



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPUS CÓRDOBA



PROGRAMA DE POSGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE

## INDUCCIÓN DE VARIACIÓN SOMACLONAL EN VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) MEDIANTE IRRADIACIÓN GAMMA

**Biol. María Karen Serrano Fuentes**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO**

2021

**INDUCCIÓN DE VARIACIÓN SOMACLONAL EN VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) MEDIANTE IRRADIACIÓN GAMMA**

La presente tesis, titulada: “**Inducción de variación somaclonal en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) mediante irradiación gamma**”, realizada por la alumna: **María Karen Serrano Fuentes**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN  
AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR



CONSEJERO:

DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO



ASESOR EXTERNO:

DR. SERAFÍN CRUZ IZQUIRDO



ASESOR INTERNO:

DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO



ASESOR INTERNO:

DR. JOEL VELASCO VELASCO

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México  
2021

Inducción de variación somaclonal en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)

mediante irradiación gamma

María Karen Serrano Fuentes, M.C.

Colegio de Postgrados, 2021

La mutagénesis *in vitro* es una alternativa para generar variación genética en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) debido a su baja diversidad genética. El objetivo de este estudio fue inducir variación somaclonal en *V. planifolia* mediante radiación gamma y su detección mediante marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Brotes previamente establecidos *in vitro* fueron multiplicados en medio de cultivo Murashige y Skoog suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> BAP (6-Bencilaminopurina). Se irradiaron explantes con diferentes dosis (0, 20, 40, 60, 80 y 100 Gy) de rayos gamma <sup>60</sup>Co. A los 60 d de cultivo, se evaluó la sobrevivencia, número de brotes por explante, longitud de brote y número de hojas por brote. Para el análisis molecular, se utilizaron diez brotes para cada dosis y la planta donante como testigo. Se utilizaron ocho cebadores y se obtuvieron un total de 43 bandas. Se calculó el porcentaje de polimorfismo (%P) y se obtuvo un dendrograma basado en la distancia genética de Jaccard y el método de agrupación neighbor joining. Los resultados mostraron un efecto hormético sobre los explantes, promoviendo el desarrollo a bajas dosis (20 y 40 Gy) e inhibición y muerte a dosis altas (60-100 Gy). Los cebadores UBC-808, UBC-836 y UBC-840 mostraron el mayor %P, con 42.6%, 34.7% y 28.7%, respectivamente. El análisis de distancia genética mostró que los tratamientos sin irradiación y con irradiación presentaron variación somaclonal. La utilización de gamma durante el cultivo *in vitro* son una alternativa para ampliar la diversidad genética para el mejoramiento en vainilla.

**Palabras claves:** Efecto hormético, marcadores ISSR, polimorfismo, rayos gamma

Inducción de variación somaclonal en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)  
mediante irradiación gamma

María Karen Serrano Fuentes, M.C.

Colegio de Postgrados, 2021

*In vitro* mutagenesis is an alternative to generate genetic variation in vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews), which is characterized by low genetic diversity. The objective of this study was to induce somaclonal variation in *V. planifolia* by gamma radiation and detect it using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) molecular markers. Shoots previously established *in vitro* were multiplied in Murashige and Skoog culture medium supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> BAP (6-benzylaminopurine). Explants were irradiated with different doses (0, 20, 40, 60, 80 and 100 Gy) of <sup>60</sup>Co gamma rays. At 60 d of culture, survival, number of shoots per explant, shoot length and number of leaves per shoot were evaluated. For molecular analysis, ten shoots were used for each dose, along with the donor plant as a control. Eight primers were used and a total of 43 bands were obtained. The percentage of polymorphism (%P) was calculated and a dendrogram based on Jaccard's genetic distance and the neighbor joining clustering method was obtained. Results showed a hormetic effect on the explants, promoting development at low doses (20 and 40 Gy) and inhibition and death at high doses (60-100 Gy). Primers UBC-808, UBC-836 and UBC-840 showed the highest %P, with 42.6%, 34.7% and 28.7%, respectively. Genetic distance analysis showed that treatments without irradiation and with irradiation presented somaclonal variation. The use of gamma rays during *in vitro* culture is an alternative to broaden genetic diversity for vanilla breeding.

**Keywords:** Gamma rays, hormetic effect, ISSR markers, polymorphism

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a mi mamá por el apoyo que siempre me ha dado, por estar ahí cuando necesito de sus palabras para continuar.

A mi compañero de vida Vladimir por estar siempre a mi lado brindándome el apoyo y estimulándome a seguir superándome académicamente.

A mis amigos, en especial a Monse, Sugey, Javi y Eucario que se han tomado parte de su tiempo para ayudarme y estar conmigo en las buenas y en las malas.

A todas las personas que han estado en el laboratorio CTV, que se han tomado la molestia de regar mis plantas de invernadero y vainillal.

Al Colegio de Posgraduados Campus Córdoba. Por brindarme las instalaciones, equipos y recursos económicos para realizar mí proyecto.

A mis académicos, por las enseñanzas durante mi formación durante la maestría.

A mi consejero, el Dr. Jericó Jabín Bello Bello, a mis asesores, Dr. Fernando Carlos Gómez Merino, Dr. Serafín Cruz Izquierdo y Dr. Joel Velasco Velasco.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la realización de mis Estudios de Maestría.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>3</b>
2.1 Objetivo general .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
2.3 Hipótesis .....	3
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
3.1 <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews .....	4
3.1.1 Origen y distribución .....	4
3.1.2 Descripción taxonómica .....	4
3.1.3 Importancia del cultivo .....	5
3.1.4 Problemática actual de la vainilla .....	6
3.2 Biotecnología Vegetal .....	6
3.3 Cultivo de tejidos vegetales (CVT) .....	7
3.3.1 Micropropagación .....	7
3.4 Mejoramiento genético de las plantas .....	8
3.5 Variación Somaclonal .....	8
3.5.1 Causas de la variación somaclonal .....	9
3.6 Mutagénesis <i>in vitro</i> .....	10
3.6.1 Radiación gamma .....	11
3.6.2 Niveles de detección de la mutagénesis .....	13
3.7 Marcadores moleculares .....	13
3.7.1 Marcadores ISSR .....	14
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4.1 Ubicación del área de trabajo .....	15
4.2 Método experimental .....	16
4.3 Establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de vainilla .....	17
4.4 Irradiación de brotes de vainilla con <sup>60</sup> Co .....	17
4.5 Diseño experimental y análisis estadístico .....	18
4.6 Extracción de ADN y análisis ISSR .....	18
4.7 Análisis de datos moleculares .....	19
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
5.1 Efecto de la radiación gamma sobre la sobrevivencia y desarrollo <i>in vitro</i> .....	20
5.2 Efecto de la radiación gamma sobre la variación somaclonal .....	22
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>24</b>
6.1 Efecto de la irradiación gamma sobre la sobrevivencia y desarrollo <i>in vitro</i> .....	24
6.2 Efecto de la radiación gamma sobre la variación somaclonal .....	25
6.3 Discusión general .....	27

<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>29</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Localización del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Córdoba. ....	15
<b>Figura 2.</b> Estrategia experimental .....	16
<b>Figura 3.</b> Efecto de la radiación gamma sobre la sobrevivencia y desarrollo <i>in vitro</i> de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews).....	21
<b>Figura 4.</b> Efecto de diferentes dosis de irradiación gamma en el desarrollo de brotes <i>in vitro</i> de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews) a los 60 días de cultivo; <b>a–f</b> ) 0, 20, 40, 60, 80 y 100 Gy, respectivamente. Barra = 1 cm.....	22
<b>Figura 5.</b> Patrón de electroforesis con marcadores ISSR .....	22
<b>Figura 6.</b> Dendrograma de similitud genética.....	23

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews.....	5
<b>Tabla 2.</b> Marcadores ISSRs seleccionados para evaluar la variación somaclonal de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews) .....	19

## 1. INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews), de la familia Orquidaceae, es cultivada por sus frutos para la extracción de vainillina, una de las especias más valiosas en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Gantait y Kundu, 2017; Arya *et al.*, 2021). A pesar de su importancia económica, *V. planifolia* está clasificada en la categoría B2ab (iii, v) “en peligro de extinción” de acuerdo con la lista roja por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN) (UICN, 2021). En México, esta especie actualmente se encuentra sujeta a protección especial (Pr) debido a la severa fragmentación de su hábitat natural (SEMARNAT, 2010).

La propagación de vainilla es de forma asexual por esquejes y se poliniza manualmente para la obtención de vainas que contienen semillas con baja o nula germinación (Gantait y Kundu, 2017; Wan *et al.*, 2020). La propagación comercial por esquejes limita la diversidad genética de esta especie, ocasionando la susceptibilidad a plagas, enfermedades y la pérdida de tolerancia a factores abióticos (Li *et al.*, 2020), provocando la caída prematura de sus frutos. Por lo tanto, ampliar la diversidad genética de *V. planifolia* es importante en programas de mejoramiento genético (Hu *et al.*, 2019).

Una alternativa para inducir variabilidad genética es mediante técnica de mutagénesis *in vitro* (Li *et al.*, 2019b; Sharma *et al.*, 2020, OIEA, 2021). Las variaciones genéticas obtenidas a partir de cultivo *in vitro* son también llamadas variaciones somaclonales (Larkin y Scowcroft, 1981). Las variaciones somaclonales derivadas por mutagénesis *in vitro* con radiación gamma son libres de restricciones reglamentarias y permiten regenerar variaciones genéticas en un corto periodo de tiempo, es de bajo costo, fácil manipulación de explantes en espacios reducidos y controlados bajo condiciones asépticas (Waugh *et al.*, 2006; Ghani y Sharma, 2019; Salava *et al.*, 2021). La mutagénesis con cobalto 60 ( $^{60}\text{Co}$ ) tiene alto potencial de penetración, no tienen ningún riesgo para el medio ambiente y puede ser utilizado para irradiar células, tejidos, órganos y plantas completas (Oladosu *et al.*, 2016; Spinoso-Castillo *et al.*, 2021). La mutagénesis *in vitro* mediante  $^{60}\text{Co}$  ha sido utilizada en el mejoramiento genético de lirio de San Francisco (*Laelia autumnalis*) (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017b), arroz (*Oryza sativa* L.) (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2020), jengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) (Sharma *et al.*, 2020), papa (*Solanum tuberosum* L.) (Mohamed *et al.*, 2021), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Özge *et al.*, 2021).

El análisis de marcadores moleculares es una herramienta útil para estimar la variación somaclonal (Pardo *et al.*, 2015, Muñoz-Miranda *et al.*, 2019; Ranghoo-Sanmukhiya, 2021).

Entre los marcadores moleculares, los Inter-Secuencias Simples Repetitivas (ISSR) se caracterizan por ser dominantes, reproducibles, de bajo costo y no requieren conocimiento previo del genoma (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Recientemente, los ISSR han sido estudiados para analizar la variación somaclonal en plátano de hoja ancha (*Plantago major*) (Ghorbanpour y Khadivi-Khub, 2015), caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Martínez-Estrada *et al.*, 2017), tulipán (*Tulipa suaveolens*) (Kritskaya *et al.*, 2019), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) (Vitavvas *et al.*, 2019) y arbusto ornamental (*Disanthus cercidifolius* Maxim.) (Ulvrova *et al.*, 2021). En *Vanilla planifolia*, los ISSR han sido previamente utilizados por Bello-Bello *et al.*, (2018); Ramírez-Mosqueda *et al.*, (2019) y Pastelín-Solano *et al.*, (2019). El objetivo de este estudio fue inducir variación somaclonal en *V. planifolia* mediante irradiación gamma con <sup>60</sup>Co y su detección por medio de marcadores moleculares ISSR.

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo general

Inducir variación somaclonal en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) mediante irradiación gamma

### 2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el desarrollo de brotes *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) bajo las diferentes dosis de radiación gamma evaluadas.
2. Evaluar el porcentaje de polimorfismo en los brotes cultivados *in vitro* de vainilla bajo las diferentes dosis de radiación gamma.
3. Evaluar la distancia genética de los brotes irradiados de vainilla mediante el coeficiente de similitud de Jaccard y el modelo de aglomeración neighbor joining.

### 2.3 Hipótesis

La radiación gamma con  $^{60}\text{Co}$  es un método eficiente para inducir variación somaclonal; sin embargo, podría ocasionar efectos sobre desarrollo *in vitro* en etapa de multiplicación en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews).

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews

##### 3.1.1 Origen y distribución

El origen del género *Vanilla* data de zonas tropicales del sureste de México, centro y sur de América en países como Guatemala, Belice y Costa Rica (Soto y Cribb, 2010; Villanueva-Viramontes *et al.*, 2017; Hernández-Ruiz *et al.*, 2020). Las vainas de vainilla se han aprovechado desde la época precolonial, por su valioso aroma y para perfeccionar el sabor del chocolate elaborado por los aztecas y los mayas (Hu *et al.*, 2019). Históricamente, durante el siglo XIX, México fue el principal productor de vainilla. Posteriormente, la vainilla fue cultivada en todo el mundo superando las limitaciones de suministro. Además, al implementar la polinización manual se expandió la producción en otras áreas geográficas. Actualmente, la vainilla se cultiva en zonas de Madagascar, Tahití, Indonesia, México e India (Menon y Nayeem, 2013; Gantait y Kundu, 2017; Hu *et al.*, 2019).

