
	Regular	Sin	3	10%
	Bueno	Sin	1	3%
	Total			26% a
1,5 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Sin	4	13%
	Bueno	Sin	3	10%
	Total			23% a
3 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Bueno	Sin	1	3%
	Total			3% a

*Prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Se aplicó un análisis de varianza a los tratamientos indicados en el cuadro 3, para evaluar el crecimiento en función del volumen del callo protocórmico y determinar si hay diferencias significativas entre los reguladores de crecimiento evaluados, dado que el fotoperíodo es el mismo. El análisis de varianza aplicado (ver anexo 2) muestra que hay diferencias significativas con respecto al factor de regulador de crecimiento ($p=0,0053$). De este modo, se puede observar a partir del cuadro 4, que el tratamiento que muestra un mayor promedio de volumen de 0,12 ml, es el tratamiento de 0,5 mg/L de 2,4-D en oscuridad.

Cuadro 4. Volumen promedio de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos a partir de los tratamientos para la prueba con un pretratamiento previo de 15 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L Caseína hidrolizada. Periodo de evaluación ocho semanas de crecimiento.

Tratamiento	Promedio (ml)*
0,5 mg/L 2,4-D en oscuridad	0,12 b
1 mg/L 2,4-D en oscuridad	0,07 a
1,5 mg/L 2,4-D en oscuridad	0,07 a
3 mg/L 2,4-D en oscuridad	0,07 a

*Prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

En la prueba de 15 días de pretratamiento en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP y con 1 g/L de CH, para el periodo de evaluación de 16 semanas, se puede observar a partir del cuadro 5 el aumento de los porcentajes de formación de callos protocórmicos. Se pueden mencionar así dos tratamientos con los mayores porcentajes de formación, el tratamiento que presenta el mayor porcentaje fue el de 0,5 mg/L de 2,4-D en condiciones en oscuridad, con un 67% de formación de callos protocórmicos. Para el tratamiento de 1 mg/L de 2,4-D en oscuridad se obtuvo un 47% de formación de callos protocórmicos. Al aplicar el análisis de varianza para el porcentaje de formación de callos protocórmicos (anexo 3), se determinó que no hay diferencias significativas en la interacción de los factores Regulador de crecimiento y Fotoperíodo ($p=0,9021$), pero si se observaron diferencias significativas en el factor de fotoperíodo ($p=0,003$), proporcionándole mayor valor a los tratamientos que crecieron en oscuridad.

Cuadro 5. Cantidad y porcentaje de formación de los diferentes callos protocórmicos de vainilla obtenidos con un pretratamiento previo de 15 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada en oscuridad. Periodo de evaluación a las 16 semanas de crecimiento.

Tratamiento	Tipo crecimiento	Presencia de pelos radicales	Cantidad	Porcentaje de formación*
0,5 mg/L 2,4-D - Luz	Regular	Sin	9	30%
	Bueno	Sin	2	7%
	Total			37% a
0,5 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Sin	14	47%
	Bueno	Sin	6	20%
	Total			67% b
1 mg/L 2,4-D - Luz	Regular	Sin	4	13%
	Total			13% a
1 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Sin	11	37%
	Bueno	Sin	3	10%
	Total			47% b
1,5 mg/L 2,4-D - Luz	Regular	Sin	3	10%
	Total			10% a
1,5 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Sin	6	20%
	Bueno	Sin	4	13%
	Total			33% b
3 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Sin	5	17%
	Total			17% a
1 mg/L BAP - Oscuridad	Bueno	Sin	8	27%
	Bueno	Con	3	10%
	Total			37% b

*Prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Por otra parte, al evaluar el volumen generado por los callos protocórmicos se obtuvieron diferencias significativas para el factor regulador de crecimiento ($p < 0,0001$). El mayor volumen promedio obtenido fue de 0,25 ml para el tratamiento de 1 mg/L de BAP, no obstante este no formó la mayor cantidad de callos de tipo protocórmicos (37%) en comparación al tratamiento de 0,5 mg/L de 2,4-D en oscuridad con un 67% de formación, considerado como el más adecuado para realizar las pruebas de transformación genética. También el tratamiento con

0,5 mg/L de 2,4-D en oscuridad muestra diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, con un volumen promedio de 0,14 ml y un porcentaje de formación de callos protocórmicos de un 67% (Cuadro 6).

