



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

**RADIOSENSIBILIDAD EN EMBRIONES INMADUROS Y
CALLOS DE *Vanilla planifolia* A DIFERENTES DOSIS DE
RADIACIÓN GAMMA**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS
POTENCIALES PARA LA AGRICULTURA**

PRESENTA

DANNIA FERNANDA GARRIDO FERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. DELFINO REYES LÓPEZ

CODIRECTOR

DR. CARLOS ROMÁN CASTILLO MARTÍNEZ

ASESORES DE TESIS

DR. EULOGIO DE LA CRUZ TORRES

DR. LUIS ANTONIO DOMÍNGUEZ PERALES

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, abril de 2025.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a tres increíbles mujeres, mi abuela María Victoria Leticia Fernández Almazán, mi mamá Karen Garrido Fernández y mi tía María Dolores Estrella Fernández Almazán, porque gracias a ellas llegue a este punto de la vida y de mi desarrollo académico.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco de todo corazón a mi director de tesis, el Dr. Delfino Reyes López, por su constante y enorme apoyo y por las enseñanzas que enriquecieron tanto mi formación académica como personal. Su compromiso y dedicación fueron una inspiración a lo largo de este camino.

A mi codirector de tesis, el Dr. Carlos Román Castillo, mi más sincero agradecimiento por creer en mí desde la licenciatura y por haberme guiado para adentrarme en el apasionante área de la biotecnología. Su confianza fue una motivación constante.

Al Dr. Eulogio De la Cruz, al Ing. Juan Manuel García y al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, gracias por recibirme siempre para irradiar mi material, por compartirme su conocimiento y por brindarme apoyo en mi investigación.

Extiendo también mi agradecimiento al Dr. Carlos Avendaño Arrazate por sus increíbles consejos, su valiosa asesoría y por su apoyo durante mi estancia en el CNRG. Asimismo, al Dr. Marco Aurelio Aragón del CNRG, gracias por su asesoría y apoyo en el análisis de mis datos, contribuyendo significativamente a este trabajo. A la Dra. Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez y a Marco Ramírez Mosqueda, mi reconocimiento y gratitud por su colaboración y asesoría para inducir la callogénesis en el laboratorio de cultivo vegetal.

En el ámbito personal, quiero dedicar un agradecimiento especial a mi mamá Karen Garrido, y a mi abuela Leticia Fernández, quienes siempre me apoyaron incondicionalmente, me alentaron y creyeron en mí incluso cuando yo no lo hacía. Su amor y fortaleza fueron mi mayor motor. También agradezco a mis tíos Estrella, Lilia, Iván y Adriana, quienes estuvieron presentes y me brindaron su apoyo durante este camino.

A mis amigos Jorge, Beto y Roque, gracias por ser la mejor compañía y siempre cuidarme en Teziutlán. Su amistad fue un pilar de apoyo emocional durante esta etapa.

A todos ustedes, gracias por ser parte de este sueño y por contribuir de manera significativa a la realización de esta meta.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Recursos fitogenéticos de México	5
4.1.1 Situación política nacional de los recursos fitogenéticos en México.....	7
4.1.2 Plan nacional de acción de los recursos genéticos agrícolas.....	8
4.2. La vainilla como recurso fitogenético de México.....	12
4.2.1 Valor cultural de la vainilla.....	13
4.2.2 Valor económico de la vainilla.....	14
4.2.3 Valor ecológico de la vainilla.....	16
4.3 Problemática del cultivo de vainilla.....	18
4.4 Estrategias de mejoramiento genético en vainilla.....	19
4.4.1 Mejoramiento por selección.....	20
4.4.2 Mejoramiento por hibridación.....	21
4.4.3 Mejoramiento por mutagénesis.....	24
4.4.3.1 Técnicas para el mejoramiento genético.....	24
4.4.3.2 Radiación gamma utilizando ⁶⁰ Co; radiosensibilidad y radioestimulación.....	25
4.4.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i>	27
4.4.4.1 Propagación de la vainilla.....	28
5.1 Ubicación experimental	30
5.2 Material vegetativo	30
5.2.1 Embriones inmaduros de <i>Vanilla planifolia</i>	31
5.2.2 Callos a partir de yema de plántulas <i>in vitro</i> M ₁	31
5.3 Irradiación del material biológico.....	31
5.3.1 Irradiación de embriones inmaduros.....	32
5.3.2. Irradiación de callos a partir de embriones inmaduros.....	32
5.3.3. Irradiación de callos a partir de yemas de plántulas M ₁	32
5.4 Establecimiento <i>in vitro</i> de embriones inmaduros.....	33
5.4.1 Desinfección del material vegetativo.....	33
5.4.2 Preparación de medio de cultivo para siembra de embriones inmaduros.....	34
5.4.3 Medio de cultivo para la formación de callo.....	34
5.4.4 Medio de cultivo para la recuperación de callo después de la irradiación.....	34
5.4.5 Medio de cultivo para la diferenciación de callo.....	35

5.4.6 Siembra de embriones inmaduros	35
5.4.7 Siembra de embriones inmaduros para inducción de callo	35
5.4.8 Siembra de yemas para inducción de callo	36
5.4.9 Incubación.....	36
5.5 Variables evaluadas de los explantes.....	36
5.5.1 Las variables evaluadas para los embriones irradiados fueron:	36
5.5.2 Variables evaluadas en la formación de callo.	37
5.5.3 Variables evaluadas en vitroplantas a partir de callo	37
5.6 Diseño experimental y análisis estadístico.....	38
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1 Comportamiento de embriones inmaduros irradiados con gammas de ⁶⁰Co.....	40
6.1.1 Estimulación en la germinación y número de brotes de los embriones inmaduros irradiados.....	40
6.1.2 Radiosensibilidad en embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i>	42
6.1.2.1 Determinación de la DL ₅₀ y la DL ₉₉ de embriones inmaduros	43
6.1.2.2 Determinación de la reducción de crecimiento (RC) en embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i>	44
6.1.3 Análisis de componentes principales en cuatro variables vegetativas de plántulas <i>in vitro</i> de embriones inmaduros.	49
6.2 Comportamiento de callos irradiados con gammas de ⁶⁰ Co a partir de embriones inmaduros	51
6.2.1 Supervivencia de callos irradiados.....	51
6.2.2 Comportamiento del peso y volumen de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.....	51
6.2.3 Radiosensibilidad en callos a partir de embriones inmaduros	52
6.2.3.1 Estimación de la DL ₅₀ y DL ₉₉ de callos irradiados a partir de embriones inmaduros	52
6.2.3.2 RC ₂₅ , RC ₅₀ y RC ₇₅ en peso y volumen de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.	54
6.2.4 Análisis de componentes principales para peso y volumen de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.	56
6.3 Comportamiento de callos M ₂ V ₁ a partir de yemas de vitroplantas M ₁ V ₁ de <i>V. planifolia</i>	56
6.3.1 Respuesta y desarrollo de callos M ₂ V ₁ a partir de yemas de vitroplantas M ₁ V ₁	56
6.3.2 Radiosensibilidad de callos M ₂ V ₁ a partir de yemas de vitroplantas M ₁ V ₁ de <i>V. planifolia</i>	60
6.3.2.1 Estimación de la DL ₅₀ de callos M ₂ V ₁ a partir de yemas de vitroplantas M ₁ V ₁ de <i>V. planifolia</i>	60
6.3.2.2 Determinación de la RC ₂₅ , RC ₅₀ y RC ₇₅ en vitroplantas a partir de callos de yemas de <i>V.</i> <i>planifolia</i>	61
6.3.3 Componentes principales de vitroplantas de callos M ₂ V ₁ irradiados a partir de yemas M ₁ V ₁ de <i>V.</i> <i>planifolia</i>	64
6.4 Comportamiento de embriones, callos y vitroplantas sometidos a irradiación con ⁶⁰ Co.....	64
6.4.1 Comportamiento de vitroplantas M ₁ a partir de embriones inmaduros.....	64
6.4.2 Desarrollo de callos irradiados a partir de embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i>	66

6.4.3 Vitroplantas M_2V_1 desarrolladas de callos a partir de yemas de vitroplantas M_1V_1 de <i>V. planifolia</i>	68
VII. CONCLUSIONES	70
VIII. BIBLIOGRAFÍA	71

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Germinación de embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i> . sometidas a irradiación de ^{60}Co	41
Cuadro 2. Número de brotes <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i> a diferentes dosis de radiación gamma.....	42
Cuadro 3. Determinación de la DL_{50} y DL_{99} de embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i>	43
Cuadro 4. Determinación de la RC_{25} , RC_{50} Y RC_{75} en longitud de plántula.....	45
Cuadro 5. Determinación de la RC_{25} , RC_{50} Y RC_{75} en número de hojas.....	46
Cuadro 6. RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} en número de yemas de <i>V. planifolia</i>	48
Cuadro 7. Determinación de la RC_{25} , RC_{50} Y RC_{75} en distancia entrenudos.....	48
Cuadro 8. Supervivencia de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.....	51
Cuadro 9. Promedios de peso y volumen de callos a partir de embriones inmaduros irradiados a distintas dosis con ^{60}C	52
Cuadro 10. DL_{50} para callo de embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i> irradiados con ^{60}C	53
Cuadro 11. Supervivencia y brotación de callos M_2V_1 de <i>V. planifolia</i>	58
Cuadro 12. Medias de desarrollo de vitroplantas M_2V_1 a partir de callos de <i>V. planifolia</i>	59
Cuadro 13. Análisis de la DL_{50} para callos M_2V_1 a partir de callos de yema M_1V	60
Cuadro 14. Cuadro Tukey de variables de vitroplantas de <i>V. planifolia</i> a partir de embriones inmaduros	65
Cuadro 15. Cuadro Tukey de variables de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.....	67
Cuadro 16. Cuadro Tukey de variables de vitroplantas M_2V_1 desarrolladas a partir de callos de yema.....	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tratamientos de callos M ₂ V ₁ a partir de yemas de vitroplantas M ₁ V ₁	34
Figura 2. Comportamiento de embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i> irradiados con ⁶⁰ Co.....	41
Figura 3. Comportamiento de la DL ₅₀ y la DL ₉₉ en embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i>	43
Figura 4. Curva de RC ₂₅ , RC ₅₀ Y RC ₇₅ en longitud de plántula.....	43
Figura 5. Curva de RC ₂₅ , RC ₅₀ Y RC ₇₅ en número de hojas.....	47
Figura 6. Curva de RC ₂₅ , RC ₅₀ Y RC ₇₅ en número de yemas.....	48
Figura 7. Curva de RC ₂₅ , RC ₅₀ Y RC ₇₅ en distancia de entrenudos.....	49
Figura 8. Análisis de componentes principales de vitroplantas M ₁	50
Figura 9. Determinación de la DL ₅₀ y DL ₉₉ para callos irradiados a partir de embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i>	53
Figura 10. RC ₂₅ , RC ₅₀ y RC ₇₅ en peso de callos a partir de embriones inmaduros.....	54
Figura 11. RC ₂₅ , RC ₅₀ y RC ₇₅ en volumen de callos a partir de embriones inmaduros.....	55
Figura 12. Análisis de componentes principales para peso y volumen de callos a partir de embriones inmaduros de <i>V. planifolia</i>	56
Figura 13. Determinación de la DL ₅₀ para callos M ₂ V ₁ de yemas M ₁ V ₁	61
Figura 14. RC ₂₅ , RC ₅₀ y RC ₇₅ en longitud de vitroplanta a partir de callos M ₂ V ₁	62
Figura 15. RC ₂₅ , RC ₅₀ y RC ₇₅ en número de hojas de vitroplanta M ₂ V ₁	62
Figura 16. RC ₂₅ , RC ₅₀ y RC ₇₅ en número de raíces de vitroplanta M ₂ V ₁	63
Figura 17. Análisis de componentes principales de callos M ₂ V ₁ irradiados de yemas M ₁ V ₁	64

RESUMEN

Los recursos fitogenéticos para la alimentación y agricultura (RFAA) son esenciales para la sostenibilidad agrícola y la seguridad alimentaria global, dentro de ellos se encuentra *Vanilla planifolia*. Actualmente, esta especie enfrenta desafíos como poca variabilidad genética y retos para adaptarse al cambio climático, siendo la mutagénesis radioinducida con ^{60}Co y el cultivo *in vitro*, técnicas prometedoras para ampliar su variabilidad genética y mejorar la reproducción de *V. planifolia*.

El estudio tuvo como objetivo evaluar la radiosensibilidad de embriones inmaduros y callos de *V. planifolia* irradiados con ^{60}Co . Se determinó la DL_{50} y DL_{99} , así como las GR_{25} , GR_{50} y GR_{75} , además de analizar los cambios morfológicos en las plantas irradiadas. Los ensayos se realizaron en condiciones *in vitro*, utilizando embriones inmaduros, callos a partir de embriones inmaduros y callos M_2V_1 a partir de yemas de vitroplantas M_1V_1 . Estos materiales fueron irradiados a distintas dosis de ^{60}Co y se analizaron las variables, longitud, número de hojas, yemas y distancia entre nudos de las vitroplantas, los datos fueron analizados mediante un ANOVA y pruebas de Tukey.

La radiosensibilidad en embriones inmaduros y callos *in vitro* a partir de embriones inmaduros se registró a una dosis de 4 Gy, considerando la DL_{50} , RC_{50} y desarrollo de callos y vitroplantas. De manera general, considerando variables del comportamiento del desarrollo de callos, brotes y vitroplantas formadas de M_1V_1 y M_2V_1 , se recomienda una dosis de irradiación con ^{60}Co de 4 Gy.

Palabras clave: *V. planifolia*, mutagénesis, radiación, callogénesis, radiosensibilidad.

ABSTRACT

Plant genetic resources for food and agriculture (PGRFA) are essential for agricultural sustainability and global food security, and among them is *Vanilla planifolia*. Currently, this species faces challenges such as low genetic variability and difficulties adapting to climate change. Radioinduced mutagenesis using ^{60}Co and in vitro culture are promising techniques for increasing its genetic variability and improving the reproduction of *V. planifolia*.

This study aimed to evaluate the radiosensitivity of immature embryos and calluses of *V. planifolia* irradiated with ^{60}Co . The LD₅₀ and LD₉₉ were determined, as well as GR₂₅, GR₅₀, and GR₇₅, in addition to analyzing the morphological changes in irradiated plants. The experiments were conducted under in vitro conditions, using immature embryos, calluses derived from immature embryos, and M₂V₁ calluses obtained from M₁V₁ vitroplant buds. These materials were irradiated at different doses of ^{60}Co , and variables such as plantlet length, number of leaves, buds, and internode distance were analyzed. The data were processed using ANOVA and Tukey's tests.

Radiosensitivity in immature embryos and in vitro-derived calluses from immature embryos was observed at a dose of 4 Gy, based on LD₅₀, RC₅₀, and the development of calluses and vitroplants. Overall, considering the growth behavior of calluses, shoots, and vitroplants formed in M₁V₁ and M₂V₁, an irradiation dose of 4 Gy with ^{60}Co is recommended.

Keywords: *V. planifolia*, mutagenesis, radiation, callogenesis, radiosensitivity.

I.INTRODUCCIÓN

Los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA) se definen como el material genético de origen vegetal que tiene un valor real o potencial destinado a la alimentación y la agricultura (SADER, 2020). Los RFAA han sido conservados y desarrollados por los agricultores de forma tradicional y son la base para desarrollar nuevas variedades y tecnologías. Se utilizan para la alimentación humana y animal, para fibras, vestimenta, vivienda y energía. La conservación y el uso sostenible de los RFAA son necesarios para garantizar la producción agrícola y afrontar los crecientes desafíos ambientales y el cambio climático. A largo plazo, la pérdida de estos recursos plantea una grave amenaza para seguridad alimentaria mundial (Roque *et al.*,2016; SADER,2020).

En la actualidad, México es considerado como uno de los países con mayor diversidad de recursos fitogenéticos; posee una vasta riqueza en especies de plantas, incluyendo a las de alto valor económico y social como maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), chile (*Capsicum annum*) y cacao (*Theobroma cacao*), entre otros (Zavala, 2006). Sin embargo, existen especies que aún no se han sido estudiadas ampliamente como son los quelites (*Amaranthus hybridus*), amaranto (*Amaranthus*), romeritos (*Suaeda torreyana*) y vainilla (*Vanilla planifolia*) y que representan una importancia cultural y económica (Roque *et al.*, 2016).

V. planifolia se considera uno de los recursos genéticos más importantes a nivel mundial por su impacto económico, ecológico y social, además de ser considerado un cultivo fundamental para las comunidades indígenas y rurales del trópico de México, especialmente la cultura Totonaca que se estableció en la región del Totonacapan (Bory *et al.*, 2016). La vainilla es considerada en México una especie endémica, por lo cual está protegida por las fuertes afectaciones que ha sufrido en su hábitat (Bello *et al.*, 2015).

Dentro de los factores que han contribuido a esta reducción de variedades se encuentra su limitante propagación vegetativa, la necesidad de polinizarse manualmente, la colecta excesiva e ilegal, así como el uso incorrecto y excesivo de plaguicidas que han reducido el

número de insectos polinizadores y el cambio climático, los cuales han dificultado a las producciones y amenazando los recursos fitogenéticos aumentando con esto la pérdida de la diversidad genética mundial para la alimentación y la agricultura (Ramírez *et al.*, 2010).

La inducción de variabilidad genética mediante mutagénesis radioinducida con Cobalto 60 es una técnica que ha sido utilizada de manera efectiva, liberándose actualmente más de 3000 nuevas variedades en varios cultivos a nivel mundial, de los cuales destacan las plantas que se propagan vegetativamente (Sivasankar *et al.*, 2021).

El mejoramiento genético mediante mutagénesis radioinducida, implica el seguimiento del desarrollo vegetativo y reproductivo de cada uno de los individuos después de la irradiación, como pueden ser cambios en la velocidad de crecimiento, número de entrenudos, tamaño, forma, color, entre otros, ya que estos pueden conducir a la identificación de un posible mutante (Reyes *et al.*, 2018). Castillo-Martínez *et al.* (2018), menciona que los agentes mutagénicos se han utilizado para inducir variabilidad en programas de mejoramiento genético de diversas especies como el aguacate (*Persea americana* Mill), trigo (*Triticum aestivum* L.), plátano (*Musa paradisiaca* L.), ajo (*Allium sativum* L.), así como incluso en violeta africana (*Saintpaulia ionantha* H. Wendel).

De acuerdo con González y Aguirre (2011), mencionan que en la vainilla existen limitantes para su propagación sexual como la baja o nula germinación de la semilla, lo cual dificulta la multiplicación con altos índices de variación genética.

Considerando la baja variabilidad genética existente en las poblaciones de vainilla debido a su tipo de reproducción asexual, el objetivo del presente trabajo es utilizar la mutagénesis radioinducida con Cobalto 60 para ampliar la variabilidad genética y causar una radio estimulación en sus diferentes estados de desarrollo vegetativo.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Estudiar la radiosensibilidad en embriones inmaduros y en callos como explantes en cultivo *in vitro* de *V. planifolia* a diferentes dosis de radiación gamma con ^{60}Co .

2.2 Objetivos específicos

- Establecer la curva de radiosensibilidad en embriones inmaduros y callos como explantes de *V. planifolia* determinando la dosis letal media (DL₅₀ y DL₉₉) y las reducciones de crecimiento (RC₂₅, RC₅₀, RC₇₅).
- Obtener plántulas *in vitro* de *V. planifolia* a partir de embriones inmaduros y callos como explantes irradiados con ^{60}Co .
- Evaluar los cambios morfológicos en callos y plántulas *in vitro* irradiadas con ^{60}Co .

III. HIPÓTESIS

La aplicación de radiación gamma con ^{60}Co a embriones inmaduros y callos como explantes encultivo *in vitro* de *V. planifolia* inducirá cambios en el desarrollo de plántulas y a nivel morfológico.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Recursos fitogenéticos de México

Los recursos genéticos vegetales para la alimentación y la agricultura son la base biológica que sustenta la producción agrícola y la seguridad alimentaria a nivel global. Estos recursos representan la materia prima esencial tanto para los agricultores, como para los fitomejoradores (FAO, 2020). La variabilidad genética que poseen permite que los cultivos y las variedades se ajusten a condiciones en constante cambio, ayudándolos a superar desafíos relacionados con plagas, enfermedades y factores de estrés abióticos. Estos recursos genéticos son clave para asegurar una producción agrícola sostenible. No existe una incompatibilidad fundamental entre la conservación y el uso de estos recursos; de hecho, es crucial que estas actividades se complementen por completo (FAO, 2020; SNICS, 2020).

El término recursos genéticos hace referencia a cualquier organismo de origen vegetal, animal, microbiano o de otro tipo que contenga unidades de herencia funcionales con un valor potencial, ya sea en el presente o en el futuro (ONU, 1992). Este concepto está profundamente relacionado con el de biodiversidad. De manera similar, la agrobiodiversidad abarca todos los componentes de la diversidad biológica relacionados con la producción en sistemas agrícolas, lo que incluye la variedad y variabilidad de plantas, animales y microorganismos. Estos se organizan en tres niveles: genes, especies y ecosistemas, los cuales son esenciales para mantener las funciones, estructuras y procesos clave en los agroecosistemas (Jarvis *et al.*, 2007). De manera estrecha con la agrobiodiversidad, el concepto de recursos fitogenéticos abarca la diversidad genética dentro del reino vegetal, la cual tiene un valor real o potencial tanto en el presente como en el futuro (Rossi, 2007).

De este modo, los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA) forman la base biológica que sustenta tanto la producción agrícola como la seguridad alimentaria a nivel global. Estos recursos son la principal materia prima para los agricultores, pero también para los fitomejoradores, ya que ellos logran que las nuevas variedades se adapten a condiciones variables y superen desafíos como plagas, enfermedades y factores de

estrés abiótico (SNICS, 2020).

La riqueza de los recursos fitogenéticos en México es el resultado de miles de años de interacción entre las personas y su entorno natural. Este país se destaca como uno de los principales centros de origen y diversificación de plantas cultivadas a nivel global, siendo reconocido por haber domesticado especies de gran relevancia económica y alimentaria, tales como el maíz (*Zea mays*), el frijol (*Phaseolus spp.*), el chile (*Capsicum spp.*) y el aguacate (*Persea americana*). Estos cultivos no solo son esenciales en la alimentación mexicana, sino que su diversidad genética tiene un valor crucial a nivel mundial, ya que contribuye al mejoramiento de los cultivos para enfrentar retos como el cambio climático, las plagas y las enfermedades (Lira *et al.*, 2020).

En términos de superficie cosechada y valor de producción, el maíz y el frijol son, sin duda, los dos cultivos nativos más relevantes desde un punto de vista económico. El maíz abarca 6.690 millones de hectáreas cosechadas, generando un valor de 106,245 millones de pesos, mientras que el frijol cubre 1.207 millones de hectáreas con un valor de 13,040 millones de pesos. Además, ambas especies tienen a México como su lugar de origen, así como como centro de diversidad y domesticación (Doebley, 2004; Gepts *et al.*, 1991). Desde la época prehispánica, han sido fundamentales y seguirán siendo pilares de la economía y la alimentación en el país. Tanto el maíz como el frijol son contribuciones significativas de Mesoamérica a la agricultura y la alimentación global; de acuerdo con los informes de la FAO (1998), forman parte de los 30 cultivos más relevantes en la producción de alimentos a nivel mundial, ocupando el primer lugar el maíz y el decimosexto el frijol.

Otros cultivos significativos en México incluyen el amaranto (*Amaranthus spp.*) y la vainilla (*Vanilla planifolia*). El amaranto, que se considera un pseudocereal, es muy nutritivo y ha ganado reconocimiento recientemente debido a sus beneficios alimentarios y su capacidad para crecer en condiciones desfavorables. Como centro de origen del amaranto, México cuenta con una rica diversidad de variedades que pueden jugar un papel crucial en la lucha contra la inseguridad alimentaria (Espitia-Rangel *et al.*, 2020). En cuanto a la vainilla, es una de las especias más apreciadas en todo el mundo, con su origen vinculado a la región

de Totonacapan en Veracruz. A pesar de los desafíos que enfrenta el país en su producción por la competencia internacional, la conservación y el mejoramiento genético de la vainilla han sido temas importantes en años recientes (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2020).

Además de las especies anteriores, México cuenta con una notable diversidad de especies frutales, entre las que destacan la guayaba (*Psidium guajava*), la papaya (*Carica papaya*) y la pitahaya (*Hylocereus spp.*), las cuales son muy valoradas tanto para el consumo local como para el comercio internacional. La conservación de los recursos fitogenéticos de estas especies, en su forma domesticada y en sus parientes silvestres, es esencial para el desarrollo de nuevas variedades comerciales que puedan afrontar los desafíos ambientales venideros (FAO, 2021).

4.1.1 Situación política nacional de los recursos fitogenéticos en México.

En los últimos veinte años, se han logrado avances significativos en la gestión de los recursos fitogenéticos en México. Uno de los hitos fue la inclusión de la preservación de la diversidad biológica y, en particular, del material genético en el Plan Nacional de Desarrollo 2001-2006, con el objetivo de “promover el acceso a recursos genéticos como activos fundamentales para el desarrollo del país.” Otro paso relevante fue el establecimiento del Artículo 102 de la Ley de Desarrollo Rural Sustentable, que busca coordinar “políticas, acciones y acuerdos internacionales sobre conservación, acceso, uso y manejo integral de los recursos fitogenéticos” (SNICS 2020; SADER, 2021).