En México, el municipio de Papantla es uno de los principales centros de beneficio y comercialización de la vainilla. En un estudio de Díaz-Bautista (2018) detectó que la vainilla que se produce en el municipio es una mezcla de frutos que provienen de al menos 19 municipios de la Sierra Norte de Puebla y de 20 municipios del norte de Veracruz. Sin embargo, de acuerdo a la IMPI (2010) este lugar tiene la denominación de origen de la “Vainilla de Papantla”. Debido a que la vainilla que se produce ahí es considerada de la mejor calidad, debido a que contiene mayor cantidad de compuestos aromáticos en comparación con la de otros países productores, las características son atribuidas a las condiciones geográficas y a las prácticas del manejo de cultivo (Santillán-Fernández *et al.*, 2019).

##### 3.1.2 Descripción taxonómica

La vainilla forma parte de la familia Orchidaceae, está conformada por diversas plantas ornamentales, comprende 850 géneros con casi 30,000 a 35,000 especies (Hoffman y Zapf 2012; Gantait y Kundu, 2017). Hasta la fecha, el género *Vanilla* está conformado por aproximadamente 120 especies (Flanagan *et al.*, 2018). Sin embargo, sólo tres de las especies se consideran económicamente importantes *Vanilla pompona*, *Vanilla tahitensis* y *Vanilla planifolia*, esta última es considerada valiosa a nivel comercial por la calidad de su aroma

(Tabla 1) (Halim *et al.*, 2019).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Bory *et al.*, 2008).

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Orden</b>	Asparagales
<b>Familia</b>	Orchidaceae
<b>Subfamilia</b>	Vanilloideae
<b>Tribu</b>	Vanilleae
<b>Subtribu</b>	Vanillinae
<b>Género</b>	<i>Vanilla</i>
<b>Especie</b>	<i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews

### 3.1.3 Importancia del cultivo

*Vanilla planifolia* es una especie de las más importantes a nivel internacional, después del azafrán (*Crocus sativus* L.) y el cardamomo (*Elettaria cardamomum*); se estima que el 95% de la vainillina natural producida a nivel mundial se obtiene de los frutos procesados de la especie (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2016). El cultivo de vainilla ha sido importante para el desarrollo socioeconómico de muchos productores de las regiones de México (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012). Sin embargo, Barrera-Rodríguez *et al.* (2011) mencionan que el aumento de los costos de producción ha sido generado por los elevados precios de insumos y por el estancamiento de algunos insumos que afectan a la rentabilidad del sistema de producción.

A pesar de su importancia, a nivel mundial se producen cerca de 100 toneladas. Mientras que, la producción nacional aporta 494.69 t. Según la FAO (2017), la producción de fruto verde del país fue de 514.94 t, ubicando al país en el quinto lugar de producción mundial, después de Madagascar, Indonesia y China, que durante el mismo año produjeron 3227, 2402 y 662 t respectivamente (Luis-Rojas *et al.*, 2020). Dentro de las plantaciones comerciales en México, los estados productores son Veracruz, Puebla, Hidalgo, Chiapas, Oaxaca, San Luis Potosí, Tabasco y Quintana Roo. De estos estados, Veracruz aporta el 70% de la producción nacional; siendo “El Totonacapan” la zona vainillera más importante del estado (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2011; Hernández-Martínez *et al.*, 2020).

### **3.1.4 Problemática actual de la vainilla**

Históricamente, la producción de vainilla en México fue económicamente importante. Sin embargo, la producción ha disminuido gracias a factores como: la caída prematura del fruto, el cambio de uso de suelo en la región, la nutrición deficiente, variación de clima, altos costos generados por la polinización manual, así como la proliferación de plagas y enfermedades (Rocha-Flores *et al.*, 2018).

Además, la falta de variabilidad es uno de los factores más importantes que contribuyen a la falta de resistencia a estrés biótico y tolerancia a estrés abiótico (Ramos-Castellá *et al.*, 2016). Ante esto, la propagación de vainilla tiene como limitante la baja tasa de germinación y la baja variabilidad que presenta la semilla (Torres-González *et al.* 2011). Otros factores que contribuyen son los métodos deficientes para propagar asexualmente los esquejes, que no garantizan la sanidad de nuevas plantaciones que están restringidas a una cantidad pequeña de esquejes por planta (Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). En consecuencia, la mayor fuente de germoplasma destinada a plantaciones comerciales está expuesta a la suma de los problemas antes mencionados que pueden causar la pérdida de aproximadamente 80% del cultivo (Borbolla *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2016).

Por lo anterior, la especie se encuentra clasificada como amenazada por la sobreexplotación en su hábitat natural y de acuerdo con la NOM-59-SEMARNAT-2010, está sujeta a programas de protección especial. En la actualidad, la vainilla de México no cuenta con variedades o genotipos mejorados que permitan minimizar la problemática existente. Ante esto, los programas de mejoramiento a través de técnicas biotecnológicas son de gran interés para obtener mejores rendimientos del cultivo (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019).

### **3.2 Biotecnología Vegetal**

La biotecnología ha sido definida como el conjunto de técnicas que involucran la manipulación de los sistemas biológicos y sus derivados, para obtener o modificar productos útiles para la humanidad. Por lo que, no consiste en una ciencia básica, se apoya en un conjunto de actividades empleando ramas como la química, biología, inmunología, microbiología, ingeniería bioquímica, biología molecular, genómica, bioinformática, entre otras (PROMÉXICO, 2017). Actualmente, la Biotecnología vegetal sufre desafíos para alimentar y vestir a una población mundial con crecimiento acelerado mientras trata de mantener una

calidad ambiental, donde existe la necesidad de mejorar el rendimiento de cultivos para adaptarse a cambios drásticos del ambiente (Collins *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013).

En este sentido, un fenómeno aplicado en la biotecnología vegetal con capacidad de regenerar nuevos tejidos, órganos o embriones es el cultivo de tejidos vegetales, el cual es un modelo de impacto para emprender el mejoramiento de cultivos de interés que generen genotipos con capacidad de prevalecer a diferentes factores bióticos y abióticos (Jha y Kumar, 2018).

### **3.3 Cultivo de tejidos vegetales (CVT)**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) utiliza una serie de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de células, tejidos y órganos vegetales en un medio nutritivo bajo un ambiente controlado, estéril y simulado (Kim *et al.*, 2017; Espinosa-Leal *et al.*, 2018). Estas técnicas se fundamentan a partir de la teoría celular mediante el concepto de totipotencia el cual fue anunciado por Haberlandt (1992) como potencial de una célula vegetal para generar un organismo completo (Bednarek y Orłowska, 2020).

Además, el CTV es parte de la biotecnología moderna y es utilizado ampliamente en trabajos sobre procesos de desarrollo de plantas, funcionamiento de genes, micropropagación y generación de plantas genéticamente modificadas con características específicas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo 2018; Bednarek y Orłowska, 2020).

#### **3.3.1 Micropropagación**

La micropropagación o propagación clonal es una de las aplicaciones actuales del Cultivo de Tejidos Vegetales. En esta técnica se mantiene genéticamente y bioquímicamente el material de siembra uniforme a escala comercial en un corto periodo de tiempo y en condiciones controladas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018; Arumugam *et al.*, 2020).

Micropropagar plantas representa ventajas en comparación con métodos convencionales ya que se producen plantas de calidad (genéticamente y fisiológicamente) libres de plagas y enfermedades, que en su mayoría tienen un alto desarrollo vegetativo y de rendimiento (Cardoso *et al.*, 2018). Otra ventaja importante es utilizar como herramienta la micropropagación dentro del mejoramiento genético, en lugar de técnicas convencionales, dado que se utilizan pequeños explantes de cualquier parte de la planta que permiten ser manipulados en condiciones controladas (Ghani y Sharma, 2019).

### **3.4 Mejoramiento genético de las plantas**

El mejoramiento de plantas es una ciencia multidisciplinaria en la que intervienen diferentes áreas del conocimiento para la creación, fijación de fenotipos y selección para mejoras que se ajusten a las necesidades agronómicas de los productores (Moose y Muhm, 2008; Marin-Montes *et al.*, 2019). Dentro de los programas de mejoramiento de cultivos de interés agrícola, es necesario contar con una extensa base genética que garantice variabilidad para tener mayor probabilidad de seleccionar genotipos (Divakaran *et al.*, 2006).

En este sentido, la variabilidad genética que se puede detectar durante las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales puede deberse a cambios genéticos o epigenéticos y representan una posibilidad importante para obtener variantes somaclonales o mutantes con caracteres agronómicos o industriales específicos que se pueden expresarse a nivel celular o vegetal. De tal forma, es posible crear plantas tolerantes a la sequía, la salinidad y el frío o resistentes al estrés biótico que interviene en el rendimiento del cultivo (Larkin y Scowcroft, 1981; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

### **3.5 Variación Somaclonal**

En el Cultivo de Tejidos Vegetales la conservación de la integridad genética de la planta donante es crucial, sin embargo, se ha demostrado que se producen plantas con anomalías y variaciones fenotípicas inesperadas que pueden ser favorables o no deseadas (Ranghoo-Sanmukhiya, 2021). Este fenómeno es conocido como variación somaclonal, que produce cambios que pueden ser de origen genético o epigenético en plantas regeneradas a partir del Cultivo de Tejidos Vegetales (Larkin y Scowcroft, 1981).

Aunque, en sistemas de producción comercial es indeseable mantener y reproducir clones, por lo que es de gran potencial si se utiliza como herramienta en la mejora de cultivos por la aparición de caracteres novedosos que pueden ser aprovechados durante el fitomejoramiento (Jain, 2001; Bairu *et al.*, 2011). La variación somaclonal ofrece algunas ventajas para la mejora genética, que incluyen la alta frecuencia de mutación y potencial para obtener mutantes *in vitro* con características novedosas (Cao *et al.*, 2016).

En comparación de las mutaciones espontáneas *in vivo*, las variaciones *in vitro* suelen ocurrir con mayor frecuencia, por lo que, las causas de la variación somaclonal no han sido explicadas por completo, la literatura hasta la fecha indica que las variaciones pueden variar desde un rasgo específico hasta generar un nuevo genoma de la planta (Yang *et al.*, 2010; Bairu *et al.*, 2011).

### 3.5.1 Causas de la variación somaclonal

Entre los factores que determinan la frecuencia de variación somaclonal incluyen el método de propagación *in vitro*, la concentración de reguladores de crecimiento y el número de ciclos de subcultivos, así como el genotipo de la especie que puede ser más susceptible a variaciones (Bairu *et al.* 2011; Krishna *et al.*, 2016; Martínez-Estrada *et al.*, 2017).

**Fuente de explante y forma de regeneración:** La regeneración de diferentes partes de tejido altamente diferenciados como hojas, raíces y tallos, generalmente tienden a producir mayor variación en comparación al utilizar meristemos, como yemas axilares y puntas de brotes. Por lo general, cuanto más viejo sea el explante mayor posibilidad de variación existe en las plantas regeneradas. También, la variación somaclonal se puede presentar a partir de mutaciones somáticas (quimeras) ya existentes en los explantes de la planta donante (Duncan 1997; Sahijram *et al.*, 2003; Krishna *et al.*, 2016; Liberatore *et al.*, 2020).

Saravanan *et al.* (2011) indican que existe una mayor variación cromosómica cuando los explantes son sometidos a fase de callo, ya que genera genomas alterados. Debido a que primero pasa por una fase de desdiferenciación celular seguida por descontroladas divisiones celulares (Vázquez, 2001; Liberatore *et al.*, 2020). Probablemente, la regeneración por vía embriogénesis es la más valorada para obtener plantas genéticamente uniformes en comparación de la vía de organogénesis. Esta preferencia es debido que el ADN en etapas iniciales de la embriogénesis somática tiene niveles más bajos de metilación que en etapas posteriores (Sahijram *et al.*, 2003; Ranghoo-Sanmukhiya, 2021).

#### **Tipo y concentración de reguladores de crecimiento:**

Existen estudios que informan que la presencia de ciertos reguladores de crecimiento y antibióticos generan variación somaclonal durante el cultivo *in vitro* (Sun *et al.*, 2013). También, D'Amato y Bayliss (1985) mencionó que las auxinas y citoquininas aumentan la tasa de variación somaclonal cuando son agregadas al medio de cultivo (Sales y Butardo, 2014; Liberatore *et al.*, 2020). En este sentido, se ha reportado que para inducir organogénesis indirecta se utiliza citoquininas las cuales aumentan la tasa de células poliploides, por el contrario, al utilizar altas concentraciones de auxinas pueden causar metilación de ADN e inestabilidad cromosómica en las que se incluyen deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones (Mançano *et al.*, 2019; Liberatore *et al.*, 2020).

**Duración y número de subcultivos:** Se sabe que el tiempo y el aumento de número de subcultivos a través del cultivo *in vitro* tiende a mostrar variaciones somaclonales entre las plantas (Krishna *et al.*, 2016). Pastelín-Solano *et al.* (2019) demostró en *Vanilla planifolia* que

medida que aumentan los ciclos de subcultivo se disminuye la tasa de multiplicación y longitud de brotes. Por lo que, reporta que posterior al quinto subcultivo es mayor la variación somaclonal.

En este contexto, se ha referenciado que en cultivos envejecidos o con varios subcultivos aumenta la variación somaclonal en especies como caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Martínez-Estrada *et al.* 2017), babano (*Musa* spp.) (Bairu *et al.*, 2006), stevia (*Stevia rebaudiana*) (Soliman *et al.* 2014) y vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) (Pastelín-Solano *et al.*, 2019).

