



Agronomía Costarricense

ISSN: 0377-9424

ISSN: 2215-2202

Universidad de Costa Rica. Colegio de Ingenieros y Agrónomos. Ministerio de Agricultura y Ganadería

Villegas-Ramírez, Juan; Palma-Zúñiga, Tomás

Caracterización morfogénica de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) para su propagación*

Agronomía Costarricense, vol. 46, núm. 1, 2022, Julio-Diciembre, pp. 9-24

Universidad de Costa Rica. Colegio de Ingenieros y Agrónomos. Ministerio de Agricultura y Ganadería

DOI: <https://doi.org/10.15517/RAC.V46I1.49861>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43673743001>

- ▶ [Cómo citar el artículo](#)
- ▶ [Número completo](#)
- ▶ [Más información del artículo](#)
- ▶ [Página de la revista en redalyc.org](#)



Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

CARACTERIZACIÓN MORFOGÉNICA DE LA VAINILLA (*Vanilla planifolia* ANDREWS) PARA SU PROPAGACIÓN*

Juan Villegas-Ramírez^{1/**}, Tomás Palma-Zúñiga²

Palabras clave: *Vanilla planifolia*; Biorreactores de Inmersión Temporal; multiplicación, organogénesis.

Keywords: *Vanilla planifolia*; Temporary Immersion Bioreactors; multiplication; organogenesis.

Recibido: 16/02/2021

Aceptado: 08/09/2021

RESUMEN

Introducción. La vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) es una orquídea que se cultiva comercialmente para la producción de vainillina, una sustancia saborizante que se emplea principalmente en la industria alimenticia y como cosmético. Aunque la demanda ha motivado su cultivo, hay poca disponibilidad de semilla vigorosa y libre de enfermedades lo cual ha sido una limitante. Se ha demostrado que los sistemas de inmersión temporal son eficientes. Para la micropropagación masiva de la vainilla, aún no se han establecido estudios de tiempo, frecuencia de inmersión y volumen óptimo en la proliferación de brotes en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) y además se desconoce una ruta morfológica que garantice la estabilidad genética y la optimización durante el proceso de micropropagación. **Objetivo.** Caracterización morfológica de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) en un BIT. **Materiales y métodos.** Se realizaron 3 experimentos, cada uno con 3 tratamientos. Para el primer experimento, se consideraron tiempos de 5, 10 y 15 min para los tratamientos, en el


ABSTRACT

Morphogenic characterization of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) for propagation. Introduction. Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) is an orchid that is commercially grown for the production van, a flavoring substance that is used mainly in the food industry and as a cosmetic. Although the demand has motivated its cultivation, there is little availability of vigorous seed and free which has been a limited. Temporary immersion systems have been shown to be efficient. For their massive micropropagation but studies of time, immersion, frequency and optimal volume have not yet been established in the proliferation of shoots in Temporary Immersion Bioreactors (BIT), furthermore, a morphogenic pathway that guarantees genetic stability and optimization during the micropropagation process is unknown. **Objective.** Morphogenic characterization of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in a BIT. **Materials and methods.** Three experiments were carried out, each with 3 treatments. For the first experiment, the immersion time considered

* Investigación producto de la Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad, del programa de posgrado del Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE).

** Autor para correspondencia. Correo electrónico: juan7villegas@estudiantec.cr

1 Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI), Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.

 0000-0001-9490-3507.

2 Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI), Centro de Investigación en Agroindustria, Biotecnología y Veterinaria (CIABIV), Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.

 0000-0002-2862-7003.

segundo se evaluaron 3 frecuencias en tiempos de 6, 12 y 18 horas y en el tercero se consideraron 20, 30 y 40 ml/explante como volumen de medio de cultivo. Para los diferentes tratamientos se utilizaron 5 repeticiones, con una unidad experimental de 10 explantes y segmentos de tallo con 3 yemas axilares. El medio de cultivo consistió en las sales de Murashige Skoog (MS) suplementado con 1 mg.L⁻¹ de BA y 1 g.L⁻¹ de caseína. El fotoperiodo se ajustó a 16 horas luz, con una temperatura de 27°C±3 y una humedad relativa de 80% **Resultados.** Se obtuvieron diferencias estadísticas (p<0,05) respecto a los tiempos evaluados, frecuencia de inmersión y el volumen por explante. Se determinó como mejor tiempo de inmersión un periodo de 15 minutos, 6 horas como frecuencia de inmersión y 40 ml como volumen de medio por explante. Al comparar la respuesta de desarrollo, el sistema BIT superó al medio semisólido 1,8 veces en el número de brotes y 4 veces en el incremento de peso fresco. También con BIT se obtuvieron 36 brotes por explante mientras que en el sistema de cultivo en medio semisólido, se obtuvieron 20 brotes por explante. **Conclusiones.** Mediante el empleo del sistema BIT, se optimizó el mecanismo de micropropagación de *V. planifolia* comparado con el medio de cultivo semisólido en la ruta organogénica directa, lo cual fue demostrado con la formación de brotes preformados y brotes adventicios.

INTRODUCCIÓN

El género *Vanilla* está representado por un grupo de lianas que comprende 126 especies pertenecientes a la familia Orchidacea (Damian y Mitidieri 2020, Azofeifa-Bolaños *et al.* 2019, Soto y Dressler 2010, Bory *et al.* 2008). Según Gelski (2019). En los últimos años se incrementó la demanda de la vainilla a nivel mundial, sin

the treatments of 5, 10 and 15 min, in the second experiment 3 frequencies were evaluated at times of 6, 12 and 18 hours and in the third experiment were considered 20, 30 and 40 ml/explant as volume of culture medium. For the different treatments used 5 repetitions, with an experimental unit of 10 explants and stem segments with 3 axillary buds. The culture medium consisted of Murashige Skoog (MS) salts supplemented with 1 mg.L⁻¹ of BA and 1 g.L⁻¹ of casein. The photoperiod was adjusted to 16 light hours, with a temperature of 27°C±3 and a relative humidity of 80%. **Results.** Statistical differences (p<0,05) were obtained with respect to the evaluated times, frequency of immersion and the volume per explant. A period of 15 minutes it was determined as the best immersion time, 6 hours as the immersion frequency and 40 ml as the volume of medium per explant. When comparing the development response, the BIT system exceeded the semisolid medium 1.8 times in the number of shoots and 4 times in the increase in fresh weight. In addition, 36 shoots were obtained per explant in BIT, while in the culture system in semi-solid medium, a multiplication rate of 20 shoots per explant. **Conclusions.** By using the BIT system, the micropropagation mechanism of *V. planifolia* was optimized compared to the semi-solid culture medium in the direct organogenic route, which was proved with the formation of preformed shoots and adventitious shoots.