Asimismo, se implementó un programa especial por parte de SAGARPA, actualmente conocida como Secretaría de agricultura y Desarrollo Rural (AGRICULTURA), llamado Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la agricultura (SINAFERI). Este programa funciona como un mecanismo para integrar esfuerzos entre diversas instituciones, organizaciones, universidades y agricultores, con el fin de promover la conservación y el uso sostenible de los recursos fitogenéticos. Más recientemente, México firmó el Protocolo de Nagoya, que establece lineamientos sobre el acceso a recursos genéticos y la distribución justa y equitativa de los beneficios que derivan de su uso (SNICS,2020; FAO, 2021).

A pesar de que México carece de una legislación específica que aborde de manera integral los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, existen diversas normativas relacionadas que establecen criterios generales para su acceso y gestión. La Ley de Desarrollo Rural Sustentable es la única que menciona explícitamente el tema, designando al Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) como la entidad encargada de coordinar políticas y acciones en este ámbito, y especificando las condiciones de acceso y uso de estos recursos (SADER, 2021).

Entre las leyes nacionales relevantes para los recursos fitogenéticos en el contexto de la alimentación y la agricultura se encuentran: la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, la Ley agraria, la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, la Ley de Cooperación Internacional para el Desarrollo, la Ley de Desarrollo Rural Sustentable, la Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas, la Ley Federal de Protección a la Propiedad de Semillas, la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, la Ley Federal de Variedades Vegetales, la Ley Federal para el Fomento y Protección del Maíz Nativo, la Ley General del Cambio Climático, y la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (SADER 2021; SNICS, 2020).

4.1.2 Plan nacional de acción de los recursos genéticos agrícolas.

El Plan Nacional de Acción para los Recursos Genéticos Agrícolas se organiza en cuatro áreas clave: conservación en sus hábitats naturales y fuera de ellos, uso sostenible y fortalecimiento de capacidades. Este plan se fundamenta en las 18 directrices del Segundo Plan de Acción Mundial para los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, propuesto por la FAO. Fue desarrollado por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), a través del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) (SNICS, 2021).

La estructura de este plan está diseñada para abordar la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos a nivel comunitario, regional y nacional, priorizando actividades específicas. La implementación del Plan Nacional de Acción se enfoca en

cultivos que son nativos de México, así como en aquellos que han sido introducidos y han generado variaciones genéticas en el país (SNICS, 2021).

Hasta el momento, se ha establecido una estrategia de atención que funciona mediante redes enfocadas en diferentes cultivos y temas. En total, hay 45 redes agrupadas en cinco microrredes: básicas o industriales, hortalizas, impulso, ornamentales y frutales, además de una red temática dedicada a los centros de conservación. Este enfoque se basa en el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la agricultura (SINAREFI), coordinado por el SNICS desde 2002, que se revitalizó en 2020 con la creación del Comité Sectorial de Recursos Genéticos para la Alimentación y la agricultura y su Subcomité de Recursos Genéticos agrícolas (SNICS, 2020).

Un objetivo clave del Segundo Plan de Acción Mundial es asegurar la conservación de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la agricultura (RFAA) como fundamento de la seguridad alimentaria, la agricultura sostenible y la lucha contra la pobreza, estableciendo así un marco para su uso tanto presente como futuro (SNICS, 2021). Para lograr este objetivo, se implementan dos enfoques de conservación: *ex situ* e *in situ* (ONU, 1992).

Conservación in situ. Esta presenta varias ventajas, entre las que destacan la preservación del material genético y de los procesos que generan la diversidad, la continua disponibilidad de variación genética para los agricultores que participan en programas de mejoramiento genético, y la posibilidad de conservar múltiples especies en un solo lugar, lo que puede resultar más económico y efectivo que la conservación *ex situ* en determinados casos (Jarvis *et al.*, 2006; Pezoa, 2001).

El área de conservación *in situ* incluye cuatro actividades prioritarias: la elaboración de estudios e inventarios de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la agricultura (RFAA), el apoyo al manejo y mejoramiento de estos recursos en las fincas, la asistencia a agricultores en situaciones de emergencia para restablecer sus cultivos y la promoción de la

gestión *in situ* de especies silvestres relacionadas y plantas silvestres comestibles (SADER, 2021).

Conservación ex situ. Implica la preservación de muestras representativas de especies o cultivos en ambientes controlados fuera de sus hábitats naturales, utilizando tecnologías adecuadas para mantener su viabilidad a lo largo del tiempo (Frankel y Soulé, 1992). A nivel global, este enfoque ha sido el más comúnmente utilizado para la conservación de recursos genéticos, siendo los bancos de germoplasma una herramienta clave para la preservación de semillas de plantas, hongos y microorganismos (Lascuráin *et al.*, 2009). La conservación de semillas se centra en las ortodoxas, que son almacenadas en contenedores herméticos a bajas temperaturas, así como en técnicas de crioconservación. Además, se cuenta con colecciones de propágulos vegetativos y cultivos de tejidos *in vitro*. En menor medida, la conservación *ex situ* también se lleva a cabo en bancos de germoplasma en campo (SADER, 2021).

Las actividades prioritarias para la conservación *ex situ* incluyen el apoyo en la recolección selectiva de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, así como el mantenimiento y expansión de la conservación de germoplasma, regeneración y multiplicación de las muestras conservadas (SNICS, 2021).

Utilización sostenible. El objetivo de este es ofrecer recomendaciones sobre la utilización más efectiva de los recursos fitogenéticos, considerando su estado de conservación, abundancia y distribución a partir de un diagnóstico nacional que analice aspectos geográficos, etnobotánicos y utilitarios, así como las condiciones ambientales y socioeconómicas de las diversas regiones del país (SNICS, 2018).

Las actividades prioritarias en esta área incluyen aumentar la caracterización y evaluación, así como el desarrollo de subconjuntos específicos de colecciones para facilitar su uso, apoyar el mejoramiento genético, ampliar la base de directrices para integrar un catálogo nacional de variedades nativas y promover la diversificación de la producción agrícola y el aumento de la diversidad de cultivos para lograr una agricultura sostenible.

También se busca fomentar el desarrollo y comercialización de variedades, especialmente las nativas y las infrautilizadas, además de apoyar la producción y distribución de semillas (SNICS, 2021).

Creación de capacidades institucionales y humanas sostenibles. El Tercer Informe Nacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura de 2020 muestra un cambio significativo en esta área durante el periodo 2012-2019. En 2012 se inauguró el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), uno de los mayores bancos de conservación a nivel mundial (INIFAP, 2015).

Durante gran parte de este periodo, el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) fue gestionado por el SNICS y actuó como el principal mecanismo de coordinación para la conservación y uso sostenible de los recursos fitogenéticos en el país. Las redes de cultivo y temáticas formaron la unidad operativa del SINAREFI, aprovechando la funcionalidad de grupos interinstitucionales e interdisciplinarios. Las 44 redes en el plan estratégico del SINAREFI incluyeron acciones para la creación de capacidades (Gámez-Montiel *et al.*, 2017; Ramírez-Galindo *et al.*, 2016; Solís *et al.*, 2017; Solís *et al.*, 2018; Vera-Sánchez *et al.*, 2016).

Para el fortalecimiento de capacidades en RFAA durante el periodo 2021-2024, se han planteado cinco acciones, cada una basada en un análisis de la situación actual y orientada a objetivos y propuestas, que al implementarse resultarán en un aumento en la creación de capacidades en relación con los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en México (SNICS, 2021).

Las actividades prioritarias incluyen la creación y fortalecimiento de programas nacionales, promoción y fortalecimiento de redes sobre recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, desarrollo de sistemas integrales de información sobre estos recursos, elaboración de sistemas de vigilancia y salvaguarda de la diversidad genética y minimización de la erosión de los recursos, y el fortalecimiento de capacidades en materia

de recursos humanos, además de la sensibilización de la opinión pública sobre la importancia de estos recursos (SADER, 2021).

4.2. La vainilla como recurso fitogenético de México

En México y Centroamérica, la vainilla representa un recurso fitogenético de suma importancia, ya que ahí existen el clima y suelo favorables para su cultivo, así como la cantidad y distribución adecuada de la precipitación a lo largo del año (Flores *et al.*, 2016). En México, solamente *V. planifolia* se cultiva con fines comerciales, debido a que es la más demandada en la industria; su cultivo comercial se originó en la zona conocida como Totonacapan, que abarca parte de los estados de Veracruz y Puebla (Lubinsky *et al.*, 2008)

La vainilla es un recurso fitogenético clave debido a su diversidad genética, su complejidad en el cultivo, su valor económico y su papel ecológico. Originaria de la región de Mesoamérica, especialmente de México, la *Vanilla planifolia* ha sido domesticada por culturas indígenas durante siglos. Esta especie presenta una variabilidad genética significativa en sus formas silvestres, lo que ofrece un valioso reservorio de características que pueden ser utilizadas para la mejora genética y la adaptación a condiciones ambientales cambiantes. La variabilidad genética es un factor crucial para la sostenibilidad del cultivo, ya que permite el desarrollo de variedades resistentes a plagas, enfermedades y condiciones de estrés abiótico, como la sequía o el cambio climático (Bory *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2022).

Además de su importancia genética, la vainilla es una de las especias más valiosas del mundo, lo que le otorga un lugar prominente en la economía global. El proceso de polinización manual necesario para su producción, así como el prolongado período de maduración y el procesamiento posterior, hacen que el cultivo de vainilla sea extremadamente laborioso. Esta complejidad, sumada a la alta demanda internacional, contribuye a su elevado precio en el mercado. En particular, países como México, Madagascar e Indonesia se destacan como los principales productores de vainilla, aunque México sigue siendo importante debido a su estatus como centro de origen de la especie. La

creciente demanda global de vainilla natural frente a la sintética impulsa aún más su relevancia económica (Bory *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2010).

4.2.1 Valor cultural de la vainilla.

Vanilla planifolia una especie de orquídea originaria de México y América Central, se encuentra especialmente en las áreas tropicales de Veracruz (Bory *et al.*, 2016). Su valor principal radica en la vainillina, un compuesto extraído al procesar sus frutos, que tiene aplicaciones en industrias como la alimentaria, farmacéutica, cosmética, y perfumería, entre otras (Toth *et al.*, 2011). Además, el fruto de esta planta ha sido apreciado por las culturas mesoamericanas no solo por su aroma, sino también por sus usos en medicina, como tributo, y como condimento. Actualmente, la vainilla es considerada una planta de gran relevancia cultural en México, en particular en la región de Totonacapan, Veracruz (Lubinsky *et al.*, 2008).

La vainilla tiene un importante valor cultural en México, destacándose en la región del Totonacapan, Veracruz, la cual es reconocida como su lugar de origen. Los antiguos totonacas fueron los primeros en domesticar esta planta, cuyo cultivo está profundamente entrelazado con sus tradiciones y creencias. La palabra en náhuatl para vainilla, *tlilxochitl*, significa "flor negra", refiriéndose a la apariencia de las vainas una vez secadas. Para los totonacas, la vainilla no solo era un bien comercial, sino que también tenía un significado espiritual y ceremonial, siendo asociada con mitos que exaltan su origen sagrado (Rodríguez-López *et al.*, 2020).

El uso de la vainilla en ceremonias y ofrendas religiosas es uno de los aspectos más relevantes de su valor cultural. Los totonacas la ofrecían a sus deidades como un símbolo de respeto y reverencia, debido a las propiedades sagradas que le atribuían. Esta tradición aún persiste, sobre todo en comunidades indígenas, donde la planta sigue usándose en festividades como el día de muertos. Asimismo, la vainilla ha sido un ingrediente fundamental en la gastronomía local, presente en recetas tradicionales desde épocas prehispánicas (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2011).

Hoy en día, la vainilla sigue siendo un símbolo cultural en las comunidades totonacas, que han mantenido viva la tradición del cultivo y curado artesanal de esta planta. Las cooperativas locales y pequeños productores han resurgido el cultivo tradicional, preservando los métodos ancestrales, lo que ha permitido la creación de productos de alta calidad que son apreciados tanto a nivel local como internacional (Rodríguez-López *et al.*, 2020).

Además, la vainilla ha sido declarada Patrimonio Cultural Inmaterial de México por la UNESCO, lo que refuerza su importancia no solo como un recurso agrícola, sino también como una parte esencial de la identidad cultural de los totonacas. Esta distinción también reconoce los esfuerzos por preservar las técnicas tradicionales de cultivo en un entorno desafiante debido a la competencia internacional y la degradación ambiental (Santillán *et al.*, 2018).

4.2.2 Valor económico de la vainilla

La vainilla ha desempeñado un papel crucial en la economía de México, especialmente en regiones como Totonacapan, Veracruz. A pesar de las dificultades impuestas por la competencia de países como Madagascar, que domina el mercado global de vainilla, México es reconocido por la alta calidad de su producción. Esto les permite a los productores mexicanos acceder a mercados especializados que valoran tanto la calidad del producto como las prácticas agrícolas tradicionales. En los últimos años, cooperativas y pequeños productores han promovido métodos de producción orgánica y comercio justo, lo que busca aumentar el valor del producto y mejorar los ingresos de las comunidades rurales que dependen de este cultivo (Luis-Rojas *et al.*, 2020).

La creciente demanda de vainilla natural se ha visto impulsada por una tendencia global hacia productos más sostenibles y naturales. Esto ha creado oportunidades para los productores mexicanos que desean diferenciarse en un mercado saturado de vainilla sintética y productos de Madagascar. Además, el desarrollo de proyectos de turismo rural relacionados con la vainilla ha contribuido significativamente al valor económico de este cultivo,

brindando a los visitantes la oportunidad de participar en experiencias educativas y culturales sobre su producción, lo que amplía las fuentes de ingresos para las comunidades locales (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2011).

En las últimas décadas, la vainilla ha adquirido el estatus de uno de los aromatizantes más populares en la repostería, heladería y diversas industrias como la vinícola, tabacalera y de perfumes. Actualmente, se considera uno de los productos agrícolas con mayor valor comercial en el mundo, con el precio del kilo de vainilla verde rondando los 10,000 pesos en el mercado (SADER, 2023).

Entre 2017 y 2021, México contó con aproximadamente 3,000 productores que generaron un promedio de 546 toneladas de vainilla entera al año, siendo Veracruz la entidad que más produce, con alrededor de 417 toneladas (76.4%). Le siguen Puebla con un 11.8% y Oaxaca con un 10.2% de la producción total (SADER, 2023).

La vainilla también se ha integrado en iniciativas de desarrollo económico sostenible, tanto por parte del gobierno como de organizaciones internacionales. Estos esfuerzos buscan no solo aumentar la rentabilidad del cultivo, sino también proteger la biodiversidad y mantener las tradiciones culturales relacionadas con la producción de vainilla. Así, el valor económico de la vainilla se mide no solo en términos de su precio en el mercado, sino también por su capacidad para generar empleo y preservar el patrimonio cultural de las comunidades rurales (Rodríguez-Deméneghi *et al.*, 2023).

A pesar de su relevancia, la producción mundial de extractos de vainilla natural es limitada, alcanzando solo cerca de 100 toneladas, mientras que el resto corresponde a sustitutos sintéticos (Retes *et al.*, 2015). La producción nacional de vainilla creció de 257 toneladas en 2003 a 494.69 toneladas en 2018, mostrando un crecimiento anual del 4.78%, superior al crecimiento poblacional de 1.9% (SIAP, 2017). Aunque México es el centro de origen y diversidad de la vainilla, y cuenta con condiciones óptimas para su cultivo, así como un profundo conocimiento técnico y tradicional, principalmente en las culturas Totonaca y

náhuatl (Díaz *et al.*, 2017).

En 2017, la producción de vainilla en México fue de 514.94 toneladas, colocándolo como el cuarto productor mundial, después de Madagascar, Indonesia y China, que produjeron en ese año 3,227, 2,402 y 662 toneladas respectivamente (FAO, 2017). Madagascar continúa dominando el mercado mundial en términos de volumen de producción, obligando a otros países productores a adaptarse a su situación. Las principales regiones productoras en México son Veracruz (76.08%), Puebla (11.55%), Oaxaca (10.5%) y San Luis Potosí (1.87%) (SIAP, 2018).

4.2.3 Valor ecológico de la vainilla

La vainilla, específicamente *Vanilla planifolia*, es un cultivo de alto valor ecológico, especialmente en los ecosistemas tropicales de los cuales es nativa. En regiones como Totonacapan, Veracruz, la vainilla es más que un motor económico: también desempeña un rol fundamental en la conservación de la biodiversidad y en la sostenibilidad de los ecosistemas locales. La vainilla es una orquídea epífita que crece de manera natural en las selvas tropicales, y su cultivo requiere condiciones específicas que promueven la preservación de los bosques y la vida silvestre (Gómez y Moreno, 2012). A diferencia de otros cultivos que demandan deforestación y expansión agrícola, la vainilla se cultiva en sistemas agroforestales, contribuyendo a la conservación de la flora y fauna local al integrarse con otros árboles y plantas. Esta relación simbiótica permite que el cultivo de vainilla no sólo sea una actividad económica, sino una estrategia ecológica que fomenta la biodiversidad (Lubinsky *et al.*, 2008).

Además, el cultivo de la vainilla tiene un impacto directo en la salud del suelo y la calidad del agua. Al ser una planta que prospera en ambientes tropicales húmedos, la vainilla contribuye al control de la erosión del suelo. La cobertura vegetal que proporciona ayuda a mantener el suelo en su lugar, evitando la pérdida de nutrientes y el desgaste que suelen generar otros cultivos intensivos. Este efecto positivo se magnifica en sistemas agroforestales, donde el uso de árboles y vegetación adicional contribuye a la retención de humedad y a la mejora de la estructura del suelo, factores clave en la prevención de la

desertificación y en el mantenimiento de los ciclos hídricos locales (Ramírez-Malagón *et al.*, 2019).

Tras la domesticación de la vainilla en México, surgieron distintos sistemas de producción, como el sistema de "acahual" o tradicional, en zonas de recuperación de flora endémica. Además, se desarrollaron métodos bajo tutores, donde se utilizan árboles de cítricos como soporte para las plantas, sistemas semi tecnificados que emplean invernaderos con malla sombra, y finalmente, invernaderos completamente tecnificados (Díaz-Bautista *et al.*, 2019). Una de las principales diferencias entre estos sistemas es el rendimiento, ya que, por ejemplo, el sistema con tutor cítrico produce alrededor de 230 kg de vainas por hectárea, mientras que los sistemas semi tecnificados pueden alcanzar los 435 kg por hectárea (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2009). Espinoza-Pérez *et al.* (2018) señalaron que los productores más eficientes son aquellos que consideran los ingresos generados por este cultivo, destacando aquellos que combinan tutores cítricos con malla sombra, lo que optimiza la producción y rentabilidad.

El cultivo de vainilla también tiene un valor importante en la protección de la biodiversidad local. Sin embargo, la ausencia de su polinizador natural, como las abejas pertenecientes al género *Euglossa*, dificultó la obtención de vainas de vainilla (Watteyn *et al.*, 2020), fue hasta que en el año 1841 que se logró la polinización artificial de esta especie (Lubinsky *et al.*, 2006). Al promover la conservación de estas especies, el cultivo de vainilla contribuye indirectamente a la salud del ecosistema en su conjunto, demostrando su valor ecológico en las cadenas tróficas locales (Herrera-Cabrera, 2018).

La producción de vainilla bajo métodos tradicionales y orgánicos también refuerza el equilibrio entre las prácticas agrícolas y la conservación ambiental. En muchas comunidades productoras, como las ubicadas en Veracruz y Oaxaca, las cooperativas han adoptado prácticas de cultivo sostenible que no sólo respetan el entorno, sino que buscan activamente regenerarlo. Estas prácticas incluyen la rotación de cultivos, el uso de abonos orgánicos y la implementación de técnicas de curado artesanal que minimizan el impacto ambiental. A través de estas iniciativas, el cultivo de vainilla se convierte en un ejemplo de

agricultura sostenible que combina rentabilidad económica con la preservación ecológica, asegurando la continuidad de los ecosistemas tropicales (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2011).

Por todo lo anterior, la vainilla es un cultivo de alto valor ecológico que no solo impulsa la economía de las comunidades que la producen, sino que también juega un rol fundamental en la conservación del medio ambiente. Desde la protección de los suelos y fuentes de agua hasta la preservación de especies locales, su cultivo destaca como un modelo de sostenibilidad en las zonas tropicales donde prospera. Con un manejo adecuado, el cultivo de vainilla tiene el potencial de ser una herramienta clave en la lucha contra la degradación ambiental y en la promoción de la biodiversidad global (Rodríguez-Deméneghi *et al.*, 2023).

Sin embargo, debido a su método de propagación fundamentalmente vegetativa, su polinización y su manejo inadecuado, la variabilidad genética de esta especie es muy reducida siendo incluso alarmante y llevando a esta especie a estar en la categoría de alto grado de erosión genética (FAO, 1995) así las poblaciones silvestres de *V. planifolia* se encuentran clasificadas en la categoría de Protección Especial (CITES, 2017; SEMARNAT, 2010).

4.3 Problemática del cultivo de vainilla

Actualmente la vainilla se ha vuelto un cultivo con un fuerte interés para su investigación, especialmente para su mejoramiento genético, debido a la alta demanda y rentabilidad que tiene, pudiéndose comparar con otros cultivos de gran importancia en México como los cítricos, el caféo incluso el plátano. El cultivo de la vainilla tiene limitantes tanto bióticas como abiótica, así como limitantes en su producción y mejoramiento genético (Ramírez *et al.* 2010).

Uno de los principales desafíos es su dependencia de condiciones climáticas específicas, que requieren un ambiente tropical con alta humedad y temperaturas estables. Cambios en el clima, como sequías o lluvias excesivas, pueden afectar drásticamente el rendimiento de las cosechas. Esta vulnerabilidad a la variabilidad climática se traduce en

incertidumbres para los agricultores que dependen de este cultivo (Martínez *et al.*, 2021; Morales *et al.*, 2022).

Entre las limitantes bióticas, las plagas y enfermedades son un problema constante. La vainilla es susceptible a diversas enfermedades, plagas y hongos que afectan su producción y calidad. Entre las principales bacterias que atacan a *Vanilla planifolia*, se encuentra *Pseudomonas syringae*, que causa manchas en las hojas y puede llevar a la muerte de la planta si no se controla adecuadamente (Charron *et al.*, 2018). Además, las plagas como los trips (*Frankliniella spp.*) y los ácaros (*Tetranychus spp.*) son comunes y pueden causar daños significativos en las hojas y las flores, comprometiendo la polinización y, por ende, la producción de vainilla. En cuanto a los hongos, *Fusarium* y *Phytophthora* son particularmente dañinos; el primero puede provocar la pudrición de las raíces y el tallo, mientras que el segundo causa enfermedades en el sistema vascular de la planta, lo que resulta en la caída de hojas y una disminución general en la salud de la planta (Guevara-Suarez *et al.*, 2022; Carbajal, 2023).

La reproducción de la vainilla también presenta sus desafíos. Aunque en su hábitat natural la polinización es realizada por abejas específicas, en otras regiones los productores deben recurrir a la polinización manual, lo que requiere habilidad y es laborioso. Este proceso incrementa los costos y limita la escalabilidad del cultivo. Además, la baja tasa de germinación de las semillas representa un reto adicional para los agricultores que desean expandir sus cultivos (Bautista-Aguilar *et al.*, 2021; Martínez-Santos *et al.*, 2021).

En el ámbito del mejoramiento genético, los esfuerzos para desarrollar variedades más resistentes han sido limitados. La escasa diversidad genética de los cultivos de vainilla impide la creación de nuevas variedades que puedan adaptarse mejor a diferentes condiciones y resistir plagas y enfermedades. Sin una investigación adecuada en genética y biotecnología, el cultivo de vainilla sigue siendo vulnerable a amenazas tanto bióticas como abióticas (Borbolla-Pérez *et al.*, 2016).

4.4 Estrategias de mejoramiento genético en vainilla

4.4.1 Mejoramiento por selección

Los avances obtenidos a través de estrategias de selección en el cultivo de vainilla han sido limitados debido, en parte, a la biología propia de la especie. Un esqueje de vainilla, por ejemplo, puede demorar entre tres y cinco años en florecer por primera vez, lo que extiende considerablemente el tiempo necesario para evaluar en campo los resultados del mejoramiento genético. Además, en el caso de los híbridos interespecíficos, puede ser necesario realizar retro cruzamientos, lo que prolonga aún más el proceso. Por estas razones, es crucial contar con herramientas que faciliten la selección temprana de características agronómicas valiosas, como la resistencia al *Fusarium* y la tolerancia a la sequía. La selección *in vitro* ha emergido como una opción viable para evaluar grandes cantidades de germoplasma, permitiendo identificar y multiplicar material genéticamente prometedor en un periodo de tiempo más corto (Menchaca *et al.*, 2011; Ramos-Castellá *et al.*, 2022)

Existen diferentes teorías sobre la domesticación de la vainilla en México. Una de las más aceptadas es que fue el pueblo totonaca el responsable de este proceso, aunque investigaciones como las de Colunga y Zizumbo (2004) sugieren que la selección y domesticación de la vainilla también pudo haberse iniciado en la región Maya. Este hallazgo plantea la posibilidad de que existieran múltiples centros de domesticación para la planta de vainilla dentro de los territorios de antiguos pueblos indígenas mexicanos.