**Genotipo y nivel de ploidía:** La evidencia existente de muestra que la variación somaclonal depende del genotipo, que incluyen cambios como roturas y reordenamiento cromosómico. Así mismo, pueden generarse fragmentos con disposición anormal de cromosomas y formación de micronúcleos, mutaciones genéticas, cambios en el número de copias de genes, activación y transposición de elementos transponibles (Álvarez *et al.* 2010; Bairu *et al.* 2011; Ranghoo-Sanmukhiya, 2021).

También, Sun *et al.* (2013) informó que dentro de las variaciones genéticas que se producen son las mutaciones puntuales, reordenamiento del ADN nuclear u organelar, ploidía y activación de genes móviles.

### 3.6 Mutagénesis *in vitro*

En términos generales, la mutación es definida como un cambio espontaneo que se produce durante la replicación del ADN o en la división celular. Al inducir mutaciones se mejora el proceso de evolución y se explotan los caracteres superiores de un cultivar (Jain *et al.*, 2013). Una disciplina dedicada al desarrollo de nuevas variedades vegetales es el fitomejoramiento, el cual utiliza las variaciones genéticas de los individuos con el fin de combinarlas para obtener nuevos caracteres deseados. Esto se ha podido lograr mediante la aplicación de tratamientos físicos o químicos que implican cambios en el genoma del material vegetal (Mba *et al.*, 2012; Holme *et al.*, 2019).

Los tratamientos convencionales utilizan agentes físicos que incluyen radiaciones ionizantes, como rayos X, rayos gamma (causan selecciones y sustituciones) y neutrones rápidos (perdidas cromosómicas, deleciones y traslocaciones). Los tratamientos químicos incluyen agentes como metanosulfonato de etilo (EMS), sulfato de dimetilo (DMS), etilenimina (EI), sulfato de dietilo (dES), metilnitrosourea (MNU), etilnitrosouretano (ENU) y etilnitrosourea (ENU), azida de sodio (NaN<sub>3</sub>), colchicina y N-etil-N-nitrosourea (NEU), los cuales generan

mutaciones puntuales. Específicamente el EMS, tiene una reacción con guanina o timina, que añade un grupo etilo y en consecuencia durante la replicación se reconocen estas bases modificadas como adenina o citocina respectivamente (Pathirana, 2011; Shelake *et al.*, 2019; Ahumada-Flores *et al.*, 2020).

Las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales han facilitado el uso de la mutagénesis *in vitro*, el hecho de combinar estas dos técnicas ha demostrado la eficacia para inducir variabilidad en un corto periodo de tiempo. Existen trabajos en cultivos donde la mutagénesis ya ha sido utilizada para inducir caracteres útiles como mejora de la calidad y resistencia a enfermedades, también se ha utilizado para la mejora de semillas (Bhat *et al.*, 2017).

Todos los posibles éxitos en la obtención de mutantes a través del cultivo *in vitro*, es por la facilidad de manipular grandes poblaciones en espacios controlados. Una ventaja de implementar estas técnicas es que son simples y económicas (Kashtwari *et al.*, 2018).

Además, la mutagénesis inducida produce cambios macromoleculares, que conducen a la alteración fisiológica y morfológica de los genotipos de las plantas (Laskar *et al.*, 2018; Ghori *et al.*, 2020). Es por esto, que la parte más crítica de la mutagénesis inducida es la selección de un mutágeno, dosis y tiempo de exposición, el tipo de planta, así como la determinación de la DL<sub>50</sub> que tiene gran relevancia ya que concentraciones elevadas y largos periodos de exposición pueden provocar efectos de consideración en mortalidad del material vegetal (Gottschalk y Wolff 2012; Ghori *et al.*, 2020; Bermúdez-Caraballoso *et al.*, 2020).

### **3.6.1 Radiación gamma**

La energía emitida por un cuerpo en forma de onda o partícula es conocida como radiación, esta se propaga mediante un nivel alto de energía que pasa a uno más bajo. Por lo que, un material radioactivo es considerado como aquel que emita radiación ionizante de cualquier tipo de radiación alfa, beta o gamma. Además, el agente debe de tener suficiente energía para desplazar electrones y causar ionizaciones en la materia (Kumar *et al.*, 2017).

Actualmente, el número de mutantes oficialmente registrados hasta el 2020 es de 3362 en (<http://mvgs.iaea.org>), de los cuales hasta el 2019, 1.600 se obtuvieron mediante irradiación con rayos gamma (Li *et al.*, 2019a). Los rayos gamma son usados recientemente para esterilizar alimentos, productos médicos y el mejoramiento vegetal. Este mutágeno físico, está conformado por partículas pequeñas, con longitud de onda de 10 nm que tienen un efecto de interacción con moléculas en particular de agua (Kitano *et al.*, 2015).

Desde los primeros trabajos de Muller (1927) en *Drosophila* con rayos X han surgido muchos trabajos. Sin embargo, desde 1960 los rayos gamma son la herramienta mutagénica más

utilizada por los fitomejoradores, debido a su accesibilidad, alto grado de precisión y poder de penetración en la materia biológica (Suprasanna *et al.* 2015).

La exposición de material vegetal con rayos gamma se realiza generalmente en minutos o en pocas horas con dosis relativamente altas, también se pueden utilizar dosis bajas cada cierto periodo de tiempo (semanas o meses) (Li *et al.*, 2019a). Morita *et al.* (2009) mencionan que la irradiación gamma causa pequeñas deleciones de 1-10 pb en comparación con los neutrones rápidos que causan deleciones de hasta 300 pb. Así mismo, los rayos gamma son capaces de capturar o liberar electrones que cuando atraviesan la materia rompen los enlaces químicos. En cambio, las interacciones con el agua tienen un efecto importante es la producción de radicales libres que tienden a cambiar de posición las bases y generar rupturas en el enlace de hidrógeno con la cadena de ADN. A nivel bioquímico los cambios presentes son en la estructura celular y metabolismo, como la dilatación de las membranas tilacoides, la fotosíntesis, variaciones en el sistema antioxidante y el almacenamiento de compuestos fenólicos. Aunque, el principal organelo afectado por la radiación es el núcleo celular (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017a).

Por otro lado, la radiación gamma en bajas dosis puede estimular el crecimiento y diferenciación celular. Este fenómeno es conocido como efecto hormético u hormesis (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017b). De acuerdo a Calabrese (2018) el efecto hormético se caracteriza por estimular el desarrollo a dosis bajas e inhibición o muerte por dosis altas. La exposición del tejido a dosis altas de un agente físico o químico puede ocasionar efectos tóxicos a través de la aparición de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Las ROS pueden dañar la estructura de carbohidratos, lípidos, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, afectando el metabolismo de las células (Hase *et al.*, 2020). Las ROS están asociadas a la hormesis y son moléculas de señalización que desencadenan diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares sobre el desarrollo vegetal; sin embargo, la producción y acumulación en exceso de ROS resulta tóxico para los tejidos vegetales (Jalal *et al.*, 2021).

Al respecto Liu *et al.* (2021) menciona que la radiación gamma, a altas dosis, puede inducir estrés oxidativo, por lo tanto, la producción de ROS generada por la exposición a altas dosis ocasiona una disminución de la proliferación celular, lo que eventualmente conduce a la muerte celular. El efecto hormético se ha observado en otros trabajos de mutagénesis *in vitro* con  $^{60}\text{Co}$  en arvejilla (Beyaz *et al.*, 2016), lirio de San Francisco (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017b), verdolaga (Kapare *et al.*, 2017) y más recientemente en arroz (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2020).

### 3.6.2 Niveles de detección de la mutagénesis

Implementar técnicas de biología molecular después de la mutagénesis sirve para demostrar la fidelidad genética de plantas cultivadas *in vitro*, así como para generar nuevos cultivares (Gantait y Kundun, 2017). Las estrategias con marcadores moleculares para determinar la fidelidad genética de las progenies cultivadas *in vitro* van desde el uso de marcadores bioquímicos, fisiológicos, citológicos y basados en el ADN (Krishna *et al.*, 2016). Sin embargo, los marcadores morfológicos y bioquímicos no les es posible detectar mutaciones puntuales o elementos genéticos móviles (de Vicente y Fulton, 2004; Pastelín-Solano *et al.*, 2019).

De igual manera, los marcadores basados en proteínas e isoenzimas son menos polimórficos en comparación con los basados en los ácidos nucleicos. Los cuales, están regidos por enzimas de restricción en la PCR que son utilizados para el aislamiento de fragmentos diana (Karihaloo, 2015).

De modo que, los marcadores moleculares son una herramienta eficaz para la detección y análisis de variaciones genéticas. Debido a que es importante demostrar la diferencia entre el mutante y la planta donante (Li *et al.*, 2019).

### 3.7 Marcadores moleculares

En la actualidad, la agricultura aprovecha la diversidad de los recursos genéticos implementando métodos para su caracterización, utilización y conservación (Dar *et al.*, 2019). Los métodos convencionales utilizados para caracterizar variaciones dentro y entre varias poblaciones de plantas son obtenidos en diferentes etapas de crecimiento, por lo tanto, requieren de un largo periodo de tiempo para la toma de datos. Además, es complicado controlar el genotipo a causa del efecto ambiental (Karihaloo, 2015).

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN con ubicación específica en un cromosoma. Estos son utilizados en varias áreas como la taxonomía, la ingeniería genética y el fitomejoramiento para detectar alteraciones a nivel del ADN o bien para detectar variaciones en material vegetal sometido a un tratamiento mutagénico (Pardo *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019b; Kaminska *et al.*, 2020).

Existe una variedad de marcadores moleculares y se pueden clasificar en grupos de acuerdo al tipo de técnica, como los marcadores de Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) que su técnica es basada en hibridación, a diferencia de los basados en la técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa). En este grupo se encuentran los marcadores de Polimorfismo de ADN Amplificados al Azar (RAPDs), también los marcadores

de Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLPs), las Secuencias Simples Repetitivas (SSR) y los Inter Secuencias Simples Repetitivas (ISSR) (Jiang, 2013; Gantait y Kundun, 2017; Nadeem *et al.*, 2018).

Los resultados de estas tecnologías ofrecen nuevos enfoques que permiten conocer datos de secuenciación hasta el genoma completo de diversas especies de interés agronómico en poco tiempo y a bajo costo. Por lo que, se espera que al obtener una mejora genética se perfeccionen los métodos y así se beneficie la obtención de los cultivos (Garrido-Cárdenas *et al.*, 2017).

### **3.7.1 Marcadores ISSR**

Los marcadores Inter Secuencias Simples Repetitivas (ISSR) están basados en la amplificación de segmentos de ADN entre dos regiones repetidas idénticas orientadas de forma opuesta, pero ubicadas a una distancia que permite la amplificación. Las repeticiones pueden ser de secuencias de di, tri, tetra o pentanucleótidos. La longitud de los cebadores generalmente utilizados es de 10 a 30 pb y pueden estar anclados o desanclados al extremo 5' o 3', con 1 a 4 bases degeneradas en el extremo. Generalmente, resisten a temperaturas de 45-60 °C con longitud de 200-2000 pb que se visualizan en gel de agarosa o poliacrilamida (Karihaloo, 2015; Nadeem *et al.*, 2018).

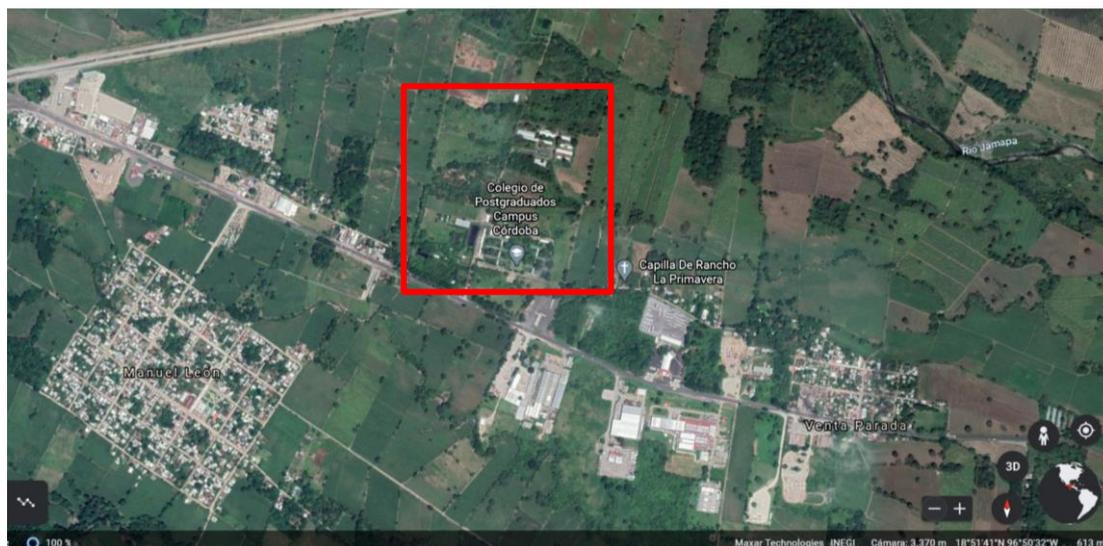
Recientemente, estos marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados para detectar variación somaclonal de *Vanilla planifolia* (Bello-Bello *et al.*, 2018; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019; Pastelín-Solano *et al.*, 2019) es una técnica simple y efectiva que no requiere de información previa del genoma, el método es rápido en comparación con otros marcadores como los RAPD y AFLP (Viehmanna *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2015; Martínez-Estrada *et al.*, 2017). Comúnmente, en estas investigaciones se utilizan partes de hojas de las plantas para extraer el ADN debido a su facilidad y especificidad para detectar un fragmento específico de la secuencia de ADN asociado al genoma. Los resultados son basados en la comparación de bandas ausentes o presentes (Bairu *et al.*, 2011). La presencia de la banda se refiere al genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto), mientras que la ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo, ya que se asume que existen dos alelos por locus (González y Aguirre, 2007).