embargo, la oferta del cultivo ha sido escasa y como consecuencia ha generado precios hasta de 600 dólares por kg, aspecto de interés para productores. Granados (2018) señaló que la oferta de vainilla de Madagascar, principal país productor del cultivo en el mundo, disminuyó en un 38% desde el 2017, debido a la afectación sufrida por el huracán Henawo.

Sin embargo, también se deben atender otros aspectos como su propagación, la cual se puede realizar tanto por el método sexual como asexual, aunque el primero es menos eficiente, debido a que es común que las semillas presenten un bajo porcentaje de germinación (Yeh *et al.* 2021). El método asexual o por esquejes de tallos requiere alta mano de obra y disponibilidad de más tiempo, lo cual incrementa costos y reduce la viabilidad de este tipo de proyecto (Azofeifa 2014). Por lo general las plantaciones establecidas por esquejes se ven afectadas por diversas enfermedades principalmente por la marchitez provocada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, que ocasiona necrosis de raíces y tallos (Adame *et al.* 2015).

Con el interés de abastecer la demanda del cultivo, a partir del uso de genotipos de vainilla de alto rendimiento, resistentes a *Fusarium oxysporium* f.sp *vanillae* (Iglesias-Andreu 2018), se ha trabajado con técnicas de micropropagación in vitro o propagación clonal bajo condiciones controladas de laboratorio.

Se han publicado protocolos de micropropagación para producir masivamente plantas de vainilla libres de plagas y enfermedades mediante organogénesis procedentes de yemas axilares (George y Ravishankar 1997), asimismo por embriogénesis somática y organogénesis mediante la inducción del callo (Janarthanam y Sheshadri 2008). Otras investigaciones con técnicas de micropropagación en el cultivo in vitro en vainilla, citan el trabajo de Philip y Nainar (1986) en el desarrollo de terminales de raíz a meristemas vegetativos, posteriormente, mediante los estudios se ha identificado que el estímulo directo de reguladores de crecimiento como la benziladenina se han utilizado para explantes de ápices del tallo (Abebe *et al.* 2009, Gantait *et al.* 2009, Tan *et al.* 2013). También la adición de reguladores del crecimiento como el ácido naftalenacético (NAA) y la 6-bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo MS es frecuente en la micropropagación de la vainilla (Murashige y Skoog 1962). También se conoce que la utilización de aditivos como lo es

lignosulfonato de calcio (Ca-LIGN) y el lignosulfonato de sodio (Na-LIGN) sobre la multiplicación y regeneración del cultivo a partir de brotes de *V. planifolia* (Abdullah *et al.* 2020).

A pesar de los beneficios de la micropropagación en medios semisólidos para la obtención de plantas libres de enfermedades, han surgido limitaciones debido a la necesidad de realizar subcultivos frecuentes cuando el medio de cultivo se agota. Además, los volúmenes de medio de cultivo en medios semisólidos son relativamente pequeños pues han presentado rangos entre 10 a 30 ml/explante según el frasco de cultivo, y más requerimiento de mano de obra, que a su vez genera problemas de contaminación por manipulación, en conjunto aspectos por los cuales se consideró como alternativa, el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Estos son sistemas automatizados en medio líquido que garantizan la oxigenación, permiten minimizar los costos de producción y la contaminación por manipulación; además proporcionan contacto uniforme en todo el explante, aspecto que favorece la sustitución del medio de cultivo líquido sin remplazar el frasco (Watt 2012). Sin embargo, investigaciones realizadas con el SIT en vainilla, no reportan respuestas morfogénicas durante la micropropagación y requieren ser identificadas con el fin de optimizar los factores químicos y físicos que las controlan. Y asimismo, garantizar la estabilidad genética de las plantas obtenidas in vitro (Alatorre 2002, Palama *et al.* 2010).

El SIT se ha diseñado y modificado con la utilización de diferentes tipos de frascos y diferentes mecanismos que impulsan el medio de cultivo mediante agitación mecánica o neumática. Los diseños de SIT fueron expuestos y descritos en detalle por Etienne y Berthouly (2002) y Paek *et al.* (2001), Paek *et al.* (2005).

También la eficiencia de los Sistemas de Inmersión Temporal ha sido motivo de una revisión de literatura por parte de Georviev *et al.* (2014) quien se refirió al funcionamiento de esos sistemas, y su diseño tecnológico, mediante ejemplos de la aplicación de estos sistemas en

micropropagación de plantas tanto a nivel de laboratorio como en terrenos para su producción.

Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016) evaluaron 3 diferentes sistemas de inmersión temporal para micropropagar la vainilla: Biorreactores de inmersión temporal (BIT®), Biorreactores de inmersión por gravedad (BIG) y receptor para inmersión temporal automatizada (RITA®). Los resultados obtenidos reportaron mayor número de brotes/explantes (18,06) obtenidos en BIT®, seguido de RITA® (12,77) y BIG (7,83), sin embargo, esta investigación no indicó el tiempo, la frecuencia y tampoco el volumen de medio/explantes específicos para los BIT. Tanto la frecuencia como el volumen de medios usados en BIT han sido los recomendados para su análisis por Ramos-Castellá *et al.* (2014) para el sistema RITA®.

Para el presente estudio en particular, se utilizó el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), propuesto por Escalona *et al.* (1999).