En la región de Totonacapan se observa un proceso de selección distinto. Las vainas de especies como *V. pompona* y *V. insignis* presentan bajas concentraciones de vainillina, con 1,115 y 866 ppm respectivamente, así como de otros compuestos menores como el ácido p-hidroxibenzoico y el ácido vinílico (Herrera *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2012). En esta zona, el germoplasma de *V. planifolia* ha sido sometido a un proceso de selección a lo largo de generaciones, guiado por las preferencias sensoriales del pueblo totonaca. Al mismo tiempo, el sistema de reproducción vegetativa de la planta ha ayudado a conservar la variabilidad en el perfil aromático de las vainas, lo que ha contribuido a la preservación de sus características químicas típicas (Herrera *et al.*, 2012).

4.4.2 Mejoramiento por hibridación

Varias especies de vainilla tienen la capacidad de hibridarse fácilmente con *V. planifolia*, lo que puede resultar en características genéticas beneficiosas, como un incremento en el contenido de vainillina, resistencia a enfermedades y una floración más temprana. A pesar de que la creación de híbridos puede mejorar el rendimiento de las plantas, actualmente carecemos de herramientas moleculares básicas para esta especie. Los marcadores moleculares de ADN son el enfoque más eficiente para validar la descendencia híbrida, detectar híbridos en cultivos comerciales e identificar accesiones no reconocidas (Li *et al.*, 2020).

El primer esfuerzo documentado para establecer un programa de mejoramiento genético en América fue llevado a cabo por Childers *et al.* (1959). Este grupo buscó transferir genes que conferían resistencia a factores bióticos y al estrés hídrico mediante la hibridación de *V. planifolia* con especies silvestres de Puerto Rico. Sin embargo, la genética de los progenitores utilizados era muy distinta, lo que resultó en una compatibilidad bastante baja. Cabe señalar que otras especies como *V. pompona*, *V. insignis*, *V. inodora*, *V. tahitensis* y *V. odorata* se utilizan principalmente por su capacidad para producir vainillina. Un enfoque crucial es la creación de híbridos entre *V. planifolia* y estas especies para dotar de resistencia a patógenos, como *Fusarium oxysporum*, sin sacrificar la calidad de la vainillina. Esto permitiría combinar las características de *V. planifolia* con las de otras especies del mismo género, como *V. insignis*, que muestra resistencia a *F. oxysporum f. sp. vanillae* (Bautista-Aguilar *et al.*, 2022), *V. pompona*, que es resistente a la sequía, y *V. tahitensis*, también utilizada en la producción de saborizantes y fragancias (Ramos-Castellá e Iglesias-Andreu, 2022).

En estudios sobre *V. planifolia*, se ha investigado el mecanismo de infección de *F. oxysporum* (Koyyappurath *et al.*, 2015). Se ha propuesto que la hibridación para obtener genotipos resistentes es la estrategia más efectiva contra este patógeno (Fravel *et al.*, 2003). Hasta el momento, algunas especies de *Vanilla*, como *V. pompona*, *V. phaeantha*, *V. barbellata*, *V. aphylla* y *V. andamanica*, han demostrado un grado de resistencia a este

hongo (Divakaran *et al.*, 2006), lo que ha motivado la implementación de programas de hibridación para el desarrollo de genotipos resistentes.

En el Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO) de la Universidad Veracruzana, se realizaron cruzamientos interespecíficos entre *V. pompona* y *V. planifolia*, con tasas de germinación del 85% y 57.9%, respectivamente. En contraste, las semillas de autopolinización de *V. pompona* mostraron solo un 5.3% de germinación, y las de *V. planifolia* no germinaron. Las plantas híbridas mostraron mayor vigor que las obtenidas por autopolinización (Menchaca *et al.*, 2011).

Además, Hernández-Leal *et al.* (2024) realizó un estudio de la diversidad y estructura genética en híbridos intraespecíficos de cruce simple de vainilla en donde, mediante cuatro marcadores moleculares (ISSR) se estimó un 97% de varianza genética dentro de poblaciones y el 3% entre poblaciones, lo cual muestra que para la conservación de la especie se debe retener individuos por población.

El Instituto Indio de Investigación de Especies (IISR) ha trabajado en la creación de plantas que sean tolerantes a *F. oxysporum* y *P. meadii*. Los resultados indican que *V. andamanica* es tolerante a ambos patógenos, mientras que *V. aphylla* muestra resistencia a *P. meadii*. Con base en estos hallazgos, se estableció un programa de hibridación para generar híbridos de *V. planifolia* con estas especies (Jayakumar *et al.*, 2008). Se evaluaron estos materiales desde la perspectiva citogenética, morfológica y molecular para identificar genotipos prometedores. Se seleccionaron diez híbridos interespecíficos resistentes a *F. oxysporum* (Divakaran *et al.*, 2006).

En la Isla Reunión, se aplicó un método estandarizado para monitorear en campo la susceptibilidad de diferentes accesiones de *Vanilla* a la pudrición de raíces causada por *F. oxysporum*. Se evaluaron 18 especies e híbridos de cinco cruces distintas. Además, se realizó una prueba *in vitro* con 12 especies de *Vanilla* e híbridos de cinco cruces, así como un material de retro cruce. Este estudio se llevó a cabo con el objetivo de identificar accesiones resistentes y multiplicar material con alta resistencia a la pudrición de raíces.

Los resultados de campo mostraron que accesiones como *Vanilla sp.*, *V. pompona*, *V. bahiana*, *V. phaeantha*, *V. crenulata*, junto con tres accesiones de *V. planifolia*, presentaron mayor resistencia a *F. oxysporum*. En condiciones *in vitro*, se seleccionaron 19 de 103 genotipos con resistencia a *F. oxysporum*, de los cuales ocho eran de *V. planifolia*, y otros de *V. bahiana* y *V. pompona* (Koyyappurath *et al.*, 2015).

La fusión de protoplastos es otra técnica biotecnológica utilizada en este cultivo. Esta técnica permite la obtención de células sin pared celular gracias a un coctel enzimático. Para la vainilla, se aplicó una mezcla de celulosa, pectina y manitol a tejido mesófilo de hojas jóvenes. Una vez obtenidos, los protoplastos se fusionaron mediante electrofusión, que implica la aplicación de un pulso de corriente eléctrica (Ortega *et al.*, 2016). Esta técnica se ha empleado para crear híbridos somáticos entre *V. andamanica* y *V. planifolia* (Geetha, *et al.*, 2008; Divakaran *et al.*, 2016) y también entre protoplastos de *V. planifolia* y *V. pompona* (Ortega *et al.*, 2016). En ambos casos, la viabilidad de los protoplastos superó el 70%. Los híbridos somáticos son diferentes de los híbridos obtenidos a través de métodos sexuales, ya que pueden presentar variaciones a nivel nuclear y citoplasmático, lo que los convierte en una herramienta importante para el mejoramiento genético. Aunque ya se han establecido protocolos eficaces para el aislamiento y fusión de protoplastos en esta especie, es esencial seguir desarrollando el crecimiento y la proliferación de los híbridos somáticos (Ramos- Castellá *et al.*, 2022).

Finalmente, los marcadores de ADN se utilizan para analizar las diferencias en secuencias cortas de ADN entre individuos. Existen diversos tipos de marcadores, clasificados principalmente en dos grupos: dominantes y codominantes. La utilización de marcadores como RAPD, AFLP y SSR ha permitido distinguir claramente entre los individuos de *V. planifolia*, *V. tahitensis* y *V. pompona*, lo cual es esencial para el análisis genético de las variedades cultivadas de vainilla (Favre *et al.*, 2022; Besse *et al.*, 2004). Divakaran *et al.* (2006) han combinado el uso de RAPD y AFLP para evaluar la variabilidad y la naturaleza de los genotipos, así como la producción de híbridos entre *V. planifolia* y *V. aphylla*.

4.4.3 Mejoramiento por mutagénesis.

4.4.3.1 Técnicas para el mejoramiento genético

El mejoramiento mediante mutaciones inducidas es una herramienta valiosa y significativa que permite modificar ciertos genes mientras se mantiene intacta la información genética específica de la especie. Además de que se acelera el proceso de evolución (Guisen *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2013). Una mutación es cualquier cambio heredable en el material hereditario que no se puede explicar mediante segregación o recombinación (Griffiths., 2008). O bien, un mutante es un individuo en el que la secuencia de nucleótidos del ADN o su fenotipo han sido modificados (Sosa,1988).

Mediante la radiación y la determinación de las dosis letales medias e inhibitorias para la especie, así como utilizando bajas dosis de radiación, se han conseguido avances genéticos sin afectar la fisiología de la planta. Esto ha permitido estimular la brotación, germinación y aumentar la variabilidad genética de las plantas (Iglesias *et al.*, 2014). La mutagénesis se utiliza para mejorar las características de las plantas. Sus principales aplicaciones incluyen el desarrollo de resistencia a plagas y enfermedades (Duncan, 1998; Ángeles, 2014), resistencia a la salinidad y al estrés hídrico (Aguilar, 2013; Meco, 2015), así como el aumento de la variabilidad genética mediante la alteración de la secuencia del ADN (Antúnez *et al.*, 2017).

Las mutaciones pueden ser inducidas por mutágenos físicos y químicos. Los mutágenos físicos son radiaciones no-ionizantes o ionizantes como los rayos UV, X, gamma, alfa, beta y neutrones rápidos y lentos; mientras que los mutágenos químicos son como el etilmetanosulfonato(EMS), metilmetanosulfonato (MMS), fluoruro de hidrógeno (HF), hidroxilamina, entre otros (Pathirana, 2011; Shekale *et al.*, 2019). La combinación entre las técnicas nucleares y de cultivo *in vitro* ofrecen muchas ventajas como la estimulación e incrementos de las poblaciones en periodos de tiempo más cortos, así como la probabilidad de obtener clones en un solo explante (Bhat *et al.*; 2017).

El mejoramiento genético en plantas mediante técnicas nucleares es un enfoque

avanzado que utiliza la radiación o mutaciones inducidas para crear variabilidad genética. Dentro de estas técnicas se encuentra la mutagénesis inducida por radiación, esta técnica implica la exposición de semillas, plántulas, o tejido vegetal a radiación ionizante, como rayos gamma, rayos X, o neutrones, para inducir mutaciones (Ahumada-Flores *et al.*, 2020).

Sin embargo, un aspecto muy importante a cuidar al aplicar estas técnicas es la correcta selección del mutágeno, su dosis y tiempo de exposición, así como la planta y tejido a utilizar. Ya que a altas concentraciones o tiempos más largos la radiación puede provocar daños e incluso la muerte del material vegetal (Bermúdez *et al.*, 2020; Ghori *et al.*, 2020)

Las mutaciones resultantes pueden ser seleccionadas para desarrollar nuevas variedades con características deseables, como resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés, o mejor rendimiento y un ejemplo es la variedad de arroz “Shwe War Tun” en Myanmar que fue desarrollada utilizando esta técnica y ha demostrado una mayor tolerancia a la salinidad y un mayor rendimiento (Ahloowalia *et al.*; 2004).

Otra técnica es la mutagénesis utilizando neutrones los cuales son neutrones rápidos que inducen mutaciones en las plantas, es menos común que los rayos gamma, pero ha demostrado ser efectivo en algunos cultivos, generando mutaciones con un rango diferente de efectos que otras formas de radiación y se ha utilizado en el mejoramiento de variedades de cebada con mayores niveles de proteína (Forster *et al.*; 2012). También se conoce el mejoramiento asistido por radiación (RAM) el cual es una técnica que combina la mutagénesis inducida por radiación con herramientas de selección asistida por marcadores moleculares para acelerar y mejorar la eficacia de los programas de mejoramiento genético en la agricultura (Maluszynki *et al.*; 2000). Por último, otra técnica es la mutación dirigida por irradiación de protones es una técnica emergente en el campo de la mutagénesis, utilizada para inducir mutaciones precisas en el ADN de las plantas (Kazama *et al.*; 2008).

4.4.3.2 Radiación gamma utilizando ^{60}Co ; radiosensibilidad y radioestimulación.

La radiación gamma con el uso de Cobalto 60, un isótopo con gran radioactividad es

utilizado para el mejoramiento de especies vegetales mediante mutagénesis ya que es un método que produce viabilidad genética y es de utilidad para determinar la radiosensibilidad de cada especie. Por ello, al generar variabilidad fenotípica y genética es una técnica potencial para el mejoramiento genético y la constante evolución mediante la inducción de mutaciones (Avendaño *et al.*, 2019).

Desde 1969, la radiación gamma es la técnica mutagénica más utilizada por su accesibilidad, su precisión y la manera de penetrar al material biológico, además de por su rapidez y costo (Suprasanna *et al.*, 2015).

Un factor importante y el primer paso al usar esta técnica, es determinar la correcta dosis de radiación, ya que al utilizar dosis bajas el efecto en el ADN y células de las especies es mínimo; en cambio, si se usa una dosis alta, la planta sufre fuertes efectos en su genoma e incluso se puede causar la muerte (Olasupo *et al.*, 2016). Esta dosis se le llama dosis óptima de radiación o dosis letal media, se determina por curvas de radiosensibilidad en diferentes variables, y es la dosis en donde se obtiene el 50% de sobrevivencia de la población al absorber la radiación (Morela *et al.*, 2002).

De acuerdo con Espino *et al.* (2013) y Álvarez *et al.* (2018) mencionan que en esta dosis media es el mejor rango para generar las mutaciones más útiles para el mejoramiento genético. Sin embargo, otros autores como Akgüm y Tosun, (2004) señalan otro rango en donde existe también probabilidades altas de realizar mutaciones efectivas que se ubica sobre la curva del 50%, este parámetro es el RC50; ambos rangos son rangos de radiosensibilidad (RRS) efectivos para realizar mutagénesis inducida.

La radiosensibilidad es el nivel de afectación a nivel de las células de cualquier tejido debido a la aplicación de radiaciones ionizantes. La sensibilidad a la radiación se determina exponiendo el material a un rango de dosis con cierta intensidad y se eligen las dosis que permitan la supervivencia de los tejidos del material y que presenten cambios observables en el mismo, de ahí que se pueda determinar la DI_{50} , la cual es la dosis en la que el 50 % del material irradiado sobrevive y la dosis óptima siendo la dosis en donde se genere mayor

variabilidad en el material (De la Fe, 2000; Li *et al.*, 2019).

La reacción de las semillas tratadas con radiación puede variar según la especie de planta, la variedad y sobre todo la intensidad de la radiación. El efecto de la radiación en cualquier intensidad es inmediatamente visible en la capacidad germinativa del material y el producto pueden ser plantas débiles o de apariencia normal (Ali *et al.*; 2017). Dentro de los cambios originados por mutagénesis por medio de radiaciones ionizantes en vegetales se encuentra la variación en el área foliar, biomasa, rendimiento de diversos granos, tolerancia a plagas entre otros (Lemus *et al.*, 2002).

La radiación gamma también puede tener efectos estimulantes en el crecimiento de las plantas. La exposición a dosis bajas de radiación gamma puede influir en el crecimiento y desarrollo lo cual puede ser beneficioso en algunos contextos. La radiación gamma puede alterar la regulación de ciertos genes que están involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas y puede influir en la biosíntesis de hormonas de crecimiento y en la actividad enzimática (Sharma *et al.*; 2020).

La aplicación de radiación gamma con Cobalto 60 ha mejorado varias especies de plantas. Dentro de los estudios en donde se ha aplicado se encuentra la inducción de mutaciones en variedades de trigo con el objetivo de mejorar la resistencia a enfermedades y la calidad del grano (Khan *et al.*; 2018), la aplicación en arroz para desarrollar líneas de cultivo con mayor resistencia al estrés hídrico (Khan *et al.*; 2019), la obtención de mutaciones en tomate con el fin de aumentar el contenido de antioxidantes y mejorar la resistencia a enfermedades (Ali *et al.*; 2017) e incluso la modificación del crecimiento y la producción de granos en la cebada (Hussain *et al.*; 2020).

4.4.4 Cultivo *in vitro* de *V. planifolia*.

En general, el término de cultivo de tejidos vegetales incluye distintas técnicas de cultivo de materiales vegetales como tejidos, órganos e incluso plantas completas. Con esta técnica, condiciones controladas del ambiente y un medio nutritivo y estéril, se pueden obtener plantas libres de patógenos. Originalmente se conoce también a esta técnica como

cultivo *in vitro* debido a que establecen en frascos y tubos de vidrio; sin embargo, actualmente se siembra también en recipientes de plástico, metal, entre otros materiales (López, 2007).

La reproducción asexual de plantas mediante esta técnica se logra debido a que cada una de las células de una planta tienen la capacidad total, llamada totipotencia celular, que se necesita para generar y desarrollar una nueva planta, esto sin ningún tipo de fusión de células sexuales o gametas (Hernández *et al.*, 2013).

Las células vegetales pueden crecer y desarrollarse adecuadamente al ser establecidas en medios de cultivo adicionados con fitohormonas, en condiciones asépticas y pueden dividirse dando dos tipos de respuesta: una dediferenciación celular seguida de un crecimiento tumoral, que forma una masa de células indiferenciadas la cual se denomina como callo y que bajo las condiciones óptimas es capaz de generar órganos o embriones somáticos, llamados de esta manera porque son estructuras similares a un embrión, pero que no se originaron por unión de gametos; y una respuesta morfogenética por la cual se forman directamente órganos, conocido como organogénesis, o embriones somáticos (Chen *et al.*, 2006).

En vainilla han sido varios estudios en tejidos meristemáticos y poco diferenciados como callos, protoplastos, etc. (Carretero *et al.*, 2007). En la bibliografía se estudian las técnicas de cultivo *in vitro* y se menciona que han sido exitosas y que mediante estas técnicas en conjunto se han identificado variantes con tolerancia a pH extremos, aluminio, salinidad y sequía, así como a diversas patógenos y enfermedades, a herbicidas, etc. (Samantaray *et al.*, 1999; Noga Amrutha *etal.*, 2007).

4.4.4.1 Propagación de la vainilla

Para el establecimiento de la vainilla *in vitro*, el explante más utilizado y con mejores resultados, es la yema axilar. Aunque lo más conveniente para el establecimiento de la especie sería utilizar las semillas, esto no se hace ya que estas simplemente no germinan y de ser así, el tiempo de germinación es en promedio de 18 semanas (Ramírez *et al.*, 2016).

Antes de su cultivo, estos tejidos se desinfectan cuidadosamente para eliminar cualquier contaminante superficial. Esto suele implicar el uso de agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio y etanol (Torres-Muñoz *et al.*, 2013).

El medio de cultivo es fundamental para el éxito de la propagación *in vitro*. Un medio comúnmente utilizado es el MS (Murashige y Skoog), enriquecido con reguladores de crecimiento como citoquininas y auxinas para promover la proliferación de brotes y la formación de raíces. La concentración óptima de estos reguladores puede variar dependiendo del tipo de explante y las condiciones específicas del cultivo (Murashige y Skoog, 1962).

El cultivo de tejidos vegetales se ha utilizado para conservar y propagar muchas especies, y puede servir para proteger y reproducir los ejemplares silvestres de vainilla identificados en México, reduciendo así el riesgo de perderlos (Lozano *et al.*, 2015). La propagación *in vitro* de *Vanilla planifolia* ha demostrado ser altamente efectiva. Estudios han reportado tasas de multiplicación significativas y una alta tasa de supervivencia durante la aclimatación. Por ejemplo, Torres-Muñoz *et al.* (2013) lograron una tasa de multiplicación de 5:1 utilizando segmentos nodales cultivados en un medio MS suplementado con 2 mg/L de BAP (6-bencilaminopurina).

Aunque en las últimas décadas se ha obtenido más conocimiento sobre esta especie y sus tratamientos (medios de cultivo y reguladores), aún persisten los problemas y dificultades en su propagación, incluso al emplear diferentes tipos de explantes (Celestino, 2005).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación experimental

La investigación se realizó en el laboratorio de propagación *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Campus Teziutlán que se encuentra en el estado de Puebla y sus coordenadas geográficas son los paralelos 19° 47' 06" y 19° 58' 12" de latitud norte y 97° 18' 54" y 97° 23' 18" de longitud occidental, a 1617 m. s. n. m. Además, se apoyó con el laboratorio de biotecnología y conservación forestal del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales (CENID-COMEF) ubicado en la alcaldía de Coyoacán, en la Ciudad de México.

5.2 Material vegetativo

El presente trabajo consistió en tres experimentos, en el primero se utilizaron frutos con embriones inmaduros a los cuales se les aplicó irradiación gamma de ^{60}Co , en el segundo se utilizaron embriones inmaduros a los cuales se les indujo callo en condiciones *in vitro* y lo que se irradió fueron callos a partir de dicho embriones, el tercero se utilizaron yemas de plántulas irradiadas M_1 a las cuales se les indujo la formación de callos y lo que se irradió fueron los callos formados a partir de dichas yemas.

Los frutos (cápsulas) con embriones inmaduros se obtuvieron del banco de germoplasma de vainilla de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla municipio de Tenampulco ubicado en las coordenadas geográficas de 20° 11' 52.23" de latitud norte y 97° 22' 06.09" de latitud oeste, a una altitud de 240 m.s.n.m. Las plántulas *in vitro* irradiadas M_1 , se obtuvieron del laboratorio de biología del CENID-COMEF de INIFAP, las cuales se obtuvieron también de embriones inmaduros a los cuales se irradió a diferentes dosis de irradiación gamma de ^{60}Co .

5.2.1 Embriones inmaduros de *Vanilla planifolia*

Para la obtención de los embriones inmaduros se polinizaron de forma manual flores de *Vanilla planifolia* entre el 1 y 5 de mayo del 2023. Posteriormente entre los 50 y 55 días después de la polinización (DDP) se cosecharon los frutos (cápsulas) de manera manual. Los embriones de estas capsulas se consideraron inmaduros debido a que a esa edad ya está formado el embrión, pero aún no su testa, lo que permite obtener plántulas bajo condiciones *in vitro*. Este material se utilizó para irradiar y para inducir callogénesis en condiciones de cultivo *in vitro*.

5.2.2 Callos a partir de yema de plántulas *in vitro* M₁

En mayo del 2023 se polinizaron flores de vainilla del banco de germoplasma de vainilla de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se cosecharon a los 55 días después de la polinización y se irradiaron a diferentes dosis de irradiación gamma de ⁶⁰Co, dichos embriones se sembraron bajo condiciones *in vitro* en el laboratorio de CENID-COMEF, las plántulas que se desarrollaron constituyeron las plántulas M₁ (Primera generación de plántulas irradiadas), se subcultivaron estas plantas M₁ y utilizando yemas se indujo callogénesis en condiciones *in vitro*, los callos formados se les aplicó diferentes dosis de irradiación gamma de ⁶⁰Co posteriormente bajo condiciones *in vitro* se indujo la diferenciación para obtener plántulas *in vitro* M₂ (Segunda generación de plántulas irradiadas).

5.3 Irradiación del material biológico.

La irradiación del material biológico (embriones inmaduros, callos a partir de embriones inmaduros y callos a partir de yemas de plántulas *in vitro* M₁) se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), utilizando radiación gamma con Cobalto 60 (⁶⁰Co) en un equipo Trasnelektro a diferentes dosis.

5.3.1 Irradiación de embriones inmaduros

Para embriones inmaduros se tomó una cápsula por tratamiento de aproximadamente 5 cm de largo y estas se irradiaron en el ININ a dosis de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40 Gy, considerando el testigo sin irradiar. Las dosis de irradiación constituyeron los tratamientos (14 tratamientos).

5.3.2. Irradiación de callos a partir de embriones inmaduros

De los frutos de vainilla (cápsulas) cosechas a los 50 a 55 DDP en el año 2023, una parte no se irradió y se sembraron los embriones inmaduros induciendo callo bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Posteriormente cuando los callos se formaron y maduraron estos fueron irradiados a dosis de 1,2, 3, 4, 5, 6, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 Gy, considerando el testigo callos sin irradiar. Las dosis de irradiación constituyeron los tratamientos (13 tratamientos).

5.3.3. Irradiación de callos a partir de yemas de plántulas M₁

Las plántulas obtenidas de los embriones inmaduros irradiados en el ININ y desarrollados en el CENID-COMEF constituyen la primera generación de irradiación denominada M₁, y las plántulas obtenidas de callos irradiados a partir de yemas de la M₁ constituyen la segunda generación de irradiación denominada M₂.

En este experimento se tomaron yemas de las plántulas M₁, se indujeron callo bajos condiciones *in vitro* y se irradiaron a dosis de 2,4,6,8 Gy, (Figura 1) considerando al testigo callos sin irradiar. Las dosis constituyeron los 21 tratamientos.