Los estudios han demostrado que son factibles herramientas para estimar la diversidad genética, la conservación, la identificación y selección con enfoques de mejoramiento (Dar *et al.*, 2019).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

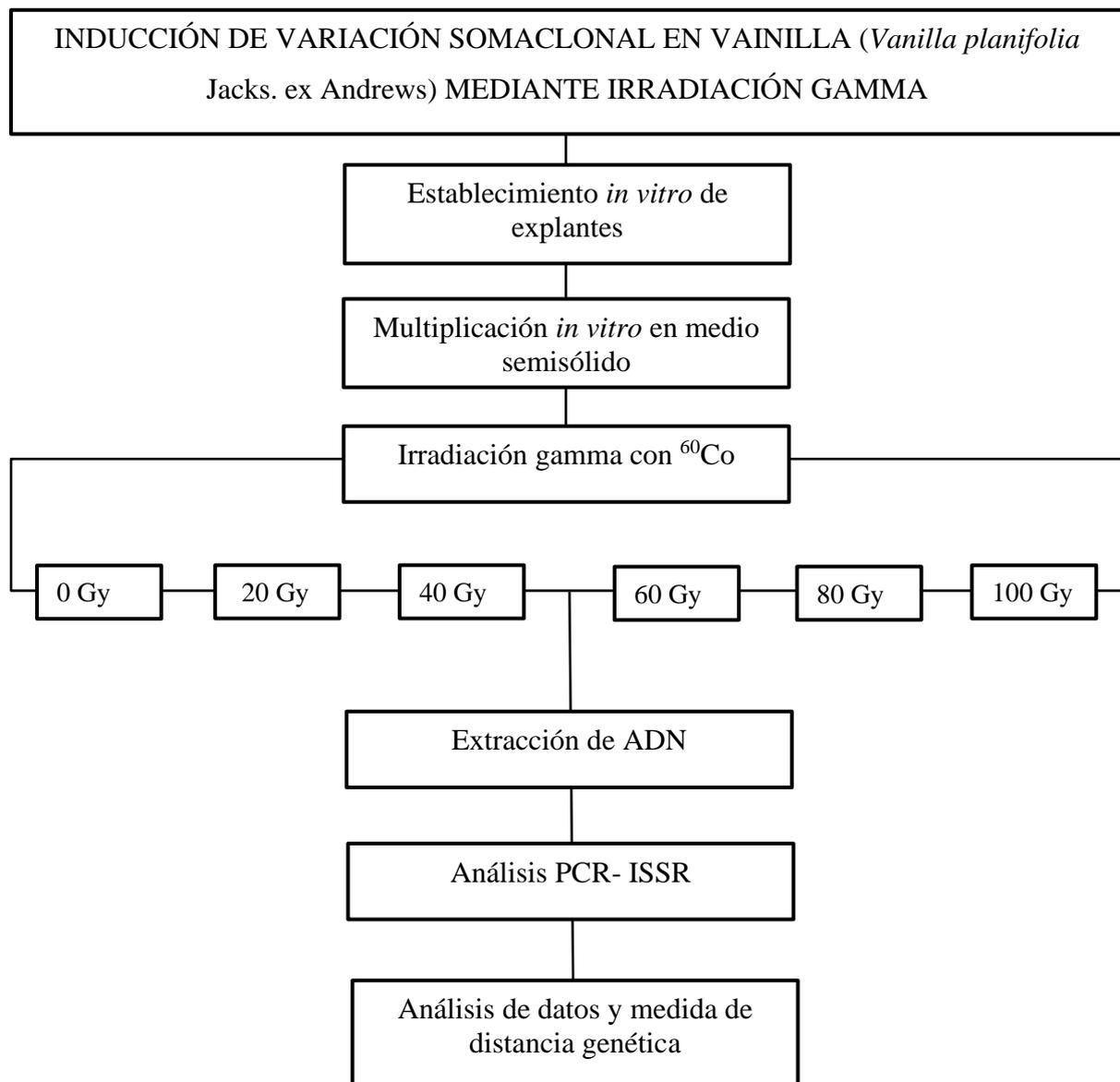
### 4.1 Ubicación del área de trabajo

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Posgraduados-Campus Córdoba, Km. 348 Carretera Federal Córdoba-Veracruz, C.P. 94946. Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. Localizado geográficamente a  $19^{\circ} 27'$  latitud Norte y  $98^{\circ} 53'$  longitud Oeste, a 720 msnm (Figura 1).



**Figura 1.** Localización del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Posgraduados (COLPOS) Campus Córdoba.

## 4.2 Método experimental



**Figura 2.** Estrategia experimental

### **4.3 Establecimiento y multiplicación *in vitro* de vainilla**

Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron tallos jóvenes de plántulas madre de vainilla de 20-30 cm de longitud que contenían tres yemas bajo condiciones de invernadero. Las hojas fueron retiradas de los tallos y se cortaron segmentos nodales de 2 cm de longitud que contenían una yema. Los nudos fueron utilizados como explantes y fueron lavados con agua corriente y dos gotas de Tween 20<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Chemical Company, St. Louis, MO, USA) durante 30 minutos. Posteriormente, los explantes se sumergieron en una solución de fungicida 0.1 mg L<sup>-1</sup> de 50WP Captan-ultra<sup>®</sup> (Arysta Life Science México S.A. de C.V. Coah., MX) durante 30 minutos. En campana de flujo laminar, los explantes se sumergieron en una solución al 5% (w/v) de NaClO (Cloralex<sup>™</sup>, Industrias Alen, S.A. de C.V, NL, México) (6% i.a.). Finalmente, se sumergieron en una solución de cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 1.3% (w/v) durante 15 minutos y se enjugaron cinco veces con agua destilada estéril. Los explantes fueron cultivados individualmente en tubos de ensayo de 22 x 150 mm que contenían 10 mL de medio MS (Murashige y skoog, 1962), suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (BAP) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. El medio MS fue ajustado a pH de  $\pm$  5.8 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y se agregó 0.25% (w/v) phytigel<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) como agente gelificante. El material se esterilizó en una autoclave a 120 °C y 115 kPa por 15 min. Los cultivos fueron incubados a 24 $\pm$  2 °C con un fotoperiodo de 16 h bajo luz LED (50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Después de dos semanas de cultivo, los explantes fueron transferidos a frascos de 500 mL que contenían 30 mL de medio de multiplicación MS suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP bajo las condiciones de luz y temperatura antes mencionadas. Se realizaron tres subcultivos en periodos de 60 días previo los tratamientos de irradiación con <sup>60</sup>Co.

### **4.4 Irradiación de brotes de vainilla con <sup>60</sup>Co**

Brotes de aproximadamente 2 cm de longitud fueron irradiados en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, ubicado en la ciudad de Toluca, México con el irradiador Transelektro (LG1-01, Budapest, HU) utilizando rayos gamma con <sup>60</sup>Co. Los explantes fueron tratados con dosis de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 Gy, con tiempo de exposición fue de 2.1, 4.2, 6.3, 8.3, 10.4 min, respectivamente. La irradiación de los brotes se realizó en cajas de Petri de cristal que contenían medio MS sin reguladores de crecimiento. Fueron utilizados 12 explantes, distribuyendo cuatro explantes por caja Petri. Posteriormente, los brotes irradiados fueron transferidos inmediatamente a medio fresco MS de multiplicación para evitar los posibles

efectos de desnaturalización de los componentes del medio. Los explantes fueron cultivados durante 60 días en medio de multiplicación antes descrito, bajo las condiciones de luz y temperatura antes mencionadas. Las variables a medir fueron porcentaje de sobrevivencia, número de brotes por explante, longitud de brote y número de hojas por brote.

#### **4.5 Diseño experimental y análisis estadístico**

Para la irradiación gamma y multiplicación *in vitro* se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía y comparación de medias por Tukey ( $P \leq 0.05$ ) utilizando el software estadístico IBM SPSS® (versión 22 para Windows). Los datos porcentuales se transformaron con la formula  $Y = \arcsen(\sqrt{x/100})$ , donde x es el valor del porcentaje.

#### **4.6 Extracción de ADN y análisis ISSR**

La planta donante y explantes sin irradiar fueron utilizados como testigo y control, respectivamente. En todos los experimentos se utilizaron muestras de hojas (0.5 g) de la planta donante y hojas de 10 brotes seleccionados al azar por cada dosis de irradiación. La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el método de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Stewart y Via, 1993). La cantidad y pureza del ADN se determinó por un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Las muestras de ADN utilizadas fueron cuando la ratio A260/230 se obtuvo en 1.8-2.2. La integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1.5% (w/v) teñido con 3 µL de Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®) en una concentración de 0.1 µL ml<sup>-1</sup> usando TAE 1X como buffer, visualizado en un espectro con luz UV utilizando un sistema de fotodocumentación (ChemiDoc™XRS Gel Documentation system, Bio-Rad, CA, USA). Para detectar el polimorfismo del ADN genómico de *V. planifolia*, se evaluaron 14 cebadores ISSR (Sigma-Aldrich®). De acuerdo a la resolución y reproducibilidad de los patrones de bandas, se seleccionaron ocho (Tabla 2).

**Tabla 2.** Marcadores Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) seleccionados para evaluar la variación somaclonal de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) con diferentes dosis de irradiación gamma con  $^{60}\text{Co}$

Cebadores	Secuencia (5'-3')	T <sub>m</sub>	No. De bandas	Rango (bp)	Polimorfismo (%)
UBC-809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	45	7	250–1500	4
T06	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50	4	400–750	3
UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52	6	500–1500	28.7
UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	50	6	400–1500	34.7
UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50	4	500–1500	0
UBC-825	ACACACACACACACT	50	6	500–2000	14.9
UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	53	9	400–1000	42.6
T05	CGTTGTGTGTGTGTGTGT	53	1	750	0

T<sub>m</sub>: Temperatura de alineamiento; pb= pares de bases; Y = C o T residuos.

Las reacciones de PCR se llevaron a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , que contenía 30 ng de ADN molde, 1.5 U de GoTaq<sup>®</sup> DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI, USA), 1 X Buffer (10mM Tris-HCL y 50mM KCl), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.5  $\mu\text{M}$  de primer. Los productos fueron amplificados en un termociclador Engine System (PTC-200, BIO-RAD, Watertown, MA). Se utilizó un programa a partir de un ciclo a 94 °C durante 4 min; seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 50 s, a una temperatura diferente para cada cebador (45-53 °C) durante 50 s y 72 °C durante 90 s. Finalmente, se realizó una extensión a 72 °C durante 10 min.

Los productos amplificados por PCR se corrieron en geles de agarosa al 2.5% (w/v) en una solución amortiguadora TAE 1X a 90 V por 90 min. Los geles se tiñeron con 3  $\mu\text{L}$  Bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA). Finalmente, los productos de PCR se obtuvieron utilizando el sistema de fotodocumentación antes mencionado.

#### 4.7 Análisis de datos moleculares

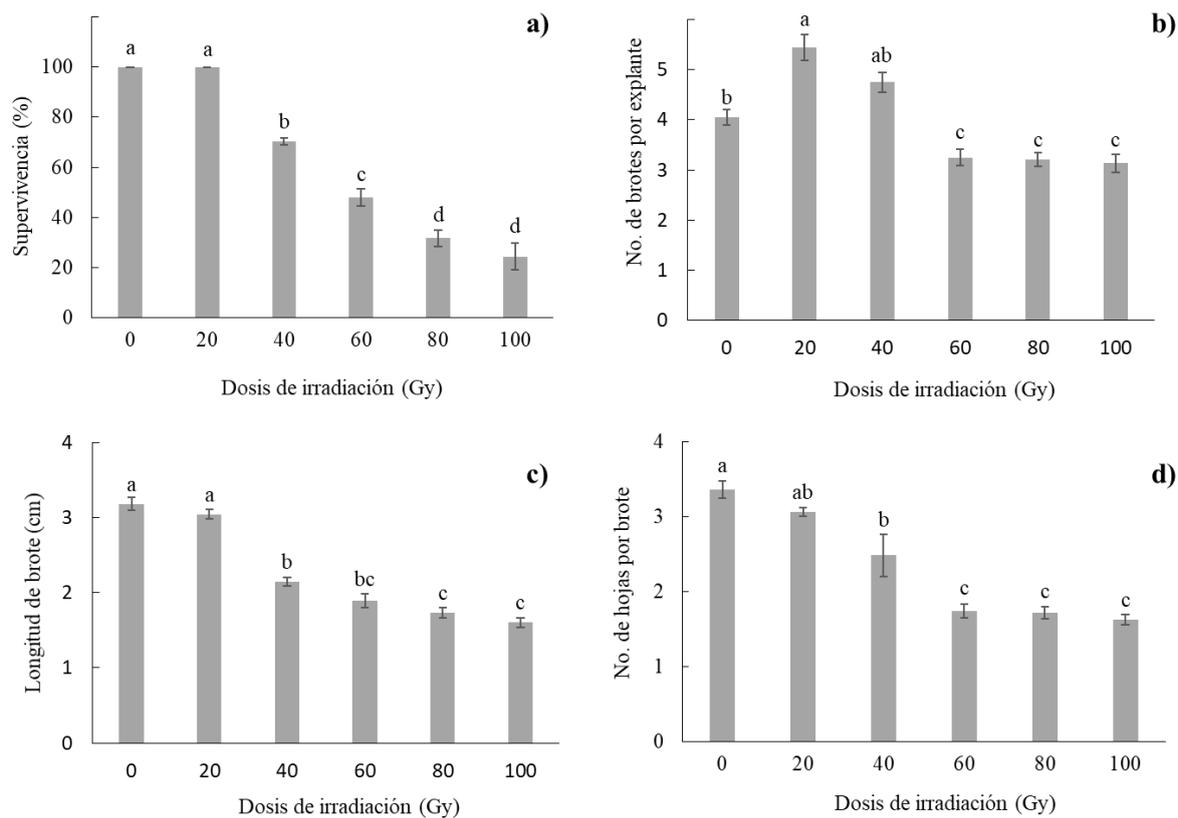
Se realizó una matriz binaria con las bandas de los fragmentos de ISSR y se registraron como presentes (1) o ausentes (0). Para cada cebador se calculó el porcentaje de polimorfismo. Además, se realizó un análisis de conglomerados mediante el coeficiente de similitud de Jaccard basado en la similitud entre conjuntos de muestras en relación a las coincidencias, donde 1 es similitud y 0 es divergencia, y el modelo de aglomeración neighbor joining (NJ) basado en la evolución mínima (Saitou y Nei, 1987). La planta donante se fijó como un grupo externo. La agrupación de NJ se realizó después de 1000 Bootstrap. Los resultados se

obtuvieron utilizando el programa Past v 3.04 (Hammer *et al.*, 2001) y fueron expresados en un dendrograma.