Cuadro 6. Volumen promedio de los tratamientos para la formación de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos para la prueba con un pretratamiento previo de 15 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L Caseína hidrolizada. Periodo de evaluación 16 semanas de crecimiento.

Regulador Crecimiento	Promedio (ml)*
0,5 mg/L 2,4-D	0,14 b
1 mg/L 2,4-D	0,09 a
1,5 mg/L 2,4-D	0,09 a
3 mg/L 2,4-D	0,08 a
1 mg/L BAP	0,25 c

*Prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Al evaluar el porcentaje de formación de los callos protocórmicos de vainilla a la octava semana de crecimiento, para la prueba de 30 días de tratamiento previo del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L de BAP y con 1 g/L de caseína hidrolizada (Cuadro 7), no se observaron diferencias significativas entre la interacción de los factores regulador crecimiento y el factor fotoperíodo ($p=0,4622$), pero si se presentaron diferencias significativas entre los reguladores de crecimiento ($p=0,036$), de estos datos se puede resaltar el tratamiento de 3 mg/L de 2,4-D en luz y oscuridad con un 60% y un 80% de formación respectivamente.

Cuadro 7. Cantidad y porcentaje de formación de los diferentes callos protocórmicos de vainilla obtenidos en los diferentes tratamientos, con un pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada. Para un periodo de evaluación de 8 semanas de crecimiento.

Tratamiento	Tipo crecimiento	Presencia de pelos radicales	Cantidad	Porcentaje de formación*
0,5 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Sin	1	4%
	Bueno	Sin	4	16%
	Bueno	Con	4	16%
	Total			36% b
1 mg/L 2,4-D - Luz	Regular	Con	1	4%
	Regular	Sin	2	8%
	Bueno	Con	10	40%
	Bueno	Sin	3	12%
	Total			64% b
1 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Sin	7	28%
	Bueno	Con	6	24%
	Bueno	Sin	1	4%
	Total			56% b
1,5 mg/L 2,4-D - Luz	Regular	Sin	4	16%
	Regular	Con	3	12%
	Bueno	Sin	2	8%
	Bueno	Con	5	20%
	Total			56% b
1,5 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Con	1	4%
	Regular	Sin	3	12%
	Bueno	Sin	5	20%
	Bueno	Con	1	4%
	Total			40% b
3 mg/L 2,4-D - Luz	Regular	Sin	6	24%
	Regular	Con	1	4%
	Bueno	Con	5	20%
	Bueno	Sin	3	12%
	Total			60% c
3 mg/L 2,4-D - Oscuridad	Regular	Sin	3	12%
	Regular	Con	6	24%
	Bueno	Sin	4	16%
	Bueno	Con	7	28%
	Total			80% c
1 mg/L BAP - Oscuridad	Bueno	Con	3	12%
	Total			12% a

*Prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Al evaluar el volumen generado por los callos protocórmicos (Cuadro 8), se obtuvieron diferencias significativas en la interacción de los factores regulador de crecimiento y fotoperíodo ($p < 0,0017$), el cuál determinó que poseía mayor volumen de 0,43 ml para el tratamiento en medio MS sólido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1g/L de caseína hidrolizada en oscuridad, pero la cantidad de callos protocórmicos formados es sólo de un 12%. El promedio de volumen de los callos protocórmicos que también es significativo y que posee un volumen promedio de 0,24 ml es el tratamiento en medio MS sólido con 0,5 mg/L de 2,4-D y 1 g/L de CH en luz, este tratamiento presenta un 67 % de formación de callos protocórmicos.

Cuadro 8. Promedio del volumen de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos en los diferentes tratamientos experimentales para la prueba con un pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS + 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada. La evaluación se realizó a las 8 semanas de crecimiento.