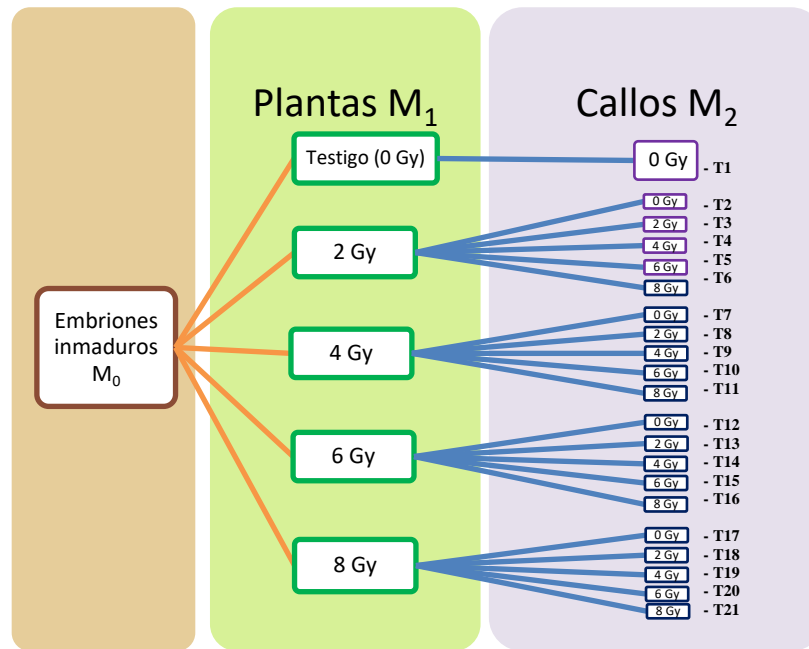


Figura 1. Tratamientos de callos a partir de yemas de vitroplantas. M_0 : Generación sin irradiación (embriones inmaduros). M_1 : Primera exposición a radiación gamma con ^{60}Co . M_2 : Segunda exposición a radiación gamma con ^{60}Co . Gy: Gray (unidad de radiación gamma).

5.4 Establecimiento *in vitro* de embriones inmaduros.

El establecimiento de cultivo *in vitro* para embriones inmaduros consistió en la desinfección de material vegetativo, la preparación del medio de cultivo y siembra.

5.4.1 Desinfección del material vegetativo

La desinfección de las cápsulas cosechadas a los 50 y 55 DDP e irradiadas a diferentes dosis de rayos gamma se realizó considerando el protocolo recomendado por Castillo *et al.*, (2018); el cual consistió en tres lavados con un cepillo de cerdas suaves, únicamente con agua y jabón, esto con la finalidad de eliminar cualquier contaminante. Una vez lavadas las vainas se colocaron en vasos de precipitado previamente rotulados con sus respectivas dosis de radiación. Posterior se sumergieron las cápsulas en una solución de etanol al 70 % por 30 segundos, después se decantó y se hicieron de dos a tres enjuagues con

agua estéril. Para finalizar el proceso de desinfección, las cápsulas se enjuagaron nuevamente en una solución de cloro al 20 % durante 10 minutos en el agitador, posteriormente se lavaron cuatro veces con agua esterilizada para retirar todo el residuo de cloro dentro de la campana de flujo, finalmente se flamearon las vainas 3 veces con alcohol al 96%.

5.4.2 Preparación de medio de cultivo para siembra de embriones inmaduros

Para la siembra de embriones inmaduros se utilizó medio Murashige and Skoog (MS) adicionado con vitaminas, al cual se le añadieron 30 g L⁻¹ de sacarosa y se ajustó el pH a 5.7-5.8; una vez ajustado, se agregaron 9g L⁻¹ de agar. Se colocó en un microondas por lapsos de 3 minutos repitiéndose esto tres veces, con la finalidad de disolver bien el agar del medio de cultivo. Posteriormente se vaciaron 20 mL de medio de cultivo en tubos de ensaye con ayuda de un dispensador, los tubos se esterilizaron en autoclave a 121°C y una presión de 15 psi por 20 minutos.

5.4.3 Medio de cultivo para la formación de callo.

Para la formación de callo utilizando como explantes embriones inmaduros y yemas. Se utilizó medio de cultivo MS con vitaminas, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 4 g L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1 g L⁻¹ de PVPP (polivinilpolipirrolidona), 1 g L⁻¹ de carbón activado y 2 mL a una concentración de 1000 ppm de 6-bencilaminopurina (BAP), se disolvieron con ayuda del agitador y un imán, se ajustó el pH a 5.7-5.8 y posteriormente se agregaron 9 g L⁻¹ de agar. Se retiró el imán y se disolvió en el microondas por lapsos de 3 minutos. Finalmente, se agregaron 10 mL de medio de cultivo a tubos de ensaye con ayuda de un dispensador, después dichos tubos se llevaron a la autoclave para su esterilización a 121°C, una presión de 15 psi por 20 minutos.

5.4.4 Medio de cultivo para la recuperación de callo después de la irradiación.

Una vez que se irradiaron los callos, tanto de embriones como de yemas, fueron colocados en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio MS, adicionado con 30 g L⁻¹

de sacarosa, 2 mL a una concentración de 1000 ppm de BAP , 1g L⁻¹ de PVPP y se ajustó el pH a 5.7-5.8; una vez que se ajustó, se agregaron 8 g L⁻¹ de agar. Se disolvió en el microondas y una vez que hirvió tres veces y se disolvió totalmente, para después esterilizarse en autoclave a 121°C y una presión de 15 psi por 20 minutos.

5.4.5 Medio de cultivo para la diferenciación de callo.

Para la diferenciación celular de los callos, se preparó medio de cultivo MS con vitaminas, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 1 mL a una concentración de 1000 ppm de BAP, 1g L⁻¹ de caseína hidrolizada, 0.5 g L⁻¹ PVPP y 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, se ajustó el pH a 5.7-5.8 y se le agregaron 8 g L⁻¹ de agar. Se agregaron en tubos de ensaye 12 mL de medio de cultivo con ayuda de un dispensador, posteriormente se esterizaron a 121°C y una presión de 15 psi por 20 minutos.

5.4.6 Siembra de embriones inmaduros

Para la siembra de los embriones, previamente se desinfectó la campana de flujo con alcohol al 96 %, posteriormente se flameó en conjunto con cajas Petri, bisturís y pinzas. Se tomaron las capsulas de vainilla previamente lavadas y desinfectadas y con ayuda de un bisturí y sobre una caja Petri se cortó los extremos del fruto y se abrió longitudinalmente en dos partes exponiendo los embriones inmaduros. Con ayuda del borde de una pinza se realizó un raspado con la finalidad de juntar los embriones y ponerlos en tubos que contenían medio de cultivo.

5.4.7 Siembra de embriones inmaduros para inducción de callo

La siembra de embriones inmaduros a los cuales se indujo la formación de callos fue de la misma manera que en el 5.4.6, con la diferencia del medio de cultivo.

5.4.8 Siembra de yemas para inducción de callo

Para la siembra de yemas donde se indujeron callos, a las plántulas se les realizó un corte de aproximadamente 1 cm. y se sembraron en tubos que contenían el medio de cultivo para inducir callogénesis.

5.4.9 Incubación

Después de la siembra, los explantes se colocaron dentro de un cuarto de incubación, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad en una temperatura constante de 25°C y humedad relativa de 40% en el aire.

5.5 Variables evaluadas de los explantes

5.5.1 Las variables evaluadas para los embriones irradiados fueron:

- Numero de semillas germinadas (SG)

Se contabilizó cada 15 días, el número de semillas germinadas después de la siembra.

- Longitud de vitroplantas (LV)

Con ayuda de una regla graduada en centímetros, se registró la longitud de las vitroplantas cada semana hasta la pre-aclimatación.

- Número de hojas (NH)

Se contabilizó el número de hojas que fueron surgiendo cada semana hasta la pre-aclimatación.

- Número de yemas (NY)

Se registró el número de yemas que fueron surgiendo desde la aparición de los botes cada semana hasta la pre-aclimatación.

- Distancia entrenudos (DE)

Con ayuda de una cinta flexible métrica graduada en centímetros, se midió la longitud decada entrenudo de las plantas cada semana hasta la pre-aclimatación, calculando el

promedio por planta.

- Radiosensibilidad y posibles mutantes (RPM)

Se evaluaron de manera visual las variaciones en la morfología de las plantas, como pigmentación, sistema radicular, variegación, tamaño; en base a la radiación aplicada.

5.5.2 Variables evaluadas en la formación de callo.

Las variables evaluadas en los callos formados a partir de embriones fueron:

- Número de callos (NC)

Se contabilizaron los callos maduros obtenidos.

- Peso del callo (PC)

Con ayuda de una báscula se pesaron los callos formados a los 90 días de la siembra.

- Volumen del callo (AC)

Con ayuda de un bernier se midió el ancho, largo y alto de los callos formados a los 90 días de la siembra, calculándose con esos datos el volumen en cm^3 .

- Número de brotes en callo (NBC)

Se contabilizaron los brotes obtenidos por cada callo en la etapa de su máxima madurez.

Las variables evaluadas para la formación de callo a partir de yema fueron:

- Número de callos (NC)

Se contabilizaron los callos maduros obtenidos.

- Número de brotes en callo (NBC)

Se contabilizaron los brotes obtenidos por cada callo en la etapa de su máxima madurez.

5.5.3 Variables evaluadas en vitroplantas a partir de callo

Las variables que se evaluaron en las vitroplantas obtenidas por ambos tipos de callo fueron:

- Longitud de vitroplantas (LV)

Con ayuda de una regla graduada en centímetros, se registró la longitud de las vitroplantas cada semana hasta la pre-aclimatación.

- Número de hojas (NH)

Se contabilizó el número de hojas que fueron surgiendo cada semana hasta la pre-aclimatación.

- Número de yemas (NY)

Se registró el número de yemas que fueron surgiendo cada semana hasta la pre-aclimatación.

- Distancia entrenudos (DE)

Con ayuda de una cinta flexible métrica graduada en centímetros, se midió la longitud decada entrenudo cada semana hasta la pre-aclimatación.

- Número de raíces (NR)

Se registró el número de yemas que fueron surgiendo cada semana hasta la pre-aclimatación

- Radiosensibilidad y posibles mutantes (RPM)

Se evaluaron de manera visual las variaciones en la morfología de las plantas, como pigmentación, sistema radicular, variegación, tamaño en base a la radiación aplicada.

5.6 Diseño experimental y análisis estadístico

En cada uno de los experimentos, los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con tres repeticiones y 3 individuos por unidad experimental. Se realizó un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey (0.05), utilizando SAS 9.0 (SAS, 2002).

Se obtuvo la DL_{50} , DL_{99} , RC_{25} , RC_{50} , RC_{75} utilizando el Software R, programa R versión 4.4.1 y sus librerías Tidyverse, Ggplot, Ecotox y DRC (R foundation, 2024). También

se realizaron diagramas de caja y los diagramas de dispersión para comparar las dosis y sus características morfológicas, así como la librería factoextra y FactoMineR para el análisis de componentes principales.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Comportamiento de embriones inmaduros irradiados con gammas de ^{60}Co .

6.1.1 Estimulación en la germinación y número de brotes de los embriones inmaduros irradiados.

En el cuadro 1, se observa que la radiación gamma de ^{60}Co tuvo un efecto marcado de estimulación para la germinación de embriones inmaduros de vainilla, en este sentido, se encontró que la germinación se dio hasta los 12 Gy. Sin embargo, la mayor cantidad de embriones germinados fue hasta los 8 Gy, siendo la dosis de 4 Gy el mejor tratamiento, debido a que se registró el mayor número de embriones inmaduros germinados. Rodríguez *et al.*, (2013), mencionan que la radiación puede estimular la germinación ya que reduce el tiempo para la germinación. Sin embargo, dicha estimulación es variable dependiendo de la especie, Croseños-Palazin *et al.* (2023) en chile apaxtleco (*C. anumm* L.) observaron una estimulación a los 100 Gy, Díaz y Cepero, (2017) en papa (*Solanum tuberosum*) la observaron a los 20 Gy, Vergara *et al.* (2023) en eucalipto (*Eucalyptus*) irradiando a 10 Gy, Álvarez-Holguín *et al.*, (2018) en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*) con 1400 Gy encontraron diferencia en la emergencia en base a la dosis de radiación gamma aplicada, mientras que Gálvez-Marroquín *et al.* (2023) no encontraron estimulación en la emergencia de plántulas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), ni Avendaño-Arrazate *et al.*,(2021) en *Coffea arabica* L. al aplicar radiación gamma.

Es evidente que después de los 10 Gy, se redujo drásticamente la germinación y después de los 12 Gy, los embriones perdieron su capacidad de germinar debido al efecto de la radiación gamma de ^{60}Co , este comportamiento según Calabrese (2018) y Gutiérrez *et al.* (2021) es debido al efecto hormético donde a dosis bajas se promueve la estimulación y a dosis altas se provoca la muerte de los tejidos u órganos (Figura 2).

Cuadro 1. Germinación de embriones inmaduros de *V. planifolia*. sometidas a irradiación de ^{60}Co .

Tratamiento	Dosis	Semillas germinadas
T1	Testigo	61
T2	2Gy	34
T3	4Gy	73
T4	6Gy	61
T5	8Gy	45
T6	10Gy	2
T7	12Gy	2
T8	14Gy	0
T9	16Gy	0
T10	18 Gy	0
T11	20Gy	0
T12	25Gy	0
T13	30Gy	0
T14	35Gy	0
T15	40Gy	0

Gy = Grey (Unidad de radiación gamma).

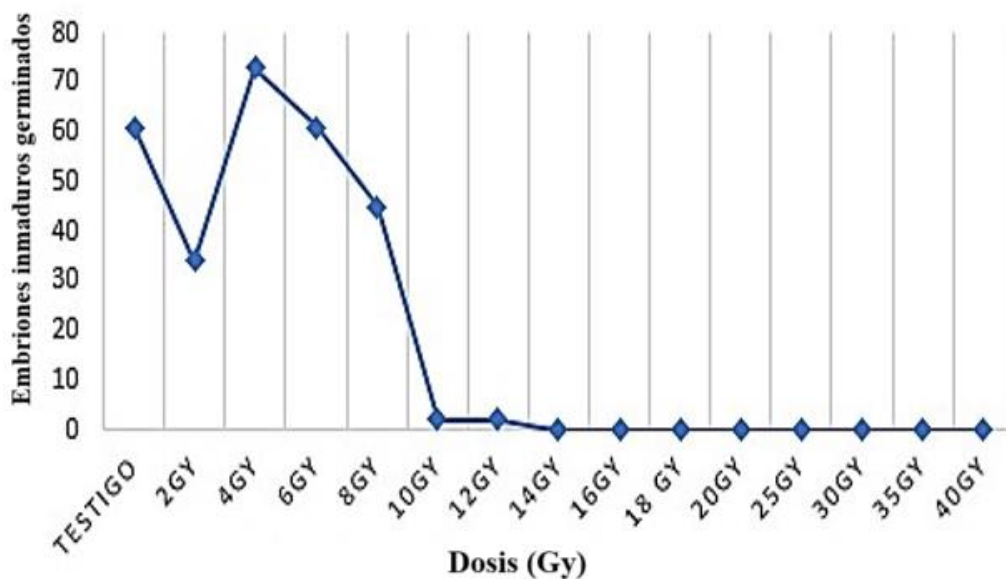


Figura 2. Comportamiento de embriones inmaduros de *V. planifolia* irradiados con ^{60}Co .

El número de brotes fue variable por cada tratamiento (Cuadro 2), siendo el tratamiento T3 (4Gy) el que presentó mayor número de brotes (46 brotes), seguido del testigo (T1) con 42 brotes. Los tratamientos T6 y T7 fueron los que presentaron el menor número de brotes con 1 y 3 brotes, respectivamente. La radiación gamma de ^{60}Co , también puede estimular la brotación *in vitro* resultando brotes más vigorosos y con mejor crecimiento, así mismo, se pueden seleccionar mutantes con características favorables (Dada *et al.*, 2018).

Por otro lado, Sulvarán (2018), reporta que entre 20 y 80 Gy obtuvo mayor brotación *in vitro* de plantas de vainilla. Sin embargo, los explantes utilizados fueron yemas de *V. planifolia*. En este sentido Avendaño-Arrazate *et al.*, (2021) mencionan que la radiación gamma de ^{60}Co , tiene diferentes efectos y varía de acuerdo con los órganos o tejidos vegetales utilizados, ya que entre más contenido de agua la radiación gamma tiene mayores efectos.

Cuadro 2. Número de brotes *in vitro* de *V. planifolia* a diferentes dosis de radiación gamma

Tratamiento	Dosis	Número de brotes
T1	Testigo	42
T2	2 Gy	21
T3	4 Gy	46
T4	6 Gy	24
T5	8 Gy	13
T6	10 Gy	1
T7	12 Gy	3

Gy = Gray: unidad de radiación gamma.

6.1.2 Radiosensibilidad en embriones inmaduros de *V. planifolia*

Se evaluó la radiosensibilidad de embriones inmaduros mediante la obtención de las dosis letales y las reducciones de crecimiento.

6.1.2.1 Determinación de la DL₅₀ y la DL₉₉ de embriones inmaduros

La DL₅₀ y DL₉₉ se determinaron con ayuda del programa R, siendo la DL₅₀ la dosis de radiación que causa el 50% de muertes en embriones inmaduros mientras que la DL₉₉ es la dosis de radiación que causa la muerte del 99% de los embriones inmaduros. Golubnova *et al.* (2011) y Ángeles-Espino *et al.* (2013) mencionan que en las dosis en donde muere el 50% de los individuos es en donde existe mayor probabilidad de producir mutaciones efectivas. En el presente trabajo, la DL₅₀ se encontró a una dosis de radiación gamma de ⁶⁰Co de 3.75 Gy y la DL₉₉ con una dosis de 14.65 Gy (Cuadro 3, Figura 3).

Cuadro 3. Determinación de la DL₅₀ y DL₉₉ de embriones inmaduros de *V.planifolia*.

DL (%)	Dosis	Error	Chi-cuadrado	Z-score	Varianza muestral	Covarianza
50	3.7568	1.0470	63.78303	16.2777	0.10843	-0.28163
99	14.6519	1.0567	63.78303	16.2777	0.03802	-0.28163

DL = Dosis letal

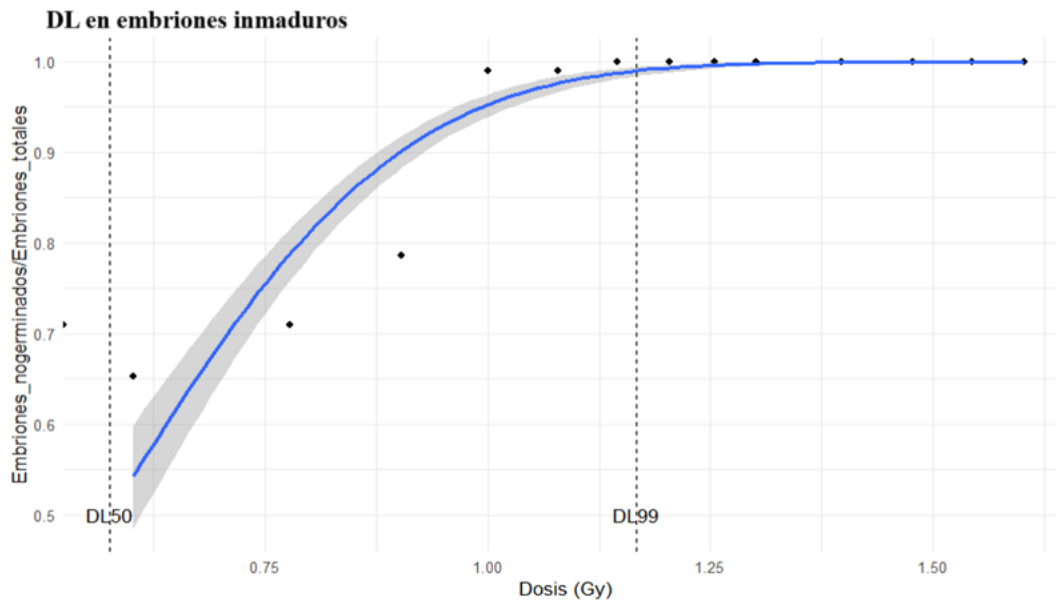


Figura 3. Comportamiento de la DL₅₀ y DL₉₉ en embriones inmaduros irradiados de *V. planifolia*.

En un estudio realizado por Villalva *et al.* (2020) se observó que las tasas más bajas de mortalidad ocurrieron en los tratamientos que utilizaron dosis bajas de radiación (0, 25 y 50 Gy). Esto permitió concluir que, a medida que la dosis de irradiación aumenta, también lo hace la tasa de mortalidad.

Al respecto, Corrales (2017) señala que en trabajos de mutagénesis inicialmente se debe determinar la dosis adecuada, la cual se obtiene mediante el estudio de radiosensibilidad ya que es en las dosis óptimas donde podrían obtenerse mayor cantidad de mutantes útiles. Por otro lado, Olasupo *et al.* (2016) mencionan que al irradiar en dosis bajas los efectos son mínimos a nivel celular y de ADN. Sin embargo, con dosis altas se puede causar daños en el genoma provocando la muerte. En trabajos de vainilla, Sulvarán (2018) obtuvo al irradiar *V. planifolia* una DL₅₀ a los 160 Gy, utilizando yemas, lo cual difiere con el presente trabajo, esto debido al tipo de explante utilizado. Sin embargo, en *Lealia autumnalis*, otra orquídea con alto valor en México se determinó que la DL₅₀ fue a los 53 Gy utilizando semilla (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017).

La dosis letal varía en base a la especie, ya que Álvarez-Holguín *et al.* (2017) encontraron que en pastos que la DL₅₀ varió entre 355 Gy y 610 Gy según el tipo de pasto, Harding *et al.* (2021) en arroz (*Oryza sativa* L.) encontró una DL₅₀ promedio de 345 Gy, en *Coffea arabica* L, Dada *et al.* (2018) encontraron una DL₅₀ es de 12 Gy y en *Agave tequilana* Ángeles-Espino *et al.*, (2020) reportaron una DL₅₀ entre 20 Gy y 25 Gy.

6.1.2.2 Determinación de la reducción de crecimiento (RC) en embriones inmaduros de *V. planifolia*.

La RC es un parámetro en la cual la radiación gamma de ⁶⁰Co provoca una reducción o disminución del crecimiento de los tejidos (Ángeles-Espino *et al.*, 2013). Algunos investigadores como Akgum *et al.* (2011) y Khalil *et al.* (2014) mencionan que la dosis en donde se reduce el crecimiento 50 % es en donde existen altas probabilidades de encontrar mutaciones efectivas. En el presente trabajo, con ayuda del paquete DCR del software R, se obtuvieron la RC₂₅, RC₅₀ y RC₇₅, así como la dosis efectiva para las variables de longitud de

planta, número de yemas, número de hojas y distancia entrenudos.

Para la longitud de las vitroplantas obtenidas de embriones inmaduros, se encontró que las RC₂₅, RC₅₀ y RC₇₅ resultaron similares, ya que los valores fueron de 8.38 Gy para RC₂₅, de 8.70 Gy para RC₅₀ y de 9.02 Gy para RC₇₅ (Cuadro 4).

Cuadro 4. Determinación de la RC₂₅, RC₅₀ Y RC₇₅ en longitud de vitroplanta.

Reducción de crecimiento	Dosis	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
RC ₂₅	8.388	1.069	6.234	10.543
RC ₅₀	8.700	1.738	5.198	12.202
RC ₇₅	8.902	2.512	3.963	14.083

RC: Reducción de crecimiento

Las dosis a las cuales se observa una reducción de crecimiento desde el 25 % hasta el 75 % están estrechamente cerca (Figura 4). Reyes-López *et al.* (2018) concluyeron al irradiar esquejes de vainilla que, aunque no es el mismo tejido, la irradiación en vainilla tiene un efecto muy drástico en la especie.

El resultado obtenido en este estudio destaca la notable sensibilidad de la especie estudiada en comparación con otras especies irradiadas. En contraste, Álvarez-Holguín *et al.* (2017) reportaron valores significativamente mayores para diferentes pastos, con RC₅₀ de 960 Gy en pasto llorón (*Eragrostis curvula*), 917 Gy en pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) 1271 Gy en pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) y 403 Gy en pasto navajita (*Bouteloua gracilis*). De manera similar, Avendaño-Arrazate *et al.* (2021) observaron una RC₅₀ de 120.12 Gy en semillas de café (*Coffea arabica*), mientras que Álvarez-Holguín *et al.* (2018) registraron rangos de 1357 a 1900 Gy para pasto africano (*Cynodon nlemfuensis*) en diferentes parámetros, como altura de planta, número de tallos y producción de semilla. Por su parte, Gálvez-Marroquín *et al.* (2023) determinaron una RC₅₀ de 453.2 Gy al irradiar semillas de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), considerando variables como altura y porcentaje de plantas.