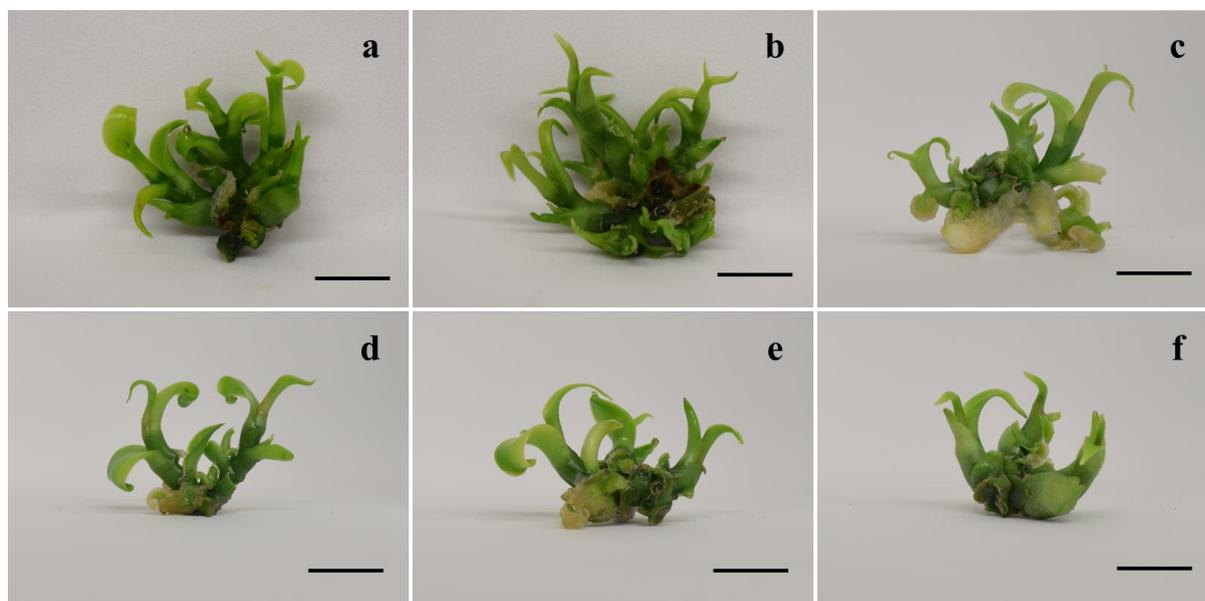
## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Efecto de la radiación gamma sobre la sobrevivencia y desarrollo *in vitro***

Las diferentes dosis de irradiación gamma mostraron un efecto significativo sobre el porcentaje de sobrevivencia, número de brotes por explante, longitud y número de hojas por brote (Figura 3). El mayor porcentaje de sobrevivencia se observó en las dosis 0 y 20 Gy, con el 100% de sobrevivencia; mientras que, los menores porcentajes de sobrevivencia se obtuvieron en las dosis de 80 y 100 Gy, con 31 y 24% de sobrevivencia, respectivamente (Figura 3a). Respecto al número de brotes por explante, la mayor cantidad de nuevos brotes se obtuvo en las dosis de 20 y 40 Gy, con 5.4 y 4.7 brotes por explante, respectivamente; mientras que, la menor cantidad de brotes se observó en las dosis de 60, 80 y 100 Gy, obteniendo tan sólo 3 brotes por explante (Figura 3b). La mayor longitud de brote se observó en las dosis 0 y 20 Gy, con 3.1 y 3 cm de longitud, respectivamente. La menor longitud se observó en las dosis de 60, 80 y 100 Gy, con 1.6 a 1.8 cm de altura (Figura 3c). En relación al número de hojas por brote, la mayor cantidad de hojas se observó en las dosis 0 y 20 Gy, con 3.3 y 3 hojas por brote; mientras que, el menor número de hojas por brote se observó en 60, 80 y 100 Gy, con 1.6 a 1.7 hojas por brote en promedio (Figura 3d).



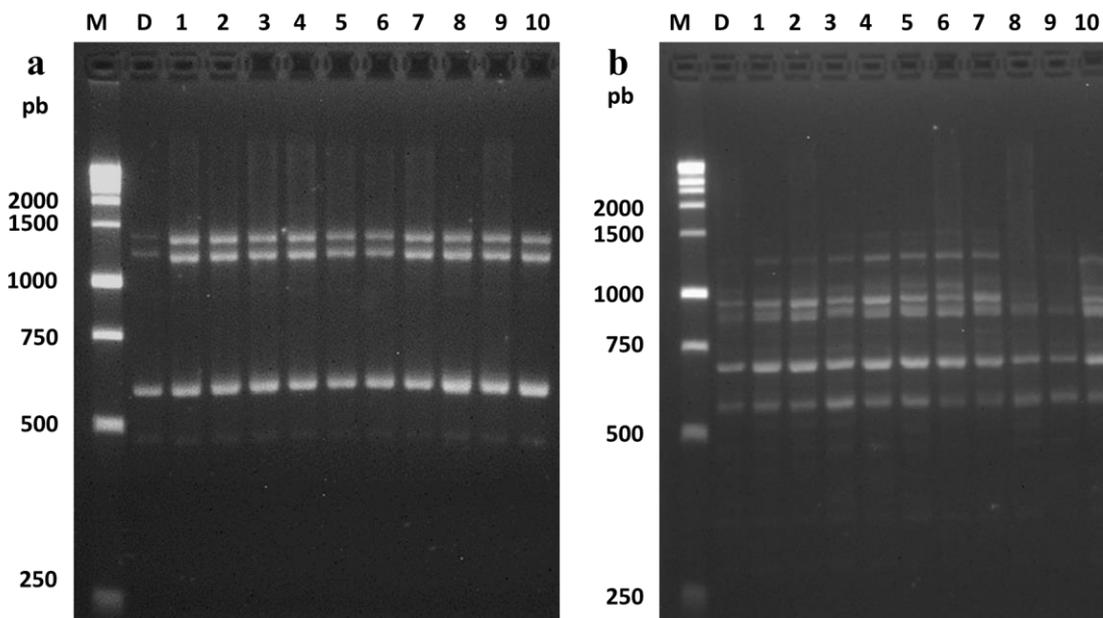
**Figura 3.** Efecto de la radiación gamma sobre la supervivencia y desarrollo *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). **a)** porcentaje de supervivencia, **b)** brotes por explante, **c)** longitud de brote y **d)** hojas por brote a los 60 días de cultivo. Los valores representan la media  $\pm$  ES (error estándar). Medias con diferente letra, son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 4.** Efecto de diferentes dosis de irradiación gamma en el desarrollo de brotes *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) a los 60 días de cultivo; **a–f)** 0, 20, 40, 60, 80 y 100 Gy, respectivamente. Barra = 1 cm.

## 5.2 Efecto de la radiación gamma sobre la variación somaclonal

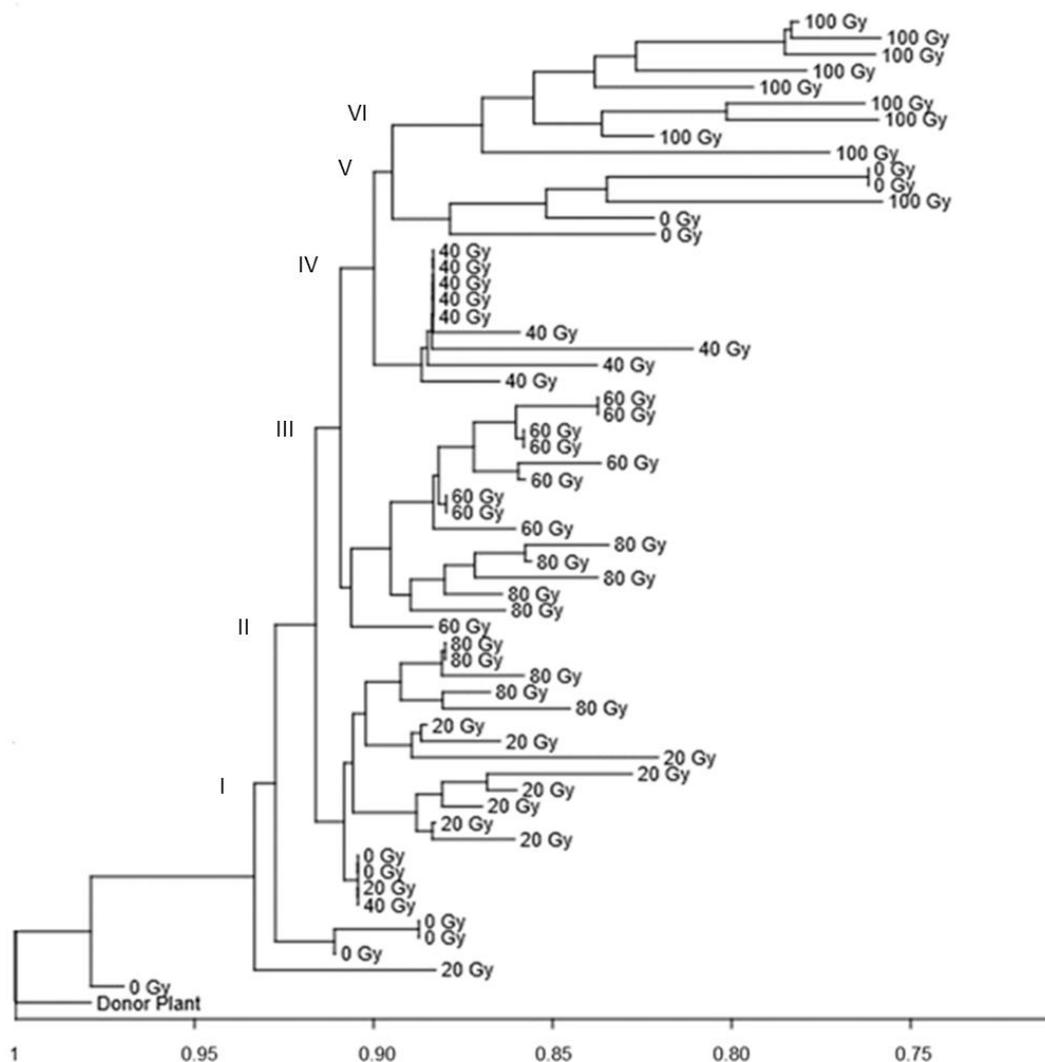
El análisis ISSR reveló la presencia de bandas monomórficas y polimórficas entre el control y las diferentes dosis de irradiación con respecto a la planta donante (Figura 5). Los ocho cebadores ISSR seleccionados amplificaron un total de 43 fragmentos de entre 250 y 2000 pb. Los cebadores que mostraron mayor porcentaje de polimorfismo fueron UBC-808 con 42.6%, seguido de UBC-836 con 34.7% y UBC-840 con 28.7%. Por otro lado, los cebadores que mostraron menos del 15% de polimorfismo fueron UBC-825, T06 y UBC-809. Los cebadores T05 y UBC-812 revelaron la presencia de fragmentos monomórficos.



**Figura 5.** Patrón de electroforesis con marcadores ISSR de diez individuos (1-10) expuestos a radiación gamma respecto a la planta donante (D). **a)** dosis 60 Gy, cebador UBC-812 **b)** dosis 20 Gy, cebador UBC-840). M= marcador de peso molecular y pb= pares de bases.

El dendrograma basado en el modelo neighbor joining no mostró similitud en las dosis de

irradiación evaluadas respecto a la planta donante. De acuerdo a las probabilidades de Bootstrap, las distancias de similitud y la longitud de las ramas, se considera el primer grupo formado por la planta donante; mientras que el segundo grupo comprende las dosis de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 Gy. El segundo grupo se dividió en seis subgrupos, donde se observó al subgrupo seis con la mayor distancia de similitud (0.76), formado por nueve individuos de dosis de 100 Gy. La menor distancia se observó en el primer y segundo subgrupo con una distancia de 0.88 y 0.86, con un individuo de 0 y 20 Gy, respectivamente. Para el resto de los subgrupos, no se observó una tendencia de agrupación respecto a las dosis de radiación gamma evaluadas (Figura 6).