Regulador Crecimiento	Condición Fotoperíodo	Promedio (ml)*
0,5 mg/L 2,4-D	Luz	0,24 b
0,5 mg/L 2,4-D	Oscuridad	0,24 b
1 mg/L 2,4-D	Luz	0,17 a
1 mg/L 2,4-D	Oscuridad	0,17 a
1,5 mg/L 2,4-D	Luz	0,17 a
1,5 mg/L 2,4-D	Oscuridad	0,19 a
3 mg/L 2,4-D	Luz	0,17 a
3 mg/L 2,4-D	Oscuridad	0,17 a
1 mg/L BAP	Oscuridad	0,43 c

*Prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

El porcentaje de formación de callos protocórmicos en los tratamientos experimentales mostrados en el cuadro 9, con un pretratamiento de 30 días en medio MS líquido con 1 mg/L de BAP y con 1 g/L de caseína hidrolizada en oscuridad, no mostró diferencias significativas en la interacción de los factores ($p = 0,674$), ni al evaluar los factores regulador crecimiento y fotoperíodo de forma separada ($p = 0,5998$ y $p = 0,5026$, respectivamente). Esta evaluación se realizó a las 16 semanas del establecimiento de los cultivos originales, por lo que el

porcentaje de formación de los callos protocórmicos formados en los diferentes tratamientos no mostró diferencias significativas.

Cuadro 9. Cantidad y porcentaje de formación de los diferentes callos protocórmicos de vainilla obtenidos en los tratamientos experimentales para la prueba con un pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en un medio líquido MS suplementado con 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada en condiciones de oscuridad. La evaluación se realizó a las 16 semanas de crecimiento.

Tratamiento	Tipo crecimiento	Presencia de pelos radicales	Cantidad	Porcentaje de formación*
0,5 mg/L 2,4-D – Luz	Regular	Sin	7	28%
	Bueno	Sin	5	20%
	Total			48% a
0,5 mg/L 2,4-D – Oscuridad	Regular	Sin	7	28%
	Bueno	Con	1	4%
	Bueno	Sin	10	40%
	Total			72% a
1 mg/L 2,4-D – Luz	Regular	Sin	5	20%
	Bueno	Sin	6	24%
	Bueno	Con	4	16%
	Total			60% a
1 mg/L 2,4-D – Oscuridad	Regular	Sin	5	20%
	Bueno	Sin	8	32%
	Bueno	Con	2	8%
	Total			60% a
1,5 mg/L 2,4-D – Luz	Regular	Sin	2	8%
	Bueno	Sin	6	24%
	Total			32% a
1,5 mg/L 2,4-D – Oscuridad	Regular	Sin	5	20%
	Bueno	Sin	8	32%
	Total			52% a
3 mg/L 2,4-D – Luz	Regular	Sin	6	24%
	Bueno	Sin	7	28%
	Bueno	Con	3	12%
	Total			64% a
3 mg/L 2,4-D – Oscuridad	Regular	Sin	6	24%
	Bueno	Sin	7	28%
	Total			52% a
1 mg/L BAP – Oscuridad	Regular	Sin	3	12%
	Bueno	Sin	6	24%
	Total			36% a

El volumen promedio los callos protocórmicos obtenido en los diferentes tratamientos aplicados no mostró diferencias significativas al aplicar el análisis de varianza ($p < 0,0001$), el tratamiento que presentó el mayor volumen se obtuvo en un medio MS sólido suplementado con 0,5 mg/L de 2,4-D y 1 g/L de caseína hidrolizada, bajo condiciones de oscuridad. El volumen promedio para este tratamiento fue de 0,57 ml (ver cuadro 10), también a partir de los resultados mostrados en este cuadro se observa que el tratamiento en medio MS sólido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de caseína hidrolizada en oscuridad, tiene un volumen promedio de 0,50 ml.

Cuadro 10. Volumen promedio de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos en los tratamientos evaluados, para la prueba con un pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en medio líquido MS suplementado con 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada. La evaluación se realizó a las 16 semanas de crecimiento.