Estos datos evidencian que la RC_{50} obtenida en este estudio es considerablemente más baja, lo que refleja una alta sensibilidad a las radiaciones gamma, probablemente asociada a características genéticas, fisiológicas y metabólicas específicas de la especie, así como a las condiciones experimentales empleadas. Esto resalta la importancia de establecer protocolos específicos y precisos para optimizar el uso de mutagénesis inducida en esta planta, considerando que la sensibilidad diferencial puede ser un factor clave en la selección y mejora genética.

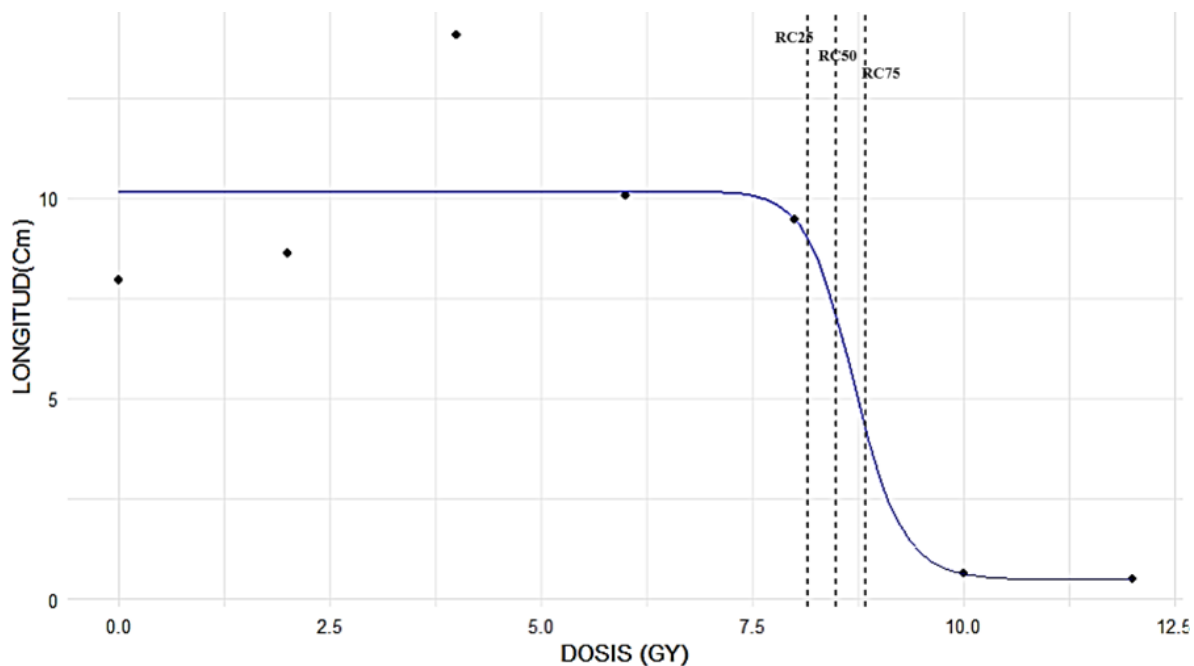


Figura 4. Curva de RC_{25} , RC_{50} Y RC_{75} en longitud de planta.

Para la determinación de la RC para la variable de número de hojas se obtuvo que la RC_{25} es de 8.14 Gy. la RC_{50} es de 8.48 Gy y la RC_{75} es de 8.83 Gy, mientras que la Dosis Efectiva (DE) fue la misma de la RC_{50} . (Cuadro 5).

Cuadro 5. Determinación de la RC_{25} , RC_{50} Y RC_{75} en número de hojas.

Reducción de crecimiento	Dosis	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
RC_{25}	8.144	0.493	7.149	9.138
RC_{50}	8.480	1.439	5.580	11.380
RC_{75}	8.830	2.506	3.782	13.879

RC: Reducción de crecimiento

En la figura 5 se observan las distintas reducciones de crecimiento graficadas en base al número de hojas obtenidas de las vitroplantas, en donde se observa la cercanía que tienen estas y las cuales están ubicadas en un solo cuadrante entre 8Gy y 9Gy. En comparación, Hernández-Muñoz *et al.* (2017) identificaron una RC_{50} en número de hojas de 28 Gy en *Laelia autumnalis*, mientras que Ghasemi-Soloklui *et al.* (2023) reportaron valores de 12 Gy, 28 Gy y 42 Gy para RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} , respectivamente, en el número de hojas y brotes de vid “Yaghouti”.

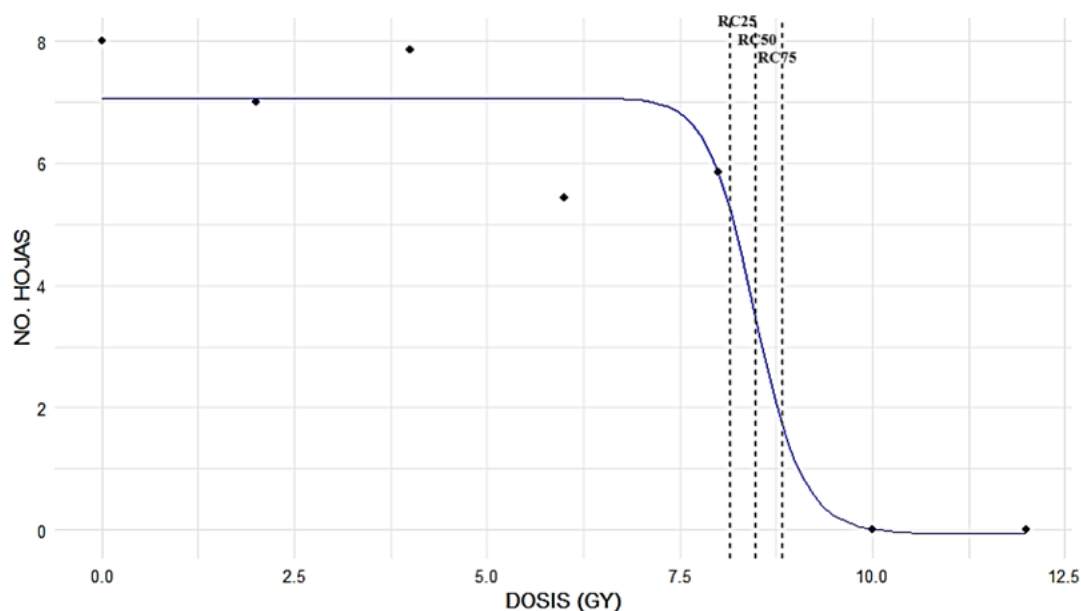


Figura 5. Curva de RC_{25} , RC_{50} Y RC_{75} en número de hojas.

En relación con número de yemas, los valores de RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} también estuvieron muy próximos, variando de 8.058 a 8.992 Gy (Cuadro 6, Figura 6). Sin embargo, la Dosis efectiva (DE) fue de 5.512 Gy, lo cual coincide con la RC_{50} ; valor que está ligeramente más alta al encontrado con la RC_{50} en número de hojas.

Por otro lado, González Oramas *et al.* (2007) encontraron que, al irradiar ápices de henequén (*Agave fourcroydes*), la dosis de 20 Gy representó la RC_{50} en términos de formación de brotes axilares, permitiendo incluso un incremento significativo en la masa fresca de los explantes en comparación con el control, aunque mayores dosis resultaron en una disminución del número de brotes por explante. En otro contexto, Avendaño-Arrazate *et*

al. (2021) determinaron que, en semillas de café irradiadas, la RC_{50} para el número de ramas fue considerablemente más alta, con un valor de 107.78 Gy.

Cuadro 6. RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} en número de yemas de *V.planifolia*.

Reducción de crecimiento	Dosis	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
RC_{25}	8.058	0.255	7.542	8.573
RC_{50}	8.512	0.526	7.452	9.572
RC_{75}	8.992	2.975	7.028	10.956

RC: Reducción de crecimiento

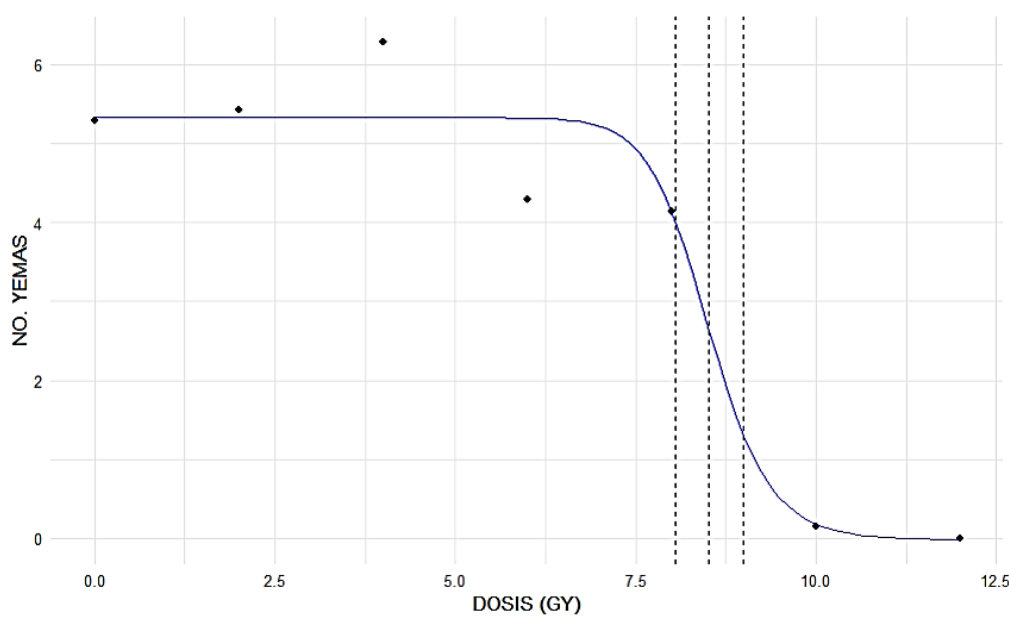


Figura 6. Curva de RC_{25} , RC_{50} Y RC_{75} en número de yemas.

Para distancia entrenudos (Cuadro 7, Figura 7), los valores de los valores de RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} fue de 8.412, 8.669 y 8.934 Gy, respectivamente, los cuales fueron muy próximos; Sin embargo, la Dosis Efectiva fue de 8.664 Gy, valor que es ligeramente mayor a lo encontrado para número de hojas y número de yemas.

Cuadro 7. Determinación de la RC_{25} , RC_{50} Y RC_{75} en distancia entrenudos

Reducción de crecimiento	Dosis	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
RC_{25}	8.412	0.920	6.559	10.265
RC_{50}	8.669	1.421	5.807	11.531
RC_{75}	8.934	1.976	4.953	12.916

RC: Reducción de crecimiento

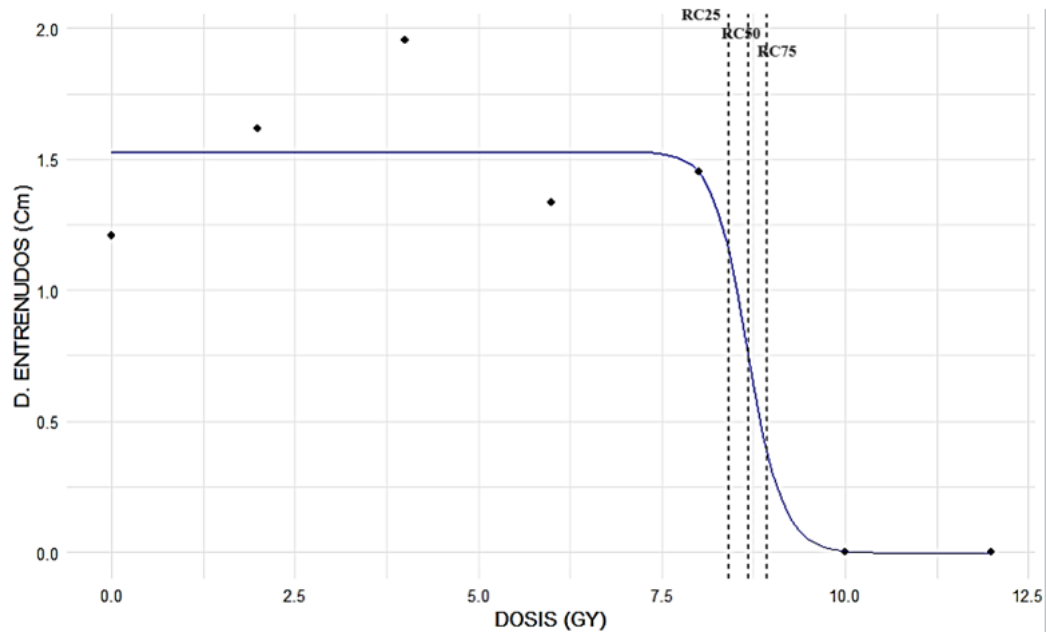


Figura 7. Curva de RC₂₅, RC₅₀ Y RC₇₅ en distancia de entrenudos.

Kartini *et al.* (2015) expuso explantes de *V. planifolia* a tres dosis de radiación gamma (10 Gy, 20 Gy y 30 Gy). Como resultado se observó que hubo diferencias en el número de hojas y entrenudos, así como la longitud en los cultivos de 10 Gy.

6.1.3 Análisis de componentes principales en cuatro variables vegetativas de plántulas *in vitro* de embriones inmaduros.

Mediante el análisis de componentes principales se redujo la dimensionalidad en las variables longitud (cm), distancia entrenudos (cm), número de yemas y número de hojas de plántulas *in vitro* provenientes de embriones inmaduros a dos componentes principales (Figura 8). Las flechas que se indican en la figura 8 se denominan vectores, donde su longitud indica el grado de contribución a la varianza. Se observa que las variables longitud y distancia entre nudos están correlacionadas positivamente debido a que sus vectores forman un ángulo menor de 45° y en la misma dirección; de la misma manera, los vectores de las variables número de yemas y número de hojas también muestran alta correlación al presentar la misma tendencia pero en el cuadrante IV; Sin embargo, entre las dos primeras variables (longitud y distancia de entrenudos) no tienen correlación alguna con las dos últimas (número de temas y número de hojas).

Por otro lado, en cuanto a los puntos (2,4,6,8,10,12) que se muestran en la figura, estos representan los tratamientos y dosis de Grays y entre más cercanas están más parecidas son entre sí y más contribuyen a la varianza. En este sentido, se puede observar que la dosis de irradiación de 6Gy y 8Gy están próximos al cuadrante I, y las dosis de 10Gy y 12Gy en el cuadrante II, lo cual indica su alta relación en base a las variables. Sin embargo, las dosis de 2Gy y 4Gy están distantes al encontrarse en el cuadrante IV y I, respectivamente, lo que indica la poca relación de estas dosis con respecto a las demás dosis.

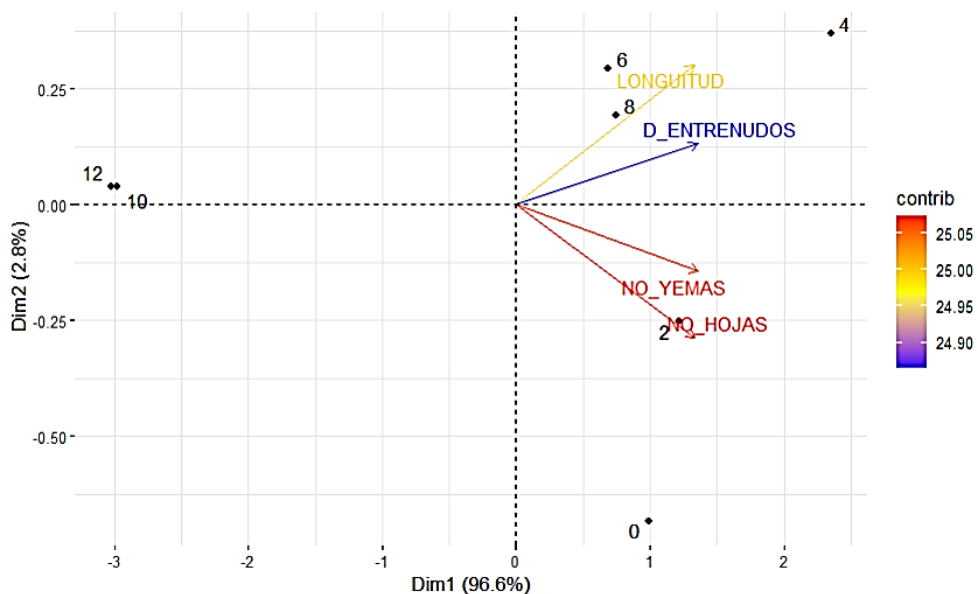


Figura 8. Análisis de componentes principales de longitud, distancia entrenudos, número de yemas y número de hojas.

Ramos-Castellá *et al.* (2024) realizó un estudio en el que se evaluó el efecto de dosis bajas de radiación gamma (10 Gy, 20 Gy, 30 Gy) en cultivos *in vitro* de *Vanilla planifolia*. Observó que la radiación de 10 Gy produjo un mayor número de hojas (4.05 hojas) y una mayor longitud de brotes en comparación con los cultivos no irradiados o con dosis más altas. Los resultados indicaron que dosis más altas de radiación redujeron el crecimiento tanto en la distancia entrenudos como de los brotes, con la dosis de 30 Gy mostrando los efectos más negativos.

6.2 Comportamiento de callos irradiados con gammas de ^{60}Co a partir de embriones inmaduros

6.2.1 Supervivencia de callos irradiados

En el cuadro 8 se muestra el porcentaje de supervivencia de los callos irradiados que se formaron a partir de embriones inmaduros.

Cuadro 8. Supervivencia de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.

Tratamiento	Dosis	Supervivencia de callos (%)
T1	0 Gy	50
T2	1 Gy	62
T3	2 Gy	75
T4	3 Gy	62
T5	4 Gy	87
T6	5 Gy	75
T7	6 Gy	50
T8	7 Gy	12
T9	8 Gy	25
T10	9 Gy	25
T11	10 Gy	37
T12	11 Gy	25
T13	12 Gy	0

T: Tratamiento. Gy: Gray, unidad de radiación gamma.

6.2.2 Comportamiento del peso y volumen de callos irradiados a partir de embriones inmaduros

En el cuadro 9 se presentan los pesos y volumen de callos irradiados a diferentes dosis. Se observa que al igual que la supervivencia los valores más altos en peso y volumen se obtuvo a los 4 Gy y fue a partir de los 7 Gy donde comienza el descenso.

Cuadro 9. Promedios de peso y volumen de callos a partir de embriones inmaduros irradiados a distintas dosis con ^{60}C .

Tratamiento	Dosis	Peso (RC)	Volumen (Cm^3)
T1	0 Gy	0.201	0.023
T2	1 Gy	0.14	0.011
T3	2 Gy	0.196	0.041
T4	3 Gy	0.218	0.012
T5	4 Gy	0.82	0.330
T6	5 Gy	0.331	0.070
T7	6 Gy	0.403	0.152
T8	7 Gy	0.1	0.014
T9	8 Gy	0.135	0.031
T10	9 Gy	0.151	0.002
T11	10 Gy	0.122	0.006
T12	11 Gy	0.162	0.015
T13	12 Gy	0	0

T: tratamiento. Gy: Gray, unidad de radiación gamma; RC: Reducción del crecimiento.

6.2.3 Radiosensibilidad en callos a partir de embriones inmaduros

En este experimento se consideraron 13 tratamientos, irradiando desde 1 Gy hasta 12 Gy, aumentando 1 Gy de manera progresiva. Se evaluó el efecto de la radiación gamma de ^{60}Co mediante la obtención de las dosis letales (DL_{50} y DL_{99}) y las reducciones de crecimiento (RC_{25} , RC_{50} y RC_{75}), así como el análisis de componentes principales.

6.2.3.1 Estimación de la DL_{50} y DL_{99} de callos irradiados a partir de embriones inmaduros

La DL_{50} para callos a partir de embriones inmaduros irradiados con ^{60}C fue de 4.17Gy, mientras que para la DL_{99} fue de 12Gy (Cuadro 10, Figura 9), La DL_{50} fue similar a la dosis de embriones inmaduros irradiados (3.75 Gy); sin embargo, en la DL_{99} se observó diferencia ya que en embriones inmaduros fue de 9 Gy. Este comportamiento posiblemente pudo deberse al contenido de agua en los explantes utilizados, ya que al irradiar embriones

inmaduros presenta menor humedad en comparación de utilizar callos, debido a que en la DL₉₉ (12 Gy) ya no se contaba con callos viables, dosis en la cual ya no hubo ningún dato positivo de supervivencia, razón por la cual ya no se considera en el cuadro 10.

Cuadro 10. DL₅₀ para callo de embriones inmaduros de *V.planifolia* irradiados con ⁶⁰C.

	Dosis	Error	Chi-cuadrado	Z-score	Varianza muestral	Covarianza
DL ₅₀	4.17Gy	1.199	8.52	4.124	0.092	-0.253

DL: Dosis letal. N: Número de unidades. Gy: Gray, unidad de radiación gamma.

Como se observa en la figura 9, tanto la Dosis Letal Media como la Dosis Letal Máxima se encuentran dentro del rango de dosis de radiación aplicada, ubicándose la DL₅₀ en el 4.17Gy mientras que la DL₉₉ en 12 Gy.

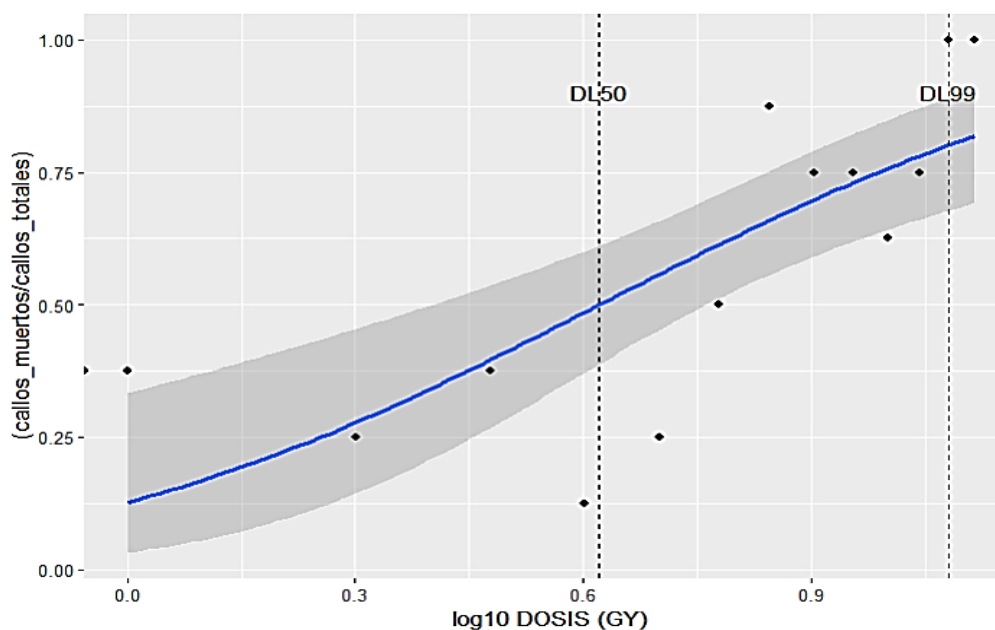


Figura 9. Determinación de la DL₅₀ y DL₉₉ para callos irradiados a partir de embriones inmaduros de *V.planifolia*.

La DL₅₀ para los callos de embriones inmaduros de *Vanilla planifolia* obtenida en este estudio (4.17 Gy) es relativamente baja en comparación con otros estudios. Veitía *et al.*

(2007) reportaron que la DL_{50} en callos de papa (*Solanum tuberosum* var. Desirée) fue de 10 Gy y Ángeles-Espino *et al.* (2013) encontraron que la DL_{50} en el área del callo de *Agave tequilana* fue de 16 Gy. Asimismo, Valdez *et al.* (2016) irradiaron callos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) encontrando la DL_{50} a una dosis de 30 Gy, mientras que Martirena-Ramírez *et al.* (2018) determinaron que la DL_{50} para callos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) fue de 30 Gy, una cifra comparable a la de caña de azúcar, lo que indica una resistencia similar a la radiación en estos tejidos.

6.2.3.2 RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} en peso y volumen de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.