El objetivo fue investigar caracterización morfogénica de la Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) mediante un biorreactor de inmersión temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material experimental. Se utilizaron plántulas in vitro de *Vanilla planifolia*, procedentes del laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional de Santa Clara, San Carlos. Las yemas axilares provenían de las plántulas in vitro que fueron subcultivadas 3 veces con 30 días de intervalo para obtener plántulas de aproximadamente 10 cm de longitud; luego se seleccionaron como explante los segmentos de tallo de las plántulas in vitro conteniendo 3 yemas axilares de 5 cm de longitud.

Medio de cultivo. Se utilizaron 2 medios de cultivo, el primero con las sales Murashige y Skoog 1962 (MS) solidificado con Agar (4,4 g.L⁻¹) y el segundo medio preparado para el BIT con las sales MS carente de agar. Ambos tipos de

medio de cultivo contenían las sales y vitaminas MS y fueron enriquecidos con 30 g.L⁻¹ de sacarosa y suplementado con 1 mg.L⁻¹ de bencil adenina (BA), 1 mg.L⁻¹ caseína y 1 ml.L⁻¹ de Plant Preservative Mixture™ (PPM) como prevención al ataque de bacterias y hongos. El pH se ajustó a 5,7 y posteriormente se esterilizó en autoclave durante 29 minutos por litro de medio de cultivo, a una temperatura de 121°C y una presión de 15 psi (Palma 2013).

Tratamientos para evaluar la respuesta de vainilla en un Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT). Para determinar las respuestas de la vainilla en BIT®, se realizaron 4 experimentos y se seleccionó el que presentó el mayor número de brotes durante su multiplicación según el tiempo y frecuencia de inmersión así como el volumen de medio. Posteriormente se evaluó la respuesta de los explantes de vainilla mediante comparación del sistema BIT® con el método convencional en medio semisólido. En cada uno de los primeros 3 experimentos se evaluaron 3 tratamientos con 5 repeticiones semanalmente durante 6 semanas. Los mismos se describen a continuación.

Experimento 1. Tiempo de inmersión.

Los tratamientos evaluados fueron: 5, 10 y 15 minutos. En esta etapa de multiplicación, el volumen fue de 300 ml por unidad BIT® (30 ml por explante) como constante. La frecuencia de inmersión utilizada como constante fue de 12 horas. Se utilizaron 10 explantes por recipiente de cultivo, con 5 repeticiones y se evaluaron semanalmente durante 6 semanas.

Experimento 2. Frecuencia de inmersión.

Se evaluaron 3 frecuencias de inmersión para los siguientes tratamientos: cada 6, 12 y 18 horas. Se utilizaron 10 minutos como mejor tiempo de inmersión según los resultados obtenidos en el experimento 1 y se estableció como constante el volumen de 30 ml/explante, 10 explantes formaron la unidad experimental y cada tratamiento fue replicado 5 veces.

Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante 6 semanas.

Experimento 3. Volumen del medio de cultivo. En esta etapa se evaluaron 3 volúmenes de medio: 20, 30 y 40 ml por explante. El tiempo y la frecuencia de inmersión se seleccionaron de los experimentos 1 y 2, donde se cuantificaron los mejores resultados en las variables evaluadas. Para cada tratamiento se utilizaron 5 repeticiones. La unidad experimental se conformó con 10 explantes. Las variables se evaluaron semanalmente durante 6 semanas.

Experimento 4. Evaluación de medios de cultivo en BIT vs medios solidificados. Una vez culminados los 3 experimentos, con tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión y volumen de medio, se procedió a realizar la comparación de resultados obtenidos en el sustrato semisólido y el medio líquido en BIT, según las mejores respuestas de tiempo y frecuencia de inmersión y el volumen de medio. Las variables también se evaluaron semanalmente durante 6 semanas.

Condiciones físicas del cuarto de crecimiento. En los 4 experimentos la temperatura del cuarto de crecimiento se reguló mediante aire acondicionado a $27\pm 3^{\circ}\text{C}$; la intensidad lumínica fue de 3000 lux, el fotoperiodo fue de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad; la humedad relativa presentó un valor de 80% en promedio.

Análisis diseño experimental. Para los 3 primeros experimentos se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones y los datos se procesaron estadísticamente con el sistema de análisis estadístico SAS. Se realizó un análisis de

varianza (ANOVA) y los resultados se ajustaron a una ecuación de regresión. El cuarto experimento se analizó mediante la prueba de t student para determinar la respuesta de los explantes de vainilla en medio semisólido de cultivo en BIT®.

Variables evaluadas. Las variables evaluadas cada semana y durante 6 semanas, fueron el número de brotes, longitud de brote (cm), número de hojas del brote, longitud de la lámina foliar del brote (cm), número de raíces, longitud de raíces (cm) e incremento de peso (g).

Histología. Los brotes de *V. planifolia* se fijaron en formaldehído: ácido acético, alcohol, ácido acético (FAA) (1:1:8 v/v), durante 4 días, se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes hasta llegar a xileno y luego la infiltración en paraplast de Fisherbrandt™. Se cortaron secciones delgadas de 10 μm mediante un micrótopo rotatorio (Leica RM2125 RTS). La tinción se hizo con verde CFC y safranina para observarlos al microscopio compuesto (Optima G302).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de inmersión temporal de los BIT en explantes de *Vanilla planifolia*. El análisis de varianza mostró diferencias significativas y altamente significativas para las variables número de brotes y longitud de raíces respectivamente, evaluadas 6 semanas después de la siembra como respuesta al tiempo de inmersión. La mayor respuesta en el número de brotes se evidenció en el tratamiento de 15 min de inmersión con 29,14 brotes y la mayor longitud de raíces (20 mm) se obtuvo con este mismo tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Multiplicación de *Vanilla planifolia* en BIT con 3 tiempos de inmersión, semana 6 después de la siembra.