**Figura 6.** Dendrograma de similitud genética basado en el coeficiente de Jaccard incorporándose al modelo de aglomeración neighbor joining. El análisis fue calculado para cada dosis de irradiación gamma con respecto a la planta donante.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Efecto de la irradiación gamma sobre la sobrevivencia y desarrollo *in vitro*

En este estudio se demostró que la irradiación gamma tiene un efecto sobre la sobrevivencia y desarrollo durante la multiplicación *in vitro* de *V. planifolia*. La mortalidad de los explantes a dosis superiores a 60 Gy pudiera explicarse debido a que la radiosensibilidad de los explantes emitida por los rayos gama. La sensibilidad de los explantes a la radiación gamma depende del tipo de tejido, tamaño, grado de desarrollo y contenido de agua (Hernández-Muñoz *et al.*, 2019). La radiación ionizante interactúa con átomos y moléculas para producir radicales libres en las células. Estos radicales pueden dañar la estructura de biomoléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, afectando el metabolismo primario de las plantas (Chahal y Gosal, 2002; Magdy *et al.*, 2020). Además, la irradiación puede afectar procesos bioquímicos como la fotosíntesis, la respiración, ciclo de Krebs y el metabolismo de biomoléculas. De acuerdo a Hasbullah *et al.*, (2012) y Hernández-Muñoz *et al.*, (2019c), la irradiación puede afectar también la división celular, daños en los cromosomas y ADN.

El incremento en el número de brotes por explantes en dosis de 20 y 40 Gy pudiera estar asociado a un efecto hormético. De acuerdo a Calabrese (2018) el efecto hormético se caracteriza por estimular el desarrollo a dosis bajas e inhibición o muerte por dosis altas. De acuerdo a Jalal *et al.* (2021), las especies reactivas de oxígeno (ROS) están asociadas a la hormesis debido a que son moléculas de señalización que desencadenan diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares sobre el desarrollo vegetal. En este estudio, dosis superiores a 60 Gy ocasionaron la muerte de los explantes y una reducción en número de brotes por explante, longitud de los brotes y número de hojas por brote. La reducción de desarrollo y aumento en la tasa de mortalidad en dosis elevadas pudiera estar asociado a una mayor producción y acumulación de ROS, que resulta tóxico para los tejidos vegetales.

En este estudio, la generación de radicales libres ocasionada por los rayos gamma pudo deberse a dos eventos: 1) debido a la radiólisis de agua que se encuentra en los tejidos y/o debido a un estrés oxidativo ocasionado por radiosensibilidad. Al respecto, Oliveira *et al.* (2021) mencionan que la acumulación en exceso de radicales libres que resultan de la radiólisis del agua producen efectos negativos sobre biomoléculas estructurales y funcionales ocasionando alteraciones del metabolismo celular. Mientras que, Liu *et al.* (2021) menciona que altas dosis de radiación gamma puede inducir estrés oxidativo; este estrés genera la formación de ROS que afecta la división celular y conduce a la apoptosis.

Los mecanismos del efecto hormético no están completamente elucidados; sin embargo,

Iavicoli *et al.* (2018) mencionan que la hormesis es una respuesta adaptativa de preparación o acoplamiento a un estrés de mayor magnitud basado en un evento evolutivo. El efecto hormético se ha observado en otros trabajos de mutagénesis *in vitro* con  $^{60}\text{Co}$  en arvejilla (Beyaz *et al.*, 2016), lirio de San Francisco (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017b), verdolaga (Kapare *et al.*, 2017) y más recientemente en arroz (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2020). Estos resultados sugieren que la irradiación gamma con  $^{60}\text{Co}$  podría promover la morfogénesis *in vitro* en explantes en un estado de dormancia en especies recalcitrantes.

## 6.2 Efecto de la radiación gamma sobre la variación somaclonal

Los marcadores ISSR lograron detectar variaciones somaclonales entre los individuos y las diferentes dosis de irradiación gamma evaluadas. Al respecto, Khan *et al.* (2021) mencionan que los marcadores ISSR producen múltiples bandas en un mismo locus, son altamente reproducibles y no necesitan información previa del genoma de la planta. En este estudio, los cebadores UBC-808, UBC-836 y UBC-840 revelaron el mayor porcentaje de polimórficos y pueden ser utilizados para futuros análisis de variación somaclonal o diversidad genética en *V. planifolia*.

De manera general, los individuos irradiados con dosis de 100 Gy mostraron la menor similitud genética; sin embargo, para el resto de las dosis evaluadas no se observó una tendencia de agrupación. En vainilla, otros estudios sobre el análisis de la variación somaclonal utilizando marcadores ISSR han observado que esta especie tiende a ser inestable genéticamente a la regeneración *in vitro* (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2015; Bello-Bello *et al.*, 2018; Pastelín-Solano *et al.*, 2019). Ramírez-Mosqueda *et al.* (2015) reportaron variación somaclonal durante la organogénesis indirecta, con 71.66% de polimorfismo. Bello-Bello *et al.* (2018), encontraron un aumento en el porcentaje de polimorfismo al incrementar las concentraciones de nanopartículas de planta (AgNP) en el medio de cultivo durante el crecimiento de *V. planifolia*, con 25% de polimorfismo en la concentración de 200 mg L<sup>-1</sup> de AgNP. Pastelín-Solano *et al.* (2019) demostró que el número de subcultivos durante la organogénesis directa es un factor importante sobre el aumento en la variación somaclonal, obteniendo porcentajes de polimorfismo mayores a 15% a partir del subcultivo número seis. Por otro lado, otros estudios demuestran la nula variación somaclonal en *V. planifolia* (Sreedhar *et al.*, 2007; Gantait *et al.*, 2009; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019 y Manokari *et al.*, 2021). Sreedhar *et al.* (2007) no observaron variación somaclonal durante el crecimiento a largo plazo utilizando marcadores moleculares RAPD e ISSR. Gantait *et al.* (2009) no observaron variación somaclonal después

de cinco subcultivos durante organogénesis directa utilizando marcadores ISSR. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2019) en plantas variegadas obtenidas durante organogénesis directa en inmersión temporal obtuvieron 0% de polimorfismo mediante ISSR. Recientemente, Manokari *et al.* (2021) mediante la organogénesis directa demostraron 0% de polimorfismo mediante marcadores basados en polimorfismo dirigido al codón de inicio (SCoT).

La variación somaclonal durante el cultivo *in vitro* puede originarse a través de varios aspectos como son: tipo de explante, vía de regeneración, número de subcultivo, duración del cultivo, tipo reguladores de crecimiento, el genotipo y nivel de ploidía (Bairu *et al.*, 2011; Ranghoo-Sanmukhiya *et al.*, 2021). Sin embargo, la variación somaclonal puede ser inducida mediante agentes mutagénicos químicos y físicos. La radiación gamma mediante  $^{60}\text{Co}$  puede generar mutaciones del tipo deleciones e inserciones, traslocaciones y sustituciones de bases (Yang *et al.*, 2019; Holme *et al.*, 2019). De acuerdo Jain (2001), las mutaciones que se producen por la variabilidad somaclonal son muy similares a las producidas espontáneamente o por métodos de mutagénesis.

La variación somaclonal obtenida en explantes no irradiados pudiera explicarse debido a la naturaleza genética de la *V. planifolia*. Al respecto, Nair y Ravindra (1994) y Bory *et al.* (2008) observaron en vainilla asociaciones somáticas y anomalías en el número de cromosomas, siendo menor al reportado  $2n = 32$ . Esto podría explicar que durante la regeneración *in vitro* de vainilla se espere mayor variación somaclonal en comparación con otras especies que no muestran asociación somática ni anomalías en el nivel de ploidia. La variación somaclonal encontrada en los tratamientos irradiados, además de la naturaleza genética de la especie, pudiera estar ocasionada gracias a la alta capacidad de penetración de los rayos gamma y principalmente a las roturas de los enlaces químicos de la doble cadena del ADN, eliminando nucleótidos o sustituyéndolos por nuevos (Oladosu *et al.*, 2016). En este estudio, las mutaciones en el ADN probablemente pueden afectar a genes homeóticos con efectos en la capacidad de regenerar nuevos brotes.

Predieri (2001) y Bairu *et al.* (2011) mencionan que el cultivo *in vitro* incrementa la eficiencia con los tratamientos mutagénicos debido a la manipulación de explantes en constante división celular bajo condiciones controladas sin factores bióticos o abióticos que interfiera en el tratamiento mutagénico. El efecto de la mutagénesis *in vitro* mediante  $^{60}\text{Co}$  para ampliar la variación genética con fines de mejoramiento ha sido estudiada en lirio de San Francisco (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017b), arroz (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2020), jengibre (Sharma *et al.*, 2020), papa (Mohamed *et al.*, 2021), tomate (Özge *et al.*, 2021).

### 6.3 Discusión general

La especie *V. planifolia* tiene una baja variabilidad genética debido al sistema de propagación asexual por esquejes (Villanueva-Viramontes *et al.*, 2017). Este método de propagación comercial limita la diversidad de la especie. En vainilla, la variación somaclonal es una alternativa para ampliar la base genética de esta especie y generar de nuevos alelos (Pastelín-Solano *et al.*, 2019) que puedan enfrentar la depresión endogámica que presenta esta especie. El aumento en la diversidad genética de vainilla es un factor importante que contribuye a la resistencia a factores bióticos y tolerancia a factores abióticos ocasionados por diferentes escenarios de cambio climático para evitar su extinción. La radiación gamma es un método de mutagenesis de gran utilidad para generar variaciones genéticas para el mejoramiento de esta especie.

En este estudio se observó que la radiación gamma tiene un efecto hormético sobre los explantes, promoviendo la formación de nuevos brotes a bajas dosis (20 y 40 Gy) e inhibición de la brotación y muerte a dosis altas (60-100 Gy). Además, se demostró que la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa y las diferentes dosis de irradiación gamma evaluadas con  $^{60}\text{Co}$  tiene efecto sobre la variación somaclonal. El análisis de agrupamiento NJ y distancia genética de Jaccard mostró que el tratamiento sin irradiación y los tratamientos con irradiación presentan divergencia genética respecto a la planta donante. Los marcadores ISSR mostraron ser eficientes para detectar variación somaclonal. Estos resultados fundamentan la posibilidad de utilizar rayos gamma durante el cultivo *in vitro* para ampliar la diversidad genética y emprender un programa de mejoramiento en vainilla.

## 7. CONCLUSIONES

Se observó un efecto hormético sobre los explantes *in vitro* de vainilla, caracterizado por promover el desarrollo a bajas dosis (20 y 40 Gy) e inhibición y muerte altas dosis (60-100 Gy).

El polimorfismo obtenido mediante los marcadores ISSR demostró la existencia de variación somaclonal en el tratamiento sin irradiar y los tratamientos irradiados.

El análisis de conglomerados neighbor joining y el coeficiente de similitud de Jaccard mostró que el tratamiento sin irradiación y los tratamientos con irradiación presentan variación somaclonal respecto a la planta donante.

En este estudio se demostró que la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa y las diferentes dosis de irradiación gamma evaluadas con  $^{60}\text{Co}$  tuvieron efecto sobre la variación somaclonal. Los marcadores ISSR mostraron ser eficientes para detectar variación somaclonal. Estos resultados abren la posibilidad de utilizar rayos gamma para ampliar la diversidad genética y emprender un programa de mejoramiento en vainilla.

## 8. REFERENCIAS

Ahumada-Flores, S., Gómez P., L. R., Parra C., F. I., de la Cruz T., E., Sarsu, F., and de los Santos V., S. (2020). Technical note: Gamma irradiation induces changes of phenotypic and agronomic traits in wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). *Applied Radiation and Isotopes*, 109490. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109490>

Álvarez, M. E., Nota, F., and Cambiagno D. A. (2010). Epigenetic control of plant immunity. *Molecular Plant Pathology* 11:563–576. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00621.x>

Abdelnour-Esquivel, A., Pérez, J., Rojas, M., Vargas, W., Gatica-Arias, A. (2020). Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 56, 88–97. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10015-5>

Arya, S. S., Rookes, J. E., Cahill, D. M., and Lenka, S. K. (2021). Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *Advances in Traditional Medicine*, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00531-w>

Arumugam, G., Sinniah, U. R., Swamy, M. K., and Lynch, P. T. (2020). Micropropagation and essential oil characterization of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Sprengel, an aromatic medicinal plant. *In vitro Celular y Developmental Biology- Plant*, 56: 491-503. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10056-1>

Bairu, M. W., Aremu, A. O., and Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147-173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>

Bory, S., Catrice, O., Brown, S., Leitch, I. J., Gigant, R., Chiroleu, F., Grisoni, M., Duval, M. F., and Besse, P. (2008b). Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Genome*, 51(10), 816-826. <https://doi.org/10.1139/G08-068>

Bermúdez-Caraballoso, I., Cruz-Martín, M. y Concepción-Hernández, M. (2020). Biotechnological Tools for the Development of Foc TR4-Resistant or -Tolerant *Musa* spp.