La estimación de la curva de reducción de crecimiento en base a peso de los callos se obtuvo que la RC_{25} fue de 6.60 Gy, la RC_{50} de 7.67Gy y la RC_{75} de 8.92Gy. Con estos datos se determinó que la dosis efectiva (DE) de radiación para el peso de callos a partir de embriones inmaduros fue de 7.67Gy (Figura 10). Martirena *et al.*, (2019) reportó una disminución de masa fresca conforme aumentaba la dosis de radiación aplicada en frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

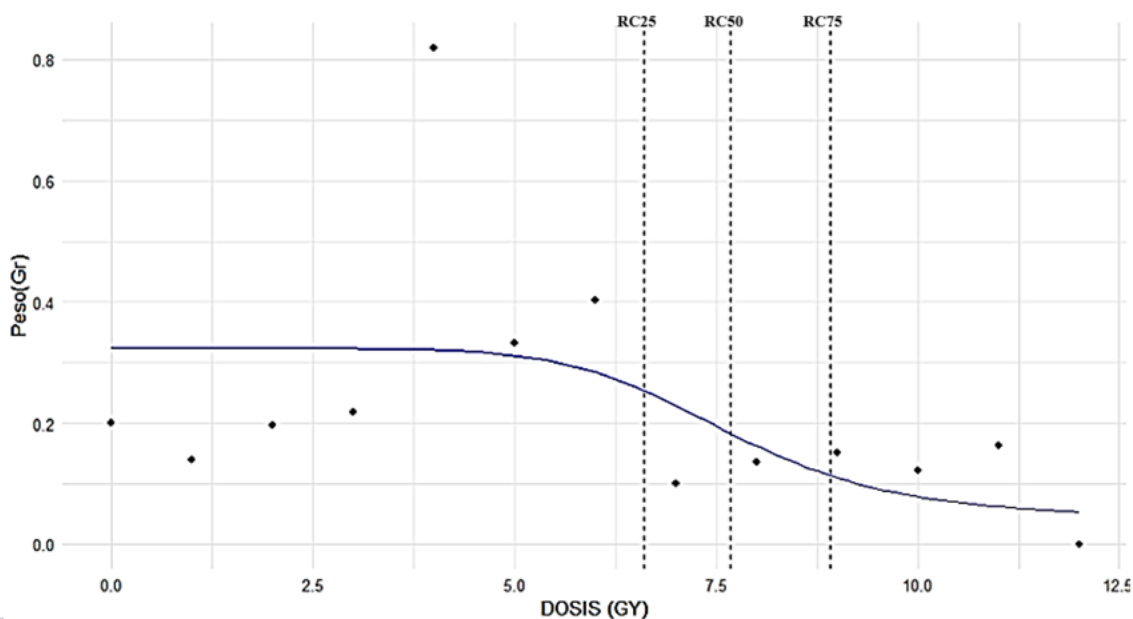


Figura 10. RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} en peso de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.

Por otro lado, considerando el volumen de callos a partir de embriones inmaduros irradiados se obtuvo que la RC_{25} fue de 1.76Gy, la RC_{50} de 2.03Gy y la RC_{75} de 2.03 Gy (Figura 11). Así mismos, la dosis efectiva (DE) fue de 2.03 Gy.

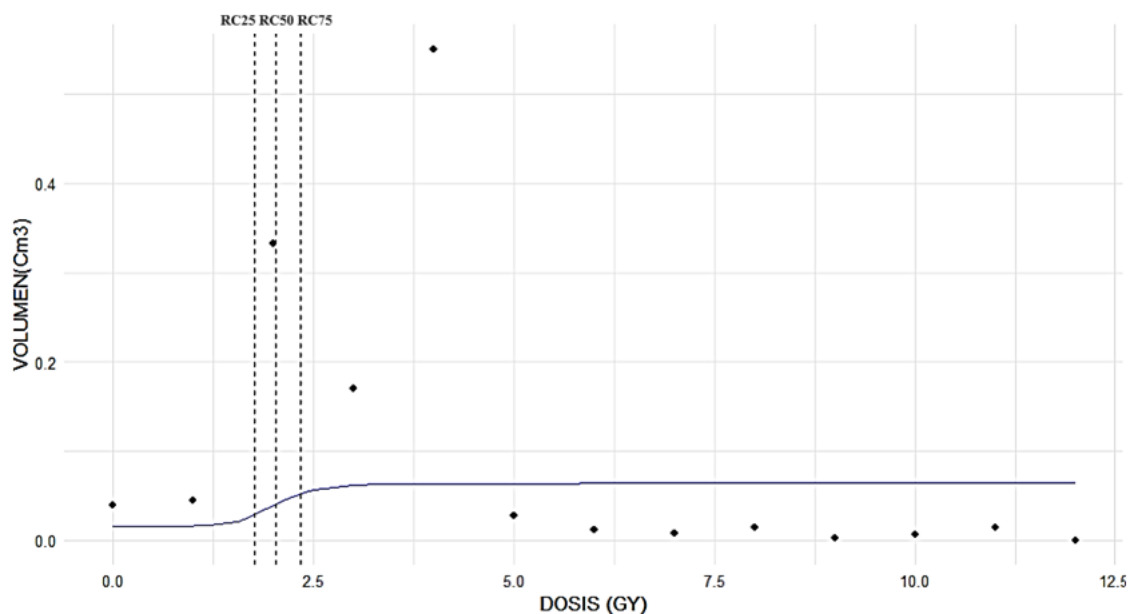


Figura 11. RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} en volumen de callos a partir de embriones inmaduros.

Las reducciones de crecimiento en callos a partir de embriones inmaduros de *V. planifolia* indican que esta especie es particularmente sensible a la radiación, con una reducción del 50 % en el crecimiento del tejido a dosis bajas. Valdez *et al.* (2016) irradiaron callos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y encontraron que la dosis que redujo el crecimiento en un 50 % fue de 30 Gy. Ángeles-Espino *et al.* (2013) en *Agave tequilana* observaron que el crecimiento del callo disminuyó significativamente a partir de 20 Gy, lo que indica una tolerancia moderada a la irradiación, superior a la de *V. planifolia*. En *Phaseolus vulgaris*, Martirena-Ramírez *et al.* (2018) encontraron que la dosis más cercana a la RC_{50} fue de 30 Gy, lo que resultó en una disminución en el número de brotes por callo. Finalmente, Veitía *et al.* (2007) determinaron que la RC_{50} para los callos de papa (*Solanum tuberosum* var. Desirée) fue de 10 Gy, lo que también refleja una mayor resistencia frente a la radiación que la observada en *V. planifolia*.

6.2.4 Análisis de componentes principales para peso y volumen de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.

En la Figura 12 se observa que las variables de peso y volumen de callos están relacionadas entre debido a que sus vectores forman un ángulo menor a 90° y se redujeron a dos componentes. En cuanto a las dosis de radiación, señaladas por puntos, casi todas las dosis están cercanas mostrando similitud entre ellas excepto por 4 Gy, en la que se obtuvieron los mayores valores en ambas variables.

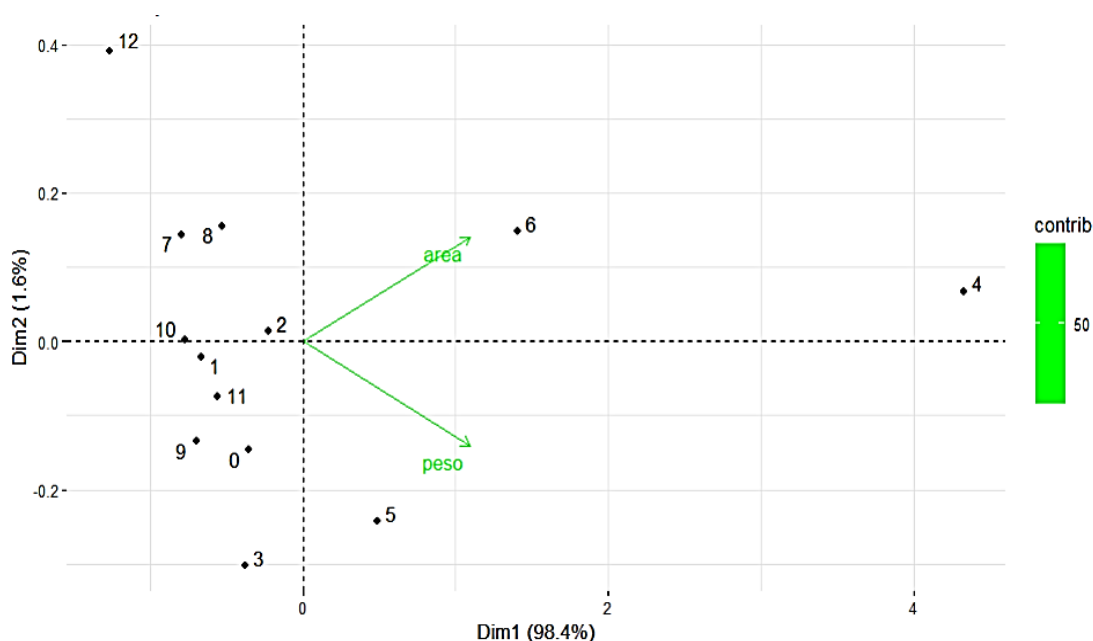


Figura 12. Análisis de componentes principales para peso y volumen de callos a partir de embriones inmaduros de *V.planifolia*

6.3 Comportamiento de callos M_2V_1 a partir de yemas de vitroplantas M_1V_1 de *V. planifolia*

6.3.1 Respuesta y desarrollo de callos M_2V_1 a partir de yemas de vitroplantas M_1V_1

Al evaluarse 21 tratamientos de callos M_2V_1 formados a partir de yemas de vitroplantas M_1V_1 se obtuvo mayor sobrevivencia en T4, T7 y T14, con porcentajes de 88.8, 100 y 100, respectivamente. Mientras que los tratamientos con menor porcentaje de sobrevivencia fueron T20 y T21 (Cuadro 11).

Los tratamientos con mayor porcentaje de sobrevivencia fueron con dosis menores a 8 Gy y los tratamientos irradiados en alguna de las generaciones a 4 Gy; los tratamientos con menor porcentaje de sobrevivencia fueron aquellos irradiados con las dosis de 6Gy y 8Gy.

Los tratamientos con mayor número de brotes desarrollados fueron el T3, el T4 y el T5 con 9, 8 y 7 brotes respectivamente. Estos 3 tratamientos fueron irradiados a dosis bajas entre los 2Gy y 4Gy. Al compararse con los tratamientos con menor número de brotes desarrollados los cuales fueron nuevamente los tratamientos con dosis altas (6Gy y 8Gy), coincide la estimulación a dosis bajas con lo observado en la brotación de embriones inmaduros y callos a partir de embriones inmaduros.

Fuchs *et al.*, (2025) reportó al irradiar plantas de caña de azúcar que la diferenciación y brotación de los callos irradiados fue afectada por la dosis de radiación, disminuyendo la diferenciación de los callos y el desarrollo de brotes con el aumento de la dosis aplicada. También Martinera *et al.*, (2019) encontró que al aplicar radiación gamma a callos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), el porcentaje de formación de callos se veía afectado.

Martirena *et al.* (2019) reportó en frijol común que la radiación gamma afecto la regeneración de los brotes a partir de callos con diferencias estadísticamente diferentes al comparar las distintas dosis aplicadas, obteniendo una mayor regeneración con las dosis más bajas.

Cuadro 11. Supervivencia y brotación de callos M₂V₁ de *V. planifolia*.

Tratamiento	Supervivencia (%)	Número de brotes
T1 (0 Gy, 0 Gy)	66.6	2
T2 (2 Gy, 0 Gy)	66.6	6
T3 (2 Gy, 2 Gy)	66.6	9
T4 (2 Gy, 4 Gy)	88.8	8
T5 (2 Gy, 6 Gy)	77.7	7
T6 (2 Gy, 8 Gy)	44.4	4
T7 (4 Gy, 0 Gy)	100	6
T8 (4 Gy, 2 Gy)	66.6	2
T9 (4 Gy, 4 Gy)	77.7	3
T10 (4 Gy, 6 Gy)	55.5	1
T11 (4 Gy, 8 Gy)	44.4	4
T12 (6 Gy, 0 Gy)	55.5	1
T13 (6 Gy, 2 Gy)	44.4	5
T14 (6 Gy, 4 Gy)	100	4
T15 (6 Gy, 6 Gy)	55.5	2
T16 (6 Gy, 8 Gy)	55.5	2
T17 (8 Gy, 0 Gy)	44.4	5
T18 (8 Gy, 2 Gy)	44.4	5
T19 (8 Gy, 4 Gy)	44.4	4
T20 (8 Gy, 6 Gy)	33.3	3
T21 (8 Gy, 8 Gy)	22.2	2

T: Tratamiento. Gy: Gray (0 Gy, 0 Gy) = primera y segunda irradiación, respectivamente.

Una vez desarrolladas las vitroplantas de los callos M₂V₁ se evaluaron 3 variables: longitud de vitroplantas, número de hojas y número de raíces. Los tratamientos con mayor longitud de planta fueron el T3, T7 y T8 (Cuadro 12), mientras que los de menor longitud fueron el T1 y T10; en cuanto a número de hojas los tratamientos con mayor desarrollo fueron el T3, T13 y T20 y los tratamientos con menor número de hojas fueron los tratamientos 10 y 12. En número de raíces, los tratamientos más altos fueron el T2 y T12, mientras que los tratamientos T11, T16, T17, T18 y T19 no tuvieron desarrollo de raíces.

Cuadro 12. Desarrollo de vitroplantas M₂V₁ a partir de callos de yema de *V. planifolia*.

Tratamiento	Longitud (cm)	No. hojas	No. raíces
T1	1.10	1.33	1.50
T2	1.30	2.50	2.33
T3	1.92	3.22	2.00
T4	1.75	2.25	0.50
T5	1.37	3.00	0.71
T6	1.32	2.00	0.75
T7	2.23	2.33	1.16
T8	2.20	2.50	1.00
T9	1.40	2.66	1.00
T10	1.00	1.00	1.00
T11	1.35	1.25	0.00
T12	1.10	0.00	2.00
T13	1.26	3.00	0.40
T14	1.35	2.25	0.25
T15	1.20	2.50	0.50
T16	1.15	2.00	0.00
T17	1.42	1.75	0.00
T18	1.80	1.75	0.00
T19	1.02	2.25	0.00
T20	1.80	2.66	0.33
T21	1.15	3.00	1.00

T =Tratamiento.

Algunos autores como Van-Harten (1998) y Caplin y Willey (2018) mencionan que el desarrollo de los meristemos y brotes después de irradiar dependen de la etapa de crecimiento y del ciclo celular de la planta, lo que pudo en este caso ocasionar un daño más severo en las células al irradiar a dosis más altas. Otra explicación que se a dado a esta reacción es que la penetración de la radiación gamma causa radiólisis, es decir descomposición del agua y otros compuestos químicos, aumentando la concentración de especies reactivas de oxígeno (SRO) llevando a las células a un estrés oxidativo y daño en el causando así daño en el ADN y provocando que las células dejen de dividirse. (Gudkov *et al.*, 2019)

6.3.2 Radiosensibilidad de callos M₂V₁ a partir de yemas de vitroplantas M₁V₁ de *V. planifolia*

Se evaluó la radiosensibilidad de callos irradiados formados a partir de yemas de vitroplantas desarrolladas por embriones inmaduros irradiados de *V. planifolia*, mediante la obtención de las dosis letales, reducciones de crecimiento y el análisis de componentes principales.

6.3.2.1 Estimación de la DL₅₀ de callos M₂V₁ a partir de yemas de vitroplantas M₁V₁ de *V. planifolia*

La DL₅₀ para callos M₂V₁ a partir de yema de vitroplantas M₁V₁ fue de 23.15 Gy (Cuadro 13, Figura 13), siendo esta, una dosis más alta que la obtenida para embriones inmaduros y para callos a partir de embriones inmaduros, esto puede deberse debido al contenido de agua y al estado del explante el cual, al ser de callo a partir de yema, puede tener una resistencia más alta a la radiación gamma.

Cuadro 13. Análisis de la DL₅₀ para callos de yema M₂V₁ de embriones inmaduros M₁V₁.

	Dosis	Error	Chi-cuadrado	Z-score	Varianza muestral	Covarianza
DL ₅₀	23.15Gy	10.56	3.915	0.72	0.564	-1.275

DL₅₀: Dosis letal media. Gy: Gray.

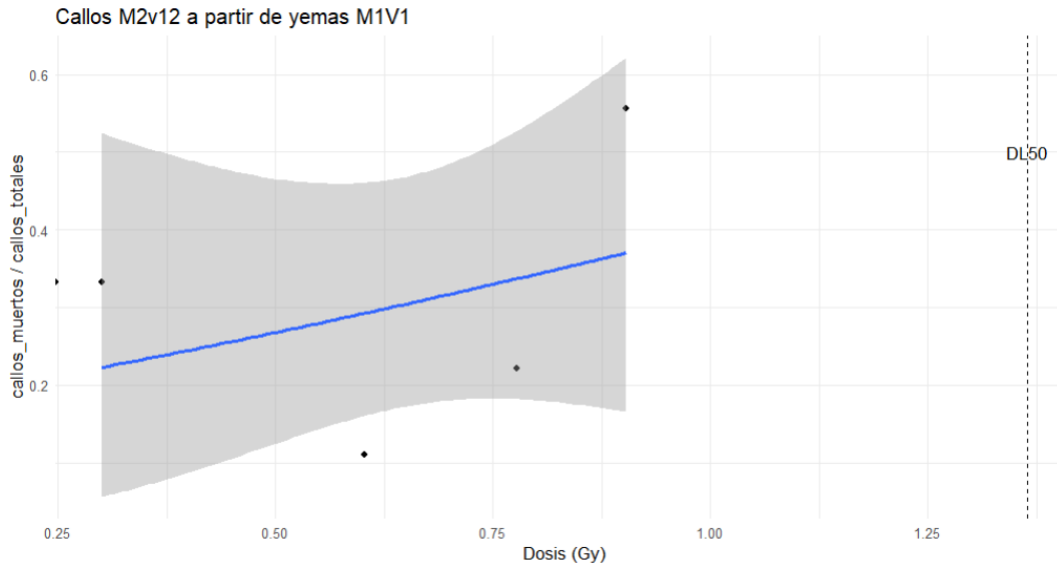


Figura 13. Determinación de la DL₅₀ para callos M₂V₁ irradiados a partir de yemas M₁V₁

6.3.2.2 Determinación de la RC₂₅, RC₅₀ y RC₇₅ en vitroplantas a partir de callos de yemas de *V. planifolia*

Se estimaron curvas de reducción de crecimiento en vitroplantas desarrolladas a partir de callos M₂V₁ a partir de yemas de vitroplantas M₁V₁ para tres variables: longitud de vitroplantas, número de hojas y número de raíces.

En longitud de vitroplantas la RC₂₅ fue de 3.03Gy, la RC₅₀ de 3.64 Gy y la RC₇₅ de 4.36 Gy. Con una dosis efectiva (DE) de 3.64 Gy. Como se puede observar en la figura 14, estos valores al igual que para embriones inmaduros y callos a partir de embriones se encuentran en un rango reducido. Gálvez (2017) irradió dos variedades de soya (*Glycine max*) y reportó que en una de ellas el valor promedio de altura de planta fue menor en comparación con su control, observando una disminución de esta al aumenta la dosis de radiación. Además, Tshilenge-Lukanda *et al.* (2013) también reporto en *Arachis hypogaea* una disminución en la altura al incrementar la dosis. Sin embargo, Gálvez (2007) reportó en otra variedad de soya una actividad contraria al obtener una mayor altura de planta con el incremento de dosis, actividad reportada también por Muldibu *et al* (2012) en soya Vuangi.

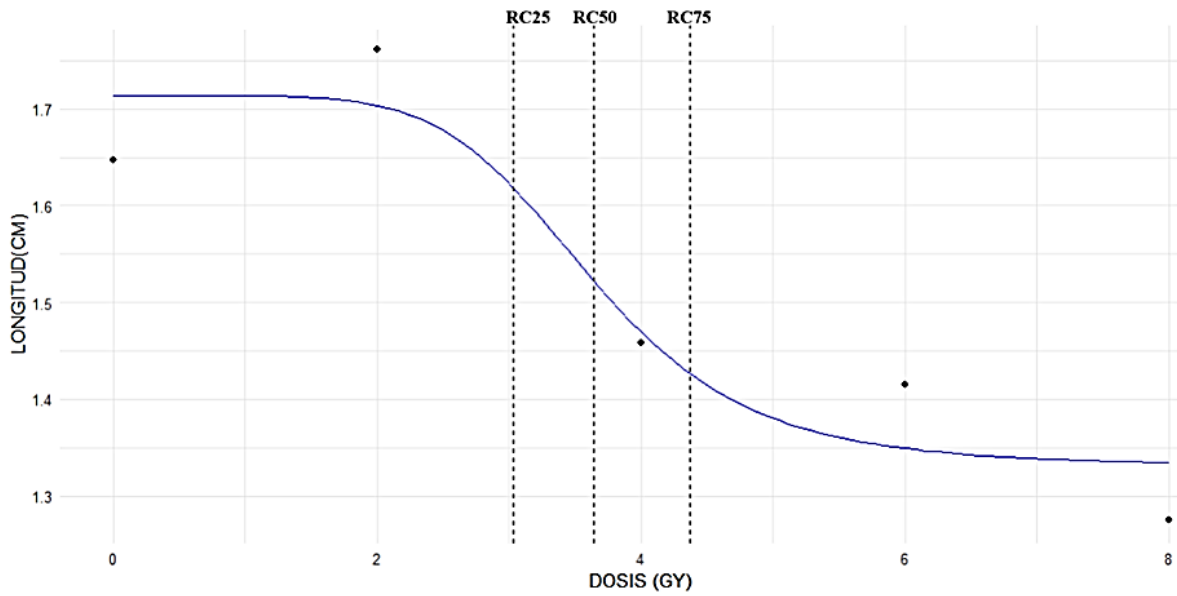


Figura 14. RC₂₅, RC₅₀ y RC₇₅ en longitud de vitroplantas a partir de callos M₂V₁.

Para la variable de número de hojas la estimación de la RC₂₅ fue de 3.03 Gy, la RC₅₀ de 3.64 Gy y la RC₇₅ fue de 4.36 Gy, con una Dosis Efectiva (DE) de 3.6 Gy (Figura 15). Estas dosis en comparación con las obtenidas en las curvas de reducción en embriones inmaduros y callos M₁V₁ son más bajas, esto puede deberse a una segunda exposición a la radiación y un material previamente irradiado.

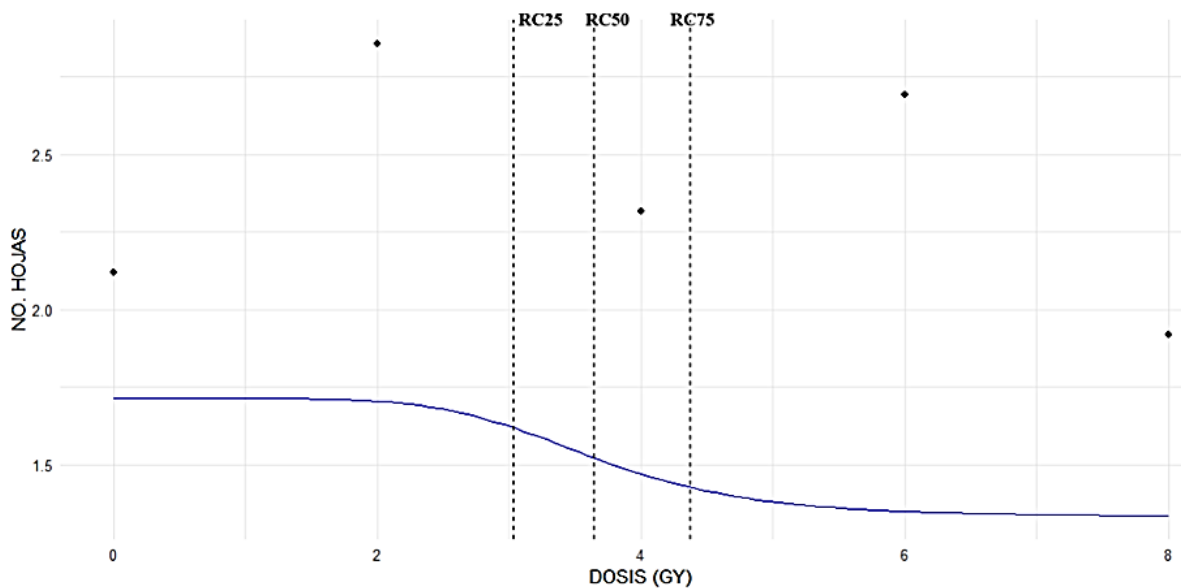


Figura 15. RC₂₅, RC₅₀ y RC₇₅ en número de hojas de vitroplantas M₂V₁.

Por último, para la reducción de crecimiento en base al número de raíces de vitroplantas M_2V_1 , se estimó una RC_{25} en 19.52 Gy, RC_{50} en 19.73 Gy y una RC_{75} en 19.93; con una Dosis Efectiva de 19.7 Gy (Figura 16). Estos valores pueden deberse a la poca presencia de raíces, ya que a partir de 4 Gy las medias estuvieron por debajo de una raíz. Este es el único valor que está por encima de todos los valores obtenidos en RC en los 3 materiales vegetativos utilizados. Martirena *et al.*, (2019) al irradiar frijol común observaron a dosis más altas de la DL_{50} un menor desarrollo de raíces secundarias y menor longitud de la raíz principal.

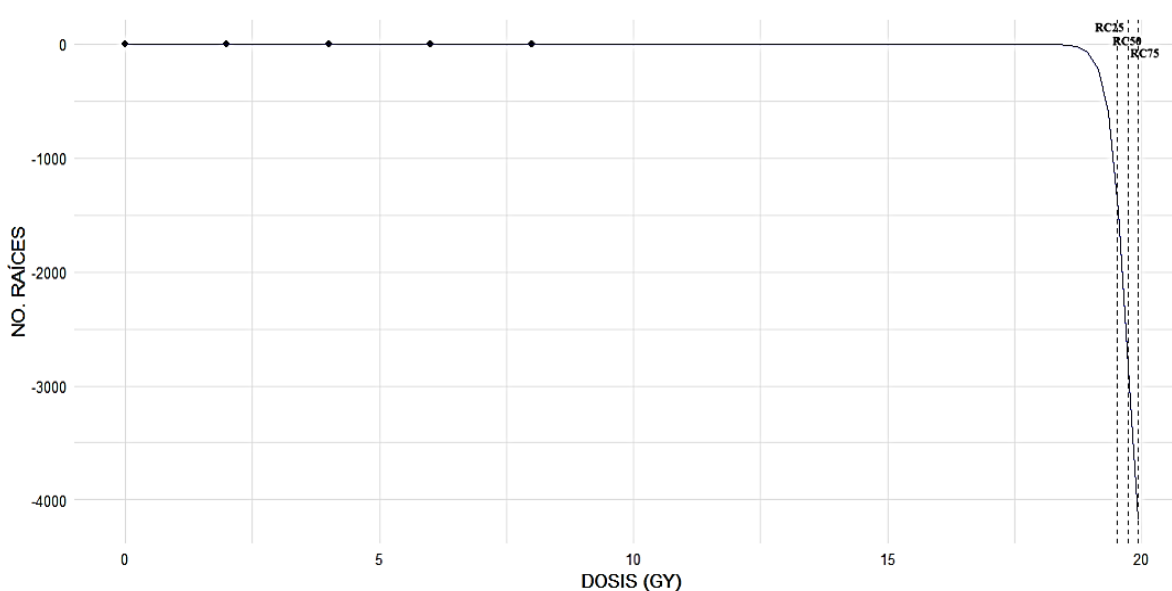


Figura 16. RC_{25} , RC_{50} y RC_{75} en número de raíces de vitroplantas M_2V_1 .

López *et al.*, (2019) reportó al irradiar *Anthurium andreanum* L. que la longitud de plantas, número de hojas y raíces disminuyó conforme se aumentaba la radiación aplicada. Algunos autores como McSteen *et al.*, (2008) y Caplín y Willey, (2018) mencionan que la morfología de los brotes regenerados a partir de callos puede ser afectado a dosis altas por la eliminación de la síntesis de auxinas, ya que estas se presentan en mayor cantidad en partes de la planta en donde hay mucha actividad de división celular. Esto puede explicar que al aumentar la dosis de radiación en callos de *V. planifolia* se observó una disminución en la elongación de tallos y formación de raíces.

6.3.3 Componentes principales de vitroplantas de callos M₂V₁ irradiados a partir de yemas M₁V₁ de *V. planifolia*.

Para el análisis de componentes principales de callos M₂V₁ irradiados a partir de yemas M₁V₁ se evaluaron las variables de longitud de plántula, número de hojas y raíces, las cuales están representadas por los tres vectores en la Figura 17. Las tres variables forman ángulos menores a 90° entre sí, lo cual indica que estas están relacionadas, estando más estrechamente relacionadas la longitud de vitroplanta y el número de raíces. En cuanto a los tratamientos representados por números en la figura 17, el testigo y los callos irradiados a 2 Gy fueron los que tuvieron los valores más altos, contribuyendo más a la varianza.

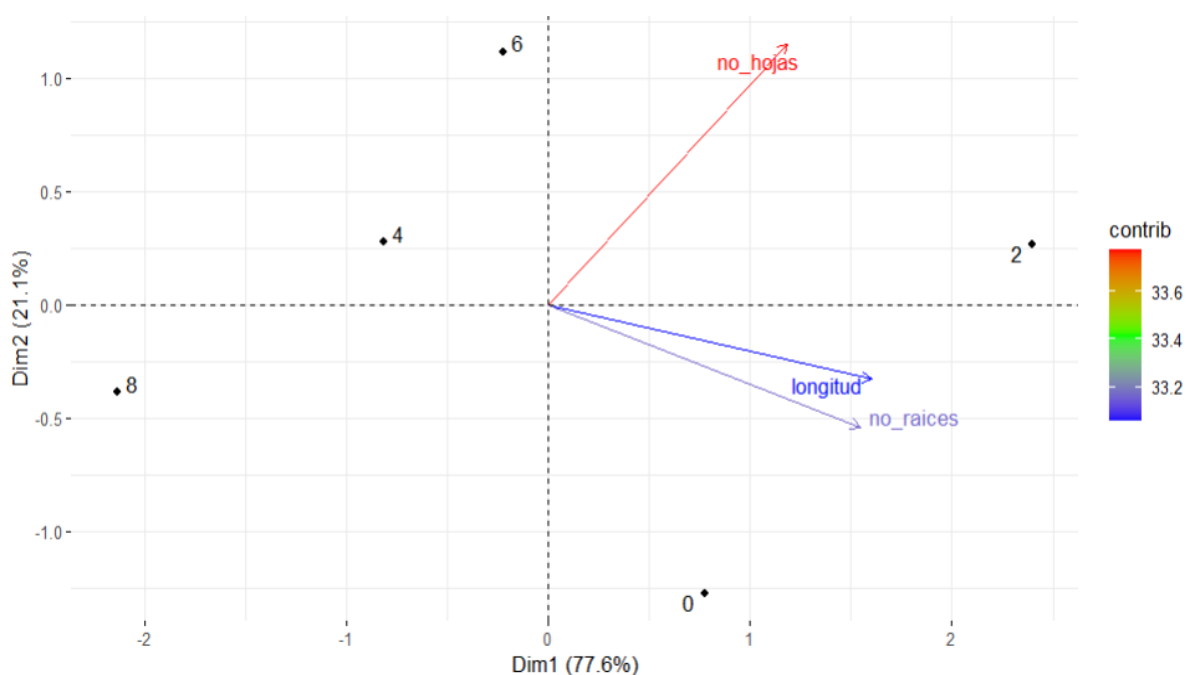


Figura 17. Componentes principales de vitroplantas a partir de callos M₂V₁ irradiados de yemas M₁V₁

6.4 Comportamiento de embriones, callos y vitroplantas sometidos a irradiación con ⁶⁰Co.

6.4.1 Comportamiento de vitroplantas M₁ a partir de embriones inmaduros.

Como puede observarse en el cuadro 14, el tratamiento T3 que corresponde a una dosis de irradiación de 4 Gy presentó los mayores valores en longitud de vitroplanta, número de yemas y longitud de entrenudos con 15.157 cm, 6,71 y 1.994 cm, respectivamente, estas

diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$). En número de hojas los valores fueron estadísticamente iguales entre los tratamientos. Sin embargo, numéricamente también el T3 fue el que presentó el mayor valor con 8.215. Así mismo, se observa que los valores fueron aumentando al aumentar la dosis de irradiación hasta llegar a los 4Gy, y después descendieron hasta los 8 Gy, lo cual indica que la radiación gamma de ^{60}Co estimuló el desarrollo de las variables vegetativas contempladas en el presente estudio.

Cuadro 14. Comportamiento de variables vegetativas en vitroplantas de *V. planifolia* a partir de embriones inmaduros irradiados con ^{60}Co .

Tratamiento	Variables vegetativas			
	Longitud (cm)	No. Yemas	No. Hojas	Entrenudos(cm)
T1(Testigo)	7.957 b	5.285 ab	8.000 a	1.172 b
T2 (2 Gy)	8.629 b	5.428 ab	7.000 a	1.580 ab
T3(4 Gy)	15.157 a	6.714 a	8.215 a	1.994 a
T4(6 Gy)	10.471 b	4.571 b	5.714 a	1.302 ab
T5(8 Gy)	10.000 b	4.142 b	6.571 a	1.302 ab
DMS	4.566	1.997	2.780	0.648
CV (%)	36.21	31.82	33.06	30.76

abc: Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). cm: centímetros. Gy: gray, unidad de medición de la radiación gamma. DMS: diferencia mínima significativa. CV (%): coeficiente de variación.

Después de la irradiación con rayos gamma en semillas inmaduros de *Vanilla planifolia*, en un estudio de Basu *et al.*, (2008) un amplio número de plantas presentaron modificaciones morfológicas al momento de establecerse en condiciones *ex vitro*, independientemente de las condiciones a las que fueron sometidas *in vitro*. Altura de planta, número y longitud de entrenudos, tamaño de hojas son algunos de los caracteres normalmente alterados, los cuales, al ser gobernado por pocos genes, frecuentemente resultan afectados en tratamiento de mutagénesis inducida (Gaur *et al.*, 2008)

Estos resultados coinciden con las tendencias observadas en otras especies en

cuanto a los efectos de la irradiación en el crecimiento y desarrollo vegetal. Villalva *et al.* (2020) observaron en un estudio sobre la inducción de mutaciones en pasto jameiro (*Brachiaria brizantha*) que la longitud de la planta varió significativamente en función de las dosis de radiación. Además, en este estudio a medida que se incrementaba la dosis, se detectaron reducciones notables en el crecimiento, lo cual concuerda con los resultados de Ángeles-Espino *et al.* (2013) en vitroplantas de *Agave tequilana var. Azul*.

Así mismo, Avendaño-Arrazate *et al.* (2021) irradiaron plantas de *Coffea arabica* y encontraron que la exposición a dosis de 50 Gy tuvo un impacto positivo en el número de ramas y hojas pero un impacto negativo al exponerse a 100 Gy; este efecto también lo reportaron en otras especies como *Physalis peruviana* (Antúnez-Ocampo *et al.*, 2017), cacahuete (*Arachis hypogaea*) (Brito y Ángeles, 2016), papa (*Solanum tuberosum*) (Salomón *et al.*, 2017) y lenteja (*Lens culinaris*) (Roy *et al.*, 2019), donde la irradiación causó una disminución en la altura de las plantas a medida que aumentaba la dosis. En *Vanilla planifolia*, Ma Árup *et al.* (2022) indicaron que, después de 44 semanas de irradiación, el crecimiento de las plantas control (sin irradiación) fue superior al de las irradiadas, mostrando mayor longitud y número de yemas.

6.4.2 Desarrollo de callos irradiados a partir de embriones inmaduros de *V. planifolia*.

En el cuadro 15, se puede observar el comportamiento de callos irradiados a partir de embriones inmaduros, donde la radiación tuvo un efecto estimulante a los 4 Gy en peso de callo con 0.8200, las diferencias encontradas entre los tratamientos fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). En relación con el volumen de callo no se presentaron diferencias significativas. Sin embargo, numéricamente T5 (4Gy), presentó el mayor valor con 0.3301 Cm³. En ambas variables se observa que sus valores fueron aumentando al aumentar la dosis de irradiación hasta llegar a los 4Gy, después estos presentaron una tendencia a disminuir hasta llegar a los 11 Gy.

Cuadro 15. Peso y volumen de callos irradiados a partir de embriones inmaduros.

Tratamiento	Variables	
	Peso (gr)	Volumen (cm ³)
T1(Testigo)	0.201 b	0.023 a
T2(1 Gy)	0.140 b	0.011 a
T3(2 Gy)	0.196 b	0.041 a
T4(3 Gy)	0.218 b	0.012 a
T5(4 Gy)	0.820 a	0.330 a
T6(5 Gy)	0.331 ab	0.070 a
T7(6 Gy)	0.403 ab	0.152 a
T8(7 Gy)	0.100 b	0.014 a
T9(8 Gy)	0.135 b	0.031 a
T10(9 Gy)	0.151 b	0.002 a
T11(10 Gy)	0.122 b	0.006 a
T12(11 Gy)	0.162 b	0.031 a
T13(12 Gy)	0.000 c	0.000 b
DMS	0.524	0.347
CV (%)	12.56	34.89

abc: Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). cm: Centímetros. Gy: gray, unidad de medición de la radiación gamma. DMS: Diferencia mínima significativa. CV (%): coeficiente de variación.

Valdez *et al.* (2004), al irradiar callos *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y observaron que su crecimiento fue afectado a medida que aumentó la dosis de irradiación, ya que a los 10 Gy registraron mayor crecimiento; Sin embargo, a los 30 Gy dicho crecimiento fue afectado. Al igual que en estudio de Villalba *et al.* (2020) con la irradiación del pasto Janeiro, la tendencia del establecimiento se redujo a medida que

aumentó la dosis de radiación hasta 75 Gy.

6.4.3 Vitroplantas M₂V₁ desarrolladas de callos a partir de yemas de vitroplantas M₁V₁ de *V. planifolia*.

Al realizar una segunda radiación en callos de yema de vitroplantas M₁V₁, se observa que la dosis de 2 Gy fue la que presentó los mayores valores, con 2.055 cm en longitud, 3.33 en número de hojas y 1,77 en número de raíces, dichas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). El comportamiento de los valores en las variables es una tendencia a disminuir después de los 2 Gy hasta los 8 Gy. Estos resultados indica que al realizar una radiación recurrente en este caso la dosis recomendada es a los 2 Gy., siendo diferente a la primera radiación donde se encontró que la dosis recomendada es a los 4 Gy.

Cuadro 16. Vitroplantas M₂V₁ desarrolladas a partir de callos de yema de vitroplantas M₁V₁ de *V. planifolia*.

Dosis M ₂ V ₁	Variables		
	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de raíces
0 Gy	1.055 ab	2.000 ab	1.277 ab
2 Gy	2.055 a	3.333 a	1.777 a
4 Gy	1.538 ab	2.444 ab	0.444 bc
6 Gy	1.022 bc	1.944 ab	0.444 bc
8 Gy	0.8500 c	1.277 b	0.222 c
DMS	0.684	1.498	0.916
CV (%)	16.53	41.40	31.77

abc: Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). cm: Centímetros. Gy: gray, unidad de medición de la radiación gamma. DMS: Diferencia mínima significativa. CV (%): coeficiente de variación.

Hernández (2013) indujo mutaciones en heliconias mediante radiación recurrente y observó una influencia en la altura de los brotes por la acumulación de mutaciones a través de las irradiaciones. Además, observó un incremento en la sobrevivencia al irradiar nuevamente a dosis distintas, sin embargo, esto se puede atribuir a la selección de las plantas M₁. En cuanto al número de hojas, este autor reporta que el desarrollo foliar estuvo

relacionado con la altura, ya que al aumentar la radiación disminuyeron ambas variables en la segunda generación.

La disminución en el crecimiento usando radiación ha sido reportada por diversos autores. Entre ellos, Canul *et al.* (2012) reportaron disminución de desarrollo en plantas irradiadas de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*); así como Iglesias *et al.* (2010) también observaron reducción de crecimiento en plántulas al irradiar oyamel.

Gálvez (2017) trabajo con radiación recurrente en soya (*Glycine max*) y al irradiar por segunda vez por debajo de la DL_{30} observó una estimulación en la producción de semilla, pero al irradiar a dosis por arriba de ese valor tuvo una disminución en la producción. Además, en uno de los genotipos irradiados observó floración temprana en la generación M_2 con dosis bajas-medias en comparación con el control. La aparición de floración temprana en plantas M_2 también se ha observado en *Brassica napus* L. (Hassan y Abd-El-Haleem, 2014).

VII. CONCLUSIONES

La radiosensibilidad en embriones inmaduros y callos *in vitro* a partir de embriones inmaduros se registró a una dosis de 4 Gy, considerando la DL₅₀, RC₅₀ y desarrollo de callos y vitroplantas.

Para una irradiación recurrente de callos M₂V₁ formados a partir de yemas de vitroplantas M₁V₁, las dosis de irradiación con ⁶⁰Co presentaron variación, para sobrevivencia de callos fue entre 4Gy y 6 Gy y para altura de planta fue de 4 Gy.

De manera general, considerando variables del comportamiento del desarrollo de callos, brotes y vitroplantas formadas de M₁V₁ y M₂V₁, se recomienda una dosis de irradiación con ⁶⁰Co de 4 Gy.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, B., Roy, A., Reddy, H., Roy, D., Das, C., Ghosh, D., Das, S., Mondal, S., Nath, R., Bhattacharyya, P. K., Jambulkar, S. K., & Bhattacharyya, S. (2024). Identification and analysis of gamma-irradiation-induced *Stemphylium* blight tolerant lentil (*Lens culinaris*) mutant. *International Journal of Radiation Biology*, 1-9. <https://doi.org/10.1080/09553002.2024.2409667>
- Aguirre G., J. A., G. J. A. Hernández, C. L. Sahagún, P. R. Ortega, C. F. Aragón, A. L. Dzib, O. De la O, H. M. R. García, M. N. O. Gómez, C. O. B. Pérez y M. R. Esparza (2018) Conservación y manejo *in situ*. In: Conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad de maíces nativos de México. Ramírez-Galindo, J., y R. González-Santos (Eds). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. México. pp 6-33.
- Ahloowalia, S., Maluszynky, M. y Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135, 187-204.
- Ahmed, S., Khan, M., Raza, T., Ahmad, R., Iqbal, J., & Eash, N. S. (2022). Integrated use of bio-organic and chemical fertilizer to enhance yield and nutrients content of tomato. *Eurasian Journal of Soil Science*, 11(2), 126-131.
- Ahumada-Flores S, Gomez P, L, Parra C, FI, De la Cruz, T, E. (2021) Technical note: Gamma irradiation induces changes of phenotypic and agronomic traits in wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) *Applied Radiation and Isotopes*. V 167.
- Akgüm, I y Tosun, M. (2004). Agricultural and cytological characteristics of M1 perennial rye (*Secale montanum* Guss.) as affected by the application of different doses of gammarays. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(5),827-833.
- Ali, S., y Ghosh, S. K. (2017). “Gamma Radiation Induced Mutagenesis in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) for Enhanced Antioxidant Properties”. *Journal of Horticultural Science*, 29(3), 301-310.

- Álvarez-Holguín, A., Morales-Nieto, C. R., Avendaño-Arrazate, C. H., Santellano-Estrada, E., Melgoza-Castillo, A., Burrola-Barraza, M. E., & Corrales-Lerma, R. (2018). Dosis letal media y reducción media del crecimiento por radiación gamma en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana* Ness). *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 5(13), 81-88. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Dirección de Investigación y Posgrado.
- Ángeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., & Paredes-Gutiérrez, L. (2013). Determinación de la dosis letal (DL₅₀) con Co60 en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(4), 381-386.
- Antúnez-Ocampo, O. M., Cruz-Izquierdo, S., Sandoval-Villa, M., Santacruz-Varela, A., Mendoza-Onofre, L. E., & De la Cruz-Torres, E. (2017). Variabilidad inducida en caracteres fisiológicos de *Physalis peruviana* L. mediante rayos gamma 60Co aplicados a la semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40, 211-218.
- Avendaño, A., C., Corrales, L., Morales, C. y Santellano, E. (2019). Radiación gamma para inducción de mutagénesis en pasto rosado (*Melinis repens* Zizka) Acta universitaria, México, 29.
- Avendaño-Arrazate, C. H., Gómez-Simuta, Y., Martínez-Bolaños, M., Méndez-López, I., Ortíz-Curiel, S., Ariza-Flores, R., Canul-Ku, J., & Reyes-López, D. (2021). Radiación gamma de 60Co en características morfológicas y reproductivas de plantas M1 en *Coffea arabica* L. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 8(1), e2730.
- Azcon-Bieto, J., Talon, M. (2013). Fundamentos de fisiología vegetal. Editorial Mcgraw - Hill - Interamericana. Madrid, España. 385-432 p.
- Barrera-Rodríguez AI; Jaramillo-Villanueva, JL; Escobedo-Garrido JS y Herrera- Cabrera BE. (2011) Rentabilidad y competitividad d ellos sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* J) en la región del Totonacapan, México. *Agrociencia* 45:625-638.
- Bautista-Aguilar, J. R., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ramírez-Mosqueda, M. A., &

- Ortiz-García, M. M. (2021). In Vitro Conservation and Genetic Stability in *Vanilla planifolia* Jacks. *HortScience*, 56(12), 1494-1498. Retrieved Apr 3, 2025, from <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16118-21>
- Bermúdez-Carballoso, I, Cruz-Martín, M y Concepción-Hernández, M (2020). Biotechnological Tools for the Development of Foc TR4- Resistant or Tolerant *Musa* spp. Cultivars. In: *Forestry and Bioindustry and biodiscovery*.
- Borbolla-Pérez, V., Iglesias-Andreu, L. G., Herrera-Cabrera, B. E., & Vovides-Papalouka, A. (2016). Absorción prematura de frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad*, Supl, 11–12
- Borja, W., Rodríguez Álava, J., & Arana Vera, L. (2020). Dosis letal media para inducir mutaciones, con rayos gamma, en pasto janeiro (*Eriochloa polystachya* Kunth). *Revista de Producción Animal*, 32(1), 73-83.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, MF. (2008) Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genet Resour Crop Evol.* 551–571.
- Bory S., P. Lubinsky, A. M. Risterucci, J. L. Noyer, M. Grisoni, M. F. Duval and P. Besse (2008) Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany* 95:805-815.
- Bory, S., Brown, F. y Besse, P. (2016). Evolutionary processes and diversification in the genus *Vanilla*. Odoux, M. Grisoni ed. *Vanilla*. CRC Press, Florida, US. 15-29.
- Carbajal-Valenzuela IA, Muñoz-Sanchez AH, Hernández-Hernández J, Barona-Gómez F, Truong C, Cibrián-Jaramillo A. Microbial Diversity in Cultivated and Feral Vanilla *Vanilla planifolia* Orchids Affected by Stem and Rot Disease. *Microb Ecol.* 2022 Oct;84(3):821-833. doi: 10.1007/s00248-021-01876-8. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34671827.
- Carretero C. L., Cantos, M., Troncoso, A. (2007). *In vitro- ex vitro* salt (NaCl) tolerance of

cassavaplants. *In vitro* cellular and developmental biology-plant 43:364-369.

- Carrillo-González, R. (2018). Manejo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.) con vermicompost. *AgroProductividad*, 9(11-B). Recuperado de <https://revista-aRCoproductividad.org/index.php/aRCoproductividad/article/view/872>
- Canul K. J.; García P. F.; Campos B. E.; Barrios G. E.; De La Cruz T. E.; García A. J.; Osuna C. F.; Ramírez R. S. 2012. Efecto de la irradiación sobre nochebuena silvestre (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3:1495-1507.
- Caplin N. and N. Willey (2018) Ionizing radiation, higher plants and radioprotection: from acute high doses to chronic low doses. *Frontiers in Plant Science*.9:1- 20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00847>
- Castillo M. M., V.P. Ramírez, G. F. Castillo y C. S. Miranda C.S. (2006) “Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol Ayocote del oriente del Estado de México”, *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29:111-120. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61029203>
- Castillo-Martínez, C. R., García-Campusano, F., Vallejo-Reyna, M., A., Reyes-Martínez, I. y Dela Cruz-Torres E. (2018). Mutagénesis de material *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* y la obtención de líneas mutantes. *Agroproductividad*: Vol. 11, (12). 33-39.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López D. y Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal.
- Charron, C., Hubert, J., Minatchy, J., Wilson, V., Chrysot, F., Gerville, S., Ioos, R., Jeandel, C., & Grisoni, M. (2018). Characterization of *Colletotrichum orchidophilum*, the agent of black spot disease of vanilla. *Journal of Phytopathology*, 166(7–8), 525–531.
- Chen, J., & Chang, W. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biología Plantarum* 50 (2):169-173.

- Childers, N., Cibes, H., & Hernández, E. (1959). Vanilla: The orchid of commerce. En C. Withner (Ed.), *The Orchids: A scientific survey* (pp. 477-508). Ronald Press.
- Colunga, G., & Zizumbo, V. (2004). Domestication of plants in Maya Lowlands. *Economic Botany*, 58, 101-110.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. (2017). Appendices I, II and III: Valid from 4 October 2017. CITES Secretariat.
- Corrales Lerma, R. (2017). Mutagénesis con radiación gamma para mejoramiento genético de pasto rosado (*Melinis repens* (Willd) Zizka). Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Chihuahua.
- De la Fe C., Romero M., Ortiz R., Ponce M. (2000). Radiosensibilidad de semillas de soya a los rayos gamma ^{60}Co Revista Cultivos Tropicales vol. 21 no. 2 p.43-47.
- Díaz-Bautista, M., Antonieta, M., Quintero, S., Espinoza-Pérez, J., Jair Barrales-Cureño, H., Herrera- Cabrera, B. E., Antonieta Sandoval-Quintero, M., Juárez-Bernabe, Y., & Reyes, C. (2019). Floristic biodiversity in *Vanilla planifolia* agroecosystems in the Totonacapan region of Mexico. *Biocell*, 1, 440–452.
- Díaz, Salomón. J. L., González Cepero, M. C., Castillo Hernández, J. G., & Varela Nualles, M. (2017). Efecto de los rayos gamma sobre la germinación de la semilla botánica de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 38(1), 89–91. <https://revista.inca.edu.cu>
- Divakaran, M., Nirmal, B., Ravindran, P. N, & Peter, K. V. (2006). Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*, 108(4), 414-422.
- Divakaran, M., Jayakumar, V., Veena, S., Vimala, J., Basha, A., Saji, K., Nirmal, K., & Peter, K. (2008). Genetic variations and interrelation ships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 459-470.

- Divakaran, M., Geetha, S., Nirmal B., & Peter, K. (2008). Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. *Current Science*, 99, 115-120.
- Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. (2004). *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Buenos Aires. Ediciones, INTA.
- El-Sayed, S. (2024). Integrated use of vermicompost and biofertilizers to enhance Growth, yield and nutrient content of tomato Crown under organic conditions. *Egyptian Journal of Horticulture*, 51(1), 103-116.
- Ellia Kartini, M., Norrizah, J. S., Noor Anilizawatima, S., & Siti Safura, J. (2015). Effect of low gamma radiation on the Growth of *Vanilla planifolia* culture.
- Espinoza-Pérez, J., Herrera-Cabrera, B. E., Zizumbo-Villarreal, D., Delgado-Alvarado, A., & Salazar-Rojas, V. M. (2018). Perfil de productor por intensidad de manejo sobre vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) en la región Totonacapan, México. *Agro Productividad*, 11(3), 58–63.
- Gálvez-Marroquín, L. A., Avendaño-Arrazate, C. H., Ariza-Flores, R., & Gomez-Simuta, Y. (2023). Radiación gamma en semillas de Jamaica para inducir variación morfológica y selección de mutantes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(5). <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i5.3010>
- Gigant, R., Bory, S., Grisoni, M. y Besse, P. (2017). Diversidad de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y sus perfiles bioclimáticos en México. *Revista de Biología Tropical*. Vol 65 (3).
- Gómez, N.M., & Moreno F. H. (2012). Respuestas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews ante variaciones microambientales bajo arreglos agroforestales en un bosque seco tropical. *Colombia Forestal*, 15(Supl. 1), 16.
- Gómez Villalva, J. C., Aguirre Terrazas, L., Gómez Pando, L., Reyes Borja, W., Rodríguez Álava, J., & Arana Vera, L. (2020). Dosis letal media para inducir mutaciones, con rayos gamma, en pasto janeiro (*Eriochloa polystachya* Kunth). *Revista de Producción*

Animal, 32(1), 73-83.

- González Oramas, G., Alemán García, S., Garriga, M., Ortíz, R., & de la Fe, C. (2007). Radiosensitivity to gamma rays (^{60}Co) in shoot tips of henequen. *Biotechnología Vegetal*, 7(2), 115-117.
- Gudkov S. V., M. A. Grinberg, V. Sukhov and V. Vodeneev (2019) Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants. *Journal of Environmental Radioactivity*. 202: 8-24.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (1996). Plan de Acción Mundial para Conservación y Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. 64 pp.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2011). El Segundo Informe Sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en el Mundo, Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia, 372 p.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2013). 14ª Reunión ordinaria de la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Comisión de Recursos Genéticos para la Agricultura y la Alimentación. CRCFA-14/13/Informe. Roma, Italia. 74 p. <http://www.fao.org/3/mg538s/mg538s.pdf>
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2021) Data production. FAO Statistical Data. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (septiembre 2021).
- Forster, B.P., Shu, Q.Y., & Nakagawa, H. (2012). Plant Mutagenesis in Crop Improvement: Basic Terms and Applications. In Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H. (Eds.), *Plant*

Mutation Breeding and Biotechnology (pp. 9-20).

- Flores J, A., Reyes L, D., Jiménez G, D., Romero A, O., Rivera T, J., Huerta L, M. (2017). Biodiversity and Evolution in the *Vanilla* genus: case studies of evolution and spatial distribution. En: Grillo, O. y Venora, G. (Eds.). *The Dynamical processes of Biodiversity*. InTech. Europe. pp. 1-26.
- Fuchs, M., González, V., Castroni, S., Díaz, E., & Castro, L. (2002). Efecto de la radiación gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. *Agronomía Tropical*, 52(3), 311–324. Recuperado el 9 de enero de 2025, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2002000300004&lng=es&tlng=es
- Gálvez Marroquín, L. A. (2017). Mutaciones inducidas mediante radiaciones gamma para caracteres de rendimiento en soya (*Glycine max* L. Merrill) genotipo H10-2416 y variedad Huasteca 400 (Tesis de maestría). Colegio de Posgraduados.
- García B. J., T. O. Pérez, T. J. E. Cos, G. L. Ruiz y L. E. Sánchez (2018) Incrementar la Productividad de los Cultivos y Proporcionar Genes de Resistencia para hacer Frente a las Emergencias Derivadas del Cambio Climático. Compobell, SL. Murcia, España. 406 p.
- Ghasemi-Soloklui, A. A., Kordrostami, M., & Karimi, R. (2023). Determination of optimum dose based on biological responses of lethal dose (DL25, 50, 75) and Growth reduction (RC25, 50, 75) in 'Yaghouti' grape due to gamma radiation. *Scientific Reports*, 13(1), 2713. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29896-z>
- Ghori, NuH., Ghori, T., Imadi, S.R., Gul, A. (2020). Improving Crop Health and Productivity: Appraisal of Induced Mutations and Advanced Molecular Genetic Tools. In: Hasanuzzaman, M. (eds) *Agronomic Crops*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0025-1_20
- Goettsch, B., T. Urquiza-Haas, P. Koleff, G. F. Acevedo, A. Aguilar-Meléndez, V. Alavez,

- G. Alejandro-Iturbide, F. Aragon-Cuevas, C. Azurdia-Pérez, J. A. Carrera, G. Castellanos-Morales, G. Cerén, A. R. Contreras-Toledo, M. E. Correa-Cano, L. De la Cruz, D. G. Debouck, A. Delgado-Salinas, E. P. Gomez-Ruiz, M. González-Ledesma & R. K. B: Jenkins (2021) Extinction risk of Mesoamerican crop wild relatives. *Plants, People, Planet*, 3:775–795, <https://doi.org/10.1002/ppp3.10225>.
- Gómez, N.M., & Moreno F. H. (2012). Respuestas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews ante variaciones microambientales bajo arreglos agroforestales en un bosque seco tropical. *Colombia Forestal*, 15(Supl. 1), 16.
- Gómez, A., & Valdés, R. (2014). Radiation-induced mutation in *Vanilla planifolia*: enhancing plant vigor and disease resistance. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(3), 201-209
- González, F. y Aguirre, J. (2011). Germinación de semilla y obtención de plántulas de *Vainilla planifolia* en condiciones *in vitro*. INIFAP. México.
- González-Santos R., J. Cadena-Iñiguez, F. J. Morales-Flores, V. M. Ruiz-Vera, J. Pimentel-López, A. Peña-Lomelí (2015) Model for the conservation and sustainable use of plant genetic resources in México. *Wulfenia Journal* 22: 333-353.
- Greule M., L. Tumino, T. Kronewald, U. Hener, J. Schleucher, A. Mosandl and F. Keppler (2010) Improved rapid authentication of vanillin using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values. *European Food Research and Technology* 231:933-941.
- Griffiths, A. J. F. (2008). *Genética* (9ª ed.). McGraw-Hill Interamericana.
- Guevara, M. (2018). Variedad de microflora presente en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. *Ex Andrews*) relacionados con procesos de beneficiado.
- Guisen O., A Uzun, H., Pala, E y G. Kafa. (2007). Development of seedlees and Mal. Socco tolerant mutant lemon through budwood irradiation. *Scientia Horticulturae*. 112: 184-190.

- Hassan M. S. and S. H. M. Abd-El-Haleem (2014) Effectiveness of gamma rays to induce genetic variability to improve some agronomic traits of canola (*Brassica napus* L.). *Asian Journal of Crop Science*, *Asian Journal of Crop Science* 6: 123-132.
- Hayashi, Y., Nakagawa, H., Hase, Y., & Saito, H. (2007). Improvement of a DNA marker analysis method for detecting heavy-ion beam-induced mutations in higher plants. *Journal of Radiation Research*, 48(Suppl_A), A43-A48.
- Hernández, E., López, M., Estrada, A. (2013). Calogénesis de *Heliconia collinsiana* RCIGGS *in vitro*: establecimiento, inducción y proliferación. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas* vol.4, no.8 pp. 1175-1186.
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López, P. A., De La Cruz-Torres, E., Martínez-Palacios, A., Fernández-Pavía, S. P., & Chávez-Bárceñas, A. T. (2017). Estimulación de la germinación y desarrollo *in vitro* de *Laelia autumnalis* con rayos gamma. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(3), 271–283. <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.3.271-283>
- Hussain, F., & Khan, M. J. (2020). “Effects of Gamma Radiation on Growth and Yield of Barley (*Hordeum vulgare* L.)”. *Field Crops Research*, 226, 54-62.
- Hernández Nataren, S. de J. (2013). Inducción de mutaciones en heliconias por radiación recurrente con cobalto-60 (Tesis de maestría). Colegio de Posgraduados.
- Iglesias, L.; Sánchez L.; Tivo Y.; Luna M.; Flores N.; Noa j.; Ruiz C.; Moreno J. (2010). Efecto de radiaciones gamma en *Abies religiosa* (Kunth) Schltd. Et Cham. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 16:5-12.
- Iglesias-Andreu, L. G., Andrade-Torres, A., Flores-Estévez, N., Giorgana Figueroa, J. L., Luna-Rodríguez, M., Nahuat Dhib, S. L., Noa-Carrazana, J. C., Ortiz-Ceballos, A., Reyes-Sosa, C., Rodríguez-Gil, L., & Saenz-Carbonell, L. A. (2014). Establecimiento de las bases biotecnológicas y ecológicas en la mejora genética de *Vanilla planifolia* Jacq. (Orchidaceae). *Cuadernos de Biodiversidad*, 45, 1-6. <https://www.cuadernosdebiodiversidad.org>

- International Atomic Energy Agency. (2022). Mutant Variety Database. IAEA. <https://mvd.iaea.org>
- Jarvis, D.I., L. Myer, H. Klemick, L. Guarino, M. Smale, A. Brown, M. Sadiki, B. Sthapit and T. Hodgkin (2006) Guía de Capacitación para la Conservación in situ en Fincas. Versión 1. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPRCI), Roma, Italia. Pp 2-11
- Kazama, Y., Hirano, T., Saito, H., Liu, Y., Ohbu, S., & Abe, T. (2008). Characterization of highly efficient heavy-ion mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 8, 267.
- Khalil, S.A., Zamir, R., Ahmad, N. (2014). Effect of different propagation techniques and gamma irradiation on major steviol glycoside's content in *Stevia rebaudiana*. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 24: 1743-1751.
- Khan, S. T., & Ahmad, R. (2018). "Induction of Mutations in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Through Gamma Radiation for Improved Grain Quality". *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(1), 115-123.
- Khan, M. S., & Ali, M. (2019). "Gamma Radiation-Induced Mutants in Rice (*Oryza sativa* L.) with Enhanced Drought Tolerance". *International Journal of Plant Sciences*.
- Koyyappurath, S., Conéjéro, G., Dijoux, J. B., Lapeyre-Montès, F., Jade, K., Chiroleu, F., Gatineau, F., Verdeil, J. L., Besse, P. & Grisoni, M. (2015). Differential responses of Vanilla accessions to root rot and colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. radices-vanilla. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-16
- Lemus Y., Méndez N. J. R., Cedeño J. R. Y Otahola G.V. (2002). Radiosensibilidad de dos genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a radiaciones gamma *Revista UDO Agrícola* vol. 2 no.1 p. 22-28.
- Li, J., Demesyieux, L., Brym, M. *et al.* (2020). Development of species-specific molecular markers in *Vanilla* for seedling selection of hybrids. *Mol Biol Rep* **47**, 1905–1920

<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05287-9>.

- López, C. (2007). Micropropagación de orquídeas del género *Phalaenopsis* a partir de yemas florales. Tesis de licenciatura en Agronomía. Universidad mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 38 p.
- López Martínez, M. I. (2019). Mutagénesis en *Anthurium andreanum* L. inducida por rayos gamma cobalto 60 y colchicina (Tesis de maestría). Colegio de Posgraduados.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, H., Kim, C. y Gómez, A. (2008). Origins and dispersal of cultivated *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62, 127- 138.
- Luis-Rojas S, Ramírez- Valverde B, Díaz- Bautista M, Pizano- Calderón J. (2020). La producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) en México: análisis y pronóstico. *Revista Mexicana de Ciencias ARCícolas*. 11:175-187.
- Ma'Arup, R., Ali, N. S., Ahmad, F., Ahmad, Z., Mohamed Norawi, M. F., & Moinuddin, H. F. (2023). Effects of gamma irradiation on morphology and protein differential in M1V1 population of *Vanilla planifolia* Andrews. *International Journal of Radiation Biology*, 99(3), 516-522.
- McSteen, P., Zhao, Y., et al. (2008). Plant hormones and signaling: Common themes and new developments. *Developmental Cell*, 14(4), 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.02.002>
- Maluszynski, M., Szarejko, I., & Forster, B.P. (2000). Induced mutations in the Green and gene revolutions. In *Proceedings of the Symposium on Induced Mutations in Plants* (pp. 459- 467). International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Martínez-Monter, J. P., García-López, E., Romero-Santos, R. D., & Fajardo-Franco, M. L. (2022). Sustratos orgánicos en el desarrollo de raíces en esquejes de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Acta Agrícola y Pecuaria*, 8, e0081014.

- Martirena-Ramírez, A., Veitía, N., García, L. R., Collado, R., Torres, D., Rivero, L., & Ramírez-López, M. (2018). Dosis óptima de radiaciones Gamma para la regeneración de plantas *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'BAT-93'. *Biotechnología Vegetal*, 18(1), 21-32.
- Martirena Ramírez, A., Veitía Rodríguez, N., Rodríguez García, L., Collado López, R., Rodríguez Torres, D., Rivero Quintana, L., & Ramírez-López, M. (2019). Efecto de diferentes explantes irradiados en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar "ICA Pijao". *Acta Biológica Colombiana*, 24(1), 13–25. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n1.70422>
- Menchaca, G. R., Ramos, P. J. M, Moreno, M. D., Luna, R. M., Mata, R. M., Vázquez, G. L., & Lozano, R. M. (2011). Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 80-84.
- Mba, C., Afza, R., Bado, S., & Shu, Q.Y. (2010). Induced Mutagenesis in Plants Using Physical and Chemical Agents. In Davey, M.R., & Anthony, P. (Eds.), *Plant Cell Culture: Essential Methods* (pp. 111-130).
- Molina M., J. C y L. T. Córdova (2006) Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la AGRICULTURA: Informe Nacional 2006. Secretaría de AGRICULTURA, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. 172p, <https://www.fao.org/3/i1500e/Mexico.pdf>
- Molina M., E. (2008) Recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Instituto de investigaciones jurídicas. Universidad Nacional Metropolitana de México.
- Morela, F., González, V., Castroni, S., Díaz, E. y Castro, L. (2002). Efecto de la radiación gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. *Agronomía Tropical Maracay*, 52(3), 311-32.
- Mudibu J., K. K. C. Nkongolo, A. Kalonji-Mbuyi and R. V. Kizungu (2012) Effect of gamma

- irradiation on morpho-agronomic characteristics of soybeans (*Glycine max* L.).
American Journal of Plant Sciences 3: 331-337.
- Muñoz de Malajovich, M. (2007). *Biotecnología*. Editorial Universidad Nacional de Quilmas.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nieto, P. (2017). Caracteres morfológicos de vainilla (*Vanilla planifolia* Jack.) utilizados por el agricultor en la selección de material reproductivo en cuatro municipios del Totonacapan. Tesis Mag. Sc. Puebla, México, 145.
- Olasupo, O., Ilori, O., Forster, P. y Bado, S. (2016). Mutagenic Effects of Gamma Radiation on Eight Accessions of Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *American Journal of Plant Sciences*, 7(2), 339-351.
- Palazin, M., Antúnez Ocampo, O. I., Sabino-López, J. E., Espinosa-Rodríguez, M., & Cruz-Izquierdo, S. (2023). Cambios horméticos por efecto de radiación gamma ⁶⁰Co en plantas M1 de Chile. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 10(2), e3444. <https://doi.org/10.19136/era.a10n2.3444>
- Pavadai P (2015) Studies on quantitative characters for gamma rays treatment in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) var. Co-1. *International Journal of Modern Cellular and Molecular Biology* 4: 1-10
- Ramírez, P., Ortega, R., López, H., Castillo, G., Livera, M., Rincón, S. y Zavala, G. (2010). Recursos Fitogenéticos de México para la alimentación y la agricultura. Informe Nacional, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. Chapingo, México.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of

Vanilla planifolia Jacks. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 52(2), 154–160.

Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ortíz-García, M., Andueza-Noh, R. H., Octavio-Aguilar, P., & Luna-Rodríguez, M. (2017). Evaluation of molecular variability in germplasm of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in southeast Mexico: Implications for genetic improvement and conservation. *Plant Genetic Resource*, 15(4), 310-320.

Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G. (2022). Avances y tendencias en mejoramiento genético de vainilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(2), e2339. https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num2_art:2339.

Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., & de Lourdes Palafox-Chávez, M. (2024). In vitro response of gamma irradiated *Vanilla planifolia* Jacks. shoots in the face of water stress. *Vegetos*. <https://doi.org/10.1007/s42535-024-00850-2>

Reyes, D; Rodríguez, B; Kelso, H; Huerta, M; Ibáñez, A. (2008). Beneficiario Tradicional de Vainilla. Puebla, MX, Editorial Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 72 p.

Reyes López, D., González Arnao, M. T., Menchaca García, R. A., Cruz Palacios, M. I., Tovar Soto, A., Kelso Bucio, H. A., & Barcenás Graniel, J. (2013). Rescate, conservación, investigación y utilización de la biodiversidad de la vainilla en México. En *I Seminario Internacional de Vainilla*. Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Reyes, D., Huerta, M., Avendaño, C., Silva, S., De la Cruz, E., García, J. y Martínez, M. (2018). Efecto de rayos gamma (^{60}Co) en esquejes de vainilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson). A 60 años del nacimiento de las instituciones nucleares. 243-250.

Rizwana B., Kalamani, A. y Ashok, S. (2002). Induced mutations in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] frequency and spectrum of viable mutations.

Researchon Crops 3(2): 421 – 425.

Rodríguez-Deméneghi, M.V; Aguilar-Rivera, N; Gheno-Heredia, Y y Armas-Silva, A A. (2023). Cultivo de vainilla en México: Tipología, características, producción, prospectiva agroindustrial e innovaciones biotecnológicas como estrategia de sustentabilidad. *Scientia Agropecuaria*. 14(1):93-109.

Rodríguez, G. L., Sánchez, V. J., & Hernández, M. E. (2013). Gamma radiation effects seed germination and Growth of *Vanilla planifolia*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(2), 123-130.

Rodríguez-López T y Martínez Castillo J. (2020). Exploración actual sobre el conocimiento y uso de vainilla (*Vanilla planifolia Andrews*) en las Tierras Bajas Mayas del Norte, Yucatán México. *Polibotánica* 48.

Rojas Vergara, P., González Campos, J., Molina Brand, M., Koch Zúñiga, L., Vera Castro, T., Velásquez Opazo, E., Villegas Nassar, D., Ly Muñoz, D., de la Cruz Torres, E., & González Jimenez, J. (2023). Efecto de diferentes dosis de radiación gamma en una plantación recién establecida de *Eucalyptus nitens* en la Región del Biobío. *Ciencia & Investigación Forestal*, 29(1). <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2023.581>

Roque H, E & Contreras A., R. (2016) La protección de la propiedad intelectual. Universidad de Guadalajara.

Roy, A., Sen, S., Bhattacharyya, P. K., Nath, R., & Bhattacharyya, S. (2019). Determination of effective dose of gamma irradiation for lentil seed mutagenesis. *International Journal of Chemical Studies*, 7, 154-156.

SADER (2020). Los recursos fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA) se definen como el material genético de origen vegetal que tiene un valor real o potencial destinado a la alimentación y la agricultura.

SADER. (2023). Vainilla mexicana, con amplio potencial productiva y preferencia en los

mercados internacionales.

- Salomón, J. L., González, C. M., Castillo, C., & Varela, M. (2017). Comportamiento de Barna, cultivar de papa (*Solanum tuberosum* L.) ante diferentes dosis de rayos gamma de fuente cobalto 60. *Cultivos Tropicales*, 38, 127-130.
- Sandeep, K., Ripudaman, S., Saquib, M., Singh, D., & Kumar, A. (2014). Effect of different combinations of vermicompost, biofertilizers, and chemical fertilizers on Growth, productivity, and profitability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Archives*, 14(1), 267-270.
- Santiago, A. (2003). Producción del cultivo de vainilla *Vanilla planifolia* Andrews y su importancia en el mercado nacional y mundial. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
- Santillán F, A; Salas Z, A y Vásquez B, N. (2018) La productividad de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews) en México de 2003 a 2014. *Rev. Mex de ciencias forestales* 9:47.
- SAS (Statistical Analysis System) (2022). SAS User's Guide Statistics. Release 9.0. SAS Institute. USA.
- Serrano Fuentes, M. K. (2021). Inducción de variación somaclonal en vainilla (*Vanilla planifolia*) mediante irradiación gamma.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (2020). Informe Nacional Sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. México. 319 pp
- Sharma, H. S., & Sharma, M. C. (2020). "Effects of Gamma Radiation on Growth and Yield of Various Plant Species". *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(4), 721-730

- Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H. (2012). Plant Mutation Breeding and Biotechnology. CABI.
- Sivasankar, S., Ellis, T. H. N., Jankuloski, L., & Ingelbrecht, I. (Eds.). (2021). Mutation breeding, genetic diversity and crop adaptation to climate change. CAB International
- Songsri, P., Suriharn, B., Sanitchon, J., Srisawangwong, S., & Kesmala, T. (2011). Effects of gamma radiation on germination and Growth characteristics of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Journal of Biological Sciences*, 11(3), 268-274. <https://scialert.net/abstract/?doi=jbs.2011.268.274>
- Soto, M. y 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(3):285-354.
- Suarez C. E., (2006). Curso sobre mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones. Instituto de investigaciones del Arroz (IIArroz). La Habana Cuba.
- Sulvarán Argüelles, I. G. (2018). Radiosensibilidad en vitroplantas de vainilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) en fase inicial con ⁶⁰Co. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Suprasanna, P., S. J. Mirajkar and S. G. Bhagwat. 2015. Induced mutations and crop improvement. In: Bahadur, B., V. M. Rajam, L. Sahijram and K. V. Krishnamurthy (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology*. Vol. I. Plant Diversity, Organization, Function and Improvement, Springer India, pp. 593-617.
- Tanaka, A., Shikazono, N., & Hase, Y. (2010). Studies on biological effects of ion beams on higherplants at JAEA. *Journal of Radiation Research*, 51(1), 81-82.
- Tavares O., R, Da Silva O., JP y Frutado M, A. (2022). *Vanilla* beyond *Vanilla planifolia* and *Vanilla × tahitensis*: Taxonomy and Historical Notes, Reproductive Biology, and Metabolites. Brazil.

- Téllez, M. (2011). El fruto mágico de una orquídea: La Vainilla. Ed. Ideogramma, México.
- Toth, S., Joong, L. K., Havkin-Frenkel, D., Belanger, F. C. y Hartman, T. G. (2011). Volatile Compounds in *Vanilla*. En: Havkin-Frenkel, D. y Belanger, F. C. (Eds.). Handbook of *vanilla* science and technology. WileyBlackwell, Chichester, UK. pp. 183-218.
- Tshilenge-Lukanda L., A. Kalonji-Mbuyi, K. K. C. Nkongolo and R. Kizungu (2013) Effect of gamma irradiation. on morpho-agronomic characteristics of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) American Journal of Plant Sciences 4: 2186-2192.
- Umesha, S. and Narayanaswamy, B. (2017). Pivotal Role of Residual Coconut Water and Spent Wash on Phyllosphere and Rhizosphere Microflora of Gherkin (*Cucumissativus* L) Under Glass House Condition. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(7) 3956-3963. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.408>
- Van Harten A. M. (1998) Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press. The Netherlands. 353 p.
- Veitía, N., García, L. R., Bermúdez-Caraballosa, I., Orellana, P., Padrón, Y., & Torres, D. (2007). Efecto de las radiaciones gamma sobre callos de papa var. 'Desirée'. *Biotecnología Vegetal*, 7(1), 57–61.
- Vera S., K. S, S. R. González y C. F. Aragón (2016) Bancos comunitarios de semillas en México: Una estrategia de conservación in situ In: Bancos Comunitarios de Semillas: Orígenes, Evolución y Perspectivas. Vernooij, R., P. Shrestha, B. Sthapit, M. Ramírez (Eds). 2016. Bioersivity International, Lima, Perú. pp: 248-253.
- Villalba, V., Moreira, I. y Díaz, G. (2012). Identificación y estudio molecular de *Fusarium* sp., agente causal de la marchitez necrótica presente en los sistemas agroforestales en asocio con el cultivo de vainilla (*Vainilla* sp.). 11(2), 159-167.
- Watteyn, C., Fremout, T., Karremans, A. P., HuaGraya, R. P., Azofeifa Bolaños, J. B., Reubens, B., & Muys, B. (2020). *Vanilla* distribution modeling for conservation and

sustainable cultivation in a joint land sparing/sharing concept. *Ecosphere*, 11(3), e03056.

Zavala G., F. (2006) La conservación d ellos recursos fitogenéticos de México. *Ciencia UANL*. Vol. 9:002. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.