Fuente de variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Longitud lámina foliar (cm)	Número raíces	Longitud raíces(cm)	Incremento de peso fresco (g)
5 min	22,88	2,14	2,61	1,60	11,84	1,40	3,25
10 min	26,01	2,17	4,74	1,73	12,11	1,73	4,50
15 min	29,14	2,20	6,87	1,86	12,369	2,06	5,75
Ecuación regresión	Y=3,13X+19,75						
R ²	0,36						
Fuentes de variación							
Trat	74,08*	0,22 ^{NS}	18,58 ^{NS}	0,13 ^{NS}	27,58 ^{NS}	0,43**	6,25 ^{NS}
Error	14,64	0,08	6,69	0,10	15,69	0,03	3,58
Gl trat	2	2	2	2	2	2	2
Gl error	8	8	8	8	8	8	8
Coef. Varía.	13,38	12,61	13,50	21,93	27,63	11,11	58,00

* diferencia significativa para p<0,05. n=10.

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

Para definir el mejor tiempo de inmersión se consideraron las variables con diferencias significativas ($p < 0,05$) y altamente significativas ($p < 0,01$) y se ajustaron a un modelo de regresión lineal, lo que confirmó que el tiempo de inmersión influye en el número de brotes y la longitud de raíces de vainilla en BIT®.

Adicionalmente, los frascos gemelos (BIT®) que fueron propuestos por Escalona *et al.* (1999), (Watt 2012) esclarecieron que la duración y frecuencia de inmersión constituyen los factores más importantes para una micropropagación exitosa, ya que influyen en la absorción de nutrientes y agua aspecto que también se asocia a la hiperhidricidad de los tejidos cultivados (Escalona *et al.* 2006).

También los trabajos de micropropagación en sistemas de inmersión temporal en vainilla han sido realizados en recipientes conocidos como RITA® con la aplicación de 2 minutos de inmersión y con diferentes tipos explantes tal y como lo indican las publicaciones, González (2003) mencionó que el uso de yemas axilares y yemas terminales vainilla; Ramos-Castellá *et al.* (2014) quienes utilizaron segmentos nodales de vainilla; Ramírez-Mosqueda *et al.* (2016) utilizaron “cluster” provenientes de yemas axilares y Spinoso-Castillo (2017) iniciaron la micropropagación en sistemas de inmersión por medio de segmentos nodales provenientes de yemas axilares. Un trabajo de micropropagación en vainilla similar a los biorreactores lo realizaron Sreedhar *et al.* (2009) con “cluster” de explantes en medios líquidos en agitación. Se identificó que el tiempo de inmersión utilizado en sistemas de inmersión

temporal varía de manera importante según la especie y del tipo de sistema de inmersión temporal que se seleccionara para la micropropagación de plantas (Georgiev *et al.* 2014).

Para la micropropagación de vainilla se utilizaron 3 tipos de sistemas de inmersión temporal a saber: Biorreactores de inmersión temporal (BIT®), biorreactores de inmersión por gravedad (BIG) y receptor para inmersión temporal automatizada (RITA®) con un protocolo propuesto por Ramos-Castellá *et al.* (2014), la mayor de brotes por explante los obtuvo en el medio de cultivo de BIT® con 18,6 brotes, seguido de RITA® con 12,77 brotes y por último el BIG con 7,83 brotes (Ramírez Mosqueda *et al.* 2016). La máxima cantidad de brotes de vainilla obtenidos en este estudio fue de 29,14 brotes (Tabla 1) cuando los explantes fueron sometidos al tratamiento de 15 minutos de inmersión, valor superior al número de brotes /explante de vainilla obtenidos por Ramos Castellá *et al.* (2014) (18,6 brotes/explante) con el BIT® como sistema de inmersión temporal.

Efecto de la frecuencia de inmersión de los BIT en explantes de *V. planifolia*. En el estudio de la frecuencia de inmersión el análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas para las variables número de brotes y número de hojas evaluados 6 semanas después de la siembra. El mayor número de brotes y hojas, 33,7 y 34,73 respectivamente se obtuvo con una frecuencia de inmersión de cada 6 horas y decreció conforme disminuía el contacto con el medio de cultivo (Tabla 2).

Tabla 2. Multiplicación de *Vanilla planifolia* en BIT con 3 frecuencias de inmersión en la semana 6 después de la siembra.

Fuente de variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número hojas	Longitud lámina foliar (cm)	Número raíces	Longitud raíces (cm)	Incremento de peso fresco (g)
Cada 6 horas	33,7	2,51	34,73	1,51	10,13	0,64	8,6
Cada 12 horas	28,9	2,46	29,13	1,35	9,33	0,69	7,82
Cada 18 horas	24,1	2,41	23,53	1,19	8,53	0,74	7,04
Ecuación regresión	$Y = -4,8 X + 38,5$		$Y = -5,6 X + 40,33$				
R ²	0,74		0,67				
Fuentes de variación							
Trat	115,8**	0,014 ^{NS}	161,07**	0,13 ^{NS}	4,87 ^{NS}	0,014 ^{NS}	3,04 ^{NS}
Error	5,13	0,207	8,73	0,074	5,28	0,09	2,30
Gl trat	2	2	2	2	2	2	2
Gl error	8	8	8	8	8	8	8
Coefficiente de variación	7,76	11,48	19,52	19,52	28,97	42,42	20,55

* diferencia significativa para $p < 0,05$. $n = 10$.** diferencias altamente significativas para $p < 0,001$. $n = 10$.

Las variables longitud de brotes, longitud de lámina foliar número de raíces y longitud de raíces e incremento de peso fresco, no mostraron diferencias estadísticas a las 6 semanas de evaluadas después de la siembra.

Resultados similares encontraron Basail *et al.* (2012) al evaluar el tiempo y frecuencia de inmersión en la micropropagación de plátano, ya que ambas variables, influyeron en la absorción de nutrientes y agua con afectación del coeficiente de multiplicación y la calidad de las plantas micropropagadas. La frecuencia de inmersión varió según la especie estudiada, el sistema de inmersión temporal empleado y la ruta de morfogénesis tal y como lo demuestra la revisión de Watt (2012), quien estableció las frecuencias de inmersión entre 30 segundos cada 10 minutos en (*Eucalyptus grandis*) y en sistemas RITA® (McAlister *et al.* 2005) y hasta 30 minutos cada 4 horas en el cultivo de *Lessertia frutescens* en

un biorreactor de inmersión temporal mediante burbujeo, B.I.B.®, (Shaik *et al.* 2010). En las investigaciones realizadas por Ramos *et al.* (2014), Ramírez *et al.* (2014), Spinoso-Castillo *et al.* (2017), González (2003) en sistemas de inmersión tipo RITA® en *Vainilla planifolia* se determinó una frecuencia de inmersión de 4 horas.