Cultivars. In: Chong P., Newman D., Steinmacher D. (eds) Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-51358-0\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51358-0_20)

Bairu, M. W., Fennell, C.W., and Van Staden, J. (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae*, 108 (4): 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.039>

Bory, S., Grisoni, M., Duval, M. F., and Besse, P. (2008a). Biodiversity and preservation of *vanilla*: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 551–571 <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9260-3>

Borbolla P., V., Iglesias A., L. G., Escalante M., E. A., Martínez C., J., Ortiz G., M. M., and Aguilar, P. O. (2016). Molecular and microclimatic characterization of two plantations of *Vanilla planifolia* (Jacks ex Andrews) with divergent backgrounds of premature fruit abortion. *Scientia Horticulturae*, 212: 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.002>

Barrera-Rodríguez, A. I., Jaramillo-Villanueva, J. L., Escobedo-Garrido, J. S. y Herrera-Cabrera, B. E. (2011). Rentabilidad y competitividad de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* J.) en la región del Totonacapan, México. *Agrociencia*, 45(5): 625-638.

Beyaz, R., Kahramanogullari, C. T., Yildiz, C., Darcin, E. S., and Yildiz, M. (2016). The effect of gamma radiation on seed germination and seedling growth of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. under *in vitro* conditions. *Journal of Environmental Radioactivity*, 162, 129-133. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.05.006>

Bello-Bello, J. J., Spinoso-Castillo, J. L., Arano-Avalos, S., Martínez-Estrada, E., Arellano-García, M. E., Pestryakov, A., Toledano-Magaña Y., García-Ramos, J. C., and Bogdanchikova, N. (2018). Cytotoxic, genotoxic, and polymorphism effects on *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews after long-term exposure to Argovit® silver nanoparticles. *Nanomaterials*, 8(10), 754. <https://doi.org/10.3390/nano8100754>

Bhat, S., Sharma, S., and Sharma, V. K. (2017). Effect of *In vitro* Mutagenesis on *In Vivo* Growth Characteristics of Strawberry cv. Camarosa. *International Journal of Current*

*Microbiology and Applied Sciences*, 6(8): 3406-3417.  
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.408>

Bednarek, P.T., and Orłowska, R. (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140, 245-257.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01724-1>

Calabrese, E. J. (2018). Hormesis: path and progression to significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (10), 2871. <https://doi.org/10.3390/ijms19102871>

Castillo-González, R. y González-Chávez, M.C.A. (2018). Relación capacidad-intensidad de potasio en suelos no fertilizados cultivados con vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agroproductividad*, 11(3): 37-44.

Chahal, G. S., Gosal, S. S. (2002). Principles and Procedures of Plant Breeding. Alpha Science International Ltd., pp. 399–412.

Cardoso, J. C., Sheng, Gerald., L. T., and Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1815. Humana Press, New York, NY.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2)

Cao, Z., Sui, S., Cai, X., Yang, Q., and Deng, Z. (2016). Somaclonal variation in ‘Red Flash’ caladium: morphological, cytological and molecular characterization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126: 269-279. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0996-3>

Collins, N. C., Tardieu, F., and Tuberosa, R. (2008). Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: ¿where do we stand? *Plant Physiology*, 147(2): 469–486.  
<https://doi.org/10.1104/pp.108.118117>

Duncan, R. R. (1997). Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Advances in Agronomy*, 58:201–240. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60256-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60256-4)

D’Amato, F., and Bayliss M. W. (1985). Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their

regenerants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 3:73–112.  
<https://doi.org/10.1080/07352688509382204>

Divakaran, M., Babu, K. N., Ravindran, P. N., and 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.02.018>

Díaz-Bautista, M., Herrera-Cabrera, B. E., Castillo-González, F., Soto-Hernández, R. M., Delgado-Alvarado, A. y Zavaleta-Mancera, H. A. (2018). Caracterización de agroecosistemas con *Vanilla* spp., [orchidaceae] en el Totonacapan, México. *Agroproductividad*, 11(3): 64-69.

Dar, A. A., Mahajan, R., and Sharma, S. (2019). Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 89(11): 1755-63.

de Vicente, M., and Fulton, T. (2004). Módulos de aprendizaje sobre marcadores moleculares: Vol. 1 y 2.

Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., and García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1–18.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Producción de vainilla.  
<http://www.fao.org/search/en/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=producci%C3%B3n+de+vainilla&cof=FORID%3A9> Acceso junio 2021

Flanagan, N. S., Ospina-Calderón, N. H., García A., L. T., Mendoza, M., and Mateus, H. A. (2018). A new species of *Vanilla* (Orchidaceae) from the North West Amazon in Colombia. *Phytotaxa*, 364 (3): 250-258. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.364.3.4>

Ghori, N. H., Ghori, T., Imadi, S. R., and 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](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0025-1_20)

Ghorbanpour, M., and Khadivi-Khub, A. (2015). Somaclonal variation in callus samples of *Plantago major* using inter-simple sequence repeat marker. *Caryologia*, 68(1), 19-24.

<https://doi.org/10.1080/00087114.2014.998128>

Gantait, S., and Kundu, S. (2017). *In vitro* biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 196.

<https://doi.org/10.1007/s11738-017-2462-1>

Garrido-Cárdenas, J. A., Mesa-Valle, C., and Manzano-Agugliaro, F. (2017). Trends in plant research using molecular markers. *Planta*, 247: 543–557. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2829-y>

Ghani, M., Sharma, S. K. (2019). Induction of powdery mildew resistance in gerbera (*Gerbera jamesonii*) through gamma irradiation. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, 159–

166. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0613-5>

Gottschalk, W., and Wolff G. (2012). *Induced mutations in plant breeding*, vol 7. Springer Science & Business Media. Berlin.

Halim, R., Akyol, B., and Gürel, A. (2019). *In vitro* regeneration of *Vanilla (Vanilla planifolia L.)*. *Journal of Applied Biological Sciences*, 11(1), 05-10.

Hernández-Martínez, J. L., Carranza-Álvarez, C., Maldonado-Miranda, J. J. Martínez-Soto, D. (2020). Isolation of *Fusarium* from vanilla plants grown in the Huasteca Potosina México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2004-4>

Hernández-Ruiz, J., Delgado-Alvarado, A., Salazar-Rojas, V. M. and Herrera-Cabrera, B. E. (2020). Morphological variation of the labellum of *Vanilla planifolia* Andrews (Orchidaceae) in Oaxaca, México. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias UNCuyo*, 52(2): 160-175.

Holme, I. B., Gregersen, P. L., and Brinch-Pedersen, H. (2019). *Induced Genetic Variation in*

Crop Plants by Random or Targeted Mutagenesis: Convergence and Differences. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01468>

Hammer, R., Harper D., A. T., Ryan, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*, 4:1–9.

Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López, P. A., De La Cruz-Torres, E., Fernández-Pavía, S.P., Martínez-Palacios, A. y Martínez-Trujillo, M. (2017a). Determinación de la DL50 y GR50 con rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) en protocormos de *Laelia autumnalis in vitro*. *Agrociencia*, 51: 507-524.

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. (2017b). Estimulación de la germinación y desarrollo *in vitro* de *Laelia autumnalis* con rayos gamma. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(3). <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.3.271-283>

Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López PA, Gómez-Sanabria, J. M., Morales-García, J. L. (2019c). Mutagenesis in the improvement of ornamental plants. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 25(3) 151-167. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2018.12.022>

Hase, Y., Satoh, K., Seito, H., and Oono, Y. (2020). Genetic Consequences of Acute/Chronic Gamma and Carbon Ion Irradiation of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00336>

Hasbullah, N. A., Taha, R. M., Saleh, A., and Mahmud, N. (2012). Irradiation effect on *in vitro* organogenesis, callus growth and plantlet development of *Gerbera jamesonii*. *Horticultura Brasileira*, 30: 252-257. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000200012>

Hu, Y., Resende M., F. R., Bombarely, A., Brym, M. Bassil, E., and Chambers, A. H. (2019). Genomics-based diversity analysis of *Vanilla* species using a *Vanilla planifolia* draft genome and Genotyping-By-Sequencing. *Scientific Reports*, 9(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40144-1>

Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras,

C., and Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Región, México. *Eur. J. Environ. Sci*, 2(1):43-50.

Hoffman, P. G. y Zapf, C. M. (2012). Review of vanilla. *Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*, 75: 2272–2273. <https://doi.org/10.1021/np3008045>

Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., and Calabrese, E. J. (2018). Nanoparticle exposure and hormetic dose–responses: An update. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 805. <https://doi.org/10.3390/ijms19030805>

IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual) (2010). Declaratoria General de la Denominación de Origen Vainilla Papantla. Acceso junio 2021 en [https://www.wipo.int/edocs/mdocs/geoind/es/wipo\\_geo\\_lim\\_11/wipo\\_geo\\_lim\\_11\\_6.pdf](https://www.wipo.int/edocs/mdocs/geoind/es/wipo_geo_lim_11/wipo_geo_lim_11_6.pdf)

Jain, S. M. (2001). Variación derivada del cultivo de tejidos en la mejora de cultivos. *Euphytica*, 118: 153–166. <https://doi.org/10.1023/A:1004124519479>

Jha, P., and Kumar, V. (2018). BABY BOOM (BBM): a candidate transcription factor gene in plant biotechnology. *Biotechnology Letters*, 40, 1467-1475. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2613-5>

Jiang G. L. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. En: Andersen, S. B. editor. *Fitomejoramiento de laboratorios a campos*. Rijeka: InTech, pags. 45 - 83.

Jain, S. M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118: 153-166. <https://doi.org/10.1023/A:1004124519479>

Jain S. M., Brar, D. S., and Ahloowalia, B. S. (eds). (2013). *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*, vol 32. Springer, Dordrecht.

Jalal, A., Oliveira J., J. C., Ribeiro, J. S., Fernandes, G. C., Mariano, G. G., Trindade V., D. R., Reis, A. R. (2021). Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207: 111225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111225>

Karihaloo, J. L. (2015). DNA Fingerprinting Techniques for Plant Identification. Bir Bahadur B., Venkat, R. M., Sahijram L., Krishnamurthy K. (eds.), Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology, © Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_9)

Kaminska, M., Tretyn, A., and Trejgell, A. (2020). Genetic stability of *Traxacum pieninicum* plantlets after long-term slow growth storage using ISSR and SCoT markers. *Biologia*, 75, 599–604. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00377-x>

Kapere, V., Satdive, R., Fulzele, D. P., and Malpathak, N. (2017). Impact of Gamma Irradiation Induced Variation in Cell Growth and Phytoecdysteroid Production in *Sesuvium portulacastrum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36: 919-930. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9697-3>

Kashtwari, M., Wani, A. A., Dhar, M. K., and Kamili, A. N. (2018). Development of an efficient *in vitro* mutagenesis protocol for genetic improvement of saffron (*Crocus sativus* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24: 951–962. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0576-6>

Kitano, S., Miyagi, A., Oono, Y., Hase, Y., Narumi, I., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2015). Metabolic alterations in leaves of oxalate-rich plant *Rumex obtusifolius* L. irradiated by gamma rays. *Metabolomics*, 11:134–142. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0684-4>

Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., and Kishan S., R. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6:54. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>

Kim, D. H., Gopal, J., and Sivanesan I. (2017). Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC Advances*, 7: 36492-360505. <https://doi.org/10.1039/C7RA07025J>

Kritskaya, T. A., Kashin, A. S., and Kasatkin, M. Y. (2019). Micropropagation and Somaclonal Variation of *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) *in vitro*. *Russian Journal of Developmental Biology*.

50 (4): 209-215. <https://doi.org/10.1134/S1062360419040040>

Khan, M. M. H., Rafii, M. Y., Ramlee, S. I., Jusoh, M., Mamun, AI, and Hualidu, J. (2021). DNA fingerprinting, fixation-index (Fst), and admixture mapping of selected Bambara groundnut (*Vigna subterranea* [L.] Verdc.) accessions using ISSR markers system. *Scientific Reports* **11**, 14527. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93867-5>

Kumar, P., Sharma, V., Yadav, P., and Singh, B. (2017). Gamma Ray Irradiation for Crop Protection Against Salt Stress. *Defence Life Science Journal*, 2(3): 292-300. <https://doi.org/10.14429/dlsj.2.11670>

Lubinsky, P., Bory, J. S., Hernández, H. S., Kim, C., and Gómez, P. G. (2008). Origins and dispersal of cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62(2):127-138. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>

Li, J., Demesyieux, L., Brym, M., Chambers, A. H. (2020). Development of species-specific molecular markers in Vanilla for seedling selection of hybrids. *Molecular Biology Reports*, 47(3), 1905-1920. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05287-9>

Li, R., Fan, L., Lin, J., Li, M., Liu, D., and Sui, S. (2019a). *In vitro* Mutagenesis followed by Polymorphism Detection Using Start Codon Targeted Markers to Engineer Brown Spot Resistance in Kalanchoe. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 144(3): 193-200. <https://doi.org/10.21273/JASHS04571-18>

Liu, H., Li, H., Yang, G., Yuan, G., Ma, Y., Zhang, T. (2021). Mechanism of early germination inhibition of fresh walnuts (*Juglans regia*) with gamma radiation uncovered by transcriptomic profiling of embryos during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 172, 111380. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111380>

Laskar, R. A., Laskar, A. A., Raina, A., Khan S, and Younus, H. (2018). Induced mutation analysis with biochemical and molecular characterization of high yielding lentil mutant lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109:167–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.067>

Loyola-Vargas, V. M., and Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Prospects. En: Loyola-Vargas, V.M. y Ochoa-Alejo, N. (eds) *Protocolos de cultivo de células vegetales*. Springer, Nueva York, NY, pp 3-13. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)

Luis-Rojas, S., Ramírez-Valverde, B., Díaz-Bautista, M., Pizano-Calderón, J. y Rodríguez-López, C. (2020). La producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) en México: análisis y pronóstico. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(1), 175-187.

Larkin, P. J. y Scowcroft W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197–214. <https://doi.org/10.1007/BF02342540>

Li, F., Shimizu, A., Nishio, T., Tsutsumi, N., and Kato, H. (2019b). Comparison and Characterization of Mutations Induced by Gamma-Ray and Carbon-Ion Irradiation in Rice (*Oryza sativa* L.) Using Whole-Genome Resequencing. *G3 Genes Genomes Genetics*, 9. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400555>

Liberatore, C. M., Rodolfi, M., Beghé, D., Fabbri, A., Ganino, T., and Chiancone, B. (2020). *In vitro* leaf-derived organogenesis and somaclonal variant detection in *Humulus lupulus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56 (6), 865-874. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10088-7>

Liu, W., Yuan, J. S., and Stewart Jr., C. N. (2013). Advanced genetic tools for plant biotechnology. *Nature Reviews Genetics*, 14 (11):781-93.

Muller, H. J. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66: 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.66.1699.84>

Mba, C., Afza, R., Shu, Q.Y. (2012). Mutagenic radiations: X-rays, ionizing particles and ultraviolet. Plant mutation breeding and biotechnology Eds. Shu, Q. Y., Forster, B. P. y Nakagawa H. (Wallingford: CABI), 83–90. <https://doi.org/10.1079 / 9781780640853.0083>

Martínez-Estrada, E., Caamal-Velázquez, J. H., Salinas-Ruiz, J., and Bello-Bello, J. J. (2017).

Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53: 553-560. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9852-3>

Mançano, A. P., de Oliveira, S. B., de Oliveira, G. R., Atalla, M. E., and Gagliardi, R. F. (2019). Genetic stability among *in vitro* eggplant clones induced by different plant growth regulators. *Biotecnología Vegetal*, 19:75–83.

Magdy, A. M., Fahmy, E. M., Abd EL-Rahman, M. A. A., and Awad, G. (2020). Improvement of 6-gingerol production in ginger rhizomes (*Zingiber officinale* Roscoe) plants by mutation breeding using gamma irradiation. *Applied Radiation and Isotopes*, 162, 109193. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109193>

Morita, R., Kusaba, M., Iida, S., Yamaguchi, H., Nishio, T., and Nishimura, M. (2009). Molecular characterization of mutations induced by gamma irradiation in rice. *Genes & Genetic Systems*, 84: 361–370. <https://doi.org/10.1266/ggs.84.361>

Marin-Montes, I. M., Lobato-Ortiz, R., Carrillo-Castañeda, G., Rodríguez-Pérez, J. E., García-Zavala, J. J. y Velasco-García, A. M. (2019). Riqueza alélica de poblaciones nativas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) para el mejoramiento genético. *Agrociencia*, 53:355-370.

Moose, S. P., and Mumm R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, 147: 969-977. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118232>

Menon S., and Nayeem N. (2013). *Vanilla planifolia*: a review of a plant commonly used as flavouring agent. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 20: 225–228.

Mohamed, E. A., Osama, E., Manal, E., Samah, A., Salah, G., Hazem, K. M., and Nabil, E. (2021). Impact of gamma irradiation pretreatment on biochemical and molecular responses of potato growing under salt stress. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00233-8>

Muñoz-Miranda, L. A., Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo Hernández, G. J., Cruz-Martínez, V. O., Torres-Morán, M. I., Lépiz-Ildefonso, R., Aarland, R. C., Castellanos-Hernández, O. A. (2019). Evaluation of somaclonal and ethyl methane sulfonate-induced genetic variation of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK). *Agronomy*, 9(4), 166. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040166>

Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Dogan, Y., Comertpay, G., Yildiz, M., Hatipoglu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Ozkan, H., Chung, G., and Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>

Nair, R. R., and Ravindran, P. N. (1994). Somatic association of chromosomes and other mitotic abnormalities in *Vanilla planifolia* (Andrews). *Caryologia*, 47(1), 65-73. <https://doi.org/10.1080/00087114.1994.10797284>

OIEA. Organismo Internacional de Energía Atómica (2021) Inducción de mutaciones. <https://www.iaea.org/es/temas/inducccion-de-mutaciones> Acceso junio 2021

Özge, Ç., Alp, A., Sinan, M., and Çimen, A. (2021). Comparison of tolerance related proteomic profiles of two drought tolerant tomato mutants improved by gamma radiation. *Journal of Biotechnology*, 330: 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.02.012>

Oliveira, N. M., de Medeiros, A. D., de Lima Nogueira, M., Arthur, V., de Araújo Mastrangelo, T., and da Silva, C. B. (2021). Hormetic effects of low-dose gamma rays in soybean seeds and seedlings: A detection technique using optical sensors. *Computers and Electronics in Agriculture*, 187:106251. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2021.106251>

Ortega M., L. C., Iglesias-Andreu., L. G., Beltrán H., J. D. y Ramírez-Mosqueda M. A. (2016). Aislamiento y fusión de protoplastos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews y *Vanilla*

*pompona* Schiede. *Revista de la Asociación Colombina de Ciencias Biológicas*, 28:16-24.

Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., Miah, G., and Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 1-16. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>

PROMÉXICO (2017). Panorama actual de la Industria Biotecnológica en México. Unidad de inteligencia de negocios. Recuperado el 23 de mayo del 2020 de <http://www.ethic.com.mx/docs/estudios/Panorama-Biotecnologia-Mexico.pdf>

Pathirana, R. (2011). Plant mutation breeding in agriculture. *Plant Sciences Reviews*, 6(032):107–126. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20116032>

Predieri, S. (2001). Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 64:185–210. <https://doi.org/10.1023/A:1010623203554>

Pardo, A., Hernández, A., Méndez, N. y Alvarado, G. (2015). Análisis genético, mediante marcadores RAPD, de microbulbos de ajo conservados e irradiados *in vitro*. *Bioagro*, 27(3): 143-150.

Pastelín-Solano., M. C., Salinas R., J., González A., M. T., Castañeda C., O., Galindo T. M. E., Bello B., 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. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00645-9>

Peng, X., Zhang, T. T., and Zhang, J. (2015). Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(1):67–77. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0750-2>

Ranghoo-Sanmukhiya, V. M. (2021). Somaclonal Variation and Methods Used for its Detection. In: Siddique, I. (eds). *Propagation and Genetic Manipulation of Plants*. Springer

Nature, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7736-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7736-9_1)

Rocha-Flores, R. G., Herrera-Cabrera, B. E., Velasco-Velasco, J., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A. y Mendoza-Castillo, M. C. (2018). Determinación preliminar de componentes de rendimiento para el cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) en la región Totonacapan, México. *Agroproductividad*, 11(3): 9-14.

Ramírez-Mosqueda, M. A. e Iglesias-Andreu, L. G. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123: 657-664. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0868-2>

Ramírez-Mosqueda, M. A. e Iglesias Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT<sup>®</sup>, BIG, and RITA<sup>®</sup>) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 52: 154-160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>

Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Favián-Vega, E., Telxeira da Silva, J. A., Leyva-Ovalle, O. R., and Murguía-González, J. (2019). Morphogenetic stability of variegated *Vanilla planifolia* Jacks. plants micropropagated in a temporary immersion system (TIB<sup>®</sup>). *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 30:603-609. <https://doi.org/10.1007/s12210-019-00813-9>

Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ortiz-García, M., Andueza-Noh, R. H., Octavio-Aguilar, P., and Luna-Rodríguez, M. (2016). 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 Resources*, 15(4):310-320. <https://doi.org/10.1017/S1479262115000660>

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2010) Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) de Protección especial de especies nativas de México de Flora y Fauna silvestres. Diario Oficial de la Federación, marzo 6, pp 2–56.

Sales, E. K., and Butardo, N. G. (2014). Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8: 63–610.

<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4897.4564>

Soto A., M. A., and Cribb, P. J. (2010). A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex Mill. (Orchidaceae, Vanillinae). *Lankesteriana*, 9(3): 355-398.

Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., and Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129:195-207. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>

Spinoso-Castillo, J. L., Escamilla-Prado, E., Aguilar-Rincón, C. H., Morales-Ramos, V., García-de los Santos, G., Corona-Torres, T. (2021). Physiological response of seeds of three coffee varieties to gamma rays ( $^{60}\text{Co}$ ). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 27(2), 55-00. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2020.07.019>

Soliman, H. I. A., Metwali E., M. R., and Almaghrabi O., A. H. (2014). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Betroni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Plant Biotechnology*, 31 (3): 249-256. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0707a>

Suprasanna, P., Mirajkar, S. J., and Bhagwat, S. G. (2015). Induced mutations and crop improvement. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. (eds). *Plant biology and biotechnology*. Springer, New Delhi, pp 593–617. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6\\_23](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_23)

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Shelake, R. M., Pramanik, D., and Kim, J. (2019). Evolution of plant mutagenesis tools: a shifting paradigm from random to targeted genome editing. *Plant Biotechnology Reports*, 13:423–445 <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00562-z>

Sahijram, L., Soneji, J., and Bollamma, K. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(6), 551-556. <https://doi.org/10.1079/IVP2003467>

Saravanan, S., Sarvesan, R. y Vinod, M. S. (2011). Identification of DNA elements involved in somaclonal variants of *Rauwolfia serpentina* (L.) arising from indirect organogenesis as evaluated by ISSR analysis. *Indian Journal of Science and Technology*, 4: 1241-1245.

Santillán-Fernández, A., Trejo C., M., Martínez S., A., Martínez A., L., Vásquez B., N. y Mejía, L. S. (2019). Potencial productivo de *Vanilla planifolia* Jacks en el Totonacapan, México, mediante técnicas geográficas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10 (4). <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1661>

Salava, H., Thula, S., Mohan, V., Kumar, R., and Maghuly, F. (2021). Application of Genome Editing in Tomato Breeding: Mechanisms, Advances, and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 682. <https://doi.org/10.3390/ijms22020682>

Sharma, V., Thakur, M., and Tomar, M. (2020). *In vitro* selection of gamma irradiated shoots of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) against *Fusarium oxysporum* f.sp. zingiberi and molecular analysis of the resistant plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143: 319–330. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01919-x>

Stewart C. N., Via L. E. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14(5):748–750.

Sreedhar R. V., Venkatachalam L., and Bhagyalakshmi N. (2007). Genetic fidelity of long-term micropropagated shoot cultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) as assessed by molecular markers. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(8):1007–1013. <https://doi.org/10.1002/biot.200600229>

Sun, S., Zhong, J., Li, S., and Wang, X. (2013). Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (*Torenia fournieri* Lind.). *Botanical Studies*, 54, 36. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-36>

Torres-González, M. J., Aguirre-Medina, J. F. y Iracheta-Donjuan, L. (2011). Germinación de semillas y obtención de plántulas de *Vanilla planifolia* Andrews en condiciones *in vitro*. *Agroproductividad*, 4:3–8.

UICN (2021) *Vanilla planifolia* (versión modificada de la evaluación de 2017). La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2020: e.T103090930A172970359. <https://www.iucnredlist.org> Acceso junio 2021.

Vázquez, A. M. (2001). Somaclonal variation analysis. *Plant Biosystems -An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 135: 57–62. <https://doi.org/10.1080/11263500112331350650>

Viehmánova, I., Bortlova, Z., Vitamvas, J., Cepkova P. H., Eliasova, K., Svobodova, E., and Travnickova, M. (2014). Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17:102–106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.011>

Villanueva-Viramontes, S., Hernández-Apolinar, M., Fernández-Concha, G. C., Dorantes-Euán, A., Dzib, G. R., and Martínez-Castillo, J. (2017). Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic analyses with ISSR and ITS. *Botanical Sciences*, 95 (2): 169-187. <https://doi.org/10.17129/botsci.668>

Ulvrova, T., Vitamvas, J., Cepkova, P. H., Eliasova, K., Janovska, D., Bazant, V., and Viehmánova (2021). Micropropagation of an ornamental shrub *Disanthus cercidifolius* Maxim. and assessment of genetic fidelity of regenerants using ISSR and flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144, 555–566 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01978-0>

Vitamvas, J., Viehmánova, I., Cepkova, P. H., Mrhalova, H., and Eliasova, K. (2019). Assessment of somaclonal variation in indirect morphogenesis-derived plants of *Arracacia xanthorrhiza*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 54. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00301>

Waugh, R., Leader, D. J., Mc Callum, N., and Cadwell D. (2006). Harvesting the potential of induced biological diversity. *Trends in Plant Science*, 11:71–79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.007>

Wan, Abdullah WMAN, Low, L., Mumaiyizah, S. B., Chai, Q. Y., Loh, J. Y., Ong-Abdullah, J., and Lai, K. S. (2020). Effect of lignosulphonates on *Vanilla planifolia* shoot multiplication, regeneration and metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42. 107. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03099-9>

Yang, G., Luo, W., Zhang, J., Yan, X., Du, Y., Zhou, L., Li, W., Wand, H., Chen, and Guo, T. (2019). Genome-wide comparisons of mutations induced by carbon-ion beam and gamma-rays irradiation in rice via resequencing multiple mutants. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1514. | <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01514>

Yang, W. R., Zhang, Q. X., Pan, H. T. y Sun, M. (2010). *In vitro* regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques. *Propagation of Ornamental Plants*, 10(2): 59-66.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)- Anchores Polimerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20(2): 176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>