



Scientia Agropecuaria

Web page: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>

Facultad de Ciencias
Agropecuarias

Universidad Nacional de
Trujillo

REVIEW



Vanilla cultivation in Mexico: Typology, characteristics, production, agroindustrial prospective and biotechnological innovations as a sustainability strategy

Cultivo de vainilla en México: Tipología, características, producción, prospectiva agroindustrial e innovaciones biotecnológicas como estrategia de sustentabilidad

Marco Vinicio Rodríguez-Deméneghi¹ ; Noé Aguilar-Rivera^{1,*} ; Yaqueline A. Gheno-Heredia¹ ; Arturo Alonso Armas-Silva¹ 

¹ Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Región Orizaba-Córdoba de la Universidad Veracruzana, C.P. 94945, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México.

* Corresponding author: naguilar@uv.mx (N. Aguilar-Rivera).

Received: 4 September 2022. Accepted: 4 February 2023. Published: 27 February 2023.

Abstract

Vanilla is the orchid of greatest economic interest to the world since the spice of the same name is obtained from it. Vanillin is obtained from its ripened pod, this compound is highly recognized and demanded by the gastronomic, pharmaceutical, and cosmetic industries for the sweet aroma and flavor it emanates. The objective of this work was to carry out a literature review to put into perspective the reader about the sustainability strategies in the vanilla industry in Mexico, as well as the innovations of propagation and *in vitro* conservation of *Vanilla planifolia* germplasm. Despite being originally from Mexico, this country ranks third in world production, preceding Madagascar, and Indonesia. This compilation of studies presents biotechnological techniques to increase vanilla production, as well as alternatives that can reduce the negative effects caused by the low genetic accumulation in this species, such as plant tissue culture, use of molecular markers for the study of somaclonal variation, asymbiotic seed germination under *in vitro* conditions. These techniques together with agro-industrial strategies can represent a sustainable alternative for vanilla production. In this article, strategies are suggested that allow those interested in vanilla production to make appropriate decisions, however, it is necessary to develop multidisciplinary studies that allow a global approach to the phenomena involved in the production and use of vanilla, as well as the resolution of the problems that this process faces.

Keywords: Biotechnological alternative; Micropropagation; *In vitro* culture; Temporary Immersion Systems.

Resumen

La vainilla es la orquídea de mayor interés económico para el mundo, pues de ella se obtiene la especia del mismo nombre. De su vaina madurada se obtiene la vainillina, este compuesto es altamente reconocido y demandado por las industrias gastronómica, farmacéutica y cosmética por el dulce aroma y sabor que emana. El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión de literatura para poner en perspectiva al lector sobre las estrategias de sustentabilidad en la industria vainillera en México, así como las innovaciones de propagación y conservación *in vitro* de germoplasma de *Vanilla planifolia*. A pesar de ser originaria de México, este país ocupa el tercer lugar de producción mundial, antecedendo a Madagascar e Indonesia. En esta recopilación de estudios se presentan técnicas biotecnológicas para incrementar la producción de vainilla, así como alternativas que puedan mitigar los efectos negativos provocados por la poca variabilidad genética en esta especie, como el cultivo de tejidos vegetales, uso de marcadores moleculares para el estudio de la variación somaclonal, germinación asimbiótica de semillas en condiciones *in vitro*. Estas técnicas en conjunto con estrategias agroindustriales pueden representar una alternativa sustentable de producción de vainilla. En el presente artículo se sugieren estrategias que permitan tomar decisiones adecuadas a los interesados en la producción de vainilla, sin embargo, es necesario el desarrollo de estudios multidisciplinario que permitan tener un enfoque global sobre los fenómenos involucrados en la producción y aprovechamiento de vainilla, así como la resolución de los problemas que este proceso enfrenta.

Palabras clave: Alternativa biotecnológica; Micropropagación; Cultivo *in vitro*; Sistemas de Inmersión Temporal.

DOI: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2023.009>

Cite this article:

Rodríguez-Deméneghi, M. V., Aguilar-Rivera, N., Gheno-Heredia, Y. A., 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.

1. Introducción

La orquídea de vainilla (*Vanilla planifolia*) tiene origen en los bosques tropicales de México y Centro América (Bory et al., 2008), cuya explotación o beneficio comienza con las culturas prehispánicas las cuales la bautizaron con el nombre de "Tlixochitl" (flor negra) haciendo clara referencia a las vainas beneficiadas la cuales adquieren un color oscuro y su exquisita y perfumada fragancia (Figura 1).



Figura 1. Fenología de *Vanilla planifolia*, al centro se encuentran las vainas beneficiadas (flor negra). 1: Plántula de vainilla germinada; 2: Plántula de vainilla (5 meses de edad); 3: Planta de vainilla (4 años); 4: Botones florales de vainilla; 5: Flor de vainilla; 6: Vainas verdes de vainilla.

La vainilla se ha cultivado desde tiempos prehispánicos principalmente en la región Totonaca, la cual actualmente es la zona con mayor producción de vainilla y está constituida por municipios del norte de Veracruz y Puebla (SIAP, 2020) (color verde claro en la Figura 2).

Uno de los primeros reportes del aprovechamiento de la vainilla, data de esta práctica desde antes de los tiempos precolombinos (Bruman, 1948). Posterior a la conquista de los Mexicas (aztecas) sobre el imperio Totonaca, esta especie fue consumida principalmente por la nobleza en una bebida a base de cacao, llamada "Xocolat" que realizaban desde los años 1300 hasta la llegada de los españoles (Bruman, 1948; Ramachandra & Ravishankar, 2000; Gallage & Møller, 2018).

Esta especie atrajo la atención de los españoles durante la conquista, razón por la que fue exportada a Europa, África y Asia para ser aprovechada por sus cualidades aromáticas y saborizantes (Teoh, 2019). Sin embargo, en estos continentes presentaron un gran problema, la ausencia de un polinizador natural, abejas pertenecientes al género *Euglossa*, razón por la cual fue imposible la obtención de vainas de vainilla (Watteyn et al., 2020). No fue hasta que en el año 1841 que lograron la polinización artificial de esta especie, logrando así el establecimiento de plantaciones fuera de México y Centro América (Lubinsky et al., 2006).

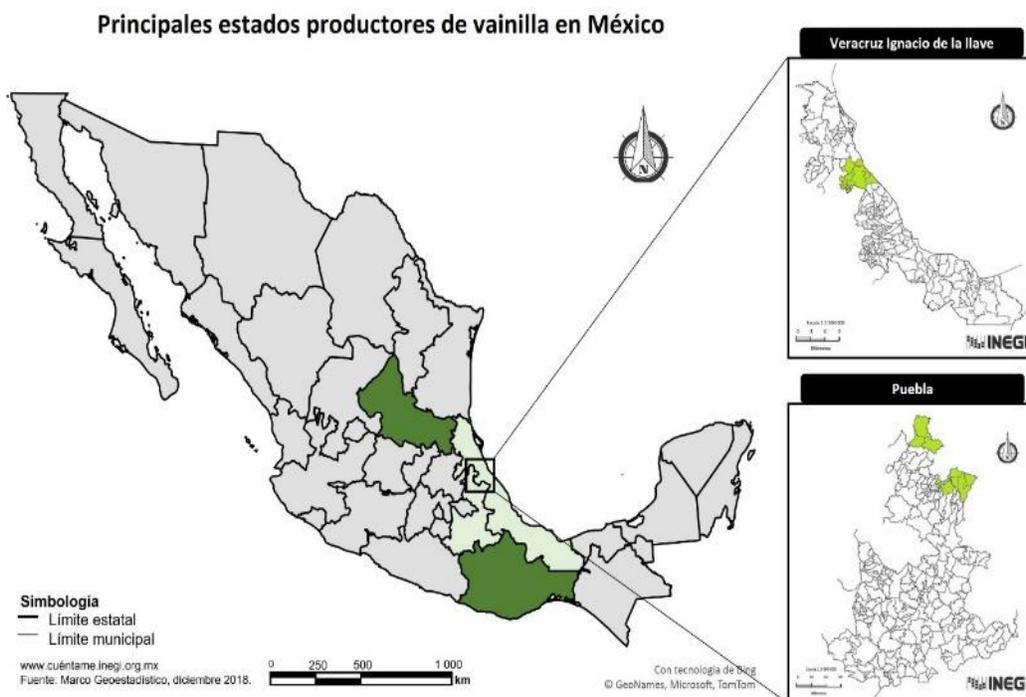


Figura 2. Principales estados productores de vainilla en México en 2019 (SIAP, 2020).

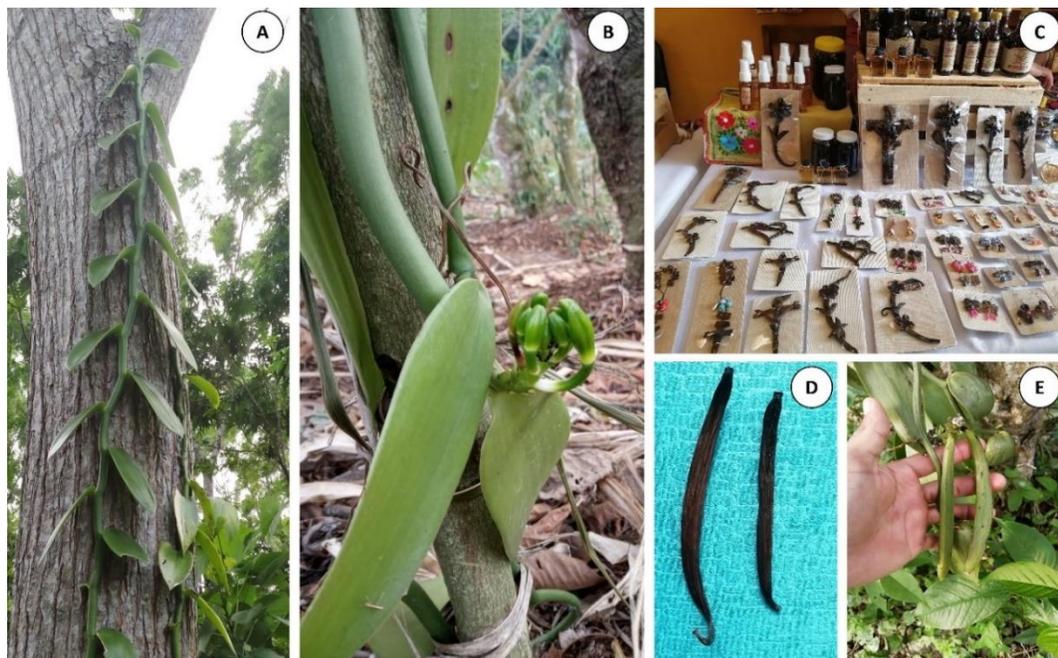


Figura 3. Estructuras vegetales de *Vanilla planifolia*. **A:** Crecimiento hemiepífito; **B:** estructuras florales en racimo; **C:** artesanías hechas con vainas de vainilla, extracto y esencia natural de vainilla; **D:** vainas de vainilla beneficiadas; **E:** vainas verdes de vainilla.