Efecto del volumen de medio de los BIT en explantes de *Vanilla planifolia*. Una vez determinado el tiempo y frecuencia de inmersión se evaluó el volumen de medio por explante, el cual mostró diferencias altamente significativas en las variables número de brotes, longitud de brotes, número de hojas e incremento de peso fresco, evaluadas 6 semanas después de la siembra (Tabla 3). Las variables longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces no presentaron diferencias estadísticas durante ese tiempo de evaluación.

Tabla 3. Multiplicación de *Vanilla planifolia* en BIT® con 3 volúmenes de medio por explante, semana 6 después de la siembra.

Fuente de variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número hojas	Longitud lámina foliar (cm)	Número raíces	Longitud raíces (cm)	Incremento de peso fresco (g)
20 ml	24,33	2,08	18,26	0,94	6,70	0,77	11,79
30 ml	29,63	1,92	22,06	1,22	6,40	0,67	17,00
40 ml	34,93	1,76	25,86	1,5	6,10	0,57	22,21
Ecuación regresión	$Y=5,30 X+19,03$	$Y=-0,16 X + 2,24$	$Y=3,8 X +14,46$				$Y=5,21 X+6,58$
R ²	0,75	0,65	0,76				0,65
Fuentes de variación							
Trat	168,47 * *	134**	72,27**	0,39 NS	0,60NS	0,32NS	178**
Error	4,30	0,013	3,93	0,23	1,85	0,12	6,75
Gl trat	2	2	2	2	2	2	2
Gl error	8	8	8	8	8	8	8
Coefficiente de variación	7,17	6,30	8,91	36,49	21,94	47,07	13

*diferencia significativa para $p<0,05$. $n=10$.**diferencias altamente significativas para $p<0,001$. $n=10$.

Se ha evidenciado que el volumen del frasco y el medio de cultivo líquido están relacionados con el número de los explantes como factores determinantes en la micropropagación en biorreactores de inmersión temporal (Watt 2012). Con los tratamientos evaluados se determinó que a mayor volumen por explante mayor es la respuesta en el número de brotes durante la micropropagación de *Vanilla planifolia*. Los resultados obtenidos se ajustaron a una ecuación de regresión que establece que por cada 10 ml de medio de cultivo que se aumente en el BIT® se incrementa un promedio de 5,3 brotes, 3,8 hojas y 5,21 gramos de peso fresco con un R^2 de 0,75 – 0,076 – 0,65 respectivamente. La longitud del brote disminuyó en 0,16 cm con un R^2 de 0,65 según el análisis de regresión realizado.

Estudio de comparación de la micropropagación de *Vanilla planifolia* en un sistema de inmersión temporal y un medio semisólido. El estudio de respuesta de explantes en la micropropagación de *V. planifolia* por medio de la prueba de contrastes de medias (*t de student*), mostró diferencias altamente significativas para las variables número de brotes, número de hojas e incremento de peso fresco al comparar el sistema de inmersión líquido (BIT) con el de medio semisólido durante 6 semanas. De esta manera se comprobó que el sistema de inmersión temporal influyó significativamente en la formación de brotes y superó en 16 el número de brotes al sistema de cultivo en medio semisólido. Resultados similares obtuvieron Bello-Bello *et al.* (2014) y

Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016) al evidenciar que el cultivo de vainilla en Biorreactores resultó ser más eficiente, ya que generó 12 brotes por explante en promedio, mientras que la vainilla micropropagada en el cultivo en medio semisólido solo produjo una tasa de multiplicación de 7 brotes por explante.

Los brotes formados en un sistema de inmersión temporal, tuvieron mayor superficie de contacto con el medio de cultivo líquido este sistema de cultivo permitió combinar la aeración con el burbujeo de la inmersión, ya que tomó del medio de cultivo los nutrientes y reguladores de crecimiento de forma más eficiente (Ramos-Castellá *et al.* 2014).

El número de hojas fue superior en BIT® con un promedio de 26 hojas mientras que en el sistema de cultivo semisólido se determinaron 15 hojas. Además, se comprobó la influencia del sistema líquido para la variable incremento de peso fresco, ya que con un valor de 26 g incrementó en peso fresco obtenido con el BIT® y superó los 6 g que se obtuvieron en el sistema semisólido (Figura 1 B). Se ha demostrado que especies micropropagadas en el sistema BIT® producen mayor cantidad de brotes/explante cuando se comparan con el número de brotes/explante obtenidos en medios de cultivos semisólidos (Escalona *et al.* 2006). En el caso del cultivo de la vainilla, se obtuvo mayor cantidad de brotes en sistemas de inmersión temporal tipo RITA® al compararlo con los brotes/explante obtenidos en medios semisólidos (Bello-Bello *et al.* 2014).

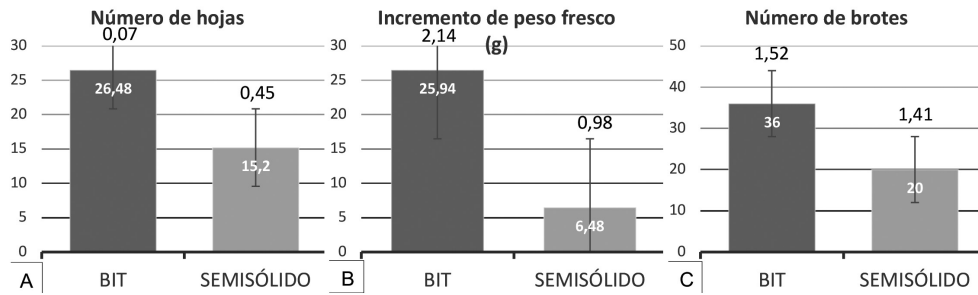


Figura 1. Efecto comparativo de los sistemas BIT y el medio semisólido. (a) número de hojas (b) incremento en peso fresco (c) número de brotes en *V. planifolia*, 6 semanas después de iniciada la siembra.