Regulador Crecimiento	Condición Fotoperíodo	Promedio (ml)*
0,5 mg/L 2,4-D	Luz	0,31 b
0,5 mg/L 2,4-D	Oscuridad	0,57 e
1 mg/L 2,4-D	Luz	0,2 a
1 mg/L 2,4-D	Oscuridad	0,2 a
1,5 mg/L 2,4-D	Luz	0,19 a
1,5 mg/L 2,4-D	Oscuridad	0,29 b
3 mg/L 2,4-D	Luz	0,41 c
3 mg/L 2,4-D	Oscuridad	0,18 a
1 mg/L BAP	Oscuridad	0,5 d

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

4.4. Determinación del fenotipo del callo protocórmico de vainilla para realizar la transformación genética.

A partir de los resultados obtenidos y tomando en consideración las imágenes de la figura 9, se determinó que los callos protocórmicos más adecuados como material biológico para realizar la transformación genética en *Vanilla planifolia* son aquellos que presentan las características de crecimiento

regular y mediano, con el tipo de callo indiferenciado homogéneo y compacto. Otras características como color y presencia de pelos radicales se consideraron menos relevantes, debido a que se observó que al transcurrir el tiempo de cultivo (para las evaluaciones de la semana 16), los que presentaban alguna coloración blanco cremoso y verde claro, llegan a cambiar en su mayoría a un color cremoso y la cantidad de pelos radicales por otra parte disminuye. Se consideran que debido a que el explante proviene de los meristemas radicales de vainilla, las prolongaciones observadas corresponden probablemente a pelos radicales, no obstante es necesario realizar estudios histológicos de estas estructuras para constatar esta hipótesis. Por lo anterior, en la figura 10 se muestran algunos ejemplos de callos protocórmicos que se consideran los más adecuados como material biológico para realizar la transformación genética de *Vanilla planifolia*.



Figura 10. Ejemplos de callos protocórmicos que se consideran los más adecuados como material biológico para realizar la transformación genética de *Vanilla planifolia*, obtenidos en la semana 8 y 16 de cultivo.

4.5. Determinación de la persistencia y desarrollo de los callos protocórmicos de vainilla obtenidos a partir de los pre-callos.

Al observar los resultados planteados en las secciones anteriores, se puede determinar que los callos protocórmicos que se formaron en los diversos tratamientos llegaron a persistir durante un periodo de 16 semanas. Cabe resaltar que de los pretratamientos realizados el que tuvo los mayores porcentajes de formación fue el pretratamiento previo de 30 días del “pre-callos tipo 9” en un medio líquido MS suplementado con 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada en condiciones de oscuridad, en comparación a los del pretratamiento previo de 14 días del “pre-callos tipo 9” en un medio líquido MS suplementado con 1 mg/L BAP + 1 g/L caseína hidrolizada en condiciones de oscuridad.

Al observar los datos obtenidos de presencia de pelos radicales durante las evaluaciones entre la semana 8 y la semana 16, se observó una disminución de estos al persistir los callos protocórmicos en el tiempo, del cuál se presentaban mayor cantidad de callos protocórmicos con presencia de pelos radicales durante las primeras 8 semanas, los mismos al paso del tiempo llegan a no presentar los pelos radicales en casi todos los tratamientos en la evaluación de 16 semanas.

5. CONCLUSIONES

En base a las condiciones generadas en que se realizo este trabajo se concluye que:

1. Se determinó que el medio de micropropagación más apropiado para *Vanilla planifolia* es el medio de cultivo MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP en oscuridad y en agitación.
2. Para la producción de raíces se determinó que el medio de cultivo más apropiado es el medio MS líquido suplementado con 1 g/L de caseína hidrolizada sin reguladores de crecimiento en oscuridad y con agitación.
3. El “pre-callo” más adecuado para la formación de callos protocórmicos es el que se determinó como “pre-callo tipo 9” en condiciones de crecimiento de medio de cultivo MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en oscuridad.
4. El medio de cultivo que permite la formación del callo protocórmico considerado como idóneo es el medio de cultivo MS sólido suplementado con 0,5 mg/L de 2,4-D y 1 g/L de CH en oscuridad.
5. El fenotipo apropiado de callo protocórmico que podría ser utilizado como material biológico para la transformación genética de vainilla es el que presenta una estructura indiferenciada de color cremosa y con poca cantidad de pelos radicales.

6. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda que para cada medio de cultivo que se trabaje con vainilla *in vitro* se suministre 1 g/L de caseína hidrolizada (CH), para generar vigor en la planta.
2. Es recomendable que los periodos entre subcultivos se recomienda que no se excedan de ocho semanas.
3. Se recomienda realizar un análisis histológico de las diferentes estructuras (pre-callos y callos protocórmicos) obtenidas durante la elaboración de este trabajo.
4. Con respecto a los diferentes tipos de “pre-callos” descritos, seria recomendable diagnosticar la inducción a callo protocórmico para los demás tipos de “pre-callos”.
5. Se recomienda cuantificar la cantidad de brotes generados a partir de las estructuras formadas para regeneración.

7. LITERATURA CITADA

1. 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.
2. Anandaraj, M; Rema, J; Sasikumar, B. 2001. Vanilla. Modern Graphics, Kochi. Calicut, Kerala. 10 p.
3. Bajaj, Y. S. 1994. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants VIII. Springer. Germany. 426 p.
4. Berger, R.G. 2007. Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Springer Berlin Heidelberg. 648 p.
5. Bertell, G. y Eliasson, L. 1991. Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum*. 84(2):255-261.
6. Bory, S; Grisoni, M; Duval, M.F.; Besse, P. 2008. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 55: 551-571.
7. Ceña, V; Jordán, J; Rozalén, J. 2003. Terapia génica. Vectores de expresión. *OFFARM*. 22(8): 102-108.
8. Chawla, H. S. 2002. Introduction to plant biotechnology. 2° edition. Science Publishers. New Hampshire, USA. 538 p.
9. Christou, P. y Yang, N. 1994. Particle bombardment technology for gene transfer. Oxford University Press. 15 p.

10. CNP (Consejo Nacional de Producción, CR) Dirección de Mercadeo y Agroindustria. 2003. Ficha Técnica de industrialización de Vainilla. San José, Costa Rica. 14 p.
11. Díaz, M; Zappacosta, D; Franzone, P; Rios, R. 1996. Biotecnología y mejoramiento vegetal. 214 p.
12. Divakaran, M; Pillai, G.S; Babu, KN; Peter, KV. 2008. Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. *Current Science*. 94(1): 115-120.
13. Dixon, R. A. y Gonzáles, R. A. 1994. *Plant cell culture: a practical approach*. Segunda Edición. Oxford University Press. Estados Unidos de America. 230 p.
14. Duval, M.F; Bory, S; Andrzejewski, S; Grisoni, M; Besse, P. Causse, S; Charon, C; Dron, M; Odoux, E; Wong, M. 2006. Diversité génétique des vanilliers Dans leurs zones de dispersión secondaire. *Les Acts du BRG*. 6: 181-196.
15. Geetha, S. y Shetty, A. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current Science*. 79(6): 886-889.
16. George, E. F; Hall, M. A; Geert-Jan De Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition: Volume 1. The Background*. Springer, Germany. 508 p.
17. George, P. S. y Ravishankar, G. A. 1997. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Reports*. 16: 490-494.

18. Giridhar, P; Obul, B; Ravishankar, G. A. 2001. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. Current Science. 81(9):1166-1170.
19. González, K. S. 2003. Respuesta de Tres Explantes de Vainilla (*Vanilla planifolia*) a Diferentes frecuencias de Inmersión Temporal. Informe práctica, Bachillerato. Cartago, CR. Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. 56 p.
20. Hamilton, C; Frary, A; Lewis, C; Tanksley, S. 1996. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 997-999.
21. Hvoslef--Eide, A. K. y Preil, W. 2005. Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer. Germany. 588 p.
22. ITC (International Trade Center). 2009. Spices Market News Service (MNS). Bulletin MNS issue August 2009. Geneva, Switzerland. 18 p.
23. Janarthnam, B. y Seshadri, S. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In vitro* cell. Dev. Biol.-Plant. 44:84-89.
24. Jefferson, RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. 5: 387-405.
25. Kalimuthu, K; Senthilkumar, R; Murugalatha, N. 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. – a tropical orchid. Current Science. 91(10): 1401-1403.

26. Konowicz, H. y Jarrick, J. 1984. *In Vitro* propagation of *Vanilla planifolia*. Hort. Sci. 19(1):58-59.
27. Malabadi, R.B. y Nataraja, K. 2007. Genetic Transformation of *Vanilla planifolia* by *Agrobacterium-tumefaciens* Using Shoot Tip Section. Research Journal of Botany. 2(2): 86-94.
28. Martínez, M; Cabrera, J; Herrera, L. 2004. Las Plantas Transgénicas: Una Visión Integral. e-Gnosis. 2(2): 1-28.
29. Mehrotra, S.; Goel, M. K; Kukreja, A. K; Mishra, B. N. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African Journal of Biotechnology. 6 (13): 1484-1492.
30. Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
31. Palma, M. 2007. Estudio Preliminar de los Parámetros Físicos para la Transformación Genética de Meristemas Radicales de Vainilla (*Vanilla planifolia*) por medio de Biobalística. Informe de práctica de especialidad, Bachillerato. Cartago, CR. Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. 59 p.
32. Philip, V.J. y Nainar S.A.Z. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. Journal of Plant Physiology. 122: 211-215.
33. Philip, V.J. y Nainar S.A.Z. 1988 a. *In vitro* transformation of meristems to shoot and plantlets in *Vanilla planifolia*. Ann. Bot. 61: 193 – 199.

34. Philip, V.J. y Padikkala, J. 1989. The role of indoleacetic acid in the conversión of root meristems to shoot meristems in *Vanilla planifolia*. Journal of Plant Physiology. 135: 233-236.
35. Salisbury, F. y Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica, S. A. de C. V. 4° edición. Estados Unidos. 756 p.
36. Sarma, Y.R. 2001. Vanilla. Agricultural Technology Information Centre. Indian Institute of Spices Research. Calicut, Kerala. Modern Graphics. 12 p.
37. Schlüter, P.M; Soto Arenas, M.A; Harris, S.A. 2007. Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae).Economic Botany. 61(4): 328–336.
38. Soto, M.A.1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chino AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J101. México D. F. 106 p.
39. Sreedhar, R. V; Roohie, K; Venkatachalam, L; Narayan, M. S; Bhagyalakshmi, N. 2007. Specific pre-treatments reduce curing period of vanilla (*Vanilla planifolia*) beans. Journal Agric Food Chem. 55: 2947–2955.
40. Sreedhar, R. V; Roohie, K; Venkatachalam, L; Neelwarne, B. 2009 Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia*). J Plant Growth Regul. 28:46–57.
41. Styer, D.J. y Chin, C. K. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. Horticultural Reviews. 5: 221-277.

42. USAID (Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional)/
Fundación Chemonics Colombia. 2003. Manual de fitoprotección y
análisis de plaguicidas: cultivo: Vainilla (*Vanilla planifolia*). Bogota,
Colombia. Chemonics Internacional. 22 p.
43. Vasil, I.K. 1994. Molecular improvement of cereals. *Plant Mol. Biol.* 25, 925-
937.
44. Watson, J; Gilman, M; Witkowski, J; Zoller, M. 1995. Recombinant DNA
Scientific American Books, second edition. New York. P: 273 - 292.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza generado de los callos protocórmicos ideales a partir del pretratamiento de 15 días en el medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en oscuridad, durante el periodo de evaluación de ocho semanas en los tratamientos de diferentes concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) en oscuridad.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3000	3	1000	1,24	0,3216
Regulador Crecimiento	3000	3	1000	1,24	0,3216
Error	16133,33	20	806,67		
Total	19133,33	23			

Anexo 2. Análisis de varianza generado de la medición de volumen a partir del pretratamiento de 15 días en el medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en oscuridad, durante el periodo de evaluación de ocho semanas en los tratamientos de diferentes concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) en oscuridad.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	3	3,50E-03	5,73	0,0053
Regulador Crecimiento	0,01	3	3,50E-03	5,73	0,0053
Error	0,01	20	6,00E-04		
Total	0,02	23			

Anexo 3. Análisis de varianza generado de los callos protocórmicos ideales a partir del pretratamiento de 15 días en el medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en oscuridad, con los periodos de evaluación de 16 semanas en los tratamientos de diferentes concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) y BAP (1mg/L) en luz y oscuridad.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15166,67	7	2166,67	2,88	0,0157
Regulador Crecimiento	7500	4	1875	2,49	0,0585
Condición Fotoperiodo	7511,11	1	7511,11	9,97	0,003
Regulador Crecimiento* Fotoperiodo	155,56	2	77,78	0,1	0,9021
Error	30133,33	40	753,33		
Total	45300	47			

Anexo 4. Análisis de varianza generado de la medición de volumen a partir del pretratamiento de 15 días en el medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en oscuridad, con los periodos de evaluación de 16 semanas en los tratamientos de diferentes concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) y BAP (1mg/L) en luz y oscuridad.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,15	7	0,02	16,36	<0,0001
Regulador Crecimiento	0,14	4	0,04	27,95	<0,0001
Condición Fotoperiodo	2,30E-03	1	2,30E-03	1,82	0,1851
Regulador Crecimiento* Condición Fotoperiodo	1,20E-03	2	5,90E-04	0,46	0,637
Error	0,05	40	1,30E-03		
Total	0,2	47			

Anexo 5 Análisis de varianza generado de los callos protocórmicos ideales a partir de los pretratamientos de 30 días en medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en luz y oscuridad, con los periodos de evaluación de 8 semanas en los tratamientos de diferentes concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) y BAP (1mg/L) en luz y oscuridad.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15030	7	2147,14	1,9	0,1023
Regulador Crecimiento	13230	4	3307,5	2,93	0,036
Condición Fotoperiodo	13,33	1	13,33	0,01	0,9142
Regulador Crecimiento* Fotoperiodo	1786,67	2	893,33	0,79	0,4622
Error	36160	32	1130		
Total	51190	39			

Anexo 6. Análisis de varianza generado de la medición de volumen a partir de los pretratamientos de 30 días en medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en luz y oscuridad, con los periodos de evaluación de 8 semanas en los tratamientos de diferentes concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) y BAP (1mg/L) en luz y oscuridad.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,49	8	0,06	30,28	<0,0001
Regulador Crecimiento	0,45	4	0,11	55,1	<0,0001
Condición Fotoperiodo	0,01	1	0,01	3,72	0,0607
Regulador Crecimiento* Condición Fotoperiodo	0,04	3	0,01	6,04	0,0017
Error	0,08	41	2,00E-03		
Total	0,58	49			

Anexo 7. Análisis de varianza generado de los callos protocórmicos ideales a partir de los pretratamientos de 30 días en el medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en oscuridad, con los periodos de evaluación de 16 semanas en los tratamientos de MS sólido suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) y BAP (1 mg/L) en oscuridad.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6684,44	8	835,56	0,6	0,7725
Regulador Crecimiento	3884,44	4	971,11	0,7	0,5998
Condición Fotoperiodo	640	1	640	0,46	0,5026
Regulador Crecimiento* Fotoperiodo	2160	3	720	0,52	0,674
Error	50240	36	1395,56		
Total	56924,44	44			

Anexo 8. Análisis de varianza generado de la medición de volumen a partir de los pretratamientos de 30 días en el medio MS líquido suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 g/L de CH en oscuridad, con los periodos de evaluación de 16 semanas en los tratamientos de MS sólido suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L y 3 mg/L) y BAP (1 mg/L) en oscuridad.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,83	8	0,1	140,98	<0,0001
Regulador Crecimiento	0,51	4	0,13	173,99	<0,0001
Condición Fotoperiodo	0,01	1	0,01	13,98	0,0006
Regulador Crecimiento* Condición Fotoperiodo	0,31	3	0,1	139,28	<0,0001
Error	0,03	36	7,30E-04		
Total	0,85	44			