A pesar del valor histórico que representa la vainilla en México, el primer cultivo clonal comercial se estableció en 1760 en el municipio de Papantla, Veracruz (SAGARPA, 2021). Lo cual ha representado una oportunidad de ingreso económico (de hasta \$5512 dólares/tonelada en el 2020) (FAOSTAT 2020) para las familias principalmente indígenas (totonacas) debido a la venta de vainillas curadas, proceso por el cual las vainas adquieren su aroma característico a través de un proceso de secado controlado y artesanías elaboradas con las vainas (Teoh, 2019) (Figura 3). México es considerado centro de origen del cultivo de vainilla y fue catalogado como el principal país productor de vainilla hasta que se descubrió la polinización artificial en 1961. Esto representó una alternativa promisorio para la obtención de vainas de vainilla fuera de México, perdiendo así el primer puesto de producción de vainilla, posición que no ha podido recuperar a la actualidad (FAOSTAT, 2020).

2. Tipos de sistemas productivos

Después de la domesticación de esta especie en México, se establecieron diferentes sistemas productivos como “acahual” o tradicional (zonas de recuperación de flora endémica); bajo tutores (principalmente arboles cítricos); sistemas semi-tecnificados (invernaderos con malla sombra) y, por último, invernaderos tecnificados (Díaz-Bautista et al., 2019; Figura 4). Una de las grandes diferencias entre estos sistemas productivos es el rendimiento (kg de vainas por ha⁻¹), ya que bajo tutor cítrico se

producen 230 kg en comparación con 435 kg bajo sistema semi-tecnificado (Barrera-Rodríguez et al., 2009). Sin embargo, Espinoza-Pérez et al. (2018) en su estudio organizan a los productores de vainilla según el perfil de intensidad de manejo sobre este cultivo, siendo los más eficientes, los que empiezan a tomar en cuenta los ingresos que representa este cultivo, es decir, aquellos que siembran vainilla bajo tutores de cítricos y malla sombra.

3. Características del cultivo y producción de *Vanilla planifolia*

Las plantas de vainilla se cultivan en climas tropicales cálidos y húmedos y tienen ciertos requisitos agroecológicos en términos de temperatura (20 – 32 °C), precipitación (promedio de 2000 a 3000 mm por año), altitud (desde el nivel del mar hasta 600 m), sombra (50% – 70%), con suelo rico en humus, árboles de soporte (tutores) (Soto-Arenas, 1999). La vaina de vainilla se obtiene a través de la polinización manual principalmente, las flores de vainilla se disponen en estructuras llamadas “candelabros”. Los productores procuran no polinizar más de 20 flores por candelabro, ya que la presencia de más vainas por estructura puede debilitar a la planta incluso puede abortar dichos frutos. Las vainas son cosechadas antes de su madurez plena, para que después de un complejo proceso de deshidratación y secado mediante el cual el fruto prácticamente inodoro e insípido cobra un particular aroma y sabor que lo pone en condiciones de ser comercializadas (Hernández-Hernández, 2011).



Figura 4. Tres tipos de sistemas productivos de vainilla. A: Acahual; B: bajo tutor de cítricos (naranja); C: semi-tecnificado (malla sombra).

La floración de la vainilla es anual y en México comienza a partir del mes de abril hasta mayo, se genera en racimos de 20 flores que tienen un lapso de vida de 6 horas (efímeras), por lo que debe ser polinizada en ese lapso entre las 6 am y 12 pm de otra manera la flor se marchita y se vuelve inviable (Hernández-Ramírez, 2020). Una vez polinizada la flor, el fruto debe madurar sobre su racimo durante 9 meses para ser cortada y posterior a ello colocarse en camas de secado para su beneficiado y potenciar su dulce aroma y sabor, cabe destacar que, la flor requiere las condiciones ideales como la temperatura, agua y sombra para no abortar su fruto (Khojraty et al., 2018).

V. planifolia destaca por su importancia económica debido al compuesto que se extrae de sus vainas curadas, el cual se llama "vainillina", utilizada principalmente como saborizante con aroma dulce y suave (Banerjee & Chattopadhyay, 2019). Inclusive se ha aprovechado por sus cualidades medicinales como antimicrobiano y antioxidante. En el mercado se comercia con tres tipos diferentes de vainillina; natural, biotecnológica y sintética, sin embargo, la producción de vainillina natural representa menos del 1% de la producción total (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2017). Este es un compuesto muy codiciado entre las industrias cosméticas, farmacéuticas y gastronómica, actualmente es una de las tres especias más demandadas y costosas del mundo (Cardone et al., 2020; Khojraty et al., 2018). También destaca por su importancia ecológica ya que se considera un producto no maderable que contribuye a la conservación y valorización de los bosques nativos y otros recursos naturales (Gómez & Moreno, 2012), debido a que su aprovechamiento data de la época precolombina con fines alimentarios (Teoh, 2019). Y finalmente desde un punto de vista social ya que el cultivo de la vainilla se puede beneficiar a los pequeños productores obteniendo grandes ingresos económicos a través

de estrategias de planeación y transferencias de tecnología (Borbolla-Pérez et al., 2017).

La vainilla al ser un cultivo clonal se encuentra fuertemente amenazada por factores de estrés tanto bióticos (Hongos; *Colletotrichum orchidophilum* (Charron et al., 2018), *Colletotrichum gloeosporoides* (Guevara-Suarez et al., 2022) y *Fusarium* (Ramírez-Mosqueda et al., 2019), como abióticos (sequía) (Iglesias-Andreu et al., 2021; Martínez-Santos et al., 2021). Esto es debido a la ausencia de diversidad genética que permita aumentar la probabilidad de supervivencia con la presencia de genes que respondan de manera favorable a situaciones de estrés que afecte a las plantas morfo-fisiológicamente, derivando en problemas como aborción floral y/o de frutos, cierre estomático, reducción de la tasa fotosintética, inhibición del crecimiento, reducción del área foliar, deshidratación severa, aumento en la susceptibilidad de patógenos y por último necrosis (Borbolla-Pérez et al., 2016).

Existen opciones que permiten mejorar la cadena de suministro, por ejemplo, a través del fitomejoramiento (potenciado el aroma y sabor, tamaño y grosor de las vainas, así como la resistencia a *Fusarium oxysporum*) (Cai et al., 2019; Pérez-Silva et al., 2021; Serrano-Fuentes et al., 2022; Silva et al., 2022). A pesar de ser una opción que ofrece resultados prometedores en cuanto a producción, el problema radica en las condiciones adversas económicamente hablando de los pequeños productores de vainilla, ya que carecen de la infraestructura necesaria y de los fondos necesarios para el establecimiento de biofábricas.

4. Producción mundial y en México

A pesar del valor socioeconómico y cultural que representa este cultivo para el país, México figura como el 3^{er} país productor de vainilla en el mundo (6,7 %), antecedido con una gran brecha a Madagascar (41,6%) e Indonesia (30,1%) (1^{er} y 2^{do}

lugar respectivamente) (figuras 5 y 6). Las primeras plantaciones de vainilla se establecieron a partir de 1767 por la población Totonaca (en la región de Veracruz) (Ecott, 2004), esta región convirtió a México en el productor de vainilla más importante en el mundo (Bruman 1948) (Figura 7).

Para México, recuperar el liderazgo de producción de vainilla en el mundo es una situación compleja, debido a factores que en conjunto perjudicaron la producción y el valor económico de esta. Entre estos factores se listan a continuación:

I. La excesiva oferta de vainilla en el mercado, derivada de la polinización artificial, lo que en consecuencia provocó una baja en el precio internacional de esta especie (Hernández-Hernández, 2018).

II. La creación del saborizante artificial (cuyo precio es mucho menor y más accesible para los hogares) (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2017).

III. El cambio climático, aumentando la temperatura y la sequía de la principal región productora de México, comprometiendo la producción de vainilla en dos de los sistemas productivos de vainilla (monocultivo y malla sombra) (Parada-Molina et al., 2022).

IV. La poca variabilidad genética de esta especie, la vuelven altamente susceptible a plagas y/o enfermedades (Watteyn et al., 2020).

Para Barrera-Rodríguez et al. (2014), las actuales organizaciones de productores de vainilla en México tienen una posición competitiva frágil. Esto

se debe a la debilidad de su cadena de suministro: grandes diferencias con respecto al sector privado (competidores) en los modos de producción, gestión y comercialización, y la incapacidad de satisfacer las necesidades del cliente.

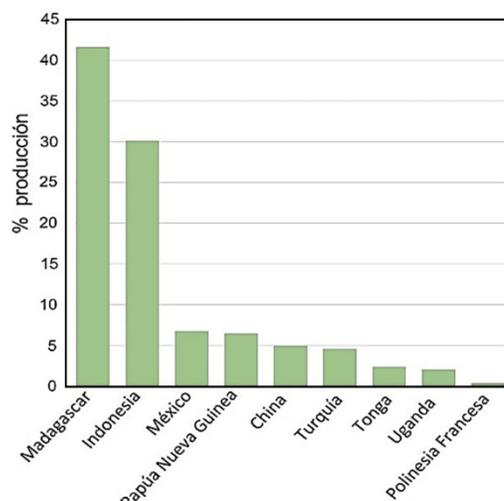


Figura 5. Principales países productores de vainilla en el mundo durante el año 2020 (FAOSTAT, 2020).

Los autores proponen tres estrategias comerciales para mejorar su desempeño: comercializar vainilla verde a las empresas locales de procesamiento, vainilla procesada y desarrollar la agroindustria para vender esencia de vainilla.

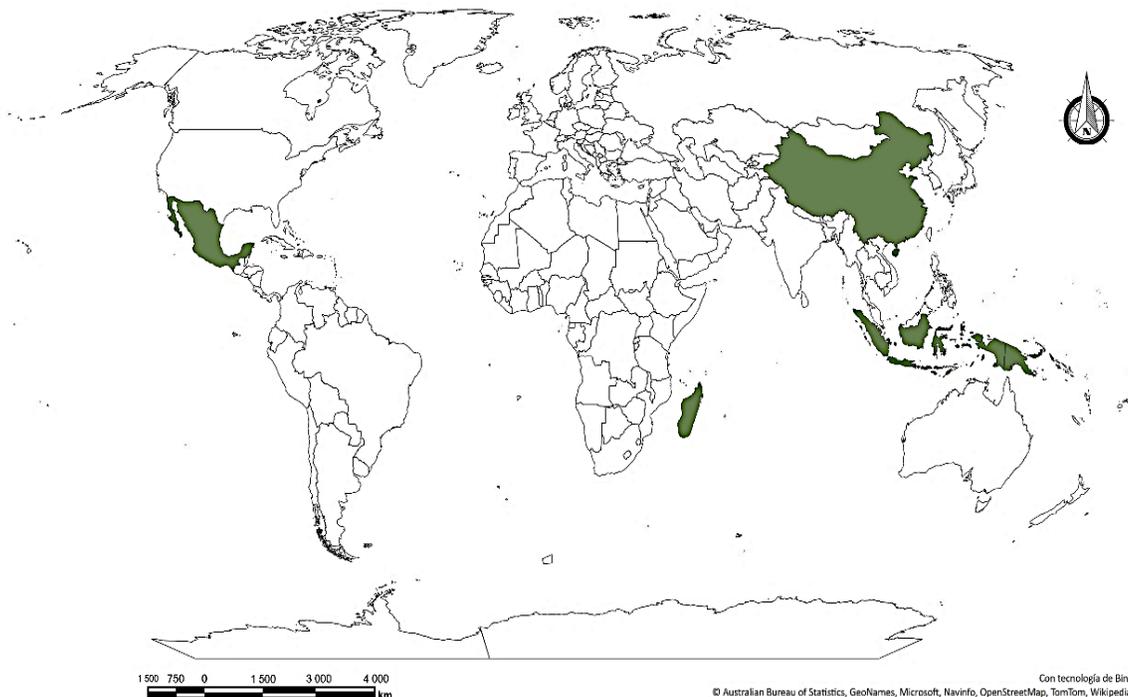


Figura 6. Producción mundial de vainilla del año 2020 (FAO, 2020).