Respuestas morfológicas de *Vanilla planifolia* y observaciones histológicas obtenidas en los BIT. Las respuestas morfológicas observadas en este estudio incluyeron el estímulo de

brotes preformados, el estímulo de brotes adventicios con la formación de “cluster” y la transformación del meristemo radical en meristemos vegetativos (Figura 2).

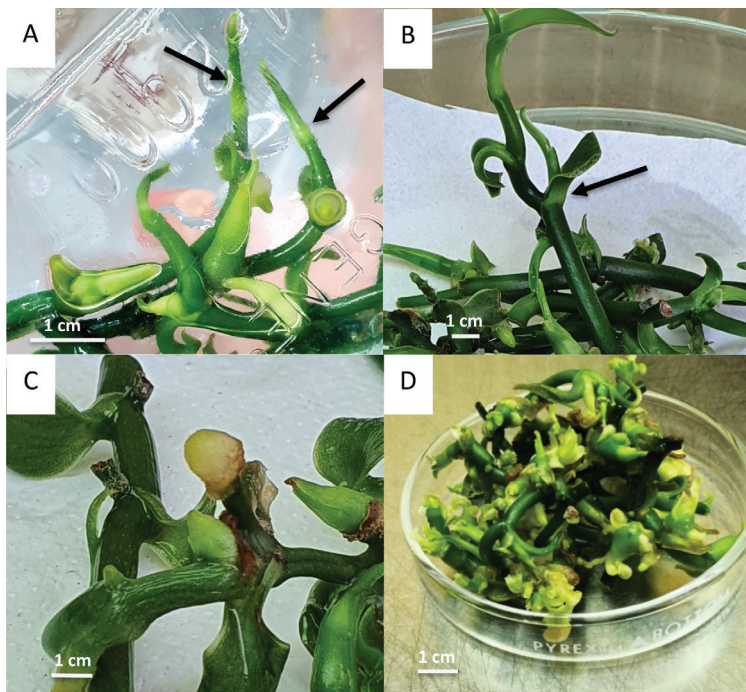


Figura 2. Morfología de estructuras regeneradas a partir de explantes de *V. planifolia* en BIT con tiempo de inmersión de 15 min, frecuencia de inmersión de 6 horas y volumen de medio de 40 ml/explante. (a) Estímulo del brote apical señalado con las flechas. (b) Estímulo de brotes axilares y formación de las raíces antes de su transformación en meristemos del brote. (c) Transformación de meristemos de raíz en meristemos vegetativos a partir de una masa de tejido meristemático (d) Estímulo de brotes adventicios que inician la formación de “cluster” y se demuestra la cantidad de brotes y biomasa alcanzada.

En los brotes de vainilla que produjeron raíces se evidenció la transformación del meristemo radical a meristemos vegetativos a través de la ruta organogénica directa detectada mediante la histología. En esta investigación, no se observaron estructuras que mostraran una ruta bipolar.

El sistema BIT® favoreció la formación de estructuras denominadas “cluster” cuyo análisis histológico mostró una ruta organogénica (Figura 3) u organogénesis de *novo* según

Sugiyama (1999), en un proceso de desdiferenciación de células y su reorganización en la división celular, con la formación de primordios y meristemos de órganos específicos. Los brotes y raíces de las plantas conservaron las funciones meristemáticas, aun si se eliminara parte o todos sus meristemos de la raíz o del tallo; además, las células vegetales de tejidos u órganos diferenciados tienen la capacidad de producir nuevos brotes y raíces laterales a través de la organogénesis (Zhang *et al.* 2018, Ikeuchi *et al.* 2016).

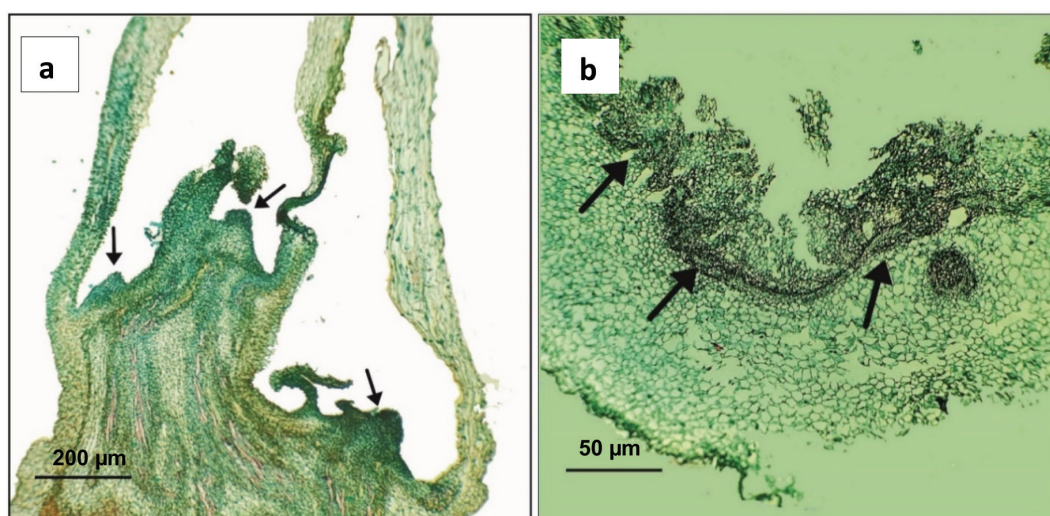


Figura 3. Análisis histológico de rutas morfogénicas en *V. planifolia* como respuesta a sistemas de cultivo BIT con tiempo de inmersión de 15 min, frecuencia de inmersión de 6 horas y volumen de medio de 40 ml/explante. (a) Formación de estructuras organogénesis que conducen a la formación de “un cluster”, (b) Grupo de células meristemáticas organizadas y diferenciación de múltiples estructuras a partir de meristemoides localizado en la parte distal de la raíz 6 semanas después de la siembra en un BIT®.

Las rutas morfogénicas de *V. planifolia* observadas en los BIT®, se desarrollaron en medio de cultivo que se suplementó con BA como citocinina en una concentración de $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y la biomasa cuantificada como incremento en peso fresco y formación de brotes en presencia de BA en el medio de cultivo que presume ser uno de los factores determinantes en la formación de brotes preformados, y en el estímulo de brotes adventicios en *V. planifolia*. El estudio de Alatorre

(2002) evidenció que la presencia de BA en el medio de cultivo, interviene en la organogénesis *in vitro* de Vainilla tanto en brotes axilares como en terminales de raíz.

Respecto a la morfología de estructuras regeneradas a partir de explantes de *V. planifolia* en BIT® como respuesta al tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión y volumen de medio de cultivo se evidenció que se siguieron la ruta de

organogénesis directa, que estimuló la formación de brotes preformados y de brotes adventicios tanto a partir de yemas axilares como de las terminales de raíz. Por su parte, la ruta organogénica en los explantes sembrados, inició con el desarrollo del brote apical y posteriormente con el de los brotes axilares. Las raíces formadas presentaron engrosamientos en el meristemo a través de una transformación de los meristemos radicales en meristemos vegetativos visibles una semana después de la siembra. Otra respuesta organogénica observada en los explantes de vainilla fue la formación de brotes adventicios organizados que se conformaron en “cluster” (Figura 2).

El análisis histológico de las estructuras obtenidas, evidenciaron a través del vínculo de bandas procambiales, a la ruta organogénica como la respuesta de los explantes de *V. planifolia* en los BIT empleado para su micropropagación (Figura 3).

En la misma figura se observa el corte longitudinal de la terminal de la raíz engrosada presentó diferenciación de múltiples brotes a partir de meristemoides formados en la parte distal del extremo de la raíz presente. Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Philip y Nainar (1988) en medios semisólidos, quienes señalaron que las respuestas de transformación de meristemos radicales a meristemos vegetativos en *V. planifolia*, solo se manifiesta en raíces nuevas en interacción del corte realizado y la interacción con auxinas endógenas, al centro de quiescencia a la formación de brotes y raíces en estas terminales de raíces.

Asimismo se constató que la ruta morfológica directa obtenida, garantiza la estabilidad genética esperable del material micropropagado, ya que reportó altos niveles de variación somaclonal durante la regeneración de callos en *V. planifolia* (Divakaran *et al.* 2015, Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu 2016), que es útil cuando se requiera promover la diversidad genética en *V. planifolia*, sin embargo, no es recomendable cuando se necesite material genético con motivos comerciales. Otro aspecto es que los subcultivos

analizados en laboratorio mostraron afectación en su estabilidad genética, pues se evidenció que los 6 a 10 subcultivos de vainilla in vitro con un medio suplementado con 8,86 μM BAP, mostraron variación genética (Pastelín Solano *et al.* 2019).

Por medio de la investigación se observó que la transformación de los meristemos de raíz en meristemos vegetativos; ocurrió en presencia de benciladenina y caseína hidrolizada en un medio de inmersión temporal muy similar a lo descrito por Philip y Nainar (1988). Además, el uso de benciladenina en el medio de cultivo para la transformación del meristemo radical en vegetativo coincidió con los resultados obtenidos por Alatorre (2002), quien señaló efectos de la benciladenina sobre la velocidad de desintegración de la caliptra y formación de estructuras vegetativas en las terminales de raíz.

Se evidenció la eficiencia de los BIT® en la micropropagación de *V. planifolia* y se estableció la ruta organogénica directa con la formación de brotes preformados y brotes adventicios, lo cual lo que garantiza su estabilidad genética (Divakaran *et al.* 2015, Ramírez y Iglesias 2015), además la eficiencia mostrada con los BIT comparado con el medio de cultivo en medio semisólido ofrece una nueva opción para la micropropagación de esta orquídea a gran escala.

Finalmente se reporta que esta investigación, es el primer informe de organogénesis de *Vanilla planifolia* evidenciado mediante histología y obtenida en este estudio de BIT® con un tiempo de inmersión de 15 min, frecuencia de inmersión de 6 horas y volumen de medio de 40 ml/explante, que ha presentado diferencias significativas en número de brotes, número de hojas e incremento de peso fresco en comparación con el medio semisólido.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI), al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y a todas las personas que de forma directa o indirecta apoyaron este estudio.