5. Prospectiva de la vainilla como agroindustria

Para la producción de vainilla en México, la opción más realista es la comercialización de la vaina verde, teniendo en cuenta los problemas estructurales de las organizaciones agrícolas de México (Figura 8). Esto implica evitar costos durante el procesamiento, en el mantenimiento, almacenaje, energéticos en el manejo de deshidratación de las vainas, debido a que en esta etapa las vainas se vuelven frágiles ya que aquí es en donde se presenta la mayor incidencia de hongos y, por lo tanto, mayor pérdida de vainas (Khojraty et al., 2018). Por lo que las grandes empresas tienen una mayor facilidad para enfrentar los retos de producción a los que se enfrenta la vainilla, combatir la presencia de patógenos, almacenaje, distribución, establecimiento de estructuras para la producción como invernaderos de malla sombra (Garza-Morales et al., 2021).

El cultivo de vainilla es una labor intensiva para los productores, puesto que se encuentra ante una situación frágil debido al escaso financiamiento hacia esta agroindustria, el poco o nulo equipo de procesamiento y la poca variabilidad genética que en conjunto comprometen el desarrollo seguro de la materia prima (Espejel-García et al., 2016). Actualmente se han desarrollado estudios en donde se menciona la diversidad genética de vainilla (Bramel & Frey, 2021), en donde *V. planifolia* resalta como principal especie de interés por sus menciones. Cabe destacar que existen otras especies como *V. pompona*, *V. insignis*, *V. inodora*, *V. tahitensis* y *V. odorata* que, si bien son explotadas para la extracción de vainillina, uno de los principales intereses es la obtención de híbridos entre *V. planifolia* y las antes mencionadas para otorgar resistencia a patógenos como *Fusarium oxysporum* sin comprometer

la calidad de la vainillina. De esta manera se pueden crear híbridos para aprovechar las características de *V. planifolia* y otras especies pertenecientes al género, por ejemplo, *V. insignis* (resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*) (Bautista-Aguilar et al., 2022), *V. pompona* (resistencia a sequía) y *V. tahitensis* (aprovechada también para saborizantes y fragancias) (Ramos-Castellá & Iglesias-Andreu, 2022).

Estas razones limitan el crecimiento del mercado nacional en combinación con la competencia internacional, saborizantes sintéticos, el gasto económico que representa la fase de procesamiento. En México durante el 2016 se cosecharon 512 toneladas (cuyo valor total se estimó en 50 millones de pesos mexicanos), de las cuales el 95% se destinan al mercado nacional y el 5% restante se exporta principalmente a Estados Unidos y a Francia (SAGARPA, 2021). Con este contexto, el cultivo de vainilla combinado con la aplicación de herramientas tecnológicas potenciaría sus cualidades y facilitaría la exportación y aprovechamiento de esta especie.

La vainilla en México es consumida ampliamente al igual que el café, chocolate y bebidas como el mezcal, sotol, bacanora y tequila (Youssef & Spence, 2021; Baqueiro-Peña et al., 2017; Damirón-Velázquez, 2004). Sin embargo, esta especie presenta graves problemas de conservación debido a poca variación genética intrapoblacional, las principales dificultades a las que se enfrenta como la excesiva recolección para su venta ilegal, deforestación de sus ecosistemas naturales y alta susceptibilidad a patógenos (Vega et al., 2020; Ramírez-Mosqueda et al., 2019; Srivastava et al., 2018; Lubinsky et al., 2008; Bory et al., 2008).

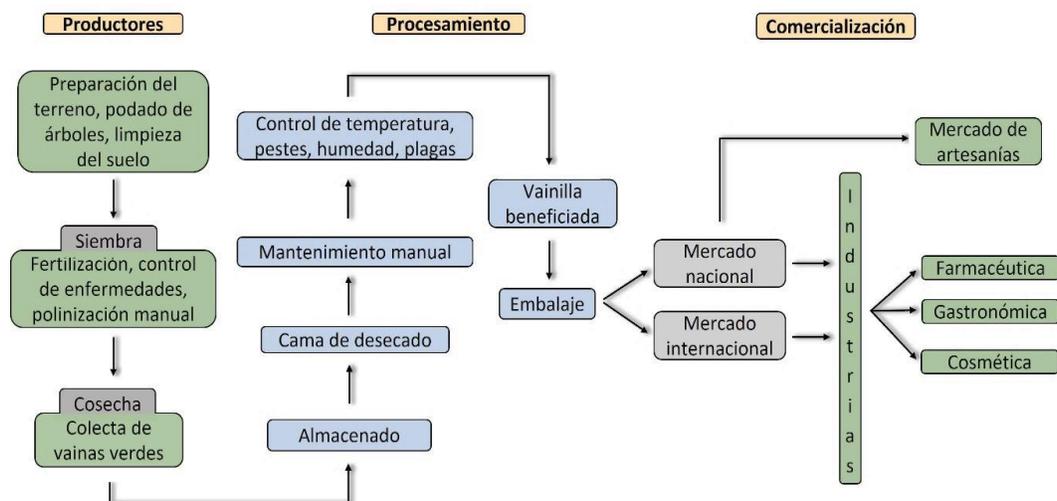


Figura 8. Desarrollo de una agroindustria vainillera.

Es debido a la erosión genética (provocada por la excesiva propagación vegetativa) que la susceptibilidad de esta especie ante cambios climáticos (frío/calor cada vez más acentuados), estrés biótico (ataque de hongos, bacterias y/o insectos) y estrés abiótico (presencia de sequía, déficit nutrimental, presencia de metales pesados en el sustrato) lo que se deriva en la aborción de la flor o la vaina verde (fruto inmaduro), principal producto con el que comercian los productores en México, lo cual afecta severamente la productividad de este sector (Barrera-Rodríguez et al., 2009; Borbolla-Pérez et al., 2016; Castro-Bobadilla et al., 2011). En México debido al conjunto de estos factores esta especie se encuentra catalogada como "sujeta a protección especial (PR)" (SEMARNAT, 2019).

Espejel-García et al. (2016) concluyeron que la interacción entre actores e instituciones, y la falta de infraestructura de soporte es debido a los problemas socioeconómicos que presenta la cadena productiva limitando la construcción de sistemas de innovación de *V. planifolia* en los principales estados productores de México como Veracruz, Puebla y San Luis Potosí. A una conclusión similar llegaron Borbolla-Pérez et al. (2016a) al reportar que la producción se encuentra limitada por la infraestructura, tecnología, susceptibilidad a diferentes tipos de estrés, así como la nula capacitación y la poca organización entre productores, aunado al bajo nivel educativo que presentan los productores limitando así la aplicación de este conocimiento al campo. Por otro lado, Méndez-Cortés et al. (2019) reportan que la participación de los agentes (productores e intermediarios) en Papantla, Veracruz difiere de valor respecto a la ubicación de estos, por citar un ejemplo, establecen que el mayor margen de ganancia (42%) lo obtienen los acopiadores (beneficiadores), seguido de los productores (40%) al vender la vaina verde, después el intermediario (10%) y por último el detallista (8%).

La vainilla ha sido estudiada con fines agroindustriales desde diferentes ángulos, entre ellos se encuentran el histórico/cultural, científico y social (Figura 9). En este sentido, se propone un FODA con información de estudios de Espejel-García et al. (2016); Lubinsky et al. (2018) y Méndez-Cortés et al. (2019) (Tabla 1) como una herramienta que permita identificar las características de los sistemas agroproductivos vainilleros para la toma de decisiones.

Bajo este contexto y dada la relevancia de la vainilla, es que debido a sus cualidades se puede considerar como una especie promisoría para la explotación en biofábricas. En México existen algunos ejemplos exitosos como la "Biofábrica siglo XXI" en Morelos,

la cual tiene como meta mejorar la rentabilidad y sustentabilidad de productos agrícolas; Biofábrica CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán) la cual trabaja con henequén (*Agave fourcroydes*), agave mezcalero (*Agave angustifolia*), banano (*Musa paradisiaca*), papaya (*Carica papaya*), café (*Coffea arabica*), achiote (*Bixa orellana*), etc., Biopla *In Vitro*, empresa de biotecnología en Villahermosa, Tabasco la cual se dedica a propagar plátano (*Musa paradisiaca*), papaya (*Carica papaya*), y estevia (*Stevia rebaudiana*). Esto agrega un alto valor bajo el concepto de integración productiva, biorrefinerías y economía circular. Sin embargo, para Paniagua-Vásquez et al. (2013), la susceptibilidad de *V. planifolia* es preocupante debido a la falta de variabilidad genética provocada principalmente por la pérdida de su hábitat natural, a la casi nula presencia de su polinizador natural y a la propagación clonal (por medio de esquejes) a gran escala.

Así pues, existe un valor agregado en el sentido del aprovechamiento de la especie por parte de las biofábricas, por ejemplo, Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán (2017) concluyeron que los residuos o subproductos del beneficio de vainilla no se han estudiado y caracterizado en su composición. Por lo tanto, representa una opción interesante para la explotación, ya que hay antecedentes de aprovechamiento de "residuos" en especies como la pulpa del café (antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio), melazas de caña (ácido cítrico para la industria farmacéutica), flores como las rosas (extracción de compuestos aromáticos), etc.

Sin embargo, queda sin resolver el principal reto de la conservación, el mantenimiento de la diversidad genética que aún existe. Por lo que Azofeifa-Bolaños et al. (2014) plantearon la urgencia de desarrollar estrategias que permitan la conservación y aprovechamiento de este recurso vegetal con fines de mejoramiento, investigación y producción comercial.

En este sentido, el germoplasma de la vainilla tradicionalmente se ha conservado ex situ a largo plazo mediante plantas enteras en condiciones de cultivo en campo, pero esta forma enfrenta altos riesgos de pérdida de la diversidad genética ya que la propagación de esta especie se da mayormente por esquejes, lo que conlleva al aumento de poblaciones clonales altamente susceptibles a cualquier patógeno y cambio climático, por otro lado, la germinación de semillas de vainilla es complicada naturalmente, debido a la impermeabilidad de la testa que impide el flujo de líquidos y nutrientes a la semilla (Yeh et al., 2021; Schlüter et al., 2007).

En México se utilizan tres métodos para propagar la vainilla. 1) Esquejes o tramos de tallo de 80 cm o más; 2) Cultivo *in vitro* y 3) Semillas. El primero es el que se utiliza comercialmente para su propagación. En las regiones vainilleras de México, los esquejes se obtienen en plantaciones comerciales, ya que no existen viveros que se dediquen exclusivamente a la producción de éstos (Santillán-Fernández, 2019). La propagación convencional es lenta, requiere mucho trabajo y consume mucho tiempo para el crecimiento y desarrollo de la planta madre (Geetha & Shetty, 2000; Giridhar & Ravishankar, 2004). El segundo caso es el más ampliamente utilizado, debido a la practicidad que implica, ya que se puede conseguir una gran cantidad de propágulos en espacios reducidos y en menor cantidad de tiempo (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018). Además de estar limitada la propagación sexual por la baja viabilidad y tasa de germinación de sus semillas (Sasikumar, 2010).

Las técnicas biotecnológicas, como estrategias de innovación tecnológica, contribuyen significativamente en los programas de propagación y conservación de las especies vegetales que permitan crear nuevos bancos de germoplasma y disponer de abundante material en condiciones fitosanitarias adecuadas (Wang et al., 2009). El cultivo *in vitro* es una herramienta clave en la biotecnología vegetal que explora la naturaleza totipotencial de las células vegetales, que se utiliza en la propagación a gran escala de clones libres de enfermedades y

conservación de germoplasma (Grout, 2017). La micropropagación se ha convertido en la base de una gran industria de propagación de plantas comerciales que involucra a cientos de laboratorios alrededor del mundo.

Es crucial explotar el potencial de cultivo *in vitro* para multiplicar y suministrar la cantidad necesaria de materiales de plantación a gran escala (Abebe et al., 2009). Esta tecnología también puede ser utilizada para satisfacer la demanda del mercado de vainilla y superar las dificultades en métodos alternativos de propagación. Por todo lo anterior el presente trabajo, está enfocado a analizar las estrategias biotecnológicas actuales, para la propagación y conservación *in vitro* de germoplasma de vainilla.

6. Innovaciones biotecnológicas en el cultivo *in vitro* de la vainilla

Uno de los principales enfoques en la investigación biotecnológica es el desarrollo de nuevas técnicas y herramientas que permitan la propagación a una escala deseable de especies vegetales para su aprovechamiento con fines agronómicos, económicos y ecológicos (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018). Desde sus inicios, el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una herramienta indispensable para la producción de plantas libres de enfermedades, propagación a gran escala en espacios pequeños, conservación de germoplasma, transformación genética, producción de metabolitos de interés (Dagla, 2012; Smith, 2013).

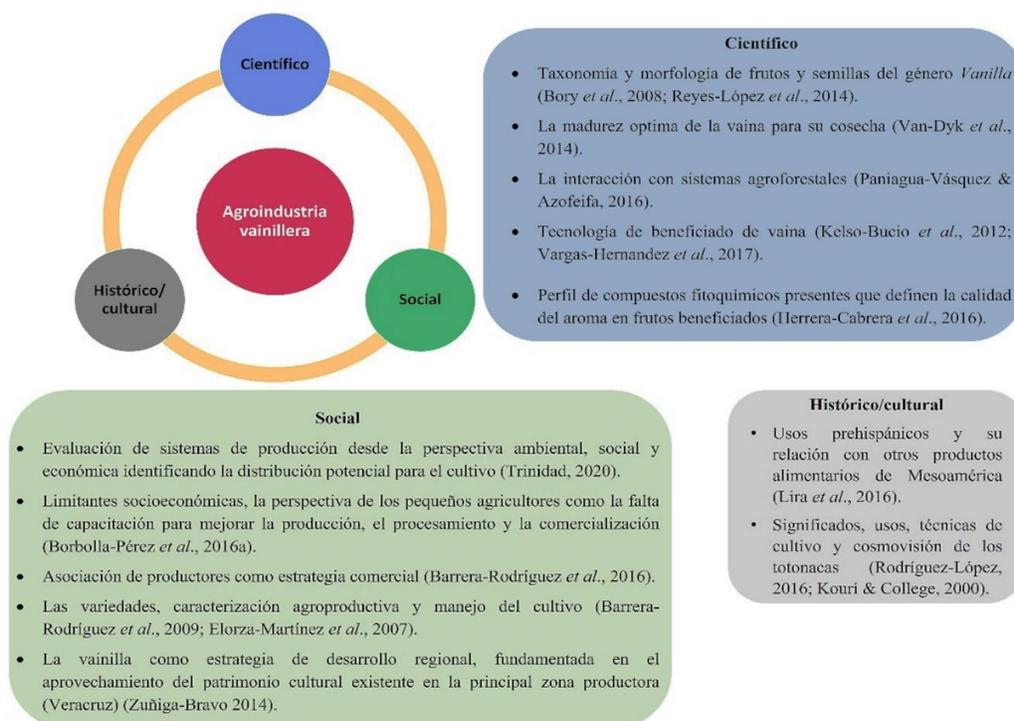


Figura 9. Esquema de las áreas de investigación en la agroindustria vainillera.

Tabla 1
Análisis FODA de la agroindustria vainillera en México

Fortalezas	Oportunidades
<ul style="list-style-type: none"> • Centro de origen de la vainilla • Tercer puesto de producción mundial de vainilla • Condiciones edafoclimáticas ideales para el desarrollo • Rendimiento por hectárea • Sistema de siembra intercalada con cítricos • La actividad productora es principalmente familiar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cercanía geográfica del principal país consumidor de vainilla en el mundo (Estados Unidos de América). • Capacitación técnica, producción orgánica y multiplicación vegetal en laboratorios de cultivo de tejidos vegetales. • Conservación de la estructura familiar en el proceso de producción. • Aprovechamiento en industrias con giros diferentes (gastronómica, farmacéutica y cosmética). • Valor agregado a las vainas beneficiadas. • Programas de Gobierno
Debilidades	Amenazas
<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de programas de apoyo enfocados a la capacitación, aprovechamiento, sustentabilidad y manejo de vainilla que consideren a los productores primarios como prioridad. • Falta de infraestructura para que los pequeños productores puedan "beneficiar" la vainilla y venderla a mejor precio. • Falta de infraestructuras adecuada para mantener un riego constante a los cultivos de vainilla. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio climático y efectos como la presencia de sequía estacional más severa. • Cultivos clonales susceptibles a plagas y enfermedades. • Susceptibilidad del precio debido a la volatilidad del mercado en los principales países productores (Tailandia y Madagascar).

V. planifolia se ha propagado utilizando técnicas de cultivo de tejidos las cuales han mostrado mayores ventajas que el método convencional. A través del cultivo de tallos (Giridhar et al., 2001), puntas de raíz (Philip & Nainar 1986), puntas de brotes (Kalimuthu et al., 2006), brotes axilares (Divakaran et al., 2006; Geetha & Shetty, 2000; Lee-Espinosa et al., 2008), así como porciones de hojas (Janarthanam & Seshadri, 2008; Tan et al., 2011, 2013).

6.1 Micropropagación vía segmentos nodales

Los primeros trabajos de micropropagación en vainilla se han llevado a cabo exitosamente en donde la principal fuente de explante son los segmentos nodales (Philip & Nainar, 1986; Rao et al, 1993; Ganesh et al., 1996; George & Ravishankar, 1997; Geetha & Sudheer 2000), el lapso de estos estudios para completar la inducción y proliferación de brotes era de 4 a 6 meses. El medio basal ha consistido en altas concentraciones de sales, como las que constituyen el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) el cual ha demostrado desde su primer reporte ser uno de los principales medios de sales basales para el cultivo *in vitro* de la vainilla en sus diferentes etapas.

Sin embargo, para tener una mejor respuesta el medio de cultivo es suplementado con reguladores de crecimiento vegetal, entre los más utilizados se encuentran la Bencilaminopurina (BA) en concentraciones que varían entre 0,5 y 2 mg L⁻¹, Ácido naftalenacético (ANA) de 0,5 a 1 mg L⁻¹, Ácido indolacético (AIA) y Kinetina (KIN) (Giridhar & Ravishankar 2004; Gopi et al., 2006; Chitra et al., 2007; Abebe et al., 2009; Gantait et al., 2009). Cabe destacar que *V. planifolia* no solo responde positivamente al medio MS, por ejemplo, Giridhar & Ravishankar (2004) probaron con éxito el medio N69 (Nitsch, 1969) reportando hasta 12 brotes por explante con una longitud 1,2 cm con la adición de zeatina. Las tasas de regeneración por explante se han podido incrementar con la adición de Thidiazuron (TDZ) y agua de coco 100% (Tabla 2) (Kalimuthu et al., 2006; Tan et al., 2011). Chin et al. (2011) mostraron un aumento significativo en la tasa de regeneración al adicionar nitroprusiato de sodio (NPS).

Tabla 2
Efecto de diferentes reguladores de desarrollo vegetal en segmentos nodales de *Vanilla planifolia*

Reguladores de desarrollo vegetal	Número de brotes por explante	Número de hojas por brote	Número de raíces por brote	Referencia
AgNP's	7,9	2,7	---	Pastelín-Solano et al., 2020
BA	3,27	3,8	1,6	Inderiati et al., 2019
TDZ	1,6	---	---	Jing et al., 2014
BA + NAA	4,2	---	---	Tan et al., 2011
BA	9,43	---	---	Kalimuthu et al., 2006
BA + IBA	13,5	---	2,46	Divakaran et al., 2006

Se ha observado que la posición de los explantes nodales tiene un efecto en la capacidad de regeneración y/o crecimiento en las plantas (Giridhar & Ravishankar 2004; Lee-Espinosa et al., 2008). El cultivo *in vitro* se ha realizado mayormente empleando medio semisólido con la adición de Phytigel o agar como agentes gelificantes a diferencia del uso de biorreactores (Figura 10).



Figura 10. Propagación de *Vanilla planifolia* *in vitro*. A: Sembrada en medio semisólido, B: Sembrada en Bioreactor RITA®.

Cabe destacar que, existen estudios en donde se ha observado el incremento en el número de brotes al exponer los explantes a medio líquido en Sistemas de Inmersión Parcial (SIP) (Tan et al., 2011; Ramos-Castellá et al., 2014). Domingues et al. (2013) desarrollaron un eficiente método a partir de segmentos nodales para la propagación *in vitro* usando un sistema de cultivo de doble fase (medio semisólido y una capa de medio líquido), incrementando la tasa de regeneración 2,5 veces que un medio normal.

6.2 Sistemas de Inmersión Temporal

Actualmente se han desarrollado nuevas metodologías para la propagación *in vitro* de plantas, dentro de las que destacan los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). La micropropagación en SIT consiste en el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos temporalmente a medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones axénicas y controladas (Bello-Bello et al., 2014, 2015). Existe una gran variedad de SIT implementados con sistemas automatizados lo cual reduce la manipulación del material vegetal, por ejemplo, el Recipiente de Inmersión Temporal (RITA®), Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMINT®) y más recientemente los biorreactores MATIS®, Plantima®, ELECTIS y SETIS™ (Alvard et al., 1993; Escalona et al., 1999; Robert et al., 2006) (Figura 11).

Los SIT se han convertido en una herramienta eficaz para la micropropagación (Berthouly & Etienne

2005; Watt 2012), ya que representa diferentes ventajas:

- Incrementa el coeficiente de multiplicación,
- Producción a gran escala,
- Reduce los costos de producción, al reducirse las manipulaciones,
- Simplifica los cambios de medios de cultivo,
- Mejoramiento en la calidad del material regenerado.

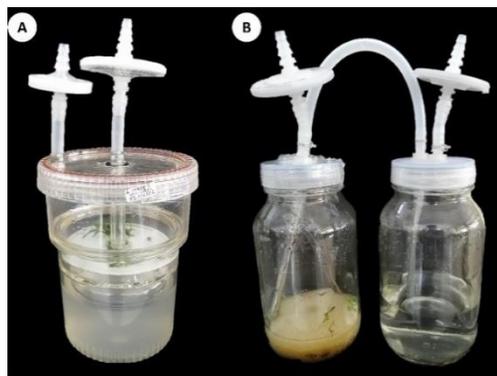


Figura 11. Sistemas de Inmersión Temporal. A: RITA®, B: BIT

Si bien se ha demostrado la utilidad en la propagación de diferentes especies vegetales en los diversos biorreactores existentes (Tabla 3), también pueden ser empleados para la producción de metabolitos secundarios (El-Sharabay & El Dawayati, 2019). Los SIT con diferentes frecuencias de inmersión han sido reportado para mejorar la calidad y elevar las tasas de multiplicación en plántulas de vainilla (Etienne & Berthouly, 2002). Ramos-Castellá et al. (2014) reportan la micropropagación más eficiente para vainilla en RITA® el cual permitió aumentos sustanciales en el número de brotes (14,27 brotes por explante) formados en un período de tiempo más corto, sin requerir subcultivos que puedan aumentar los costos de producción, la frecuencia de inmersión utilizada fue de 2 min cada 4 h, seguido del sistema de inmersión parcial (8,64 brotes) y medio sólido (5,80 brotes).

Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu (2016), observaron diferentes respuestas de las plántulas *in vitro* de vainilla, según el tipo de sistema de inmersión temporal utilizado, resultando 18,06 brotes por explante en sistemas BIT® seguido de RITA® con 12,77 y BIG 6,83. Teniendo un efecto positivo el sistema BIT® en la tasa de supervivencia de las plántulas micropropagadas del 100%. La utilización del cultivo *in vitro* de segunda generación, en numerosos sistemas de inmersión temporal, ofrece muchas ventajas en el proceso de micropropagación a escala de *Vanilla planifolia*.

Tabla 3

Aplicaciones de propagación para diferentes especies vegetales

Sistema de cultivo	Número de brotes por explante	Especie	Referencia
ELECTIS	30	<i>Malus sylvestris</i>	Sota et al., 2021
RITA	2,5	<i>Salix viminalis</i>	Gago et al., 2021
RITA	3,05	<i>Agave angustifolia</i>	Monja-Mio et al., 2021
TIBS	21	<i>Larix × eurolepis</i> Henry	Kim-Cuong et al., 2021
SETIS	7,3	<i>Mussa AAA cv. Grand Naine</i>	Bello-Bello et al., 2019
RITA	8,47	<i>Stevia rebaudiana</i>	Bayraktar 2019
TIBS		<i>Bletilla striata</i>	Zhang et al., 2018
TIS	4,5	<i>Spathiphyllum cannifolium</i>	Dewir et al., 2006

6.3 Germinación *in vitro* de las semillas

La germinación de las semillas *in vitro* de la vainilla ha sido muy estudiada, sin embargo, son pocos los reportes que han tenido éxito con esta estrategia. El medio de cultivo más eficiente para la germinación *in vitro* de vainilla es el MS (Murashige & Skoog, 1962). Menchaca (2011) empleó medio MS adicionado con 400 mg L⁻¹ de glutamina y 80 mg L⁻¹ de sulfato de adenina para germinar semillas de *V. planifolia*, *V. pompona* e híbridos de estas. El mejor resultado para la germinación (85%) lo obtuvieron con *V. planifolia* x *V. pompona*, seguido de *V. pompona* x *V. planifolia* (57%), en contraparte la tasa de germinación más baja (10%) se reportó en *V. pompona* x *V. pompona*, por último, en cruces de *V. planifolia* x *V. planifolia* no hubo germinación. Pedroso-do-Morales et al. (2012) determinaron que sesenta segundos de escarificación con H₂SO₄ en un medio MS con sus sales reducidas al 25% proporcionó los mejores resultados alcanzado el 65% de germinación, siendo un procedimiento viable para la producción comercial de esta especie. Los estudios a partir de semillas de *Vanilla planifolia* han sido diversos, sin embargo, muy pocos han sido con la finalidad de germinar las semillas, la mayoría se ha enfocado a tomar como fuente de explante las semillas para la producción de callos (Palama et al., 2010; Menchaca et al., 2011). La germinación *in vitro* de semillas de *V. planifolia* representa una alternativa para recuperar la variabilidad genética obteniendo una germinación exitosa.

Palama et al. (2010) sembraron aproximadamente de 200 a 300 semillas (de vainas verdes de 7 meses de edad), las cuales fueron cultivadas bajo oscuridad en un medio MS con 0,5 mg L⁻¹ TDZ obteniendo callo embriogénico. Los callos embriogénicos primarios fueron formados después de transferir a un medio basal con AIA (0,5 mg L⁻¹) y TDZ (0,5 mg L⁻¹). Estos callos fueron mantenidos por subcultivo en medio basal que contiene IAA (0,5 mg L⁻¹) y TDZ (0,3 mg L⁻¹) durante 6 meses para estimular la formación de embriones somáticos. Tan et al. (2011) indujeron la formación de callo en medio MS con

2,0 mg L⁻¹ de ácido naftanelacético (ANA) y 1,0 mg L⁻¹ de 6-benciladenina (BA) a partir de explantes juveniles de hojas (5%) y segmentos nodales (35%), posteriormente se indujo organogénesis indirecta generando 4,2 brotes por callo en medio MS con 1,0 mg L⁻¹ de BA y 0,5 mg L⁻¹ de ANA. Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu (2015) partieron de semillas de vainas inmaduras para la obtención de callo organogénico.

6.4 Variación somaclonal

Debido a que *V. planifolia* es propagada principalmente de forma vía asexual, la casi nula polinización natural y la poca diversidad de poblaciones silvestres, es que se ha provocado una alta erosión genética en esta especie (Paniagua-Vásquez et al., 2013). Por estas razones se vuelve necesario el desarrollo de estrategias que permitan la inducción de variación somaclonal. Villegas-Ramírez & Palma-Zuñiga (2022) reportan que la vainilla bajo condiciones *in vitro* y una constante exposición al BAP (6 a 10 subcultivos) comienzan a generar variación genética.

Tabarés et al. (1991) definen la variación somaclonal como la variación genética que se origina en los cultivos celulares y de tejidos vegetales. La variabilidad genética se puede ampliar mediante técnicas de cultivo *in vitro*. El uso de rutas morfogénicas indirectas permite aumentar el porcentaje de variación somaclonal en plántulas regeneradas.

Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu (2015) establecieron un protocolo para la organogénesis indirecta en *V. planifolia*, el callo friable fue inducido de semillas inmaduras cultivadas en la oscuridad, utilizando medio MS suplementado con 2,27 μM Tidiazuron (TDZ). Se regeneraron 6,8 brotes por callo en medio MS suplementado con 8,88 mM de BA. Los análisis moleculares de las plántulas regeneradas vía organogénesis indirecta revelaron la existencia de un 71,66% de polimorfismo. La variabilidad generada puede ser de gran interés para la obtención de líneas celulares tolerantes y/o resistentes a diversos factores de estrés abiótico (déficit hídrico) y/o bióticos (*Fusarium oxysporum* f.

sp. *vanillae*), factores que han sido atribuidos a la caída de frutos en este cultivo (Ramírez-Mosqueda et al., 2015).

Se sabe que las mutaciones se presentan de forma natural en las poblaciones, sin embargo, unas lo hacen con mayor frecuencia que otras, un ejemplo de esto son las mutaciones espontáneas, las cuales se presentan muy raramente en poblaciones naturales, por lo que el estímulo para la aparición de estas puede representar una estrategia para ampliar el acervo genético de *V. planifolia* y generar especies tolerantes y/o resistentes a estrés biótico y abiótico. Además, abriría nuevas perspectivas para implementar una mejora genética.

6.5 Marcadores moleculares

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Existe una gran diversidad de marcadores, clasificados principalmente en dos grupos; dominantes o codominantes. El uso de marcadores RAPD, AFLP e incluso SSR ha permitido separar claramente individuos *V. planifolia*, *V. tahitensis* y *V. pompona* estos resultados han sido esenciales para el análisis genético de los especímenes cultivados de vainilla durante su introducción (Favre et al., 2022; Besse et al., 2004). Por otro lado, Divakaran et al. (2006) además de RAPD ha combinado el uso de AFLP para evaluar la variabilidad y la naturaleza de genotipos y producción de híbridos entre *V. planifolia* y *V. aphylla*.

La baja diversidad genética en vainilla ha sido reportada a través de análisis RAPD (Besse et al., 2004) y AFLP (Duval et al., 2006) también a través de RAPD e ISSR (Verma et al., 2008) y SSR's (Simiyu et al., 2020). Se ha descrito además el aislamiento y caracterización de microsatélites de *V. planifolia* los cuales fueron transferibles a *V. tahitensis* y a especies silvestres de América, África y Asia. Los microsatélites han resultado útiles para estudios de diversidad, hibridación y estudios filogeográficos en el género *Vanilla* (Andriamihaja et al., 2021; Bory et al., 2008; Gigant et al., 2012). Por otro lado, diversos estudios han demostrado la eficacia de ISSR en el cultivo de vainilla tales como fidelidad genética (Bautista-Aguilar et al., 2021; Reddampalli et al., 2007), diversidad genética (Chambers et al., 2021; Praveen et al., 2009), variación somaclonal (Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, 2015).

6.6 Conservación de *Vanilla planifolia*

Debido a la poca variabilidad genética presente en *V. planifolia* es que se ha desarrollado interés en la polinización cruzada con otras especies del género

Vanilla (pompona, tahitensis e insignis principalmente) y obtener beneficios de la diversidad genética intraespecífica, por ejemplo, combinar la resistencia a estrés biótico y/o abiótico al mismo tiempo que se estimula la producción de vainilla (Pansarin & Ferreira et al., 2021; Ramachandra & Ravishankar, 2000). Si bien es importante la conservación de germoplasma, esta representa una alta inversión económica, limitando el número de accesiones que pueden ser preservadas (Divakaran et al., 2006).

Las estrategias de conservación más eficientes en la actualidad tienen un enfoque biotecnológico, ya que complementan a las estrategias tradicionales ya establecidas (huertos y bancos de semillas). Estos métodos consisten en limitar el crecimiento hasta tasas mínimas llamada "conservación por lento crecimiento" (Hernández-Leal et al., 2020) o a la supresión total del metabolismo celular conocida como "crioconservación" (Hernández-Ramírez et al., 2020). Dentro de las ventajas de las estrategias biotecnológicas se encuentra el poco espacio requerido para el establecimiento de vitro plantas, reducción en trabajo mecánico y manipulación del material vegetal, salvaguardando su integridad e inocuidad y permitiendo así el mantenimiento de bancos de germoplasma eficientes y funcionales (Nhut 2022; Engelmann & González-Arno, 2013).

Estas técnicas de conservación a mediano y largo plazo en *Vanilla* spp. han sido estudiadas ampliamente por diversos autores (González-Arno et al., 2018; Chaipanich et al., 2019; Hernández-Ramírez et al., 2020; Divakaran et al., 2006; González-Arno et al., 2009; Divakaran & Babu, 2009). Por lo que es en este sentido que el sistema de conservación in vitro por medio del cultivo de tejidos vegetales que se puede optar por la ruta de la conservación de germoplasma de vainilla con especial interés ante diferentes factores de producción, resistencia, tolerancia, etc. (Gantait, 2017; Martínez-Santos et al., 2021; Pastelín-Solano et al., 2019; Divakaran et al., 2006).

6.7 Crioconservación

Se han desarrollado investigaciones cuyo principal objetivo es la reducción del crecimiento y desarrollo de las plantas para su conservación a mediano y largo plazo, siendo la principal técnica la "Crioconservación", cuyo principio es exponer el tejido vegetal a temperatura muy bajas. La combinación de esta técnica con el cultivo de tejidos vegetales resulta en una herramienta muy útil para la conservación de germoplasma a lapso deseado (por lo general a largo plazo) (Agrawal et al., 2019; Panis et al., 2020; Panis & Lombardi, 2005; Khoury et al., 2010; Pritchard et al., 2013).

Existe una gran diversidad de técnicas de crioconservación, como la inmersión en nitrógeno líquido, deshidratación por medio de agentes osmorreguladores, encapsulación y vitrificación, todo en dependencia de la especie y órgano(s) que se deseen conservar (semillas, embriones cigóticos, muestras de tejidos, yemas apicales, meristemos, etc.) (González-Arno et al., 2020; Calva-Estrada et al., 2018; Ocampo-Salinas et al., 2020; Sakai, 1995; Panis, 1995; González-Arno et al., 2009). Se ha estudiado el almacenamiento seguro de ápices de vainilla mediante técnicas basadas en la vitrificación, como es el caso de la técnica de Gota-Vitrificación (G-V) (González-Arno et al., 2009), donde se experimentó en las distintas etapas que implica la técnica, sin embargo la combinación que resultó con mayores índices de regeneración fue empleando un pre acondicionamiento utilizando medio de cultivo MS suplementado con sacarosa (0,3 M) durante un solo día, un tratamiento de carga también con sacarosa 0,4 M en combinación con el glicerol 2 M y la solución vitrificadora PVS3 [50% (w/v) de glicerol + 50% (w/v) de sacarosa], durante 30 minutos de exposición, manteniendo a los tejidos en total oscuridad durante una semana, para favorecer su recuperación. Se obtuvo 30% de sobrevivencia, sin embargo, solo se obtuvo un 10% de regeneración después de 6 meses de la crioconservación.

Hernández-Ramírez et al. (2014) realizaron modificaciones a lo reportado anteriormente, utilizaron trehalosa, durante el preacondicionamiento y el tratamiento de carga. Prolongaron la duración del preacondicionamiento (7 días de recuperación de los ápices recién extraídos), en medio MS y posteriormente 1 o 7 días en medio de cultivo MS suplementado con trehalosa (0,3 M), tratados con solución de carga trehalosa-glicerol, manteniendo a los tejidos en total oscuridad por al menos 3-4 meses para su recuperación, antes de su transferencia a las condiciones estándar de iluminación. Esto favoreció el aumento de la sobrevivencia (de 30% a 60%). Sin embargo, estos resultados no se han logrado reproducir hasta ahora y tampoco han mejorado la tasa de regeneración (10%) de los ápices crioconservados en comparación con lo reportado por González-Arno et al. (2009).

Las condiciones que se han reportado para obtener estos porcentajes tanto de sobrevivencia como de regeneración establecen un antecedente que da pauta a cuáles podrían ser las alternativas que garanticen el almacenamiento seguro de germoplasma de vainilla a largo plazo, por lo que es necesario seguir abundando en este tema y

estudiar otras técnicas criogénicas que han resultado exitosas para otras especies vegetales con características similares a la vainilla.

7. Conclusiones

México se caracteriza por ser un país megadiverso que con la aplicación de herramientas biotecnológicas puede plantear estrategias de conservación y aprovechamiento sustentables con la capacidad de producir, conservar, aumentar la variabilidad genética para obtener plantas de vainilla resistentes a estrés biótico y/o abiótico. A pesar de que México aún se encuentra en el desarrollo de estas tecnologías, aunado a la escasa capacitación productiva de los productores vainilleros en el país, se encuentra en tercer lugar de producción mundial. Es por las razones antes expuestas que México representa un campo de oportunidades muy interesante para la aplicación de las tecnologías antes mencionadas. Debido al estatus de conservación en el que se encuentra la vainilla es necesario llevar a cabo acciones para la conservación, aprovechamiento y uso sostenible de esta especie.

En este estudio, se evidenciaron las aportaciones de los distintos proyectos de investigación referentes a los métodos de propagación y conservación *in vitro* de la especie *Vanilla planifolia*, que se han realizado por diversas organizaciones en todo el mundo y en particular en México donde es considerado centro de origen y diversificación. Las aportaciones hacen referencia a las estrategias biotecnológicas para el cultivo, mejoramiento genético y almacenamiento seguro a largo plazo de esta especie. Se discutió la relevancia de estos hallazgos y su posible impacto en la promoción de la conservación de la vainilla y la prospectiva de su uso diversificado.

ORCID

M. V. Rodríguez-Deméneghi  <https://orcid.org/0000-0002-0371-4434>
 N. Aguilar-Rivera  <https://orcid.org/0000-0002-7833-6749>
 Y. A. Gheno-Heredia  <https://orcid.org/0000-0002-8320-8274>
 A. A. Armas-Silva  <https://orcid.org/0000-0002-3160-2640>

References

- Abebe, Z., Mengesha, A., Teressa, A., & Tefera, W. (2009). Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 6817–6821.
- Agrawal, A., Singh, S., Malhotra, E. V., Meena, D. P. S., & Tyagi, R. K. (2019). Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources. In *Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources*.
- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32, 55-60.
- Andriamihaja, C. F., Ramarosandratana, A. V., Grisoni, M., Jeannoda, V. H., & Besse, P. (2021). Drivers of population divergence and

- species differentiation in a recent group of indigenous orchids (*Vanilla spp.*) in Madagascar. *Ecology and Evolution*, 11(6), 2681–2700.
- Azofeifa-Bolaños, J. B., Paniagua-Vásquez, A., & García-García, J. A. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla spp.* (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1), 189–202.
- Banerjee, G., & Chattopadhyay, P. (2019). Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 499–506.
- Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2017). Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.), its residues and other industrial by-products for recovering high value flavor molecules: A review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 1–9.
- Barrera-Rodríguez, A. I., Herrera-Cabrera, B. E., Jaramillo-Villanueva, J., Escobedo-Garrido, J., & Bustamante-González, Á. (2009). Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) bajo naranjo y en malla sombra en el Totonacapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(2), 199–212.
- Barrera-Rodríguez, A., Espejel-García, A., Herrera-Cabrera, B. E., & Cuevas-Reyes, V. (2016). Entrepreneurial association formation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) producers' organizations in Totonacapan. *Agroproductividad*, 9(1), 79–85.
- Barrera-Rodríguez, A. I., Santoyo-Cortés, V. H., Del Moral, J. B., & Reyes Altamirano Cárdenas, J. (2014). Perspectives d'avenir et compétitivité des organisations de producteurs de vanille du Mexique. *Cahiers Agricultures*, 23(6), 374–381.
- 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*, 141(2), 1494–1498.
- Bayraktar, M. (2019). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* bertonii using RITA® bioreactor. *HortScience*, 54(4), 731–725.
- Bello-Bello, J. J., Cruz-Cruz, C. A., & Pérez-Guerra, J. C. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa AAA* cv. Grand Naine). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 55, 313–320.
- Bello-Bello, J. J., García-García, G. G., & Iglesias-Andreu, L. (2015). Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Revista fitotecnica mexicana*, 38(2), 165–171.
- Bello-Bello, J., Espinosa-Castillo, J., & Iglesias-Andreu, L. (2014). Establecimiento de un Sistema de Biorreactores para la Micropropagación de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews). *Agroproductividad*, 7(3), 63–68.
- Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: Hvostlef-Eide, A.K., Preil, W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht.
- Besse, P., Silva, D. D., Bory, S., Grisoni, M., & Duval, M. F. (2004). RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science*, 167(2), 379–385.
- Borbolla-Pérez, V., Iglesias-Andreu, L. G., Herrera-Cabrera, B. E., & Vovides-Papalouka, A. (2016). Aborción prematura de frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agro productividad, Supl*, 11–12.
- Bory, Séverine, Grisoni, M., Duval, M. F., & Besse, P. (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: Present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551–571.
- Bramel, P., Frey, F. 2021. Global strategy for the conservation and use of Vanilla genetic resources. Global Crop Diversity Trust. Bonn, Germany. 62 p.
- Bruman, H. (1948). The culture history of Mexican Vanilla. *The Hispanic American Historical Review*, 28(3), 360–376.
- Cai, Y., Gu, F., Hong, Y., Chen, Y., & Xu, F. (2019). Metabolite Transformation and Enzyme Activities of Hainan Vanilla Beans During Curing to Improve. *Molecules*, 24(15), 2781.
- Calva-Estrada, S. J., Mendoza, M. R., García, O., Jiménez-Fernández, V. M., & Jiménez, M. (2018). Microencapsulation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) and powder characterization. *Powder Technology*, 323, 416–423.
- Cardone, L., Castronuovo, D., Perniola, M., Cicco, N., & Candido, V. (2020). Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview. *Scientia Horticulturae*, 272, 109560.
- Castro-Bobadilla, G., Martínez, A. J., Martínez, M. L., & García-Franco, J. G. (2011). Application of located irrigation system to increase the retention of fruit of *Vanilla planifolia* in the Totonacapan, Veracruz, México. *Agrociencia*, 45(3), 281–291.
- Chaipanich, V. V., Roberts, D. L., Yencho, S., Te-Chato, S., & Divakaran, M. (2019). Development of a Cryopreservation Protocol for *Vanilla siamensis*: An Endangered Orchid Species in Thailand. *Cryo Letters*, 40(5), 305–311.
- Charron, C., Hubert, J., Minatchy, J., Wilson, V., Chrysot, F., Gerville, S., loos, 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.
- Chambers, A., Cibrián-Jaramillo, A., Karremans, A. P., Moreno Martínez, D., Hernandez-Hernandez, J., Brym, M., Resende, M. F. R., Moloney, R., Sierra, S. N., Hasing, T., Alomia, Y. A., & Hu, Y. (2021). Genotyping-By-Sequencing diversity analysis of international Vanilla collections uncovers hidden diversity and enables plant improvement. *Plant Science*, 311, 111019.
- Chitra, R., Arulmozhiyan, R., Jawaharlal, M., & Vaidel, E. (2007). Micropropagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *J Plant Crops*, 35, 111–113.
- Chin, T. B., Foan, C., & Alderson, P. (2011). Optimization of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell. Tiss Org. Cult.*, 105, 457–463.
- Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, 17(8), 759–767.
- Damirón-Velázquez, R. (2004). La vainilla y su cultivo. Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria. Gobierno del Estado de Veracruz. S/p.
- Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2006). A simple method for mass propagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactor. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42(3), 291–297.
- 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.
- Divakaran, M., & Babu, K. N. (2009). Micropropagation and in vitro conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Methods in Molecular Biology*, 547, 129–138.
- Divakaran, M., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2006). Conservation of Vanilla species, *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 175–180.
- Dolce, N. R., Hernández-Ramírez, F., & González-Arnao, M. T. (2019). Cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia*) root-tips: A new alternative for in vitro long-term storage of its germplasm. *Acta Horticulturae*, 1234, 203–210.
- Domingues, S. O. D., Sayd, R. M., Balzon, T. A., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2013). A new procedure for *in vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. *Scientia Horticulturae*, 161, 204–209.
- Divakaran, M., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2006). Conservation of Vanilla species, *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 175–180.
- Duval, M. F., Bory, S., Andrzejewski, S., Grisoni, M., Besse, P., Causse, S., & Wong, M. (2006). Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. *Les Actes du BRG*, 6, 181–196.
- Ecott, T. (2004). *Vanilla: Travels in Search of the Luscious Substance*. Penguin, London.
- 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.

- El-Sharabay, S., & El-Dawayati, M. (2019). Bioreactor Steroid Production and Analysis of Date Palm Embryogenic Callus. In J. M. Al-Khayri (Ed.), *Date Palm Biotechnology Protocols Volume 1: Tissue Culture Applications, Methods in Molecular Biology*, 1637, 309–318.
- Elorza-Martínez, P., López Herrera, M., Hernández Fuentes, A. D., Olmedo Pérez, G., Domínguez Barradas, C., & Maruri García, J. M. (2007). Efecto del tipo de tutor sobre el contenido de vainillina y clorofila en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) en Tuxpan, Veracruz, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7(1), 228–236.
- Engelmann, F., & González-Arno, M. T. (2013). Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. San José: IICA.
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743–748.
- Espejel-García, A., Barrera-Rodríguez, A., Herrera-Cabrera, B. E., & Cuevas-Reyes, V. (2016). Factores Estructurales en la construcción del sistema regional de innovación de vainilla (*Vainilla planifolia* Jacks ex Andrews) en México. *Agro productividad*, 9, 74–78.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215–231.
- FAOSTAT. (2020). Producción y comercio de vainilla: país por producto. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Favre, F., Jourda, C., Grisoni, M., Piet, Q., Rivallan, R., Dijoux, J. B., Hascoat, J., Lepers-Andrzejewski, S., Besse, P., & Charron, C. (2022). A genome-wide assessment of the genetic diversity, evolution and relationships with allied species of the clonally propagated crop Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69, 2125–2139.
- Gago, D., Vilavert, S., Bernal, M. Á., Sánchez, C., Aldrey, A., & Vidal, N. (2021). The effect of sucrose supplementation on the micropropagation of *Salix viminalis* L. Shoots in semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Forests*, 12(10), 1408.
- Gallage, N. J., & Møller, B. L. (2018). Vanilla: The most popular flavour. In W. Schwab, B. Lange, & M. Wüst (Eds.), *Biotechnology of Natural Products* (pp. 3–24). Springer, Cham.
- Ganesh, D., Sreenath, H. I., & Jayashree, G. (1996). Micropropagation of vanilla through node culture. *J. Plantation Crops*, 24, 16–22.
- Gantait, S. (2017). *In vitro* biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 196.
- Gantait, S., Mandal, N., & Bhattacharyya, S. (2009). Mass multiplication of *Vanilla planifolia* with pure genetic identity confirmed by ISSR. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 3(1), 18–23.
- Garza-Morales, R., Banda-Ortiz, H., & Vázquez-Trujillo, K. (2021). Supply Chain and Economic Viability of *Vanilla planifolia* Andrew Production: A Case Study. *Agro Productividad*, 14(1), 31–36.
- Geetha, S., & Shetty, A. (2000). *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current Science*, 79, 886–889.
- George, P. S., & Ravishankar, G. A. (1997). *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Rep*, 16, 490–494.
- Gigant, R., Brugel, A., de Bruyn, A., Risterucci, A. M., Guiot, V., Viscardi, G., Humeau, L., Grisoni, M., & Besse, P. (2012). Nineteen polymorphic microsatellite markers from two African *Vanilla* species: Across-species transferability and diversity in a wild population of *V. humblotii* from Mayotte. *Conservation Genetics Resources*, 4(1), 121–125.
- Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2004). Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian Journal of Biotechnology*, 3(1), 113–118.
- Giridhar, P., Obul Reddy, B., & Ravishankar, G. A. (2001). Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. *Current Science*, 81(9), 1166–1170.
- 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.
- González-Arno, M. T., Guerrero-Rangel, A., Martínez, O., & Valdés-Rodríguez, S. (2018). Protein changes in the shoot-tips of vanilla (*Vanilla planifolia*) in response to osmoprotective treatments. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 27(3), 331–341.
- González-Arno, M. T., Hernández-Ramírez, F., Dolce, N. R., Rascón-Díaz, M. P., Cruz-Cruz, C. A. (2020). Cryobiotechnological Studies in *Vanilla*: The Orchid of Multi-industrial Uses. In: Khasim, S., Hegde, S., González-Arno, M., Thammasiri, K. (eds) *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges*. Springer, Singapore.
- González-Arno, M. T., Lazaro-Vallejo, C. E., Engelmann, F., Gamez-Pastrana, R., Martínez-Ocampo, Y. M., Pastelin-Solano, M. C., & Diaz-Ramos, C. (2009). Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45, 574–582.
- Gopi, C., Vatsala, T., & Ponmurugan, P. (2006). *In vitro* Multiple Shoot Proliferation and Plant Regeneration of *Vanilla planifolia* And. A Commercial Spicy Orchid. *Journal of Plant Biotechnology*, 8(1), 37–41.
- Grout, B. (2017). General Principles of Tissue Culture. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (2nd Edition, Vol. 2). Elsevier.
- Guevara-Suarez, M., Martha, C., Jim, P., Afanador-kafuri, L., & Restrepo, S. (2022). *Colletotrichum* Species Complexes Associated with Crops in Northern South America: A Review. *Agronomy*, 12(3), 548.
- Hernández-Hernández, J. (2011). Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sureste de México trópico húmedo. Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) establecimiento y mantenimiento. In INIFAP.
- Hernández-Hernández, J. (2018). Mexican Vanilla Production. In D. Havkin-frenkel & F. Belanger (Eds.), *Handbook of Vanilla Science and Technology* (Second Edi, pp. 1–26). Wiley-Blackwell.
- Hernández-Leal, E., Reyes-López, D., Castillo-Martínez, C. R., Avendaño-Arrazate, C. H., Corona-Torres, T., García-Zavala, J. J., & Pascual-Ramírez, F. (2020). *In vitro* conservation of *Vanilla planifolia* hybrids in minimal growth conditions. *Agro productividad*, 13(12), 3–10.
- Hernández-Ramírez, F. (2020). Estudios de crioconservación con germoplasma de vainilla (*Vanilla* spp.). Tesis Doctoral en Ciencias Agropecuarias. Universidad Veracruzana. México.
- Hernández-Ramírez, F., Dolce, N., Flores-Castaños, O., Rascón, M. P., Ángeles-Álvarez, G., Folgado, R., & González-Arno, M. T. (2020). Advances in cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) shoot-tips: assessment of new biotechnological and cryogenic factors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 56(2), 236–246.
- Hernández-Ramírez, F., González-Arno, M. T., Cruz-Cruz, C. A., Pastelin-Solano, M. C., & Engelmann, F. (2014). Comparison of Different Preconditioning and Loading Treatments with Vanilla (*Vanilla planifolia* Jack.) Apices Cryopreserved Using the Droplet-Vitrification Procedure. *Acta Horticulturae*, 1039, 173–180.
- Iglesias-Andreu, L., Ramos-Castellá, A. L., & Palafox Chávez, M. de L. (2021). *In Vitro* Selection of Irradiated Plantlets of *Vanilla Planifolia* Jacks. In the Face of Water Stress. *Research Square*, 1, 1–12.
- Inderiati, S., Ratnawati, & Since, D. (2019). *In Vitro* Propagation Of Vanilla (*Vanilla Planifolia* Andr.) On Different Concentration Of Cytokinins. *Agroplanta*, 8(12), 14–17.
- Janarthanam, B., & Seshadri, S. (2008). Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(2), 84–89.

- Jaramillo, R. P. V. (2013). Identificación de genes candidatos de tolerancia a estrés por salinidad en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mediante la técnica de despliegue diferencial de genes. Universidad San Francisco de Quito.
- Jing, G. F., Rahman, Z. A., & Subramaniam, S. (2014). The effect of thin cell layer system in *Vanilla planifolia* in vitro culture. *Current Botany*, 5, 22–25.
- Kalimuthu, K., Senthilkumar, R., & Murugalatha, N. (2006). Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andrews – a tropical orchid. *Current Science*, 91(10), 1401–1403.
- Khoury, C., Laibert, B., & Guarino, L. (2010). Trends in *ex situ* conservation of plant genetic resources: a review of global crop and regional conservation strategies. *Genet Resour Crop Evol*, 57, 625–639.
- Khoyratty, S., Kodja, H., & Verpoorte, R. (2018). Vanilla flavor production methods: A review. *Industrial Crops and Products*, 125, 433–442.
- Kim-Cuong, L., Beata, D., Sofie, J., Lelu-Walter, M.-A., & Egertsdotter, U. (2021). Temporary immersion bioreactor system for propagation by somatic embryogenesis of hybrid Larch (*Larix x eurolepis* Henry). *Biotechnology Reports*, 32, e00684.
- Lee-Espinosa, H. E., Biolo, F. C., Laguna-cerda, A., El, C., Agri, F. C., Auto, U., Mijangos-corte, J. O., & Barahona-pe, L. F. (2008). In Vitro Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Hortscience*, 43(2), 454–458.
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. *Methods in Molecular Biology*, 1815, 3–13.
- Lubinsky, P., Van-Dam, M., & Van-Dam, A. (2006). Pollination of Vanilla and evolution in Orchidaceae. *Orchids*, 75(12), 926–929.
- Martínez-Santos, E., Cruz-Cruz, C. A., Spinoso-Castillo, J. L., & Bello-Bello, J. J. (2021). In vitro response of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) to PEG-induced osmotic stress. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10.
- Menchaca, R., Ramos, J., Moreno, D., Luna, M., Mata, M., Vázquez, L., & Lozano, M. (2011). Germinación in vitro de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 80–84.
- Méndez-Cortés, V., García-Salazar, J. A., Ramírez-Jaspeado, R., & Mora-Flores, J. S. (2019). Who gets the biggest profits in the commercialization of vanilla (*Vanilla planifolia* J.) in Papantla, Veracruz?: Producers or intermediaries. *Agro Productividad*, 12(9), 35–40.
- Monja-Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Alamillo, M., Sánchez-Teyer, F. L., & Robert, M. L. (2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora.' *3 Biotech*, 11(2), 1–8.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., & Matsuzawa, T. (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91(1), 67–73.
- Nitsch, J. P., & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from Pollen Grains. *Physiologia Plantarum*, 163, 85–87.
- Nhut, D.T. (2022). General Information: Some Aspects of Plant Tissue Culture. In: Nhut, D.T., Tung, H.T., YEUNG, E.C.T. (eds) Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region. Springer, Singapore.
- Ocampo-Salinas, I. O., Gómez-Aldapa, C. A., Castro-Rosas, J., Vargas-León, E. A., Guzmán-Ortiz, F. A., Calcáneo-Martínez, N., & Falfán-Cortés, R. N. (2020). Development of wall material for the microencapsulation of natural vanilla extract by spray drying. *Cereal Chemistry*, 97(3), 555–565.
- Palama, T. L., Menard, P., Fock, I., Choi, Y. H., Bourdon, E., Govinden-Soulange, J., Bahut, M., Payet, B., Verpoorte, R., & Kodja, H. (2010). Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): Proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology*, 10, 82.
- Paniagua-Vásquez, A., Azofeifa Bolaños, B., & García García, J. A. (2013). Cultivo de la vainilla orgánica en sistemas agroforestales. *Universidad En Diálogo: Revista de Extensión*, 3(1 y 2), 31–46.
- Paniagua-Vásquez, A., & Azofeifa, J. B. (2016). Impacto en la sociedad del desarrollo del proyecto integrado del cultivo de vainilla orgánica en sistemas agroforestales, y su vinculación al sector agroalimentario. *Universidad En Diálogo: Revista de Extensión*, 6(2), 23.
- Panis, B. (1995). Cryopreservation of banana (*Musa spp.*) germplasm. *Disertaciones de Agricultura*. Lovaina, BE.
- Panis, B., & Lombardi, M. (2005). Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The Role of Biotechnology, (págs. 43-54). Villa Gualino, Turin, Italy.
- Panis, B., Nagel, M., & den Houwe, I. Van. (2020). Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in vitro collections and/or in liquid nitrogen. *Plants*, 9(12), 1–22.
- Pansarin, E. R., & Ferreira, A. W. C. (2022). Evolutionary disruption in the pollination system of Vanilla (Orchidaceae). *Plant Biology*, 24(1), 157–167.
- Parada-Molina, P. C., Pérez-silva, A., Cerdán-cabrera, C. R., & Soto-enrique, A. (2022). Condiciones climáticas y microclimáticas en sistemas de producción de vainilla. *Agronomía Mesoamericana*, 33(2), 48682.
- Pastelín-Solano, M. C., Salinas-Ruiz, J., González-Arno, M. T., Castañeda-Castro, O., Galindo-Tovar, M. E., & Bello-Bello, J. J. (2019). Evaluation of in vitro shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(2), 561–567.
- Pastelín-Solano, M. C., Ramírez-Mosqueda, M. A., Bogdanchikova, N., Castro-González, C. G., & Bello-Bello, J. J. (2020). Silver nanoparticles affect the micropropagation of vanilla (*Vanilla planifolia* jacks. ex andrews). *Agrociencia*, 54(1), 1–13.
- Pedroso-do-Moraes, C., Souza-Leal, T., Panosso, R., & Souza, M. C. (2012). Efeitos da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento in vitro de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae: Vanilloideae). *Acta Botanica Brasílica*, 26(3), 714–719.
- Pérez-Silva, A., Mayra, S., García, N., Petit, T., Bernard, J., Ángeles, M. D. L., Vera, V., Besse, P., & Grisoni, M. (2021). Quantification of the aromatic potential of ripe fruit of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) and several of its closely and distantly related species and hybrids. *European Food Research and Technology*, 247(6), 1489–1499.
- Pérez-Molphe, B. E. M., Ramírez, M. R., Núñez, P. H. G., & Ochoa, A. N. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales (1st ed.). Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Philip, V. J., & Nainar, S. A. (1986). Clonal Propagation of *Vanilla planifolia* (Salish.) Ames using Tissue Culture. *J. Plant Physiol*, 122, 211–215.
- Praveen, V. C., Chakrabart, D., Jena, S. N., Mishra, D. K., Singh, P. K., Sawant, S. V., & Tuli, R. (2009). The extent of genetic diversity among Vanilla species: Comparative results for RAPD and ISSR. *Industrial Crops and Products*, 29, 581–589.
- Pritchard, H. W., Stuppy, W., & Nadarajan, J. (2013). How many species of higher plants need conserving by cryopreservation? 2nd International Symposium on Plant Cryopreservation., (pág. 15). Fort Collins, Colorado, USA.
- Ramachandra, R. S., & Ravishankar, G. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), 289–304.
- 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.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in

- plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(3), 657–664.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Teixeira da Silva, J. A., Luna-Rodríguez, M., Noa-Carrazana, J. C., Bautista-Aguilar, J. R., Leyva-Ovalle, O. R., & Murguía-González, J. (2019). *In vitro* selection of vanilla plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41, 40.
- Ramos-Castellá, A., Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J., & Lee-Espinosa, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50(5), 576–581.
- Ramos-Castellá, A. L., & Iglesias-Andreu, L. G. (2022). Avances y tendencias en mejoramiento genético de vainilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(2), 2339.
- Rao, Y., Mathew, M., Madhusoodanan, K., J., K., & Naidu, R. (1993). Multiple shoot regeneration in Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Journal of Plantation Crops*, 21, 351-354.
- Reddampalli, V., Sreedhar, Lakshmanan, V., & Neelwarne, B. (2007). Genetic fidelity of long-term micropropagated shoot cultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) as assessed by molecular markers. *Biotechnology Journal*, 2(8), 1007-1013.
- Reyes-López, D., Flores Jiménez, Á., Huerta Lara, M., Kelso Bucio, H.-A., Avendaño Arrazate, C., Lobato Ortiz, R., Aragón García, A., & Lopez Olguín, J. (2014). Variación morfométrica de fruto y semilla en cuatro especies del género Vanilla. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 205–218.
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M. A., & Fuentes-Carrillo, P. (2006). A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation. In *Plant cell culture protocols*, pp. 121-129.
- SAGARPA. (2021). Plan rector del sistema producto vainilla en el Estado de Puebla. Comité sistema producto vainilla. SAGARPA, México. 10 pp.
- Sakai, A. (1995). Cryopreservation for germplasm collection in woody plants. Somatic embryogenesis in woody plants vol. 1. (págs. 293-315). Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers.
- Santillán-Fernández, A. (2019). Potencial productivo de *Vanilla planifolia* Jacks en el Totonacapan, México, mediante técnicas geográficas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), 789–802.
- Sasikumar, B. (2010). Vanilla breeding - a review. *Agricultural Review*, 31(2), 139–144.
- Schlüter, P. M., Soto-Arenas, M. A., & Harris, S. A. (2007). Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany*, 61(4), 328–336.
- SIAP (2019). Sistema de Información Agrícola y Pesquera. Producción Agrícola. Anuario estadístico de la producción agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- SEMARNAT. (2019). Norma oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental - especies nativas de México de flora y fauna silvestres - categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - lista de especies en riesgo. Diario Oficial, 1–77.
- Serrano-Fuentes, M. K., Gómez-Merino, F. C., Cruz-Izquierdo, S., Spinoso-Castillo, J. L., & Bello-Bello, J. J. (2022). Gamma Radiation (60 Co) Induces Mutation during *In Vitro* Multiplication of Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews). *Hortechology*, 8(503), 1–12.
- Silva, O. J. P., Garrett, R., Bello, K. M. G., & Furtado, M. A. (2022). Vanilla flavor: Species from the Atlantic Forest as natural alternatives. *Food Chemistry*, 375, 131891.
- Simiyu, L. N., Wolukau, J. N., & Maurice, O. E. (2020). Diversity assessment of vanilla (*Vanilla* species) accessions in selected counties of Kenya using simple sequence repeats (SSRs) markers. *African Journal of Biotechnology*, 19(10), 736–746.
- Smith, R. H. (2013). Plant Tissue Culture. In *Plant Tissue Culture*. Elsevier Inc.
- Srivastava, S., Kadooka, C., & Uchida, J. Y. (2018). Fusarium species as pathogen on orchids. *Microbiological Research*, 207, 188–195.
- Sota, V., Benelli, C., Çuko, B., Papakosta, E., Depaoli, C., Lambardi, M., & Kongjika, E. (2021). Evaluation of ElectIS bioreactor for the micropropagation of *Malus sylvestris* (L.) Mill., an important autochthonous species of Albania. *Horticultural Science*, 48(1), 12–21.
- Soto-Arenas, M. A. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J101. México: Instituto Chinoí, A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología, A.C.
- Tabarés, E., Pachón, J., & Roca, W. (1991). Variación Somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In *Cultivo de Tejidos en la Agricultura* (pp. 340–343).
- Tan, B. C., Chin, C. F., & Alderson, P. (2011). Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(3), 457–463.
- Tan, B. C., Chin, C. F., Liddell, S., & Alderson, P. (2013). Proteomic Analysis of Callus Development in *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 1220–1229.
- Teoh, E. S. (2019). The Story of Vanilla. In *Orchids as Aphrodisiac, Medicine or Food*, pp. 109–130. Springer Nature Switzerland.
- Van-Dyk, S., Holford, P., Subedi, P., Walsh, K., Williams, M., & McGlasson, W. B. (2014). Determining the harvest maturity of vanilla beans. *Scientia Horticulturae*, 168, 249–257.
- Vargas-Hernández, M., Macías-Bobadilla, I., Guevara-González, R. G., Romero-Gomez, S. de J., Rico-García, E., Ocampo-Velázquez, R. V., Alvarez-Arquieta, L. de L., & Torres-Pacheco, I. (2017). Plant hormesis management with biostimulants of biotic origin in agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–11.
- Vega, M., Hernández, M., Herrera-Cabrera, B.E. & Wegier, A. (2020). *Vanilla planifolia* (amended version of 2017 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020.
- Verma, P. C., Chakrabarty, D., Jena, S. N., Mishra, D. K., Singh, P. K., Sawant, S. V., & Tuli, R. (2008). The extent of genetic diversity among Vanilla species: Comparative results for RAPD and ISSR. *Industrial Crops and Products*, 29, 581–589.
- Villegas-Ramírez, J., & Palma-Zúñiga, T. (2022). Caracterización morfológica de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) para su propagación. *Agronomía Costarricense*, 46(1), 9–24.
- Wang, Q. C., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M., & Valkonen, J. P. T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology*, 154(3), 351-363.
- Watt, M. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14025-14035.
- Watteyn, C., Fremout, T., Karremans, A. P., Huaracaya, 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.
- Yeh, C.-H., Chen, K.-Y., & Lee, Y.-I. (2021). Asymbiotic germination of *Vanilla planifolia* in relation to the timing of seed collection and seed pretreatments. *Botanical Studies*, 62(1), 12.
- Youssef, J., & Spence, C. (2021). Introducing diners to the range of experiences in creative Mexican cuisine, including the consumption of insects. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 25, 100371.
- Zhang, B., Song, L., Bekele, L. D., Shi, J., Jia, Q., Zhang, B., Jin, L., Duns, G. J., & Chen, J. (2018). Optimizing factors affecting development and propagation of *Bletilla striata* in a temporary immersion bioreactor system. *Scientia Horticulturae*, 232, 121–126.