LITERATURA CITADA

- Abdullah, WMAN; Low, LY; Mumaiyizah, SB; Chai, QY; Loh, JY; OngAbdullah, J; Lai, KS. 2020. Effect of lignosulphonates on *Vanilla planifolia* shoot multiplication, regeneration and metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* 42(107):107. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03099-9>
- Abebe, ZA; Mengesha, A; Teressa, W; Tefera, W. 2009. Efficient in vitro multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African J. Biotechnol.* 8:6817-6821.
- Adame, J; Rodríguez, GR; Iglesias, ALG; Ramos, PM; Luna, RM. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93(3):669-678. DOI: <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.142>.
- Alatorre, CF. 2002. Estudio morfológico e histológico del híbrido *Vanilla planifolia* Andrews x *Vanilla pompona* Schiede obtenido in vitro. Tesis Ingeniero Agrónomo. Chapingo, México. 92 p.
- Azofeifa-Bolanos, JB; Paniagua-Vásquez, A; García-García, JA. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 25(1):189-202.
- Azofeifa-Bolaños, JB; Rivera-Coto, G; Paniagua-Vásquez, A; Cordero-Solórzano, R; Salas-Alvarado, E. 2019. Efecto de la desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfológico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agronomía Mesoamericana* 30(1):33-49.
- Basail Pérez, M; Medero Vega, V; Otero Gálvez, E; Torres Delgado, M; López Torres, J; Cabrera Jova, M; Santos Pino, A.; Rayas Cabrera, A; Bautista Toledo, M; Beovidez García, Y. 2012. Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la propagación in vitro del cultivar de plátano vianda INIVITPV06-30 (Musa AAB). *Biotecnología Vegetal* 12(1).
- Bello-Bello, J; Spinoso-Castillo, J; Iglesias-Andreu, L. 2014. Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews). *Agroproductividad* 7(3):63.
- Bory, S; Lubinsky, P; Risterucci, AM; Noyer, JL; Grisoni, M; Duval, MF; Besse, P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *Am. J. Bot.* 95(7):805-815. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.2007332>.
- Damian, A; Mitidieri, N. 2020. Living in the clouds: A new high-elevation species of Vanilla (Orchidaceae, Vanilloideae) from Perú. *Phytotaxa* 451(2):154-160. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.451.2.5>
- Divakaran, M; Babu, KN; Ravindran, PN; Peter, KV. 2015. Biotechnology for micropropagation and enhancing variations in Vanilla. *Asian J. Plant Sci Res.* 5(2):52-62.
- Escalona, M; Gonzalez, J; Cejas, I; Aragon, C; Capote, I; Rodriguez, R; Cañal, M; Sandoval, J; Roels, S; Debergh, P. 2006. Temporary immersion bioreactor: An efficient technology for scaling up plant production. In *vitro* Cellular & Developmental Biology - Animal 42:13A-13A.
- Escalona, M; Lorenzo, JC; González, B; Daquinta, M; González, JL; Desjardins, Y; Borroto, CG. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18:743-748.
- Etienne, H; Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69(3):215-231.
- Gantait, S; Mandal, N; Bhattacharyya, S; Das, PK; Nandy, S. 2009. Mass multiplication of *Vanilla planifolia* with pure genetic identity confirmed by ISSR. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 3(1):18-23.
- Gelski, J. 2019. Vanilla prices slowly drop as crop quality improves. *FoodBusinessNews, USA, Solsland Publishing.* sp.
- George, PS; Ravishankar, GA. 1997. In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using Bud explants. *Plant Cell Report.* 16:490-494.
- Georgiev, V; Schumann, A; Pavlov, A; Bley, T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences* 14(6):607-621.
- González, L. 2003. Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Informe Práctica Especialidad. Cartago, Costa Rica, ITCR. P. 67. Consultado 15 abr. 2019. Disponible en <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/216>
- Granados, O. 2018. Vainilla a precio de oro. El País, Madrid, España . Consultado 20 jun. 2018. Disponible en https://elpais.com/economia/2018/06/13/actualidad/1528910475_550952.html
- Iglesias-Andreu, L. 2018. Selección de genotipos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews Resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. vanillae, mediante biotecnología. *Agro Productividad* 11(3):70-74.
- Ikeuchi, M; Ogawa, Y; Iwase, A; Sugimoto, K. 2016. Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 143:1442-1451.
- Janarthanam, B; Seshadri, S. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. In *vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 44(2):84-89.
- Mcalister, B; Finnie, J; Watt, MP; Blake, W; FC. 2005. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for the production of commercial *Eucalyptus* clones at Mondi Forests (SA). *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81:347-358.

- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3):473-497.
- Paek, KY; Chakrabarty, D; Hahn, E. 2005. Application of bioreactor systems for large production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81:287-300.
- Paek, Ky; Hahn, EJ; Son, SH. 2001. Application of Bioreactors for large-Scale Micropropagation Systems of Plants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:149-157.
- Palama, TL; Menard, P; Fock, I; Choi, YH; Bourdon, E; Govinden-Soulangue, J; Kodja, H. 2010. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology* 10(1):1-18.
- Palma, T. 2013. Micropropagación de cultivos tropicales de importancia económica. Centro de Investigación en Biotecnología, Agroindustria y Veterinaria. San Carlos, Costa Rica, Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI). 79 p.
- Pastelín Solano, MC; Salinas Ruíz, J; González Arnao, MT; Castañeda Castro, O; Galindo Tovar, ME; Bello Bello, JJ. 2019. Evaluation of in vitro shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 25(2):561-567. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00645-9>.
- Philip, VJ; Nainar, S. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 122(3):211-215. DOI: 10.1016/S0176-1617(86)80119-5.
- Philip, VY; Nainar, S. 1988. Transformación in vitro del meristemo de la raíz en brotes y plántulas en *Vanilla planifolia*. *Annals of Botany* 61:193-199. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a087542.
- Ramírez, M; Iglesias, L. 2015. Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 123(3):657-664. DOI: 10.1007/s11240-015-0868-2.
- Ramírez-Mosqueda, M; Iglesias Andreu, L. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52:154-160. 10.1007/s11627-015-9735-4.
- Ramos-Castellá, A; Iglesias-Andreu, LG; Bello-Bello, J; Lee-Espinosa, H. 2014. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 50(5):576-581.
- Shaik, S; Dewir, Yh; Singh, N; Nicholas, A. 2010. Micropropagation and bioreactor studies of the medicinally important plant *Lessertia (Sutherlandia) frutescens* L. *South Afr. J. Bot.* 76:180-186.
- Soto, M; Dressler, R. 2010. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9:285-354. DOI: 10.15517/lank.v0i0.12065.
- Spinoso-Castillo, JL; Chavezz-Santoscoy, RA; Bogdanchikova, N. 2017. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 129:195-207. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>.
- Sreedhar, RV; Venkatachalam, L; Neelwarne, B. 2009. Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia*). *J. Plant Growth Regulation* 28:46-57. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-008-9073-4>.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis in vitro. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:61-64.
- Tan, BC; Chin, CF; Alderson, P. 2013. Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49(5):626-630.
- Watt, MP. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 11:14025-14035. 10.5897/AJB12.1693.
- Yeh, CH; Chen, KY; Lee, YI. 2021. Asymbiotic germination of *Vanilla planifolia* in relation to the timing of seed collection and seed pretreatments. *Botanical Studies* 62:6. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00311-y>
- Zhang, H; Zhang, TT; Liu, H; Shi, DY; Wang, M; Bie, XM; Li, XG; Zhang, XS. 2018. Thioredoxin mediated ROS homeostasis explains natural variation in plant regeneration. *Plant Physiol.* 176:2231-22



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr