



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**INFLUENCIA DEL SISTEMA DE MANEJO Y  
CONDICIÓN AMBIENTAL EN LA CALIDAD  
FÍSICA Y PERFIL DE METABOLITOS  
SECUNDARIOS EN FRUTOS DE *Vanilla*  
*planifolia***

**GUADALUPE ANDRADE ANDRADE**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA

2022

La presente tesis, titulada: **Influencia del sistema de manejo y condición ambiental en la calidad física y perfil de metabolitos secundarios en frutos de *Vanilla planifolia***, realizada por la alumna: **Guadalupe Andrade Andrade**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:

  
DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:

  
DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

ASESOR:

  
DR. ANGEL BUSTAMANTE GONZÁLEZ

ASESOR:

  
DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

Puebla, Puebla, México, 25 de febrero del 2022

# INFLUENCIA DEL SISTEMA DE MANEJO Y CONDICIÓN AMBIENTAL EN LA CALIDAD FÍSICA Y PERFIL DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN FRUTOS DE *Vanilla planifolia*

Guadalupe Andrade Andrade, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2022

## Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia del sistema de manejo y condición ambiental en las características físicas y perfil de metabolitos secundarios en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* con diferente madurez fisiológica. Se seleccionaron tres sistemas de cultivo en la región Totonacapan: dos en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) y uno en acahual (20 Soles). Los resultados indicaron que los tres sistemas fueron diferentes en función de las prácticas de manejo realizadas y el rendimiento de fruto, la presencia de enfermedades fue determinante en el rendimiento de fruto. La humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa (RFA) fueron los parámetros de clima con influencia mayor en el rendimiento. Los resultados del perfil de metabolitos indicaron que los frutos más maduros y los cultivados en el sistema de acahual tuvieron la acumulación mayor de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa). Los sistemas en 20 Soles y Solteros de Juan Rosas tuvieron la concentración más alta de clorofilas como resultado de una exposición mayor a la RFA, y tendieron a disminuir con la madurez. La concentración mayor de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales se encontraron en 20 Soles y Solteros de Juan Rosas al actuar como foto-protectores debido a una condición de estrés lumínico mayor. También mostraron la tendencia de incrementar en frutos verdes más maduros, pero disminuyeron en frutos beneficiados. Sin embargo, en el perfil de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides, los sistemas en malla sombra tuvieron semejanza mayor. La temperatura y RFA fueron los parámetros de clima que más influyeron en la acumulación de metabolitos secundarios. La evaluación de metabolitos aromáticos indicó la presencia de vainillina libre en frutos verdes y el incremento de glucovainillina en frutos más maduros. Los frutos cultivados en malla sombra (en tutor vivo e inerte) tuvieron semejanza mayor en su perfil aromático, mientras que los frutos del sistema en acahual presentaron una calidad aromática mayor. Los frutos beneficiados tuvieron una capacidad antioxidante mayor a los frutos verdes. Las colectas del sistema acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) tuvieron la capacidad antioxidante mayor de acuerdo con las pruebas DPPH y ORAC.

**Palabras clave:** madurez fisiológica, metabolitos secundarios, parámetros de clima, sistemas de manejo, *Vanilla planifolia*.

**INFLUENCE OF MANAGEMENT SYSTEM AND ENVIRONMENTAL CONDITION  
ON PHYSICAL QUALITY AND SECONDARY METABOLITES PROFILE IN FRUITS  
OF *Vanilla planifolia***

**Guadalupe Andrade Andrade, D.C.**

**Colegio de Postgraduados, 2022**

**Abstract**

The objective of this research was to evaluate the influence of the management system and environmental condition on physical characteristics and secondary metabolites profile in green and cured pods of *Vanilla planifolia* with different physiological ripeness. Three cultivation systems were selected in the Totonacapan region: two in shade mesh (Barriles and Solteros de Juan Rosas; SJR) and one in acahual (20 Soles). The data indicated that the three systems were different depending on management practices carried out and fruit yield, the presence of diseases was decisive in fruit yield. Relative humidity and photosynthetically active radiation (PAR) were the main climate parameters with the greatest influence on yield. The results on the metabolite profile indicated that the most mature fruits and those grown in the acahual system had the highest accumulation of sugars (glucose, fructose and sucrose). The systems at 20 Soles and SJR had the highest chlorophylls concentration because of greater exposure to PAR, and they tended to decrease with ripeness. The highest concentration of phenolic compounds, flavonoids and total terpenoids were found in 20 Soles and SJR, as they act as photoprotectors due to a condition of greater light stress. They also showed a tendency to increase in more mature green pods, which decreased in cured pods. However, in the profile of phenolic acids, flavonoids and terpenoids, the shade mesh systems had greater similarity. Temperature and PAR were the climate parameters with the greatest influence on secondary metabolites accumulation. The evaluation of aromatic metabolites indicated the presence of free vanillin in green pods and the increase of glucovanillin in more mature pods. The pods grown in shade mesh (in living and inert tutors) had the greater similarity in their aromatic profile, while the pods of the acahual system presented the best aromatic quality. The cured pods had a higher antioxidant capacity than the green pods. The accessions from acahual system (20 Soles) and shade mesh with living tutors (SJR) had the highest antioxidant capacity according to DPPH and ORAC test.

**Key words:** physiological ripeness, secondary metabolites, climate parameters, management systems, *Vanilla planifolia*.

## **DEDICATORIA**

Agradezco a mis padres por enseñarme siempre el camino correcto y la importancia del trabajo duro. Gracias por su apoyo incondicional y por ser mi más grande fortaleza, mi inspiración y más grande motivo para continuar. Los amo.

A mi hermana Rosy: A ti te debo gran parte de quien soy, eres una segunda madre para mí y te amo como tal. Gracias por ser mi apoyo, por animarme y ser un gran ejemplo de superación y fortaleza.

A mi hermana Paty: Tú eres mi mejor amiga, en quien más confío. Gracias por tu apoyo incondicional.

A Rodolfo: Eres una luz en mi camino. Tu cariño, comprensión y apoyo han sido fundamentales para llegar al final de este proyecto. Gracias por tu alegría y por compartir conmigo la maravillosa persona que eres.

A Jade: Por ser mi compañera durante todo este proceso y alegrar mis días con tu ternura.

## AGRADECIMIENTOS

A los productores de la Región Totonacapan con quienes tuve el gran honor de trabajar: M.V.Z. César Arellano Valencia y esposa M.C. Ma. de Lourdes García de Castro, Ing. Raúl Degetau, Ing. Juan Pérez Atzin, Dr. Pedro Maya, Don Lucas, Don Cuco y a todos los trabajadores de los vainillales. Gracias por la amabilidad, la calidez en cada visita y por permitirnos entrar a sus hogares. Su confianza es invaluable, y su trabajo y amor mantienen viva la magia que rodea a la vainilla.

Al Colegio de Postgraduados *Campus Puebla*, por ser mi hogar durante todos estos años y darme la gran oportunidad de aprender, crecer como persona y conocer a tantas personas maravillosas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me permitieron continuar con mi crecimiento personal y profesional.

A los miembros de mi Consejo Particular: Dra. Adriana Delgado Alvarado, Dr. Edgar Herrera Cabrera, Dr. Ángel Bustamante González, Dr. Marco Soto Hernández y Dra. Cecilia Guízar González. Gracias por permitirme aprender de tan grandes personas e investigadores.

A la M.C. Cecilia García Osorio de laboratorio de Fruticultura, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad. Gracias por su apoyo personal y profesional. Gracias por sus consejos, su amistad y tener la oportunidad de aprender de una gran persona como lo es usted.

Al M.C. Rubén San Miguel Chávez del laboratorio de Fitoquímica, Postgrado en Botánica. Gracias por apoyo en el desarrollo de la etapa experimental y por la oportunidad de aprender de usted.

A la M.C. Madai Sánchez Arzubide, por facilitarme el acceso a las instalaciones de la Facultad de Ingeniería Química durante la etapa experimental.

A la Dra. Socorro Villanueva Rodríguez, M.C. Yvonne Román Maldonado y Q.F.B. Antonio Escobedo Reyes del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C (CIATEJ).

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
JUSTIFICACIÓN	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO I. MANEJO DE <i>Vanilla planifolia</i> EN TRES SISTEMAS DE CULTIVO DE LA REGIÓN TOTONACAPAN	6
Resumen	6
Abstract	7
1.1. Introducción	8
1.2. Materiales y métodos	10
1.3. Resultados y discusión	14
1.4. Conclusiones	41
CAPÍTULO II. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE CLIMA EN EL RENDIMIENTO DE FRUTO DE <i>Vanilla planifolia</i> CULTIVADO EN TRES SISTEMAS DE MANEJO	43
Resumen	43
Abstract	44
2.1. Introducción	45
2.2. Materiales y métodos	46
2.3. Resultados y discusión	49
2.4. Conclusiones	77

CAPÍTULO III. VARIACION DE METABOLITOS EN FRUTOS VERDES Y BENEFICIADOS DE <i>Vanilla planifolia</i> CULTIVADOS EN DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO	79
Resumen	79
Abstract	80
3.1. Introducción	81
3.2. Materiales y métodos	82
3.3. Resultados y discusión	90
3.4. Conclusiones	142
CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FÍSICA Y AROMÁTICA DE FRUTOS VERDES Y BENEFICIADOS DE <i>Vanilla planifolia</i> CULTIVADOS EN DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO.	144
Resumen	144
Abstract	145
4.1. Introducción	146
4.2. Materiales y métodos	147
4.3. Resultados y discusión	151
4.4. Conclusiones	181
CAPÍTULO V. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE <i>Vanilla planifolia</i> CON DIFERENTE MADUREZ FISIOLÓGICA CULTIVADOS EN TRES SISTEMAS DE MANEJO	183
Resumen	183
Abstract	184
5.1. Introducción	185
5.2. Materiales y métodos	186
5.3. Resultados y discusión	189
5.4. Conclusiones	197



DISCUSIÓN GENERAL	198
CONCLUSIONES GENERALES	212
PERSPECTIVAS Y ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN	214
6.1. REFERENCIAS	215

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.	11
Cuadro 1.2. Variables y códigos considerados para describir la toma de datos en los vainillales.	13
Cuadro 1.3. Variables utilizadas para evaluar el rendimiento de frutos de <i>Vanilla planifolia</i> .	13
Cuadro 1.4. Comparación de las unidades de producción con base en el sistema de manejo.	21
Cuadro 1.5. Análisis de varianza para variables de producción de fruto de vainilla evaluados en tres sistemas de manejo en el Totonacapan, México.	31
Cuadro 1.6. Prueba de medias para variables de producción de frutos promedio en tres sitios del Totonacapan, México.	33
Cuadro 1.7. Correlación de Pearson para variables de rendimiento de fruto en tres sitios del Totonacapan, México.	37
Cuadro 1.8. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables de rendimiento en las tres dimensiones de la caracterización de tres sistemas de manejo de <i>Vanilla planifolia</i> en el Totonacapan, México.	38
Cuadro 2.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.	47
Cuadro 2.2. Variables medidas en planta y en fruto para evaluar el rendimiento y sus componentes en <i>Vanilla planifolia</i> .	48
Cuadro 2.3. Prueba de medias para variables de componentes de rendimiento en planta y variables de fruto en tres sitios del Totonacapan, México.	51
Cuadro 2.4. Análisis de varianza de variables ambientales medidas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los tres sitios de estudio en los ciclos 2018 y 2019.	53
Cuadro 2.5. Prueba de medias por hora de tres sitios para variables ambientales medidas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	54
Cuadro 2.6. Prueba de medias por sitio para variables ambientales registradas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de frutos de los ciclos 2018 y 2019.	55
Cuadro 2.7. Análisis de varianza para variables ambientales en el vainillal de Barriles registradas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	58
Cuadro 2.8. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de Barriles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	58

Cuadro 2.9. Análisis de varianza para variables ambientales registradas en el sitio de 20 Soles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	59
Cuadro 2.10. Prueba de medias para variables ambientales registradas en el sitio de 20 Soles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	60
Cuadro 2.11. Análisis de varianza para variables ambientales medidas en el sitio de Solteros de Juan Rosas durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto del ciclo 2019.	60
Cuadro 2.12. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de Solteros de Juan Rosas durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto del ciclo 2019.	61
Cuadro 2.13. Análisis de varianza de variables ambientales registradas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto en los ciclos 2018 y 2019.	61
Cuadro 2.14. Prueba de medias por hora de tres sitios para variables ambientales medidas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	62
Cuadro 2.15. Prueba de medias por sitio para variables ambientales registradas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	63
Cuadro 2.16. Análisis de varianza para variables ambientales en el vainillal de Barriles medidas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	64
Cuadro 2.17. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de Barriles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de los ciclos 2018 y 2019.	64
Cuadro 2.18. Análisis de varianza para variables ambientales medidas en el sitio de 20 Soles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo del fruto de los ciclo 2018 y 2019.	65
Cuadro 2.19. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de 20 Soles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto de los ciclos 2018 y 2019.	65
Cuadro 2.20. Análisis de varianza para variables ambientales medidas en el sitios de Solteros de Juan Rosas durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto del ciclo 2019.	66
Cuadro 2.21. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de Solteros de Juan Rosas durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto del ciclo 2019.	66
Cuadro 2.22. Correlación canónica entre variables ambientales de la localidad de Barriles, Gutiérrez Zamora, Veracruz y variables de rendimiento de fruto de <i>Vanilla planifolia</i> .	71

Cuadro 2.23. Correlación canónica entre variables ambientales de la localidad de 20 Soles, Papantla, Veracruz y variables de rendimiento de frutos de <i>Vanilla planifolia</i> .	72
Cuadro 2.24. Correlación canónica entre variables ambientales de la localidad de Solteros de Juan Rosas, Papantla, Veracruz y variables de rendimiento de frutos de <i>Vanilla planifolia</i> .	74
Cuadro 3.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.	83
Cuadro 3.2. Identificación y marca de los metabolitos utilizados.	88
Cuadro 3.3. Medias y coeficientes de variación de glucosa, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales y almidón evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	91
Cuadro 3.4. Concentración media en g 100 g <sup>-1</sup> de materia seca para glucosa, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales y almidón evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.	92
Cuadro 3.5. Concentración media en g 100 g <sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para glucosa, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales y almidón evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.	93
Cuadro 3.6. Medias y coeficientes de variación de pigmentos fotosintéticos evaluados en frutos verdes de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	95
Cuadro 3.7. Concentración media en mg g <sup>-1</sup> de materia seca para pigmentos fotosintéticos en frutos verdes de <i>Vanilla planifolia</i> evaluados en tres sitios y en diferentes estados de madurez durante el ciclo de cultivo 2019.	96
Cuadro 3.8. Medias y coeficientes de variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y terpenoides totales evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	98
Cuadro 3.9. Concentraciones medias en mg g <sup>-1</sup> de materia seca para los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y terpenoides totales evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.	99
Cuadro 3.10. Concentración media en mg g <sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y terpenoides totales evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i>	

colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.	100
Cuadro 3.11. Identificación de metabolitos en frutos de vainilla.	103
Cuadro 3.12. Tiempo de retención de los metabolitos evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> .	103
Cuadro 3.13. Peso molecular de los compuestos mayoritarios en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> .	104
Cuadro 3.14. Medias y coeficientes de variación de ácidos fenólicos evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019, en tres sitios de la región Totonacapan.	108
Cuadro 3.15. Concentración media en mg g <sup>-1</sup> de materia seca para los ácidos fenólicos evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	110
Cuadro 3.16. Concentración media en mg g <sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para los ácidos fenólicos evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	112
Cuadro 3.17. Medias y coeficientes de variación de flavonoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	115
Cuadro 3.18. Concentración media en mg g <sup>-1</sup> de materia seca para los flavonoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	117
Cuadro 3.19. Concentración media en mg g <sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para los flavonoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	118
Cuadro 3.20. Medias y coeficientes de variación de terpenoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	121
Cuadro 3.21. Concentración media en mg g <sup>-1</sup> de materia seca para los terpenoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.	123
Cuadro 3.22. Concentración media en mg g <sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para los terpenoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.	124

Cuadro 3.23. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables fisicoquímicas en las dos dimensiones de los metabolitos primarios y secundarios evaluados en frutos verdes de <i>Vanilla planifolia</i> de la región Totonacapan, México.	127
Cuadro 3.24. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables fisicoquímicas en las dos dimensiones de los metabolitos primarios y secundarios evaluados en frutos beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> de la región Totonacapan, México.	130
Cuadro 3.25. Correlación canónica entre parámetros de clima y metabolitos primarios y secundarios registradas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> de la localidad de Barriles, Gutiérrez Zamora, Ver.	134
Cuadro 3.26. Correlación canónica entre parámetros de clima y metabolitos primarios y secundarios registradas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> de la localidad de 20 Soles, Papantla, Ver.	137
Cuadro 3.27. Correlación canónica entre parámetros de clima y metabolitos primarios y secundarios registradas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> de la localidad de Solteros de Juan Rosas, Papantla, Ver.	140
Cuadro 4.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.	148
Cuadro 4.2. Variables físicas y parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> .	149
Cuadro 4.3. Metabolitos cuantificados en frutos de vainilla.	150
Cuadro 4.4. Medias y coeficientes de variación de características físicas y de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	152
Cuadro 4.5. Valores medios por sitio y estado de madurez de las características físicas evaluadas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en la región Totonacapan, México.	155
Cuadro 4.6. Valores medios por sitio y estado de madurez de los parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en la región Totonacapan, México.	157
Cuadro 4.7. Medias y coeficientes de variación de las variables aromáticas evaluadas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	164
Cuadro 4.8. Valores medios por sitio en partes por millón (ppm) de las variables aromáticas evaluadas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	169

Cuadro 4.9. Valores medios por estado de madurez en partes por millón (ppm) de las variables aromáticas evaluadas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	171
Cuadro 4.10. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables aromáticas en las dos dimensiones de la caracterización de frutos verdes de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	176
Cuadro 4.11. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables aromáticas en las dos dimensiones de la caracterización de frutos beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	179
Cuadro 5.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.	186
Cuadro 5.2. Medias y coeficientes de variación de la capacidad antioxidante evaluadas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	190
Cuadro 5.3. Valores medios por sitio para la actividad antioxidante por el método de DPPH y ORAC evaluadas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.	191
Cuadro 5.4. Valores medios por tipo de tejido y estado de madurez para la actividad antioxidante por el método de DPPH y ORAC evaluadas en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> de tres sitios de la región Totonacapan México colectados durante el ciclo de cultivo 2019.	192
Cuadro 5.5. Análisis de correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante y los metabolitos secundarios totales evaluados en frutos verdes de <i>Vanilla planifolia</i> .	196
Cuadro 5.6. Análisis de correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante y los metabolitos secundarios totales evaluados en frutos beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> .	196
Cuadro 5.7. Análisis de correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante y los metabolitos secundarios totales evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> .	197

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de la orientación y distribución de <i>Vanilla planifolia</i> dentro del vainillal, en los sitios de: A) Barriles (Gutiérrez Zamora, Veracruz); B) 20 Soles (Papantla, Veracruz) en ciclo de producción 2018; C) 20 Soles (Papantla, Veracruz) en ciclo de producción 2019; D) Solteros de Juan Rosas (Papantla, Veracruz).	12
Figura 1.2. Muestra de frutos cosechados para evaluación del rendimiento en los vainillales, 2019.	14
Figura 1.3. Vainillal ubicado en Paso de Barriles bajo sistema de malla sombra (Gutiérrez Zamora, Veracruz), 2019.	16
Figura 1.4. Sistema de manejo establecido en el rancho 20 Soles en condiciones de acahual (Papantla, Veracruz), 2019.	18
Figura 1.5. Vainillal con sistema de manejo en malla sombra con tutores vivos ubicado en Solteros de Juan Rosas (Papantla, Veracruz), 2019.	20
Figura 1.6. Medidas de distribución de plantas en tres sistemas de manejo de vainilla en el Totonacapan, México. A) Distribución y altura de plantas, B) Distribución de tutores.	28
Figura 1.7. Dispersión de tres sistemas de manejo de vainilla en el Totonacapan, México, con base en los dos primeros componentes principales del análisis de 16 variables de rendimiento agrupadas por medias poblacionales.	39
Figura 1.8. Dendrograma de tres sistemas de manejo de vainilla en el Totonacapan, México basado en el promedio de 16 variables de rendimiento y agrupado por similitud de distancias. Nota: La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.	40
Figura 2.1. Colocación de sensores (datalogger) para registro de parámetros ambientales.	48
Figura 2.2. Valores mínimo, máximo y promedio de la temperatura mensual registrada en los ciclos de cultivo 2018 y 2019. Los datos mostrados en la figura se registraron durante los meses de marzo (M) a noviembre (N).	56
Figura 2.3. Valores mínimo, máximo y promedio de la humedad relativa mensual registrada en los ciclos 2018 y 2019. Los datos mostrados en la figura se registraron durante los meses de marzo (M) a noviembre (N).	56
Figura 2.4. Valores mínimo, máximo y promedio de la radiación fotosintéticamente activa mensual registrada en los ciclos de cultivo 2018 y 2019. Los datos mostrados en la figura se registraron durante los meses de marzo (M) a noviembre (N).	57
Figura 2.5. Precipitación pluvial acumulada registrada en los sistemas de manejo durante los periodos de floración y amarre (A y B), y en el período de desarrollo de fruto (C y D) en los ciclos de producción de vainilla de 2018 y 2019 (CONAGUA 2019).	68



- Figura 2.6. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los dos primeros factores en la interacción de variables ambientales y rendimiento de fruto de *Vanilla planifolia* en los periodos de floración y amarre de fruto (A) y desarrollo del fruto (B) del ciclo de producción en Barriles, Gutiérrez Zamora, Ver. Fru/m<sup>2</sup>: Frutos/m<sup>2</sup>; RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa a las 14:00 h; RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa a las 18:00 h; kgFru/m<sup>2</sup>: kilogramos de fruto/m<sup>2</sup>; HR\_14H: Humedad relativa a las 14:00 h; HR\_18H: Humedad relativa a las 18:00 h; PPF: Peso promedio por fruto; VolFru: Volumen del fruto; Temp\_14H: Temperatura a las 14:00 h; Fru/Mac: Frutos/Maceta; Mac/G: Macetas/Guías; Mac/m<sup>2</sup>: Macetas/m<sup>2</sup>. 71
- Figura 2.7. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los dos primeros factores en la interacción de variables ambientales y rendimiento de fruto de *Vanilla planifolia* en los periodos de floración y amarre de fruto (A) y desarrollo de fruto (B) del ciclo de producción en 20 Soles, Papantla, Ver. Fru/Mac: Frutos/Maceta; Fru/m<sup>2</sup>: Frutos/m<sup>2</sup>; LongFru: Longitud del fruto; RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa a las 18:00 h; HR\_18H: Humedad relativa a las 18:00 h; HR\_10H: Humedad relativa a las 10:00 h; RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa a las 14:00 h; PPFru: Peso promedio por fruto; Temp\_18H: Temperatura a las 18:00 h; VolFru: Volumen del fruto; LxAFru: Largo x Ancho; AncFru: Ancho del fruto. 73
- Figura 2.8. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los dos primeros factores en la interacción de variables ambientales y rendimiento de fruto de *Vanilla planifolia* en los periodos de floración y amarre de fruto (A) y desarrollo de fruto (B) del ciclo de producción en Solteros de Juan Rosas, Papantla, Ver. Fru/Mac: Frutos/Maceta; G/m<sup>2</sup>: Guías/m<sup>2</sup>; RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa a las 18:00 h; Fru/G: Frutos/Guía; Mac/m<sup>2</sup>: Macetas/m<sup>2</sup>; VolFru: Volumen del fruto; RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa a las 14:00 h; PPFru: Peso promedio por fruto; HR\_18H: Humedad relativa a las 18:00 h; Temp\_18H: Temperatura a las 18:00 h; Fru/m<sup>2</sup>: Frutos/m<sup>2</sup>; Mac/G: Macetas/Guía; AncFru: Ancho del fruto. 74
- Figura 3.1. Contenido de ácidos fenólicos en frutos verdes (A y C) y beneficiados (B y D) de *Vanilla planifolia* colectados en los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan. 114
- Figura 3.2. Contenido de flavonoides en frutos verdes (A y C) y beneficiados (B y D) de *Vanilla planifolia* colectados en los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan. 120
- Figura 3.3. Contenido de terpenoides en frutos verdes (A y C) y beneficiados (B y D) de *Vanilla planifolia* colectados en los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan. 125

- Figura 3.4. Dispersión de tres colectas de frutos verdes de *Vanilla planifolia* con base en los dos componentes principales del análisis de 28 variables químicas agrupadas por medias poblacionales. 128
- Figura 3.5. Dendrograma de tres colectas de frutos verdes de *Vanilla planifolia* colectados en el ciclo de cultivo 2019 basado en el promedio de 28 variables químicas agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable. 129
- Figura 3.6. Dispersión de tres colectas de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* con base en los dos componentes principales del análisis de 26 variables químicas agrupadas por medias poblacionales. 131
- Figura 3.7. Dendrograma de tres colectas de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados en el ciclo de cultivo 2019 basado en el promedio de 26 variables químicas agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable. 132
- Figura 3.8. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los tres primeros factores en la interacción de parámetros de clima y, metabolitos primarios y secundarios en frutos verdes (A y B) y beneficiados (C y D) de *Vanilla planifolia* colectados en Barriles, Gutiérrez Zamora, Ver. HR\_14 y HR\_18: Humedad relativa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. Temp\_14 y Temp\_18H: Temperatura promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h; RFA\_14H y RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. TerpT: Terpenoides totales; CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; Chla: Clorofila a; CarXan: Carotenoides y Xantofilas; AST: Azúcares solubles totales. 135
- Figura 3.9. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los tres primeros factores en la interacción de parámetros de clima y, metabolitos primarios y secundarios en frutos verdes (A y B) y beneficiados (B y C) de *Vanilla planifolia* colectados en 20 Soles, Papantla, Ver. HR\_14 y HR\_18: Humedad relativa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. Temp\_14 y Temp\_18H: Temperatura promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h; RFA\_14H y RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; TerpT: Terpenoides totales; AST: Azúcares solubles totales; Chlb: Clorofila b; CarXan: Carotenoides y Xantofilas. 138
- Figura 3.10. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los tres primeros factores en la interacción de parámetros de clima y, metabolitos primarios y secundarios en frutos verdes (A y B) y beneficiados (C y D) de *Vanilla planifolia* colectados en Solteros de Juan Rosas, Papantla, Ver. HR\_14 y HR\_18: Humedad relativa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. Temp\_14 y Temp\_18H: Temperatura promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h; RFA\_14H y RFA\_18H:

	Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; TerpT: Terpenoides totales; AST: Azúcares solubles totales; Chlb: Clorofila b; CarXan: Carotenoides y Xantofilas.	141
Figura 4.1.	Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo de cultivo 2018 en el sitio de Barriles.	159
Figura 4.2.	Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en el sitio de Barriles.	160
Figura 4.3.	Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo de cultivo 2018 en el sitio de 20 Soles.	161
Figura 4.4.	Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en el sitio de 20 Soles.	161
Figura 4.5.	Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en el sitio de Solteros de Juan Rosas.	162
Figura 4.6.	Concentración de compuestos menores en frutos verdes colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	172
Figura 4.7.	Concentración de vainillina y glucovainillina en frutos verdes colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	173
Figura 4.8.	Concentración de compuestos menores en frutos beneficiados colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.	174
Figura 4.9.	Concentración de vainillina y glucovainillina en frutos beneficiados colectados en tres sitios de la región Totonacapan, México durante los ciclos 2018 y 2019.	175
Figura 4.10.	Dispersión de tres colectas de frutos verdes de <i>Vanilla planifolia</i> con base en los dos componentes principales del análisis de 13 variables aromáticas agrupadas por medias poblacionales.	177
Figura 4.11.	Dendrograma de tres colectas de frutos verdes de <i>Vanilla planifolia</i> basado en el promedio de 13 variables aromáticas colectados en el ciclo de cultivo 2019 agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.	178
Figura 4.12.	Dispersión de tres colectas de frutos verdes de <i>Vanilla planifolia</i> con base en los dos componentes principales del análisis de 13 variables aromáticas agrupadas por medias poblacionales.	180
Figura 4.13.	Dendrograma de tres colectas de frutos beneficiados de <i>Vanilla planifolia</i> basado en el promedio de 13 variables aromáticas colectados	

en el ciclo de cultivo 2019 agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.	181
Figura 6.1. Asociación de los parámetros de clima (temperatura, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa) con variables agronómicas y químicas de <i>Vanilla planifolia</i> .	211

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Vanilla* integra aproximadamente 110 especies, de las cuales *Vanilla pompona*, *Vanilla tahitensis* y *Vanilla planifolia* son las más importantes puesto que son, probablemente, las únicas especies que producen frutos aromáticos. No obstante, *V. planifolia* es la de mayor importancia a nivel económico y comercial debido al aroma de sus frutos que se caracterizan por tener notas aromáticas florales, ahumadas, dulces, picantes, amaderadas, a tabaco, ciruela pasa o resina, aunque estos perfiles pueden variar (Ranadive 2011).

Las características sensoriales de los frutos beneficiados de vainilla no sólo le han permitido mostrar una gran versatilidad en industrias como la farmacéutica y de perfumería. Sino que también muestra aplicaciones en el sector alimenticio como conservador y saborizante (Rivera-Espinoza y Muriel 2013; Gallage *et al.* 2017). Así mismo, se ha demostrado que los extractos de vainilla pueden presentar diferentes actividades biológicas tales como capacidad antioxidante, antimutagénica, hipolipidémica, antifúngica y potencial actividad para prevenir padecimientos cardiovasculares, obesidad, diabetes o cáncer al inhibir la mutagénesis (Fitzgerald *et al.* 2004; Sinha *et al.* 2008; Dong *et al.* 2014).

El sistema de manejo en que se cultiva la vainilla es un factor de gran importancia para la especie, ya que las prácticas realizadas derivan en el desarrollo de un microclima y actividades específicas que se relacionan con las características físicas y rendimiento de fruto (Maturano 2002). Además de relacionarse con aspectos como la caída de fruto, deficiencia en la nutrición del cultivo y enfermedades (Porrás-Alfaro y Bayman 2007; Soto-Arenas 2009; Hernández-Hernández y Lubinsky 2011). Por lo que, el sistema de manejo se ve reflejado en características físicas de los frutos verdes como el color, tamaño o peso (Ranadive 2011). Pero también pueden influenciar la síntesis de metabolitos secundarios con potencial actividad biológica o propiedades aromáticas, que se asocia a la etapa de desarrollo de la planta y condiciones de crecimiento, entre otros (Palama *et al.* 2010; Saxena *et al.* 2013).

De manera que una alta concentración de metabolitos secundarios se puede asociar con mayor protección a la planta o a una condición en particular como una estrategia adaptativa al entorno (Mazid *et al.* 2011; Pavarini *et al.* 2012; Pagare *et al.* 2015). Mientras que en compuestos aromáticos pueden ser un indicador de calidad y de madurez del fruto. Lo que se refleja en

variaciones a nivel del perfil metabólico dando lugar a quimiotipos que resultan de adaptaciones locales en la composición química de los frutos por la interacción de la especie con su ambiente (Gross *et al.* 2009). Por lo que bajo diferentes sistemas de manejo se presentarán diferentes condiciones ambientales ejerciendo una influencia en las características químicas de los frutos (Ibarra-Cantún *et al.* 2018).

La composición química de los frutos es compleja, ya que al menos se han identificado 200 compuestos que contribuyen al perfil aromático de los frutos beneficiados. No obstante, aún es limitada la información acerca de las características químicas de los frutos verdes, puesto que carecen de aroma y su principal fuente de acumulación de compuestos se da en forma de glucósidos como la glucovainillina, la cual ocurre desde aproximadamente la semana 15 posterior a la polinización hasta la semana 30 y que se hidrolizan principalmente durante el beneficiado de los frutos (Odoux 2006; Van Dyk *et al.* 2010). De manera que luego de la fermentación en el beneficiado se liberen compuestos como la vainillina, que puede llegar a constituir aproximadamente 85 % del total de compuestos volátiles (Menon y Nayeem 2013).

## **JUSTIFICACIÓN**

*Vanilla planifolia* es una de las especies más apreciadas a nivel comercial debido a que se considera la principal fuente de vainillina natural (Bory *et al.* 2008; Azofeifa-Bolaños *et al.* 2014). Este compuesto tiene aplicaciones en la producción de alimentos, bebidas, cosméticos y fármacos, entre otros (Jadhav *et al.* 2009; Gurnani *et al.* 2014). Además de su importancia comercial, el cultivo de vainilla promueve una importante cantidad de mano de obra, especialmente en los periodos de floración y cosecha (Consejo Nacional de productores de Vainilla 2006).

México es centro de origen y diversidad de la vainilla (Soto-Arenas 2009). De acuerdo con Lubinsky *et al.* (2008) el cultivo de vainilla con fines comerciales en México inició en la región Totonacapan, que comprende municipios de Puebla y Veracruz. Sin embargo, su cultivo también se distribuye en zonas como Oaxaca, Chiapas, Quintana Roo, San Luís Potosí e Hidalgo (Castillo-Martínez y Engleman 1993; Soto-Arenas 2009). Aunado a su valor económico y comercial, la vainilla es un recurso fitogenético de gran importancia cultural para pueblos originarios como el maya o el totonaca (ASERCA 2000; Salazar-Rojas *et al.* 2011).

El cultivo de vainilla requiere condiciones agroecológicas particulares, por lo que en la actualidad se cultiva principalmente en dos sistemas de manejo: acahual y malla sombra (Hernández-Hernández y Lubinsky 2011). Las prácticas de manejo en cada sistema son variables y pueden presentar condiciones ambientales diferentes, puesto que en la mayoría de casos el manejo se realiza de manera empírica y los estudios agronómicos de esta especie son insuficientes (Hernández-Hernández y Lubinsky 2011).

La diferencia en la condición ambiental de cada sistema de manejo puede influir en la concentración de metabolitos secundarios como flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y terpenos presentes en diferentes estructuras de la planta (Ibarra-Cantún *et al.* 2018). Sin embargo, la información acerca de la influencia del ambiente sobre la producción de metabolitos secundarios presentes, tanto en frutos verdes como beneficiados y cómo varían en función de la edad fisiológica y el sistema de manejo de los frutos aún es limitada. La presente investigación se realizó en vainillales con diferente sistema de manejo en el Totonacapan con el objetivo de evaluar la influencia de la condición ambiental propia de cada vainillal en las características físicas y de rendimiento de fruto. Así como en el perfil de metabolitos secundarios en frutos verdes y beneficiado con diferente edad fisiológica

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La vainilla es un cultivo de gran importancia cultural que además puede generar un gran impacto económico al incrementar los ingresos de los productores (Ledezma *et al.* 2006; Castro 2008). Esto debido a la gran demanda a nivel mundial por sus aplicaciones como aromatizante y saborizante (Hilmer *et al.* 2010). Sin embargo, el cultivo de vainilla se enfrenta a diferentes problemáticas como el cambio climático, la caída prematura de fruto y la presencia de enfermedades que afectan de manera importante la producción y rendimiento de frutos (Hernández-Hernández *et al.* 2011). Así mismo, parte de la baja productividad del cultivo puede asociarse a la poca experiencia de los productores y el escaso conocimiento agronómico del cultivo (Moreno y Díez 2011).

En México se distinguen principalmente tres sistemas de manejo (Barrera-Rodríguez *et al.* 2009). Las diferencias en estos sistemas de manejo generan condiciones ambientales particulares que ejercen un efecto en la calidad física y química de los frutos, así como en el rendimiento. El

efecto de las prácticas de manejo sobre esta última variable se asocia entre otros factores a la conducción de guías, poda (sombreado), polinización, humedad y materia orgánica disponible (Vargas-Hernández 2014). Mientras que las variaciones en la composición química se atribuyen a la condición ambiental, prácticas de manejo como nutrición, riego y enfermedades, entre otras (Lubinsky *et al.* 2008). No obstante, el rendimiento de fruto cambia año con año ya que las condiciones ambientales varían y las prácticas de manejo pueden modificarse (De la Cruz-Medina *et al.* 2009).

La importancia de la vainilla como recurso genético radica principalmente en sus características aromáticas, por lo que los estudios en esta especie se han enfocado en los frutos beneficiados y productos derivados de ellos como los extractos comerciales (Gurnani *et al.* 2014). Además de su aroma, los frutos de vainilla han mostrado cierta actividad biológica como agente antioxidante, anticancerígeno y antiinflamatorio, entre otros (Sinha *et al.* 2008; Shanmugavalli *et al.* 2009). No obstante, aún es escasa la información de los perfiles químicos que presentan los frutos en diferentes etapas de madurez fisiológica. Por ello, en el presente trabajo se planteó conocer las variaciones en los perfiles químicos de frutos verdes y beneficiado con diferente madurez cultivados en diferentes sistemas de manejo. Así como describir la influencia de las prácticas de manejo en cada vainillal en el rendimiento de fruto.

## **HIPÓTESIS**

La concentración de metabolitos secundarios, características físicas y rendimiento en frutos de vainilla (*Vanilla planifolia*) varía en función de las prácticas de manejo, condición ambiental y madurez fisiológica.

## **OBJETIVOS**

General

- Evaluar la influencia del sistema de manejo y condición ambiental en las características físicas y perfil de metabolitos secundarios de frutos verdes y beneficiados con diferente edad fisiológica.



## Específicos

- Seleccionar y describir vainillales con diferente sistema de cultivo con base en sus prácticas de manejo y los principales parámetros de clima (temperatura, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa) de cada condición.
- Evaluar el rendimiento de frutos en cada vainillal y asociarlo con su sistema de manejo y condición ambiental.
- Evaluar el perfil de metabolitos secundarios en frutos verdes y beneficiados de vainilla cosechados a las 28, 30 y 32 semanas de madurez cultivados en diferentes sistemas de manejo y correlacionarlo con su condición ambiental.
- Evaluar las características físicas y perfil aromático de frutos verdes y beneficiados colectados a las 28, 30 y 32 semanas de madurez cultivados en diferentes sistemas de manejo.
- Evaluar la capacidad antioxidante en frutos verdes y beneficiados con 30 y 32 semanas de madurez fisiológica.

El presente trabajo de tesis se organizó por capítulos para tratar de probar la hipótesis de que la condición ambiental y las prácticas de manejo ejercen una influencia en el perfil de metabolitos secundarios y características físicas de los frutos verdes y beneficiados de la Región Totonacapan con diferente edad fisiológica. En el Capítulo I se presenta una descripción del manejo que se realiza en los tres vainillales objeto de estudio, así como sus componentes de rendimiento de fruto. En el Capítulo II se muestra la influencia de la condición ambiental marcado por los principales parámetros de clima (temperatura, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa) en el rendimiento de fruto en cada sistema de manejo. Mientras que en el Capítulo III se evaluó el perfil de metabolitos primarios y secundarios en los frutos verdes y beneficiados de los tres vainillales seleccionados. El Capítulo IV describió el perfil aromático de los frutos verdes y beneficiados, por último, en el Capítulo V se evaluó la capacidad antioxidante de los frutos verdes y beneficiados.

## CAPÍTULO I. MANEJO DE *Vanilla planifolia* EN TRES SISTEMAS DE CULTIVO DE LA REGIÓN TOTONACAPAN

### RESUMEN

La distribución geográfica de la vainilla está determinada por la condición ambiental, aunque también, esta especie presenta una capacidad adaptativa amplia que le permite su establecimiento en diferentes sistemas de cultivo. Estos sistemas se diferencian principalmente por las prácticas de manejo aplicadas, que se reflejan en el rendimiento potencial del cultivo. El objetivo de este capítulo fue describir las prácticas de manejo que realiza el productor al cultivo de vainilla establecido en tres sistemas de producción y evaluar el rendimiento de fruto. El estudio se realizó en tres sistemas de cultivo: malla sombra con tutores inertes (Barriles), acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas; SJR). La descripción de los cultivos se realizó a partir de datos recabados en campo y una entrevista semiestructurada. La evaluación del rendimiento de fruto se realizó a partir de 16 componentes de rendimiento diferenciados en variables evaluadas en planta y variables de fruto. El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza, prueba de medias, componentes principales y conglomerados. Las principales diferencias entre los sistemas evaluados se presentaron en el tipo de tutor, frecuencia de poda, densidad de plantas, fertilización y fecha de cosecha. Los cuerpos de agua destacaron como un factor de gran importancia para el cultivo. Los problemas identificados en los sistemas de cultivo se relacionaron con la caída prematura de fruto, enfermedades como *Fusarium*, *Aspergillus* y antracnosis; así como plagas de hormigas. La evaluación de los componentes de rendimiento indicó que los sistemas en malla sombra tuvieron la densidad mayor de guías y las plantas de porte mayor, sin embargo, tuvieron la cantidad menor de inflorescencias por guía. El sistema en Barriles tuvo la densidad mayor de macetas/m<sup>2</sup> y frutos/m<sup>2</sup>. Este sistema presentó el rendimiento mayor de fruto, pero tuvo los frutos más pequeños y de peso menor por lo que requirió una cantidad mayor de frutos por kilogramo. Mientras que los sistemas en acahual (20 Soles) y en malla sombra con tutores vivos (SJR) tuvieron los frutos de peso y tamaño mayor. La presencia de enfermedades fue un factor determinante en la producción de fruto en SJR, ya que a pesar de tener una importante densidad de guías tuvo el rendimiento más bajo. Se concluye que los tres sistemas de manejo (prácticas realizadas al cultivo) son diferentes como resultado del objetivo de cada productor, lo que se reflejó en la calidad física y rendimiento de fruto.

**Palabras clave:** prácticas de manejo, rendimiento, sistema de cultivo, vainilla.

## CHAPTER I. MANAGEMENT OF *Vanilla planifolia* IN THREE CULTIVATION SYSTEMS OF TONACAPAN REGION

### ABSTRACT

The geographical distribution of vanilla is determined by the environmental condition, although this species also has a wide adaptive capacity that allows its establishment in different cultivation systems. These systems differ mainly in the management practices applied, which are reflected in the potential yield of the crop. This chapter aimed to describe the management practices carried out by the producer to the vanilla crop established in three production systems and to evaluate the fruit yield. The study was carried out in three cultivation systems: shade mesh with inert tutors (Barriles), acahual (20 Soles) and shade mesh with living tutors (Solteros de Juan Rosas; SJR). The description of the crops was made from data collected in the field and a semi-structured interview. The evaluation of the fruit yield was carried out from 16 yield components, which were differentiated into variables evaluated in the plant and in the pod. Statistical analysis consisted of an analysis of variance, test of means, principal components and conglomerates. The main differences between the systems evaluated were in type of tutor, pruning frequency, plant density, fertilization and harvest date. The waterbody highlighted as an important factor for the crop. The problems identified in the cultivation systems were correlated to premature pod drop, diseases such as *Fusarium*, *Aspergillus* and anthracnose; as well as ant infestations. The evaluation of the yield components indicated that the shade mesh systems had the highest plant density and larger plants, however, they had the lowest number of inflorescences per plant. The system in Barriles had the highest density of inflorescences/m<sup>2</sup> and fruits/m<sup>2</sup>. This system presented the highest fruit yield, but had the smallest fruit and lowest weight, thus requiring a greater number of pods per kilogram. While the systems in acahual (20 Soles) and shade mesh with living tutors (SJR) had the pods of greater weight and size. The presence of disease was a determining factor in fruit production in SJR, since despite having an important density of plants it had the lowest yield. Based on the above, it is concluded that the three management systems (practices applied to crop) are different because of the purpose of each producer, which was reflected in the physical quality and fruit yield.

**Key words:** management practices, yield, cultivation system, vanilla.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

El género *Vanilla* tiene una amplia distribución en el mundo, de acuerdo con Soto y Dressler (2010) tiene origen en Mesoamérica y está formado por alrededor de 110 especies que se distribuyen a lo largo de la región pantropical del mundo. Dentro de la diversidad de este género sólo tres especies producen frutos comestibles: *Vanilla pompona* Schiede, *Vanilla tahitensis* y *Vanilla planifolia* (Korthou y Verpoorte 2007). Esta última (*Vanilla planifolia*) es la más cultivada y la de mayor importancia ecológica, económica y social debido a que su cultivo permite la incorporación de otras especies como un sistema agrícola (Bory *et al.* 2007; Bouétard *et al.* 2010).

La distribución de esta especie está determinada por la condición ambiental y el clima, los cuales junto con las prácticas de manejo ejercen una influencia en las características físicas y aromáticas de los frutos (Lubinsky *et al.* 2008). Debido a sus características climáticas, el cultivo de vainilla en México se distribuye principalmente en las costas de la Sierra Madre Oriental sobre el Golfo (Hernández-Hernández 2011). El estado con mayor producción de vainilla en México es Veracruz al aportar alrededor de 70 % de la producción nacional, mientras que Puebla, Oaxaca, Hidalgo y San Luís Potosí aportan una menor producción (Santillán-Fernández *et al.* 2019).

Actualmente, la vainilla se produce bajo diferentes sistemas de manejo y con una diversidad de prácticas, generalmente desarrolladas y transmitidas de manera empírica y los estudios agronómicos sobre la producción de vainilla aún son insuficientes (Hernández-Hernández y Lubinsky 2011). De acuerdo con Barrera-Rodríguez *et al.* (2009) y Hernández-Hernández (2011), en México se distinguen tres sistemas de cultivo:

- a) Acahual: simula las condiciones naturales del hábitat de la vainilla bajo una vegetación secundaria nativa e introducida en pequeñas superficies, lo que genera un bajo rendimiento (Barrera-Rodríguez *et al.* 2011). Los principales tutores utilizados en este sistema de manejo son laurel (*Litsea gluascens*), “pata de vaca” (*Bahuinia divaricata*), “cojón de gato” (*Tabernaemontana* sp.), cacahuapaxtle (*Hamelia erecta*) y capulín (*Eugenia capuli*) (Hernández-Hernández 2005). Cuando se introducen cítricos como tutores se establece un sistema con doble propósito (Barrera-Rodríguez *et al.* 2011).

- b) Intensivo con tutores naturales: el sistema se establece en superficies deforestadas, utiliza especies como el pichoco (*Erythrina* sp.) o cocuite (*Gliricidia sepium*). La densidad de plantas y tutores suele ser mayor que en el sistema de acahual, por lo que el rendimiento en la producción es mayor (Hernández-Hernández y Lubinsky 2011).
- c) Intensivo en malla sombra: es el sistema de cultivo más reciente y se caracteriza por sustituir al menos el 50 % de la sombra proporcionada por tutores naturales. Generalmente la superficie de cultivo es pequeña, debido a los altos costos asociados a la colocación de estructuras de soporte. Los tutores naturales pueden ser especies como pichoco (*Erythrina* sp.) o cocuite (*Gliricidia sepium*); o bien, tutores sintéticos o inertes como postes de concreto, madera o bambú. Puede incorporar sistemas de riego (por goteo o microaspersión), agroquímicos y equipos de registro-control de temperatura y plagas (Barrera-Rodríguez *et al.* 2011).

Un aspecto importante en los sistemas de manejo es la selección del tutor, ya que además de proporcionar soporte a la planta le brinda sombra y materia orgánica. Los tutores se eligen de acuerdo con los criterios del productor. Hernández-Hernández y Lubinsky (2011) señalan que deben ser especies que mantengan el follaje durante todo el ciclo productivo, de fácil propagación, adaptación a la poda, ausencia de espinas y hojas en la base del árbol, especies fuertes que soporten el peso de las plantas, que no pierdan la corteza con facilidad, resistentes a enfermedades y raíces profundas que no compitan con la planta por los nutrientes.

La poda del tutor es una actividad asociada al manejo de sombra, puesto que tanto la floración como la calidad de los frutos se relacionan con la cantidad de luz que reciben y su efecto en la tasa fotosintética (Puthur 2005). Esta práctica se realiza para brindar una condición de sombra adecuada para la planta, usualmente en los meses de mayo y noviembre, para favorecer el desarrollo de brotes florales y vegetativos (Pradeepkumar *et al.* 2008). Durante los periodos más soleados lo recomendable es manejar un sombreado entre 50 y 70 % para ayudar a conservar la humedad del suelo y el aire (Ranadive 2005). De acuerdo con Pradeepkumar *et al.* 2008, la cantidad de sombra sugerida para el cultivo durante la temporada de lluvias oscila entre 30-50 % para evitar la aparición de enfermedades y hongos. Mientras que un exceso de sombra puede ocasionar una baja diferenciación floral, así como tallos más delgados y hojas de menor tamaño.

Mientras que la falta de sombra puede causar quemaduras a las plantas y la caída de frutos (Hernández-Hernández y Lubinsky 2011).

A su vez, la nutrición del cultivo es una práctica compleja puesto que la planta es altamente sensible a la aplicación de fertilizantes (Damirón-Velázquez 2004; Osorio *et al.* 2011). Sin embargo, la fertilización resulta necesaria dado el bajo contenido de nutrientes esenciales para el crecimiento de la planta (Damirón-Velázquez 2004). Bajo condiciones naturales y en algunos sistemas de cultivo como el acahual o malla sombra, la principal fuente de nutrientes se da mediante la incorporación de materia orgánica, vermicomposta o humus. Estos abonos mantienen la humedad y temperatura del suelo, una buena aireación y promueven la asociación de micorrizas (Anikumar 2004; Porrás-Alfaro y Bayman 2007; Osorio *et al.* 2014). La vainilla requiere condiciones de estrés hídrico para promover la diferenciación floral y alta humedad durante el desarrollo del fruto (Sujatha y Bhat 2010). Es recomendable un suministro constante de agua a lo largo de todo el ciclo productivo, principalmente en el periodo de floración (marzo-mayo), cuando consume aproximadamente 48 % de sus necesidades totales (Villarreal-Manzo y Herrera-Cabrera 2018).

A lo largo del ciclo productivo, la vainilla se enfrenta con múltiples problemas como la caída prematura de fruto que puede estar asociada a la inadecuada nutrición del cultivo, enfermedades, estrés hídrico y ambiental, entre otros (Ghazoul y Satake 2009; Castro-Bobadilla *et al.* 2011; Martínez-García *et al.* 2012). Estos factores ambientales, además de los factores de manejo y genéticos, impactan directamente en el rendimiento de fruto (Maturano 2002; Flores-Jiménez *et al.* 2017; Rocha *et al.* 2018). Con base en los antecedentes mencionados, el objetivo de este capítulo fue describir el manejo que el productor realiza al cultivo de vainilla en tres sistemas de producción, así como su influencia en las características físicas y de rendimiento del fruto.

## **1.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

El estudio se realizó en tres vainillales dentro de la región Totonacapan. Los sitios se seleccionaron con base en el sistema de manejo que practican los productores de vainilla en esta región: el Rancho 20 Soles y la localidad de Solteros de Juan Rosas ubicados en el municipio de

Papantla, Veracruz; y El rancho Xanathlan ubicado en la localidad de Paso de Barriles en Gutiérrez Zamora, Veracruz (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.

Municipio	Sitio	Longitud	Latitud	Altitud (msnm)
Papantla	Rancho 20 Soles	-97.31	20.43	176
	Solteros de Juan Rosas	-97.20	20.34	203
Gutiérrez Zamora	Paso de Barriles	-97.14	20.46	29

msnm: metros sobre el nivel del mar

### Registro de información

La información se recabó con base en una metodología mixta en la que se obtuvieron datos cualitativos a través de una entrevista semiestructurada para conocer algunos aspectos del manejo que los productores realizan en su vainillal. La entrevista se aplicó durante la etapa de floración y amarre de fruto (marzo-mayo de 2018), y durante el desarrollo de los frutos (junio de 2018) (Anexo A1 y A2).

La entrevista incluyó aspectos de:

- Sistema de manejo: características del vainillal, tipo y características del tutor.
- Polinización, desarrollo y caída de fruto
- Prácticas de manejo: poda, fertilización, riego y control de plagas.
- Cosecha: calidad física del fruto

Con la información obtenida se realizó la descripción de las características de cada vainillal en cuatro aspectos: sistema de producción, prácticas de manejo, cosecha de frutos y problemas identificados por el productor. Así, se elaboró un cuadro comparativo de semejanzas y diferencias en los tres sistemas de manejo evaluados. Los datos cuantitativos se obtuvieron a partir de mediciones realizadas dentro del vainillal. En él se registraron medidas de plantas, tutores, calles y camellones a partir de las variables concentradas en el Cuadro 1.2. La orientación y distribución de las plantas en cada vainillal se representa en esquemas como se indica (Figuras 1.1A, 1.1B, 1.1C y 1.1D).

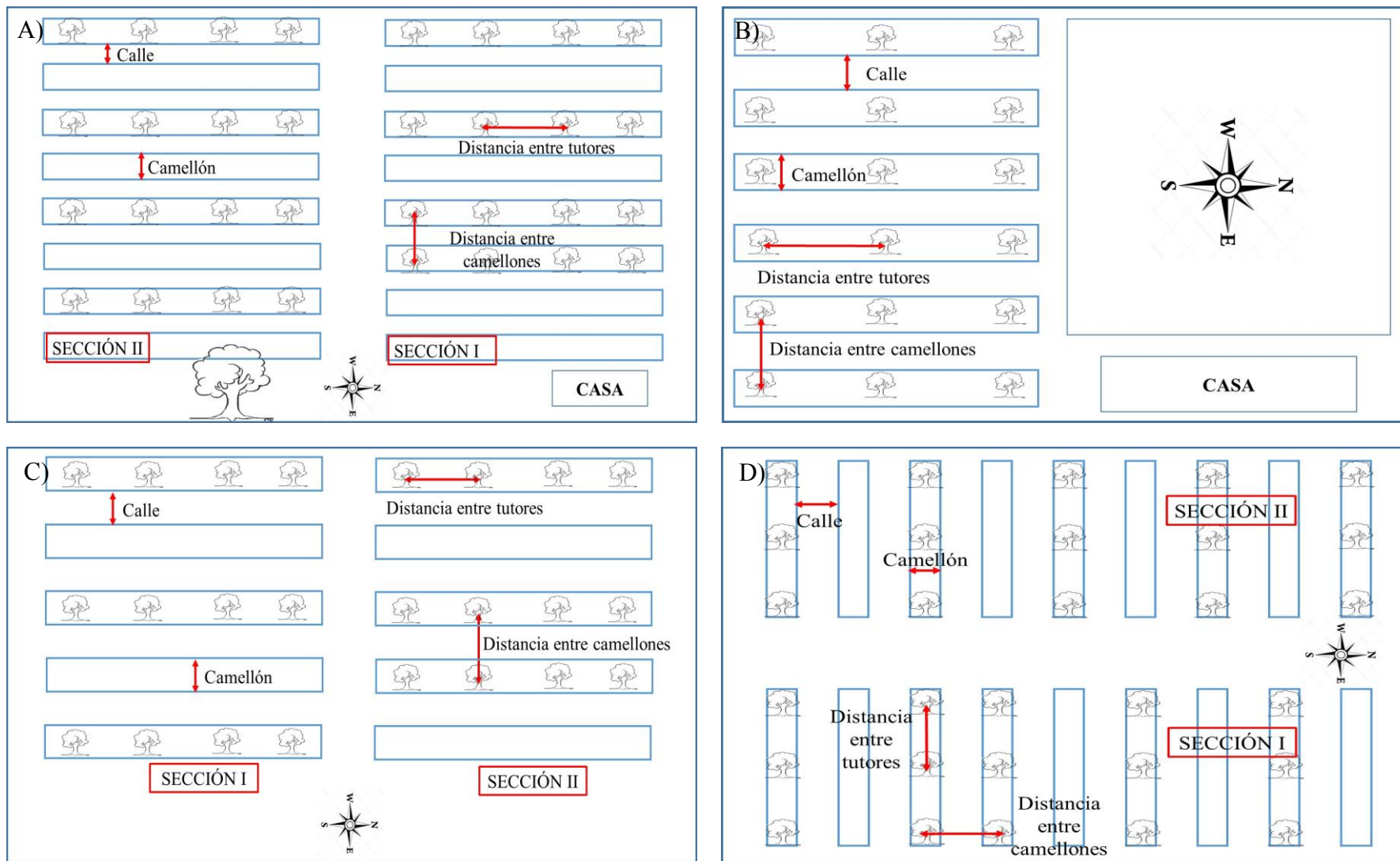


Figura 1.1. Esquema de la orientación y distribución de *Vanilla planifolia* dentro del vainillar, en los sitios de: A) Barriles (Gutiérrez Zamora, Veracruz); B) 20 Soles (Papantla, Veracruz) en ciclo de producción 2018; C) 20 Soles (Papantla, Veracruz) en ciclo de producción 2019; D) Solteros de Juan Rosas (Papantla, Veracruz).



Cuadro 1.2. Variables y códigos considerados para describir la toma de datos en los vainillales.

Variable	Código	Unidad
Altura de planta	AP	m
Altura de tutor	AT	m
Distancia entre tutores	DET	m
Distancia entre camellones	DCam	m
Número de guías por tutor	GxT	Adimensional
Ancho de calle	AnC	m
Ancho de camellón	AnCam	m

### Evaluación de componentes de rendimiento en los vainillales

Durante el periodo de cosecha de los frutos del ciclo de producción 2019, en cada camellón de los vainillales se identificó aleatoriamente 1 m lineal de plantas, donde cada metro correspondió a una repetición. Se obtuvieron 12 repeticiones para Paso de Barriles, 10 para 20 Soles y 18 para Solteros de Juan Rosas. A las 30 semanas después de la polinización se cosecharon todos los frutos presentes en el área marcada en los camellones de cada sitio. Los frutos de cada repetición se identificaron y colocaron en bolsas de papel de estraza (Figura 1.2). Inmediatamente se registraron datos del número y peso total de todos los frutos cosechados, así como el número de macetas. Adicionalmente, se tomó una muestra de entre 20 y 30 frutos de cada repetición, de los cuales se registró el peso individual y dimensiones del fruto (largo, ancho y grosor). A partir de las mediciones realizadas en el vainillal y los frutos se propusieron 16 variables divididas en variables de planta y variables de fruto (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Variables utilizadas para evaluar el rendimiento de frutos de *Vanilla planifolia*.

Código	Variable	Unidad	Código	Variable	Unidad
APlanta	Altura de planta	m	PPF	Peso promedio por fruto	g
G/m <sup>2</sup>	Guías/m <sup>2</sup>	Adimensional	Fru/kg	Frutos/kg	Adimensional
Fru/m <sup>2</sup>	Frutos/m <sup>2</sup>	Adimensional	Fru/G	Frutos/Guía	Adimensional
Mac/m <sup>2</sup>	Macetas/m <sup>2</sup>	Adimensional	Largo	Largo	cm
kgFru/m <sup>2</sup>	kg de fruto/m <sup>2</sup>	kg/m <sup>2</sup>	Anc	Ancho	cm
Fru/M	Frutos/maceta	Adimensional	Gros	Grosor	cm
M/G	Macetas/Guía	Adimensional	LxA	Largo x Ancho	cm <sup>2</sup>
			VolFru	Volumen del fruto	cm <sup>3</sup>
			Rend	Rendimiento	kg/m <sup>2</sup>



Figura 1.2. Muestra de frutos cosechados para evaluación del rendimiento en los vainillales, 2019.

### **Análisis estadísticos**

El análisis estadístico para las variables de rendimiento de fruto se realizó con el paquete estadístico SAS (versión 9.0). Dicho análisis consistió en un análisis de varianza (ANOVA), prueba de medias Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) para las variables evaluadas en planta y en fruto. También se realizó la prueba de correlación de Pearson, donde sólo se muestran las asociaciones con valor absoluto a partir de 0.7. Además, se realizó el análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados para determinar la similitud y la distribución de los vainillales con base en los componentes de rendimiento.

## **1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Características de tres sistemas de manejo de vainilla en la región Totonacapan**

A partir de la entrevista aplicada a los tres productores de vainilla, responsables de los sistemas de manejo en estudio, se describe lo siguiente:

#### **Sistema de manejo 1. Vainillal en Paso de Barriles (Gutiérrez Zamora, Veracruz)**

##### **Sistema de producción:**

El vainillal se encuentra establecido bajo condiciones de malla sombra, se caracteriza por tener en promedio nueve plantas por cada tutor, y es el vainillal con la mayor densidad de guías de los evaluados. El cultivo se estableció hace siete años y el productor eligió el “tarro” o bambú (*Phyllostachys aurea*), como tutor para la vainilla puesto que es una de las especies más

abundantes en la región, además de mostrar gran durabilidad y resistencia a las condiciones del clima (Figura 1.3).

### **Prácticas de manejo:**

Durante el periodo de floración (marzo-mayo) el productor poliniza las flores que alcanzan la antesis. Sin embargo, es habitual la caída de flores luego de ser polinizadas. El productor atribuye este hecho principalmente a los cambios en las condiciones de clima por la transición entre periodos de sequía y lluvia. Otra práctica que realiza el productor en el vainillal es el encauzamiento de guía, que se realiza cuando las guías alcanzan aproximadamente 2 m de altura, o cuando llegan a nivel de suelo. La fertilización de las plantas consiste en la aplicación foliar y al voleo de productos químicos a base de micronutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) complementada con fertilización orgánica, principalmente composta. Esta práctica se realiza de manera más intensa a partir del inicio de la floración con una frecuencia quincenal hasta el final del desarrollo del fruto.

El riego aplicado a este sistema de manejo se da mediante aspersores en la parte superior de las plantas. Sin embargo, las prácticas de riego cambian dependiendo de la etapa del ciclo de cultivo. Por lo general se aplica durante las primeras horas del día (aproximadamente entre las 6 y 7 a.m.), con una duración de 1.5 a 2 h cada dos o tres días. Durante la temporada de lluvia se aplica riego de auxilio una vez cada dos semanas. En el periodo de floración el riego se realiza mediante aspersores para evitar que el suelo se humedezca en exceso y dificulte la polinización manual por la formación de lodo. Mientras que durante el desarrollo de fruto el riego se realiza a pie de planta para evitar la aparición de enfermedades en los frutos. A lo largo de este periodo el riego se realiza de manera constante para proveer de suficiente agua a la planta y alcanzar el máximo desarrollo de los frutos.

En lo referente a la presencia y manejo de plagas y enfermedades, el productor señala que las principales enfermedades que se presentan en el cultivo son hongos como *Aspergillus* y *Fusarium*. El método de control de estas enfermedades por parte del productor se da mediante la aplicación de una mezcla de cobre y cal, fungicidas químicos como Bavistín® (en las dosis recomendadas por la marca), y el corte y remoción de las plantas enfermas del vainillal.

### **Cosecha de frutos:**

Los frutos se cosechan cuando alcanzan la madurez, aproximadamente en el mes de noviembre, aunque el corte se puede prolongar hasta diciembre puesto que el precio de los frutos incrementa al tener mayor madurez. El productor considera que la principal característica física que determina la adecuada madurez de los frutos es el cambio en su coloración a tonalidades amarillentas. Así mismo, considera que cosechar los frutos con la madurez adecuada (8 ó 9 meses posteriores a la polinización) permite un mejor beneficiado con lo que se obtienen mejores características aromáticas y mayor producción de aceites que le aporten brillo a los frutos beneficiados.

### **Problemas identificados por el productor:**

El productor en este sistema de manejo señala que durante el periodo de desarrollo del fruto se presenta caída prematura de entre el 5 y 10 %. Al igual que la caída de flor, atribuye el aborto de fruto a los cambios en el clima o dificultades en el sistema de riego, esto último debido a que la acumulación de agua en los frutos promueve la aparición de enfermedades.



Figura 1.3. Vainillal ubicado en Paso de Barriles bajo sistema de malla sombra (Gutiérrez Zamora, Veracruz), 2019.

## **Sistema de manejo 2. Vainillal en 20 Soles (Papantla, Veracruz)**

### **Sistema de producción:**

El vainillal establecido en 20 Soles tiene una edad de cuatro años y se estableció en un sistema de manejo en acahual con una densidad de sólo una planta por tutor. El productor de este vainillal utiliza como tutores para el cultivo de vainilla la chaca (*Bursera simaruba*), pata de vaca (*Bauhinia forticata*) y laurel (*Laurus nobilis*), debido a su rápido crecimiento y fácil adaptación al ambiente. No obstante, dado el establecimiento de este sistema también cuentan con árboles de mayor altura que no desempeñan la función de tutor, sino que proporcionan sombra al cultivo. De manera que se realice la poda tres veces al año mediante la apertura de “ventanas” en los árboles, es decir, realiza una poda ligera que permita el paso de luz a través del follaje (Figura 1.4).

### **Prácticas de manejo:**

EL productor realiza el encauzamiento de guía cuando la guía alcanza aproximadamente 2 m de altura, ya que facilita el manejo de la planta en las diferentes etapas de desarrollo. La fertilización es foliar química a base de micronutrientes (N, P y K) dos veces al mes. Con respecto a la incidencia de plagas o enfermedades, el productor señala que se han presentado en su cultivo *Fusarium*, roya o antracnosis y afectar la calidad física de los frutos. Por lo que recurre a la aplicación de fungicidas químicos como Carbendazim® y sulfato de cobre como medio de control

El riego se aplica mediante dos sistemas, goteo en la base de la planta y micro aspersión en la parte superior para mantener la humedad relativa en el cultivo. Suele aplicarse durante la mañana y la tarde para lograr un mayor aprovechamiento del agua. Esta práctica se realiza por lo general cada tercer día o diariamente, si el cultivo lo requiere. El riego se realiza de manera más intensiva durante el periodo de amarre y desarrollo de fruto, usualmente entre mayo-agosto puesto que son los meses más calurosos.

### **Cosecha de frutos:**

El productor asocia características físicas como el cambio de un color verde brillante a un tono amarillo opaco en el fruto, como uno de los indicadores de óptima madurez de los frutos, la cual

se alcanza a los 8 ó 9 meses luego de la fecundación de la flor. La cosecha puede prolongarse hasta diciembre o enero, ya que el productor considera que los frutos presentan mejores características aromáticas luego de ser beneficiados con lo que obtienen un mayor precio de venta, esto debido a que su producción está más enfocada al mercado gourmet.

### **Problemas identificados por el productor:**

Durante el periodo de polinización el productor ha observado la caída de flor, lo cual atribuye a la falta de viabilidad en el polen, falta de polen (mala polinización), caída natural y exceso/falta de lluvia. En lo referente al periodo de desarrollo de fruto, el productor menciona que una vez transcurrido el periodo crítico de fecundación y amarre de fruto (aproximadamente 45 días después de la polinización) no se presentó caída de fruto, lo que asegura la producción. No obstante, los factores que considera podrían favorecer la caída de fruto durante su desarrollo, son la alta temperatura y las variaciones drásticas en la humedad del ambiente. El productor considera que existen factores que pueden afectar la calidad física del fruto luego de la cosecha, tales como el manejo postcosecha. Es decir, el acopio de frutos previo al beneficio requiere extender los frutos en petates de palma para mantenerlos aireados y evitar la aparición de hongos.



Figura 1.4. Sistema de manejo establecido en el rancho 20 Soles en condiciones de acahual (Papantla, Veracruz), 2019.

### **Sistema de manejo 3. Vainillal en Solteros de Juan Rosas (Papantla, Veracruz)**

#### **Sistema de producción:**

El vainillal de Solteros de Juan Rosas tiene ocho años de establecido y lo mantiene como una actividad complementaria, se encuentra en condiciones de malla sombra con tutores vivos de pichoco cimarrón (*Erythrina herbacea* L.) y presenta una densidad promedio de siete plantas por tutor. El productor eligió este tutor por mantener el follaje y proteger a las plantas durante todo el ciclo de cultivo. La poda de tutores se realiza en promedio dos veces al año entresacando 1 ó 2 ramas de los árboles para que las plantas puedan recibir suficiente luz (Figura 1.5).

#### **Prácticas de manejo:**

Algunas de las prácticas de manejo que realiza el productor son el encauzamiento de guía a una altura aproximada de 3 m, considerando que los tutores permiten este manejo. Otra práctica es la fertilización, particularmente orgánica, mediante la incorporación de vermicomposta aplicada al voleo a la base del tallo. En cuanto al riego, se utiliza agua de manantiales cercanos al cultivo que se almacena en una cisterna, y se aplica por aspersión con una duración de aproximadamente una hora cada cuatro o cinco días, dependiendo de las necesidades del cultivo, principalmente en la temporada de seca o en los periodos más calurosos. El riego se suspende durante la temporada de lluvias. Las principales enfermedades o plagas del cultivo son la roya, la pudrición de raíz, *Fusarium* y hormigas negras. Para su control se utilizan productos químicos y orgánicos como el caldo bordelés (sulfato cúprico y cal), Benomilo® (plaguicida), y una mezcla de extracto de neem (*Azadirachta indica*), higuerrilla (*Ricinus communis*) y flor de campana (*Brugmansia candida*).

#### **Cosecha de frutos:**

La temporada de cosecha en este vainillal inicia después del 12 de diciembre, ya que según indica el productor, esta fecha la establece el diario oficial de la federación (DOF). Sin embargo, la fecha se puede modificar por factores relacionados con la seguridad ya que se han presentado casos de robo a otros productores. El productor asocia la madurez de los frutos con el cambio en la coloración; y atribuye con características físicas como el tamaño (longitud), el calibre (grosor) y el peso de los frutos con su calidad para la venta. El productor considera que la madurez del

fruto es un factor de gran importancia para tener mejores características al ser beneficiados. Los frutos cosechados se mantienen en arpillas de plástico para mantenerlas aireadas hasta el momento del traslado para su venta, la cual se realiza el mismo día del corte o al día siguiente para evitar que los frutos pierdan peso.

### **Problemas identificados por el productor:**

Durante la floración se presenta una importante caída de flores polinizadas, lo que el productor asocia con la falta de nutrientes, las altas temperaturas y cambios en el ambiente, particularmente el cambio entre los periodos de sequía, altas temperaturas y lluvia. En este vainillal, alrededor del 10 % de las flores polinizadas sufren caída. En el ciclo 2019 la caída de flor se incrementó aproximadamente 50 % por la intensa sequía. También considera que la deficiencia de minerales en el suelo junto con la presencia en enfermedades como la roya puede propiciar la caída de flor y fruto así como afectar su calidad. Este productor se caracteriza por registrar el inicio y término de la floración, y un conteo del número de frutos caídos a lo largo del ciclo. Esta actividad, aunque extenuante, le permite tener un mayor control de la producción que tendrá en cada ciclo agrícola.



Figura 1.5. Vainillal con sistema de manejo en malla sombra con tutores vivos ubicado en Solteros de Juan Rosas (Papantla, Veracruz), 2019.

En el Cuadro 1.4 se presenta un análisis comparativo de los tres vainillales evaluados.



## Análisis comparativo de los tres sistemas de manejo de vainilla en la región Totonacapan

Cuadro 1.4. Comparación de las unidades de producción con base en el sistema de manejo.

	Semejanza	Diferencia
Sistema de manejo	Los vainillales ubicados en Barriles y Solteros de Juan Rosas presentan sistemas de manejo en condiciones de malla sombra.	El vainillal de 20 Soles se encuentra establecido en condiciones de acahual (características similares a una condición natural). No obstante, cuenta con un sistema de riego al igual que el establecido en Barriles
Tipo de tutor/poda	Los productores de 20 Soles y Solteros de Juan Rosas establecieron su vainillal con tutores, realizan poda de los tutores 2 o 3 veces al año, dependiendo de los requerimientos. La elección de tutor depende de las características del mismo como follaje, capacidad de adaptación y rápido crecimiento.	El vainillal ubicado en Barriles utiliza tutores inertes (bambú), por lo que la poda no se realiza. La decisión de utilizar este tutor se basa en la durabilidad y abundancia de la especie en la región. El vainillal en 20 Soles utilizada árboles que no actúan como tutor, sino para proporcionar sombra al cultivo.
Densidad de plantas	Los vainillales de Barriles y Solteros de Juan Rosas son los que presentan mayor densidad de plantas con 9 y 7 plantas por tutor, respectivamente. Lo que puede representar una mayor producción de fruto.	A diferencia de los otros dos vainillales, el establecido en 20 Soles mantiene sólo una planta por tutor. Esto con el objetivo de facilitar el manejo del cultivo en caso de que alguna planta presente señales de enfermedad.
Prácticas de manejo	El encauzamiento de guía se realiza a una altura que permite un manejo accesible de la planta para labores como poda, polinización o cosecha, esto es entre los 2 y 3 m de altura o cuando la guía llega al suelo.	El productor en el vainillal de Solteros de Juan Rosas se caracteriza por aplicar en su mayoría productos elaborados a base de productos naturales para atacar las enfermedades de las plantas. De igual manera, aplica de manera constante fertilización orgánica (vermicomposta).

Cuadro 1.4. Continuación...

	Semejanzas	Diferencias
Riego	El riego en los tres sistemas de manejo se aplica mediante aspersión ya sea durante las primeras horas de la mañana o por la tarde, generalmente cada tercer día. Esta actividad se realiza de manera más intensa durante los periodos de sequía y temporadas más calurosas. No obstante, en el caso de Solteros de Juan Rosas y 20 Soles, se suspende esta actividad durante el periodo de lluvias.	A diferencia de los otros sistemas de manejo, 20 Soles combina el riego por aspersión en la parte alta y el goteo en la base de la planta. Por otra parte, el riego en Barriles tiene una duración de 1.5 a 2 h, mientras que en los dos sistemas restantes sólo es de una hora. Así mismo, durante la temporada de lluvias se sigue aplicando el riego de manera esporádica, aproximadamente una vez cada dos semanas
Cosecha de frutos	Los productores tienen definido el periodo de corte de los frutos, ya sea por fechas señaladas por el Consejo Estatal de Productores de Vainilla Veracruzana o por criterio del productor basado en las características físicas del fruto.	El productor de 20 Soles realiza la cosecha de frutos considerando no sólo la madurez y las características físicas del fruto (tonalidad amarillenta del fruto). También considera que los frutos con mayor madurez presentarán también mayor concentración de vainillina, lo que implica un precio de venta mayor.
Calidad de fruto	Los productores coinciden en que las características físicas que presenta un fruto de calidad son el color, el tamaño y que no presente defectos aparentes como manchas.	El productor del vainillal en Solteros de Juan Rosas considera el peso y calibre (grosor) del fruto como otra característica física importante. Estos aspectos influyen en la venta de los frutos, ya que la retribución económica está dada por el peso de los frutos.
Problemas en el vainillal	Los problemas detectados en los tres sistemas de manejo se centran en la caída prematura de flor y fruto, aspectos que atribuyen a cambios climáticos, aumento de temperatura, falta/exceso de lluvia. Las enfermedades que se han presentado en los vainillales son roya, antracnosis, hongos como <i>Fusarium</i> y <i>Aspergillus</i> . El principal manejo que se da a las plantas enfermas es la remoción y la aplicación de productos químicos.	Para llevar el control de la cantidad de frutos caídos durante todo el ciclo de producción, el productor de Solteros de Juan Rosas realiza un conteo diario de las flores polinizadas desde el inicio de la floración hasta la cosecha de frutos.

Los sistemas descritos anteriormente presentan características contrastantes en términos del manejo y la distribución de plantas. Las labores en el vainillal dependen del sistema de manejo, la edad de la planta, el ambiente (temperatura, precipitación, humedad relativa) y el propósito de venta del dueño del vainillal.

Como señala Hernández-Hernández (2011), el sistema de acahual presenta baja densidad de plantas sin riego y con pocas actividades de manejo, por lo que el rendimiento es bajo, como es el caso de 20 Soles. Mientras que en sistemas de manejo con producción intensiva, como se observa en Barriles y Solteros de Juan Rosas, manejan una alta densidad de plantas y se estima un mayor rendimiento de frutos. Sin embargo, las prácticas de manejo en 20 Soles le proporcionan un gran potencial de producción de fruto aún con la baja densidad de plantas, a diferencia de Solteros de Juan Rosas donde a pesar de tener una importante cantidad de plantas, determinadas prácticas de manejo, como la poca ventilación en el vainillal fomentan la aparición de enfermedades.

En el sistema de malla sombra se recomienda que la malla se establezca a una altura de entre 3 y 5 m para promover la circulación de aire en el vainillal puesto que se encuentra en un espacio confinado (Hernández-Hernández 2011) y es el sistema con mayor incidencia de enfermedades como *Fusarium spp.* y *Antracnosis spp.* (Barrera-Rodríguez *et al.* 2009) como es el caso de Solteros de Juan Rosas.

Una característica importante que menciona Damirón-Velázquez (2004) en sistemas intensivos como la malla sombra es el uso de tutores muertos o inertes, pues considera que el tutor sólo proporciona soporte a la planta. No obstante, los productores indican que la vainilla puede llegar a obtener nutrientes del tutor a lo largo de su desarrollo (Barrera-Rodríguez *et al.* 2009).

Al igual que Hernández-Hernández (2011), los productores de los tres sistemas de manejo evaluados señalan que, en general, las principales características que debe tener un tutor (dependiendo si es vivo, artificial o inerte) es que sea fácil de propagar, mantener el follaje, y ser resistente al peso de la planta, a plagas y enfermedades. En lo referente al manejo de tutores y sombreado Ranadive (2005) y Hernández-Hernández (2011) indican que la poda de tutores vivos debe realizarse de 2 a 3 veces al año, de manera que durante la temporada de floración y polinización el sombreado sea de 70 % a 80 % para evitar quemaduras en las plantas por el exceso de sol y la pérdida de humedad, mientras que en la temporada de lluvias el porcentaje de

sombra se mantenga entre 30 % y 50 %. De igual manera, Damirón-Velázquez (2004) sugiere que los tutores se poden cuando alcanzan los dos metros de altura para que les permita formar ramas laterales que distribuyan de manera más eficiente la sombra.

El manejo de tutores y sombra es uno de los factores de mayor importancia en la producción de vainilla, ya que plantas que están muy sombreados o con demasiada luz son más propensas a enfermarse o a presentar dificultades durante el ciclo de cultivo (Ranadive 2005). Por ejemplo, en 20 Soles y Solteros de Juan Rosas la poda de tutor se realiza mediante la apertura de “ventanas” que permitan el ingreso de luz, no obstante, uno de los problemas observados en este último vainillal fue la demora en la diferenciación floral puesto que había un exceso de sombra. A diferencia de Barriles, donde el manejo de sombra se da únicamente al retirar o incorporar mallas sobre la estructura que las soporta, dependiendo de las necesidades del cultivo.

Aunado al manejo del tutor, el encauzamiento de guía, que por lo general se realiza a 2 m o a la altura del tutor, es importante para facilitar las actividades de polinización y cosecha. Además, esta práctica promueve la floración y formación de nuevos brotes (Hernández-Hernández 2011). En este aspecto, Barriles y Soltero de Juan Rosas son los vainillales con plantas de mayor porte, por lo que prácticas como la polinización y cosecha implican más tiempo que en 20 Soles no sólo por la cantidad de guías por tutor, sino también por la dificultad para acceder a las flores y frutos de las partes más altas.

Respecto a la densidad de guías, Sánchez-Morales *et al.* (2001) señalan que cuatro plantas o esquejes por tutor son lo más recomendable porque permiten el correcto encauzamiento de guías, debido a que mantiene una mejor ventilación entre ellas. Una densidad alta de guías puede tener en ocasiones un efecto negativo en el rendimiento ya que las guías más expuestas presentarán mayor cantidad de brotes florales que aquellas que se encuentran en el interior (Barrera-Rodríguez *et al.* 2009). Esto se observó en Barriles, donde los frutos se encontraron principalmente en la parte más expuesta de las plantas, y escasamente en las áreas más internas, además de que se obtuvieron frutos de menor tamaño que en los otros sitios.

Algunas de las dificultades más comunes que se presentan durante el ciclo de cultivo de la vainilla son la caída de flor y fruto puesto que tienen un efecto directo en la producción (Iglesias-Andreu *et al.* 2014). La caída se da aproximadamente al mes y medio después de la polinización

(principalmente en junio) después de intensas lluvias, y puede variar entre el 15 y 90%, dependiendo del sistema de manejo (Hernández-Hernández 2011). En este caso, Solteros de Juan Rosas fue el vainillal con mayor caída de flor y fruto debido principalmente a enfermedades.

En los tres sistemas evaluados se presenta la caída de flor, argumentan que los cambios climáticos son uno de los factores de mayor influencia. Lo cual se relaciona con lo que mencionan Anandaraj *et al.* (2005) y Hernández-Hernández (2011), donde la caída de flor o fruto se manifiesta cuando la temperatura supera los 32 °C y hay baja humedad relativa (< 80 %) durante los meses de mayor intensidad solar, lo que causa un desbalance fisiológico por el estrés térmico y la disminución en la humedad relativa. En 20 Soles y Barriles la caída de flor, a pesar de ser sistemas de manejo diferentes, fue de aproximadamente 15 %, mientras que en Solteros de Juan Rosas fue el sistema más afectado puesto que para el ciclo evaluado (2019) se observó una caída de flor cercana al 50 %. Por su parte, Borbolla-Pérez *et al.* (2016) mencionan que la principal causa de la caída de fruto es el bajo nivel de precipitación en el periodo de desarrollo de fruto, exceso de sombreado, daños en las estructuras vegetativas y altas temperaturas.

Por otra parte, el manejo de plagas y enfermedades dependerá de las características del patógeno y la cultura del productor. Un ejemplo de esto es lo que mencionan los productores de la Huasteca Potosina, los cuales manejan las plagas en su vainillal de manera manual quitando las partes afectadas, o mediante la aplicación de productos orgánicos y químicos, en la mayoría de los casos se recurre a aplicar aceite de neem para la chinche roja, Carbendazim® y caldo bordelés para *Fusarium*; así como oxiclورو de cobre para la antracnosis (SAGARPA 2012).

Los métodos de control de plagas en los tres vainillales estudiados son variables, por ejemplo, Solteros de Juan Rosas se caracteriza por quitar las plantas y hojas enfermas junto con la aplicación de extractos naturales a base de plantas, caldo bordelés, o productos químicos como el Benomilo®. A diferencia de este vainillal, 20 Soles y Barriles utilizan en su totalidad productos químicos como Bavistín®, Carbendazim® y sulfato de cobre.

Con base en el estudio realizado por Borbolla-Pérez *et al.* (2016) la diversidad de prácticas pueden limitar la producción puesto que ciertas características en el manejo agronómico no están bien definidas. Así mismo, señalan que el escaso conocimiento en el manejo de plagas y

enfermedades resulta poco eficiente en su control, por lo que recurren a prácticas como la remoción e incineración de plantas afectadas.

La cosecha de los frutos de acuerdo con lo que reporta Hernández-Hernández (2014) se inicia aproximadamente el 10 de diciembre, determinado por los acuerdos establecidos en la asociación de productores y beneficiadores. Sin embargo, la cosecha se puede escalonar durante 2 o 3 meses esperando que las flores que se polinizaron al final alcancen la madurez (Damirón-Velázquez 2004). El índice de cosecha es el principal parámetro para realizar el corte de los frutos, esto es, cuando alcanzan su madurez comercial que viene dada por la coloración amarillenta en el ápice (SAGARPA 2012; Hernández-Hernández 2014). En el caso de los vainillales evaluados, la fecha para cosechar es variable de acuerdo con el criterio y objetivos específicos del productor, aunque también se toma como referencia la fecha acordada por el Consejo Estatal de Productores de Vainilla Veracruzana A.C. P. No obstante, mientras que en Solteros de Juan Rosas y Barriles realizan la cosecha en periodos muy similares durante el mes de noviembre, la cosecha en 20 Soles se puede prolongar hasta los meses de enero o febrero esperando que los frutos estén más maduros para facilitar el beneficiado y acumulen una mayor cantidad de compuestos aromáticos como la vainillina.

Llegado el periodo de cosecha, lo recomendable es cortar los frutos junto con el raquis para evitar su deshidratación, y mantenerlos en lugares frescos y sombreados para evitar que pierdan peso (Damirón-Velázquez 2004). En los vainillales evaluados, la cosecha de frutos se realiza bajo estas condiciones aun cuando la venta se realiza ya sea el mismo día o el posterior al corte; o bien, como es el caso de 20 Soles para iniciar el proceso de beneficiado. Barrera-Rodríguez *et al.* (2009) mencionan que para los productores de la Región Totonacapan una de las principales características de calidad que atribuyen a los frutos de vainilla es el tamaño. Cabe destacar que los productores de los vainillales evaluados adicionan como parámetro de calidad el color amarillento del fruto (índice de cosecha), el calibre (grosor del fruto), y el peso ya que la cotización de su cosecha varía dependiendo del peso.

### **Distribución espacial de los sistemas de manejo**

Las Figuras 1.6A y 1.6B muestran la distribución de plantas y tutores en cada vainillal, de acuerdo con las siguientes variables:

- Altura de planta: las plantas establecidas en Solteros de Juan Rosas presentaron una altura que oscila entre los 2.5 y 3 m. Por su parte, el vainillal de Barriles mostraron mayor variación ya que 27 % de las plantas se encuentran a una altura de 1.6 a 2 m, 67 % de 2.1 a 2.5 m y 10 % entre 2.6 y 3 m. Mientras que las plantas de 20 Soles son las que presentan menor altura de los tres sistemas evaluados, ya que el 87 % de las plantas tuvieron una altura de 1.6 a 2 m, lo que facilita prácticas como polinización, encauzamiento de guía y cosecha al realizar el corte de frutos de manera más eficiente.
- Altura de tutor: la mayor variación se encontró en Solteros de Juan Rosas, debido a que utiliza tutores vivos en su sistema de manejo. Las medidas de los tutores fueron 10 % de tutores con 2-3 m, 70 % 3-4 m y 20 % de 4-4.5 m de altura. En el vainillal de Barriles 63 % de los tutores se encuentran a 1.9 m de altura y 37 % a 2.5 m, en promedio. A diferencia de los sistemas de manejo anteriores, el vainillal de 20 Soles presenta los tutores de menor altura con un valor promedio de 1.7 m.
- Distancia entre tutores: la distribución en Barriles indica que 23 % de los tutores se distribuyen a 0.7 m de distancia entre sí, mientras que 77 % se encuentran a 1.3 m de distancia, en promedio. En 20 Soles 90 % de sus tutores están establecidos a 0.6 m de separación y sólo 10 % a 1.2 m de distancia. Mientras que en el vainillal de Solteros de Juan Rosas 40 % de los tutores presentan una separación promedio de 0.8 m y 60 % de 1.1 m.
- Distancia entre camellones: En Barriles 97 % de los camellones se encuentran a una distancia promedio de 2.3 m. En contraste, en Solteros de Juan Rosas 80 % de los camellones muestran una separación promedio de 1.25 m y 20 % tienen 0.9 m de separación. En el caso de 20 Soles, es el vainillal con mayor separación entre camellones debido a que en su totalidad se encuentran a una distancia promedio de 2.7 m.
- Ancho de camellón: en promedio en Barriles se encontró que 67 % de los camellones tienen en promedio 1.5 m de ancho y el 33 % tienen una longitud aproximada a los 2.5 m. En Solteros de Juan Rosas la mayoría de camellones (90 %) tiene una longitud promedio de 1.3 m y sólo 10 % presenta una anchura aproximada a los 0.95 m. Mientras que en 20 Soles los camellones son más estrechos, con aproximadamente 0.7 m de longitud.
- Ancho de calle: en Barriles el 20 % de las calles del vainillal tienen una anchura aproximada a 0.95 m, mientras que el 80 % mostró una longitud de 1.23 m. En el caso de

20 Soles 87 % de las calles tuvieron 1.9 m de ancho promedio y 23 % un ancho de 2.3 m. Por su parte, Solteros de Juan Rosas tuvo las calles más anchas, con una longitud promedio de 2.4 m.

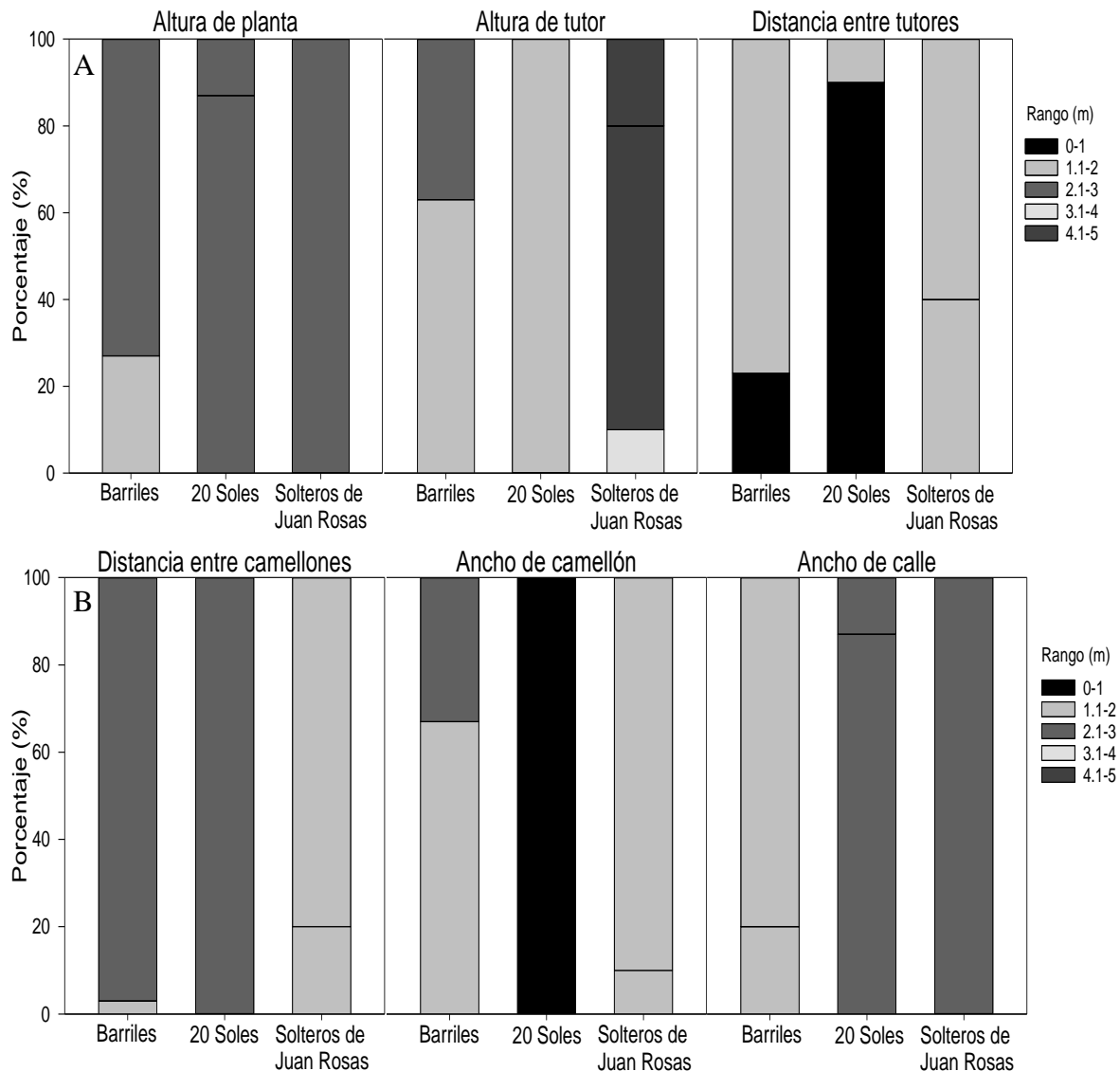


Figura 1.6. Medidas de distribución de plantas en tres sistemas de manejo de vainilla en el Totonacapan, México. A) Distribución y altura de plantas, B) Distribución de tutores.

Aunque las distancias utilizadas en la distribución de plantas y tutores dentro de un vainillal son variables, la separación entre ellos debe promover una adecuada ventilación, suficiente penetración de luz y un fácil manejo y control de enfermedades (Kasdiannan y Dinesh 2008).

De acuerdo con Hernández-Hernández (2011) la distribución de plantas en sistemas de monocultivo establecidos en México puede tener un arreglo de 1 x 2 m, 2 x 2 m, 1.5 x 2.5 m, y 3 x 3 m; lo que puede permitir un mayor rendimiento. A diferencia de un sistema establecido bajo



naranja, la distancia entre plantas y tutores sugerida puede ser de 4 x 4 m, 5 x 5 m, 6 x 6 m o 7 x 7 m. Sin embargo, De la Cruz-Medina *et al.* (2009) sugieren que la separación sea de 1 m entre tutores y 2 m entre hileras.

En sistemas establecidos en malla sombra la separación comúnmente utilizada es de 1 o 1.5 m para facilitar la movilidad dentro del cultivo, aunque se prefieren distancias de 1.8 a 2 m para permitir el manejo del cultivo cuando se incorpora mecanización. Esta última condición brinda el mejor balance entre el incremento del rendimiento y la distancia favorable para evitar la presencia de enfermedades en el cultivo (Exley 2011).

Con respecto a la distribución dentro del vainillal, fue notable que en 20 Soles se da una mayor aeración del cultivo no sólo por la separación entre camellones, sino también por encontrarse establecido en condiciones de acahual y la baja densidad de plantas (1 esqueje/tutor). Lo que disminuye los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades. También facilita el acceso para actividades de limpieza, reemplazo de plantas y cosecha. Por su parte, el hecho de que Barriles tenga una alta densidad de plantas puede limitar la aeración dentro del cultivo, sin embargo, su distribución permite un flujo constante de aire. Mientras que Solteros de Juan Rosas, aun con la separación entre plantas y camellones, presenta enfermedades en las plantas ya que los tutores vivos tienen mucho follaje y la malla sombra cubre los cuatro extremos del vainillal hasta el nivel del suelo para evitar el acceso de animales que puedan dañar el cultivo, lo que limita la adecuada aeración del cultivo. No obstante, este vainillal tiene la mayor separación entre hileras de plantas, lo que facilita el manejo del cultivo,

El manejo de altura de plantas y tutores es variable y es usual que el manejo se realice a una altura de aproximadamente 2 m, ya que facilita prácticas de manejo como polinización y cosecha (Hernández-Hernández 2011). Estas mismas características para el manejo de altura de plantas y tutores se realizan en Costa Rica (Varela-Quirós 2011). No obstante, Exley (2011) señala que las plantaciones en Australia suelen manejarse a una altura de 3 m.

Los productores de 20 Soles y Barriles aplican las prácticas de manejo de altura de manera similar a lo que señalan Hernández-Hernández (2011) y Varela-Quirós (2011). Sin embargo, en el caso particular de 20 Soles el bajo porte de plantas y tutores permite que la polinización, cosecha y encausamiento de guía se realice más rápido al no requerir el uso de escaleras para

acceder a las flores o frutos de las zonas más altas. Por otra parte, las plantas en Barriles se encuentran a mayor altura que las de 20 Soles. Ya que una parte importante de las inflorescencias se encuentran en la parte superior del cultivo suelen utilizarse escaleras para acceder a ellas, a los frutos o para encausar las guías durante el ciclo de cultivo. El vainillal en Solteros de Juan Rosas tuvo las plantas de mayor porte, por lo que en este caso se requieren escaleras para alcanzar las inflorescencias y frutos de las partes más altas, como se dio en el caso de Barriles. Además, dado que utiliza tutores vivos de gran altura algunas de las guías pueden incluso superar los 3 m de altura saliendo del alcance del productor para su manejo.

Con respecto a la distribución de plantas dentro de los vainillales, se observó que los camellones más angostos se encuentran en 20 Soles, es decir, las plantas cuentan con menor espacio para crecer. Mientras que Barriles y Solteros de Juan Rosas presentan camellones de mayor longitud, esto aunado a que son los sistemas de manejo con mayor densidad de plantas y requieren mayor espacio para su establecimiento. El tener camellones de mayor longitud permite una mayor incorporación de materia orgánica o acolchado que contribuye a retener la humedad del suelo y favorece el desarrollo de nuevas raíces.

### **Variables de rendimiento de fruto y sus componentes en los sistemas de manejo**

La producción de frutos de vainilla mostró grandes variaciones en los componentes de rendimiento evaluados en cada sistema de manejo. Como se indica en el Cuadro 1.5, las 16 variables o componentes de rendimiento mostraron diferencias estadísticas altamente significativas ( $P < 0.001$ ). El coeficiente de variación osciló entre 5 y 34 %, donde guías/m<sup>2</sup> (26.30 %), frutos/m<sup>2</sup> (33.32 %), macetas/guía (21.91 %) y frutos/guía (21.58 %) fueron las variables con el coeficiente de variación más alta. Mientras que largo (5.44 %), ancho (6.42 %), grosor (6.077 %), largo x ancho (9.7 %) y altura de planta (9.72 %) mostraron el menor coeficiente de variación.

Cuadro 1.5. Análisis de varianza para variables de producción de fruto de vainilla evaluados en tres sistemas de manejo en el Totonacapan, México.

Variable	Media	CV (%)	Cuadrados medios	
			Sitio	Error
Altura de planta	2.47	9.72	8.01***	0.058
Guías/m <sup>2</sup>	12.88	26.30	1555.66***	11.479
Frutos/m <sup>2</sup>	74.59	33.32	46899.24***	617.655
Macetas/m <sup>2</sup>	11.30	19.57	234.05***	4.893
kg de fruto/m <sup>2</sup>	0.68	19.20	2.25***	0.017
Frutos/maceta	5.92	17.52	92.95***	1.076
Macetas/Guías	2.46	21.91	167.03***	0.290
Peso promedio por fruto (g)	10.65	14.87	81.09***	2.510
Frutos/kg	99.89	15.86	9026.09***	251.010
Frutos/Guía	15.83	21.58	8195.36***	11.678
Largo (cm)	16.59	5.44	56.02***	0.814
Ancho (cm)	1.09	6.42	0.14***	0.005
Grosor (cm)	0.88	6.07	0.09***	0.003
Largo x Ancho (cm <sup>2</sup> )	18.20	9.97	158.73***	3.290
Volumen del fruto (cm <sup>3</sup> )	16.26	15.48	242.79***	6.332
Rendimiento (kg/m <sup>2</sup> )	0.70	16.72	2048677.77***	13580.005

\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001; CV: Coeficiente de variación

La prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) indicó variación entre las variables evaluadas (Cuadro 1.6 A y 1.6 B). En las variables de planta se observó que estadísticamente los tres sitios son diferentes, no obstante, en la relación macetas/guía y macetas/m<sup>2</sup>, Barriles y Solteros de Juan Rosas son estadísticamente iguales.

Con respecto a las variables evaluadas en planta Solteros de Juan Rosas se caracterizó por tener las plantas de mayor altura con un valor promedio de 3.16 m, seguido de Barriles con 2.17 m y 20 Soles con 1.64 m. Barrera-Rodríguez *et al.* (2011) indican que un promedio de cuatro esquejes por tutor permite un adecuado encauzamiento de guía, ventilación y cantidad de sombra. El principal impacto que puede tener una alta densidad de guías en el rendimiento de fruto se refleja no sólo en la longitud y peso de los frutos, sino también en que la floración se da principalmente en la parte más expuesta de las plantas y en menor grado en la parte interna dando una menor producción de fruto. Barriles es el sistema de manejo con mayor densidad de plantas con un promedio de 25 guías/tutor, Solteros de Juan Rosas tiene en promedio 11 guías/ tutor, aproximadamente la mitad que Barriles. En cambio, 20 Soles tuvo sólo 1 guía/tutor, con lo cual es el sistema de manejo con menor densidad de plantas. En el índice macetas/m<sup>2</sup> 20 Soles y

Solteros de Juan Rosas son estadísticamente iguales con 10 y 8 macetas/m<sup>2</sup>, respectivamente, mientras que Barriles tuvo 16 macetas/m<sup>2</sup>.

La relación frutos/m<sup>2</sup> indica que Barriles es el vainillal con mayor producción de fruto por unidad de superficie (145 frutos/m<sup>2</sup>). No obstante, Solteros de Juan Rosas tuvo una densidad alta de plantas con baja producción, mostrando un promedio de 29 frutos/m<sup>2</sup>. En contraste, aún con una baja densidad de plantas (1guía/tutor), 20 Soles tuvo una producción promedio de 67 frutos/m<sup>2</sup>, lo que representa aproximadamente la mitad de producción de Barriles. Esta tendencia se observó también para la relación kg de fruto/m<sup>2</sup>, ya que Barriles mostró valores de 1.07 kg de fruto/ m<sup>2</sup>, mientras que 20 Soles y Solteros de Juan Rosas indicaron valores de 0.86 y 0.31 kg de fruto/m<sup>2</sup>, respectivamente.

El sistema de manejo con mayor densidad de frutos por maceta es Barriles (9 frutos/maceta), seguido de 20 Soles (7 Frutos/Maceta) y Solteros de Juan Rosas (4 frutos/maceta). Finalmente, en la relación macetas/guía Barriles y Solteros de Juan Rosas son estadísticamente iguales con 1 maceta/guía, mientras que 20 Soles presentó una proporción mayor con 7 macetas/guía. Uno de los parámetros de mayor importancia en el rendimiento es la cantidad de frutos/m<sup>2</sup>, ya que esto es de cierta forma independiente de la densidad de plantas, lo que se pudo observar en los vainillales evaluados.

La prueba de medias para las variables de fruto a partir de las cuales se evaluó el rendimiento señalan que el vainillal con frutos de mayor peso es 20 Soles con un promedio de 13.09 g por fruto, seguido por Solteros de Juan Rosas con 11.23 g promedio por fruto. Barriles requiere una cantidad mayor de frutos por kilogramo (Fru/kg) porque tiene frutos de menor peso. Esto es, que una mayor producción de fruto representa una disminución en su tamaño y peso. Mientras que en términos de esta variable, 20 Soles y Solteros de Juan Rosas son estadísticamente iguales. La relación frutos por guía (Fru/Guía) tuvo los valores más altos en 20 Soles, esto debido a que sólo tiene una guía por tutor.

Aún con la mayor densidad de guías, Barriles y Solteros de Juan Rosas tienen menor proporción de macetas/guía y son estadísticamente iguales. En las características físicas de los frutos 20 Soles es el sistema de manejo con frutos de mayor longitud y mayor volumen. No obstante, Solteros de Juan Rosas tuvo los frutos más anchos y gruesos. En términos de rendimiento, los tres

sistemas de manejo son estadísticamente distintos, Barriles es el vainillal con mayor producción con 1.06 kg de fruto/m<sup>2</sup>. 20 Soles, aun con la baja densidad de guías tuvo mayor producción de fruto (0.88 kg de fruto/m<sup>2</sup>) que Solteros de Juan Rosas cuya producción fue de sólo 0.34 kg de fruto/m<sup>2</sup>.

Cuadro 1.6. Prueba de medias para variables de producción de frutos promedio en tres sitios del Totonacapan, México.

Sitio	Componentes de rendimiento de fruto								
	Variables de planta								
	AP (m)	Guías/m <sup>2</sup>	Frutos/m <sup>2</sup>	Macetas/m <sup>2</sup>	kg fruto/m <sup>2</sup>	Fru/M	M/G		
Barriles	2.17b	25a	145a	16a	1.07a	9a	1b		
20 Soles	1.64c	1c	67b	10b	0.86b	7b	7a		
Solteros de Juan Rosas	3.16a	11b	29c	8b	0.31c	4c	1b		
DMS	0.24	3.33	24.41	2.17	0.13	1.02	0.53		
	Variables de fruto								
	PPF (g)	Fru/kg	Fru/Guía	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)	LxA (cm <sup>2</sup> )	VolFru (cm <sup>3</sup> )	Rend (kg/m <sup>2</sup> )
Barriles	7.81c	131a	6b	14.84c	0.97b	0.78b	14.35c	11.21c	1.06a
20 Soles	13.09a	78b	51a	19.29a	1.13a	0.91a	21.87a	20.15a	0.88b
Solteros de Juan Rosas	11.23b	91b	3b	16.22b	1.56a	0.93a	18.75b	17.54b	0.34c
DMS	1.56	15.56	3.36	0.89	0.07	0.05	1.78	2.47	114.45

AP: Altura de planta; Fru/M: Frutos/Maceta; M/G: Macetas/Guía; PPF: Peso promedio por fruto; Fru/kg: Frutos/Kilogramo, Fru/Guía: Frutos/Guía; LxA: Largo x Ancho; VolFru: Volumen del fruto; Rend: Rendimiento; DMS: Diferencia mínima significativa. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística.

Damirón-Velázquez (2004) y Hernández-Hernández (2014) señalan que el rendimiento de frutos de vainilla depende de factores como la región, edad de las plantas, sistema de manejo, cantidad de sombra y nivel de ventilación. Mientras que Barrera-Rodríguez *et al.* (2009) indican que para los productores del Totonacapan el grado de nutrición, la humedad atmosférica, la temperatura y cómo se realiza la polinización son algunos de los factores de mayor importancia para el buen desarrollo de los frutos. Por su parte, Soto-Arenas (2006) mencionan que las prácticas de manejo, factores climáticos y el sistema de producción en sí definen de manera importante la producción de fruto. Esto debido a que dependiendo de prácticas como el manejo de luz mediante la poda de tutor se puede estimular o reducir la inducción floral y el crecimiento vegetativo de las plantas (Fouché y Jouve 1999; Puthur 2005).

La mayoría de los aspectos señalados anteriormente son considerados por el productor como los de mayor impacto en el rendimiento de fruto, principalmente los cambios bruscos entre periodos

calurosos y los de lluvia. Ejemplo de ello es Solteros de Juan Rosas, donde factores como la ventilación y la humedad en el vainillal tuvieron un impacto directo en el rendimiento de fruto.

Por otra parte, una sobrecarga de guías puede reducir la vida productiva de la planta y reducir los rendimientos (Baltazar-Nieto 2010). En los vainillales estudiados estos factores se reflejaron de manera contrastante en Barriles y 20 Soles. Ya que Barriles, tuvo la mayor proporción de guías, frutos y macetas por metro cuadrado, así como el rendimiento más alto, no obstante, la calidad física de los frutos fue menor que 20 Soles y Solteros de Juan Rosas en términos de peso y grosor.

La cantidad de macetas por planta puede ser afectada por factores como la fertilización, bajas temperaturas estacionales (Hernández-Hernández 2011), estrés hídrico (Varela-Quiroz 2011) y aumento en la radiación (Ranadive 2005). Díez-Gómez (2015) señala que la proporción de abortos florales y de frutos se reduce de manera considerable con la fertilización, de manera que en sistemas tradicionales el índice de amarre de fruto fue de 32 % y en los tecnificados de 85 %. En los vainillales evaluados la mayor caída de flor y fruto se presentó en los sistemas de malla sombra, en particular en Solteros de Juan Rosas donde el aborto de flor fue cercano al 50 %. Mientras que el vainillal en 20 Soles establecido en acahual tuvo la menor caída de flor a lo largo del ciclo de cultivo.

Mata *et al.* (2007) estiman que cada planta puede tener entre 10 y 15 macetas florales. En el caso de los sistemas de manejo estudiados se presentó menor cantidad de macetas florales con un máximo de 16 macetas/m<sup>2</sup> en Barriles y un mínimo de 8 macetas/m<sup>2</sup> en Solteros de Juan Rosas. Por otra parte, Damirón-Velázquez (2004) indica que la producción promedio de fruto es de 1 kg/planta, mientras que López-Méndez y Mata-García (2006) comentan que el peso promedio de frutos por planta oscila entre 1-2 kg, y hasta 5.5 kg/planta establecida en sistema bajo naranjo.

A su vez, estiman que el mayor rendimiento de frutos en los vainillales se da a partir del cuarto o quinto año, y posteriormente tiende a disminuir. De la Cruz-Medina *et al.* (2009) reportan que el rendimiento de fruto de vainilla en un buen sistema de manejo es de 3 kg/planta. En este aspecto, podemos destacar que la producción de fruto es menor con respecto a lo reportado, de manera particular en Solteros de Juan Rosas se destaca el impacto de las enfermedades, ya que fue un factor determinante en la baja producción de fruto a pesar del número de guías por tutor se

obtuvo un rendimiento de 0.34 kg/m<sup>2</sup>. En el vainillal de Barriles el rendimiento reportado fue de 1.07 kg/m<sup>2</sup>, mientras que en 20 Soles se observó también un importante potencial de rendimiento considerando que se maneja únicamente 1 planta por tutor, por lo que el manejo desempeñó un papel de gran importancia al tener menor competencia por nutrientes y recursos en el cultivo dada la baja densidad de plantas.

Sánchez-Morales *et al.* (2001) mencionan que el sistema intensivo que incorpore riego puede tener el mayor rendimiento por unidad de superficie, así como mayor calidad de fruto en cuanto a sus características físicas, lo que se puede atribuir a una mayor disponibilidad del agua en el suelo. Lo que se refleja en el aspecto económico puesto que se obtendrá mayor ganancia en la venta de los frutos verdes, así como un mayor precio en el mercado internacional para los frutos beneficiados (Hernández-Hernández *et al.* 2019). De acuerdo con Rahman *et al.* (2019) el peso promedio por fruto es de 20.2 g y una longitud aproximada a los 19 cm. No obstante, es importante destacar que la producción varía año con año. Estas variaciones se observan también a nivel de sistema de manejo, ya que se encontraron importantes diferencias en el peso y tamaño de los frutos. Por ejemplo, de los dos sistemas establecidos en malla sombra Solteros de Juan Rosas tuvo frutos de mayor peso promedio y mayor longitud (11.23 g y 16.22 cm) que Barriles (7.81 g y 14.84 cm), a diferencia del sistema en acahual donde usualmente se obtienen bajos rendimientos y frutos pequeños, no obstante, en este caso 20 Soles destacó por los frutos de mayor tamaño y peso (13.09 g y 19.29 cm).

Díez-Gómez (2015) señala que esto pudo deberse en gran medida a las prácticas de manejo en el sistema tecnificado como un suministro de agua constante (especialmente en temporada de sequía) y el uso de fertilizantes (Castro-Bobadilla *et al.* 2011). Es importante destacar que en los vainillales estudiados se incorpora un sistema de riego y se aplica fertilización constante. Sin embargo, se observaron diferencias en la cantidad de macetas distribuidas en las guías, particularmente en Barriles ya que aun cuando tiene gran cantidad de guías por tutor, se observó en promedio una maceta por guía, al igual que en Solteros de Juan Rosas, mientras que en 20 Soles esta proporción fue de 4.

### **Análisis de correlación de Pearson en variables de rendimiento de fruto**

Se realizó el análisis de correlación de Pearson entre las variables evaluadas en planta y las características físicas de los frutos para identificar las variables con correlación más significativa. Todas las correlaciones establecidas entre las variables de planta y fruto mostraron alta significancia estadística ( $<0.0001$ ). Se encontraron correlaciones negativas en altura de planta, guías/m<sup>2</sup> y número de frutos/kg. Las correlaciones más altas se encontraron entre kg de fruto/m<sup>2</sup> y rendimiento ( $r=0.95$ ,  $<0.0001$ ); macetas/guía y frutos/guía ( $r=0.98$ ,  $<0.0001$ ); ancho y grosor ( $r=0.96$   $<0.0001$ ); largo x ancho y volumen del fruto ( $0.98$ ,  $<0.0001$ ); y peso promedio por fruto con frutos/kg ( $r=-0.96$ ,  $<0.0001$ ), largo x ancho ( $r=-0.96$   $<0.0001$ ) y volumen del fruto ( $0.95$ ). Mientras que las correlaciones más bajas se identificaron principalmente en altura de planta y guías/m<sup>2</sup> (Cuadro 1.7).

En el caso de las variables evaluadas, las correlaciones indican que al incrementar la altura de planta disminuyen los kilogramos de fruto/m<sup>2</sup> y el rendimiento. Así mismo, las correlaciones indican que, al incrementar la cantidad de guías y fruto por metro cuadrado, tiende a disminuir el peso promedio del fruto, longitud y rendimiento. Mientras que se da un incremento en la cantidad de frutos por kilogramo. Por otra parte, al incrementar los kilogramos de fruto por metro cuadrado se observó un incremento en la relación frutos/maceta y rendimiento. También se observó un incremento en la relación frutos/guía y la longitud del fruto en función del incremento de la proporción macetas/guía.

En el grupo de las variables evaluadas en los frutos se observó que al incrementar el peso promedio de los frutos disminuye el número de frutos por kilogramo, así como un incremento en las dimensiones del fruto (largo, ancho, grosor, largo x ancho y volumen del fruto). Igualmente, la correlación indica que al incrementar el número de frutos por kilogramo tiende a disminuir las dimensiones del fruto.



Cuadro 1.7. Correlación de Pearson para variables de rendimiento de fruto en tres sitios del Totonacapan, México.

<b>VARIABLES DE PLANTA</b>		<b>r</b>	<b>P</b>
Altura de planta	kg de fruto/m <sup>2</sup>	-0.76	<0.0001
	Frutos/kg	-0.73	<0.0001
	Rendimiento	-0.77	<0.0001
	Macetas/Guía	-0.72	<0.0001
Guías/m <sup>2</sup>	Peso promedio por fruto	-0.79	<0.0001
	Frutos/kg	0.79	<0.0001
	Largo	-0.81	<0.0001
	Macetas/m <sup>2</sup>	0.84	<0.0001
Frutos/m <sup>2</sup>	kg de fruto/m <sup>2</sup>	0.83	<0.0001
	Frutos/Maceta	0.81	<0.0001
	Rendimiento	0.84	<0.0001
	kg de fruto/m <sup>2</sup>	0.76	<0.0001
Macetas/m <sup>2</sup>	Rendimiento	0.70	<0.0001
	Frutos/Maceta	0.89	<0.0001
kg de fruto/m <sup>2</sup>	Rendimiento	0.95	<0.0001
	Frutos/Maceta	0.89	<0.0001
Macetas/Guía	Frutos/Guía	0.98	<0.0001
	Largo	0.82	<0.0001
<b>VARIABLES DE FRUTO</b>		<b>r</b>	<b>P</b>
Peso promedio por fruto	Frutos/kg	-0.96	<0.0001
	Largo	0.84	<0.0001
	Ancho	0.84	<0.0001
	Grosor	0.84	<0.0001
	Largo x Ancho	0.96	<0.0001
	Volumen del fruto	0.95	<0.0001
	Largo	-0.81	<0.0001
Frutos/kg	Ancho	-0.85	<0.0001
	Grosor	-0.86	<0.0001
	Largo x Ancho	-0.93	<0.0001
	Volumen del fruto	-0.92	<0.0001
Frutos/Guía	Largo	0.82	<0.0001
	Largo x Ancho	0.90	<0.0001
	Volumen de fruto	0.82	<0.0001
Largo	Grosor	0.96	<0.0001
	Ancho	0.84	<0.0001
	Largo x Ancho	0.84	<0.0001
Ancho	Volumen del fruto	0.91	<0.0001
	Largo x Ancho	0.85	<0.0001
	Volumen del fruto	0.93	<0.0001
Grosor	Largo x Ancho	0.85	<0.0001
	Volumen del fruto	0.93	<0.0001
Largo x Ancho	Volumen del fruto	0.98	<0.0001

### Distribución de la variación de variables de rendimiento

El análisis de componentes principales mostró que la distribución de los 16 componentes de rendimiento en los dos primeros componentes principales explica el 100 % de la variación total (Cuadro 1.8). El primer componente (CP1) explicó aproximadamente 71 % de la variación y está definido por las variables peso promedio por fruto (PPF), frutos/kg (Fru/kg), grosor y volumen del fruto (VolFru). Mientras que el segundo componente aportó 29 % de la variación siendo definida por kilogramos de fruto/m<sup>2</sup>, frutos/maceta, macetas/guía, frutos/Guía (Fru/Guía) y rendimiento (Rend).

Cuadro 1.8. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables de rendimiento en las tres dimensiones de la caracterización de tres sistemas de manejo de *Vanilla planifolia* en el Totonacapan, México.

Variable	Componentes principales (CP)	
	CP1	CP2
Macetas/m <sup>2</sup>	-0.315369	0.150558
kgFruto/m <sup>2</sup>	-0.202849	<b>0.403805</b>
Frutos/Maceta	-0.222045	<b>0.378709</b>
Macetas/Guía	0.204097	<b>0.402288</b>
Peso promedio por fruto	<b>0.321511</b>	0.115103
Frutos/kg	<b>-0.327983</b>	-0.05593
Frutos/Guía	0.185832	<b>0.423064</b>
Largo	0.270117	0.294035
Ancho	0.320038	-0.124599
Grosor	<b>0.322283</b>	-0.109782
LxA	0.315379	0.150509
Volumen del fruto	<b>0.325819</b>	0.080838
Rendimiento	-0.195148	<b>0.412841</b>
<b>Valor propio</b>	<b>9.1851</b>	<b>3.8149</b>
<b>Proporción variación total</b>	<b>0.7065</b>	<b>0.2935</b>
<b>Variación acumulada</b>	<b>0.7065</b>	<b>1.0000</b>

Los valores marcados en negritas indican las variables que presentan mayor influencia en cada componente principal

La distribución espacial de los tres sitios o vainillales que se muestra en la Figura (1.7) indicando la diferenciación de los sitios. Con base en el primer componente (CP1), los vainillales en 20 Soles y Solteros de Juan Rosas presentan características similares en relación al mayor peso promedio, grosor y volumen del fruto, así como una menor cantidad de vainas por kilogramo. Mientras que Barriles presentó los frutos de menor tamaño y por lo tanto un mayor número de

frutos por kilogramo. Por otra parte, de acuerdo con el segundo componente (CP2) Barriles y 20 Soles fueron similares en la proporción de kg de fruto/m<sup>2</sup>, frutos/maceta y rendimiento. Mientras que Solteros de Juan Rosas fue el vainillal con menor rendimiento, menor proporción de kilogramos de fruto/m<sup>2</sup> y cantidad de frutos por guía, a pesar de la densidad de plantas presente en el sistema de manejo.

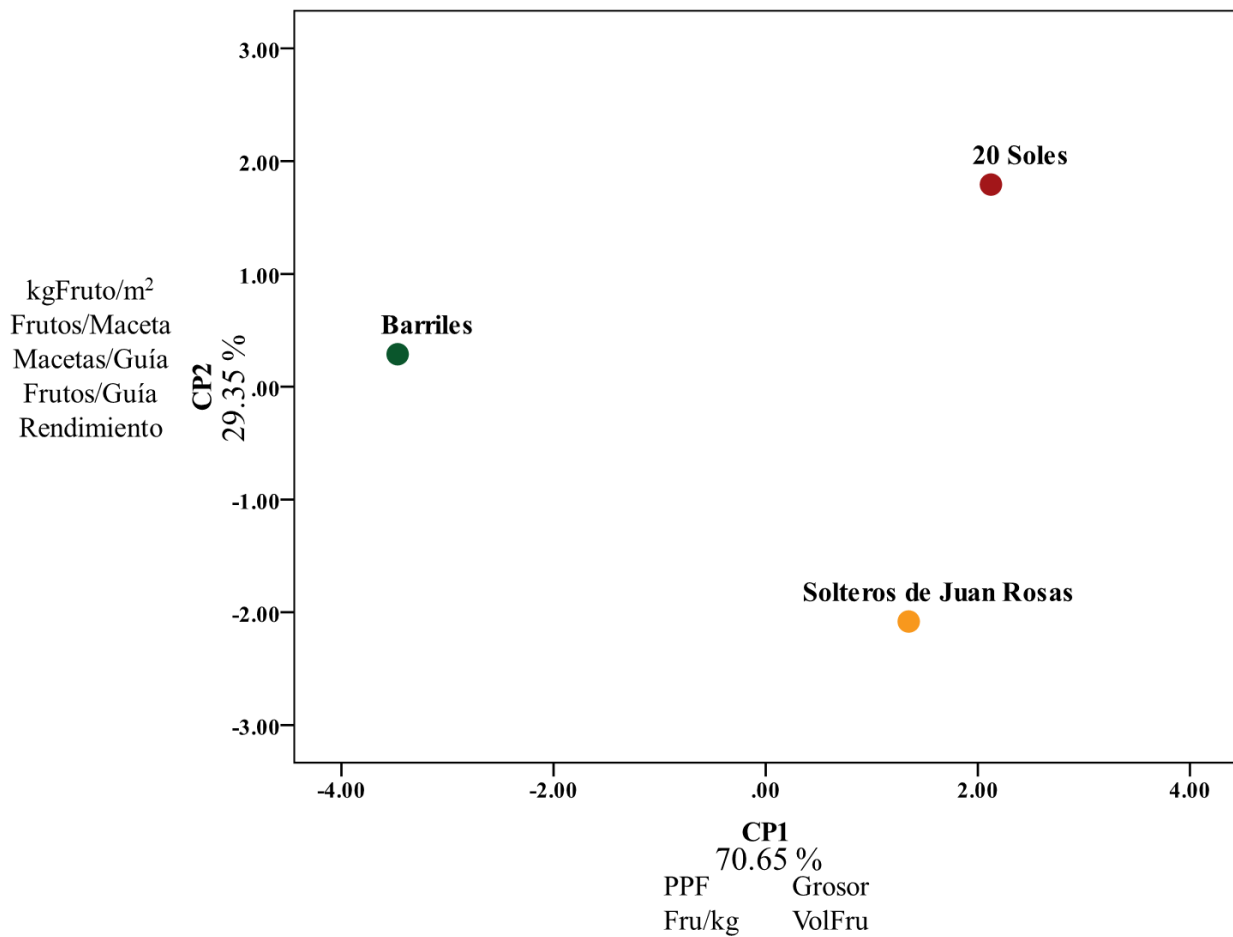


Figura 1.7. Dispersión de tres sistemas de manejo de vainilla en el Totonacapan, México, con base en los dos primeros componentes principales del análisis de 13 variables de rendimiento agrupadas por medias poblacionales.

### Agrupación de la variación de componentes de rendimiento de fruto

En el análisis de conglomerados se observó la misma agrupación que en el análisis de componentes principales al realizar el corte a una distancia de 1.0 (Figura 1.8). Se observa que los tres sistemas de manejo evaluados son diferentes en términos de rendimiento, características físicas del fruto y densidad de frutos. De acuerdo con esto se muestra la formación de tres grupos:

**Grupo I.** Integrado por 20 Soles. Este sistema de manejo se caracterizó por tener la mayor proporción de macetas/guía, macetas/guía y frutos/guía. Así mismo, mostró un rendimiento intermedio al igual que los frutos de mayor longitud, peso promedio, volumen y área (largo x ancho). Por lo que fue el vainillal con menor número de frutos por kilogramo.

**Grupo II.** Conformado por Solteros de Juan Rosas, presentó la menor proporción de macetas y kilogramos de fruto por unidad de superficie (macetas/m<sup>2</sup> y kgFruto/m<sup>2</sup>, respectivamente), así como una menor proporción de macetas/guía con respecto a los otros vainillales evaluados. Por lo que presentó el menor rendimiento, no obstante, los frutos mostraron características similares a 20 Soles en términos de longitud, área (largo x ancho) y peso promedio. Así mismo, mostró los frutos más anchos y más gruesos.

**Grupo III.** Este grupo incluye en vainillal localizado en Barriles. Este vainillal se diferencia por tener la mayor cantidad de macetas/m<sup>2</sup>, frutos/maceta y frutos/kg. También se observó el mayor rendimiento, no obstante, los frutos de este vainillal fueron los de menor tamaño y peso por lo que se requiere mayor cantidad de frutos por kilogramo.

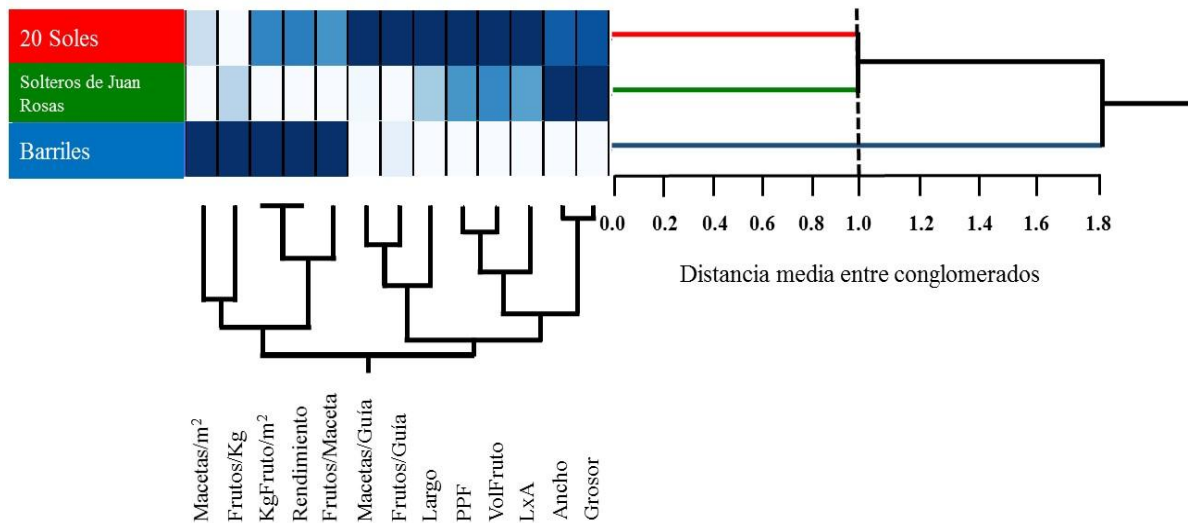


Figura 1.8. Dendrograma de tres sistemas de manejo de vainilla en el Totonacapan, México basado en el promedio de 13 variables de rendimiento y agrupado por similitud de distancias. Nota: La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

#### **1.4. CONCLUSIONES**

De acuerdo con las condiciones en que se encuentran establecidos los vainillales y sus características en cuanto a producción o rendimiento se determinó que los tres sistemas de manejo son diferentes como resultado del objetivo de cada productor en su vainillal. Estas diferencias son el resultado en parte de las prácticas de manejo. Las principales semejanzas se encontraron en la densidad de plantas y periodo de cosecha, especialmente entre Solteros de Juan Rosas y Barriles con 20 Soles. Lo que se refleja de manera particular en el tamaño, rendimiento del fruto y tipo de mercado, el cual depende de manera importante del objetivo de cada productor. Por ejemplo, el productor en Barriles opta por una mayor densidad de plantas ya que su objetivo principal es la producción en términos de cantidad de frutos cosechados por lo que fue el vainillal con mayor rendimiento, pero con frutos de menor tamaño.

El productor en Solteros de Juan Rosas mantiene el vainillal como una actividad complementaria, con una densidad de plantas similar a Barriles. En este sistema se cosechan frutos de tamaño competentes en el mercado, pero el microclima que prevalece en su vainillal puede ser uno de los factores más importantes que favorecen la aparición de enfermedades y que limitan el potencial productivo del vainillal debido en parte al manejo de la malla sombra y la aeración del cultivo. Otro aspecto de gran relevancia en el vainillal de Solteros de Juan Rosas es que su producción está enfocada al mercado orgánico motivo por el cual se diferencian sus prácticas de manejo en cuanto a fertilización y manejo de plagas de los otros vainillales. Un aspecto importante que diferencia este sistema de manejo de Barriles y 20 Soles es que el productor aplica un registro de las flores polinizadas y frutos abortados durante el ciclo de cultivo.

Mientras que el productor en 20 Soles tiene un objetivo enfocado al mercado gourmet, por lo que busca que sus frutos sean de mayor longitud y de mayor madurez. Esto implica que al ser beneficiados se obtenga un producto de mayor calidad en cuanto a la concentración de compuestos aromáticos como la vainillina y se evite la aparición de hongos o rayaduras en los frutos por lo que la cosecha en este vainillal se realiza alrededor de dos meses después que en Barriles y Solteros de Juan Rosas. Así mismo, maneja una baja densidad de plantas, lo que favorece un mayor aprovechamiento de los recursos como agua y nutrientes a fin de obtener frutos de mayor tamaño.

Otra diferencia se observó en el tipo de tutor y poda, puesto que 20 Soles y Solteros de Juan Rosas utilizan tutores vivos que requieren poda a lo largo del ciclo de cultivo; mientras que Barriles utiliza tutores inertes que no requieren esta actividad. La edad del vainillal es otro aspecto relacionado con el rendimiento de fruto, 20 Soles es el vainillal más joven de los tres sistemas evaluados con una edad aproximada de cinco años, por lo que tiene un importante potencial productivo. En contraste, Solteros de Juan Rosas y Barriles presentan una edad similar que oscila entre los 7 y 8 años, no obstante, con el manejo adecuado pueden ser altamente competitivos en la producción de fruto. Dentro de las principales semejanzas entre los vainillales evaluados se destacan las prácticas de riego, ya que en los tres casos se indica la presencia de cuerpos de agua cercanos que permiten un mejor acceso al recurso hídrico y su aprovechamiento; así como la aplicación del riego ya sea durante las primeras horas del día o al final de la tarde.

Por otra parte, Solteros de Juan Rosas y 20 Soles son similares respecto a la densidad de macetas y frutos, así como en las características físicas de los frutos como longitud, ancho, grosor y peso promedio. A su vez, Barriles y 20 Soles presentaron características similares en cuanto al rendimiento de fruto aun con la baja densidad de plantas en 20 Soles. Por último, los aspectos que tienen en común los sistemas de manejo evaluados se enfocan en la presencia de enfermedades y plagas como hongos, antracnosis y hormigas; así como la caída prematura de fruto por los cambios de clima entre periodos de altas temperaturas y sequías, y las lluvias.

## **CAPÍTULO II. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE CLIMA EN EL RENDIMIENTO DE FRUTO DE *Vanilla planifolia* CULTIVADO EN TRES SISTEMAS DE MANEJO**

### **RESUMEN**

La vainilla presenta gran plasticidad adaptativa que le ha permitido establecer diferentes sistemas de cultivo con prácticas de manejo y características ambientales específicas. El objetivo de este capítulo fue evaluar cuatro parámetros de clima y su relación con el rendimiento de fruto en tres vainillales con diferente sistema de manejo. El estudio se realizó en dos sistemas de malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas, SJR) y uno en acahual (20 Soles). Los componentes de rendimiento se obtuvieron a partir de las mediciones en cada vainillal donde se registró altura de planta, peso de fruto, densidad de frutos, plantas e inflorescencias (macetas). Así como peso, longitud, ancho, grosor, área y volumen del fruto. También se registraron temperatura, humedad relativa (HR), radiación fotosintéticamente activa (RFA) y precipitación durante el ciclo de cultivo. En el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza, prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) y correlaciones canónicas. Los resultados indicaron que 20 Soles y SJR a pesar de ser sistemas de manejo diferentes, pero ambos con tutores vivos, fueron similares en rendimiento, peso y tamaño de fruto. En el ciclo 2018 se registraron valores más altos de temperatura, pero humedad relativa y RFA menores con respecto a 2019, debido a un prolongado periodo de sequía por lo que la precipitación también fue menor. La temperatura y humedad relativa registrada en los vainillales mostraron una tendencia similar en los tres vainillales. La mayor diferencia se encontró en la RFA, pero 20 Soles y SJR tuvieron condiciones semejantes, lo que puede asociarse al manejo de sombra en los tutores vivos. En Barriles, la RFA tuvo mayor relación con la cantidad de inflorescencias y frutos. El vainillal en 20 Soles mostró asociación entre la temperatura y la densidad de frutos, así como la RFA con frutos/maceta. Los parámetros registrados en SJR tuvieron asociación entre la temperatura y RFA con el peso de los frutos y frutos/maceta; y temperatura con la densidad de frutos. Se concluye que el rendimiento es diferente en cada vainillal y refleja las diferencias en las prácticas de manejo y objetivo de cada productor. La influencia de los parámetros de clima sobre los componentes de rendimiento fue diferente en cada vainillal ya que se genera un microclima específico en cada sistema de cultivo derivado de las prácticas de manejo, y que se asocia con la calidad física y rendimiento de fruto. Sin embargo, la HR y la RFA fueron los parámetros con mayor influencia sobre el rendimiento.

**Palabras clave:** componentes de rendimiento, parámetros de clima, prácticas de manejo, vainilla.

## CHAPTER II. INFLUENCE OF CLIMATE PARAMETERS ON FRUIT YIELD OF *Vanilla planifolia* CULTIVATED IN THREE MANAGEMENT SYSTEMS

### ABSTRACT

Vanilla has a great adaptive plasticity that has allowed it to establish different cultivation systems with specific management practices and environmental characteristics. The objective of this chapter was to evaluate four climate parameters and their relationship with fruit yield in three plantations with different management system. The study was carried out in two shade mesh systems (Barriles y Solteros de Juan Rosas; SJR) and one in acahual (20 Soles). Yield components were obtained from measurements in each vanilla plantation where plant height, fruit, plant and inflorescence density were recorded. As well as weight, length, width, thickness, area and volume of fruit. Temperature, relative humidity (RH), photosynthetically active radiation (PAR) and precipitation during the crop cycle were also recorded. In the statistical analysis, an analysis of variance, Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ) and canonical correlation were performed. The results indicated that 20 Soles and SJR, despite having different management systems, although but two both with living tutors, were similar in yield, weight and fruit size. In the 2018 cycle, higher temperature values were recorded, but lower relative humidity and PAR compared to 2019, because of a prolonged period of drought, so precipitation was also lower. The temperature and relative humidity recorded in the vanilla plantations showed that they had a similar trend in all of them. The greatest difference was found in the PAR, but 20 Soles and SJR had similar conditions, which may be associated with shade management in the living tutors. In Barriles, the PAR had a greater correlation with the number of inflorescences and fruits. The vanilla plantation in 20 Soles showed an association between temperature and fruit density, as well as PAR with fruits/inflorescence. The parameters recorded in SJR had an association between temperature and PAR with the fruit weight and fruits/inflorescence; and temperature with fruits density. It is concluded that the yield is different in each vanilla plantation and reflects the differences in the management practices and objective of each producer. The influence of the climate parameters on yield components was different in each vanilla plantation since a specific microclimate is generated in each cultivation system derived from management practices, and which is associated with physical quality and fruit yield. However, RH and PAR were the climate parameters with the greatest influence on yield.

**Key words:** yield components, climate parameters, management practices, vanilla.



## 2.1. INTRODUCCIÓN

*Vanilla planifolia* es una orquídea trepadora hemiepífita de hábitos umbrófilos y requiere una regulación de sombra para crear un microclima propicio para su desarrollo (Cabrelli *et al.* 2006). Debido a su metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), la vainilla presenta una dinámica de crecimiento compleja (Díez *et al.* 2017). Bajo condiciones naturales, esta especie se expone a estrés hídrico, térmico y lumínico dado que crece en diferentes ambientes (Fouché y Jouve 1999). Por lo que estas diferencias en las condiciones de crecimiento le proporcionan a la planta una gran plasticidad adaptativa (Zotz y Andrade 2001; Haslam *et al.* 2003).

La vainilla es característica de regiones tropicales y requiere condiciones agroecológicas particulares para un adecuado desarrollo vegetativo y calidad del fruto (Soto-Arenas y Solano-Gómez 2007). Idealmente la vainilla requiere temperaturas que oscilan entre 24°C y 26°C (Soto-Arenas y Solano-Gómez 2007), aunque puede tolerar temperaturas de hasta 32°C (Anandaraj *et al.* 2005). Valores por debajo de 20 °C puede inhibir su crecimiento, desarrollo e intensidad de floración (Ranadive 2005), mientras que temperaturas superiores a 32°C ocasiona la caída prematura del fruto debido a las condiciones de estrés (Hernández-Hernández 2007). Así mismo, de acuerdo con Gangadhara *et al.* (2010) la humedad relativa en el cultivo debe ser aproximada al 70 %, aunque bajo condiciones de humedad entre 74 y 80 % y temperaturas de 23 a 28 °C se favorece el crecimiento de hongos como *Fusarium oxysporum*, condición que puede propiciar la caída del fruto.

Por otra parte, Puthur (2005) señala que el éxito del cultivo de vainilla depende en gran medida del manejo de luz, al ser la variable ambiental con mayor influencia en la fotosíntesis, el desarrollo de la planta y el rendimiento. Por ejemplo, se ha observado mayor productividad en el cultivo bajo condiciones de luz de 600-800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que se promueve el desarrollo vegetativo en condiciones de 300-600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y se presenta un efecto negativo en la productividad bajo 600-800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Puthur 2005).

Aunque la planta necesita periodos de 2 o 3 meses de relativa sequía para estimular la floración al promover la activación de yemas florales (Exley 2011; Varela-Quiroz 2011), un bajo nivel de precipitación estacional o deficiencias en el riego puede afectar su sistema radicular que impactan en la floración y fructificación (Fouché y Jouve 1999; Hernández y Lubinsky 2011). El requerimiento hídrico del cultivo suele encontrarse entre los 2000 a 3000 mm de precipitación

anual distribuidos a lo largo del ciclo (Soto-Arenas 2003; Hernández-Hernández 2007), no obstante, una precipitación pluvial mayor a los 3000 mm mal distribuida durante el año puede propiciar el desarrollo de enfermedades como la roya, la antracnosis y otras causadas por hongos como *Fusarium* sp.

La disponibilidad de agua durante el desarrollo del fruto es un factor clave para mejorar la retención de fruto (Castro-Bobadilla *et al.* 2011). No obstante, la caída de fruto ocurre en sistemas con y sin riego, y se asocia también a factores como las prácticas de manejo agronómico relativos a la nutrición, sombra y manejo fitosanitario (Hernández-Hernández *et al.* 2019). Desde el enfoque ambiental, el rendimiento de vainilla depende de la relación entre la especie, y la cantidad y calidad de recursos ecológicos, hídricos, edáficos y luminosos del ecosistema (Rocha-Flores *et al.* 2018). Aunque el rendimiento de fruto en el cultivo depende de múltiples factores como la genética, nutrición del cultivo, patógenos, respuesta a fitohormonas y selección post-polinización, entre otros (Ghazoul y Satake 2009; Martínez-García *et al.* 2012); la condición en que se desarrolla el cultivo tiene un impacto importante en su respuesta a la retención de fruto y, en consecuencia, en el rendimiento.

De acuerdo con Borbolla-Pérez *et al.* (2016a) la caída de fruto en vainilla ocurre principalmente entre los meses de mayo-agosto. En varias especies la caída de fruto se asocia a condiciones de estrés como el incremento en la temperatura (Franke y Fischer 2015), principalmente durante los periodos de sequía donde se alcanzan temperaturas superiores a los 32 °C y humedad relativa menor a 80 % (Hernández-Hernández 2011; Hernández-Hernández *et al.* 2019). Las condiciones antes mencionadas propician una situación de estrés ambiental que limita la actividad de las hormonas y provocan la caída de fruto (Salazar-Rojas *et al.* 2016). El objetivo de este capítulo fue evaluar cuatro factores climáticos (temperatura, humedad relativa, radiación fotosintéticamente activa y precipitación) durante dos ciclos de cultivo y su influencia en el rendimiento de fruto de *Vanilla planifolia* cultivados en tres sistemas de manejo.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

El estudio se realizó en tres vainillales (sitios) dentro de la región Totonacapan de acuerdo con el sistema de manejo que practican los productores: el Rancho 20 Soles (sistema en acahual) y la

localidad de Solteros de Juan Rosas (sistema en malla sombra) ubicados en el municipio de Papantla, Veracruz; y el rancho Xanathlan (sistema en malla sombra) ubicado en Paso de Barriles en Gutiérrez Zamora, Veracruz (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.

Municipio	Sitio	Longitud	Latitud	Altitud (msnm)
Papantla	Rancho 20 Soles	-97.31	20.43	176
	Solteros de Juan Rosas	-97.20	20.34	203
Gutiérrez Zamora	Paso de Barriles	-97.14	20.46	29

msnm: metros sobre el nivel del mar

### Evaluación de componentes de rendimiento en los vainillales

Durante el periodo de cosecha de los frutos del ciclo de producción 2019, en cada camellón establecido dentro de los vainillales se seleccionó y marcó con listón de color 1 m lineal de plantas con densidad similar que correspondió a una repetición. Se obtuvieron 12 repeticiones para Paso de Barriles, 10 para 20 Soles y 18 para Solteros de Juan Rosas. A las 30 semanas posteriores a la polinización se cosecharon todos los frutos presentes en el área marcada dentro de los camellones de cada sitio. Los frutos de cada repetición se identificaron y colocaron en bolsas de papel de estraza. Inmediatamente se registraron datos del número y peso total de todos los frutos cosechados, así como el número de macetas.

Adicionalmente, se tomó una muestra de entre 20 y 30 frutos. Para cada fruto se registró el peso fresco en una balanza digital (ADAM Modelo HCB3001) con una precisión de dos decimales. También se registró la longitud, ancho y grosor en la región media del fruto con un vernier digital (Marca Mitotuyo®). A partir de las mediciones realizadas en las plantas y los frutos se propuso una ecuación para estimar el rendimiento de fruto en los tres sitios de estudio (Ecuación 1).

$$\text{Rendimiento de fruto} = \left( \frac{\text{Guías}}{\text{m}^2} \right) \left( \frac{\text{Inflorescencias}}{\text{Guía}} \right) \left( \frac{\text{Frutos}}{\text{Inflorescencia}} \right) (\text{kg de fruto}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Con base en los estudios de Menon *et al.* (2002) y Rocha-Flores *et al.* (2018) se definieron 16 variables. De las cuales siete describieron las características de planta y nueve los frutos (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Variables medidas en planta y en fruto para evaluar el rendimiento y sus componentes en *Vanilla planifolia*.

Código	Variable	Unidad	Código	Variable	Unidad
Planta			Fruto		
AP	Altura de planta	m	PPFru	Peso promedio de fruto	g
G/m <sup>2</sup>	Guías/m <sup>2</sup>	Adimensional	Fru/kg	Frutos/kilogramo	Adimensional
Fru/m <sup>2</sup>	Frutos/m <sup>2</sup>	Adimensional	Fru/G	Frutos/Guía	Adimensional
Mac/m <sup>2</sup>	Macetas/m <sup>2</sup>	Adimensional	LongFru	Longitud de fruto	cm
kgFru/m <sup>2</sup>	kg de fruto/m <sup>2</sup>	kg/m <sup>2</sup>	AncFru	Ancho de fruto	cm
Fru/Mac	Frutos/Maceta	Adimensional	GrosFru	Grosor de fruto	cm
Mac/G	Macetas/Guía	Adimensional	LxAFru	Longitud x Ancho	cm <sup>2</sup>
			VolFru	Volumen del fruto	cm <sup>3</sup>
			Rend	Rendimiento	kg/m <sup>2</sup>

### Registro de factores ambientales

En cada vainilla se colocaron sensores (Datalogger marca Hobo<sup>®</sup> U12-012) aproximadamente a 2.5 m de altura del suelo, para registrar las condiciones de temperatura, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa (RFA), que prevalecieron en los cultivos desde el inicio de la floración hasta la cosecha de los frutos. Las variables ambientales se registraron cada hora durante los meses de marzo a noviembre de los ciclos 2018 y 2019 (Figura 2.1). Así mismo, se obtuvieron los datos de precipitación acumulada promedio mensual para cada sitio de acuerdo con la base de datos de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA 2019).



Figura 2.1. Colocación de sensores (datalogger) para registro de parámetros ambientales.

### Análisis estadísticos

Las variables de rendimiento de fruto se analizaron mediante una prueba de medias y los análisis más detallados se describen en el Capítulo I. Los parámetros de clima (temperatura, humedad

relativa y radiación fotosintéticamente activa) registrados en cada ciclo de cultivo (2018 y 2019) se dividieron en dos periodos: floración y amarre de fruto (marzo-mayo) y desarrollo de fruto (junio-noviembre). Considerando que el desarrollo de la vainilla se ve influenciado por factores como la cantidad de luz que recibe (Puthur 2005). Los datos utilizados para el análisis incluyen sólo el periodo de luz a lo largo del día. Este periodo consideró el valor promedio de cada cinco días de cada mes a las 06:00, 10:00, 14:00 y 18:00 horas del ciclo productivo de la vainilla. Con base en este criterio, se obtuvieron 15 repeticiones para el periodo de floración y amarre de fruto, y 35 repeticiones para el desarrollo de fruto en cada rango de horario establecido. Los datos de variables ambientales se evaluaron con el paquete estadístico SAS (versión 9.0) mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ) para cada periodo por rango de horario y por sitio. Adicionalmente se realizó un el análisis de correlaciones canónicas entre parámetros de clima (temperatura, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa) y los componentes de rendimiento con el paquete estadístico XLSTAT (Versión 2021).

### **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) indicó variación entre las variables evaluadas (Cuadro 2.3). En la mayoría de las variables de planta se observó que estadísticamente los tres sitios fueron diferentes. No obstante, en la relación macetas/guía y macetas/m<sup>2</sup>, fueron estadísticamente iguales Barriles y Solteros de Juan Rosas.

Solteros de Juan Rosas se caracterizó por tener las plantas de mayor altura con un valor promedio de 3.16 m, seguido de Barriles con 2.17 m y, por último, 20 Soles que presentó las plantas de menor porte con 1.64 m. Referente a la densidad de plantas, Barriles fue el sistema de manejo con la mayor densidad con un promedio de 25 guías/tutor, Solteros de Juan Rosas tuvo en promedio 11 guías/ tutor, aproximadamente la mitad que Barriles. A diferencia de estos dos sistemas de manejo, 20 Soles se caracterizó por tener sólo una guía/tutor y fue el sistema de manejo con menor densidad de plantas. En el índice macetas/m<sup>2</sup> 20 Soles y Solteros de Juan Rosas fueron estadísticamente iguales con 10 y 8 macetas/m<sup>2</sup>, respectivamente, mientras que Barriles tuvo 16 macetas/m<sup>2</sup>.

De manera similar a la densidad de plantas, la relación frutos/m<sup>2</sup> indica que Barriles fue el vainillal con mayor producción de fruto por unidad de superficie (145 frutos/m<sup>2</sup>). No obstante, a pesar de que Solteros de Juan Rosas presentó una importante densidad de plantas tuvo una baja

producción de fruto con un promedio de 29 frutos/m<sup>2</sup>. En contraste, aún con una baja densidad de plantas (1 guía/tutor) 20 Soles tuvo una producción promedio de 67 frutos/m<sup>2</sup>, lo que representó aproximadamente la mitad de producción de Barriles. Esta tendencia se observó también para la relación kilogramo de fruto/m<sup>2</sup>, ya que Barriles mostró valores de 1.07 kg de fruto/ m<sup>2</sup>, mientras que 20 Soles y Solteros de Juan Rosas presentaron valores de 0.86 y 0.31 kg de fruto/m<sup>2</sup>, respectivamente (Cuadro 2.3). Por otra parte, el sistema de manejo con mayor densidad de frutos por maceta fue Barriles (9 frutos/maceta), seguido de 20 Soles (7 Frutos/Maceta) y Solteros de Juan Rosas (4 frutos/maceta). Finalmente, en la relación macetas/guía Barriles y Solteros de Juan Rosas fueron estadísticamente iguales con 1 maceta/guía, mientras que 20 Soles presentó una proporción mayor con 7 macetas/guía (Cuadro 2.3).

La prueba de medias para las variables de fruto señala que el vainillal con frutos de mayor peso fue 20 Soles con un promedio de 13.09 g por fruto, seguido por Solteros de Juan Rosas con 11.23 g promedio por fruto. Por lo que en ambos sistemas de manejo se requiere una menor cantidad de frutos por kilogramo. Mientras que, para Barriles, se registró una cantidad mayor de vainas en la proporción frutos por kilogramo (Fru/kg) debido a que las plantas tuvieron frutos con menor peso promedio (Cuadro 2.3).

La relación frutos por guía (Fru/Guía) presentó los valores más altos en 20 Soles, esto debido a que sólo tuvo una guía por tutor, además, aún con la mayor densidad de guías Barriles y Solteros de Juan Rosas tuvo menor proporción y se mostraron estadísticamente iguales. En las características físicas de los frutos 20 Soles fue el sistema de manejo con frutos de mayor longitud y mayor volumen. No obstante, Solteros de Juan Rosas se caracterizó por mostrar los frutos más anchos y gruesos. En términos de rendimiento, los tres sistemas de manejo fueron estadísticamente distintos, Barriles fue el vainillal con mayor producción al mostrar valores de 1.06 kg de fruto/m<sup>2</sup>. Por su parte, 20 Soles, aun con la baja densidad de guías presentó una mayor producción de fruto (0.88 kg de fruto/m<sup>2</sup>) que Solteros de Juan Rosas con una producción de fruto de sólo 0.34 kg de fruto/m<sup>2</sup>.

Cuadro 2.3. Prueba de medias para variables de componentes de rendimiento en planta y variables de fruto en tres sitios del Totonacapan, México.

Sitio	Componentes de rendimiento de fruto								
	Variables de planta								
	AP (m)	Guías/ m <sup>2</sup>	Frutos/ m <sup>2</sup>	Macetas/ m <sup>2</sup>	kg Fruto/m <sup>2</sup>	Frutos/ Maceta	Macetas/ Guía		
Barriles	2.17b	25a	145a	16a	1.07a	9a	1b		
20 Soles	1.64c	1c	67b	10b	0.86b	7b	7a		
Solteros de Juan Rosas	3.16a	11b	29c	8b	0.31c	4c	1b		
DMS	0.24	3.33	24.41	2.17	0.13	1.02	0.53		
	Variables de fruto								
	PPF (g)	Frutos/ kg	Frutos/ Guía	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)	LxA (cm <sup>2</sup> )	VolFru (cm <sup>3</sup> )	Rend (kg/m <sup>2</sup> )
Barriles	7.81c	131a	6b	14.84c	0.97b	0.78b	14.35c	11.21c	1.06a
20 Soles	13.09a	78b	51a	19.29a	1.13a	0.91a	21.87a	20.15a	0.88b
Solteros de Juan Rosas	11.23b	91b	3b	16.22b	1.56a	0.93a	18.75b	17.54b	0.34c
DMS	1.56	15.56	3.36	0.89	0.07	0.05	1.78	2.47	114.45

AP: Altura de planta; PPF: Peso promedio por fruto; Fru/kg: Frutos/Kilogramo, Fru/Guía: Frutos/Guía; LxA: Largo x Ancho; VolFru: Volumen del fruto; Rend: Rendimiento; DMS: Diferencia mínima significativa. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Aunque de manera empírica los productores de los vainillales bajo estudio señalaron que los cambios drásticos entre los periodos calurosos y de lluvia son los que tienen mayor impacto en la producción de fruto. El rendimiento de fruto también se ve afectado por aspectos como la edad fisiológica de las plantas, las características del sistema de manejo y la condición ambiental (Damirón-Velázquez 2004; Hernández-Hernández 2014). La principal influencia del sistema de manejo sobre la producción de frutos se asocia a las prácticas que manejo de luz-sombra, densidad de plantas y poda de tutores, entre otros, que pueden inducir la floración y sanidad de la plantación (Puthur 2005).

La influencia de estos factores se observó en los tres vainillales evaluados. En Solteros de Juan Rosas se generó un microambiente de alta humedad en el vainillal que causó problemas de sanidad en el cultivo y afectó el rendimiento de fruto. Por otra parte, Baltazar-Nieto (2010) menciona que una sobrecarga de guías puede disminuir el periodo de vida productiva de la planta e incidir en menores rendimientos. Este factor pudo apreciarse en Barriles (malla sombra) y 20 Soles (acahual), que al ser sistemas contrastantes con diferentes intereses por parte de los productores manejan densidades diferentes de plantas. En el caso de Barriles la alta densidad de plantas generó competencia que impactó principalmente en el tamaño y peso de los frutos.

Mientras que en 20 Soles la baja densidad de plantas dio como resultado frutos de mayor peso y tamaño que en Barriles.

Aunque Mata *et al.* (2007) señalan que cada planta puede tener de 10 a 15 inflorescencias, el amarre de fruto puede ser diferente dependiendo del sistema de manejo, de manera que en sistemas tradicionales el amarre de fruto es cercano al 32 %, mientras que en los tecnificados suele ser de aproximadamente del 85 % (Díez-Gómez 2015). De tal manera, que de acuerdo con Damirón-Velázquez (2004) el rendimiento promedio de fruto es de 1 kg/planta, en tanto que otros autores mencionan que puede oscilar entre 1-5.5 kg/planta dependiendo del sistema de manejo (López-Méndez y Mata-García 2006). En los sistemas de manejo evaluados el vainillal de Barriles (malla sombra) tuvo el mayor rendimiento (1.07 kg/m<sup>2</sup>), aunque sacrificó el tamaño y peso de los frutos. Mientras que Solteros de Juan Rosas (malla sombra) y 20 Soles (acahual), a pesar de tener diferente rendimiento y ser sistemas de manejo contrastantes tuvieron los frutos más pesados y de tamaño similar.

Con respecto a las características físicas de los frutos, Rahman *et al.* (2019) mencionan que el peso promedio por fruto es de 20.2 g y una longitud aproximada de 19 cm. En función de este criterio, las colectas de 20 Soles fueron los más cercanos a lo reportado en literatura. Aunque estas características pueden variar entre ciclos de cultivo, las diferencias se atribuyen también al sistema de manejo, como se observó en los vainillales bajo estudio. Por ejemplo, aunque Barriles y Solteros de Juan Rosas están establecidos en condiciones de malla sombra, este último vainillal tuvo frutos de mayor peso promedio y mayor longitud (11.23 g y 16.22 cm) que Barriles (7.81 g y 14.84 cm). Aunque se estima que en los sistemas en acahual se obtienen rendimientos bajos y frutos pequeños, 20 Soles destacó por los frutos de mayor tamaño y peso (13.09 g y 19.29 cm). Lo que refleja las diferencias tanto de los sistemas de manejo, las prácticas realizadas en el cultivo y los objetivos de cada productor.

### **Evaluación de los parámetros de clima**

- **Periodo de floración y amarre de fruto**

Los parámetros de clima, referidos a la temperatura, la humedad relativa y la radiación fotosintéticamente activa (RFA) se evaluaron durante los ciclos de producción 2018 y 2019. En el Cuadro 2.4 se muestra el análisis de varianza donde se indica que el rango horario y la RFA



fueron las principales fuentes de variación en los tres sitios de estudio. En el periodo de floración del ciclo 2018 la RFA tuvo el mayor coeficiente de variación (43.45 %). Durante el ciclo 2019 la temperatura y humedad relativa tuvieron coeficientes de variación semejantes (11.78 % y 11.23 %, respectivamente), similar al ciclo 2018 la RFA tuvo el coeficiente de variación más alto.

Cuadro 2.4. Análisis de varianza de variables ambientales medidas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los tres sitios de estudio en los ciclos 2018 y 2019.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios		
			Sitio	Hora	Error
Ciclo 2018					
Temperatura (°C)	27.19	7.89	17.14 <sup>ns</sup>	132.95***	4.61
Humedad relativa (%)	49.97	24.28	837.15*	2836.70***	147.18
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	10.80	43.45	1758.75***	1060.70***	22.04
Ciclo 2019					
Temperatura (°C)	28.38	11.78	28.13 <sup>ns</sup>	253.90***	11.17
Humedad relativa (%)	69.30	11.23	195.61*	3249.64***	60.56
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	14.09	24.52	677.59***	2664.58***	11.94

\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001, \*P < 0.01, ns: No significativa

En el Cuadro 2.5 se presenta la prueba de medias para los parámetros de clima del periodo de floración de los ciclos 2018 y 2019. En los tres vainillales, las temperaturas más altas se registraron a las 14:00 h, particularmente en Barriles y en Solteros de Juan Rosas, los cuales registraron temperaturas superiores a las de 20 Soles. Sin embargo, los valores registrados durante 2018 y 2019 para esta variable fueron similares para sus respectivos rangos horarios en Barriles y 20 Soles.

La mayor humedad relativa se presentó a las 06:00 y 10:00 h en cada vainillal. Durante el ciclo 2018 se observaron valores más bajos de humedad en comparación con 2019. Además, Barriles y 20 Soles mostraron una condición similar en la humedad registrada a las 14:00 y 18:00 h. Al igual que en el primer ciclo, las horas de mayor humedad reportados en 2019 fueron las 06:00 y 10:00 h, aunado a esto Solteros de Juan Rosas y 20 Soles mostraron una condición similar a lo largo del día. En el caso de la radiación fotosintéticamente activa (RFA), las horas de mayor incidencia de luz fueron las 10:00 y 14:00 h. No obstante, la mayor RFA se encontró

principalmente en Barriles a las 14:00 h, seguido de Solteros de Juan Rosas. 20 Soles presentó la menor RFA debido principalmente a las características de su sistema de manejo en el que incorporan árboles como tutor (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5. Prueba de medias por hora de tres sitios para variables ambientales medidas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

Sitio	Hora	Variable					
		Temperatura (°C)		Humedad relativa (%)		Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	
		2018	2019	2018	2019	2018	2019
Barriles	06:00	22.20e	21.76e	72.53a	82.20bc	0.20c	0.21f
	10:00	28.02bc	28.97cd	46.14bc	72.50cd	16.47b	25.72b
	14:00	32.24a	34.01ab	32.00c	54.83fg	30.190a	37.91a
	18:00	28.14bc	28.08cd	36.27c	65.29de	15.11b	6.62e
20 Soles	06:00	23.10de	25.58de	71.77a	89.06ab	0.40c	0.22f
	10:00	25.86cd	28.09cd	59.12ab	72.44cd	3.90c	19.19c
	14:00	30.49ab	30.48bc	37.05c	50.94g	17.71b	19.32c
Solteros de Juan Rosas	18:00	27.45c	27.48cd	44.88bc	60.16efg	2.45c	6.26e
	06:00	nr	22.96e	nr	92.51a	nr	0.23f
	10:00	nr	28.11cd	nr	78.87c	nr	14.07d
	14:00	nr	35.23a	nr	54.18fg	nr	29.84b
	18:00	nr	31.04ab	nr	61.80ef	nr	8.29e

nr: Dato no registrado. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

La prueba de medias por sitio indica que en el ciclo 2018 no se observaron diferencias estadísticas en la temperatura registrada en Barriles y 20 Soles. Sin embargo, el vainillal establecido en 20 Soles registró la mayor precipitación acumulada promedio y humedad durante el periodo de floración y amarre de fruto. Así mismo, el vainillal de Barriles tuvo la mayor RFA. En el ciclo 2019 se observó una tendencia similar ya que no se observaron diferencias estadísticas en temperatura entre los tres sitios evaluados.

Se encontraron características similares en humedad relativa registrada en Barriles y 20 Soles, y se diferenciaron de Solteros de Juan Rosas el cual registró los valores más altos de humedad relativa. Los tres sitios fueron estadísticamente distintos en la RFA registrada, donde Barriles destacó por recibir la mayor cantidad de luz en el cultivo, lo que es un reflejo de las diferencias en el manejo de los vainillales. Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticas en la precipitación acumulada en Barriles y Solteros de Juan Rosas, pero se diferenciaron de 20 Soles que tuvo menor precipitación (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6. Prueba de medias por sitio para variables ambientales registradas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de frutos de los ciclos 2018 y 2019.

Sitio	Variable			
	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Precipitación acumulada (mm)
Ciclo 2018				
Barriles	27.65a	46.74b	15.49a	67.60b
20 Soles	26.73a	53.21a	6.12b	204.70a
Ciclo 2019				
Barriles	28.21a	68.71ab	17.62a	15.07a
20 Soles	27.91a	68.15b	11.25c	12.55b
Solteros de Juan Rosas	29.33a	71.84a	13.11b	15.07a

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

En la Figura 2.2 se muestra la temperatura mínima, máxima y promedio por mes de los ciclos de cultivo 2018 y 2019. De acuerdo con esto se pudo observar que las temperaturas mínima y promedio en Barriles y 20 Soles fueron similares durante el ciclo de cultivo en 2018, sin embargo, Barriles registró temperaturas máximas superiores, particularmente en el mes de septiembre. En el ciclo 2019 se observó mayor variación en la temperatura en los tres sitios, pero se observó la misma tendencia al disminuir la temperatura durante los meses de octubre y noviembre. En este caso, aunque los tres sitios mostraron temperaturas mínimas con promedios semejantes, Solteros de Juan Rosas registró temperaturas máximas superiores durante todo el periodo del cultivo.

La humedad relativa mínima, máxima y promedio por mes registrada en los ciclos 2018 y 2019 se muestra en la Figura 2.3. En el ciclo 2018 la humedad relativa mínima fue similar en los dos sitios de estudio con valores entre 20-30 %, sin embargo, se observó mayor variación en 20 Soles y valores más bajos en Barriles. Se observó una tendencia semejante en la humedad relativa promedio de los dos sitios, pero en Barriles fue evidente un descenso en la humedad relativa promedio entre los meses de abril y mayo, con valores relativamente constantes durante el ciclo de cultivo e incrementando entre los meses de septiembre y octubre. Mientras que en 20 Soles se registró en general humedad relativa más alta que en Barriles con valores más constantes. El ciclo 2019 registró valores de humedad relativa superiores a los reportados en 2018, particularmente en Solteros de Juan Rosas, aunque en los tres sitios se hizo evidente un incremento considerable en la humedad relativa entre los meses de marzo y abril. Además, la humedad relativa máxima en

Barriles y Solteros de Juan Rosas fue similar y superior en los últimos meses del desarrollo del fruto a la registrada en 20 Soles.

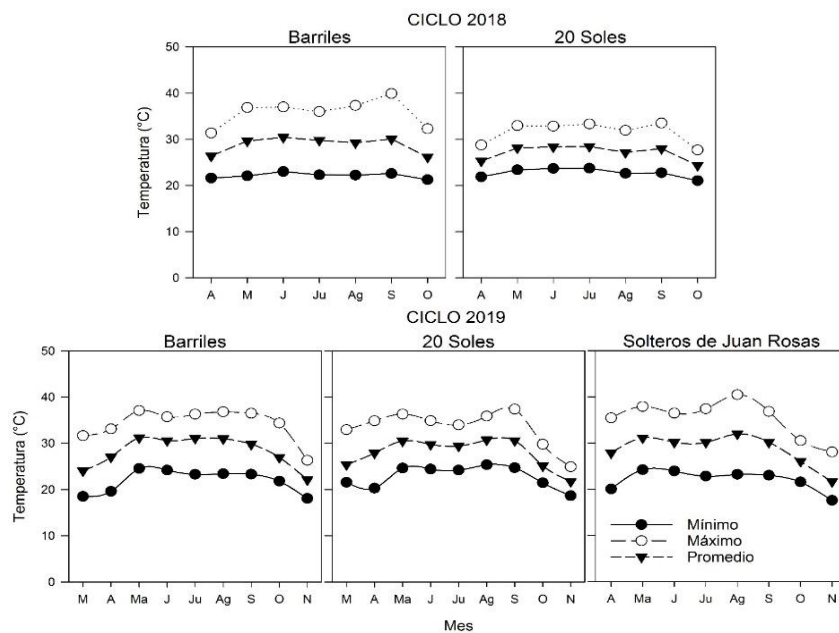


Figura 2.2. Valores mínimo, máximo y promedio de la temperatura mensual registrada en los ciclos de cultivo 2018 y 2019. Los datos mostrados en la figura se registraron durante los meses de marzo (M) a noviembre (N).

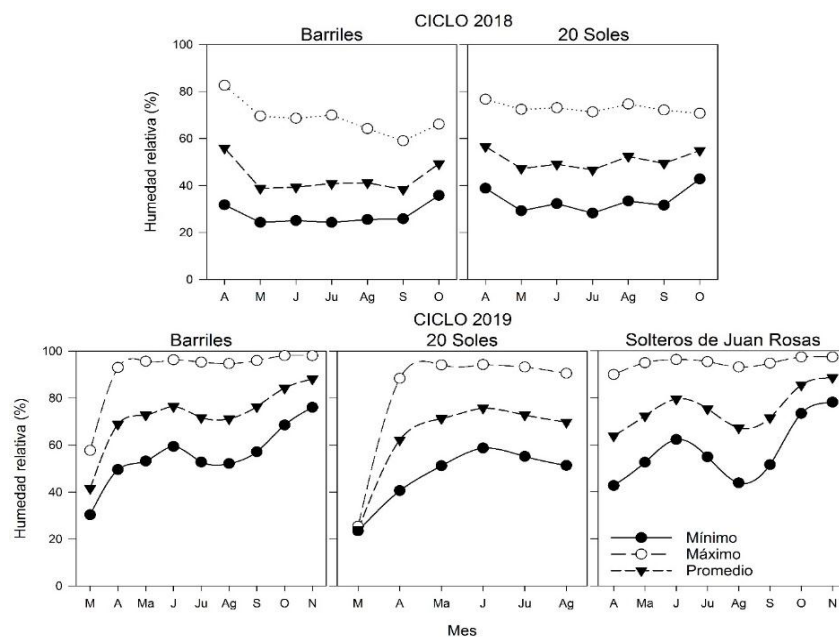


Figura 2.3. Valores mínimo, máximo y promedio de la humedad relativa mensual registrada en los ciclos 2018 y 2019. Los datos mostrados en la figura se registraron durante los meses de marzo (M) a noviembre (N).

La radiación fotosintéticamente activa (RFA) registrada durante el ciclo 2018 fue más baja que en el ciclo 2019 (Figura 2.4). La RFA recibida en el cultivo de 20 Soles fue menor a la registrada en Barriles, lo que evidencia las diferencias entre ambos sistemas de manejo, así mismo se observó un incremento a lo largo del ciclo de cultivo y una disminución en la cantidad de luz que recibe el cultivo entre septiembre y octubre. En el ciclo 2019 se registraron valores similares entre 20 Soles y Solteros de Juan Rosas, los cuales tuvieron RFA máxima parecidos. No obstante, Barriles y 20 Soles tuvieron mayor variación durante el ciclo de cultivo.

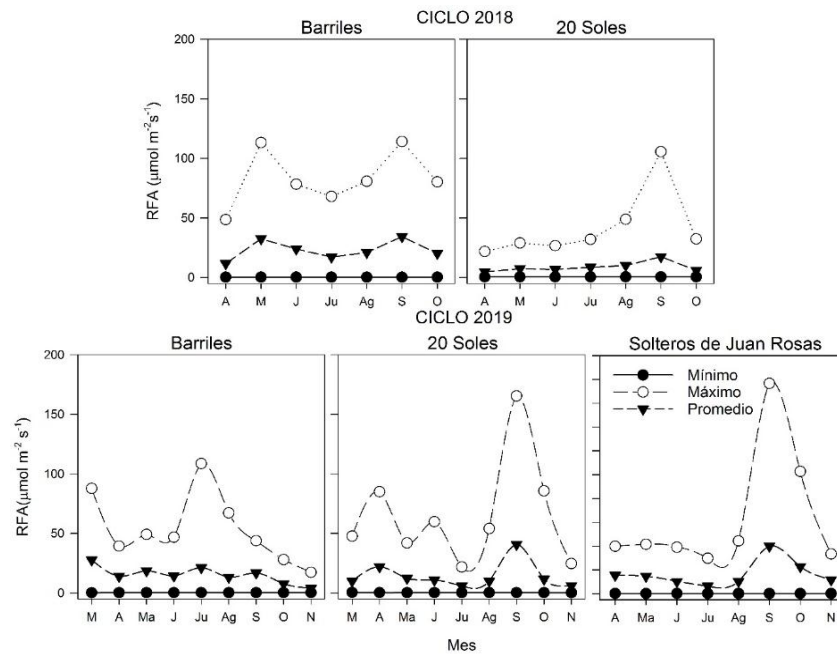


Figura 2.4. Valores mínimo, máximo y promedio de la radiación fotosintéticamente activa mensual registrada en los ciclos de cultivo 2018 y 2019. Los datos mostrados en la figura se registraron durante los meses de marzo (M) a noviembre (N).

### Análisis de varianza por sitio

- Barriles

El análisis de varianza en Barriles mostró diferencias estadísticamente significativas en los horarios evaluados para los tres parámetros ambientales. La radiación fotosintéticamente activa fue la variable con mayor coeficiente de variación en los ciclos 2018 y 2019 (70.81 % y 27.77 %, respectivamente).

Cuadro 2 7. Análisis de varianza para variables ambientales en el vainillal de Barriles registradas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios	
			Hora	Error
Ciclo 2018				
Temperatura (°C)	27.65	7.89	170.63***	4.75
Humedad relativa (%)	46.7	31.36	3307.30***	214.76
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	16.24	70.81	1994.21***	132.24
Ciclo 2019				
Temperatura (°C)	28.21	10.42	403.95***	8.64
Humedad relativa (%)	68.71	15.53	2136.90***	113.90
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	17.62	27.77	4805.80***	23.92

\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001

En la prueba de medias del ciclo 2018 la mayor temperatura se registró a las 14:00 h, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre las 10:00 y 18:00 h. Además, sólo se encontraron diferencias estadísticas en la humedad relativa de las 06:00 h. Se observó mayor variación en la RFA, ya que se observaron cuatro grupos, donde la mayor RFA se registró a las 14:00 h. En el ciclo 2019 se observó una tendencia semejante en temperatura y humedad relativa, sin embargo, RFA tuvo mayor variación puesto que se mostraron cuatro grupos estadísticamente diferentes (Cuadro 2.8).

Cuadro 2.8. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de Barriles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

Ciclo	Hora	Variable		
		Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
2018	06:00	22.20c	72.53a	0.20c
	10:00	28.02b	46.14b	21.68ab
	14:00	32.24a	36.27b	32.84a
	18:00	28.14b	32.00b	10.25bc
2019	06:00	21.76 c	82.20 a	0.21 d
	10:00	28.97 b	72.50 ab	25.72 b
	14:00	34.01 a	54.29 b	37.91 a
	18:00	28.08 b	65.29 b	6.62 c

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

- 20 Soles

Todos los parámetros de clima evaluados mostraron diferencias estadísticas altamente significativas durante el ciclo 2018. En el ciclo 2019 sólo la humedad relativa y la RFA mostraron significancia estadística. La RFA fue la variable con mayor coeficiente de variación en ambos ciclos (59.08 % y 17.46 %, respectivamente) (Cuadro 2.9).

Cuadro 2.9. Análisis de varianza para variables ambientales registradas en el sitio de 20 Soles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios	
			Hora	Error
Ciclo 2018				
Temperatura (°C)	26.73	7.90	95.26***	4.46
Humedad relativa (%)	53.21	16.77	2366.11***	79.59
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	6.44	59.08	611.45***	14.46
Ciclo 2019				
Temperatura (°C)	27.91	15.50	65.39*	18.70
Humedad relativa (%)	68.15	8.58	4351.09***	34.17
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	11.25	17.46	1464.52***	3.85

\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001

En el Cuadro 2.10 se muestra la prueba de medias de los parámetros de clima evaluados en 20 Soles. Se indica que durante 2018 la mayor temperatura se registró a las 14:00 h y no se encontraron diferencias estadísticas entre las 10:00 y 18:00 h. Se encontró que la humedad relativa de las 14:00 y 18:00 h no presentó diferencias estadísticas, sin embargo, la mayor humedad se tuvo a las 06:00 h, seguido de las 10:00 h. La mayor variación se encontró en la RFA, principalmente en los valores registrados a las 06:00 y 14:00 h.

Durante el ciclo 2019 se observó que la temperatura más alta se registró a las 14:00 h y no hubo diferencias estadísticas entre la temperatura de las 06:00 y 18:00 h. En cambio, la humedad relativa mostró gran variación al ser estadísticamente diferentes los cuatro rangos horarios. Por otra parte, se observó que la RFA de las 10:00 y 14:00 h fueron estadísticamente iguales y con la mayor incidencia de luz.

Cuadro 2.10. Prueba de medias para variables ambientales registradas en el sitio de 20 Soles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

Ciclo	Hora	Variable		
		Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
2018	06:00	23.10c	71.77a	0.40c
	10:00	25.86b	59.12b	5.57b
	14:00	30.49a	37.05c	17.71a
	18:00	27.45b	44.88c	2.06bc
2019	06:00	25.58b	89.06a	0.22c
	10:00	28.09ab	72.44b	19.19a
	14:00	30.48a	50.94d	19.32a
	18:00	27.48b	60.16c	6.26b

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

- Solteros de Juan Rosas

En el caso de Solteros de Juan Rosas, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas en los rangos horarios evaluados, el coeficiente de variación más alto se encontró en la RFA (18.81 %) mientras que la temperatura y humedad relativa tuvieron la menor variación (6.53 % y 6.25 %, respectivamente) (Cuadro 2.11). En la prueba de medias los valores más altos de temperatura y RFA se encontraron a las 14:00 h. Así mismo, fue el sitio con mayor variación en los parámetros ambientales, puesto que todos los rangos horarios evaluados fueron estadísticamente diferentes (Cuadro 2.12).

Cuadro 2 11. Análisis de varianza para variables ambientales medidas en el sitio de Solteros de Juan Rosas durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto del ciclo 2019.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios	
			Hora	Error
Temperatura (°C)	29.33	6.53	292.35***	3.66
Humedad relativa (%)	71.84	6.25	3260.94***	20.14
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	13.11	18.81	1723.42***	6.08

\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001



Cuadro 2.12. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de Solteros de Juan Rosas durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) de la etapa de floración y amarre de fruto del ciclo 2019.

Hora	Variable		
	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
06:00	22.96d	92.51a	0.23d
10:00	28.11c	78.87b	14.07b
14:00	35.23a	54.18d	29.84a
18:00	31.04b	61.80c	8.29c

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

- **Periodo de desarrollo de fruto**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sitios y rangos horarios para los parámetros de clima evaluados, sin embargo, en el ciclo 2019 no se encontró significancia estadística en la variable temperatura entre sitios. En general, se observó mayor variación en las variables registradas durante el periodo de desarrollo de fruto del ciclo 2018, particularmente en la radiación fotosintéticamente activa (RFA) (43.87 %) (Cuadro 2.13).

Cuadro 2.13. Análisis de varianza de variables ambientales registradas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto en los ciclos 2018 y 2019.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadros medios		
			Sitio	Hora	Error
Ciclo 2018					
Temperatura (°C)	27.85	9.31	162.07***	483.56***	6.73
Humedad relativa (%)	47.15	18.90	5304.04***	6462.98***	79.37
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	13.15	43.87	8325.28***	6155.79***	33.28
Ciclo 2019					
Temperatura (°C)	28.72	10.50	25.60ns	493.45***	9.09
Humedad relativa (%)	77.98	8.51	1436.40***	5146.73***	44.06
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	13.91	23.59	1934.21***	8142.17***	10.76

\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001

En el Cuadro 2.14 se muestra la prueba de medias para el periodo de desarrollo de fruto, donde se observó una amplia variación en los parámetros de clima evaluados. En 2018 las principales diferencias estadísticas se encontraron en la temperatura de las 14:00 y 18:00 h de Barriles y 20

Soles, mientras que en 2019 se observó que los rangos horarios fueron estadísticamente similares para los tres sitios. Los resultados para humedad relativa evaluados en 2018 mostraron que los valores registrados a las 06:00 h fueron similares en ambas localidades, sin embargo, hubo diferencias estadísticas en los demás rangos horarios entre sitios, puesto que 20 Soles mostró una condición con mayor humedad. Durante 2019 se observó que Barriles y Solteros de Juan Rosas presentaron características semejantes de humedad a las 10:00 h, así mismo, la mayor humedad relativa se encontró en general en Solteros de Juan Rosas.

En el ciclo 2018 se encontró una amplia variación en la RFA, sólo se encontró semejanza estadística entre sitios a las 06:00 h, puesto que Barriles se recibió una mayor incidencia de luz. En contraste, los valores registrados durante 2019 indicaron que los sitios evaluados fueron similares en términos de la RFA recibida a las 06:00 y 14:00 h. Barriles y 20 Soles fueron semejantes en el rango horario de 18:00 h, mientras que 20 Soles y Solteros de Juan Rosas fueron estadísticamente similares en esta variable registrada a las 10:00 h.

Cuadro 2.14. Prueba de medias por hora de tres sitios para variables ambientales medidas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

	Hora	Variable					
		Temperatura (°C)		Humedad relativa (%)		Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	
		2018	2019	2018	2019	2018	2019
Barriles	06:00	22.53e	23.96e	63.51ab	94.96a	0.20f	0.22g
	10:00	28.30cd	28.51cd	43.24c	82.38c	39.21a	47.68a
	14:00	33.73a	33.94a	29.53e	63.38ef	27.88b	19.91c
	18:00	30.14bc	30.42bc	33.52de	71.23d	8.86d	4.60f
20 Soles	06:00	23.17e	24.94e	69.14a	91.57ab	0.40f	0.28g
	10:00	26.30d	28.83cd	57.07b	72.33d	5.60de	16.34d
	14:00	30.91b	31.87ab	37.25cd	58.93f	21.56c	23.63bc
	18:00	27.75d	28.41cd	43.95c	70.14d	1.49ef	3.82f
Solteros de Juan Rosas	06:00	nr	23.16e	nr	94.58a	nr	0.21g
	10:00	nr	27.76d	nr	87.03bc	nr	15.74d
	14:00	nr	33.08a	nr	67.91de	nr	26.18b
	18:00	nr	29.69b	nr	72.85d	nr	7.95e

nr: Datos no registrados. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

La comparación de medias por sitio señala que para los parámetros evaluados en 2018 los sitios fueron estadísticamente distintos, aunque 20 Soles se caracterizó por tener los valores más altos

de temperatura y RFA, mientras que la mayor humedad relativa y precipitación se encontró en Barriles. En el ciclo 2019 se encontró que los tres sitios fueron estadísticamente iguales en los valores de temperatura, y estadísticamente distintos respecto a la humedad relativa. Por otra parte, en términos de RFA Barriles y Solteros de Juan Rosas fueron similares, así como 20 Soles y Solteros de Juan Rosas lo fueron respecto a la precipitación acumulada (Cuadro 2.15).

Cuadro 2.15. Prueba de medias por sitio para variables ambientales registradas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

Sitio	Variable			
	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Precipitación acumulada (mm)
Ciclo 2018				
Barriles	27.03b	51.85a	7.23b	127.95a
20 Soles	28.68a	42.45b	19.04a	122.10b
Ciclo 2019				
Barriles	29.21a	73.23c	11.02b	87.78a
20 Soles	29.21a	77.99b	18.10a	60.41b
Solteros de Juan Rosas	28.42a	80.59a	12.52b	60.41b

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

### Análisis de varianza por sitio

- Barriles

El análisis de varianza por sitio mostró diferencias estadísticamente significativas entre los rangos horarios evaluados en Barriles en los ciclos 2018 y 2019 (Cuadro 2.16). El coeficiente de variación osciló entre 9 % y 41 %, donde RFA fue la variable con mayor variación en ambos ciclos (40.10 % y 21.88 %, respetivamente) e igualmente la temperatura tuvo el coeficiente de variación más bajo (9.52 % y 9.41 %).

La comparación de medias entre rangos horarios mostró gran variación en los parámetros de clima. Principalmente en temperatura y RFA ya que para ambos ciclos los horarios evaluados fueron estadísticamente diferentes, donde la mayor temperatura se registró a las 14:00 h y la RFA más alta se observó a las 10:00 h. Por otra parte, se encontraron diferencias estadísticas en la humedad relativa de las 14:00 h de los ciclos 2018 y 2019, donde en general, el ciclo 2019 tuvo valores más altos de humedad en 2019 (Cuadro 2.17).

Cuadro 2.16. Análisis de varianza para variables ambientales en el vainillar de Barriles medidas en el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios	
			Hora	Error
Ciclo 2018				
Temperatura (°C)	28.68	9.52	656.77***	7.46
Humedad relativa (%)	42.45	19.20	6908.68***	66.44
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	19.04	40.10	9435.47***	58.28
Ciclo 2019				
Temperatura (°C)	29.21	9.41	605.96***	7.55
Humedad relativa (%)	77.99	8.66	6606.04***	45.58
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	18.10	21.88	16100.17***	15.69

\*\*\*P<0.0001, \*\*P < 0.001

Cuadro 2.17. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de Barriles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de los ciclos 2018 y 2019.

Ciclo	Hora	Variable		
		Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
2018	06:00	22.53d	63.51a	0.20d
	10:00	28.30c	43.24b	39.21a
	14:00	33.73a	29.53c	27.88b
	18:00	30.14b	33.52c	8.86c
2019	06:00	23.96d	94.96a	0.22d
	10:00	28.51c	82.38b	47.68a
	14:00	33.94a	63.38d	19.91b
	18:00	30.42b	71.23c	4.60c

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

- 20 Soles

Al igual que Barriles, en 20 Soles se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas para los tres parámetros evaluados. El coeficiente de variación tuvo valores de 6 % a 40 %, de manera específica, RFA fue el parámetro con mayor variación en los ciclos 2018 (39.66 %) y 2019 (25.05 %) (Cuadro 2.18).

Cuadro 2.18. Análisis de varianza para variables ambientales medidas en el sitio de 20 Soles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo del fruto de los ciclo 2018 y 2019.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios	
			Hora	Error
Ciclo 2018				
Temperatura (°C)	27.03	9.06	310.36***	6.00
Humedad relativa (%)	51.61	18.53	6017.28***	92.30
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	7.26	39.66	2876.11***	8.29
Ciclo 2019				
Temperatura (°C)	28.51	11.23	273.46***	10.25
Humedad relativa (%)	73.23	6.41	3492.51***	22.03
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	11.02	25.05	4016.78***	7.62

\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001

La comparación entre rangos horarios durante el desarrollo de fruto en 20 Soles mostró que para la variable temperatura se encontraron diferencias estadísticas entre horarios, entre ciclos presentaron un comportamiento semejante. La humedad relativa de 2018 indicó diferencias en los horarios evaluados, sin embargo, durante 2019 se indica que las 14:00 h y 18:00 h fueron estadísticamente iguales. En lo referente a la RFA la mayor incidencia de luz se dio a las 14:00 h, no obstante, en 2018 se señala que las 06:00 y 18:00 h presentó una condición similar. Por otra parte, en 2019 se encontró mayor variación ya que los horarios evaluados fueron estadísticamente distintos (Cuadro 2.19).

Cuadro 2.19. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de 20 Soles durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto de los ciclos 2018 y 2019.

Ciclo	Hora	Variable		
		Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
2018	06:00	23.17c	69.14a	0.40c
	10:00	26.30b	57.07b	5.60b
	14:00	30.91a	37.25d	21.56a
	18:00	27.75b	43.95c	1.48c
2019	06:00	24.94c	91.57a	0.28d
	10:00	28.83b	72.33b	16.34b
	14:00	31.87a	58.93c	23.63a
	18:00	28.41b	70.14b	3.82c

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

- Solteros de Juan Rosas

En el Cuadro 2.20 se muestra el análisis de varianza de los parámetros de clima evaluados durante el desarrollo de fruto en Solteros de Juan Rosas. La RFA fue el parámetro con mayor variación al mostrar un coeficiente de 23.81 %, mientras que la humedad relativa tuvo el menor coeficiente de variación (9.15 %). Así mismo, se observaron diferencias altamente significativas entre los horarios evaluados. Por otro lado, en la prueba de comparación de medias se observó gran variación entre las variables evaluadas al mostrar diferencias estadísticas entre los horarios evaluados (Cuadro 2.21). La mayor temperatura y RFA se registró a las 14:00 h, mientras que los valores más bajos se encontraron a las 06:00 h. De igual manera las 06:00 h fue el rango horario con mayor humedad, mientras que las 14:00 h, que coincide con la mayor temperatura, tuvieron la menor humedad.

Cuadro 2.20. Análisis de varianza para variables ambientales medidas en el sitios de Solteros de Juan Rosas durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto del ciclo 2019.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios	
			Hora	Error
Temperatura (°C)	28.42	10.84	600.93***	9.49
Humedad relativa (%)	80.59	9.15	5341.65***	54.36
Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	12.52	23.81	4309.56***	8.89

\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001

Cuadro 2.21. Prueba de medias para variables ambientales medidas en el sitio de Solteros de Juan Rosas durante el periodo de luz (06:00 a 18:00 h) durante el desarrollo de fruto del ciclo 2019.

Hora	Variable		
	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Radiación fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
06:00	23.16d	94.58a	0.21d
10:00	27.77c	87.03b	15.74b
14:00	33.08a	67.91d	26.18a
18:00	29.69b	72.85c	7.95c

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

Referente al nivel de precipitación registrado en los sistemas de manejo evaluados durante el ciclo de producción 2018, se observa que febrero y mayo fueron los meses con menor incidencia de lluvia tanto en 20 Soles como en Barriles (Figura 2.5A). No obstante, el sistema de manejo ubicado en Barriles registró menor precipitación a lo largo de todo el periodo de amarre y desarrollo con un mínimo de 5 mm en febrero y un máximo de 119 mm durante abril. Esta tendencia también se observó en el periodo de desarrollo de fruto, en el caso de Barriles los meses más secos se registraron durante julio, noviembre y diciembre con precipitaciones que oscilaron entre 20-50 mm (Figura 2.5C).

Mientras que los meses de junio, agosto y octubre se caracterizaron por una mayor precipitación al mostrar un rango de lluvia entre 110-220 mm. Por otra parte, 20 Soles presentó una notable disminución en la precipitación a lo largo de los meses de julio-septiembre y un considerable incremento durante octubre, siendo el mes con mayor precipitación en el periodo al tener alrededor de 270 mm (Figura 2.5C). En contraste, el ciclo de producción 2019 se caracterizó por una notable etapa de sequía a lo largo del periodo de floración y amarre de fruto en los tres vainillales evaluados (Figura 2.5B), principalmente en los meses de febrero, abril y mayo donde la precipitación máxima fue de 5.7 mm mostrando una condición similar en los sistemas de manejo. Durante este periodo los meses de mayor precipitación se presentaron en enero y marzo (Figura 2.5B).

Por otra parte, durante el desarrollo de fruto se observaron cantidades similares de precipitación en los sistemas evaluados en los meses de junio-septiembre con valores que oscilaron entre 0-60 mm. Así mismo se observó un incremento sustancial entre los meses de septiembre y octubre, alcanzando en el caso de Barriles una precipitación acumulada durante estos meses de 60.51 mm a 194.56 mm. Mientras que en 20 Solteros de Juan Rosas el incremento se dio de 51.81 mm a 282.71 mm (Figura 2.5D).

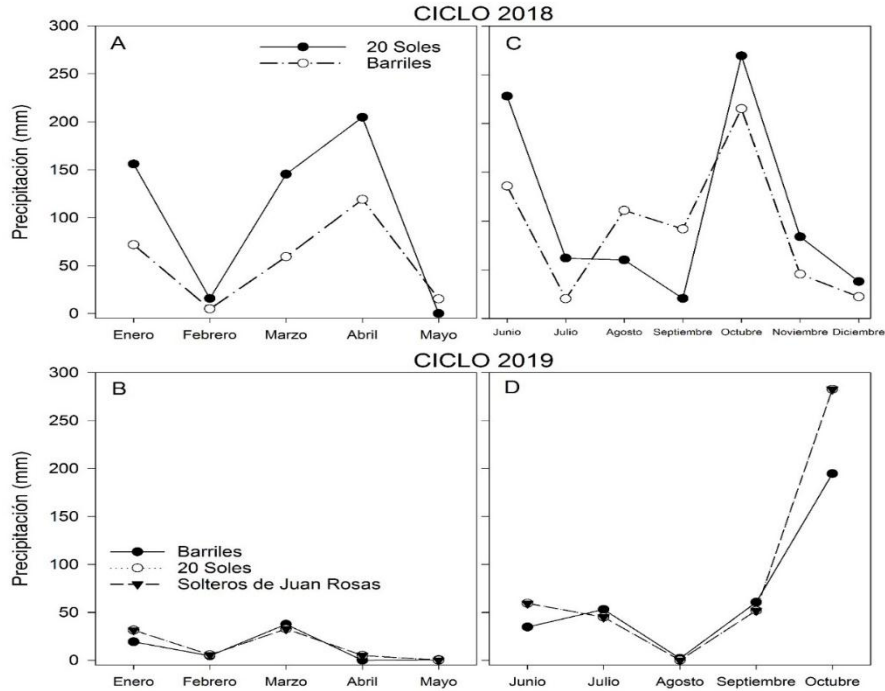


Figura 2.5. Precipitación pluvial acumulada registrada en los sistemas de manejo durante los periodos de floración y amarre (A y B), y en el período de desarrollo de fruto (C y D) en los ciclos de producción de vainilla de 2018 y 2019 (CONAGUA 2019).

El nivel de precipitación registrado durante el ciclo 2019, año en que se realizó la evaluación de rendimiento, se caracterizó por una evidente sequía que representó un reto para mantener las condiciones óptimas en cada sistema de manejo. La práctica de riego complementario fue un factor de gran importancia para mantener los niveles de humedad relativa en los vainillales, sin embargo, el incremento en esta variable junto con la temperatura pudo generar una condición que promovió la caída de fruto o la aparición de enfermedades. Este fue el caso del vainillal en Solteros de Juan Rosas, donde la alta condición de humedad en las primeras horas del día junto con el incremento en la temperatura y el manejo de luz con mayor sombreado de tutores vivos favoreció la presencia de enfermedades como la roya, que junto con la caída prematura de fruto generó un bajo rendimiento de fruto a pesar de la alta densidad de plantas que presenta el vainillal.

El cultivo de vainilla requiere temperatura de 16 a 32 °C, una humedad que puede variar de 60 a 80 % y una intensidad luminosa de 50 a 60 %, ideales para su desarrollo y fructificación (Rahman *et al.* 2019). No obstante, el aborto de frutos de vainilla se ha atribuido en parte al estrés a que se somete la planta por el incremento de temperatura y disminución en la humedad relativa



del cultivo, generalmente con valores mayores a 32 °C y humedad menor a 80 % (Hernández-Hernández 2011) a lo largo del periodo de polinización-fecundación del ciclo de producción o de manera particular en temporadas de sequía. De acuerdo con los datos que reportamos en los tres sistemas de manejo evaluados la temperatura se encontró dentro de los rangos mencionados en literatura (20-30 °C) (Ranadive 2005), pero las temperaturas más altas ( $\geq 32$  °C) en general se registraron en Solteros de Juan Rosas, particularmente durante el periodo comprendido entre abril a septiembre (Figura 2.2). En la humedad relativa encontramos mayor variación y valores más altos con respecto a lo reportado en literatura ( $\approx 80$  %) (Hernández-Hernández 2011).

Los vainillales de Barriles y Solteros de Juan Rosas tuvieron una condición de mayor humedad relativa, ya que tuvieron rangos de 55-92 % y 57-95 %, respectivamente (Figura 2.3). Mientras que en 20 Soles se registraron rangos de 25-85 %, lo que permite diferenciar entre sistemas de manejo ya que los primeros dos vainillales están establecidos en condiciones de malla sombra y 20 Soles se estableció como acahual. Esta condición permite una mayor ventilación y regulación de la temperatura en el cultivo (Hernández-Hernández y Lubinsky 2010). Lo que contribuye a evitar una condición de riesgo en relación con la humedad relativa presente en el cultivo. En este estudio, se encontraron temperaturas similares durante el periodo de floración/amarre y desarrollo de fruto para ambos ciclos evaluados, no obstante, en el ciclo 2019 se registraron temperaturas mayores que en 2018 (Cuadros 2.6 y 2.15). Referente a la humedad, el periodo 2018 se caracterizó por una intensa sequía que se reflejó a lo largo de todo el ciclo de producción con una humedad máxima de 62 % durante el periodo de desarrollo de fruto en Barriles y 65 % en 20 Soles en el periodo de floración y amarre de fruto (Figura 2.3).

En contraste, en el ciclo 2019 se registraron valores de humedad más altos que en 2018, particularmente durante el desarrollo de fruto, donde 20 Soles (77.79 %) y Solteros de Juan Rosas (80.59 %) fueron los sistemas de manejo con mayor humedad relativa (Cuadro 2.15). Cabe destacar que la alta humedad registrada en Solteros de Juan Rosas (Figura 2.3), junto con el incremento en la temperatura (Figura 2.2) generó una condición que dio lugar a la presencia de enfermedades como la roya. Esta situación favoreció la caída prematura de fruto, lo que generó una considerable disminución en el rendimiento de fruto.

En las zonas productoras de vainilla se utilizan diferentes condiciones de iluminación en el cultivo que pueden promover el adecuado desarrollo de la planta: 30-80 % de iluminación en

México (Hernández-Hernández 2011), 50-60 % en Costa Rica (Varela-Quirós 2011), 60 % en Isla Reunión, Comoras y Madagascar (Kahane *et al.* 2008), 30-50 % en India (Sarma *et al.* 2011), 50-60 % en Australia (Exley 2011), y 30-50 % en Indonesia e Islas del sudeste Pacífico (Bianchessi 2004). Valores menores a estos rangos se consideran adecuados para el crecimiento vegetativo y para promover la floración (Puthur 2005).

Müller *et al.* (2001) indican que la regulación de luz en el cultivo es importante ya que es necesaria para balancear la energía absorbida, utilizada y disipada para evitar el daño en los tejidos. Los sistemas de 20 Soles y Solteros de Juan Rosas realizan el manejo de luz a partir de la poda de tutores, mientras que en Barriles esta práctica se realiza mediante la colocación de malla sombra, por lo cual se observó una menor incidencia de luz en el cultivo con respecto de los dos sistemas antes mencionados (Figura 2.4). Los valores de radiación fotosintéticamente activa (RFA) registrados durante los ciclos de estudio (Figura 2.4) fueron considerablemente menor que los reportados por Puthur 2005. Sin embargo, el estudio realizado por Elorza *et al.* (2014) donde evaluaron plantaciones con tutores vivos reportaron valores semejantes a los registrados en este estudio.

### **Correlación canónica de variables ambientales con variables de rendimiento de fruto**

- *Barriles*

El análisis de correlación canónica para las variables evaluadas en Barriles mostró una alta correlación tanto en el periodo de floración y amarre de fruto, como en el periodo de desarrollo de fruto (0.95,  $r^2=0.90$  y 0.99,  $r^2=0.99$ , respectivamente) (Cuadro 2.22). Para la floración y amarre de fruto los valores más altos de correlación se encontraron entre la radiación fotosintéticamente activa de las 18:00 h (RFA\_18H) y la proporción de macetas/m<sup>2</sup>. Mientras que la temperatura de las 14:00 h (Temperatura\_14H) mostró baja asociación con macetas/m<sup>2</sup>, frutos/m<sup>2</sup>, kg de fruto/m<sup>2</sup> y peso promedio por fruto (Figura 2.6A).

En el periodo de desarrollo de fruto las variables de mayor asociación fueron la radiación fotosintéticamente activa de las 14:00 y 18:00 h (RFA\_14H y RFA\_18H) con frutos/maceta. En contraste, la humedad relativa (HR\_18H) y temperatura (Temperatura\_14H) tuvieron la menor asociación con el peso promedio por fruto, ancho de fruto, macetas/guía y macetas/m<sup>2</sup> (Cuadro 2.22, Figura 2.6B).

Cuadro 2.22. Correlación canónica entre variables ambientales de la localidad de Barriles, Gutiérrez Zamora, Veracruz y variables de rendimiento de fruto de *Vanilla planifolia*.

Correlación de variables ambientales con variables canónicas de rendimiento de fruto			
Floración y amarre de fruto		Desarrollo de fruto	
Temperatura_14H	-0.1001	Temperatura_14H	-0.2956
HR_18H	0.5376	HR_14H	0.4822
RFA_14H	0.5125	HR_18H	0.2663
RFA_18H	0.7225	RFA_14H	-0.6141
		RFA_18H	0.7175

Correlación de rendimiento de fruto con variables canónicas de variables ambientales			
Floración y amarre de fruto		Desarrollo de fruto	
Macetas/m <sup>2</sup>	-0.2696	Macetas/m <sup>2</sup>	-0.1526
Frutos/m <sup>2</sup>	-0.0574	Frutos/Maceta	0.9492
kg de fruto/m <sup>2</sup>	0.0809	Macetas/Guía	0.1096
Peso promedio por fruto	0.0940	Peso promedio por fruto	-0.0789
Volumen del fruto	-0.0123	Ancho	0.0801
r <sup>2</sup>	0.90	r <sup>2</sup>	0.99
Correlación canónica	0.95	Correlación canónica	0.99

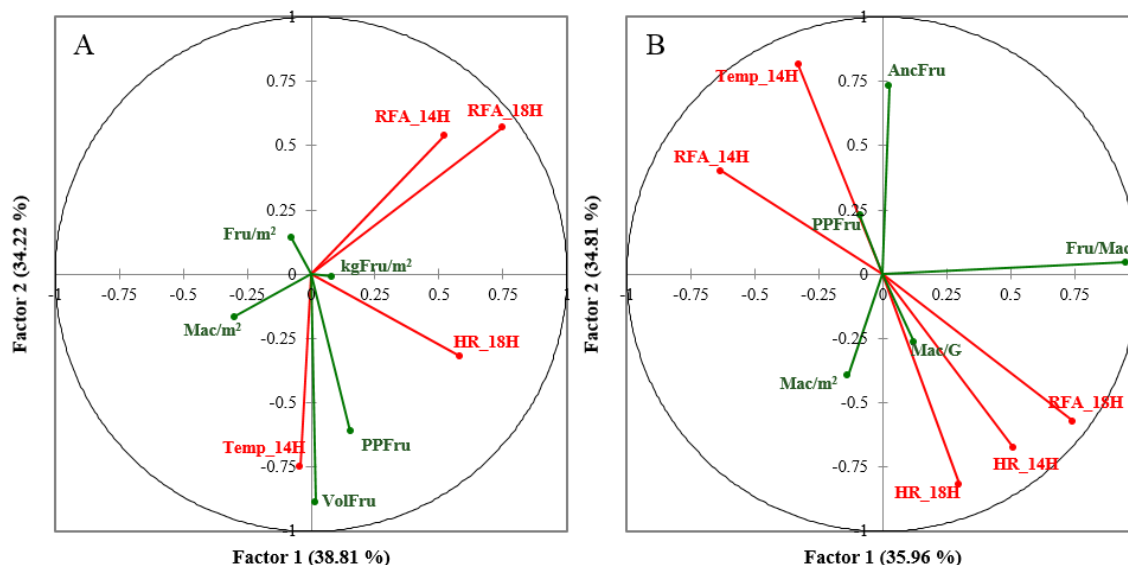


Figura 2.6. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los dos primeros factores en la interacción de variables ambientales y rendimiento de fruto de *Vanilla planifolia* en los periodos de floración y amarre de fruto (A) y desarrollo del fruto (B) del ciclo de producción en Barriles, Gutiérrez Zamora, Ver. Fru/m<sup>2</sup>: Frutos/m<sup>2</sup>; RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa a las 14:00 h; RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa a las 18:00 h; kgFru/m<sup>2</sup>: kilogramos de fruto/m<sup>2</sup>; HR\_14H: Humedad relativa a las 14:00 h; HR\_18H: Humedad relativa a las 18:00 h; PPF: Peso promedio por fruto; VolFru: Volumen del fruto; Temp\_14H: Temperatura a las 14:00 h; Fru/Mac: Frutos/Maceta; Mac/G: Macetas/Guías; Mac/m<sup>2</sup>: Macetas/m<sup>2</sup>.

- 20 Soles

La evaluación del periodo de floración y amarre de fruto en 20 Soles mostró una alta correlación (0.97,  $r^2= 0.95$ ). Los valores de asociación más alta se encontraron entre la temperatura (Temperatura\_18H) y la relación frutos/m<sup>2</sup>. La menor asociación se encontró entre la radiación fotosintéticamente activa (RFA\_14H) con frutos/maceta, peso promedio por fruto, longitud del fruto (Largo) y volumen de fruto (Figura 2.7A). El desarrollo de fruto también mostró una alta correlación (0.93,  $r^2=0.86$ ) (Cuadro 2.23), donde la principal asociación se encontró entre la radiación fotosintéticamente activa (RFA\_18H) con frutos/maceta. Así mismo, la menor asociación se encontró entre la radiación fotosintéticamente activa (RFA\_14H) y el peso promedio por fruto. También se observó correlación alta y negativa entre la humedad relativa (HR\_10H) con la proporción de frutos/maceta (Cuadro 2.23, Figura 2.7B).

Cuadro 2.23. Correlación canónica entre variables ambientales de la localidad de 20 Soles, Papantla, Veracruz y variables de rendimiento de frutos de *Vanilla planifolia*.

Correlación de variables ambientales con variables canónicas de rendimiento de fruto			
Floración y amarre de fruto		Desarrollo de fruto	
Temperatura_18H	-0.2434	Temperatura_18H	0.1212
HR_18H	0.1663	HR_10H	0.3695
RFA_14H	-0.0118	RFA_14H	-0.2487
RFA_18H	0.1464	RFA_18H	0.7995
Correlación de rendimiento de fruto con variables canónicas de variables ambientales			
Floración y amarre de fruto		Desarrollo de fruto	
Frutos/Maceta	-0.2052	Frutos/Maceta	-0.5260
Frutos/m <sup>2</sup>	0.4968	Peso promedio por fruto	-0.0113
Peso promedio por fruto	-0.0474	Ancho	-0.1840
Largo	-0.3733	Largo x Ancho	-0.1859
Volumen del fruto	-0.2107		
$r^2$	0.95	$r^2$	0.86
Correlación canónica	0.97	Correlación canónica	0.93

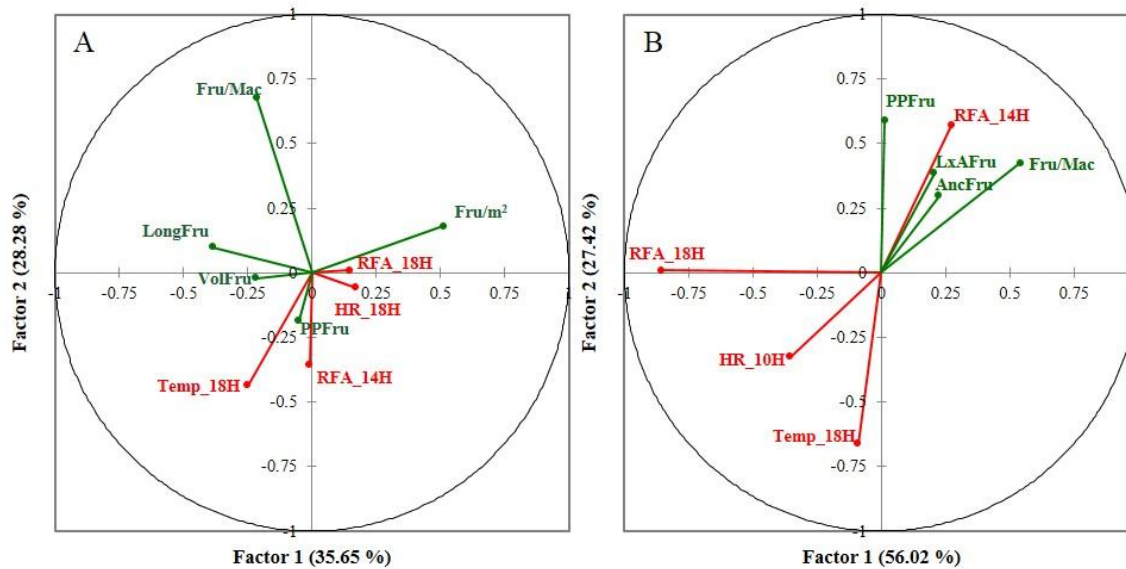


Figura 2.7. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los dos primeros factores en la interacción de variables ambientales y rendimiento de fruto de *Vanilla planifolia* en los periodos de floración y amarre de fruto (A) y desarrollo de fruto (B) del ciclo de producción en 20 Soles, Papantla, Ver. Fru/Mac: Frutos/Maceta; Fru/m<sup>2</sup>: Frutos/m<sup>2</sup>; LongFru: Longitud del fruto; RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa a las 18:00 h; HR\_18H: Humedad relativa a las 18:00 h; HR\_10H: Humedad relativa a las 10:00 h; RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa a las 14:00 h; PPFru: Peso promedio por fruto; Temp\_18H: Temperatura a las 18:00 h; VolFru: Volumen del fruto; LxAfFru: Largo x Ancho; AncFru: Ancho del fruto.

- *Solteros de Juan Rosas*

Las correlaciones más bajas se encontraron en Solteros de Juan Rosas. La mayor asociación en el periodo de floración y amarre de fruto se encontró entre la temperatura (Temperatura\_18H) y radiación fotosintéticamente activa (RFA\_14H) con frutos/maceta y peso promedio por fruto. De igual manera, las asociaciones menores se encontraron entre radiación fotosintéticamente activa (RFA\_18H) con ancho de fruto (Figura 2.8A). El segundo periodo tuvo menor correlación que el primero (0.79,  $r^2=0.63$ ) (Cuadro 2.24), sin embargo, la mayor asociación se encontró entre la temperatura (Temperatura\_18H) con frutos/guía, frutos/m<sup>2</sup> y macetas/guía. Mientras que la menor asociación se encontró entre la radiación fotosintéticamente activa (RFA\_18H) con frutos/maceta (Figura 2.8B).

Cuadro 2.24. Correlación canónica entre variables ambientales de la localidad de Solteros de Juan Rosas, Papantla, Veracruz y variables de rendimiento de frutos de *Vanilla planifolia*.

Correlación de variables ambientales con variables canónicas de rendimiento de fruto			
Floración y amarre de fruto		Desarrollo de fruto	
Temperatura_18H	0.5256	Temperatura_18H	0.4310
HR_18H	0.4849	HR_18H	-0.2624
RFA_14H	0.5161	RFA_14H	-0.2204
RFA_18H	-0.3758	RFA_18H	-0.0793
Correlación de rendimiento de fruto con variables canónicas de variables ambientales			
Floración y amarre de fruto		Desarrollo de fruto	
Guías/m <sup>2</sup>	0.2736	Macetas/Guía	0.6979
Macetas/m <sup>2</sup>	0.4901	Macetas/m <sup>2</sup>	0.4035
Frutos/Maceta	-0.5486	Frutos/Maceta	0.3430
Peso promedio por fruto	0.5023	Frutos/m <sup>2</sup>	0.6419
Ancho	0.0883	Frutos/Guía	0.4917
Volumen del fruto	0.3128		
r <sup>2</sup>	0.73	r <sup>2</sup>	0.63
Correlación canónica	0.86	Correlación canónica	0.79

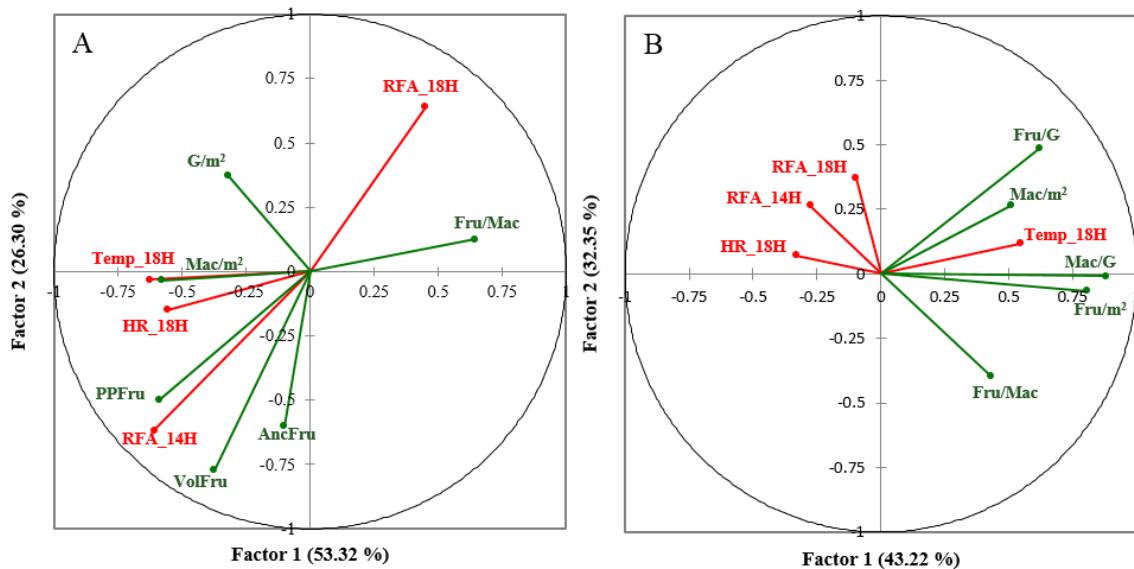


Figura 2.8. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los dos primeros factores en la interacción de variables ambientales y rendimiento de fruto de *Vanilla planifolia* en los periodos de floración y amarre de fruto (A) y desarrollo de fruto (B) del ciclo de producción en Solteros de Juan Rosas, Papantla, Ver. Fru/Mac: Frutos/Maceta; G/m<sup>2</sup>: Guías/m<sup>2</sup>; RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa a las 18:00 h; Fru/G: Frutos/Guía; Mac/m<sup>2</sup>: Macetas/m<sup>2</sup>; VolFru: Volumen del fruto; RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa a las 14:00 h; PPFru: Peso promedio por fruto; HR\_18H: Humedad relativa a las 18:00 h; Temp\_18H: Temperatura a las 18:00 h; Fru/m<sup>2</sup>: Frutos/m<sup>2</sup>; Mac/G: Macetas/Guía; AncFru: Ancho del fruto.

Dentro de los factores ambientales de mayor relevancia en la fisiología de un cultivo son la radiación solar, humedad relativa y temperatura (Zaubin *et al.* 2011). Sin embargo, estos factores no pueden ser controlados del todo por el agricultor y varían con cada estación, por lo que la implementación de prácticas de manejo adecuadas puede maximizar el rendimiento, pero la respuesta del cultivo puede variar entre ambientes (Fageria *et al.* 2006). Esto se observó en los sistemas evaluados, ya que las prácticas realizadas en cada vainillal tuvieron efecto en los parámetros de clima al diferenciar los sistemas en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) y acahual (20 Soles). Esto deriva del objetivo de cada productor en el cultivo de vainilla que lleva a generar prácticas de manejo distintas que generan microclimas particulares que influyen de diferente manera en los componentes de rendimiento.

La influencia de la temperatura en las plantas de vainilla se refleja en que el incremento en este parámetro puede generar una condición de estrés y un desbalance hormonal en la planta, lo que disminuye la acumulación de hormonas que favorecen la fijación del fruto como las auxinas, giberelinas y citocininas e incrementando el etileno y ácido abscísico que promueve su caída (Modise *et al.* 2009; Khandaker *et al.* 2016). Las variaciones en la temperatura se asocian con la proporción de frutos/maceta, frutos/m<sup>2</sup> y la cantidad de frutos, ya que el descenso en la temperatura en una determinada etapa fenológica de la planta puede estimular la floración al inhibir la dominancia apical (Hernández y Lubinsky 2010) que también se relaciona con el potencial de frutos que puedan llegar a desarrollarse.

La humedad es otro factor de gran importancia en el cultivo, ya que el riesgo de tener una condición de alta humedad es la incidencia de enfermedades causadas por hongos (Bhai *et al.* 2008; Tombe y Liew 2011), condición que se observó en Solteros de Juan Rosas, lo que aunado a una ventilación insuficiente, que generó tanto la aparición de enfermedades como la caída prematura de fruto. Es importante mencionar que, aunque periodos de sequía donde la humedad relativa disminuye puede ser benéfico para promover el desarrollo de yemas florales (Exley 2011), periodos muy prolongados de sequía genera una condición de estrés que puede inducir la caída prematura de flores o frutos al reducir el crecimiento vegetativo o la floración por la pérdida de agua en sus tejidos suculentos. (Leakey 1970).

La vainilla presenta el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), lo que le proporciona una gran plasticidad para adaptarse en ambientes con diferente cantidad de luz (Fouché y Jouve 1999). La RFA tuvo diferente efecto dependiendo de los sistemas de cultivo, en los cuales se realizan prácticas de manejo particulares relacionadas con el manejo de luz-sombra. La capacidad adaptativa de la vainilla en diferentes condiciones de luz se atribuye en parte a que se le considera una especie no domesticada (Flores-Jiménez *et al.* 2017), lo que justamente le permite establecerse bajo diferentes sistemas de manejo.

Gupta y Jatothu (2013) señalan que la cantidad de luz que recibe el cultivo es uno de los factores con mayor influencia en el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que es esencial para el desarrollo fisiológico en las plantas mediante procesos como fotosíntesis, así como una gran influencia en el crecimiento y desarrollo. Díez *et al.* (2017) señalan que una intensidad de luz de 8 % puede favorecer que los entrenudos tengan mayor longitud, mientras que una incidencia de luz entre 17 % y 31 % favorecen una mayor área foliar. Por lo cual la RFA fue una de las variables asociada principalmente con el número de guías, ya que tanto la cantidad de guías como la altura de planta refiere a una mayor cantidad de follaje que puede realizar la actividad fotosintética. Así mismo, menciona que se da un mayor crecimiento en plantas con intensidad de luz intermedia ( $369\text{-}577 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) expresada en longitud de la planta, área foliar, biomasa radicular y biomasa total. Además, el ambiente que favorece la fotosíntesis y crecimiento de la vainilla se dan al medio día al mostrar estos valores, mientras que ambientes con mayor radiación ( $67\%$  o  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pueden limitar la fotosíntesis y desarrollo de la planta. Pero también pueden generar quemaduras en las estructuras de la planta y una caída prematura de los frutos en desarrollo, lo que afecta la proporción de macetas (inflorescencias) en la planta y en consecuencia el rendimiento.

La influencia de la condición ambiental sobre la producción y rendimiento de un cultivo puede tener diferente efecto. Por ejemplo, en cultivos como el maíz (*Zea mays*) las variaciones en la temperatura pueden influir en la disminución del crecimiento y peso del grano (Novacek *et al.* 2013), situación que se observó en los tres sistemas evaluados teniendo influencia en el peso promedio y tamaño del fruto (longitud, ancho y grosor). Mientras que en orquídeas ornamentales como *Phalaenopsis*, con el mismo metabolismo que la vainilla, las variaciones en la temperatura y humedad pueden promover el crecimiento vegetativo (Pridgeon 2000; Paradiseo y De Pascale



2014). En el caso de la vainilla, la disminución en la temperatura puede inhibir la dominancia apical y promover el desarrollo de brotes vegetativos y florales (Hernández y Lubinsky 2010).

En otras especies como el plátano (*Musa paradisiaca*) se ha observado que la productividad se asocia con el nivel de precipitación, temperatura y humedad relativa. Es decir, que el rendimiento del cultivo puede ser afectada por lluvias excesivas y altas temperaturas, no obstante, la calidad del fruto también puede disminuir cuando la temperatura y la humedad son bajas (Salau *et al.* 2016). Por lo que se ha observado una buena productividad en rangos de temperatura de 25-27 °C y humedad cercana al 77 %, temperaturas mayores pueden reducir la calidad del fruto puesto que hay pérdida de firmeza por la pérdida de agua (Salau *et al.* 2016). Esta situación también se puede observar en vainilla, puesto que el incremento en la temperatura y humedad relativa favorecen el desarrollo de enfermedades que impacten no sólo en el rendimiento, sino también en la calidad física de los frutos.

## **2.4. CONCLUSIONES**

Se encontraron diferencias estadísticas en la humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa registradas en los dos ciclos registrados, donde 2018 tuvo un importante periodo de sequía que generó una pronunciada disminución en la humedad relativa en los dos sitios evaluados. Las diferencias entre sistemas de manejo se encontraron en la humedad relativa, ya que aquellos establecidos en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) registraron valores más altos que el sistema en acahual (20 Soles) en el que ocurre una mayor ventilación del cultivo dadas sus características de establecimiento. El principal parámetro de clima que diferenció los vainillales evaluados fue la RFA derivado de las prácticas que el productor realiza en el manejo de luz sobre el cultivo dependiendo del sistema en que estén establecidos. Las semejanzas entre 20 Soles y Solteros de Juan Rosas, a pesar de ser sistemas de manejo distintos, podría asociarse con el manejo que se realiza ya que ambos vainillales presentan tutores vivos. De acuerdo con los parámetros de clima registrados en Solteros de Juan Rosas se determinó que los altos valores de temperatura y humedad relativa generaron un microclima de estrés que llevó a la caída prematura de flores y frutos, lo que influyó en un bajo rendimiento. Se observaron diferencias en la producción de fruto entre sitios, sin embargo, Solteros de Juan Rosas y 20 Soles tuvieron características similares en cuanto al rendimiento y características físicas de los frutos (peso, longitud, grosor y ancho) a pesar de ser sistemas de manejo distintos. El efecto de las variables ambientales depende del sistema de manejo (vainillal), sin embargo, en términos generales, la

humedad y radiación fotosintéticamente activa fueron los parámetros de clima con mayor influencia sobre el rendimiento de fruto.

### **CAPÍTULO III. VARIACION DE METABOLITOS EN FRUTOS VERDES Y BENEFICIADOS DE *Vanilla planifolia* CULTIVADOS EN DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO**

#### **RESUMEN**

Los metabolitos primarios y secundarios de las plantas desempeñan funciones diferentes y pueden ser un indicador de la condición ambiental en que los organismos vegetales se desarrollan. El objetivo de este capítulo fue correlacionar el perfil de metabolitos primarios y secundarios en frutos verdes y beneficiados de dos vainillales en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) y uno en acahual (20 Soles) con la condición ambiental en que se desarrollan. Se cuantificaron azúcares solubles totales, almidón, pigmentos fotosintéticos (clorofilas, carotenos+xantofilas) y metabolitos secundarios totales (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales) por espectrofotometría, así como los perfiles de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides por cromatografía de líquidos. El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza, prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), análisis de componentes principales, conglomerados y correlaciones canónicas. Los resultados indicaron que los frutos colectados en 20 Soles tuvieron mayor acumulación de azúcares solubles, almidón y pigmentos fotosintéticos. A pesar de que los sistemas de manejo evaluados tuvieron características particulares, los vainillales de 20 Soles y Solteros de Juan Rosas fueron similares en la acumulación de metabolitos secundarios totales tanto en frutos verdes como beneficiados, con tendencia a incrementar en los frutos más maduros. Sin embargo, los perfiles de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides de las colectas de Barriles y Solteros de Juan Rosas tuvieron mayor semejanza. La correlación canónica indicó principalmente que la temperatura y radiación fotosintéticamente activa (RFA) tuvieron mayor influencia en la acumulación de azúcares solubles, pigmentos fotosintéticos y metabolitos secundarios totales. A partir de estos resultados se concluye que el sistema de manejo influyó en los perfiles de metabolitos primarios y secundarios de las colectas evaluadas, ya que los sistemas de manejo en malla sombra, particularmente con tutores inertes, tuvieron menor acumulación de estos compuestos en relación al sistema en acahual. Además, los frutos cultivados en este sistema de manejo presentaron una acumulación mayor de moléculas de almacenamiento o precursoras de otros metabolitos como los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y el almidón.

**Palabras clave:** condición ambiental, frutos, metabolitos primarios, metabolitos secundarios

### CHAPTER III. VARIATION OF METABOLITES IN GREEN AND CURED PODS OF *Vanilla planifolia* CULTIVATED IN DIFFERENT MANAGEMENT SYSTEMS

#### ABSTRACT

Plant primary and secondary metabolites perform different functions and can be an indicator of the environmental condition in which plant organisms develop. The chapter aimed to correlate the primary and secondary metabolites profile in green and cured pods of two vanilla plantations in shade mesh (Barriles and Solteros de Juan Rosas; SJR) and one in acahual (20 Soles) with their environmental condition. Total soluble sugars, starch, photosynthetic pigments (chlorophylls, carotenoids+xanthophylls) and secondary metabolites (total phenolic compounds, flavonoids and terpenoids) were quantified by spectrophotometry; as well as the profile of phenolic acids, flavonoids and terpenoids by liquid chromatography. Statistical analysis consisted in an analysis of variance, Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ), analysis of principal components, conglomerates and canonical correlations. The results indicated that the fruits collected in acahual (20 Soles) had the highest accumulation of soluble sugars, starch and photosynthetic pigments. Although the management systems evaluated had particular characteristics, the vanilla plantations in 20 Soles and SJR were similar in the total secondary metabolites accumulation in both green and cured pods, with a tendency to increase in more mature fruits. However, the phenolic acids, flavonoids and terpenoids profiles in accessions of Barriles and SJR were more similar. The canonical correlation mainly indicated that temperature and photosynthetically active radiation (PAR) had a greater influence on accumulation of soluble sugars, photosynthetic pigments and total secondary metabolites. From these results it is concluded that the management system influenced the profile of primary and secondary metabolites in the accessions evaluated, since the management systems in shade mesh, particularly with inert tutors, had less accumulation of these compounds in relation to the system in acahual. In addition, the fruits grown in this management system had a greater accumulation of storage molecules or precursors of other metabolites such as soluble sugars (glucose, fructose and sucrose) and starch.

**Key words:** environmental condition, fruits, primary metabolites, secondary metabolites, vanilla.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas presentan metabolismos primario y secundario. Los productos del metabolismo primario producen moléculas como lípidos, aminoácidos, carbohidratos y ácidos nucleicos que aportan energía y bloques de construcción para el crecimiento y desarrollo de un organismo (Wink 2003; Hartmann 2007). Así mismo, pueden actuar de manera directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas por lo que los metabolitos derivados de este metabolismo actúan sobre procesos químicos como la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, diferenciación de tejidos y formación de macromoléculas (Taiz y Zeiger 2006).

En contraste, el metabolismo secundario produce una diversidad de moléculas de bajo peso molecular conocidas como metabolitos secundarios, los cuales pueden tener funciones específicas o múltiples propósitos (Hu *et al.* 2018; Li *et al.* 2018) y contribuyen a las interacciones planta-ambiente (Hartmann 2007). Las funciones de estos metabolitos son diversas, pueden actuar como defensa contra herbívoros y patógenos (Mithöfer y Boland 2012), brindar resistencia a condiciones de estrés (Bont *et al.* 2020), promover mutualismos (Schäfer *et al.* 2009) y la ingesta de micronutrientes (Hu *et al.* 2018) o reguladores de crecimiento (Malinovsky *et al.* 2017). No obstante, también pueden contribuir en los perfiles aromáticos, sabores y colores como estrategia reproductiva (Akula y Ravishankar 2011; Deborde *et al.* 2017).

La biosíntesis de metabolitos secundarios es variable y está influenciada por factores bióticos y abióticos, especie, etapa fenológica o estructura vegetal, entre otros (Fang *et al.* 2011; Pichersky y Lewinsohn 2011; Kim y Buell 2015). Por lo que un conjunto particular de metabolitos secundarios producidos por una población de plantas puede reflejar las características específicas de un ambiente o especie determinada (Moore *et al.* 2014). Los cambios en el metabolismo secundario de las plantas son una respuesta a los cambios ambientales, ya que modifican sus mecanismos metabólicos para mantener sus rutas en óptimas condiciones (Ober 2005).

La influencia del ambiente sobre el metabolismo de las plantas se expresa principalmente en la producción de metabolitos, dando lugar a variaciones en sus perfiles químicos. Factores bióticos y abióticos como la deficiencia de nutrientes, lesiones en las estructuras vegetales, presencia de iones metálicos, radiación UV, intensidad de luz, ritmo circadiano, temporada estacional, salinidad, sequía, cambios en la temperatura y ataque de patógenos son algunas de las principales variables involucradas en las diferencias en el contenido de metabolitos secundarios (Seigler

2000; Gouvea *et al.* 2012; Verma y Shukla 2015). De esta manera, la condición ambiental puede propiciar el desarrollo de ecotipos o quimiotipos que expresen las variaciones metabólicas en la especie (Halkier y Gershenzon 2006). El efecto de la condición ambiental ha sido objeto de estudios en orquídeas como *Vanilla planifolia*, ya que de acuerdo con Dodd *et al.* (2002) y Rao y Ravishankar (2002), la temperatura, humedad relativa e intensidad de luz son los tres factores abióticos que, además de determinar la capacidad adaptativa de la vainilla, tienen mayor influencia en la fotosíntesis y producción de los metabolitos secundarios. De manera particular, la condición ambiental tiene un efecto importante en los pigmentos fotosintéticos, ya que son la principal fuente de recepción de energía a través de la luz y una condición de estrés ambiental puede promover su degradación y disminución de su actividad (Tanaka *et al.* 2008).

Los principales estudios realizados en *Vanilla planifolia* se han enfocado en la caracterización aromática de los frutos beneficiados. Sin embargo, aún es limitada la información acerca de los contenidos de metabolitos primarios y secundarios tanto en frutos verdes como beneficiados. El objetivo de este capítulo fue evaluar el contenido de metabolitos primarios (pigmentos fotosintéticos, azúcares solubles y almidón), el contenido y perfil de metabolitos secundarios (compuestos fenólicos totales, ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides) en frutos verdes y beneficiados con diferente madurez fisiológica en tres sitios durante dos ciclos de cultivo, así como su relación con la condición ambiental de cada sitio.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

La región Totonacapan abarca una superficie de aproximadamente 7751 km<sup>2</sup>, en ella se incluye el área septentrional de la Sierra Norte de Puebla y parte de la llanura costera del Golfo al norte de Veracruz (Toledo *et al.* 1994). Esta región posee una geografía variada en la que se distinguen distintos climas y recursos naturales. Parte del desarrollo de la región se basa en actividades agrícolas como el cultivo de cítricos, tabaco y vainilla (Zúñiga-Bravo 2014). Este último es uno de los cultivos de mayor importancia no sólo por su valor económico, sino también por su trascendencia cultural. De acuerdo con datos del IMPI (2009), la vainilla se cultiva en 39 municipios de la región Totonacapan, 19 de los cuales corresponden a Veracruz.

## Sitios de colecta

Durante el ciclo 2018 se seleccionaron dos sitios de colecta en la Región Totonacapan de Veracruz mediante observación directa: el Rancho 20 Soles ubicado en el municipio de Papantla y el Rancho Xanathltan en la localidad de Barriles perteneciente al municipio de Gutiérrez Zamora, por sus características contrastantes en el manejo y sistema de producción; en este caso, acahual (Rancho 20 Soles) y malla sombra (Paso de Barriles). En el ciclo 2019 se incluyó a los dos sitios mencionados anteriormente, la localidad de Solteros de Juan Rosas establecido en condiciones de malla sombra con tutores vivos. Los sitios de ubicaron con un GPS Garmin Montana 650, en el Cuadro 3.1 se indica su ubicación geográfica.

Cuadro 3.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.

Municipio	Localidad	Longitud	Latitud	Altitud (msnm)
Papantla	Rancho 20 Soles	-97.31	20.43	203
	Solteros de Juan Rosas	-97.34	20.34	176
Gutiérrez Zamora	Paso de Barriles	-97.14	20.46	29

msnm: metros sobre el nivel de mar

## Material vegetal

Durante los meses de abril-mayo de 2018 y 2019 se polinizaron manualmente aproximadamente 60 flores por sitio en cada ciclo de cultivo. La cosecha de frutos para el ciclo 2018 y el ciclo 2019 se realizó a las 28 y 32 semanas, y 30 y 32 semanas posteriores a la polinización, respectivamente. El material obtenido en ambos ciclos se separó en dos grupos, la mitad de frutos verdes se liofilizaron, molieron y tamizaron, y se reservó para los análisis posteriores. Los frutos restantes colectados en 2018 se trasladaron al Rancho Santa Beatriz donde se sometieron a un beneficiado tradicional de 16 semanas, mientras que los frutos colectados en 2019 fueron beneficiados por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez del ejido Primero de Mayo, Veracruz. De acuerdo con el proceso descrito por Xochipa-Morante (2015), el proceso de beneficiado consistió en escaldar los frutos en agua a 75-80°C durante 8 a 10 segundos. Posteriormente, las vainas se colocaron en una caja de madera (encajonado) donde conservan el calor y se favorecen las reacciones enzimáticas que dan pie al desarrollo de los compuestos

aromáticos. Se procedió al secado al sol de los frutos en lapsos de 30 minutos a 2 horas, dependiendo de las condiciones del clima, para luego encajonar nuevamente.

### **Procesamiento de material vegetal**

- a) Frutos verdes: los frutos colectados se cortaron en rodajas con un grosor aproximado de 2 mm y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente las rodajas se sometieron a un proceso de liofilización durante 8 h bajo las siguientes condiciones: temperatura del colector -80 °C, presión de vacío 0.2 psi en una liofilizadora Labconco® (FreeZone Cat. 7400040). Una vez deshidratados, los frutos se molieron en un molino de carga (Krupps GX4100) hasta obtener una molienda uniforme. Los frutos molidos se hicieron pasar a través de un tamiz a fin de homogeneizar el tamaño de partícula a 420 µm. Las muestras procesadas se almacenaron a 5 °C hasta el momento del análisis.
- b) Frutos beneficiados: los frutos se congelaron a -20 °C y se molieron en un procesador de alimentos marca Nutribullet® Serie 600 hasta obtener una molienda uniforme. Los frutos molidos se almacenaron a 5 °C hasta el momento del análisis.

### **Cuantificación de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón**

#### *Preparación de extractos para cuantificación de azúcares solubles*

Se pesaron 50 mg de tejido y se agregaron 3 mL de etanol al 80 %, las muestras se llevaron a baño María (80 °C) durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Este proceso de extracción se realizó cuatro veces de manera consecutiva. Luego de realizar los cuatro lavados, los extractos se llevaron a sequedad durante 24 h a 50 °C en una estufa de aire forzado, transcurrido este lapso el residuo se resuspendió en 2 mL de agua destilada.

#### *Cuantificación de azúcares solubles*

La cuantificación se realizó a partir de la metodología propuesta por Scholes *et al.* (1994). La mezcla de reacción en placa consistió en adicionar 200 µL HEPES 100 mM a pH 7.5, 10 µL NAD 40 mM, 10 µL ATP 100 mM a pH 7, 10 µL glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y 10 µL extracto para luego reposar durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 10 µL de hexoquinasa y reposó por 20 min, luego de este lapso se agregaron 10 µL de fosfogluco isomerasa con un tiempo de reposo de 20 min. Finalmente se agregaron 10 µL de invertasa y luego de 20 min de



reposito se realizó la lectura a 340 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo-Scientific Varioskan Flash).

### *Cuantificación de almidón*

La cuantificación de almidón se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Scholes *et al.* (1994) a través de la medición de glucosa como sustrato. Para ello se utilizó el tejido residual de los lavados para azúcares solubles, el cual se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se colocó en autoclave durante 30 min a 121 °C. Para la digestión del almidón se mezclaron 100 µL de extracto, 100 µL de amortiguador MES 500 mM pH 4.5, 50 µL de α-amilasa (0.5 U/ µL MES), 50 µL de amilogucosidasa (0.28 U/ µL MES), e incubaron durante 4.5 h a 37 °C. La mezcla de reacción para la determinación de almidón se realizó a partir de 200 µL de HEPES 100 mM pH 7.5, 10 µL de NAD 40 mM, 10 µL de ATP 100 mM, 10 µL de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (0.05 U/ µL HEPES), 10 µL de extracto y 10 µL de hexoquinasa (0.05 U/ µL HEPES). Posteriormente reposó durante 20 min a temperatura ambiente y se realizó la lectura a 340 nm.

### **Cuantificación de pigmentos fotosintéticos**

Se pesaron 250 mg de tejido fresco y se maceraron en un mortero frío con 5 mL de acetona fría al 80 %. Se adicionaron 0.1 g de MgCl<sub>2</sub> y arena de mar purificada. La mezcla se centrifugó a 2 350 g por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se aforó a 5 mL con acetona al 80 %. La lectura se realizó a 470, 646 y 663 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Evolution 300 Thermo-Scientific). La concentración en mg g<sup>-1</sup> de clorofila *a* (Chl<sub>a</sub>), clorofila *b* (Chl<sub>b</sub>) y xantofilas + carotenoides (C<sub>x+c</sub>) se calculó como señala Lichtenthaler y Wellburn (1983) en las Ecuaciones 2, 3 y 4.

$$Chl_a = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$Chl_b = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 A_{470} - 3.27 Chl_a - 107 Chl_b}{229} \quad (\text{Ecuación 4})$$

## **Cuantificación de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales por espectrofotometría**

### *Compuestos fenólicos totales en microplaca*

Los extractos se obtuvieron al pesar 120 mg de tejido vegetal suspendidos en 3 mL de metanol, luego de colocar las muestras en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner AS5150B) con frecuencia 5.5 durante 30 minutos en intervalos de 10 min y reposos de 5 min entre cada ciclo. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 2 350 g durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. La mezcla de reacción en placa consistió en 25  $\mu\text{L}$  de extracto y 150  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, posteriormente se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 %, luego de agitar durante 30 s y reposar por 6 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Luego del reposo, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5 % y reposó durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. La lectura se realizó a 725 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo-Scientific Varioskan Flash) ya que se utilizó ácido gálico como estándar y Uriarte-Pueyo y Calvo (2009), y Silva-Beltrán *et al.* (2015) mencionan que la longitud de onda de absorción de este compuesto se da entre 720 y 765 nm. Los resultados se expresaron en mg de equivalente de ácido gálico por gramo de materia seca ( $\text{mg EAG g}^{-1} \text{MS}$ ).

### *Flavonoides totales en microplaca*

Para la cuantificación se utilizaron los mismos extractos que en compuestos fenólicos totales. La mezcla de reacción para cuantificar flavonoides consistió en 25  $\mu\text{L}$  de extracto y 100  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, la mezcla se agitó durante 10 s y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  al 5 % (disuelto en agua destilada). Luego de una agitación de 10 s y un reposo de 5 min a temperatura ambiente se agregaron 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10 % (disuelto en metanol). La mezcla se agitó durante 10 s y reposó 6 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 M (disuelto en agua destilada). Luego de 10 s de agitación se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, se agitó por 15 s y reposó por 5 min en oscuridad. La lectura se realizó a 415 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo-Scientific Varioskan Flash). Los resultados se expresaron en mg de equivalente de quercetina por gramo de materia seca ( $\text{mg EQ g}^{-1} \text{MS}$ ).

### *Terpenos totales:*

La extracción se realizó de acuerdo con Ghorai *et al.* (2012). Se pesaron 250 mg de tejido y se adicionaron 1.75 mL de metanol al 95 %, las muestras se colocaron en un sonicador (Ultrasonic Cleaner AS5150B) durante 30 min en lapsos intermitentes de 10 min y maceraron durante 24 h a temperatura ambiente. Las muestras se filtraron y almacenaron a 5 °C hasta el momento del análisis. La cuantificación se realizó a partir del método propuesto por Chang y Lin (2012). En la mezcla de reacción se adicionaron 120 µL de extracto, 150 µL de vainillina al 5 % y 500 µL de ácido perclórico, posteriormente se llevaron a baño María (60 °C) durante 45 min. Transcurrido este tiempo las muestras se colocaron en hielo durante 10 min y se agregaron 2.25 ml de ácido acético glacial. La lectura se realizó a 550 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Evolution 300 Thermo-Scientific). Los resultados se expresaron en mg de equivalente de ácido oleanólico por gramo de materia seca (mg EAO g<sup>-1</sup> MS).

### **Identificación de metabolitos mayoritarios en frutos de vainilla por UPLC-QTOF-MS**

La identificación de metabolitos mediante cromatografía de líquidos UPLC-QTOF-MS se realizó a partir de 700 mg de tejido al cual se le adicionaron 3.5 mL de la mezcla metanol:agua (8:2 v/v). Luego de agitar en vortex durante 10 s, las muestras se sonicaron durante 1 h y se centrifugaron a 2500 g durante 10 minutos. Finalmente, los extractos se filtraron con acrodisco de poro 0.45 µm. Los metabolitos puros utilizados como estándares se prepararon a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>, sus características se describen en el Cuadro 3.2. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: flujo de columna 0.3 mL min<sup>-1</sup>, presión de operación 15 000 psi, fase móvil agua-ácido fórmico 0.1 %: Acetonitrilo (90:10), volumen de inyección de estándares 5 µL y muestra 8 µL, ionización en modo positivo (ESI<sup>+</sup>), el escaneo de masas se realizó en un rango de 50-400 m/z, electrospray 4 000 V, nebulizador 40 psi, tiempo de corrida 15 min y un flujo de 0.3 mL min<sup>-1</sup>.

Cuadro 3.2. Identificación y marca de los metabolitos utilizados.

Metabolito	Marca	Número de catálogo
<i>m</i> -Cresol		65996
Ácido <i>trans-p</i> -cumárico		55823
Ácido ferúlico		PHR1791
Eugenol		35995
Vainillina	Sigma-Aldrich	PHR1245
Ácido vanílico		94770
Ácido 4-Hidroxibenzoico		PHR1048
4-Hidroxibenzaldehído		54590
Alcohol vainílico		61852
3,4-Dihidroxibenzaldehído		92588
Glucovainillina 95 %	SynInnova	SL-899

### **Cuantificación de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides por cromatografía de líquidos (HPLC)**

#### *Preparación de extractos*

El proceso de extracción de metabolitos se realizó a partir de 50 mg de tejido vegetal y 1 mL de etanol al 80 %. Luego de tres ciclos intermitentes de 10 min en el sonicador (Ultrasonic Cleaner AS5150B) las muestras se centrifugaron a 2 000 g por 10 min y se filtraron con acrodisco de poro 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### *Ácidos fenólicos y flavonoides*

La fase móvil se corrió en condiciones de gradiente, del minuto 0.1 al 20 la proporción de fase móvil fue: fase A (Agua pH 2.5 acidificado con ácido trifluoroacético) 85 % y fase B (acetonitrilo) 15 %. A partir del minuto 20 hasta el final de la corrida (35 minutos) la proporción de fase móvil cambió a 65 % fase A y 35 % fase B. Se utilizó una columna Hypersil ODS C-18 marca Agilent® (diámetro de partícula 5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm). El flujo de fase móvil fue de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  bajo condiciones isotérmicas (30 °C) y un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  realizando la lectura a los 254, 280, 300 y 365 nm. Las curvas de calibración para cuantificar los ácidos fenólicos se realizaron con los estándares de los ácidos clorogénico, ferúlico, rosmárico, protocatecuico, 3,5-dihidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzoico,  $\beta$ -resorcílico, siríngico, vanílico, gálico, sinápico y *p*-cumárico. Los estándares utilizados para cuantificar los flavonoides fueron miricetina, kaempferol, isorhamnetina, apigenina, rutina, morina y quercetina.

## *Terpenoides*

El análisis de terpenoides se realizó con una fase móvil en proporción de 80 % fase A (acetonitrilo) y 20 % fase B (agua) en condiciones isotérmicas de 40 °C. Se utilizó la columna Zorbax Eclipse XDB C-8 marca Agilent® (diámetro de partícula 5 µm, 150 x 4.6 mm). El flujo de fase móvil fue de 1 mL min<sup>-1</sup>, volumen de inyección 20 µL y lectura a longitud de onda de 215 y 220 nm. Las curvas de calibración se realizaron con los estándares de carnosol, estigmasterol, ácido oleanólico, α-amirina, β-sitosterol y ácido ursólico.

## **Registro de parámetros de clima**

En cada vainilla se colocaron sensores (Datalogger marca Hobo® U12-012) aproximadamente a 2.5 m de altura del suelo, a fin de registrar las condiciones de temperatura, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa (RFA). Las variables ambientales se registraron cada hora durante los meses de marzo a noviembre del ciclo de cultivo 2019. Considerando que el desarrollo de la vainilla se ve influenciado por factores como la cantidad de luz que recibe (Puthur 2005), los datos utilizados para el análisis incluyen sólo el periodo de luz a lo largo del día, es decir, el valor promedio de 15 días de cada mes a las 6:00, 10:00, 14:00 y 18:00 horas del ciclo productivo de la vainilla.

## **Análisis estadísticos**

El análisis estadístico de las variables químicas evaluadas se realizó mediante un análisis de varianza con el procedimiento PROC GLM y PROC ANOVA. Así mismo, se realizó la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), análisis de componentes principales y análisis de conglomerados. También se aplicó el análisis de correlaciones canónicas para determinar la asociación entre las variables que describen los perfiles metabólicos de los frutos y la condición ambiental de cada sitio. El análisis de correlaciones canónicas entre variables químicas y los parámetros de clima se realizó con el paquete estadístico XLSTAT (Versión 2021). Debido a que en la base de datos de parámetros de clima se encontraron observaciones faltantes fue necesaria la imputación de datos. El objetivo de imputar datos perdidos es generar observaciones completas que se puedan analizar a través de métodos estadísticos. Por ello se aplicó la técnica determinística de imputación de la media para producir datos a partir del promedio de los datos no faltantes (Useche-Castro y Mesa-Ávila 2006).

### **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Metabolitos primarios**

##### *Azúcares solubles y almidón*

El análisis de varianza realizado en los azúcares solubles y almidón se muestra en el Cuadro 3.3. Para los frutos verdes colectados en el ciclo 2018 se reportaron coeficientes de variación entre 9-13 %, donde sacarosa fue el compuesto con mayor variación. Entre sitios y estados de madurez se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas para todas las variables con excepción de la sacarosa. Las variables evaluadas en las colectas del ciclo 2019 mostraron coeficientes de variación entre 11-24 %, de manera que almidón fue la variable con mayor variación.

En este ciclo las variables mostraron diferencias estadísticas altamente significativas, con excepción de la fructosa. Se hizo evidente que sólo hubo diferencias estadísticas significativas entre estados de madurez en fructosa y almidón dado que este último es un metabolito de almacenamiento que se hidroliza como resultado de la madurez del fruto (Cuadro 3.3). En frutos beneficiados se encontraron coeficientes de variación entre 11-20 %, de manera que fructosa (19.19 %) fue la variable con el mayor coeficiente de variación.

Así mismo, se observaron diferencias estadísticas significativas tanto entre sitios como entre estados de madurez. Para las colectas del ciclo 2019 los coeficientes de variación más altas se reportaron en fructosa (24.32 %) y sacarosa (22.48 %). También se encontraron diferencias altamente significativas entre sitios para sacarosa y almidón. Mientras que las diferencias estadísticas entre estados de madurez se observaron en todas las variables, con excepción de fructosa (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Medias y coeficientes de variación de glucosa, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales y almidón evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Variable	Media (g 100 g <sup>-1</sup> )	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios		
			Sitio	Madurez	Error
<b>FRUTOS VERDES</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
Glucosa	6.03	10.66	6.9023**	7.7685***	0.4205
Fructosa	2.22	10.69	2.7879***	0.7167**	0.0562
Sacarosa	0.79	12.52	0.0014ns	0.0365ns	0.0097
Azúcares solubles totales	9.09	9.45	18.7900***	14.6292***	0.7380
<b>Ciclo 2019</b>					
Glucosa	6.84	13.75	5.4711**	0.0110ns	0.8850
Fructosa	1.98	12.95	0.1100ns	0.5457**	0.0656
Sacarosa	0.49	15.90	0.1812***	0.0151ns	0.0061
Azúcares solubles totales	9.31	11.77	8.5170**	0.2611ns	1.2010
Almidón	2.08	23.02	15.6959***	0.9976*	0.2297
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
Glucosa	17.15	11.89	54.3473**	931.9316***	4.1575
Fructosa	6.67	19.19	7.1253*	155.8153***	1.6384
Sacarosa	1.13	12.30	0.1015*	0.0809*	0.0192
Azúcares solubles totales	24.95	12.65	107.3303**	1874.4160***	9.9614
<b>Ciclo 2019</b>					
Glucosa	9.63	17.06	0.5087ns	111.9133***	2.7012
Fructosa	3.31	24.32	0.7524ns	0.9591ns	0.6482
Sacarosa	0.26	22.48	0.5858***	0.0248**	0.0033
Azúcares solubles totales	13.20	10.73	0.7593ns	95.1979***	2.0066
Almidón	3.74	12.47	55.0487***	1.0066*	0.2177

\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$

La prueba de medias por sitio en las variables medidas en frutos verdes se muestra en el Cuadro 3.4. Para el ciclo 2018 se observaron diferencias estadísticas para glucosa, fructosa y azúcares solubles totales, ya que la mayor concentración de azúcares se encontró en los frutos colectados en Barriles. Puesto que la síntesis de estos metabolitos se estimula con la exposición a la luz, estos resultados coinciden con los mostrados en la Figura 2.4 del Capítulo II, donde se registraron valores de RFA superiores en el sistema en malla sombra de Barriles, con respecto al acahual en 20 Soles en el ciclo 2018.

En el caso de las colectas del ciclo 2019 las diferencias estadísticas se encontraron en todas las variables a excepción de fructosa. De esta manera, 20 Soles y Solteros de Juan Rosas mostraron características similares en la acumulación de azúcares. No obstante, la mayor concentración de

estos metabolitos se presentó en las colectas cultivadas de 20 Soles, mientras que la mayor acumulación de almidón se encontró en las colectas de Solteros de Juan Rosas. En este caso, los sistemas establecidos en 20 Soles y Solteros de Juan Rosas registraron valores de RFA superiores a los del sistema en Barriles (Véase Figura 2.4 del Capítulo II de esta tesis); lo cual pudo estimular una mayor producción de azúcares y moléculas de almacenamiento como el almidón.

En el Cuadro 3.4 se muestra la prueba de medias para frutos beneficiados. A partir de esto se determinó que hay diferencias estadísticas para las cuatro variables evaluadas en las colectas de 2018, esto debido a que los frutos colectados en 20 Soles mostraron la mayor concentración de azúcares. Por otra parte, en las colectas del ciclo 2019 sólo se encontraron diferencias estadísticas en sacarosa donde las colectas de Barriles tuvieron la mayor concentración de este metabolito y 20 Soles y Solteros de Juan Rosas presentaron concentraciones similares. También se reportaron diferencias estadísticas en almidón al acumularse en mayor cantidad en los frutos de 20 Soles. En términos generales, los frutos de Barriles y 20 Soles tuvieron mayor acumulación de estos metabolitos en las colectas del 2018 en relación a las del 2019.

Cuadro 3.4. Concentración media en g 100 g<sup>-1</sup> de materia seca para glucosa, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales y almidón evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.

Sitio	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Azúcares solubles totales	Almidón
<b>FRUTOS VERDES</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
Barriles	6.52a	2.50a	0.79a	9.81a	ne
20 Soles	5.65b	1.94b	0.78a	8.37b	ne
DMS	0.44	0.16	0.08	0.58	
<b>Ciclo 2019</b>					
Barriles	6.35b	2.01a	0.43b	8.78b	1.25c
20 Soles	7.47a	2.04a	0.61a	10.09a	1.91b
Solteros de Juan Rosas	6.74ab	1.89a	0.44b	9.08b	3.09a
DMS	0.76	0.21	0.06	0.88	0.39
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
Barriles	15.93b	6.23b	1.07b	23.22b	ne
20 Soles	18.38a	7.12a	1.18a	26.38a	ne
DMS	1.38	0.87	0.09	2.14	
<b>Ciclo 2019</b>					
Barriles	9.44a	3.16a	0.46a	13.06a	2.79b
20 Soles	9.76a	3.54a	0.13b	13.44a	5.76a
Solteros de Juan Rosas	9.70a	3.24a	0.18b	13.10a	2.68b
DMS	1.32	0.65	0.05	1.14	0.38

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha=0.05$ ). ne: No evaluado



A partir de la prueba de medias por estado de madurez para frutos verdes (Cuadro 3.5) se encontraron diferencias estadísticas en glucosa, fructosa y azúcares solubles totales al mostrar una mayor acumulación a las 30 semanas de madurez. Para el ciclo 2019 las diferencias estadísticas se detectaron en la concentración de fructosa y almidón al mostrar los valores más altos en frutos con 30 semanas de madurez. Por otra parte, se encontraron diferencias estadísticas en las variables evaluadas en frutos beneficiados del ciclo 2018, de manera que la mayor concentración de metabolitos se presentó a las 32 semanas de madurez. En el caso del ciclo 2019 las diferencias se encontraron en glucosa, sacarosa y azúcares solubles totales al mostrar mayor concentración a las 32 semanas de madurez. El almidón se acumuló en mayor cantidad a las 30 semanas (Cuadro 3.5), ya que al ser una molécula de almacenamiento se hidroliza como resultado de la madurez de los frutos y mostró menor acumulación a las 32 semanas.

Cuadro 3.5. Concentración media en g 100 g<sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para glucosa, fructosa, sacarosa, azúcares solubles totales y almidón evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.

Madurez (Semanas)	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Azúcares solubles totales	Almidón
<b>FRUTOS VERDES</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
28	6.55a	2.36a	0.82a	9.73a	ne
32	5.62b	2.08b	0.76a	8.45b	ne
DMS	0.44	0.16	0.07	0.58	
<b>Ciclo 2019</b>					
30	6.86a	2.08a	0.51a	9.38a	2.22a
32	6.83a	1.88b	0.48a	9.25a	1.95b
DMS	0.51	0.14	0.04	0.60	0.26
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
28	12.07b	4.59b	1.08b	17.73b	ne
32	22.24a	8.75a	1.17a	32.17a	ne
DMS	1.38	0.87	0.09	2.14	
<b>Ciclo 2019</b>					
30	8.19b	3.44a	0.24b	11.87b	3.88a
32	11.07a	3.18a	0.28a	14.53a	3.61b
DMS	0.90	0.44a	0.03	0.77	0.26

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  
ne: No evaluado

Por lo general los frutos verdes más jóvenes contienen mayor cantidad de glucosa, lo que es una variable que podría ayudar para definir la ruta biosintética de compuestos aromáticos como la vainillina (Palama *et al.* 2009). Esto debido a que la glucosa es la principal fuente de carbono utilizado como precursor de diferentes compuestos y pueden desempeñar funciones de metabolito intermediario en diversos procesos bioquímicos (Lesage-Meessen *et al.* 2002).

La acumulación de azúcares en frutos beneficiados, la glucosa puede estar presente entre 8 % (Leong *et al.* 1989) a 20 % (Odoux y Brillouet 2009). El incremento en la acumulación de azúcares en los frutos al incrementar su madurez es debido a la hidrólisis del almidón y la solubilización de hemicelulosas presentes en la pared celular (Voragen *et al.* 1993). Por lo cual se reportaron concentraciones más altas en los frutos con 32 semanas de madurez que en los de 28 o 30 semanas. La glucosa y fructosa fueron las azúcares con mayor concentración tanto en frutos verdes como en beneficiados de los tres sitios. Mientras que la sacarosa tuvo la concentración más baja, causado posiblemente por la hidrólisis de este disacárido luego de su translocación de las hojas a otras estructuras de la planta como los frutos (Wang *et al.* 2009).

El almidón se reportó en bajas concentraciones, ya que al ser el principal metabolito de reserva suele hidrolizarse en función de la madurez del fruto. En este estudio el almidón mostró mayor concentración en frutos beneficiados ya que se pudo cuantificar la glucosa residual presente en el tejido al momento del análisis. Además de la madurez de los frutos, la síntesis de estos metabolitos puede mostrar asociación con los factores ambientales, ya que los azúcares son un producto directo de la actividad fotosintética y la cantidad de luz que la planta recibe influye positivamente en su acumulación (Wang *et al.* 2009). Así mismo, se puede asociar con incrementos en la temperatura durante el desarrollo de los frutos por su influencia en el suministro fotosintético de azúcares (Sadras y Petrie 2011; Greer y Weedon 2013). Con base en esto se podría hipotetizar que en el ciclo 2018 los frutos de Barriles estuvieron expuestos a mayores condiciones de luz y temperatura puesto que reportaron concentraciones superiores a 20 Soles. Mientras que para el ciclo 2019 las concentraciones mayores de azúcares en frutos verdes se dieron en 20 Soles y Solteros de Juan Rosas, asumiendo que las condiciones ambientales antes mencionadas pudieron tener valores superiores que en Barriles.

En frutos beneficiados se reportaron concentraciones superiores a los frutos verdes, esto debido a que contienen una gran cantidad de glucósidos de vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-

hidroxibenzoico y ácido vanílico que se hidrolizan durante el beneficio de los frutos generando azúcares como la glucosa en forma libre, motivo por el cual es el principal monosacárido presente en los frutos (Azeez 2008). Sin embargo, además de la condición ambiental, el incremento en su acumulación puede atribuirse a las condiciones de almacenamiento (Wang *et al.* 2009). Esto se pudo observar de manera evidente en los frutos beneficiados colectados en el ciclo 2018, los cuales se refrigeraron a 5 °C durante un periodo prolongado hasta el momento de su análisis. De manera que las bajas temperaturas favorecieron la deshidratación de los frutos y una mayor acumulación de estos compuestos, pero también debido a un proceso llamado edulcoración inducido por frío donde se da la hidrólisis del almidón en azúcares reductores (Sowokinos 2001). No obstante, en los frutos verdes esta condición aparentemente no mostró influencia significativa ya que las colectas se liofilizaron previamente y mantuvieron una baja humedad, con lo que pudieron mantenerse más estables.

### Pigmentos fotosintéticos

El análisis de varianza realizado para pigmentos fotosintéticos evaluados en frutos verdes de vainilla mostró coeficientes de variación cercanos al 17 %. Se encontraron diferencias altamente significativas entre sitios para todas las variables, mientras que las diferencias estadísticas entre estados de madurez sólo tuvieron diferencias en clorofila *a* (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6. Medias y coeficientes de variación de pigmentos fotosintéticos evaluados en frutos verdes de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Variable	Media (mg g <sup>-1</sup> )	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios		
			Sitios	Madurez	Error
Clorofila <i>a</i>	35.40	16.22	213.1417**	413.8038**	32.9549
Clorofila <i>b</i>	19.00	16.40	56.4351**	10.0580ns	9.7169
Carotenos+Xantofilas	21.18	16.74	189.5850***	30.4687ns	12.5645

\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$

Con respecto a la prueba de medias por sitios se encontraron diferencias estadísticas entre las tres variables evaluadas, de manera que las colectas de 20 Soles mostraron la mayor concentración de clorofilas *a* y *b*, así como de carotenoides y xantofilas. Así mismo, las colectas de Barriles y Solteros de Juan Rosas mostraron características similares en cuanto al contenido de estos pigmentos. Por otra parte, la prueba de medias entre estados de madurez indica diferencias

estadísticas sólo en el contenido de clorofila *a*, mostrando mayor concentración de este pigmento en los frutos con 30 semanas de madurez (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7. Concentración media en mg g<sup>-1</sup> de materia seca para pigmentos fotosintéticos en frutos verdes de *Vanilla planifolia* evaluados en tres sitios y en diferentes estados de madurez durante el ciclo de cultivo 2019.

		Variable (mg g <sup>-1</sup> )		
		Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenoides+Xantofilas
Sitio	Barriles	32.47b	17.59b	19.45b
	20 Soles	39.24a	21.04a	25.05a
	Solteros de Juan Rosas	36.94ab	19.59ab	22.10b
	DMS	17.10	17.10	17.10
Madurez (Semanas)	30	37.79a	19.43a	21.87a
	32	31.57b	18.32a	20.08a
	DMS	24.63	24.62	24.62

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha=0.05$ )

La producción de pigmentos fotosintéticos se estimula con la exposición a la luz para poder realizar la fotosíntesis, pero suelen degradarse como consecuencia de la madurez y senescencia de los frutos (Zhang *et al.* 2014a), por lo cual se observaron concentraciones más bajas de los pigmentos fotosintéticos en frutos de madurez mayor (32 semanas). La clorofila *a*, al ser el principal pigmento que captura la luz solar para la fotosíntesis se encuentra en mayor concentración que la clorofila *b*; el cual es un pigmento accesorio que luego de colectar la luz la pasa a la clorofila *a* (Berg 2017). Cabe destacar que, aunque la presencia de clorofilas en el fruto se asocia también con su capacidad adaptativa a diferentes condiciones de luz, un exceso de luz puede causar la degradación de los pigmentos (Gonçalves y Santos Junior 2005). Pero cuando la planta recibe menor cantidad de luz se incrementa la síntesis y actividad de los carotenoides y xantofilas para transferir la luz absorbida a las clorofilas (Taiz y Zeiger 2009). Los carotenoides y xantofilas pueden ser menos afectadas por la senescencia (Lu *et al.* 2001), este comportamiento se observó en las colectas analizadas ya que la disminución en la acumulación de dichos pigmentos en frutos con mayor madurez fue menos significativa.

Por lo general los pigmentos fotosintéticos suelen degradarse como parte del proceso de madurez o senescencia, efecto de la condición ambiental como estrés hídrico, cambios drásticos de temperatura o la acción de fitohormonas como el etileno, entre otros (Heaton y Marangoni 1996; Lim *et al.* 2007). A su vez, estas condiciones favorecen la expresión de determinados genes que

inducen la síntesis de proteínas que degradan los pigmentos fotosintéticos (Heaton y Marangoni 1996). Lo anterior sugiere que, además del proceso natural de madurez o senescencia, los frutos cultivados en sistemas de malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) pudieron estar expuestos a un mayor estrés durante su desarrollo en relación a las colectas del sistema en acahual (20 Soles) donde se observaron concentraciones más altas de estos pigmentos.

### **Metabolitos secundarios totales (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales)**

Con base en el Cuadro 3.8, los metabolitos evaluados en frutos verdes mostraron coeficientes de variación entre 6-11 % para el ciclo de cultivo 2018, donde compuestos fenólicos totales (10.57 %) y terpenoides totales (9.64 %) mostraron los coeficientes más altos. Las tres variables evaluadas mostraron diferencias estadísticas altamente significativas entre sitios, mientras que entre estados de madurez únicamente terpenoides totales mostraron significancia estadística. Para el ciclo 2019 se mostraron coeficientes de variación en un rango de 7-11 %, al igual que en el ciclo 2018 compuestos fenólicos y terpenoides totales mostraron la mayor variación con valores de 10.37 % y 10.61 %, respectivamente. Se observaron diferencias altamente significativas entre sitios, así mismo, sólo se encontraron diferencias estadísticas entre estados de madurez para flavonoides totales.

Para los frutos beneficiados del ciclo 2018 los coeficientes de variación oscilaron entre 6-22 %, siendo terpenoides totales la variable con mayor variación. Por otra parte, las diferencias estadísticas entre sitios se encontraron sólo en flavonoides totales, mientras que para los estados de madurez se encontraron diferencias estadísticas para todas las variables, principalmente para terpenoides totales. En las colectas del ciclo 2019 se encontraron coeficientes de variación entre 7-16 %, flavonoides y terpenoides totales fueron las variables con mayor variación. Las diferencias estadísticas entre sitios se encontraron en compuestos fenólicos y terpenoides totales, mientras que entre estado de madurez las diferencias estadísticas se dieron en compuestos fenólicos totales (Cuadro 3.8).

Cuadro 3.8. Medias y coeficientes de variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y terpenoides totales evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Variable	Media (mg g <sup>-1</sup> )	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios		
			Sitio	Madurez	Error
<b>FRUTOS VERDES</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
Compuestos fenólicos totales	16.57	10.57	291.2879***	6.2991ns	3.0629
Flavonoides totales	13.21	6.91	27.1489***	0.6157ns	0.8343
Terpenoides totales	3.84	9.64	12.9120***	0.8412*	0.1366
<b>Ciclo 2019</b>					
Compuestos fenólicos totales	16.28	10.37	86.8107***	129.6392***	2.8486
Flavonoides totales	14.93	7.34	55.0043***	1.9844ns	1.1998
Terpenoides totales	4.89	10.61	3.4148***	0.1764ns	0.2696
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
Compuestos fenólicos totales	14.16	6.82	0.0355ns	4.9773*	0.9317
Flavonoides totales	10.91	15.57	32.0336**	13.3269*	2.8860
Terpenoides totales	1.50	21.50	0.0021ns	1.9394***	0.1040
<b>Ciclo 2019</b>					
Compuestos fenólicos totales	15.08	7.467	3.7933*	15.7050**	1.2673
Flavonoides totales	11.67	14.40	0.7894ns	0.0146ns	2.8246
Terpenoides totales	1.46	15.38	0.9586***	0.0122ns	0.0507

\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$

De acuerdo con la prueba de medias entre sitios para frutos verdes se observaron diferencias estadísticas para los dos sitios evaluados en 2018 (Cuadro 3.9), donde 20 Soles tuvo la mayor concentración de los tres grupos de metabolitos. Por otra parte, se observaron diferencias estadísticas para los sitios evaluados en 2019. De manera que los tres sitios evaluados son estadísticamente diferentes en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales, mientras que para terpenoides totales 20 Soles y Solteros de Juan Rosas son estadísticamente iguales. La prueba de medias entre sitios para frutos beneficiados (Cuadro 3.9) indica diferencias estadísticas sólo para la concentración de flavonoides totales, puesto que la mayor acumulación de estos metabolitos se presentó en las colectas de 20 Soles. Mientras que para el ciclo 2019 se observó que las colectas de 20 Soles y Solteros de Juan Rosas presentaron características similares al mostrar valores más altos en compuestos fenólicos y flavonoides totales.

Cuadro 3.9. Concentraciones medias en mg g<sup>-1</sup> de materia seca para los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y terpenoides totales evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.

Sitio	Compuestos fenólicos totales	Flavonoides totales	Terpenoides totales
<b>FRUTOS VERDES</b>			
<b>Ciclo 2018</b>			
Barriles	13.72b	12.35b	3.24b
20 Soles	15.49a	14.08a	4.43a
DMS	1.19	0.62	0.25
<b>Ciclo 2019</b>			
Barriles	14.01c	13.07c	4.41b
20 Soles	18.39a	15.17b	5.26a
Solteros de Juan Rosas	16.54b	16.42a	5.01a
DMS	1.36	0.88	0.15
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>			
<b>Ciclo 2018</b>			
Barriles	14.13b	9.97b	1.51a
20 Soles	16.41a	11.86a	1.49a
DMS	0.66	1.15	0.22
<b>Ciclo 2019</b>			
Barriles	14.65b	11.49a	1.72a
20 Soles	15.56a	11.62a	1.40b
Solteros de Juan Rosas	15.02ab	11.90a	1.28b
DMS	0.91	1.35	0.18

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística, Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Al realizar la prueba de medias por estado de madurez se observaron diferencias estadísticas sólo para terpenoides totales en las colectas de frutos verdes del ciclo 2018, y mostró una mayor acumulación de estos compuestos a las 32 semanas. Aunque no se encontraron diferencias estadísticas, la mayor acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides totales se presentó en los frutos de 32 semanas. Por su parte, las variables evaluadas en los frutos verdes colectados durante el ciclo 2019 mostraron diferencias estadísticas en compuestos fenólicos totales al mostrar mayor concentración a las 32 semanas de madurez (Cuadro 3.10). A diferencia de los frutos verdes, los frutos beneficiados del ciclo 2018 mostraron diferencias estadísticas para las tres variables, es decir, la mayor concentración de compuestos fenólicos se dio a las 32 semanas. En el ciclo de cultivo 2019 sólo se observaron diferencias estadísticas en compuestos fenólicos

totales al mostrar una mayor acumulación en frutos más jóvenes, es decir, con 30 semanas de madurez (Cuadro 3.10).

Cuadro 3.10. Concentración media en mg g<sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y terpenoides totales evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.

Madurez (Semanas)	Compuestos fenólicos totales	Flavonoides totales	Terpenoides totales
<b>Frutos verdes</b>			
Ciclo 2018			
28	13.79b	13.08a	3.68b
32	14.53a	13.34a	3.99a
DMS	0.66	0.62	0.25
Ciclo 2018			
30	14.54b	14.74a	4.84a
32	15.62a	15.12a	4.95a
DMS	0.6154	0.60	0.28
<b>Frutos beneficiados</b>			
Ciclo 2018			
28	16.15a	10.30b	1.27b
32	16.98a	11.52a	1.73a
DMS	1.19	1.15	0.22
Ciclo 2019			
30	14.73b	11.66a	1.45a
32	17.82a	11.69a	1.46a
DMS	0.92	0.92	0.12

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística, Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Los compuestos fenólicos y flavonoides son dos de los grupos de metabolitos de mayor interés ya que pueden presentar diferente actividad biológica sin embargo, pueden desempeñar funciones diferentes en los frutos. Por ejemplo, los compuestos fenólicos pueden aportar características sensoriales de aroma y sabor (Belitz y Grosch 1988), mientras que los flavonoides (entre otras funciones) pueden aportar color (Mazza y Miniati 1994). Su síntesis es promovida por una condición de estrés biótico o abiótico como temperaturas extremas, radiación UV o plagas, entre otros (Edreva 2005; Soto-Hernández *et al.* 2019).

Ésta condición de estrés favorece la liberación de radicales libres, lo que a su vez influye en la producción de estos metabolitos debido en parte al incremento en la actividad de la fenilamonioliasa (PAL) y chalcona sintasa (Cheynier *et al.* 2013) y se favorece la producción de



moléculas con potencial antioxidante y captadoras de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Klimov *et al.* 2008). La acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides es dependiente de la madurez, puesto que los frutos con mayor madurez tienen concentraciones más altas de estos compuestos en comparación con los frutos inmaduros (Mokhtar *et al.* 2021), aunque también pueden disminuir en las últimas etapas de madurez al ser oxidados por la polifenol-oxidasa (Fawole y Opara 2013). Sin embargo, las diferencias también pueden estar asociadas a las prácticas de manejo del cultivo (Amaral *et al.* 2004).

En este caso, las diferencias se observaron en función del sistema de manejo, ya que 20 Soles y Solteros de Juan Rosas tuvieron características semejantes en la acumulación de estos dos grupos de metabolitos. Lo que sugiere que las colectas de estos dos sitios estuvieron expuestas a mayor estrés como la incidencia de radiación durante el desarrollo de los frutos, lo que se puede comprobar en la Figura 2.4, mostrada en el Capítulo II de esta tesis. También se observaron diferencias en el estado de madurez de los frutos ya que los frutos con mayor madurez (32 semanas) tuvieron mayor concentración de compuestos fenólicos.

Los frutos beneficiados mostraron un incremento en la acumulación de compuestos fenólicos totales derivado de las reacciones generadas por enzimas como la polifenol-oxidasa, glucosidasa y peroxidasa que además de generar cambios en la coloración del fruto producen moléculas que aportan aroma y sabor a los frutos (Cid-Pérez y López-Malo 2011). También se observó una disminución en la concentración de flavonoides debido en parte a que estos metabolitos suelen disminuir con el procesamiento en este caso el beneficiado de los frutos (Venegas-Casanova 2012). Esto debido a que muestran cierta sensibilidad al calentamiento lo que favorece su degradación (Sharma *et al.* 2015).

La degradación de flavonoides también depende en gran medida de su estructura química, por lo que el incremento en la temperatura puede no tener el mismo efecto en todos los compuestos (Sharma *et al.* 2015), motivo por el cual pudieron mostrar este comportamiento. Aunque su acumulación también puede asociarse a su reactividad, ya que los flavonoides son moléculas altamente oxidables que presentan en su estructura un número variable de grupos hidroxilo (Pellegrini *et al.* 2009). Otro aspecto relacionado al mayor contenido de flavonoides en frutos verdes respecto a los beneficiados, es que estos metabolitos contribuyen en el transporte de auxinas relacionadas con el desarrollo de los frutos (Widhalm y Dudareva 2015).

Por otra parte, los terpenoides también muestran respuesta a la condición ambiental, ya que están influenciados por las altas temperaturas, es decir, que se producen en mayor cantidad en condiciones de altas temperaturas (Helming *et al.* 2007). La síntesis de terpenos, como la de otros metabolitos secundarios, se ve afectada por el ambiente ya que la cantidad de luz, temperatura o daño físico puede cambiar su concentración, de manera que una condición de estrés modifica su síntesis (Copolovici y Niinemets 2016).

Aunque sus variaciones también dependen de los cambios fisiológicos en la planta como el estado de madurez de los frutos (Mu *et al.* 2018), lo cual se pudo observar en los resultados de este estudio. Además, ya que los terpenoides responden a condiciones de estrés se mostró la misma situación que los compuestos fenólicos totales y flavonoides. Es decir, las colectas de 20 Soles y Solteros de Juan Rosas que estuvieron más expuestas a radiación UV durante el ciclo de cultivo (como se puede observar en la Figura 2.4 del Capítulo II de esta tesis) también mostraron una mayor acumulación de estos metabolitos, ya que actúan como fotoprotectores para evitar daño celular en los frutos (Bartwal *et al.* 2013). Pero también pueden actuar como protectores ante las altas temperaturas (Bartwal *et al.* 2013).

En contraste, los terpenos están presentes en los frutos beneficiados principalmente en el aceite esencial y aportan notas aromáticas a los frutos (Soto-Arenas 2006a). Sin embargo, las moléculas más pequeñas como los monoterpenos y sesquiterpenos que conforman los aceites esenciales y aportan aroma pueden ser más volátiles y perderse durante el almacenamiento (Bueno *et al.* 2020), razón por la cual se observaron concentraciones más bajas en frutos beneficiados. Mientras que las moléculas más complejas y mayor peso moléculas como los diterpenos y triterpenos tienen menor volatilidad (Caputi y Aprea 2011). Además, algunos terpenos (principalmente los de menor peso molecular) pueden degradarse durante el procesamiento por efecto de la temperatura al ser oxidados o isomerizados (Yang *et al.* 2007; Turek y Stintzing 2013), por lo que se observó una disminución en la concentración en frutos beneficiados, los cuales se someten a un tratamiento térmico durante el curado. Además de que se puede dar una pérdida de terpenoides inducida por un proceso de deshidratación (Fiorini *et al.* 2019), como es el caso de los frutos beneficiados.

## Evaluación de metabolitos secundarios mayoritarios en frutos de vainilla

En el Cuadro 3.11 se muestra el peso molecular y abundancia de los compuestos fenólicos evaluados en frutos verdes y beneficiados colectados durante el ciclo de cultivo 2018. Sin embargo, las señales reportadas fueron de baja intensidad por lo que sólo se realizó un análisis cualitativo en donde se evaluó la presencia o ausencia de los metabolitos. En el Cuadro 3.12 se muestran los tiempos de retención de los metabolitos identificado, y en el Cuadro 3.13 se indican los valores de la relación masa-carga (m/z) o peso molecular de los iones moleculares de los compuestos evaluados.

Cuadro 3.11. Identificación de metabolitos en frutos de vainilla.

Metabolito	Sitio									
	20 Soles					Barriles				
	Fruto	Verde		Beneficiado		Verde		Beneficiado		
	PM	28 S	32 S	28 S	32 S	28 S	32 S	28 S	32 S	
Vainillina	153.0565	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ác. vanílico	169.0519	*	*	*	*	T	*	*	*	*
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído	123.0478	*	*	T	*	T	T	*	*	*
Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	139.0395	T	*	*	T	*	*	*	*	*
Alcohol vainílico	155.0572	T	T	*	*	T	T	*	*	*
<i>m</i> -Cresol	109.1030	*	*	*	T	T	*	*	*	*
Ácido ferúlico	195.0744	T	T	*	T	T	T	*	T	T
Glucovainillina	316.2802	T	T	T	T	T	T	T	T	T

\*Presencia; T: Trazas; PM: Peso molecular; 28 S: 28 Semanas; 32 S: 32 Semanas

Cuadro 3.12. Tiempo de retención de los metabolitos evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia*.

Metabolito	Tiempo de retención (min)	Metabolito	Tiempo de retención (min)
Vainillina	4.70	<i>m</i> -Cresol	6.48
Ácido vanílico	3.45	Ácido ferúlico	4.87
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído	3.88	3,4-Dihidroxibenzaldehído	2.73
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzaldehído	2.84	Glucovainillina	1.99
Alcohol vanílico	5.88	Ácido <i>p</i> -cumárico	4.49
Eugenol	8.56		

Cuadro 3.13. Peso molecular de los compuestos mayoritarios en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia*.

Masa monoisotópica	Barriles				20 Soles			
	28 Semanas		32 Semanas		28 Semanas		32 Semanas	
	FV	FB	FV	FB	FV	FB	FV	FB
	125.0617	125.0617	125.0617	125.0594	125.0640	279.0953	125.0617	137.0613
137.0589	137.0613	263.2382	137.0613	263.2349	137.0637	263.2349	279.0919	
279.0953	245.2223	279.0919	257.2484	279.0919				
	263.2349		265.2479					
	310.2255							

FV: Fruto verde; FB: Fruto beneficiado

En la colecta de 20 Soles los resultados indicaron que en los frutos verdes los principales metabolitos identificados son vainillina, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído, *m*-cresol y ácido *p*-hidroxibenzoico. Además de los metabolitos mencionados anteriormente, se identificó alcohol vanílico y ácido ferúlico en los frutos beneficiados. En general, los metabolitos identificados en trazas fueron ácido ferúlico y glucovainillina. Referente a los frutos recolectados en Barriles los metabolitos presentes en los frutos verdes se encontraron en trazas, con excepción de vainillina y ácido *p*-hidroxibenzoico.

En los frutos beneficiados se observó mayor presencia de metabolitos ya que sólo el ácido ferúlico y glucovainillina se identificaron en trazas. Con respecto a las diferencias entre muestras en función de la madurez, aunque los metabolitos no pudieron ser cuantificados, se observó que, al analizar la intensidad de las señales de cada uno de los picos, la concentración de metabolitos en los frutos de 20 Soles de 32 semanas tuvo una tendencia a disminuir con respecto a los de 28 semanas de madurez. Por otro lado, en las muestras colectadas en la localidad de Barriles se detectó una tendencia opuesta, es decir, un incremento en la concentración de metabolitos en los frutos de mayor madurez.

El metabolito más abundante en los frutos beneficiados cosechados a las 32 semanas fue la vainillina, aunque no como se espera, esto podría ser debido a que las vainas se encontraban colonizadas por una especie de hongo no identificado que invadieron una gran parte del tejido. De igual manera en estas vainas se detectó la presencia de *m*-cresol, ácido ferúlico y *p*-hidroxibenzaldehído. Finalmente podemos mencionar que la tendencia general en ambas localidades de muestreo, fue la disminución en la concentración de metabolitos en los frutos de 32 semanas (Cuadro 3.11). Estos compuestos se presentaron en las diferentes etapas de madurez

de los frutos, no obstante, la intensidad de los picos mostró diferencias, fue notable que los frutos más maduros tuvieron mayor concentración de metabolitos identificados como mayoritarios. Con la obtención de la información anterior se prosiguió con un cambio en la cantidad de tejido vegetal, y concentración de ácido fórmico en la fase móvil, con la finalidad de observar si las señales podrían ser amplificadas, para poder realizar la cuantificación.

En las muestras evaluadas por UPLC la glucovainillina mostró señales de baja intensidad independientemente de la madurez de los frutos, no obstante, se mostró mayor presencia del glucósido en los frutos de 32 semanas. Gallage *et al.* (2017) mencionan que la mayor acumulación de glucovainillina se alcanza cuando el fruto está en total madurez, es decir, cuando comienza a tornarse de color amarillo. Según señalan Wongsheree *et al.* (2013) la cantidad de glucovainillina incrementa con la madurez de los frutos verdes, pero disminuye su concentración de manera significativa durante el beneficio, así mismo indican que el mayor contenido de glucovainillina se presenta en frutos con 11 meses de madurez.

Estos autores también señalan que otros compuestos aromáticos volátiles como el ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido benzoico disminuyen durante el desarrollo de los frutos y, especialmente, después de un acondicionamiento de tres meses de los frutos beneficiados. Los principales compuestos aromáticos se encuentran en forma glucosilada, por lo que su presencia en forma libre antes del beneficio suele ser menor (Wongsheree *et al.* 2013). Sin embargo, este glucósido también se identificó en los frutos beneficiados, lo que indica que la hidrólisis del glucósido no fue completa durante el curado de los frutos (Pardio *et al.* 2018). La baja intensidad en la señal de los metabolitos evaluados por UPLC puede indicar poca acumulación de los mismos. Según Havkin-Frenkel (2018) gran parte de la vainillina y otros compuestos presentes en los frutos se pierde durante el beneficio dada su volatilidad y que como parte de este proceso se exponen al ambiente. Cabe mencionar que autores como Takahashi *et al.* (2013) indican que los precursores de la vainillina suelen estar en concentraciones mil veces menor que la vainillina.

En los frutos verdes de ambas colectas se detectó una gran cantidad de vainillina, aunque de acuerdo con Havkin-Frenkel (2018) esta molécula se encuentra en frutos verdes en forma libre solo como trazas ya que está presentes en su mayoría en forma de glucósido. Sin embargo, la vainillina fue el metabolito de mayor presencia en las muestras tanto en frutos verdes como beneficiados. Esto coincide con los estudios de Ranadive *et al.* (1983) y Sagrero-Nieves y

Schwartz (1988), donde indicaron que la vainillina está presente en los frutos sin haber hidrólisis, lo que representa entre el 50 % y 90 % del potencial total de producción de vainillina.

Durante el acondicionamiento de las muestras se observó la presencia de hongos en los frutos beneficiados, por lo cual se plantea la hipótesis de que los microorganismos degradaron los compuestos fenólicos en los frutos beneficiados. Se sabe que algunos bacilos y hongos pueden degradar una gran cantidad de ácidos orgánicos como el cinámico, *p*-cumárico, 3-fenilpropiónico, ferúlico, benzoico y *p*-hidroxibenzoico (Peng *et al.* 2003), varios de los cuales son precursores de la vainillina o compuestos mayoritarios en las vainas beneficiadas. El efecto de estos microorganismos puede observarse en la conversión de ácido ferúlico y vainillina con su posterior oxidación a ácido vanílico y, este a su vez, es desmetilado a ácido protocatecuico (Karmakar *et al.* 2000); lo que pudo causar una considerable disminución de vainillina en los frutos. Sin embargo, una característica de los microorganismos involucrados en el proceso biosintético es que su actividad no concluye con la acumulación de metabolitos de interés como la vainillina o el ácido vanílico, sino que sigue la degradación de sus fuentes de carbono hasta finalizar con la liberación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Havkin-Frenkel 2018). La acumulación de metabolitos como la vainillina produce cierta toxicidad para los microorganismos, por lo que producen la conversión a ácido vanílico y su posterior degradación (Sarangi y Sahoo, 2009).

De manera que la conversión y degradación de metabolitos es un mecanismo de desintoxicación de los microorganismos (Numpaque *et al.* 2015), o bien, la realizan como fuente de carbono para su crecimiento (Mishra y Kumar 2017). Los compuestos de alta o baja volatilidad son susceptibles a cambios químicos por las interacciones como oxidación, hidrólisis, degradación térmica, foto-oxidación, polimerización de compuestos insaturados e interacción con proteínas (Fisher y Scott 1997). Metabolitos como la vainillina tiene tres grupos altamente reactivos como el aldehído, hidroxilo y núcleo aromático, lo que lo hace más susceptible a diferentes tipos de reacción, como la oxidación de vainillina a ácido vanílico (Weerawatanakorn *et al.* 2015).

### **Contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* por cromatografía de líquidos (HPLC)**

La evaluación de los perfiles de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides en los frutos de vainilla resulta de importancia ya que pueden brindar información de su composición química e identificar metabolitos que puedan ser de interés por su potencial actividad. Esto debido a que la

mayoría de estudios se han realizado sobre los metabolitos que aportan aroma en los frutos, sin embargo, la información de la composición química de los frutos es aún limitada.

### *Ácidos fenólicos*

En el Cuadro 3.14 se muestran los coeficientes de variación de los ácidos fenólicos evaluados en frutos verdes y beneficiados. En la colecta del ciclo de cultivo 2018 se observaron coeficientes de variación entre 3-44 %, donde la mayor variación se dio en la concentración de los ácidos clorogénico y *p*-hidroxibenzoico al tener coeficientes de variación de 43.37 % y 42.66 %, respectivamente, siendo el sitio la principal fuente de variación.

En los frutos verdes colectados en el ciclo de cultivo 2019 la principal fuente de variación se dio entre sitios, aunque se observaron coeficientes de variación menores con un rango de 2-23 %, siendo los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico y gálico los metabolitos con mayor variación al mostrar coeficientes de 15.90 %, 18.51 % y 22.70 %, respectivamente. Así mismo, se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre las variables principalmente a nivel de sitio de colecta. En el caso de los frutos beneficiados del ciclo de cultivo 2018 los coeficientes de variación se encontraron en un rango entre 1-39 %, donde los ácidos clorogénico (38.48 %) y *p*-hidroxibenzoico (33.52 %) fueron los de mayor variación. Mientras que en los frutos colectados en el ciclo de cultivo 2019 los coeficientes de variación se reportaron en un rango de 1-40 %, donde los metabolitos con mayor variación fueron los ácidos *p*-hidroxibenzoico (39.71 %), vanílico (28.63 %) y gálico (20.99 %). En ambos ciclos de cultivo se observaron diferencias estadísticas altamente significativas a nivel de sitio y madurez fisiológica de los frutos (Cuadro 3.14).

Cuadro 3.14. Medias y coeficientes de variación de ácidos fenólicos evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019, en tres sitios de la región Totonacapan.

	Variable	Media (mg g <sup>-1</sup> )	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios			
				Sitio	Madurez	Error	
FRUTOS VERDES	Ciclo 2018	Ác. Clorogénico	0.7733	43.37	1.2332**	1.1131*	0.1125
		Ác. Ferúlico	0.4714	17.78	0.3095***	0.0318ns	0.0070
		Ác. Rosmárico	0.1049	21.79	0.0215***	0.0030*	0.0005
		Ác. Protocatecuico	1.8257	12.15	32.3229***	0.0130ns	0.0430
		Ác. Dihidroxibenzoico	0.0618	11.87	0.0012**	0.0002ns	0.0005
		Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.0274	42.66	0.0008*	0.0023**	0.0001
		Ác. $\beta$ -resorcílico	0.1107	5.91	0.0120***	0.0008**	0.00004
		Ác. Siríntrico	0.5127	2.02	0.0002ns	0.0012**	0.0001
		Ác. Vaníllico	0.0098	7.50	-	0.0001**	5.5E-7
		Ác. Gálico	10.6609	3.25	-	0.0637ns	0.1198
		Ác. Sinápico	0.1153	5.65	-	0.0002ns	4.3E-5
	Ác. <i>p</i> -cumárico	0.6706	13.17	1.1345***	0.2185**	0.0078	
	Ciclo 2019	Ác. Sinápico	0.0509	7.6384	2.4830E-5ns	3.63E-6ns	1.5140E-5
		Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.0149	15.8991	0.0002***	6.763E-5*	5.59E-6
		Ác. $\beta$ -resorcílico	0.1240	4.8230	0.0011***	5.94E-6ns	3.574E-5
		Ác. Siríntrico	0.5058	5.7702	0.0015ns	0.0012ns	0.0009
		Ác. Ferúlico	0.0222	4.3418	2.835E-5***	0.00ns	9.4E-7
		Ác. Protocatecuico	0.1645	5.2763	0.0004*	4.87E-6ns	7.528E-5
		Ác. Vaníllico	0.0850	18.5078	0.0037**	0.0019*	0.0003
Ác. 3,5-dihidroxibenzoico		0.0425	2.3513	-	-	1E-6	
Ác. Gálico		1.9952	22.6961	4.1859***	1.7494*	0.2051	
Ác. <i>p</i> -cumárico	0.1096	7.6737	0.0013***	0.0003ns	7.07E-5		
FRUTOS BENEFICIADOS	Ciclo 2018	Ác. Clorogénico	0.0222	38.48	1.9E-7ns	0.0003ns	7.26E-5
		Ác. Ferúlico	1.0240	11.55	4.851***	0.183**	0.014
		Ác. 3,5-dihidroxibenzoico	0.0750	17.49	1.55E-5ns	0.004**	0.0002
		Ác. <i>p</i> -cumárico	0.5625	11.74	1.246***	0.014ns	0.004
		Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.0122	33.52	0.0012***	9.40E-5	1.67E-5
		Ác. $\beta$ -resorcílico	0.3506	11.42	0.002ns	0.003ns	0.002
		Ác. Siríntrico	0.5740	4.64	0.025**	0.002ns	0.001
		Ác. Protocatecuico	0.1814	3.46	0.002**	0.001**	3.90E-5
		Ác. Rosmárico	0.1076	9.56	-	-	0.0001
		Ác. Vaníllico	0.0196	8.8036	-	0.0002**	2.98E-6
		Ác. Gálico	10.1056	8.6834	-	1.711ns	0.770
	Ác. Sinápico	0.0499	1.6735	-	5.92E-6*	6.995	
	Ciclo 2019	Ác. Sinápico	0.0474	1.4252	3.406E-6**	1.105E-6ns	4.6E-7
		Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.0317	39.7065	0.0004ns	0.004**	0.0002
		Ác. $\beta$ -resorcílico	0.1344	7.5116	0.0004*	0.0013**	0.0001
		Ác. Siríntrico	0.4506	10.2129	0.685***	0.0113*	0.002
		Ác. Ferúlico	0.0207	2.9359	2.51E-6**	1.824E-6*	3.70E-7
		Ác. Protocatecuico	-	-	-	-	-
		Ác. Vaníllico	0.0769	28.6277	0.006**	0.011**	0.001
Ác. 3,5-dihidroxibenzoico		0.0427	1.3644	1.74E-6ns	8.067E-9ns	1.390E-7	
Ác. Gálico	0.2332	20.9948	0.007ns	0.013*	0.0024		
Ác. <i>p</i> -cumárico	0.0840	1.2514	7.02E-6*	3.187E-5***	1.10E-6		

\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$

En el Cuadro 3.15 se muestra la prueba de Tukey en frutos verdes colectados durante 2018 y 2019. En el primer ciclo de cultivo hubo diferencias estadísticas en todos los metabolitos



evaluados, con excepción de los ácidos *p*-hidroxibenzoico y sirínico. Las colectas de Barriles tuvieron la mayor concentración de ácidos clorogénico, rosmárico, protocatecuico y 3,5-dihidroxibenzoico. No obstante, no se detectaron los ácidos vanílico, gálico y sinápico; además, el ácido *p*-cumárico únicamente se reportó en frutos con 28 semanas de madurez. Por otra parte, las colectas de 20 Soles mostraron la concentración más alta de ácidos *p*-cumárico, ferúlico y  $\beta$ -resorcílico. En el ciclo 2019, se observaron importantes diferencias respecto al tipo y concentración de ácidos fenólicos, en comparación a los detectados en los frutos del ciclo 2018, ya que en general se reportaron concentraciones más altas de los metabolitos evaluados. Así mismo, se observaron diferencias estadísticas entre los frutos de los tres sitios evaluados sólo para los ácidos *p*-cumárico y ferúlico. En general, los frutos colectados en 20 Soles presentaron la mayor concentración de los ácidos evaluados, sin embargo, las colectas de Solteros de Juan Rosas presentaron características similares a 20 Soles en términos de la concentración de estos metabolitos. Cabe mencionar que el ácido 3,5-dihidroxibenzoico sólo se encontró en los frutos colectados en 20 Soles con 30 semanas de madurez. En la prueba de medias para los ácidos fenólicos evaluados en frutos beneficiados. Se observó que no hay diferencias estadísticas entre sitios evaluados en ciclo de cultivo 2018 para los ácidos clorogénico, 3,5-dihidroxibenzoico y  $\beta$ -resorcílico. Mientras que las colectas de 20 Soles tuvieron la concentración más alta de ácido *p*-cumárico, ferúlico y sirínico; los frutos de Barriles se caracterizaron por tener una mayor concentración de ácido protocatecuico y *p*-hidroxibenzoico.

Es importante señalar que se observó gran variación en el perfil de los metabolitos en frutos beneficiados al mostrar las siguientes diferencias: el ácido rosmárico sólo se detectó en los frutos de Barriles con 32 semanas de madurez, el ácido protocatecuico no se reportó en frutos de 20 Soles con 32 semanas de madurez, no se reportó la presencia de ácido vanílico en los frutos colectados en 20 Soles, mientras que el ácido gálico y sinápico no se detectaron en las colectas de Barriles (Cuadro 3.15). En cambio, los frutos beneficiados del ciclo 2019 mostraron una mayor diversidad de metabolitos. Se observaron diferencias estadísticas en todos los ácidos fenólicos evaluados, con excepción del ácido sirínico y sinápico. Al igual que en los frutos verdes, las colectas de 20 Soles mostraron en la mayoría de los casos la concentración más alta de ácidos fenólicos, mientras que Solteros de Juan Rosas presentó características similares en su composición química y Barriles tuvo las concentraciones más bajas de los ácidos cuantificados.

Cuadro 3.15. Concentración media en mg g<sup>-1</sup> de materia seca para los ácidos fenólicos evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Sitio	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
<b>FRUTOS VERDES</b>												
<b>Ciclo 2018</b>												
Barriles	0.169b	1.094a	0.311b	0.147a	3.467a	0.072a	0.035a	0.079b	0.509a	nd	nd	nd
20 Soles	0.922a	0.453b	0.632a	0.063b	0.185b	0.052b	0.019a	0.142a	0.516a	nd	nd	nd
DMS	0.153	0.438	0.110	0.299	0.290	0.010	0.015	0.009	0.014			
<b>Ciclo 2019</b>												
Barriles	0.095c	nd	0.020c	nd	0.156b	nd	0.009b	0.116b	0.425a	0.057b	2.526a	0.049a
20 Soles	0.124a	nd	0.025a	nd	0.173a	nd	0.018a	0.139a	0.524a	0.104a	1.032b	0.053a
Solteros de Juan Rosas	0.110b	nd	0.022b	nd	0.165ab	nd	0.018a	0.116b	0.499a	0.094a	2.428a	0.051a
DMS	0.013		0.002		0.013		0.004	0.009	0.044	0.024	0.684	0.006
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>												
<b>Ciclo 2018</b>												
Barriles	0.240b	0.022a	0.388b	nd	0.191a	0.074a	0.022a	0.362a	0.529b	nd	nd	nd
20 Soles	0.885a	0.022a	1.659a	nd	0.163b	0.076a	0.002b	0.339a	0.619a	nd	nd	nd
DMS	0.086	0.011	0.154		0.011	0.017	0.005	0.052	0.035			
<b>Ciclo 2019</b>												
Barriles	0.085a	nd	0.020b	nd	nd	0.043a	0.028a	0.134ab	0.642a	0.061b	0.228a	0.047b
20 Soles	0.084ab	nd	0.022a	nd	nd	nd	0.041a	0.143a	0.060b	0.113a	0.269a	0.048a
Solteros de Juan Rosas	0.083b	nd	0.020b	nd	nd	0.043a	0.027a	0.126b	0.649a	0.057b	0.203a	0.047b
DMS	0.002		0.001			0.001	0.019	0.015	0.070	0.033	0.074	0.001

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística, Tukey ( $\alpha=0.05$ ). M1: Ác. *p*-cumárico; M2: Ác. Clorogénico; M3: Ác. Ferúlico; M4: Ác. Rosmárico; M5: Ác. protocatecuico; M6: Ác. 3,5-Dihidroxibenzoico; M7: Ác. *p*-Hidroxibenzoico; M8: Ác.  $\beta$ -resorcílico; M9: Ác. Siringico; M10: Ác. Vanílico; M11: Ác. Gálico; M12: Ác. Sinápico; nd: No detectado

Las diferencias en el contenido de ácidos fenólicos de acuerdo con el estado de madurez en los frutos verdes se presentan en el Cuadro 3.16. Con base en lo anterior, no se observaron diferencias estadísticas para los ácidos *p*-cumárico, ferúlico, protocatecuico y 3,5-dihidroxibenzaldehído evaluados en los frutos verdes del ciclo 2018. Así mismo, los ácidos clorogénico y rosmárico se acumularon en mayor cantidad en frutos con 28 semanas de madurez, mientras que aquellos con 32 semanas de madurez presentaron mayor contenido de ácido *p*-hidroxibenzoico,  $\beta$ -resorcílico y sirínico.

Para el ciclo 2019 se observó menor variación entre estados de madurez, ya que sólo se mostraron diferencias estadísticas en el ácido *p*-hidroxibenzoico y vanílico al mostrar mayor acumulación de estos metabolitos en los frutos con 30 semanas de madurez; mientras que el ácido gálico se expresó en mayor cantidad a las 32 semanas.

Como se indica en el Cuadro 3.16 las diferencias estadísticas en los frutos colectados durante 2018 se encontraron principalmente en el ácido ferúlico y 3,5-dihidroxibenzaldehído ya que se presentaron en mayor concentración a las 32 semanas de madurez. A diferencia del ácido *p*-hidroxibenzoico, el cual se reportó en mayor cantidad a las 28 semanas. Por otra parte, para el ciclo de cultivo 2019 se observó un perfil de ácidos fenólicos diferente, ya que se encontraron diferencias estadísticas en todos los metabolitos evaluados con excepción de los ácidos 3,5-dihidroxibenzoico y sinápico. Esto debido a que la mayor acumulación de metabolitos se presentó a las 30 semanas, en particular el ácido *p*-hidroxibenzoico y vanílico.

Cuadro 3.16. Concentración media en mg g<sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para los ácidos fenólicos evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Madurez (Semanas)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
<b>FRUTOS VERDES</b>												
<b>Ciclo 2018</b>												
28	0.641a	0.469b	0.420a	0.089b	1.793a	0.066a	0.041a	0.119a	0.523a	nd	nd	nd
32	0.731a	1.078a	0.523a	0.121a	1.859a	0.057a	0.013b	0.103b	0.503b	nd	nd	nd
DMS	0.153	0.438	0.110	0.030	0.290	0.010	0.015	0.009	0.014			
<b>Ciclo 2019</b>												
30	0.113a	nd	0.022a	nd	0.1639a	nd	0.017a	0.123a	0.498a	0.095a	1.683b	0.051a
32	0.106a	nd	0.022a	nd	0.1650a	nd	0.013b	0.125a	0.514a	0.075b	2.307a	0.051a
DMS	0.009		0.001		0.0088		0.002	0.006	0.030	0.016	0.458	0.004
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>												
<b>Ciclo 2018</b>												
28	0.529a	0.017a	0.901b	nd	0.182a	0.056b	0.015a	0.334a	0.561a	nd	nd	nd
32	0.596a	0.027a	1.147a	nd	0.181a	0.094a	0.009b	0.367a	0.587a	nd	nd	nd
DMS	0.086	0.011	0.154		0.011	0.017	0.005	0.052	0.035			
<b>Ciclo 2019</b>												
30	0.085a	nd	0.021a	nd	nd	0.043a	0.046a	0.143a	0.476a	0.101a	0.260a	0.048a
32	0.083b	nd	0.020b	nd	nd	0.043a	0.018b	0.126b	0.426b	0.052b	0.207b	0.047a
DMS	0.001		0.001			0.001	0.013	0.010	0.047	0.022	0.050	0.001

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística, Tukey ( $\alpha=0.05$ ). M1: Ác. *p*-cumárico; M2: Ác. Clorogénico; M3: Ác. Ferúlico; M4: Ác. Rosmárico; M5: Ác. protocatecuico; M6: Ác. 3,5-Dihidroxibenzoico; M7: Ác. *p*-Hidroxibenzoico; M8: Ác.  $\beta$ -resorcílico; M9: Ác. Siringico; M10: Ác. Vanílico; M11: Ác. Gálico; M12: Ác. Sinápico; nd: No detectado

En la Figura 3.1 se muestra el perfil de ácidos fenólicos en frutos verdes y beneficiados de los ciclos 2018 y 2019. Los frutos verdes del ciclo 2018 colectados en Barriles mostraron un incremento en la acumulación de ácidos fenólicos de 28 a 32 semanas. Los metabolitos de mayor concentración fueron los ácidos protocatecuico, clorogénico y sirínico (Figura 3.1A). En contraste, las colectas de 20 Soles tuvieron mayor diversidad de metabolitos y aproximadamente el doble de concentración de ácidos fenólicos, pero no se observaron diferencias significativas entre estados de madurez. Destacaron por su presencia los ácidos: gálico, *p*-cumárico, ferúlico, clorogénico y rosmárico. En frutos beneficiados de Barriles se observó una considerable disminución en la acumulación de metabolitos, manteniendo una mayor concentración en los frutos de 32 semanas. Con respecto a los frutos de 20 Soles, también fue evidente la disminución de ácidos fenólicos, no obstante, los metabolitos de mayor presencia se conservaron (Figura 3.1B).

En las colectas del ciclo 2019 se observó menor diversidad de ácidos fenólicos que en 2018. Los frutos verdes colectados en Barriles y Solteros de Juan Rosas tuvieron características similares, tanto en el tipo de ácidos fenólicos como en el incremento en la acumulación de ácidos fenólicos en frutos de 32 semanas. Los metabolitos con mayor presencia comunes entre las colectas fueron los ácidos gálico y sirínico (Figura 3.1C). En los frutos beneficiados se observó mayor diversidad de metabolitos, pero una disminución en la acumulación de compuestos en los frutos de 32 semanas y un incremento en la proporción de ácido sirínico. Además de este compuesto, los ácidos con mayor concentración fueron el gálico,  $\beta$ -resorcílico y *p*-cumárico (Figura 3.1D).

Los ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico, *p*-cumárico y sinápico suelen sintetizarse para proteger a los tejidos contra patógenos. Estos compuestos se encuentran usualmente en bajas concentraciones debido a que son precursores o puntos de ramificación para la síntesis de otros compuestos como la vainillina (Yahia 2017; Marchiosi *et al.* 2020). Así mismo, la alta acumulación de ácido gálico podría asociarse con la presencia de otros metabolitos, ya que este ácido es el componente mayoritario presente en los taninos hidrolizables (Waterman y Mole 1994). Se observaron importantes diferencias en los perfiles entre ciclos de cultivo, lo que puede indicar que las condiciones tanto ambientales como de almacenamiento tuvo influencia en el tipo y cantidad de metabolitos. De manera que las colectas del ciclo 2018 tuvieron mayor diversidad de ácidos fenólicos, pero también una mayor acumulación de metabolitos, no obstante, la

disminución de estos metabolitos en el ciclo 2019 pudieran atribuirse al prolongado almacenamiento de estas colectas, de manera que los metabolitos pudieron sufrir cierta degradación u oxidación. Como se ha mencionado los compuestos fenólicos responden a diversos factores como la cantidad de luz que el cultivo recibe, el estado de madurez o variables agronómicas como las características de manejo (Quiñones *et al.* 2012). Por lo que al igual que en la cuantificación de metabolitos secundarios totales, las colectas de 20 Soles y Solteros de Juan Rosas tuvieron en general concentraciones más altas que Barriles, ya que presentaron algunas características ambientales semejantes particularmente la radiación fotosintéticamente activa.

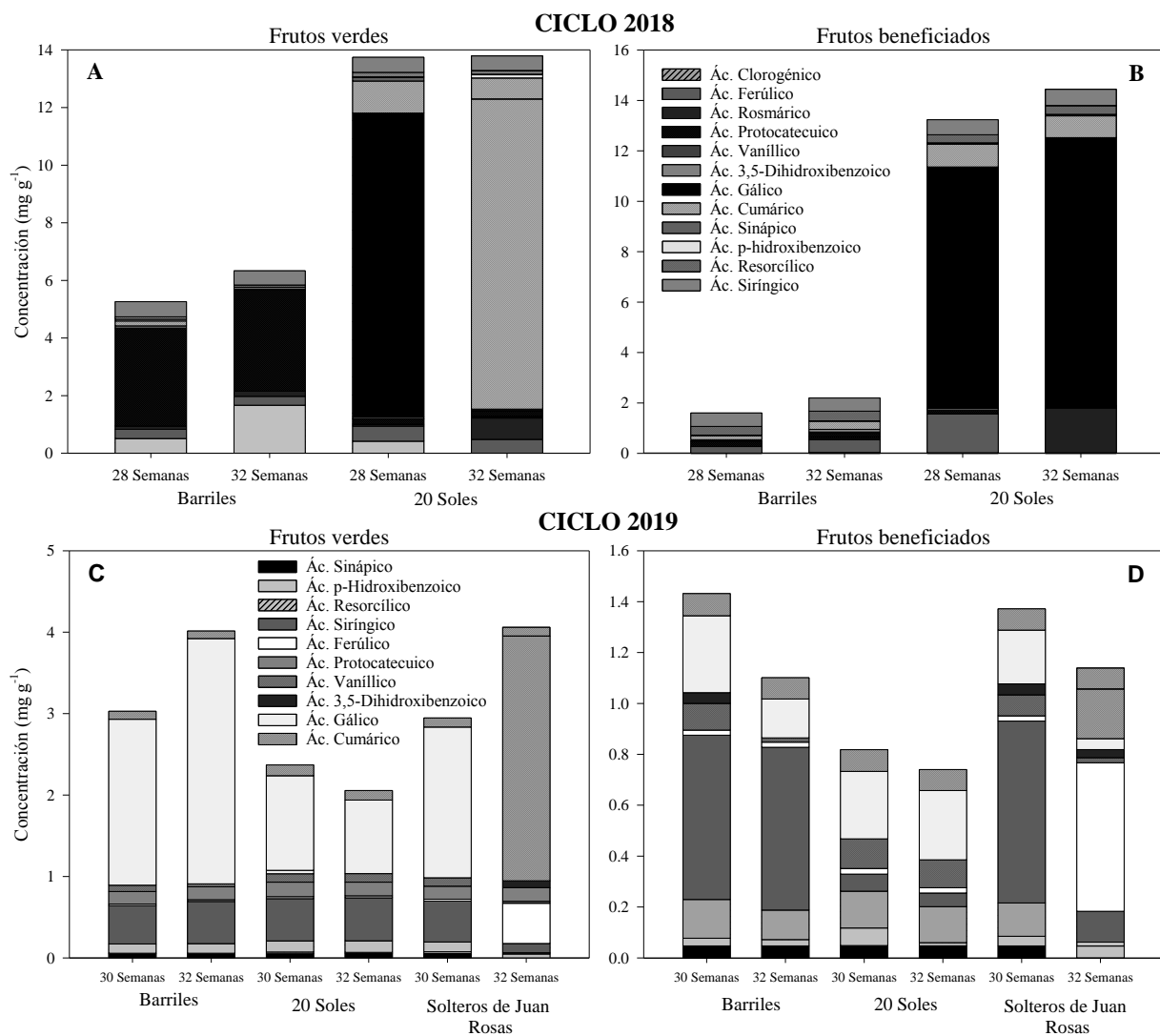


Figura 3.1. Contenido de ácidos fenólicos en frutos verdes (A y C) y beneficiados (B y D) de *Vanilla planifolia* colectados en los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan.

## Flavonoides

Como se indica en el Cuadro 3.17 los coeficientes de variación para los flavonoides evaluados en frutos verdes colectados en el ciclo 2018 mostraron valores que oscilan entre 2-13 %, donde morina (11.11 %) y quercetina (12.33 %) fueron los metabolitos con coeficientes de variación más altos. Con excepción del kaempferol e isorhamnetina, los demás metabolitos mostraron diferencias altamente significativas entre sitios. Por otra parte, en las colectas del ciclo 2019 se reportaron coeficientes de variación altos en rutina (105.97 %) y quercetina (61.26 %), esto debido principalmente a las grandes diferencias de concentración de los metabolitos entre sitios de colecta. Por otra parte, el análisis de varianza realizado en frutos beneficiados para las colectas del ciclo 2018 indican que los coeficientes de variación se encuentran entre 2-56 %, donde rutina fue el flavonoide con mayor variación (56.29 %). De igual manera en el ciclo 2019, las diferencias entre sitios causaron los altos coeficientes de variación (Cuadro 3.17).

Cuadro 3.17. Medias y coeficientes de variación de flavonoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

	Variable	Media (mg g <sup>-1</sup> )	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios			
				Sitio	Madurez	Error	
<b>FRUTO VERDE</b>	<b>Ciclo 2018</b>	Miricetina	0.0682	8.8332	0.0006**	1.6140E-6	3.6270E-5
		Kaempferol	0.0996	9.1420	0.002ns	0.0002ns	8.3970E-5
		Isorhamnetina	0.0460	2.8674	7.3947E-6ns	6.3365E-6ns	1.7300E-6
		Apigenina	0.0938	4.2658	0.0006**	4.2800E-6ns	1.6020E-5
		Rutina	0.1652	7.2897	0.0092***	0.0014*	0.0002
		Morina	0.1911	11.1117	0.0429***	0.0006ns	0.0005
	Quercetina	0.1260	12.3343	0.0055**	0.0003ns	0.0002	
	<b>Ciclo 2019</b>	Rutina	0.2731	105.9684	0.5601**	0.5512*	0.0838
		Quercetina	0.2018	61.2570	0.1500*	0.1504*	0.0153
		Hesperidina	0.0730	4.0204	-	-	8.61E-6
Miricetina		0.0498	4.2297	5.4670E-6ns	2.1660E-7ns	4.44E-6	
Kaempferol		0.0835	1.5012	9.9008E-8ns	3.2344E-6ns	1.57E-6	
Isorhamnetina	0.0387	2.9510	8.2502E-6*	6.9769E-6*	1.30E-6		
<b>FRUTO BENEFICIADO</b>	<b>Ciclo 2018</b>	Isorhamnetina	0.0493	8.8984	-	4.7100ns	1.9260E-5
		Apigenina	0.0878	2.4717	-	1.2640E-5	4.71E-6
		Rutina	0.5565	56.2910	1.0821**	0.7432*	0.981
		Morina	0.1447	12.3787	0.0074**	0.0003ns	0.0003
		Quercetina	0.1117	11.9490	0.0008ns	7.0280E-5	0.0002
	<b>Ciclo 2019</b>	Rutina	0.0879	0.6721	0.0002***	2.00E-8ns	3.5E-7
		Quercetina	0.0968	1.0281	7.43E-6**	5.7E-7ns	939E-7
		Hesperidina	-	-	-	-	-
		Miricetina	0.0485	0.8773	-	7.0417E-8ns	1.8063E-7
		Kaempferol	0.0839	0.9951	7.55E-6**	1.8E-7ns	7.00E-7
Isorhamnetina	0.0382	2.0169	2.1724E-7ns	5.0669E-7ns	5.9241E-7		

\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$

Como se muestra en el Cuadro 3.18, de acuerdo con la prueba de Tukey entre sitios de colecta los frutos verdes colectados durante 2018 mostraron diferencias estadísticas en todos los flavonoides evaluados, con excepción del kaempferol e isorhamnetina. Las colectas de Barriles destacaron por tener la mayor concentración de flavonoides. Mientras que en el ciclo 2019 se observaron grandes diferencias en el contenido de flavonoides ya que no se reportó quercetina e isorhamnetina en los frutos de 20 Soles. Así mismo, no se identificó miricetina en las colectas de 20 Soles ni Solteros de Juan Rosas. De esta forma se encontraron diferencias estadísticas entre sitios en la concentración de isorhamnetina, rutina y quercetina. En frutos beneficiados se observó la disminución de flavonoides durante el proceso de beneficio.

Según se indica en el Cuadro 3.18 no se identificó kaempferol ni miricetina en ninguna de las colectas evaluadas del ciclo 2018, mientras que ambos metabolitos se encontraron en los frutos verdes. Este comportamiento se podría asociar en parte a una bioconversión de estos metabolitos por efecto de enzimas producidas por hongos, esto considerando que las colectas del ciclo 2018 tuvieron una importante contaminación causada por hongos que pudieron utilizar el esqueleto carbonado de los metabolitos y producir nuevas moléculas (Huynh *et al.* 2014). Además de que su estructura los hace altamente oxidables.

De manera que sólo se encontraron diferencias estadísticas en dos metabolitos donde los frutos colectados en Barriles tuvieron la mayor concentración de rutina, mientras que los frutos colectados en 20 Soles mostraron la concentración más alta de morina. En el caso de las colectas del 2019 se encontraron diferencias estadísticas en la concentración de kaempferol, rutina y quercetina.



Cuadro 3.18. Concentración media en mg g<sup>-1</sup> de materia seca para los flavonoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Sitio	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<b>FRUTOS VERDES</b>							
<b>Ciclo 2018</b>							
Barriles	0.074a	0.104a	0.047a	0.101a	0.193a	0.251a	0.147a
20 Soles	0.027b	0.096a	0.045a	0.087b	0.138b	0.131b	0.105b
DMS	0.010	0.012	0.002	0.005	0.016	0.028	0.020
<b>Ciclo 2019</b>							
Barriles	0.050a	0.083a	0.038b	nd	0.092b	nd	0.090b
20 Soles	nd	nd	nd	nd	0.101b	nd	-
Solteros de Juan Rosas	0.049a	0.084a	0.040a	nd	0.626a	nd	0.314a
DMS	0.004	0.002	0.002		0.437		0.162
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>							
<b>Ciclo 2018</b>							
Barriles	nd	nd	nd	nd	0.857a	0.120b	0.120a
20 Soles	nd	nd	nd	nd	0.256b	0.170a	0.104a
DMS					0.409	0.023	0.017
<b>Ciclo 2019</b>							
Barriles	nd	0.085a	0.038a	nd	0.086b	nd	0.098a
20 Soles	nd	0.083b	0.038a	nd	0.098a	nd	0.096b
Solteros de Juan Rosas	nd	0.084a	0.038a	nd	0.085b	nd	0.096b
DMS		0.001	0.001		0.001		0.002

Nota: Letras diferentes por columna indica diferencia estadística, Tukey ( $\alpha=0.05$ ). M1: Miricetina; M2: Kaempferol; M3: Isorhamnetina; M4: Apigenina; M5: Rutina; M6: Morina; M7: Quercetina; nd: No detectado

La prueba de medias por estado de madurez de los frutos verdes colectados durante 2018 se muestra en el Cuadro 3.19, en donde se observó que sólo miricetina y rutina tuvieron diferencias estadísticas entre fechas de corte, de manera que la mayor acumulación de estos metabolitos se dio a las 32 semanas de madurez. Mientras tanto, los frutos verdes colectados en 2019 mostraron diferencias estadísticas únicamente en la concentración de isorhamnetina, rutina y quercetina puesto que la mayor acumulación de estos flavonoides se dio a las 28 semanas de madurez.

En lo referente a los frutos beneficiados (Cuadro 3.19) se observaron diferencias estadísticas en la concentración de rutina al acumularse en mayor grado a las 32 semanas. En los frutos del ciclo 2019 las diferencias estadísticas también se mostraron únicamente en rutina mostrando la misma tendencia de acumularse en mayor cantidad en los frutos más maduros.

Cuadro 3.19. Concentración media en mg g<sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para los flavonoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Madurez (Semanas)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<b>FRUTOS VERDES</b>							
<b>Ciclo 2018</b>							
28	0.065b	0.103a	0.045a	0.094a	0.155b	0.198a	0.121a
32	0.075a	0.096a	0.047a	0.093a	0.176a	0.184a	0.131a
DMS	0.010	0.012	0.002	0.005	0.016	0.028	0.020
<b>Ciclo 2019</b>							
30	0.050a	0.083a	0.040a	nd	0.448a	nd	0.313a
32	0.050a	0.084a	0.038b	nd	0.098b	nd	0.090b
DMS	0.004	0.002	0.002		0.293		0.162
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>							
<b>Ciclo 2018</b>							
28	nd	nd	nd	nd	0.308b	0.140a	0.109a
32	nd	nd	nd	nd	0.805a	0.150a	0.114a
DMS					0.409	0.023	0.017
<b>Ciclo 2019</b>							
30	nd	0.084a	0.038a	nd	0.085b	nd	0.097a
32	nd	0.084a	0.038a	nd	0.090a	nd	0.097a
DMS		0.001	0.001		0.001		0.001

Nota: Letras diferentes por columna indica diferencia estadística, Tukey ( $\alpha=0.05$ ). M1: Miricetina; M2: Kaempferol; M3: Isorhamnetina; M4: Apigenina; M5: Rutina; M6: Morina; M7: Quercetina; nd: No detectado

Los perfiles de flavonoides en frutos verdes del ciclo 2018 no mostraron diferencias importantes entre estados de madurez, sin embargo, las colectas de Barriles tuvieron mayor acumulación de metabolitos. Los flavonoides con mayor concentración en ambos sitios fueron la morina, rutina y quercetina; sin embargo, no se detectó miricetina en la colecta de 20 Soles con 32 semanas de madurez (Figura 3.2A). Los frutos beneficiados tuvieron menor diversidad en contenido de flavonoides, en las colectas de Barriles no se detectó miricetina, kaempferol ni isorhamnetina. Pero destacó el incremento de rutina en los frutos de 32 semanas. Mientras que las colectas de 20 Soles no mostraron diferencias significativas entre estados de madurez (Figura 3.2B).

Las colectas del ciclo 2019 tuvieron menor diversidad en el tipo de metabolitos. En las colectas de Barriles se observó una concentración similar de los metabolitos identificados sin mostrar diferencias importantes entre fechas de madurez. Por su parte, en los frutos de 20 Soles con 30 semanas sólo se identificó hesperidina y rutina, mientras que en los frutos de 32 semanas únicamente se detectó rutina. A diferencia de estas colectas, los frutos de Solteros de Juan Rosas

con 30 semanas destacaron por su alta concentración de rutina y quercetina, con una notable disminución en la acumulación de flavonoides a las 32 semanas (Figura 3.2C).

En frutos beneficiados se observó una disminución en la concentración de flavonoides puesto que la miricetina sólo se identificó en las colectas de Barriles. No se observaron diferencias entre estados de madurez de las colectas de Barriles y Solteros de Juan Rosas, pero en 20 Soles fue evidente una menor acumulación de flavonoides en los frutos de 30 semanas ya que no se detectó rutina (Figura 3.2D).

A diferencia de los compuestos fenólicos, los flavonoides mostraron una disminución en los frutos más maduros, como resultado de la degradación y reactividad de su estructura (Arena *et al.* 2012). No obstante, al igual que los ácidos fenólicos, los flavonoides mostraron mayor diversidad y concentraciones más altas en las colectas del ciclo 2018 en comparación con las de 2019. Lo que de acuerdo con Nabavi *et al.* (2018) y Jugran *et al.* (2016) sería un indicador de estrés oxidativo o disminución en la temperatura.

El efecto de tratamientos térmicos sobre los flavonoides se hizo evidente, ya que gran parte de los metabolitos presentes en los frutos verdes ya no se identificaron en los frutos beneficiados, no obstante, en algunos casos la concentración incrementó. Lo que muestra que su degradación depende en parte de la estructura química del metabolito (Sharma *et al.* 2015). Cabe destacar que los flavonoides también suelen degradarse durante el almacenamiento, ya que son sensibles aún en condiciones de oscuridad (Chaaban *et al.* 2017), y dado que las muestras, particularmente del ciclo 2019 se almacenaron durante un periodo prolongado.

Se evidenció una mayor acumulación de ácidos fenólicos y flavonoides en las colectas del ciclo 2018 en relación al ciclo 2019. La producción de metabolitos secundarios suele incrementar ante condiciones de estrés, en este caso, el ciclo 2018 se destacó por tener temperaturas superiores a las registradas en el ciclo 2019; así como baja humedad relativa y periodos muy marcados de escasez de lluvia que pudieron generar cambios en el metabolismo de la planta.

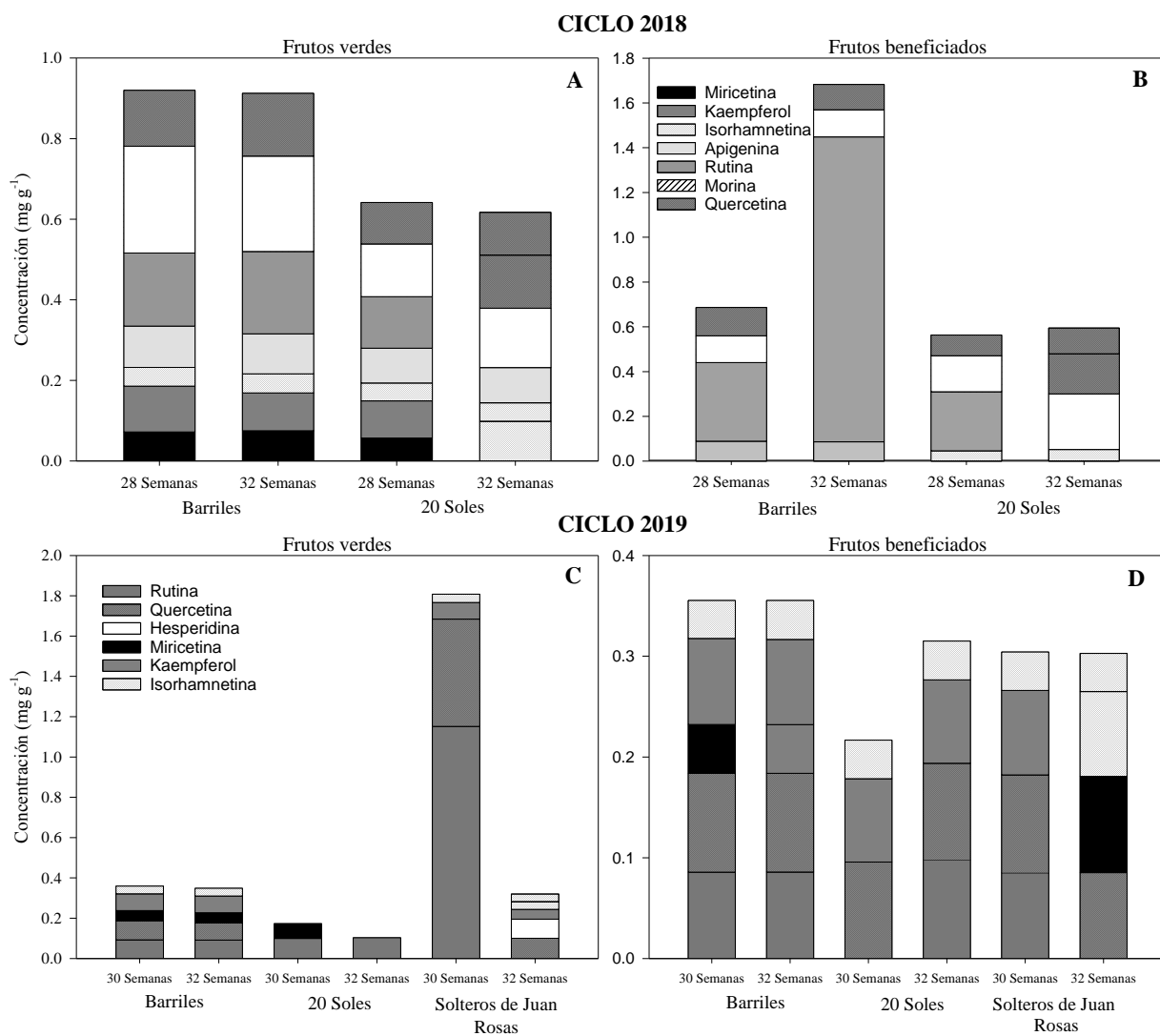


Figura 3.2. Contenido de flavonoides en frutos verdes (A y C) y beneficiados (B y D) de *Vanilla planifolia* colectados en los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan.

### Terpenoides

En el caso de los terpenoides, el análisis de varianza realizado para el ciclo 2018 indica que los coeficientes de variaciones se mostraron en un rango de 13-43 %, donde estigmasterol (42.89 %) y ácido oleanólico fueron los metabolitos con mayor variación (33.66 %). De manera que la principal fuente de variación se presentó entre sitios, mientras que estigmasterol y ácido oleanólico mostraron, además, diferencias altamente significativas entre estados de madurez. En contraste, los terpenoides evaluados en frutos verdes colectados durante 2019 tuvieron coeficientes de 8-58 %, siendo el  $\beta$ -sitosterol la variable con mayor variación (58.10 %). Las diferencias estadísticas altamente significativas a nivel de sitio se observaron en todas las

variables, salvo en estigmasterol, mientras que no se reportaron diferencias estadísticas entre estados de madurez de los frutos (Cuadro 3.20).

Cuadro 3.20. Medias y coeficientes de variación de terpenoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Variable	Media (mg g <sup>-1</sup> )	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios		
			Sitio	Madurez	Error
<b>FRUTOS VERDES</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
Carnosol	0.0210	20.6295	0.0001*	7.9100E-5ns	1.8690E-5
Estigmasterol	0.1603	42.8898	0.1881***	0.0540**	0.0047
Ác. Oleanólico	0.0620	33.6572	0.0088**	0.0284**	0.0004
α-Amirina	0.3961	13.4806	-	8.9231E-4	0.0029
β-Sitosterol	0.0112	15.5180	0.0001***	2.1870E-5	3.04E-6
<b>Ciclo 2019</b>					
Carnosol	1.45E-4	12.7960	6.8274E-8***	1.4258E-9ns	3.4268E-10
Ác. Ursólico	0.0425	21.3187	0.0091***	8.03E-6ns	8.2020E-5
Estigmasterol	0.0103	8.9024	2.0679E-6ns	3.1941E-7ns	8.4E-7
Ác. Oleanólico	0.0233	13.8474	0.0002***	1.7980E-5ns	1.0370E-5
α-Amirina	4.5580	17.0905	22.1012***	2.1269ns	0.6068
β-Sitosterol	0.0538	58.1012	0.0090**	0.0030ns	0.0010
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>					
<b>Ciclo 2018</b>					
Carnosol	0.2597	3.1415	-	0.0034**	6.6670E-5
Estigmasterol	0.3008	24.9733	0.3104**	0.3172**	0.0056
Ác. Oleanólico	0.1127	8.1300	0.0791***	9.83E-6ns	8.3970E-5
α-Amirina	0.1664	13.0300	0.0267**	0.1067***	0.0005
β-Sitosterol	0.0198	22.4841	0.0011**	1.4660E-5ns	1.9750E-5
<b>Ciclo 2019</b>					
Carnosol	2.46E-4	76.2676	4.3479E-7**	2.8134E-7*	3.5315E-8
Ác. Ursólico	0.0426	20.6652	0.0179***	3.00E-5ns	7.77340E-5
Estigmasterol	0.0112	14.0371	1.6250E-5*	2.05E-6ns	2.48E-6
Ác. Oleanólico	0.0288	12.3609	1.63E-4**	1.18E-4*	1.27E-5
α-Amirina	0.3951	60.8252	0.0888ns	0.0302ns	0.0578
β-Sitosterol	0.0059	16.1869	3.17E-5***	5.75E-5***	9.3E-7

\*\*\*P<0.0001, \*\*P<0.001

Por su parte, el análisis para frutos beneficiados (Cuadro 3.20) indica que los terpenoides evaluados en las colectas de 2018 mostraron coeficientes de variación entre 3-25 %, siendo el estigmasterol (24.97 %) y β-sitosterol (22.48 %) los metabolitos con mayor variación.

En este caso los metabolitos mostraron diferencias estadísticas altamente significativas entre sitios, con excepción del  $\beta$ -sitosterol y el ácido oleanólico que no mostraron diferencias estadísticas entre estados de madurez. A su vez, los metabolitos evaluados en las colectas de 2019 tuvieron coeficientes de variación de 12-76 %. De los cuales carnosol (76.27 %) y  $\alpha$ -amirina (60.83 %) mostraron la mayor variación, principalmente entre sitios. A partir de la prueba de medias se encontraron diferencias estadísticas entre sitios para todos los metabolitos evaluados en los frutos verdes colectados en 2018. Las colectas de Barriles se caracterizaron por tener la concentración más alta de estigmasterol, ácido oleanólico y  $\beta$ -sitosterol; mientras que las colectas de 20 Soles tuvieron la mayor concentración de carnosol (Cuadro 3.21).

En el caso de las colectas del ciclo 2019 se encontraron diferencias estadísticas entre todos los metabolitos, con excepción de  $\beta$ -sitosterol. Por una parte, las colectas de Barriles mostraron la mayor concentración de carnosol y ácido ursólico. Mientras que las colectas de 20 Soles tuvieron la mayor acumulación de ácido oleanólico,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -sitosterol. Además, los frutos de 20 Soles y Solteros de Juan Rosas mostraron perfiles similares en el contenido de terpenoides. Para los frutos beneficiados colectados en el ciclo 2018 (Cuadro 3.21) se mostraron diferencias estadísticas para todos los metabolitos cuantificados, particularmente los frutos colectados en Barriles tuvieron la mayor concentración de terpenoides.

Por su parte, los seis metabolitos evaluados en las colectas del ciclo 2019 se detectaron, a excepción de Barriles donde no se detectó carnosol y mostraron diferencias estadísticas, con excepción de la  $\alpha$ -amirina. Las colectas de Barriles tuvieron la concentración más alta de carnosol, estigmasterol y ácido ursólico, mientras que los frutos colectados en 20 Soles y Solteros de Juan Rosas se caracterizaron por tener la mayor concentración de ácido oleanólico y  $\beta$ -sitosterol.

Cuadro 3.21. Concentración media en mg g<sup>-1</sup> de materia seca para los terpenoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.

Sitio	Carnosol	Estigmasterol	Ác. Oleanólico	$\alpha$ -Amirina	$\beta$ -Sitosterol	Ác. Ursólico
<b>FRUTOS VERDES</b>						
<b>Ciclo 2018</b>						
Barriles	0.018b	0.285a	0.084a	nd	0.015a	nd
20 Soles	0.024a	0.035b	0.018b	nd	0.008b	nd
DMS	0.006	0.090	0.036	nd	0.002	nd
<b>Ciclo 2019</b>						
Barriles	2.65E-4a	0.011a	0.017b	2.597c	0.024b	0.088a
20 Soles	6.10E-5c	0.011a	0.029a	6.432a	0.098a	0.019b
Solteros de Juan Rosas	1.09E-4b	0.010a	0.024a	4.645b	0.040b	0.021b
DMS	28.00E-6	0.001	0.005	1.177	0.047	0.014
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>						
<b>Ciclo 2018</b>						
Barriles	nd	0.432a	0.194a	0.205a	0.038a	nd
20 Soles	nd	0.038b	0.032b	0.089b	0.004b	nd
DMS	nd	0.130	0.012	0.038	0.008	nd
<b>Ciclo 2019</b>						
Barriles	5.56E-4a	0.013a	0.023b	0.375a	0.003b	0.105a
20 Soles	1.13E-4b	0.010b	0.030a	0.285a	0.007a	0.007b
Solteros de Juan Rosas	7.01E-5b	0.010b	0.033a	0.526a	0.007a	0.015b
DMS	0.0003	0.002	0.005	0.363	0.002	0.013

Nota: Letras diferentes por columna indica diferencia estadística, Tukey ( $\alpha=0.05$ ). nd: No detectado

Con respecto a la prueba de medias por estado de madurez en frutos verdes del ciclo 2018 (Cuadro 3.22) se encontraron diferencias estadísticas en todos los metabolitos, con excepción del carnosol. La mayor concentración de estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol se encontró en los frutos con 28 semanas de madurez, mientras que hubo mayor acumulación de ácido oleanólico y  $\alpha$ -amirina a las 32 semanas. En los frutos beneficiados del ciclo 2018 las diferencias estadísticas se encontraron en estigmasterol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -sitosterol, donde estos dos últimos metabolitos se acumularon en mayor grado a las 32 semanas. Mientras que en el ciclo 2019 las diferencias se encontraron en carnosol, ácido oleanólico, y  $\beta$ -sitosterol, siendo estos dos últimos compuestos los que se presentaron en mayor concentración a las 32 semanas (Cuadro 3.22).

Cuadro 3.22. Concentración media en mg g<sup>-1</sup> de materia seca por estado de madurez para los terpenoides evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.

Madurez (Semanas)	Carnosol	Estigmasterol	Ác. Oleanólico	$\alpha$ -amirina	$\beta$ - Sitosterol	Ác. Ursólico
<b>FRUTOS VERDES</b>						
<b>Ciclo 2018</b>						
28	0.018a	0.227a	0.017b	0.072b	0.013a	nd
32	0.024a	0.093b	0.153a	0.214a	0.010b	nd
DMS	0.006	0.090	0.036	0.038	0.002	
<b>Ciclo 2019</b>						
30	1.36E-4a	0.011a	0.024a	4.902a	0.041a	0.041a
32	1.54E-4a	0.010a	0.022a	4.2142a	0.067a	0.042a
DMS	1.87E-5	0.001	0.003	0.788	0.032	0.009
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>						
<b>Ciclo 2018</b>						
28	nd	0.350a	0.114a	0.072b	0.015b	nd
32	nd	0.202b	0.112a	0.214a	0.029a	nd
DMS		0.130	0.0120	0.038	0.008	
<b>Ciclo 2019</b>						
30	3.71E-4a	0.012a	0.026b	0.354a	0.004b	0.041a
32	1.21E-4b	0.011a	0.031a	0.436a	0.008a	0.044a
DMS	0.0002	0.002	0.004	0.243	0.001	0.009

Nota: Letras diferentes por columna indica diferencia estadística, Tukey ( $\alpha=0.05$ ). nd: No detectado

Los perfiles de terpenoides en frutos verdes para las colectas del ciclo 2018 indican que Barriles tuvo las concentraciones más altas de este grupo de metabolito. En este sitio destacó la presencia de carnosol y  $\alpha$ -amirina, sin embargo, el ácido oleanólico incrementó de manera considerable en frutos verdes de 32 semanas (Figura 3.3A). En ambos sitios se hizo evidente la disminución en la acumulación de terpenoides en frutos de 32 semanas (Figura 3.3A). En frutos beneficiados incrementó la concentración de terpenoides. Las colectas de Barriles tuvieron una disminución en frutos de 32 semanas y no se detectó carnosol. Los metabolitos de mayor concentración en estas colectas fueron estigmasterol,  $\alpha$ -amirina y ácido oleanólico. En los frutos de 20 Soles se observó la tendencia contraria y menor diversidad de metabolitos, sus frutos tuvieron alta concentración de carnosol, Sin embargo, no se identificó  $\alpha$ -amirina en los frutos de 28 semanas ni estigmasterol en los de 32 semanas (Figura 3.3B).



Para el ciclo 2019 se observó una mayor acumulación y diversidad de metabolitos en frutos verdes. Los frutos colectados en 20 Soles tuvieron la mayor acumulación de terpenoides. Los compuestos de mayor concentración fueron ácido ursólico,  $\alpha$ -amirina, y ácido oleanólico (Figura 3.3C). En los frutos beneficiados se dio una disminución en la concentración de metabolitos, pero el compuesto de mayor concentración fue  $\alpha$ -amirina (Figura 3.3D).

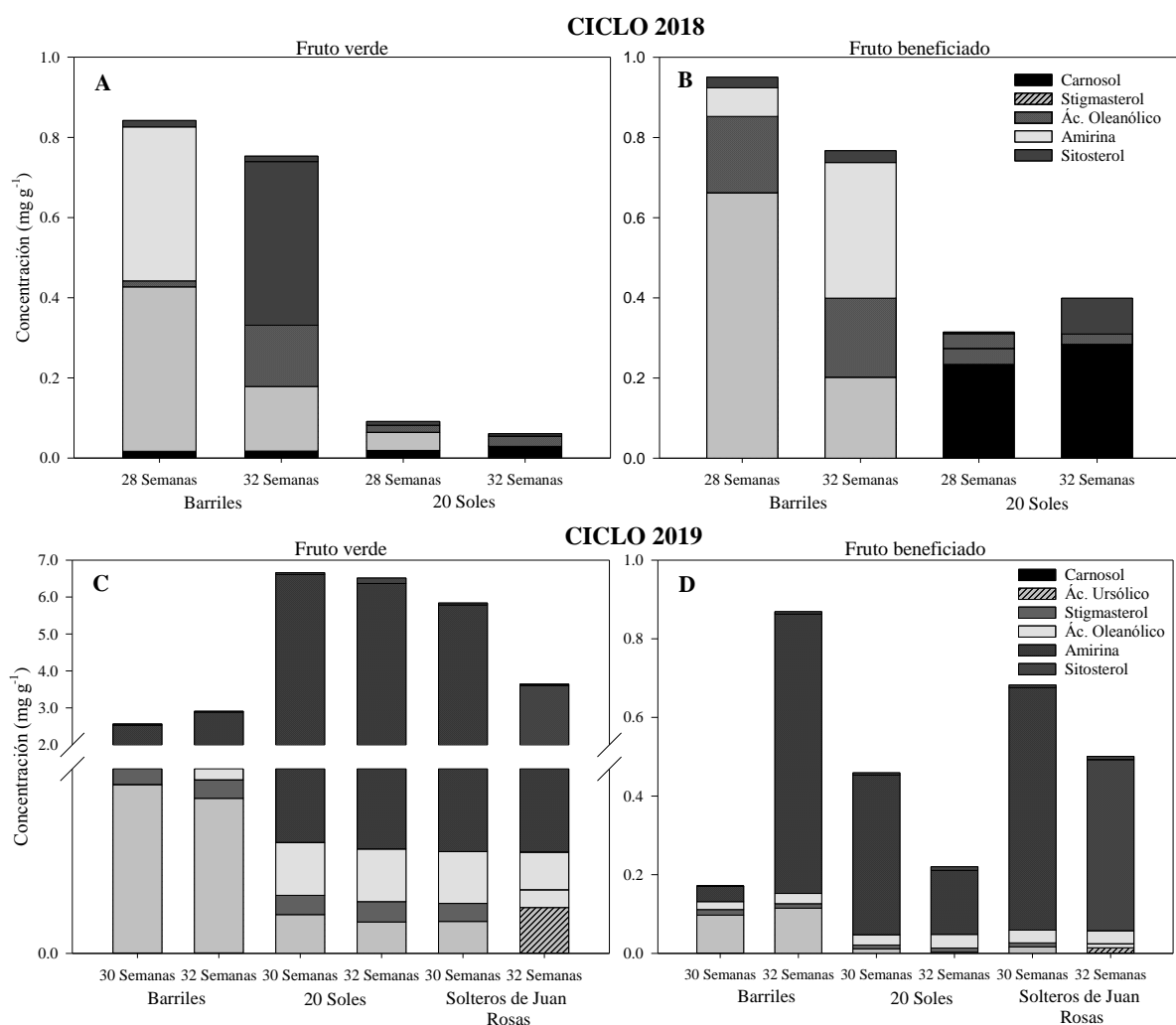


Figura 3.3. Contenido de terpenoides en frutos verdes (A y C) y beneficiados (B y D) de *Vanilla planifolia* colectados en los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan.

En contraste con los flavonoides y ácidos fenólicos, las colectas del ciclo 2019 tuvieron mayor diversidad en el perfil de terpenoides que en el ciclo 2018 (Figuras 3.3C y 3.3D), aunque los metabolitos en común en ambos ciclos se expresaron en concentraciones más bajas. En parte las diferencias en la concentración de terpenoides entre estados de madurez o sitios se atribuye al balance entre su síntesis y la volatilización, ya que presentan esta propiedad (Singsaas 2000).

Aunque también influye el manejo del cultivo (McCarthy 1986), lo que se observó de manera más evidente en las colectas del ciclo 2018. Otro factor que puede promover la producción de terpenoides es el incremento en la temperatura, con lo que se puede suponer que estos metabolitos pueden actuar como termoprotectores en los diferentes tejidos (Singsaas *et al.* 1997). O bien, su síntesis se puede ver influenciada de manera importante por la cantidad de radiación que reciba la planta; de manera que los frutos verdes mostraron una mayor acumulación de este grupo de metabolitos. Situación que lleva a asumir que el ciclo 2019 registró temperaturas más altas, así como radiación fotosintéticamente activa superiores particularmente en los sistemas de acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) , lo que se puede observar en los Cuadros 2.6 y 2.15, y Figura 2.4 del Capítulo II de esta tesis. No obstante, estas moléculas se pueden degradar en tratamientos térmicos como el beneficiado de los frutos, pero también algunas moléculas son menos sensibles a estos tratamientos (Yang *et al.* 2007).

### **Distribución de la variación de perfiles de metabolitos primarios y secundarios en frutos verdes y beneficiados**

#### *Frutos Verdes*

De acuerdo con el análisis de componentes principales para las variables evaluadas en frutos verdes, los dos primeros componentes explicaron 100 % de la variación total. El primer componente (CP1) explicó 76.33 % de la variación y se definió principalmente por metabolitos secundarios como el ácido ferúlico, ácido protocatecuico, ácido *p*-cumárico, flavonoides totales y  $\alpha$ -amirina; así como metabolitos primarios como glucosa, clorofila *a* y clorofila total. El segundo componente aportó 23.67 % de la explicación y estuvo definido por variables como el ácido *p*-hidroxibenzoico, compuestos fenólicos totales, rutina, estigmasterol, fructosa, y almidón (Cuadro 3.23). A partir de la distribución espacial indicada por el primer componente (CP1), 20 Soles se diferenció de Barriles y Solteros de Juan Rosas por tener la concentración mayor de los ácidos ferúlico, protocatecuico y *p*-cumárico; así como las concentraciones más altas de flavonoides totales,  $\alpha$ -amirina, glucosa, clorofila *a* y clorofila total. De acuerdo con el segundo componente principal (CP2) se mostró que las colectas de Barriles y 20 Soles son similares en cuanto a la mayor concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico, estigmasterol y fructosa, diferenciándose de Solteros de Juan Rosas el cual tuvo las concentraciones más bajas en estas variables.

Sin embargo, este sitio se caracterizó por tener los valores más altos de compuestos fenólicos totales, rutina y almidón (Figura 3.4).

Cuadro 3.23. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables fisicoquímicas en las dos dimensiones de los metabolitos primarios y secundarios evaluados en frutos verdes de *Vanilla planifolia* de la región Totonacapan, México.

Variable	Componentes principales (CP)	
	CP1	CP2
Ác. Sinápico	0.211065	-0.085015
Ác. <i>p</i> -Hidroxibenzoico	0.169769	<b>-0.240710</b>
Ác. $\beta$ -resorcílico	0.194787	0.168913
Ác. Siríntrico	0.205645	0.120461
Ác. Ferúlico	<b>0.215785</b>	0.027038
Ác. Protocatecuico	<b>0.215752</b>	-0.027886
Ác. Vanílico	0.201368	-0.141859
Ác. Gálico	-0.198680	-0.153597
Ác. <i>p</i> -cumárico	<b>0.215817</b>	-0.026213
Compuestos fenólicos totales	0.119506	<b>-0.323768</b>
Rutina	-0.009364	<b>-0.388067</b>
Flavonoides totales	<b>0.214845</b>	-0.045121
Carnosol	-0.202907	0.134602
Ác. Ursólico	-0.183704	0.205080
Estigmasterol	0.032584	<b>0.383998</b>
Ác. Oleanólico	0.211734	-0.079472
$\alpha$ -Amirina	<b>0.215278</b>	-0.037887
$\beta$ -Sitosterol	0.209766	0.094818
Terpenoides totales	0.206844	-0.113649
Glucosa	<b>0.215225</b>	0.038844
Fructosa	0.072659	<b>0.365862</b>
Sacarosa	0.198558	0.154104
Azúcares solubles totales	0.209714	0.095190
Almidón	0.064648	<b>-0.370678</b>
Clorofila <i>a</i>	<b>0.215317</b>	0.037178
Clorofila <i>b</i>	0.212816	0.069526
Clorofila total	<b>0.214635</b>	0.048246
Carotenoides + Xantofilas	0.187913	0.192389
<b>Valor propio</b>	<b>21.3722</b>	<b>6.6279</b>
<b>Proporción variación total</b>	<b>0.7633</b>	<b>0.2367</b>
<b>Variación acumulada</b>	<b>0.7633</b>	<b>1.0000</b>

Los valores marcados en negritas indican las variables que representan mayor influencia en cada componente principal

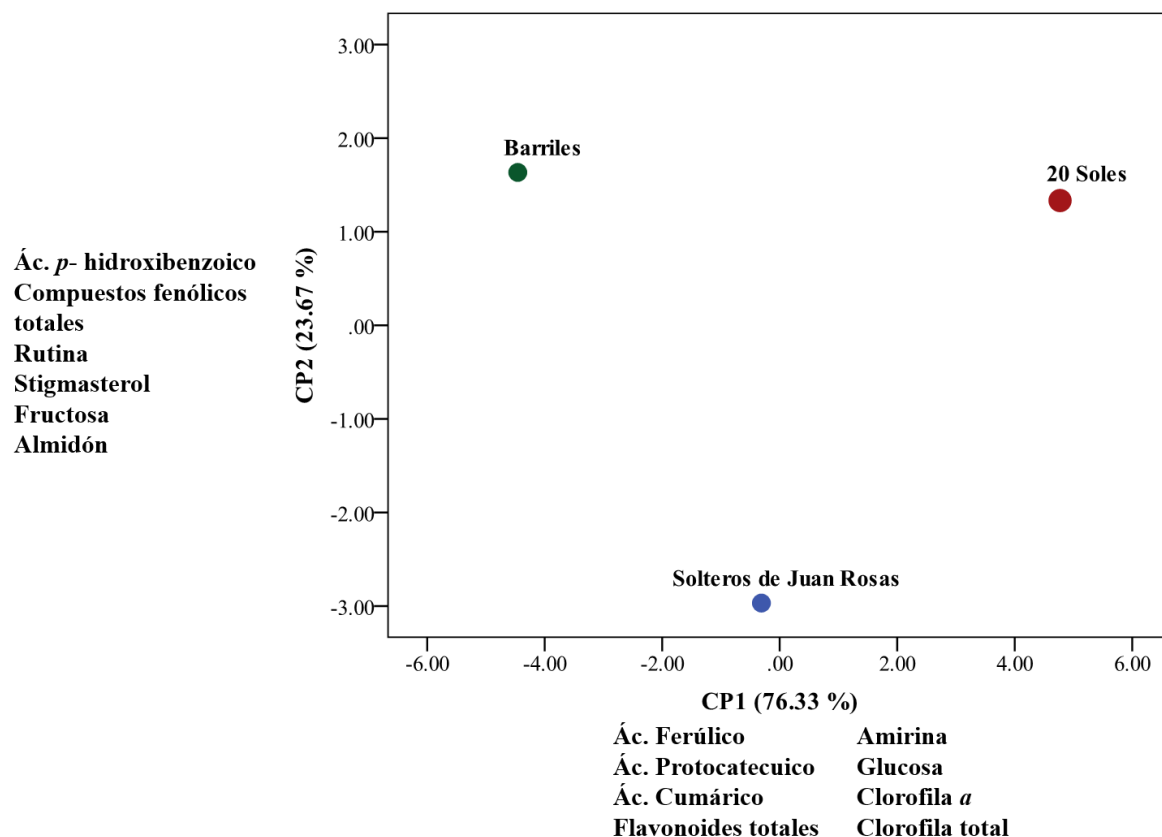


Figura 3.4. Dispersión de tres colectas de frutos verdes de *Vanilla planifolia* con base en los dos componentes principales del análisis de 28 variables químicas agrupadas por medias poblacionales.

De acuerdo con el análisis de conglomerados se observó que los tres sitios de colecta presentan características diferentes. Las colectas de frutos verdes de 20 Soles se caracterizaron por tener las concentraciones más altas de pigmentos fotosintéticos (clorofilas *a* y *b*, clorofila total, carotenoides y xantofilas). También tuvieron los valores más altos de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y azúcares solubles totales) y valores medios de almidón. Además, mostraron la mayor acumulación de ácidos fenólicos (ácidos sinápico, protocatecuico, *p*-cumárico, vanílico,  $\beta$ -resorcílico, siríngico y ferúlico), flavonoides totales y terpenoides ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y terpenoides totales); así como la menor concentración de ácido gálico, carnosol y ácido ursólico.

Con respecto a las colectas de Barriles, tuvieron la menor concentración de los ácidos fenólicos, terpenoides, flavonoides y pigmentos fotosintéticos características de los frutos colectados en 20 Soles; así como de ácido *p*-hidroxibenzoico, compuestos fenólicos totales, almidón y rutina.

Sin embargo, se diferenciaron por tener la mayor concentración de ácido gálico, carnosol y ácido ursólico. Por otra parte, las colectas de Solteros de Juan Rosas presentaron concentraciones intermedias de los ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides antes mencionados. Pero una característica en particular señala la concentración más alta de ácido *p*-hidroxibenzoico, compuestos fenólicos totales, almidón y rutina; al igual que valores medios de pigmentos fotosintéticos y azúcares como glucosa, azúcares solubles totales y sacarosa. No obstante, tuvieron mayor acumulación de ácido *p*-hidroxibenzoico, compuestos fenólicos totales y almidón (Figura 3.5).

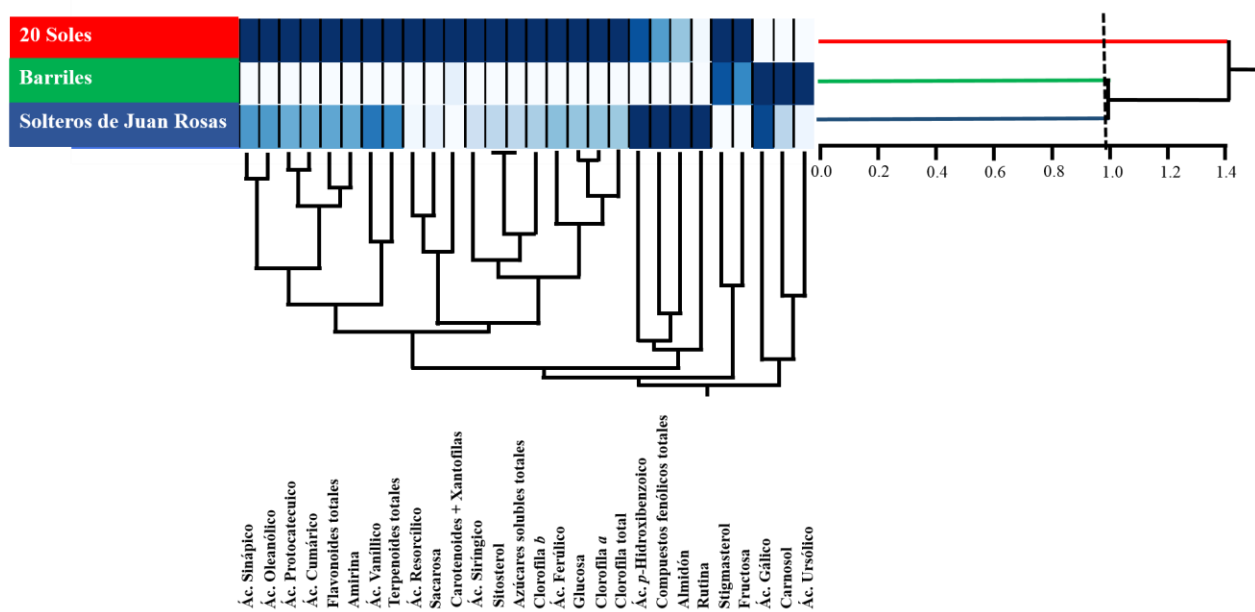


Figura 3.5. Dendrograma de tres colectas de frutos verdes de *Vanilla planifolia* colectados en el ciclo de cultivo 2019 basado en el promedio de 28 variables químicas agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

### Frutos Beneficiados

El análisis de componentes principales en frutos beneficiados mostró que los dos primeros componentes explicaron 100 % de la variación total. El primer componente (CP1) explicó 66 % de la variación definido por el ácido siríngico, compuestos fenólicos totales, kaempferol, fructosa, azúcares solubles totales y almidón. Mientras que el segundo componente (CP2) se definió por las variables ácido  $\beta$ -resorcílico, ácido *p*-cumárico, flavonoides totales, ácido oleanólico,  $\alpha$ -amirina y terpenoides totales (Cuadro 3.24).

La distribución del primer componente (CP1) indicó que las colectas de Barriles y Solteros de Juan Rosas tuvieron características similares en términos de mayor concentración de ácido siríntrico y kaempferol. Por su parte, 20 Soles se diferenció de estas colectas por tener la concentración más alta de ácido siríntrico, compuestos fenólicos totales, fructosa, azúcares solubles totales y almidón. Con respecto al segundo componente (CP2), Barriles y 20 Soles fueron semejantes por la alta concentración de ácido  $\beta$ -resorcílico, ácido *p*-cumárico, y terpenoides totales. La colecta de Solteros de Juan Rosas mostró la concentración más alta de flavonoides totales, ácido oleanólico y  $\alpha$ -amirina (Figura 3.6).

Cuadro 3.24. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables fisicoquímicas en las dos dimensiones de los metabolitos primarios y secundarios evaluados en frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* de la región Totonacapan, México.

Variable	Componentes principales	
	CP1	CP2
Ác. Sinápico	0.215314	0.152101
Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.219272	0.140703
Ác. $\beta$ -resorcílico	0.158458	<b>0.253715</b>
Ác. Siríntrico	<b>-0.224930</b>	-0.122148
Ác. Ferúlico	0.224553	0.123488
Ác. Vanílico	0.220061	0.138293
Ác. Gálico	0.178801	0.225960
Ác. <i>p</i> -cumárico	-0.112347	<b>0.297660</b>
Compuestos fenólicos totales	<b>0.241039</b>	-0.018837
Rutina	0.221948	0.132312
Quercetina	-0.208610	0.169263
Kaempferol	<b>-0.240900</b>	0.022028
Isorhamnetina	0.189405	0.208523
Flavonoides totales	0.035947	<b>-0.332545</b>
Carnosol	-0.174199	0.232832
Ác. Ursólico	-0.197806	0.192794
Estigmasterol	-0.190415	0.206731
Ác. Oleanólico	0.142874	<b>-0.271078</b>
$\alpha$ -Amirina	-0.124279	<b>-0.288311</b>
$\beta$ -Sitosterol	0.176142	-0.229977
Terpenoides totales	-0.140326	<b>0.273648</b>
Glucosa	0.213745	-0.156338
Fructosa	<b>0.238133</b>	0.055286
Sacarosa	-0.203521	0.180884
Azúcares solubles totales	<b>0.233394</b>	0.085983
Almidón	<b>0.223031</b>	0.128729
<b>Valor propio</b>	<b>17.1577</b>	<b>8.8423</b>
<b>Proporción variación total</b>	<b>0.6599</b>	<b>0.3401</b>
<b>Variación acumulada</b>	<b>0.6599</b>	<b>1.0000</b>

Los valores marcados en negritas indican las variables que representan mayor influencia en cada componente principal

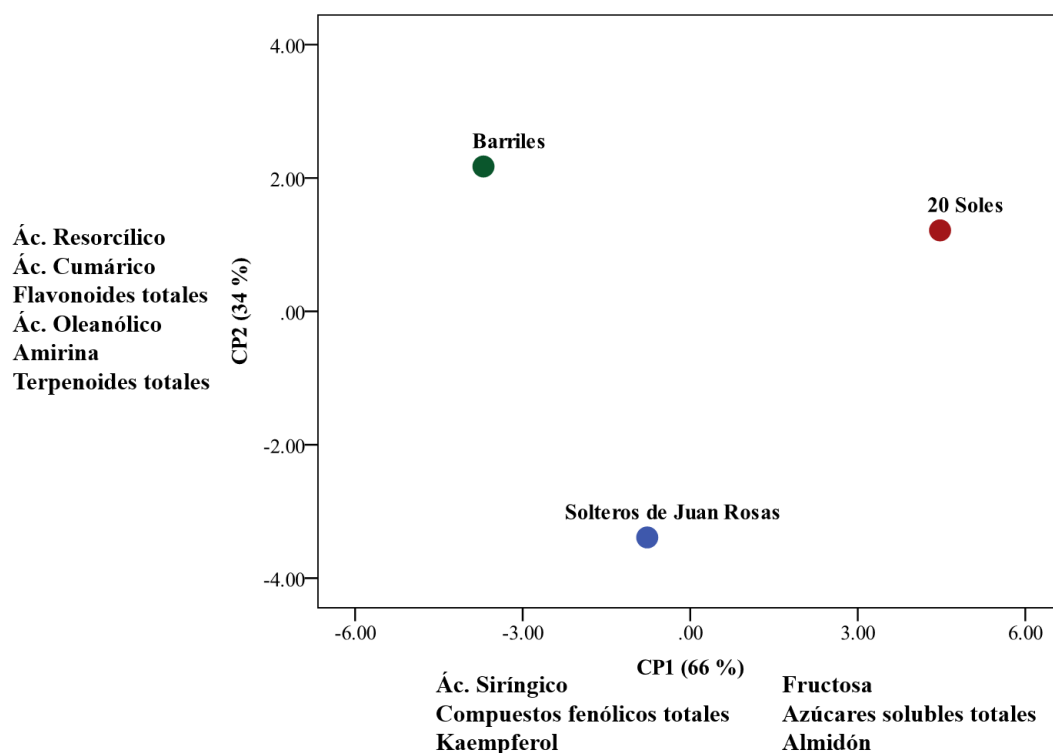


Figura 3.6. Dispersión de tres colectas de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* con base en los dos componentes principales del análisis de 26 variables químicas agrupadas por medias poblacionales.

A partir de las variables evaluadas en frutos beneficiados se determinó que los tres sitios de colecta son diferentes (Figura 3.7). Por una parte, las colectas de 20 Soles tuvieron como principal característica una alta concentración de ácidos fenólicos (ácidos sinápico, *p*-hidroxibenzoico, ferúlico, vanílico,  $\beta$ -resorcílico y gálico) y compuestos fenólicos totales. También destacó por su alta concentración de rutina, isorhamnetina, almidón y azúcares (glucosa, fructosa y azúcares solubles totales). A su vez, las colectas de Barriles mostraron altas concentraciones de los ácidos siríngico, *p*-cumárico y ursólico. También tuvieron la concentración más alta de kaempferol, quercetina, estigmasterol, carnosol, terpenoides totales y sacarosa. En estas colectas se destacaron valores medios de isorhamnetina, ácido  $\beta$ -resorcílico, ácido gálico y  $\alpha$ -amirina; mientras que tuvo los valores más bajos de glucosa y fructosa.

En contraste, Solteros de Juan Rosas se caracterizó por la alta concentración de flavonoides totales,  $\alpha$ -amirina, ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol y ácido siríngico. De igual manera mostró valores medios en azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y azúcares solubles totales), compuestos fenólicos totales, kaempferol y quercetina.

A diferencia de las otras colectas, Solteros de Juan Rosas tuvo la menor concentración de los ácidos sinápico, *p*-hidroxibenzoico, ferúlico, vanílico,  $\beta$ -resorcílico y gálico. Y los valores más bajos de rutina, almidón e isorhamnetina (Figura 3.7).

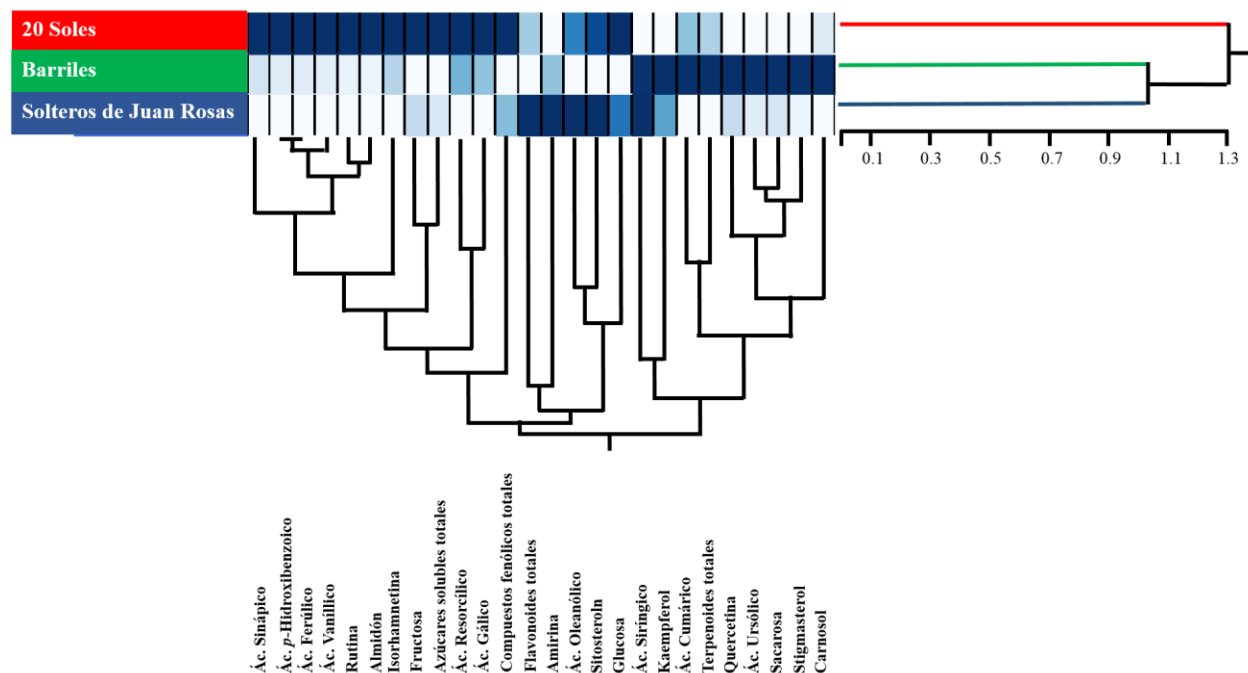


Figura 3.7. Dendrograma de tres colectas de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados en el ciclo de cultivo 2019 basado en el promedio de 26 variables químicas agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

### Análisis de Correlaciones Canónicas entre parámetros de clima y contenido de metabolitos por sitio

- Barriles

La correlación canónica entre parámetros de clima y las variables químicas evaluadas en los frutos beneficiados colectados en Barriles tuvo valores de 0.98 ( $r^2= 0.99$ ). Según se indica en el Cuadro 3.25 la correlación más alta se encontró entre la temperatura (Temperatura\_14H y Temperatura\_18H) y radiación fotosintéticamente activa (RFA\_18H) con compuestos fenólicos totales (0.4224), clorofila *a* (0.5001), flavonoides totales (0.3580) y sacarosa (0.5158); así como una menor asociación con pigmentos fotosintéticos como carotenos y xantofilas (0.0353).



La humedad relativa (HR\_14H y HR\_18H) tuvo una asociación positiva con la acumulación de terpenoides totales, mientras que mostró una correlación negativa con azúcares como glucosa y fructosa. Como se indica en las Figura 3.8A y 3.8B, los tres primeros factores de las correlaciones canónicas explicaron 72.04 % de la varianza total.

De acuerdo con esto, la concentración de azúcares incrementa en función del incremento de la temperatura y radiación fotosintéticamente activa (RFA) ya que influyen directamente en actividad fotosintética (Greer y Weedon 2013), pero también incrementan para actuar como un osmoprotector (Yuanyuan *et al.* 2009). Estas variables ambientales también tienen influencia en la síntesis de flavonoides totales puesto que una mayor exposición a la luz incrementa el estrés oxidativo, lo que favorece el incremento en la expresión de genes involucrados en su biosíntesis a fin de incrementar su función como fotoprotectores (Pastore *et al.* 2013). Este mismo efecto se muestra con los compuestos fenólicos totales, los cuales tienden a incrementar en un ambiente donde incrementa la radiación al favorecerse la actividad enzimática (Zhang *et al.* 2012).

Así mismo, la asociación entre temperatura y RFA con la clorofila *a* se atribuye a que esta molécula es el principal pigmento fotosintético requerido para la captación de luz (Valladares y Niinemets 2008), en el caso de los carotenoides y xantofilas su incremento con la temperatura se debe a que estas proporcionan termotolerancia a los tejidos (Sinsas 2000). Por otra parte, la humedad relativa mostró un efecto positivo en la producción de terpenoides como lo indican Park *et al.* (2011), ya que el incremento en la humedad relativa del ambiente promueve una mayor emisión de estos compuestos. Con respecto a la relación inversa entre la humedad y la acumulación de glucosa, esto se atribuye principalmente a que una menor humedad relativa implica mayor temperatura, lo que favorece la acumulación de azúcares.

El análisis de correlaciones canónicas para frutos beneficiados tuvo valores de 0.99 ( $r^2 = 0.99$ ) (Cuadro 3.25). El análisis señaló que la principal asociación se dio entre la radiación fotosintéticamente activa medida a las 18:00 h (RFA\_18H) con fructosa (0.8105), compuestos fenólicos totales (0.8077), y en menor grado con almidón (0.4668). Mientras que la radiación registrada a las 14:00 h (RFA\_14H) tuvo mayor influencia en metabolitos como terpenoides totales (0.7553) y menor asociación con sacarosa (0.3995). No obstante, la RFA registrada en ambos periodos horarios tuvieron una correlación negativa con azúcares solubles totales (-0.8886).

Así mismo, se encontró que la temperatura (Temp\_18H) y humedad relativa (HR\_14H y HR\_18H) se correlacionan en forma positiva con flavonoides totales (-0.5639) así como una menor influencia sobre azúcares solubles totales. Los tres factores expresados por el análisis aportaron 86.79 % de la varianza (Figuras 3.8C y 3.8D).

Al igual que en los frutos verdes, la RFA tuvo un efecto directo en la acumulación de azúcares y almidón de los frutos beneficiados puesto que son el principal producto de la fotosíntesis, ya sea como monosacáridos o como moléculas de almacenamiento como el almidón. Aunque también influyen de manera positiva en la síntesis de compuestos fenólicos. En lo referente al efecto de la RFA sobre los terpenoides, esta relación indica que una mayor cantidad de luz estimula la síntesis de estos metabolitos al incrementa la actividad enzimática, puesto que los terpenoides pueden proteger los tejidos de la consecuente oxidación por la exposición a la luz solar (Sharkey y Yeh 2001).

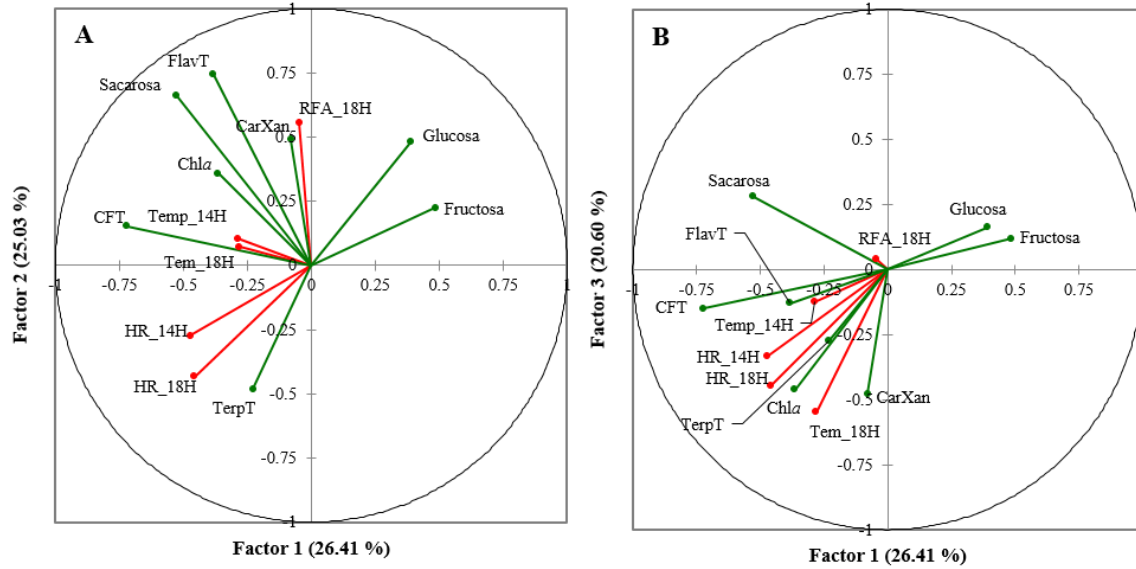
Cuadro 3.25. Correlación canónica entre parámetros de clima y metabolitos primarios y secundarios registradas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* de la localidad de Barriles, Gutiérrez Zamora, Ver.

Correlación de parámetros de clima con variables canónicas químicas			
Frutos Verdes		Frutos Beneficiados	
Temperatura_14H	0.4630	Temperatura_18H	-0.0606
Temperatura_18H	0.3290	Humedad relativa_14H	-0.0877
Humedad relativa_14H	0.0536	Humedad relativa_18H	-0.1659
Humedad relativa_18H	0.1888	RFA_14H	0.5254
RFA_18H	0.3119	RFA_18H	0.6625
Correlación de variables químicas con variables canónicas de parámetros de clima			
Compuestos fenólicos totales	0.4224	Compuestos fenólicos totales	0.8077
Flavonoides totales	0.3580	Flavonoides totales	-0.5639
Terpenoides totales	0.0422	Terpenoides totales	0.7553
Glucosa	-0.2882	Fructosa	0.8105
Fructosa	-0.3167	Sacarosa	0.3995
Sacarosa	0.5158	Azúcares solubles totales	-0.8886
Clorofila <i>a</i>	0.5001	Almidón	0.4668
Carotenoides + Xantofilas	0.0353		
$r^2$	0.99	$r^2$	0.99
Correlación canónica	0.98	Correlación Canónica	0.99

RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 h.

RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 18:00 h.

### Frutos Verdes



### Frutos Beneficiados

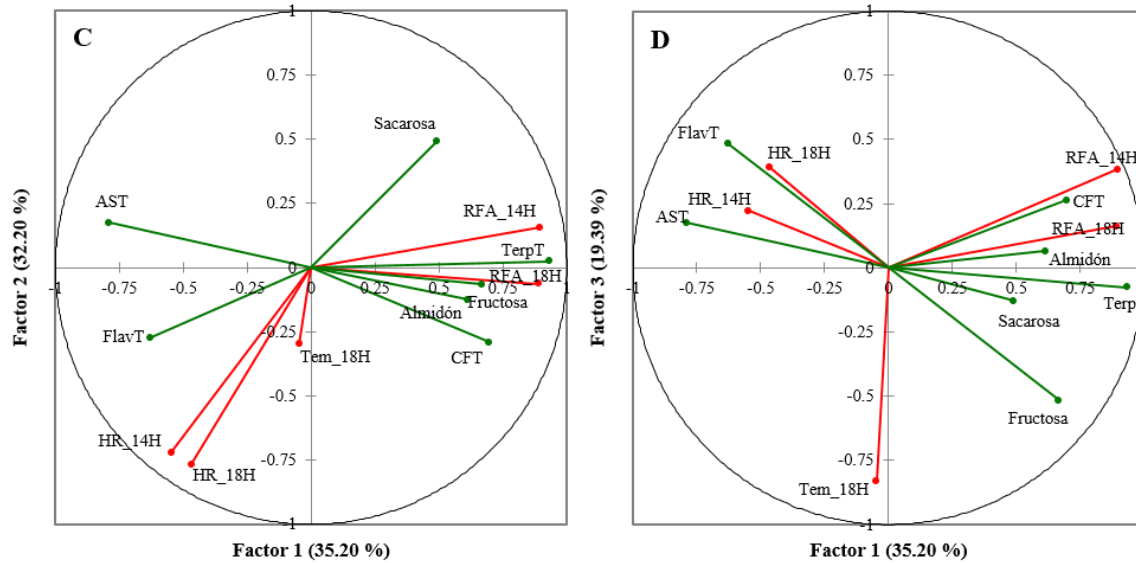


Figura 3.8. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los tres primeros factores en la interacción de parámetros de clima (●) y, metabolitos primarios y secundarios (●) en frutos verdes (A y B) y beneficiados (C y D) de *Vanilla planifolia* colectados en Barriles, Gutiérrez Zamora, Ver. HR<sub>14</sub> y HR<sub>18</sub>: Humedad relativa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. Temp<sub>14</sub> y Temp<sub>18H</sub>: Temperatura promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h; RFA<sub>14H</sub> y RFA<sub>18H</sub>: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. TerpT: Terpenoides totales; CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; Chl<sub>a</sub>: Clorofila *a*; CarXan: Carotenoides y Xantofilas; AST; Azúcares solubles totales.

- 20 Soles

La correlación canónica entre las variables químicas evaluadas en frutos verdes y las variables ambientales tuvo valores de 0.99 ( $r^2= 0.99$ ) (Cuadro 3.26). Los resultados indicaron que una de las correlaciones positivas más altas se dio entre temperatura (Temp\_14H y Temp\_18H) y terpenoides totales (-0.5026). Por otra parte, la humedad relativa (HR\_14H y HR\_18H) y radiación fotosintéticamente activa registrada a las 14:00 h (RFA\_14H) mostraron baja asociación con la concentración de fructosa y sacarosa. Mientras que la radiación fotosintéticamente activa (RFA\_18H) tuvo alta correlación con glucosa (0.7727) y azúcares solubles totales (0.8038); así como una menor asociación con clorofila *b* (0.4419), flavonoides totales (0.2196) y carotenoides y xantofilas (0.0696). Así mismo, mostró una baja correlación con compuestos fenólicos totales (-0.0608). Según se señala en las Figuras 3.9A y 3.9B los tres factores del análisis explicaron 79.11 % de la varianza total.

La relación entre temperatura y terpenoides indica que por una parte, el incremento en la temperatura puede favorecer la biosíntesis de estas moléculas al aumentar la actividad de enzimas involucradas en su producción (Peñuelas y Llusà 2001). El incremento en su producción reflejan una respuesta directa al estrés para actuar como termoprotectores en las estructuras vegetales y el aparato fotosintético (Helming *et al.* 2007). Por otra parte, la relación de la RFA con la producción de azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa se relaciona con la cantidad de luz que se recibe para la actividad fotosintética. Lo que a su vez tiene relación con la producción de clorofila *b* y caroteno-xantofilas que actúa en la fotosíntesis. Así mismo, la exposición a la RFA también estimula la síntesis de flavonoides y compuestos fenólicos para proteger de los radicales libres generados por la radiación UV (Klimov *et al.* 2008).

La correlación canónica entre variables químicas evaluadas en frutos beneficiados y la condición ambiental en que estos se cultivan tuvieron un valor de 0.97 ( $r^2= 0.98$ ) (Cuadro 3.26). A partir de este análisis se determinó que la humedad relativa (HR\_14 y HR\_18H) y radiación fotosintéticamente activa (RFA\_14H) tuvieron mayor asociación con las azúcares de los frutos beneficiados glucosa (0.3691), fructosa (0.2558) y azúcares solubles totales (0.3459). También se encontró menor asociación con sacarosa (-0.0185) y compuestos fenólicos totales (-0.2387).

Por otra parte, la acumulación de flavonoides totales (0.4252) se vio más influenciado por la temperatura (Temp\_14H y Temp\_18H). El porcentaje de explicación proporcionado por los tres factores en este análisis fue de 97.27 % (Figura 3.9C y 3.9D). Al igual que en los frutos verdes, la RFA se relacionó de manera directa con la producción de azúcares como productos derivados de la fotosíntesis. La relación entre temperatura y la acumulación de flavonoides a menudo suele ser inversa, ya que el incremento en la temperatura puede generar su degradación o la disminución en la expresión de genes involucrados en su biosíntesis (Carbonell-Bejarano *et al.* 2013).

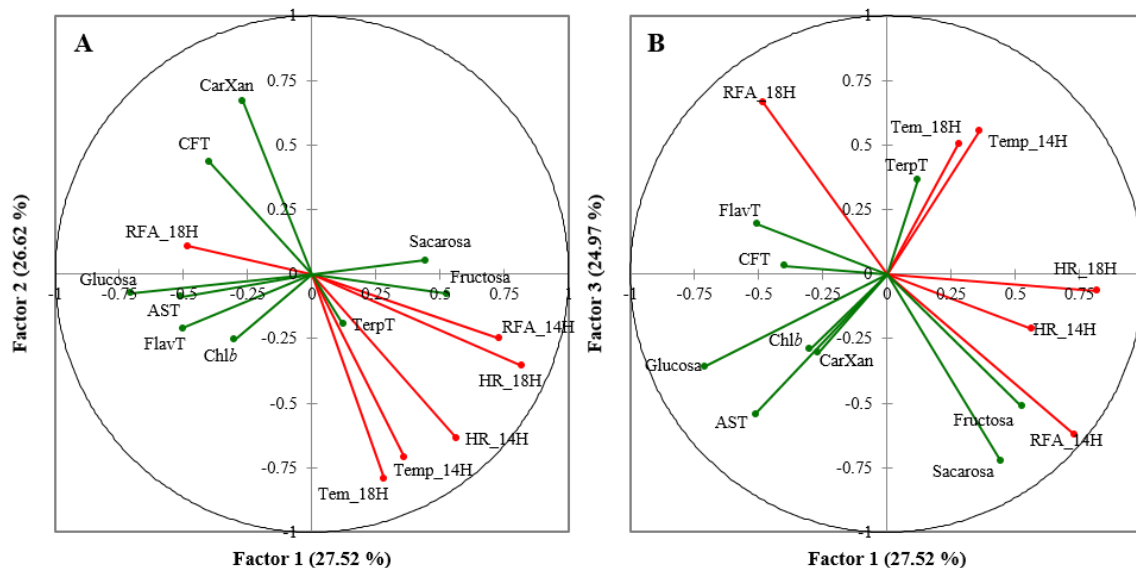
Cuadro 3.26. Correlación canónica entre parámetros de clima y metabolitos primarios y secundarios registradas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* de la localidad de 20 Soles, Papantla, Ver.

Correlación de parámetros de clima con variables canónicas químicas			
Frutos verdes		Frutos beneficiados	
Temperatura_14H	-0.4989	Temperatura_14H	0.2548
Temperatura_18H	-0.3093	Temperatura_18H	0.2841
Humedad relativa_14H	0.0189	Humedad relativa_14H	0.6195
Humedad relativa_18H	0.2837	Humedad relativa_18H	0.5290
RFA_14H	0.0515	RFA_14H	0.6626
RFA_18H	-0.2768		
Correlación de variables químicas con variables canónicas de parámetros de clima			
Compuestos fenólicos totales	-0.0608	Compuestos fenólicos totales	-0.2387
Flavonoides totales	0.2196	Flavonoides totales	0.4252
Terpenoides totales	-0.5026	Glucosa	0.3691
Glucosa	0.7727	Fructosa	0.2558
Fructosa	0.0007	Sacarosa	-0.0185
Sacarosa	0.2342	Azúcares solubles totales	0.3459
Azúcares solubles totales	0.8038		
Clorofila <i>b</i>	0.4419		
Carotenoides + Xantofilas	0.0696		
$r^2$	0.99	$r^2$	0.98
Correlación canónica	0.99	Correlación Canónica	0.97

RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 h.

RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 18:00 h.

### Frutos Verdes



### Frutos Beneficiados

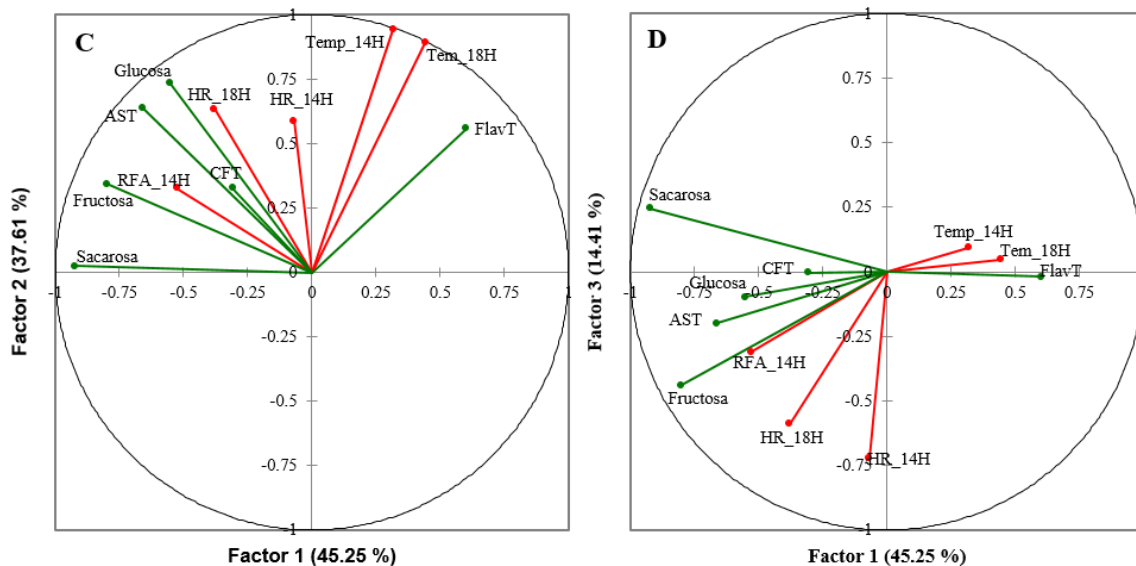


Figura 3.9. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los tres primeros factores en la interacción de parámetros de clima (●) y, metabolitos primarios y secundarios (●) en frutos verdes (A y B) y beneficiados (B y C) de *Vanilla planifolia* colectados en 20 Soles, Papantla, Ver. HR\_14 y HR\_18: Humedad relativa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. Temp\_14 y Temp\_18H: Temperatura promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h; RFA\_14H y RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; TerpT: Terpenoides totales; AST: Azúcares solubles totales; Chlb: Clorofila *b*; CarXan: Carotenoides y Xantofilas.

- Solteros de Juan Rosas

El análisis realizado en frutos verdes colectados en Solteros de Juan Rosas tuvo una correlación de 0.97 ( $r^2 = 98$ ) (Cuadro 3.27). Se observó que la radiación fotosintética activa registrada a las 18:00 h (RFA\_18H) tuvo una fuerte correlación con la acumulación de clorofila *b* (-0.7012) y una menor asociación con carotenoides y xantofilas (-0.241), ya que estos pigmentos están directamente asociados con la cantidad de luz recibida para realizar la fotosíntesis. Los metabolitos primarios como glucosa (-0.1816), fructosa (-0.0923), azúcares solubles totales (-0.1734) y almidón (-0.2203) se correlacionaron con la radiación fotosintéticamente activa de las 14:00 h (RFA\_14H) y la humedad relativa de las 18:00 h (HR\_18H). Esta asociación se atribuye a que son los productos resultantes de la fotosíntesis ya sea como moléculas precursoras o de almacenamiento (Sowokinos 2001). A su vez, su asociación con la humedad relativa puede ser un indicador de que una condición de menor humedad llega a generar mayor acumulación de estas azúcares para que actúen como reguladores osmóticos y evitar la deshidratación de los tejidos (Yuanyuan *et al.* 2009).

La temperatura de las 18:00 h tuvo asociación principalmente con la acumulación de compuestos fenólicos totales (0.2891), ya que la producción de estos metabolitos se puede inhibir en condiciones de altas temperaturas (Xie *et al.* 2012). Mientras que la humedad relativa de las 14:00 h (HR\_14H) se correlacionó principalmente con la concentración de terpenoides totales (0.5652) y menor asociación con flavonoides totales (0.3697), ya que esta condición puede favorecer la actividad enzimática para la producción de terpenoides. Aunque en el caso de los flavonoides, la asociación se atribuye a que mayores condiciones de humedad representan bajas temperaturas, lo que genera mayores cantidades de especies reactivas al oxígeno, y en consecuencia mayor síntesis de flavonoides (Klimov 2008). De acuerdo con la Figura 3.10A y 3.10B los tres factores del análisis de correlaciones canónicas explicaron 85.93 % de la varianza total.

El análisis de correlación canónica para frutos beneficiados indicó que la temperatura (Temp\_14H y Temp\_18H) tuvo una asociación inversa con la acumulación de glucosa (-0.5565), sacarosa (-0.4887) y azúcares solubles totales (-0.5460); así como una mayor correlación con los compuestos fenólicos totales (0.7775). Esta relación señala que temperaturas más bajas pueden propiciar la síntesis de compuestos fenólicos para actuar como antioxidantes (Xie *et al.* 2012).

Mientras que la humedad relativa mostró mayor asociación con los azúcares, lo que indica que a menor humedad relativa se incrementa la producción de azúcares para actuar como osmolitos. De igual manera, la radiación fotosintéticamente activa (RFA\_18H) tuvo asociación el almidón y una correlación negativa con la acumulación de flavonoides totales (0.1949), señalando que a mayor incidencia de RFA se produce mayor cantidad de azúcares y por lo tanto, mayor cantidad de metabolitos de reserva (Cuadro 3.27). Los tres primeros factores del análisis explicaron 85.01 % de la varianza total (Figuras 3.10C y 3.10D).

Cuadro 3.27. Correlación canónica entre parámetros de clima y metabolitos primarios y secundarios registradas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* de la localidad de Solteros de Juan Rosas, Papantla, Ver.

Correlación de parámetros de clima con variables canónicas químicas			
Frutos Verdes		Frutos Beneficiados	
Temperatura_18H	-0.1143	Temperatura_14H	0.0019
Humedad relativa 14H	0.7531	Temperatura_18H	0.2142
Humedad relativa_18H	0.5565	Humedad relativa_14H	-0.0792
RFA_14H	0.4193	Humedad relativa_18H	-0.1337
RFA_18H	-0.5010	RFA_18H	0.1489
Correlación de variables químicas con variables canónicas de parámetros de clima			
Compuestos fenólicos totales	0.2891	Compuestos fenólicos totales	0.7775
Flavonoides totales	0.3697	Flavonoides totales	0.1949
Terpenoides totales	0.5652	Glucosa	-0.5565
Glucosa	-0.1816	Sacarosa	-0.4887
Fructosa	-0.0923	Azúcares solubles totales	-0.5460
Azúcares solubles totales	-0.1734	Almidón	0.0748
Almidón	-0.2203		
Clorofila <i>b</i>	-0.7012		
Carotenoides + Xantofilas	-0.2241		
$r^2$	0.99	$r^2$	0.98
Correlación canónica	0.99	Correlación Canónica	0.99

RFA\_14H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 h.

RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 18:00 h.



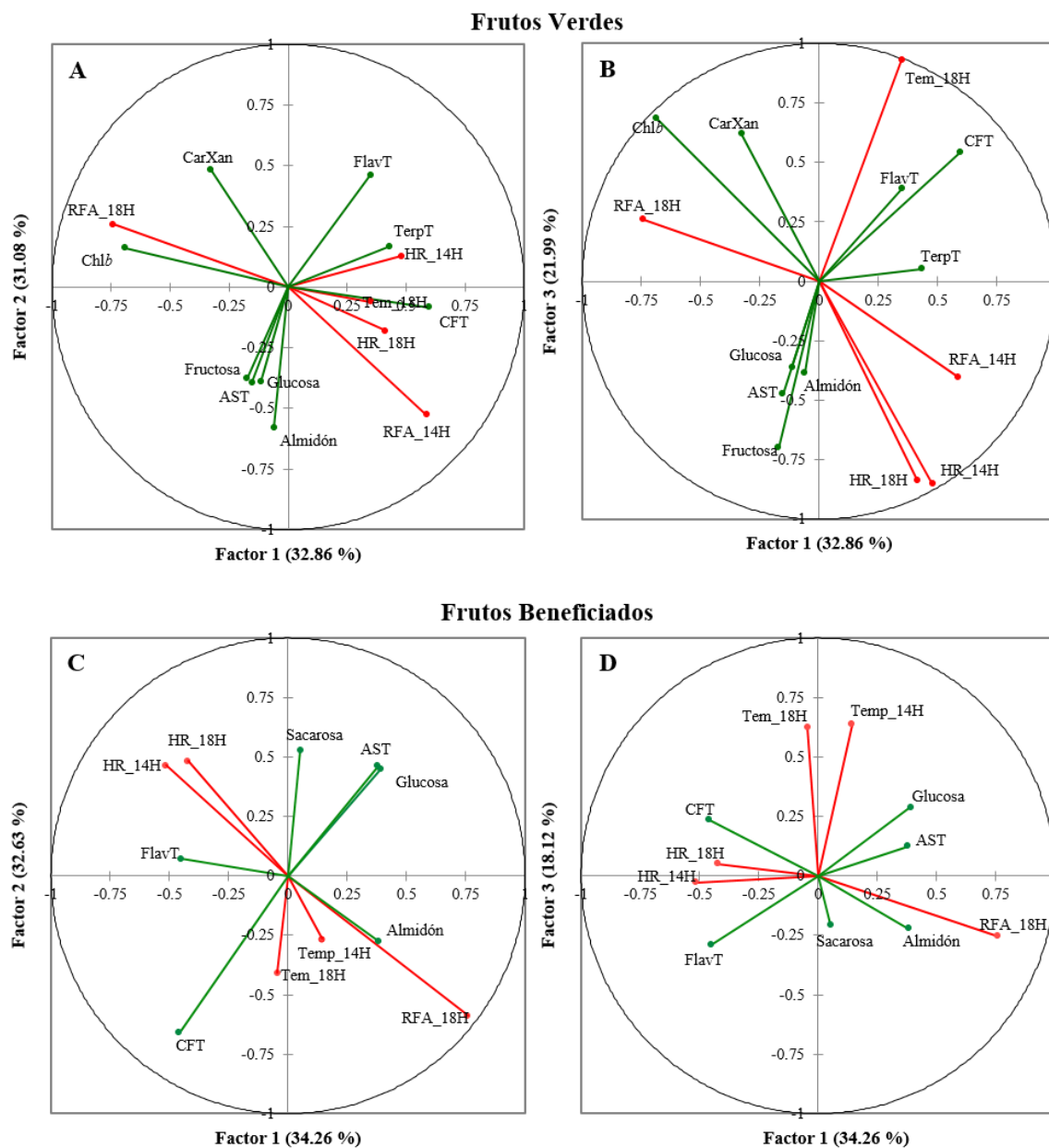


Figura 3.10. Representación gráfica de los coeficientes de correlación estructural de los tres primeros factores en la interacción de parámetros de clima (●) y, metabolitos primarios y secundarios (●) en frutos verdes (A y B) y beneficiados (C y D) de *Vanilla planifolia* colectados en Solteros de Juan Rosas, Papantla, Ver. HR\_14 y HR\_18: Humedad relativa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. Temp\_14 y Temp\_18H: Temperatura promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h; RFA\_14H y RFA\_18H: Radiación fotosintéticamente activa promedio registrada a las 14:00 y 18:00 h. CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; TerpT: Terpenoides totales; AST: Azúcares solubles totales; Chlb: Clorofila *b*; CarXan: Carotenoides y Xantofilas.

### 3.4. CONCLUSIONES

Se encontraron importantes diferencias en el contenido de metabolitos primarios y secundarios de los frutos de vainilla entre los dos ciclos de cultivo evaluados, lo que sugiere condiciones ambientales diferentes en cada ciclo. El tiempo de almacenamiento fue uno de los factores con mayor influencia en la cuantificación de azúcares en los frutos del ciclo 2018, ya que los valores reportados para el ciclo 2018 fueron aproximadamente el doble de lo detectado en frutos de 2019.

Los pigmentos fotosintéticos fueron un parámetro importante que permitió diferenciar los sistemas de manejo evaluados, ya que representaron un indicador de las características ambientales predominantes en el desarrollo del fruto. Las diferencias entre sistemas de manejo fueron evidentes, ya que los frutos verdes de los vainillales establecidos en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron menor concentración de clorofilas (*a* y *b*), carotenos y xantofilas. Lo que los diferenció del sistema en acahual (20 Soles). Estas diferencias no sólo se atribuyen al sistema de manejo, sino también al posible estrés ambiental que favoreció la degradación de estos pigmentos. Pero también se mostraron diferencias entre edad de los frutos al evidenciar la degradación de los pigmentos como resultado de la madurez de los frutos.

Los tres sitios evaluados tuvieron perfiles diferentes de metabolitos secundarios, con lo que se observa que las prácticas de manejo realizadas en el vainillal, junto con la condición ambiental, influyeron en la producción de estas moléculas. En los perfiles de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides se observaron importantes diferencias estadísticas y coeficientes de variación altos, lo que sugiere diferencias en la condición ambiental con diferente influencia sobre el metabolismo de la planta debido a las diferencias en el manejo y el sistema de cultivo. Se observó que los frutos cultivados en sistemas de malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron la mayor acumulación de ácidos fenólicos y mostraron contenidos similares que se diferenciaron del sistema en acahual (20 Soles), lo que indica el efecto del sistema de manejo sobre estos compuestos. El perfil de flavonoides y terpenoides en los frutos tuvo diferencias principalmente entre ciclos de cultivo en los tres sistemas de manejo evaluados. Lo anterior sugiere que la condición ambiental fue diferente en ambos ciclos y, por lo tanto, tuvo una influencia distinta sobre la síntesis de flavonoides.

A pesar de que se presentaron semejanzas entre sitios, al evaluar las variables en conjunto se definió que los tres sitios fueron diferentes, resultado de las diferencias propias del sistema de manejo, condición ambiental y prácticas de manejo realizadas en cada vainillal. No obstante, se observaron mayores semejanzas en la composición química de las colectas de Barriles y Solteros de Juan Rosas, que con las de 20 Soles. Lo que indica que el sistema de manejo tiene una influencia directa en los perfiles químicos de los frutos al mostrar semejanza entre los vainillales establecidos en malla sombra.

El análisis de correlaciones canónicas mostró que existe influencia de la condición ambiental sobre las variables químicas. Los parámetros de clima evaluadas mostraron diferente influencia en la composición química de los frutos. Aunque en los tres vainillales la RFA tuvo un efecto similar en la acumulación de pigmentos fotosintéticos y azúcares, las diferencias se observaron en mayor medida en los metabolitos secundarios (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales), ya que estos compuestos pueden ayudar a comprender de mejor manera las diferencias en la condición climática propia de cada sistema de manejo al ser más influenciados en su biosíntesis. Sin embargo, la temperatura y radiación fotosintéticamente activa fueron los parámetros que influyeron en la acumulación de metabolitos primarios y secundarios. Esta información puede resultar relevante y la base de futuras investigaciones para determinar las condiciones que favorezcan una mayor acumulación de compuestos que aporten mejores características a los frutos.

## **CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FÍSICA Y AROMÁTICA DE FRUTOS VERDES Y BENEFICIADOS DE *Vanilla planifolia* CULTIVADOS EN DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO**

### **RESUMEN**

La calidad de los frutos de vainilla se define por sus características físicas y su perfil aromático. No obstante, la información de las características aromáticas en frutos verdes y beneficiados es limitada en relación al sistema de cultivo en que se cultivan. El objetivo de este capítulo fue evaluar compuestos aromáticos mayoritarios y precursores del aroma en frutos verdes y beneficiados con diferente madurez cultivados en sistema de malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas; SJR) y acahual (20 Soles). Se colectaron aproximadamente 20 frutos con 28, 30 y 32 semanas de madurez en diferentes ciclos de cultivo en tres vainillales. La mitad de frutos de cada madurez se procesó en verde (liofilización) y los frutos restantes se sometieron a beneficiado tradicional. Se evaluó el peso, longitud, ancho, grosor y descriptores de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , Cromo, Hue e índice de color) en los frutos verdes y beneficiados. También se cuantificó la concentración de vainillina, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vaníllico, *p*-hidroxibenzaldehído, glucovainillina, alcohol vaníllico y 3,4-dihidroxibenzaldehído por cromatografía de líquidos. Los análisis estadísticos realizados fueron análisis de varianza, prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), análisis de componentes principales y conglomerados. Los resultados señalaron que las colectas de acahual tuvieron frutos de mayor longitud, peso y tamaño, por lo que se consideran de mayor calidad; y también tuvieron los frutos más oscuros. Respecto al perfil aromático, los frutos verdes se diferenciaron de los beneficiados por la ausencia de alcohol vaníllico y 3,4-dihidroxibenzaldehído. Las colectas de acahual (20 Soles) tuvieron una concentración mayor de glucovainillina, lo que representa un potencial mayor de producción de vainillina. Los compuestos evaluados se encontraron en mayor concentración en frutos beneficiados, lo que indica que estos compuestos se encuentran principalmente como glucósidos. Sin embargo, aún se detectó glucovainillina en frutos beneficiados, lo cual refiere a una hidrólisis incompleta del glucósido. Los frutos de los sistemas en malla sombra tuvieron una mayor acumulación de compuestos menores (ác. *p*-hidroxibenzoico, ácido vaníllico y *p*-hidroxibenzaldehído), además de alcohol vaníllico y 3,4-dihidroxibenzaldehído. Se concluye que los frutos cultivados en acahual (20 Soles) tuvieron una calidad física y aromática mejor que aquellos cultivados en malla sombra.

**Palabras clave:** compuestos menores, sistema de manejo, perfil aromático, vainilla.

## CHAPTER IV. EVALUATION OF THE PHYSICAL AND AROMATIC QUALITY OF GREEN AND CURED PODS OF *Vanilla planifolia* CULTIVATED IN DIFFERENT MANAGEMENT SYSTEMS

### ABSTRACT

The quality of vanilla pods is defined by their physical characteristics and their aromatic profile. However, the information on the aromatic characteristics in green and cured pods is limited in relation to the cultivation system in which they are grown. The objective of this chapter was to evaluate the major aromatic compounds and aroma precursors in green and cured pods with different ripeness cultivated in a shade mesh system (Barriles y Solteros de Juan de Rosas; SJR) and acahual (20 Soles). Around 20 pods with 28, 30 and 32 weeks of ripeness were collected in different crop cycles in three vanilla plantations. Half of the pods of each maturity were green processed (lyophilization) and the remaining pods submitted to traditional curing. Weight, length, width, thickness and color descriptors ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , Chroma, Hue and color index) were evaluated in green and cured pods. The concentration of vanillin, *p*-hidroxibenzoic acid, vanillic acid, *p*-hidroxibenzaldehído, glucovanillin, vanillyl alcohol and 3,4-dihydroxybenzaldehyde were quantified by liquid chromatography. The statistical analysis performed were analysis of variance, Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ), analysis of principal components and conglomerates. The results indicated that the acahual accessions had the pods of greater length, weight and size, for which they are considered of higher quality; and they had the darkest pods. Regarding the aromatic profile, the green pods differed from those cured pods by the absence of vanillyl alcohol and 3,4-dihydroxybenzaldehyde. The acahual accessions (20 Soles) had a higher glucovanillin concentration, which represents a higher potential for vanillin production. The evaluated compounds were found in higher concentrations in cured pods, which indicate that these compounds are found mainly as glycosides. However, glucovanillin was still detected in cured pods, which refers to incomplete hydrolysis of the glucoside. The fruits of shade mesh systems had a higher accumulation of minor compounds (*p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and *p*-hydroxybenzaldehyde), in addition to vanillyl alcohol and 3,4-dihydroxybenzaldehyde. It is concluded that the pods grown in acahual (20 Soles) had a better physical and aromatic quality than those grown in shade mesh.

**Key words:** minor compounds, management system, aromatic profile, vanilla.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

La vainilla es una de las especies más apreciadas por su diversidad de aplicaciones y características aromáticas (Gallage y Møller 2018). Los frutos verdes maduros carecen de aroma casi en su totalidad, sin embargo, este se desarrolla luego de un proceso de fermentación que se da durante el beneficiado dando lugar a una serie de reacciones glucolíticas que produce moléculas aromáticas en estado libre (Ramachandra-Rao y Ravishankar 2000). Aunque se han realizado diversos estudios en vainilla como la identificación de los cambios metabólicos en hojas y frutos verdes (Palama *et al.* 2010), cambios en la composición de los frutos en diferentes etapas de desarrollo (Palama *et al.* 2009; Palama *et al.* 2011), así como la comparación del metaboloma de los frutos beneficiados donde se proponen diferentes rutas de biosíntesis de la vainillina (Gu *et al.* 2017). Uno de los aspectos de mayor interés en esta especie se enfoca en conocer los metabolitos responsables de sus características aromáticas.

Según señalan Brodelius (1994) y Palama *et al.* (2009), las características aromáticas de los frutos de vainilla se expresan durante el último periodo de su desarrollo y se acumulan principalmente en forma de glucósidos. Uno de los principales glucósidos identificados en frutos verdes es la glucovainillina, la cual representa cerca del 90 % del potencial de vainillina y se acumula principalmente de la semana 15 a la 30 posteriores a la polinización (Brodelius 1994). Derbesy *et al.* (1989) señalan que luego de la hidrólisis, la vainillina puede estar presente en concentraciones aproximadas al 2 % en materia seca cuando su potencial es de 5-6 % (Leong 1991). Esto debido a que el rendimiento de hidrólisis enzimático no supera el 40 % luego del beneficio de los frutos (Odox 2000). Palama *et al.* (2009) señalan que la concentración de agliconas y glucósidos de compuestos como la vainillina, ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído, alcohol vanílico y ácido vanílico aumentan con la madurez de los frutos. Por lo que los frutos con mayor madurez suelen tener mayor concentración de compuestos aromáticos libres.

El aroma de los frutos beneficiados de vainilla, junto con características físicas como el tamaño y color, son algunas de las características más importantes no sólo a nivel comercial, sino también como un parámetro que le permite al agricultor seleccionar los frutos (Salazar-Rojas *et al.* 2012). Por lo que estas características de los frutos determinan en gran medida su precio potencial a partir de las clasificaciones basadas en estos criterios (Curti-Díaz 1995).

Aunque el beneficiado es un factor que determina en gran medida las características del aroma de los frutos; la condición ambiental, el origen geográfico y la madurez fisiológica son aspectos importantes relacionados con su perfil aromático (Odoux 2000; Karthik-Kumar y Balamohan 2013). Aun cuando la vainillina es el principal compuesto aromático presente en la vainilla, existe una gran diversidad de moléculas que contribuyen al perfil aromático de los frutos beneficiados (Pérez-Silva *et al.* 2006). Estudios previos indican que los frutos beneficiados contienen más de 450 compuestos volátiles, en su mayoría de naturaleza fenólica (Verpoorte y Alferman 2013). Dentro de estos compuestos, los metabolitos de mayor concentración en los frutos beneficiados que se reportan son vainillina, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico (Zhang y Mueller 2012; Takahashi *et al.* 2013). Además de otros compuestos como *p*-cresol, creosol, y alcohol *p*-hidroxibenzílico (Dignum *et al.* 2004).

Mientras que en los frutos verdes Palama *et al.* (2011) reportan que su composición química incluye glucovainillina, así como los glucósidos de *p*-hidroxibenzaldehído, glucósidos A y B. Sin embargo, aún es limitada la información acerca de las características químicas de los frutos verdes y beneficiados con diferente madurez en relación al manejo y sistemas de producción en el cultivo de vainilla. Por ello, el objetivo de este capítulo fue analizar en frutos verdes y beneficiados de diferente edad fisiológica, sus características físicas, algunos precursores del aroma y los principales compuestos aromáticos en colectas de tres vainillales con diferente sistema de manejo durante dos ciclos de cultivo.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

La región Totonacapan abarca una superficie de aproximadamente 7751 km<sup>2</sup>, en ella se incluye el área septentrional de la Sierra Norte de Puebla y parte de la llanura costera del Golfo al norte de Veracruz (Toledo *et al.* 1994). Esta región posee una geografía variada en la que se distinguen distintos climas y recursos naturales. Parte del desarrollo de la región se basa en actividades agrícolas como el cultivo de cítricos, tabaco y vainilla (Zúñiga-Bravo 2014). Este último es uno de los cultivos de mayor importancia no sólo por su valor económico, sino también por su trascendencia cultural. Datos del IMPI (2009) mencionan que la vainilla se cultiva en 39 municipios de la región Totonacapan, 19 de los cuales corresponden a Veracruz.

De acuerdo con Tavares-González (2018), se estima que la vainilla de Veracruz se cultiva en una proporción de aproximadamente 59 % en condiciones de cielo abierto, 23 % en malla sombra y sólo 18 % en acahual.

### Sitios de colecta

Durante el año 2018 se seleccionaron dos sitios de colecta con características contrastantes en el manejo y sistema de producción en la Región Totonacapan Veracruzano: el Rancho 20 Soles ubicado en el municipio de Papantla (sistema en acahual) y el Rancho Xanathtlan en la localidad de Barriles (malla sombra con tutores inertes) perteneciente al municipio de Gutiérrez Zamora. En el ciclo de producción 2019, además de los dos sitios antes mencionados, se incluyó un vainillal con sistema en malla sombra con tutores vivos ubicado en la localidad de Solteros de Juan Rosas del municipio de Papantla, Ver. Los sitios de ubicaron con un GPS Garmin Montana 650 y en el Cuadro 4.1 se indica su ubicación geográfica.

Cuadro 4.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.

Municipio	Localidad	Longitud	Latitud	Altitud (msnm)
Papantla	Rancho 20 Soles	-97.31	20.43	203
	Solteros de Juan Rosas	-97.34	20.34	176
Gutiérrez Zamora	Paso de Barriles	-97.14	20.46	29

msnm: metros sobre el nivel del mar.

### Material vegetal

Durante los meses de abril y mayo se polinizaron de manera manual aproximadamente 60 flores por sitio en 2018 y 2019. La cosecha de frutos se realizó 28 y 32 semanas posteriores a la polinización para el ciclo 2018, y a las 30 y 32 semanas para el ciclo 2019. El material obtenido en ambos ciclos se separó en dos grupos, la mitad de frutos verdes se procesaron en fresco. Los frutos restantes colectados en 2018 se trasladaron al Rancho Santa Beatriz donde se sometieron a un beneficiado tradicional de 16 semanas, mientras que los frutos colectados en 2019 fueron beneficiados por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez del ejido Primero de Mayo, Veracruz. De acuerdo con el proceso descrito por Xochipa-Morante (2015), el proceso de beneficiado consistió en escaldar los frutos en agua a 75-80°C durante 8 a 10 segundos.



Posteriormente, las vainas se colocaron en una caja de madera (encajonado) donde conservan el calor y se favorecen las reacciones enzimáticas que dan pie al desarrollo de los compuestos aromáticos. Se procedió al secado al sol de los frutos en lapsos de 30 minutos a 2 horas, dependiendo de las condiciones del clima, para luego encajonar nuevamente

### **Procesamiento de material vegetal**

*Frutos verdes:* los frutos maduros se cortaron en rodajas con un grosor aproximado de 2 mm y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente los frutos se deshidrataron en una liofilizadora (Labconco® Cat. 7400040 FreeZone) durante 8 h bajo las siguientes condiciones: temperatura del colector -80 °C, presión de vacío 0.2 psi. Una vez deshidratados, los frutos se molieron en un molino de carga (Krupps GX4100) hasta obtener una molienda uniforme. Los frutos molidos se tamizaron para homogeneizar el tamaño de partícula y se almacenaron a 5 °C hasta el momento del análisis.

*Frutos beneficiados:* los frutos se congelaron a -20 °C y se molieron en un procesador de alimentos marca Nutribullet® Serie 600 hasta obtener una molienda uniforme. Los frutos molidos se almacenaron a 5 °C hasta el momento del análisis.

### **Evaluación de variables físicas**

Las variables físicas y de color evaluadas en los frutos beneficiados se indican en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.2. Variables físicas y parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia*.

Código	Variable	Unidades
Peso	Peso	g
Long	Longitud	cm
Anc	Ancho	cm
Gros	Grosor	cm
L*	Luminosidad	Adimensional
a*	a*	Adimensional
b*	b*	Adimensional
C*	Croma	Adimensional
h*	Hue	Grados
IC	Índice de color	Adimensional

La evaluación de las dimensiones y características de color de los frutos se realizó como sigue:

*Peso:* se registró para cada fruto en una balanza analítica marca A&D GR-202.

*Longitud, grosor y ancho:* se midieron a partir de un vernier digital marca Mitotuyo®.

*Parámetros de color:* se evaluaron con un colorímetro ColorFlex Hunter Lab® realizando dos repeticiones por fruto. A partir de los parámetros L\*, a\* y b\* (L\*: Luminosidad, a\*: posición entre rojo y verde, b\*= posición entre amarillo y azul) se estimaron los valores de Cromo (C\*), Hue (h\*) e índice de color (IC) de acuerdo con las Ecuaciones 5, 6 y 74.

$$Croma = (a^*^2 + b^*^2)^{1/2} \quad (Ecuación 5)$$

$$Hue = \arctan(b^*/a^*) \quad (Ecuación 6)$$

$$\text{Índice de color} = \frac{(a^*)(1000)}{(L^*)(b^*)} \quad (Ecuación 7)$$

### Cuantificación de glucovainillina y compuestos aromáticos por cromatografía de líquidos (HPLC)

Para evaluar las características del perfil químico de los frutos de vainilla, se realizó la cuantificación de algunos de los principales compuestos aromáticos reportados en literatura y algunos de los precursores en la ruta biosintética de la vainillina, así como algunos índices para establecer la relación entre los compuestos minoritarios (ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzaldehído) y el compuesto mayoritario (vainillina) (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Metabolitos cuantificados en frutos de vainilla.

Clave	Metabolito	Unidad
AVan	Alcohol vanílico	ppm
Dihidro	3,4-Dihidroxibenzaldehído	ppm
GluVan	Glucovainillina	ppm
C1	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	ppm
C2	Ácido vanílico	ppm
C3	<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído	ppm
C4	Vainillina	ppm
C1/C4	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico/Vainillina	Adimensional
C2/C4	Ácido vanílico/ Vainillina	Adimensional
C3/C4	<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído / Vainillina	Adimensional
(C1+C2)/C4	(Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico + Ácido vanílico) / Vainillina	Adimensional
ΣCM	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico + Ácido vanílico + <i>p</i> -Hidroxibenzaldehído	Adimensional
ΣCM/C4	(Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico + Ácido vanílico + <i>p</i> -Hidroxibenzaldehído) / Vainillina	%
GluVa/C4	Glucovainillina/Vainillina	Adimensional

La cuantificación de estos metabolitos se realizó mediante cromatografía de líquidos (HPLC), la cual se indica a continuación:

- a) Frutos verdes: la extracción se realizó con base en la metodología propuesta por Brillouet y Odoux (2010) con las siguientes modificaciones: se pesaron 50 mg de tejido y se adicionaron 3 mL de metanol grado HPLC. Las muestras se agitaron durante 1 h en una parrilla eléctrica, posteriormente se centrifugaron a 2350 g durante 10 min, y finalmente se filtraron a través de un acrodisco de poro 0.45  $\mu\text{m}$ .
- b) Frutos beneficiados: la extracción de metabolitos se realizó mediante la metodología propuesta por Cicchetti y Chaintreau (2009). Se pesaron 50 mg de tejido en viales de vidrio y se adicionaron 18 mL de etanol acuoso (1:1). Las muestras se agitaron manualmente durante 10 segundos para luego agitar en una parrilla eléctrica durante 30 min y macerar por 24 h en condiciones de refrigeración. Luego del reposo las muestras se agitaron durante 5 min, se tomó 1 mL de muestra y se filtró en acrodisco de poro 0.45  $\mu\text{m}$ .

Los extractos de frutos verdes y beneficiados se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer bajo las siguientes condiciones: columna Synchronis C18 5 $\mu$  250 x 4.6 mm Thermo Scientific, flujo 1 mL min<sup>-1</sup>, fase móvil isocrónica e isotérmica (20 % metanol- 80 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10<sup>-2</sup> M, 30 °C), metanol acuoso grado HPLC (1:1), presión 1830 psi, tiempo de corrida 35 min, volumen de inyección 10  $\mu\text{L}$ , lectura a 254 nm.

### **Análisis estadísticos**

El análisis estadístico de las características físicas y aromáticas de los frutos se realizó con el paquete estadístico SAS (Versión 9.0). También se realizó una prueba de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ), análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados (AC).

## **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Características físicas y de color en frutos verdes y beneficiados de vainilla**

El análisis de varianza para las variables físicas y de color evaluadas en frutos verdes del ciclo 2018 muestra que el coeficiente de variación tiene un rango de 0.5 a 14 %. Variables como peso (13.99 %), longitud (11.59 %) e índice de color (12.04 %) tuvieron la mayor variación; mientras que el parámetro de color h\* tuvo el coeficiente de variación más bajo (0.52 %).

Las diferencias estadísticas altamente significativas se encontraron entre sitios de colecta. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticas para los parámetros de color b\*, C\*, h\* e IC. En el ciclo 2019 las variables con mayor coeficiente de variación fueron peso (13.66 %), a\* (15.37 %), b\* (12.02 %), C\* (12.72 %) e IC (14.19 %). Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre sitios en las variables L\* y C\*, mientras que a\* y h\* e IC mostraron diferencias estadísticas por estado de madurez (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4. Medias y coeficientes de variación de características físicas y de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

	Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios			
				Sitio	Madurez	Error	
<b>FRUTOS VERDES</b>	<b>CICLO 2018</b>	Peso (g)	13.01	14.00	80.9994***	1.9522ns	3.3155
		Longitud (cm)	17.56	11.60	5.3363ns	4.0080ns	4.1433
		Ancho (cm)	1.17	9.87	0.3629***	0.0005ns	0.0133
		Grosor (cm)	0.98	9.86	0.2007***	0.0001ns	0.0094
		L*	34.05	9.94	128.6474**	6.0025ns	11.4589
		a*	-5.39	9.56	1.8497*	0.7812ns	0.2654
		b*	21.48	8.86	200.6440***	23.6787*	3.6195
		Croma (C*)	22.16	8.51	198.0855***	20.3172*	3.5575
		Hue (h*)(grados)	284.28	0.52	32.5617**	25.7740**	2.1707
	Índice de color (IC)	-7.52	12.04	29.3336***	4.3631*	0.8205	
	<b>CICLO 2019</b>	Peso (g)	12.38	13.66	6.1697ns	0.0631ns	2.8583
		Longitud (cm)	18.75	11.61	11.8422ns	13.2817ns	4.7380
		Ancho (cm)	1.20	9.60	0.0330ns	0.0103ns	0.0132
		Grosor (cm)	0.96	9.09	0.0113ns	0.0011ns	0.0076
		L*	37.74	8.59	63.0420**	14.9653ns	10.5082
		a*	-3.33	15.37	0.6107ns	12.7978***	0.2612
		b*	16.59	12.02	7.2006ns	0.1920ns	3.9757
		Croma (C*)	17.12	12.72	19.2190*	3.1507ns	7.7390
Hue (h*)(grados)		281.41	1.08	3.5134ns	98.9132**	9.2964	
Índice de color (IC)	-5.18	14.19	1.3875ns	31.3897***	0.5401		
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>	<b>CICLO 2018</b>	Peso (g)	2.97	18.80	4.1147**	0.7384ns	0.3114
		Longitud (cm)	17.77	11.16	0.0038ns	14.2964ns	3.9257
		Ancho (cm)	0.64	11.88	0.1101***	0.0637**	0.0057
		Grosor (cm)	0.32	12.27	0.0220**	4.51E-5ns	0.0016
		L*	19.20	8.43	0.6401ns	0.4674ns	2.6237
		a*	3.64	14.30	0.0055ns	5.3241***	0.2709
		b*	4.83	12.94	0.0620ns	9.8724***	0.3909
		Croma (C*)	6.05	13.31	0.0208ns	15.1758***	0.6476
		Hue (h*)(grados)	53.09	4.47	3.8225ns	1.3830ns	5.6351
	Índice de color (IC)	39.37	9.67	2.7649ns	0.0670ns	14.4987	
	<b>CICLO 2019</b>	Peso (g)	2.06	11.63	2.2215***	0.1102ns	0.0573
		Longitud (cm)	17.92	8.77	32.5605***	9.5005*	2.4708
		Ancho (cm)	0.61	10.55	0.0109ns	0.0738***	0.0041
		Grosor (cm)	0.24	10.90	0.0146***	0.0006ns	0.0007
		L*	18.59	10.04	0.9275ns	27.6843**	3.4824
		a*	2.47	15.66	2.3114***	2.7872***	0.1496
		b*	3.41	13.29	1.7214**	0.3000ns	0.2050
		Croma (C*)	4.30	14.59	4.5550***	0.2880ns	0.3925
Hue (h*)(grados)		54.64	11.20	30.2601ns	399.8015*	37.4713	
Índice de color (IC)	39.97	9.51	64.1383*	499.9938***	14.4355		

\*\*\*P<0.0001, \*\*P<0.001

En los frutos beneficiados del ciclo 2018 el coeficiente de variación tuvo un rango de 4-19 %. La variable peso tuvo el mayor coeficiente de variación (18.80 %) y h\* (4.47 %) fue la variable con menor variación. Las diferencias estadísticas significativas entre sitios de colecta sólo se encontraron en las variables peso, ancho y grosor. Sin embargo, entre estados de madurez las diferencias estadísticas se encontraron en las variables ancho, a\*, b\* y C\*. Las variables evaluadas en el ciclo 2019 tuvieron coeficientes que oscilan entre 8-16 %. Las variables con mayor variación fueron los parámetros de color a\*(15.66 %), b\* (13.29 %), y C\* (14.59 %).

A diferencia del ciclo 2018, las variables evaluadas en colectas del ciclo 2019 tuvieron mayor diferencia estadística tanto entre sitios como entre estados de madurez (Cuadro 4.4). Estos resultados podrían asociarse a la condición microclimática en los vainillales, ya que durante el ciclo 2019 se registraron valores más altos de radiación fotosintéticamente activa (RFA) respecto al ciclo 2018 (véase Figura 2.4 del Capítulo II de esta tesis). Los pigmentos, como la clorofila en los frutos verdes, se estimulan ante una mayor exposición a la luz para brindar protección a los tejidos o realizar la fotosíntesis. Por lo que, a pesar de degradarse por efecto de la madurez de los frutos, se encontraron en mayor cantidad para aportar tonos más oscuros y verdes.

En el Cuadro 4.5 se muestra la prueba de medias para las características físicas de frutos verdes y beneficiados. Para los frutos verdes colectados en el ciclo de cultivo 2018 del sistema en malla sombra con tutores inertes (Barriles) sólo se encontraron diferencias estadísticas en el peso de los frutos, donde el mayor peso se registró en los frutos con 28 semanas de madurez. Mientras que en las colectas cultivadas en acahual (20 Soles) los frutos de mayor peso fueron los de 32 semanas de madurez. En el ciclo de cultivo 2019 las diferencias estadísticas entre estados de madurez de las colectas cultivadas en malla sombra con tutor inerte (Barriles) se observaron en el peso y longitud de los frutos de 32 semanas, con respecto a los colectados a las 32 semanas.

Las colectas en acahual (20 Soles) únicamente tuvieron diferencias estadísticas en el peso de los frutos de 30 semanas; mientras que en el sistema malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) no se encontraron diferencias en peso y tamaño de los frutos entre las fechas de corte. Para el caso de los frutos beneficiados del ciclo 2018, se encontraron diferencias estadísticas en el peso, la longitud y el grosor de los frutos de 30 semanas con respecto a los de 32 semanas de madurez; mientras que en las colectas de 20 Soles no se encontraron diferencias estadísticas.

Para el ciclo de cultivo 2019 las colectas en malla sombra con tutor inerte (Barriles) mostraron diferencias en la longitud y grosor de los frutos, ya que los cosechados a las 32 semanas mostraron valores más altos en estas variables. Así mismo, las diferencias se dieron en la anchura de los frutos de 30 semanas. Por su parte, las colectas en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) mostraron diferencias estadísticas en el peso de los frutos, donde los frutos de 30 semanas de madurez tuvieron el mayor peso.

Aunque no hay parámetros tan detallados de calidad física para los frutos verdes, uno de los criterios más utilizados por el productor es el índice de cosecha, el cual determinan a partir del cambio en la coloración en el ápice del fruto, lo que ocurre entre ocho y nueve meses posteriores a la polinización (Hernández-Hernández 2013). Mientras que la Norma Oficial Mexicana NOM-182-SCFI-2011 indica que la calidad física de los frutos beneficiados debe considerar una longitud superior a los 15 cm, sin dehiscencia apical ni muestras de pudrición. La Norma Mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009 clasifica los frutos beneficiados en categorías extra, categoría I, II y III con base en la longitud, concentración de vainilla y contenido de humedad.

Bajo el criterio de longitud del fruto las colectas evaluadas en el ciclo 2018 se encontraron en la categoría I que indica un tamaño superior a los 17.5 cm. En este caso los frutos en malla sombra con tutor inerte (Barriles) tuvieron mayor longitud que los cultivados en acahual (20 Soles). No obstante, en el ciclo 2019 se encontraron importantes diferencias en la clasificación ya que los frutos cultivados en malla sombra con tutor inerte (Barriles) se encontraron principalmente en la categoría II ( $\geq 15$  cm). Mientras que los frutos de acahual (20 Soles) y malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) se clasificaron en la categoría I ya que además de tener mayor longitud también tuvieron mayor grosor. Lo que permite señalar de acuerdo con los resultados de este trabajo, se pueden obtener frutos de vainilla con diferentes calidades dependiendo del sistema de manejo en que se cultiven.

Cuadro 4 5. Valores medios por sitio y estado de madurez de las características físicas evaluadas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en la región Totonacapan, México.

	Madurez (Semanas)	Barriles				20 Soles				Solteros de Juan Rosas			
		Peso	Longitud	Ancho	Grosor	Peso	Longitud	Ancho	Grosor	Peso	Longitud	Ancho	Grosor
FRUTOS VERDES	<b>Ciclo 2018</b>												
	28	15.58a	17.77a	1.28a	1.07a	10.76b	17.91a	1.04a	0.89a	ne	ne	ne	ne
	32	13.03b	16.48a	1.14a	1.03a	12.41a	17.93a	1.10a	0.93a	ne	ne	ne	ne
	DMS	1.47	2.13	0.14	0.12	1.31	1.67	0.07	0.06				
	<b>Ciclo 2019</b>												
	30	10.66b	16.88b	1.18a	0.97a	13.79a	20.02a	1.19a	0.95a	12.76a	18.25a	1.25a	0.98a
	32	13.10a	19.56a	1.18a	0.95a	10.91b	19.03a	1.11a	0.92a	12.74a	19.24a	1.25a	1.01a
	DMS	1.14	1.96	0.09	0.07	1.68	2.50	0.15	0.12	1.18	2.09	0.12	0.09
	FRUTOS BENEFICIADOS	<b>Ciclo 2018</b>											
28		3.63a	18.85a	0.75a	0.35a	2.80a	17.94a	0.63a	0.31a	ne	ne	ne	ne
32		3.07b	17.02b	0.65b	0.34a	2.78a	17.53a	0.58a	0.31a	ne	ne	ne	ne
DMS		0.35	1.53	0.06	0.04	0.34	1.21	0.05	0.02				
<b>Ciclo 2019</b>													
30		1.64a	15.95b	0.61a	0.20b	2.52a	19.37a	0.64a	0.26a	2.11a	17.43a	0.66a	0.24a
32		1.82a	17.77a	0.53b	0.22a	2.30b	19.62a	0.59a	0.29a	1.77b	18.17a	0.53b	0.21a
DMS		0.23	1.47	0.08	0.02	0.21	2.29	0.07	0.03	0.34	1.65	0.08	0.04

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha=0.05$ ). DMS: Diferencia mínima significativa; ne: No evaluado

En el Cuadro 4.6 se muestra la prueba de medias de los parámetros de color en frutos verdes y beneficiados. De acuerdo con esto, los frutos verdes cultivados en malla sombra con tutor inerte (Barriles) presentaron durante 2018 diferencias estadísticas en las variables  $b^*$  y  $C^*$ , ya que los valores más altos se observaron en los frutos con 32 semanas de madurez. Lo que indicó que esta colecta tuvo los frutos con coloraciones más amarillentas, como resultado de una mayor madurez en el que se degradan los pigmentos fotosintéticos. En las colectas de acahual (20 Soles) se observó mayor variación, ya que las diferencias estadísticas se dieron en las variables  $a^*$ ,  $a^*/b^*$ ,  $h^*$  e IC al tener los valores más altos en frutos con 28 semanas de madurez. Lo anterior hace referencia a que los frutos con 28 semanas de madurez mostraron mayor cantidad de pigmentos respecto a los colectados a las 32 semanas, lo que les aportó coloraciones más verdes y oscuras. Las colectas del ciclo 2019 de malla sombra con tutor inerte (Barriles) y acahual (20 Soles) tuvieron diferencias estadísticas entre estados de madurez en las variables  $a^*$ ,  $a^*/b^*$ ,  $C^*$  e IC, las cuales tuvieron los valores más altos en frutos de 32 semanas. Por su parte, las colectas en malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) tuvieron diferencias estadísticas en las variables  $b^*$ ,  $a^*/b^*$ ,  $C^*$  e IC con los valores más altos en frutos de 32 semanas.

Por otra parte, las diferencias estadísticas se dieron en las variables  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$  en frutos beneficiados cultivados en malla sombra con tutor inerte (Barriles) durante el ciclo 2018. En contraste, no hubo diferencias estadísticas en las variables evaluadas en los frutos de acahual (20 Soles). La prueba de medias para el ciclo 2019 muestra que las colectas en malla sombra con tutor inerte (Barriles) tuvieron diferencias entre estados de madurez en todos los parámetros de color con excepción de las variables  $L^*$  y  $h^*$ . Mientras que las colectas de acahual (20 Soles) sólo tuvieron diferencias estadísticas en las variables  $a^*/b^*$  e índice de color. Por último, el sistema malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) fue el sitio con mayor variación entre estados de madurez, ya que todas las variables, a excepción de  $a^*$ , tuvieron diferencias. Los parámetros  $L^*$ ,  $a^*/b^*$  e índice de color mostró los valores más altos en los frutos de 30 semanas. Mientras que  $b^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$  tuvieron los valores más altos en los frutos de 32 semanas de madurez. Las diferencias entre los ciclos evaluados podrían asociarse con la cantidad de luz que recibieron los frutos durante su desarrollo, ya que se observaron importantes diferencias principalmente en la RFA (véase Figura 2.4 del Capítulo II de esta tesis) (Cuadro 4.6).



Cuadro 4.6. Valores medios por sitio y estado de madurez de los parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en la región Totonacapan, México.

Ciclo	Sitio	Madurez	L	a*	b*	a*/b*	C*	h*	IC
<b>FRUTOS VERDES</b>									
2018	Barriles	28	32.93a	-5.10a	18.33b	-0.28a	19.04b	285.64a	-8.46a
		32	31.42a	-5.26a	20.34a	-0.26a	21.02a	284.62a	-8.28a
		DMS	3.65	0.45	1.88	0.03	1.87	1.47	0.93
	20 Soles	28	35.87a	-5.96b	23.18a	-0.26b	23.94a	284.47a	-7.23b
		32	35.81a	-5.25a	24.25a	-0.22a	24.82a	282.28b	-6.10a
		DMS	2.71	0.44	1.72	0.02	1.69	1.28	0.72
2019	Barriles	30	35.66a	-3.94b	17.31a	-0.23b	19.12a	281.96a	-5.93b
		32	36.87a	-2.70a	16.32a	-0.17a	16.42b	280.01a	-4.51a
		DMS	3.38	0.45	2.24	0.03	2.35	2.48	0.60
	20 Soles	30	37.39a	-3.92b	15.97a	-0.25b	15.94a	283.32a	-6.07b
		32	37.82a	-2.63a	15.61a	-0.17a	15.88a	279.37b	-4.06a
		DMS	3.98	0.51	1.60	0.03	1.64	3.41	0.66
	Solteros de Juan Rosas	30	39.44a	-3.23a	16.29b	-0.20b	16.69b	282.23a	-5.29b
		32	41.19a	-2.85a	18.64a	-0.15a	18.91a	279.31a	-3.87a
		DMS	2.70	0.61	1.89	0.05	1.87	4.21	1.14
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>									
2018	Barriles	28	19.49a	2.86b	3.83b	0.75a	4.81b	52.86a	38.96a
		32	19.23a	4.14a	5.44a	0.76a	6.84a	52.70a	40.09a
		DMS	1.34	0.35	0.45	0.04	0.55	1.26	3.78
	20 Soles	28	19.18a	3.57a	4.73a	0.76a	5.91a	53.03a	39.52a
		32	19.07a	3.75a	5.03a	0.75a	6.27a	53.54a	38.83a
		DMS	0.98	0.28	0.33	0.04	0.44	1.62	2.03
2019	Barriles	30	19.45a	3.33a	3.89a	0.86a	5.29a	51.50a	45.20a
		32	17.88a	2.16b	3.40b	0.64b	4.11b	57.94a	35.98b
		DMS	2.09	0.46	0.39	0.14	0.66	7.03	5.01
	20 Soles	30	18.72a	2.39a	3.32a	0.73a	4.12a	54.62a	39.60a
		32	17.72a	2.23a	3.70a	0.60b	4.48a	59.70a	33.85b
		DMS	2.36	0.29	0.52	0.10	0.61	7.69	4.51
	Solteros de Juan Rosas	30	19.23a	2.18a	2.81b	0.78a	3.60b	51.51b	42.10a
		32	16.66b	2.05a	3.59a	0.57b	4.12a	59.12a	36.29b
		DMS	2.17	0.26	0.40	0.14	0.45	7.27	3.32

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha=0.05$ ). L\*: Luminosidad; C\*: Cromo; h\*: Hue; IC: Índice de color; DMS: Diferencia mínima significativa.

Las diferencias en la coloración en los frutos ocurren como resultado del proceso de madurez y puede ser un parámetro para determinar su calidad. Estas diferencias en el color de verde a tonos amarillentos son resultado de la degradación de clorofila y se presentan otros pigmentos como los catorenoides y xantofilas (Nagle *et al.* 2016), aunque también pueden ayudar a evaluar atributos internos como el dulzor (Khairunniza *et al.* 2014).

Sin embargo, como los cambios de color dependen de las condiciones de crecimiento y edad fisiológica del fruto no se considera un indicador de calidad o madurez de cosecha adecuado (Van Dyk *et al.* 2014). Aunque estos cambios se pueden dar como resultado del proceso natural de madurez de los frutos, las diferencias más evidentes se generan durante el beneficiado, ya que durante este tratamiento actúan diferentes enzimas que como la polifenoloxidasa y peroxidasa que le aportan los tonos marrón y café oscuro (Reyes-López *et al.* 2008; Van Dyk *et al.* 2010). La norma NOM-182-SCFI-2011 menciona que los frutos beneficiados deben tener un color café oscuro o negro, y debe tener brillo derivado de los aceites generados durante el beneficio.

De acuerdo con los parámetros de color evaluados los frutos verdes del ciclo 2019, tuvieron valores más altos de  $L^*$  y  $C^*$  que los registrados en 2018. Aunque se observaron valores más bajos en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h^*$  e IC. Esto indica que los frutos de 2018 tuvieron colores verde oscuro y opaco, con tendencia a tonalidades amarillentas más intensas que las colectas de 2019. En los frutos beneficiados del ciclo 2019 se encontraron valores considerablemente más bajos de luminosidad,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C$ ; así como un incremento en los valores de  $h^*$  con respecto de las colectas del ciclo 2018. Estas variaciones indican que los frutos del ciclo 2019 fueron más oscuros y opacos, además de tonos rojizos amarillentos. Aunque por una parte Van Dyk *et al.* (2014) mencionan que no se ha observado alguna correlación entre el color de los frutos verdes y el contenido de glucovainillina ya que los cambios en el color pueden asociarse en parte al ambiente, la madurez o el manejo. De la Cruz-Medina *et al.* (2009) consideran que hay una asociación del tamaño y la apariencia de los frutos beneficiados con el aroma, particularmente el contenido de vainillina. Motivo por el cual estos son algunos de los criterios utilizados para clasificar los frutos.

Los parámetros de color en los frutos cultivados en malla sombra con tutor inerte (Barriles) se muestran en la Figura 4.1, donde se observa no se mostraron cambios importantes entre fechas de madurez. Los cambios en  $L^*$  y  $C^*$  en los frutos indicó que los frutos de 32 semanas se tornaron más oscuros y opacos. Las diferencias en el parámetro  $a^*$  mostraron tonalidades verdes, mientras que los cambios en  $b^*$  indicaron colores más amarillentos. Referente al parámetro  $h^*$ , los frutos presentaron tonalidades verde-azules, además, el índice de color indica coloraciones que van del verde intenso al verde amarillento y la relación  $a^*/b^*$  expresa una disminución en el brillo del fruto debido a los valores de  $a^*$  que indican colores verdes.

De acuerdo con los parámetros  $L^*$  y  $C^*$ , se observó que los frutos beneficiados se tornaron más oscuras luego de ser sometidas al tratamiento de fermentación. Los valores de  $h^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en ambos estados de madurez señalan que los frutos mostraron tonos rojizos y amarillentos. Mientras que el índice de color (IC) indica tonos que van del naranja intenso al rojo profundo, y la relación  $a^*/b^*$  representa disminución del color verde e incremento en el tono amarillo y rojo propios del cambio de color durante el beneficio.

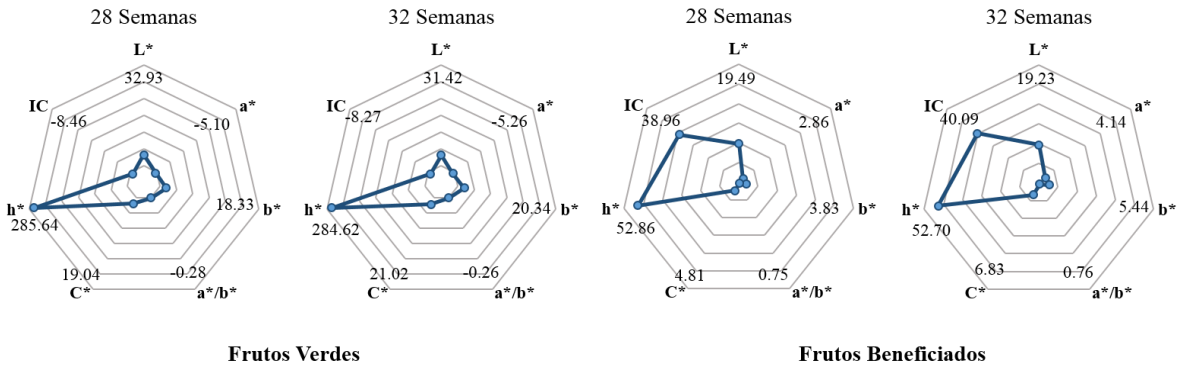


Figura 4.1. Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo de cultivo 2018 en el sitio de Barriles.

En las colectas del ciclo 2019 los frutos se caracterizaron por presentar un incremento en la luminosidad ( $L^*$ ) a las 32 semanas con respecto de aquellos de 30 semanas. A partir de las diferencias en el parámetro  $a^*$  y  $b^*$  se determinó que los frutos tuvieron tonalidades rojizas y azules al incrementar la madurez. Los cambios en los valores de  $C^*$  y  $h^*$  señalan que los frutos de 32 semanas tuvieron colores más opacos con tendencia a tonos más oscuros. Los valores en el índice de color y  $a^*/b^*$  mostraron que los frutos tuvieron colores más intensos del verde al amarillo. En frutos beneficiados se observó una disminución en la luminosidad en frutos de 32 semanas. Los cambios en los valores de  $a^*$  y  $b^*$  muestran que los frutos tuvieron tonos verdes y azules. Los valores de IC,  $C^*$  y  $h^*$  indicaron tonos rojizos oscuros (Figura 4.2)

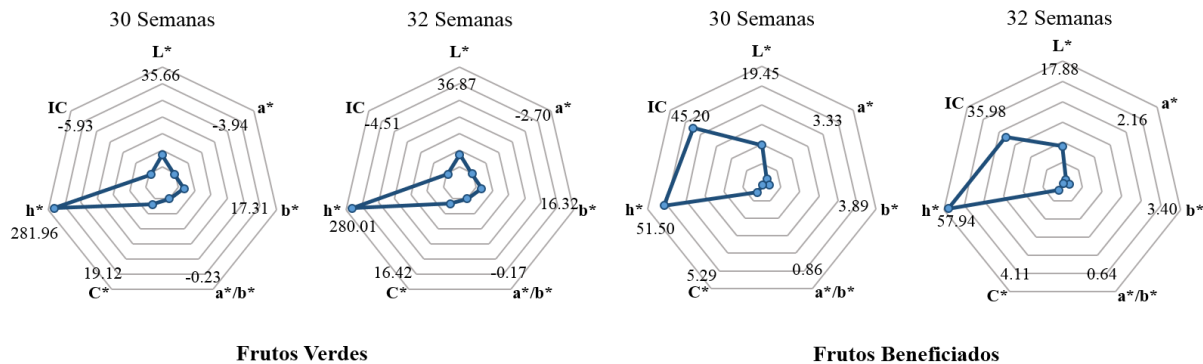


Figura 4.2. Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en el sitio de Barriles.

Los frutos verdes colectados en el ciclo 2018 no mostraron diferencia en la luminosidad. De acuerdo con los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  se determinó que los frutos tuvieron tonalidades más verdes y amarillentas al incrementar la madurez de los frutos. También se observó que a medida que incrementó la madurez del fruto las coloraciones se tornaron más verdes con tendencia al amarillo. Al incrementar la madurez en frutos beneficiados, las vainas mostraron colores oscuros, con tonos rojizos y amarillentos, así mismo tuvieron colores más brillantes (Figura 4.3).

Con respecto a las colectas del ciclo 2019, los frutos verdes tuvieron mayor luminosidad que los colectados en el ciclo 2018. A partir de las variables  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$  estas colectas tuvieron coloraciones rojizas y azules más oscuras y opacas. Sin embargo, el índice de color y la relación  $a^*b^*$  indican que los frutos tuvieron colores verdes más amarillentos en los frutos de mayor madurez, es decir, los de 32 semanas. Por otra parte, los frutos beneficiados de 2019 también tuvieron menor luminosidad. Estas colectas tuvieron colores más rojizos, amarillentos y opacos que las colectas de 2018 (Figura 4.4).

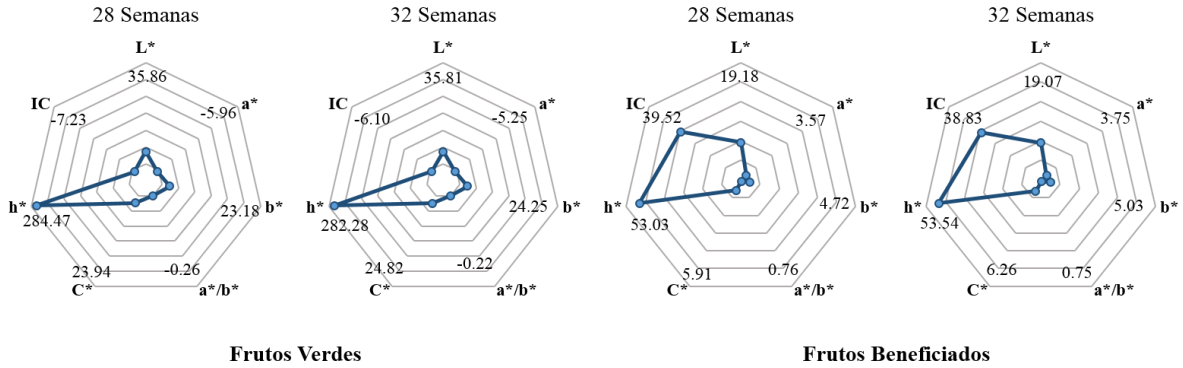


Figura 4.3. Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo de cultivo 2018 en el sitio de 20 Soles.

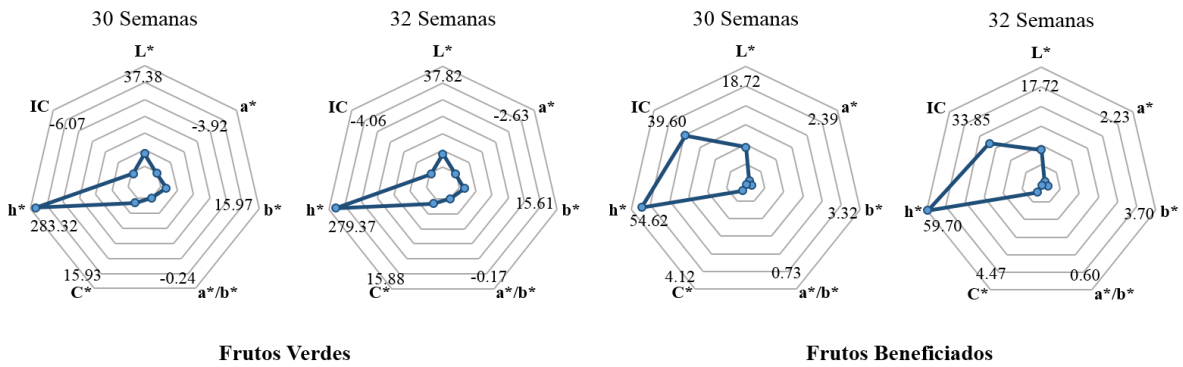


Figura 4.4. Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en el sitio de 20 Soles.

Las colectas de frutos verdes del sistema malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) fueron las de mayor luminosidad. Las diferencias entre estados de madurez indicaron que los frutos de mayor madurez tuvieron colores más rojizos, amarillos verdosos, más nítidos y oscuros. Mientras que los frutos beneficiados mostraron un importante cambio en la coloración, ya que los frutos con 32 semanas de madurez se caracterizaron por tener colores más oscuros, rojizos y tonos ligeramente amarillentos, así como tonos más nítidos respecto a las colectas de los otros dos sitios (Figura 4.5).

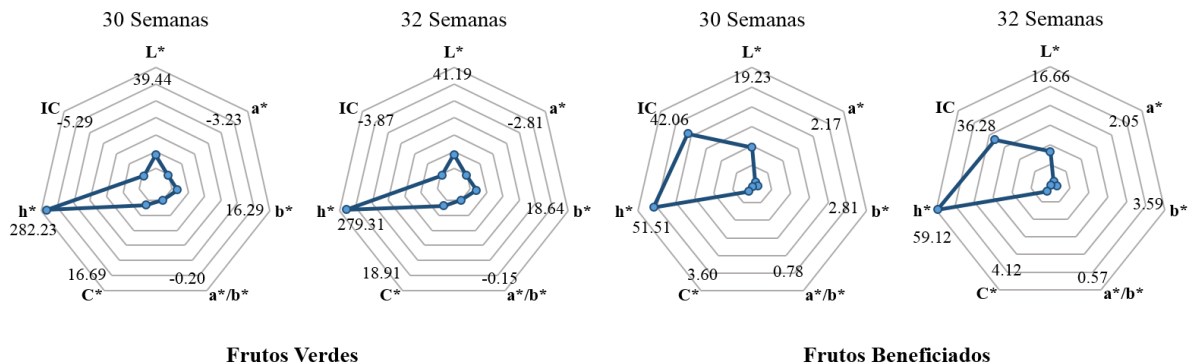


Figura 4.5. Parámetros de color evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en el sitio de Solteros de Juan Rosas.

### Componentes del aroma de frutos verdes y beneficiados de vainilla

#### Análisis estadísticos

De acuerdo con el análisis de varianza de las variables aromáticas evaluadas en frutos verdes del ciclo 2018 se reportaron coeficientes de variación entre 9-41 % (Cuadro 4.7A). Las variables con mayor variación fueron las proporciones C1/C4 (38.84 %), C2/C4 (40.69 %), (C1+C2)/C4 (39.84 %),  $\Sigma$ CM/C4 (29.65 %) y C4/Glucovainillina (28.75 %). A nivel de sitio sólo el ácido *p*-hidroxibenzoico, glucovainillina, glucovainillina/C4 y C4/glucovainillina mostraron significancia estadística. En contraste, entre estados de madurez la significancia estadística se observó sólo en el ácido vanílico y glucovainillina.

Al respecto, Ranadive (1992) señala que el ácido vanílico y vainillina puede ser más afectado por el origen geográfico o la madurez del fruto que el ácido *p*-hidroxibenzoico y *p*-hidroxibenzaldehído, por lo cual se observó mayor variación y significancia estadística en estos dos metabolitos. Lo que podría ser un indicador de las diferencias microclimáticas en los sitios evaluados. Mientras que la glucovainillina, se espera que incremente en función de la madurez al ser un indicador del rendimiento potencial de vainillina libre.

Respecto al ciclo 2019, el coeficiente de variación osciló entre 8-19 %. Las variables con mayor variación fueron las proporciones C1/C4 (16.97 %) y C3/C4 (18.01 %), en tanto que el ácido vanílico (8.55 %) y la suma de compuestos menores (C1+C2+C3) (9.94 %) tuvieron los coeficientes de variación más bajos. Todas las variables, con excepción del *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina, mostraron diferencias estadísticas significativas entre sitios.

Las diferencias estadísticas significativas entre estados de madurez se encontraron sólo en la concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico. En frutos beneficiados del ciclo 2018 se reportaron coeficientes de variación en un rango de 5 a 42 % (Cuadro 4.7B). Las variables con mayor coeficiente de variación fueron glucovainillina (42 %) y glucovainillina/C4 (25.28 %). No se reportaron diferencias estadísticas entre sitios de colecta. Sin embargo, entre estados de madurez las diferencias estadísticas se encontraron en ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina, C2/C4, (C1+C2)/C4,  $\Sigma$ CM/C4, glucovainillina y glucovainillina/C4.

Las variables evaluadas para el ciclo 2019 tuvieron coeficientes de variación entre 9-26 %. Los coeficientes más altos se encontraron en la relación C2/C4 (26.37 %), (C1+C2)/C4 (25.16 %),  $\Sigma$ CM/C4 (22.52 %) y glucovainillina (26.18 %). Con excepción de la vainillina y 3,4-dihidroxibenzaldehído, todas las variables mostraron diferencias estadísticas significativas entre sitios de colecta. Por otra parte, las diferencias estadísticas significativas entre estados de madurez se encontraron en ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vaníllico, *p*-hidroxibenzaldehído, C1/C4, C3/C4,  $\Sigma$ CM,  $\Sigma$ CM/C4 y Glucovainillina/C4

Cuadro 4.7. Medias y coeficientes de variación de las variables aromáticas evaluadas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos de cultivo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

	Variable	Media	Coeficientes de variación (%)	Cuadrados medios			
				Sitio	Madurez	Error	
FRUTOS VERDES	CICLO 2018	C1	187.38	19.82	12136.23*	132.13ns	1378.82
		C2	605.97	20.97	19324.59ns	3076.99ns	16142.54
		C3	1293.57	9.22	1.16ns	88286.10*	14210.64
		C4	5013.45	23.51	498756.46ns	480772.47ns	1389180.26
		C1/C4	0.04	38.84	2.02E-4ns	5.60E-6ns	2.39E-4
		C2/C4	0.13	40.69	1.20E-6ns	0.001ns	0.003
		C3/C4	0.27	24.28	0.0044ns	0.010ns	0.004
		(C1+C2)/C4	0.17	39.84	1.73E-4ns	0.002ns	0.005
		C1+C2+C3 (ΣCM)	2086.92	9.56	61553.84ns	116353.18ns	39759.04
	ΣCM/C4	0.44	29.65	0.0029ns	0.03ns	0.02	
	Glucovainillina	1167	9.47	2779346721**	1447957622*	122070502	
	Glucovainillina/C4	24.36	23.60	196.91*	0.40ns	33.05	
	C4/Glucovainillina	0.05	28.74	0.001*	0.0002ns	0.0002	
	CICLO 2019	C1	31.34	11.49	362.41***	220.44**	12.97
		C2	84.46	8.55	501.79**	11.37ns	52.16
		C3	378.75	13.85	9079.46ns	693.96ns	2751.19
		C4	3513.85	10.33	145319.59ns	2772.82ns	131713.71
		C1/C4	0.01	16.97	4.44E-5***	2.11E-5**	2.36E-6
C2/C4		0.02	13.32	6.76E-5*	4.1E-7ns	1.05E-5	
C3/C4		0.11	18.01	0.0015*	7.44E-5ns	0.0004	
(C1+C2)/C4		0.03	13.27	1.92E-4**	1.53E-5ns	1.96E-5	
C1+C2+C3		494.54	9.94	15124.88*	1430.22ns	2416.68	
CM/C4	0.14	14.90	0.0025*	0.0002ns	4.52E-4		
Glucovainillina	57620.89	11.70	273286019.00*	170439243.40ns	45463062		
Glucovainillina/C4	16.49	13.63	20.31*	13.85ns	5.06		
C4/Glucovainillina	0.06	13.23	3.34E-4*	2.65E-4ns	6.78E-5		
FRUTOS BENEFICIADOS	CICLO 2018	C1	268.80	10.69	801.85ns	5124.16*	825.35
		C2	2110.64	13.11	16123.22ns	43798.66ns	76523.09
		C3	605.63	18.42	55.56ns	122571.71*	12450.36
		C4	9011.90	18.79	99127.11ns	253.805.55*	2868461.23
		C1/C4	0.03	17.98	2.1E-7ns	7.01E-5ns	3.10E-5
		C2/C4	0.24	13.01	7.15E-5ns	0.0128**	0.001
		C3/C4	0.07	5.60	2.61E-6ns	2.2533E-6ns	1.42E-5
		(C1+C2)/C4	0.27	13.10	6.35E-5ns	0.02**	0.001
		C1+C2+C3	2985.06	12.43	21856.84ns	398119.43ns	137686.97
	CM/C4	0.34	10.55	4.03E-5ns	0.02**	0.001	
	Glucovainillina	289.40	42.00	46500.86ns	272645.16**	14777.16	
	Glucovainillina/C4	0.03	25.28	1.82E-4ns	0.002**	5.52E-5	
	C4/Glucovainillina	41.32	20.51	2.3468ns	2731.33**	71.81	
	Alcohol vainfillico	1978.21	12.19	150318.71ns	8446.49ns	58182.01	
	3,4-Dihidroxibenzaldehído	212.52	13.01	7.07ns	414.81ns	764.44	
	CICLO 2019	C1	209.94	9.02	5630.75**	37170.96***	359.27
		C2	2276.76	17.34	1677400.57**	1477008.04**	156529.56
		C3	388.91	15.74	31127.65**	5383.99**	3746.20
C4		10165.69	15.00	4401584.15ns	1300703.26ns	2326556.08	
C1/C4		0.02	17.92	6.87E-5*	3.72E-4**	1.46E-5	
C2/C4		0.23	26.37	0.02*	0.01ns	0.004	
C3/C4		0.04	9.01	1.37E-4**	8.31E-4***	1.19E-5	
(C1+C2)/C4		0.25	25.16	0.0251*	0.02ns	0.004	
C1+C2+C3		2875.64	13.89	1543769.92**	2690078**	159553.66	
CM/C4	0.29	22.52	0.02*	0.03*	0.004		
Glucovainillina	6360.84	26.18	18454915.63**	12199453.28ns	2772543.33		
Glucovainillina/C4	0.62	16.46	0.06*	0.05*	0.01		
C4/Glucovainillina	1.70	18.87	0.50*	0.41ns	0.10		
Alcohol vainfillico	842.15	15.04	75811.16*	17766.25ns	16036.01		
3,4-Dihidroxibenzaldehído	179.14	18.83	1603.65ns	675.38ns	1137.43		

\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$



La prueba de medias por sitio de colecta se muestra en el Cuadro 4.8. Las diferencias estadísticas en las variables evaluadas en los frutos verdes del ciclo 2018 se encontraron en el ácido *p*-hidroxibenzoico, glucovainillina y las proporciones Vainillina/Glucovainillina, Glucovainillina/Vainillina. Las colectas de malla sombra con tutor inerte (Barriles) tuvieron mayor concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico y la proporción Vainillina/Glucovainillina. Mientras que las colectas de acahual (20 Soles) tuvieron mayor concentración de glucovainillina y su proporción con vainillina (Glucovainillina/Vainillina). No se detectaron alcohol vanílico ni 3,4-Dihidroxibenzaldehído en los frutos verdes de los ciclos 2018 y 2019.

Para las colectas del ciclo 2019 no se encontraron diferencias estadísticas en *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina y la proporción C3/C4. En este caso las colectas de malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) tuvieron mayor acumulación de ácido *p*-hidroxibenzoico, C1/C4, (C1+C2)/C4, la suma de compuestos menores ( $\Sigma$ CM) y la proporción de compuestos menores con respecto a la vainillina ( $\Sigma$ CM/C4). Los vainillales establecidos en sistema malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) mostraron valores estadísticamente iguales en la concentración de ácido vanílico y se diferenciaron del sistema en acahual de 20 Soles.

Ranadive (1992) menciona que el ácido vanílico es uno de los principales metabolitos influenciados por el ambiente, por lo que los cultivos en malla presentaron una condición ambiental con mayor semejanza, por lo cual tuvieron concentraciones similares de este metabolito. Las colectas de malla sombra con tutor inerte (Barriles) y acahual (20 Soles) presentaron concentraciones estadísticamente diferentes, ya que los frutos en acahual tuvieron la mayor acumulación de glucovainillina y de la proporción de Glucovainillina/Vainillina. Dignum *et al.* (2001) indican que la calidad aromática final de los frutos depende no sólo de las condiciones adecuadas del beneficiado, sino también de la concentración de glucovainillina en los frutos verdes, por lo cual puede considerarse que los frutos cultivados en 20 Soles en los ciclos 2018 y 2019 tendrían las mejores características aromáticas.

Las variaciones en la concentración de los compuestos aromáticos entre sistemas de manejo o ciclos de cultivo de especies con reproducción clonal, como la vainilla, pueden ser la expresión de polimorfismos químicos influenciados por determinadas condiciones ambientales (Lebot y Levesque 1996) lo cual puede generar variaciones en la producción de precursores de los compuestos volátiles (Figueiredo *et al.* 2008).

Con base en lo anterior, los cultivos en sistema malla sombra tuvieron mayor semejanza en la composición química de los frutos verdes y beneficiados. Los frutos beneficiados colectados en el ciclo 2018 no mostraron diferencias estadísticas para ninguna de las variables evaluadas. En el ciclo 2019 no hubo diferencias estadísticas en vainillina y 3,4-Dihidroxibenzaldehído. Se encontró que las colectas de frutos en malla sombra (Solteros de Juan Rosas y Barriles) son estadísticamente iguales en la concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vanílico. Así como la proporción  $C2/C4$ ,  $(C1+C2)/C4$  y suma de compuestos menores ( $\Sigma CM$ ). Las colectas en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutor inerte (Barriles) fueron estadísticamente diferentes, en particular los frutos en acahual mostraron la mayor concentración de *p*-hidroxibenzaldehído y de la proporción  $C3/C4$ . También se encontró que los frutos del sistema malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) tuvo la mayor proporción de  $C1/C4$  y de  $\Sigma CM/C4$ .

La concentración de compuestos menores (ác. *p*-hidroxibenzoico, ác. vanílico y *p*-hidroxibenzaldehído) y vainillina mostraron alta variabilidad con respecto a los valores referidos para frutos beneficiados en la NOM-182-SCFI-2011 y Toth *et al.* (2011). Sin embargo, el ác. *p*-hidroxibenzoico y vainillina se encontraron en rangos más cercanos a los que reportan Toth *et al.* (2011). Se destacó que las colectas en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron perfiles similares al mostrar las concentraciones más altas de los compuestos aromáticos evaluados, mientras que podría considerarse que las colectas de acahual (20 Soles) tienen las mejores características aromáticas puesto que tienen las concentraciones más altas de vainillina y las menores proporciones de compuestos menores.

Con respecto a la influencia del sistema de manejo en el perfil aromático de los frutos, los estudios realizados por Xochipa-Morante (2015) e Ibarra-Cantún (2017) muestran las diferencias en la concentración de compuestos aromáticos de acuerdo con el sistema de manejo. Los resultados de estos estudios indican que los frutos cultivados en el sistema de acahual tienen la mayor acumulación de vainillina y menor proporción de compuestos menores; lo que le aporta mejores características aromáticas y podría ser un indicador de que la condición ambiental de este sistema de manejo favorece la síntesis de compuestos como vainillina (Ibarra-Cantún 2017). El estudio realizado por Gu *et al.* (2017) señala que hay importantes diferencias en el perfil metabólico de frutos verdes y beneficiados.

En este caso las principales diferencias entre tejidos se dieron en alcohol vanílico y 3,4-dihidroxibenzaldehído que estuvieron presentes únicamente en frutos beneficiados. Pero también se observaron diferencias en la concentración de los compuestos ya que todos los compuestos, con excepción de la glucovainillina incrementaron luego del beneficiado, lo que indica que estos compuestos se encuentran en los frutos verdes mayoritariamente como glucósidos.

El glucósido de mayor interés es la glucovainillina, ya que es el principal precursor de vainillina. La hidrólisis de este compuesto ocurre durante el beneficiado, sin embargo, la conversión del glucósido en vainillina libre no ocurre de manera completa ya que la  $\beta$ -glucosidasa sólo alcanza aproximadamente 40 % de su capacidad hidrolítica (Odoux *et al.* 2000). De manera que el rendimiento de vainillina luego de su conversión puede variar de 1.5-3 % (Odoux *et al.* 2000), cuando su potencial original oscila entre 5-6 % (Leong 1991). Motivo por el cual aún es posible encontrar glucovainillina en frutos beneficiados, lo cual fue demostrado por Odoux (2000) y confirmado por los resultados de este estudio.

Para explicar este comportamiento se plantearon diferentes hipótesis, una propone que ocurre una inadecuada o ineficiente interacción enzima-sustrato durante el beneficio, mientras que otra plantea la inactivación de enzimas durante los tratamientos térmicos o por el desarrollo de inhibidores enzimáticos (Odoux 2000). De acuerdo con literatura, la glucovainillina se reporta en concentraciones de 130 mM (Brillouet *et al.* 2010) a 338 mM (Odoux 2003), lo que equivale a 40, 880 y 94, 340 ppm, respectivamente. Dichas concentraciones se encuentran en los rangos de los valores detectados en este estudio, incluso concentraciones superiores en los frutos del ciclo 2018.

La variación aromática en frutos beneficiados también puede atribuirse al origen geográfico, edad fisiológica de los frutos y características del beneficiado, lugar de procedencia y tipo de cultivo (Ranadive 2011; Tavares-González 2018). Aunque hay varios criterios para evaluar la calidad de los frutos beneficiados, el aroma es uno de los principales criterios para determinar su calidad tomando como referencia la concentración de vainillina. Esto debido a que es el compuesto mayoritario y la mayoría de moléculas aromáticas están presentes en concentraciones menores a 10 ppm (Ranadive 2011).

Por ejemplo, la clasificación de frutos beneficiados de vainilla en Indonesia consiste en 6 categorías (gourmet, grado I, grado II, grado III y frutos con dehiscencia) con un rango de 1.6 % a  $\leq 0.2$  % de vainillina (Ranadive 2011). Mientras que la NMX-FF-074-SCFI-2009 indica que la vainilla mexicana se clasifica en cuatro categorías (extra, categoría I, categoría II y categoría III) con rangos de vainillina de 2.4-1.6 %. De acuerdo con esto, las colectas evaluadas en este estudio podrían clasificarse en la categoría III a pesar de tener una concentración menor a la indicada en la norma.

Se encontraron concentraciones altas de ácido vanílico y concentraciones bajas de vainillina con respecto a lo reportado en literatura. Lo que podría atribuirse a un proceso de dimerización de la vainillina durante el beneficiado, que favorece la disminución en la concentración de vainillina en forma libre (Gatfield *et al.* 2007). Mientras que las altas concentraciones de ácido vanílico podrían deberse al proceso de oxidación de la vainillina por efecto de la peroxidasa, lo que genera una degradación oxidativa de la vainillina (Pérez-Silva 2006; Odoux 2011). El almacenamiento puede ser un factor que afecte la acumulación de vainillina, ya que el estudio de Odoux (2000) señala que luego de almacenar los frutos por un periodo de seis meses se redujo la concentración de vainillina de 3.9 a 2.8 %.

En este estudio este pudo ser un factor de gran relevancia, puesto que los frutos se encontraron almacenados durante periodos prolongados hasta el momento de su análisis. Es importante destacar que las colectas del ciclo 2018, además de estar almacenadas durante varios meses, mostraron la aparición de hongos no identificados que pudieron degradar compuestos fenólicos (Peng *et al.* 2003).

Cuadro 4.8. Valores medios por sitio en partes por millón (ppm) de las variables aromáticas evaluadas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclo 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Sitio	C1	C2	C3	C4	C1/C4	C2/C4	C3/C4	(C1C2)/C4	CM	CM/C4	C5	C5/C4	C4/C5	C6	C7
<b>FRUTOS VERDES</b>															
<b>Ciclo 2018</b>															
Barriles	219.18a	646.10a	1293.26a	5217.30a	0.044a	0.130a	0.252a	0.174a	2158.50a	0.43a	101441b	20.31b	0.053a	nd	nd
20 Soles	155.58b	565.84a	1293.88a	4809.60a	0.036a	0.131a	0.290a	0.166a	2015.30a	0.46a	131879a	28.41a	0.036b	nd	nd
DMS	48.50	165.93	155.69	1539.30	0.020	0.069	0.086	0.089	260.41	0.17	14430	7.51	0.017		
<b>Ciclo 2019</b>															
Barriles	26.96b	89.97a	347.13a	3590.90a	0.008b	0.025ab	0.10a	0.033ab	463.58b	0.131b	51753b	14.50b	0.071a	nd	nd
20 Soles	26.74b	73.90b	366.92a	3615.90a	0.007b	0.021b	0.10a	0.028b	467.56b	0.131b	64996a	18.12a	0.056b	nd	nd
Solteros de Juan Rosas	40.31a	89.50a	422.19a	3334.70a	0.012a	0.027a	0.13a	0.039a	552.47a	0.167a	56113ab	16.87ab	0.060ab	nd	nd
DMS	5.44	10.91	79.26	548.41	0.0023	0.005	0.030	0.007	74.29	0.032	10189	3.40	0.012		
<b>FRUTOS BENEFICIADOS</b>															
<b>Ciclo 2018</b>															
Barriles	260.62a	2074.00a	607.78a	9102.80a	0.0318a	0.2453a	0.0668a	0.276a	2942.40a	0.343a	351.65a	0.033a	40.87a	2161.00a	213.29a
20 Soles	276.97a	2149.30a	603.48a	8921.00a	0.0311a	0.2405a	0.0677a	0.272a	3027.70a	0.339a	227.15a	0.026a	41.76a	1886.80a	211.75a
DMS	37.52	361.28	145.73	2211.90	0.0073	0.0413	0.0049	0.047	484.61	0.047	158.76	0.010	11.07	417.35	36.11
<b>Ciclo 2019</b>															
Barriles	214.47a	2410.90a	320.20b	9381.00a	0.023ab	0.26a	0.034b	0.286a	2945.5a	0.320ab	4838b	0.53b	1.99a	849.98ab	163.64a
20 Soles	177.34b	1693.90b	465.85a	11079.30a	0.018b	0.16b	0.043a	0.180b	2337.1b	0.223b	8278a	0.73a	1.41b	745.34b	177.55a
Solteros de Juan Rosas	238.11a	2725.50a	380.66ab	10036.80a	0.024a	0.27a	0.038ab	0.297a	3344.3a	0.335a	5968ab	0.60ab	1.71ab	1020.12a	196.22a
DMS	28.64	597.84	32.49	2304.90	0.006	0.09	0.005	0.097	603.59	0.100	2516.10	0.15	0.49	228.01	50.96
NOM-182-SCFI-2011	58-100	411-861	219-498	Mínimo 20,000											
Toth <i>et al.</i> (2011)	218-255	887-1,315	635-1549	9,296-22,757											

C1: Ác. *p*-Hidroxibenzoico; C2: Ác. Vanílicico; C3: *p*-Hidroxibenzaldehído; C4: Vainillina; C1/C4: Ác. *p*-Hidroxibenzoico/Vainillina; C2/C4: Ác. Vanílicico/Vainillina; C3/C4: *p*-Hidroxibenbenzaldehído/Vainillina; (C1C2)/C4: (Ác. *p*-Hidroxibenzoico + Ác. Vanílicico)/Vainillina; CM: (Ác. *p*-Hidroxibenzoico + Ác. Vanílicico + *p*-Hidroxibenzaldehído); CM/C4: (Ác. *p*-Hidroxibenzoico + Ác. Vanílicico + *p*-Hidroxibenzaldehído)/Vainillina; C5: Glucovainillina; C5/C4: Glucovainillina/Vainillina; C4/C5: Vainillina/Glucovainillina; C6: Alcohol vanílicico; C7: 3,4-Dihidroxibenzaldehído; nd: No detectado; DMS: Diferencia mínima significativa

Según se indica en la prueba de medias por estado de madurez (Cuadro 4.9), las colectas de frutos verdes del ciclo 2018 sólo tuvieron diferencias estadísticas en dos variables: en el *p*-hidroxibenzaldehído que se acumuló en mayor cantidad a las 28 semanas de madurez, y en la glucovainillina que presentó mayor acumulación del metabolito a las 32 semanas. En las colectas del ciclo 2019 las diferencias estadísticas se encontraron en el ácido *p*-hidroxibenzoico y su proporción respecto a la vainillina (C1/C4), ya que en ambos casos los valores más altos se reportaron a las 30 semanas de madurez.

En el caso de los frutos beneficiados del ciclo 2018 se encontraron diferencias estadísticas para la mayoría de variables. La mayor acumulación de ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina, glucovainillina y la proporción Glucovainillina/Vainillina se encontró en los frutos con mayor madurez (32 Semanas). Mientras que los frutos de 28 semanas se caracterizaron por tener una mayor proporción de las variables  $C2/C4$ ,  $(C1+C2)/C4$ ,  $\Sigma CM/C4$  y Vainillina/Glucovainillina. Por otro lado, las colectas del ciclo 2019 tuvieron mayor acumulación de compuestos menores (C1, C2, C3 y  $\Sigma CM$ ), y en las proporciones  $C1/C4$ ,  $C3/C4$ ,  $\Sigma CM$  y  $\Sigma CM/C4$ . Además, la mayor proporción de Glucovainillina/Vainillina se presentó en frutos con 32 semanas de madurez.

Cuadro 4.9. Valores medios por estado de madurez en partes por millón (ppm) de las variables aromáticas evaluadas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Madurez (Semanas)	C1	C2	C3	C4	C1/C4	C2/C4	C3/C4	C1C2/C4	ΣCM	ΣCM/C4	C5	C5/C4	C4/C5	C6	C7
<b>Frutos verdes</b>															
Ciclo 2018															
28	184.06a	621.98a	1379.34a	4813.3a	0.041a	0.141a	0.31a	0.18a	2185.40a	0.49a	105675b	24.17a	0.049a	nd	nd
32	190.70a	589.96a	1207.79b	5213.60a	0.039a	0.120a	0.24a	0.16a	1988.50a	0.40a	127644a	24.54a	0.041a	nd	nd
DMS	48.50	165.93	155.69	1539.3	0.020	0.069	0.09	0.09	260.41	0.17	14430	7.51	0.017		
Ciclo 2019															
30	34.84a	83.66a	384.96a	3501.40a	0.010a	0.024a	0.11a	0.034a	503.45a	0.146a	54544a	15.62a	0.066a	nd	nd
32	27.84b	85.25a	372.54a	3526.30a	0.008b	0.024a	0.107a	0.032a	485.62a	0.140a	60698a	17.37a	0.058a	nd	nd
DMS	3.64	7.30	53.03	366.94	0.002	0.003	0.020	0.005	49.70	0.022	6817.20	2.27	0.008		
<b>Frutos beneficiados</b>															
Ciclo 2018															
28	248.13b	2050.20a	504.56b	7559.90b	0.034a	0.276a	0.067a	0.309a	2802.90a	0.376a	138.67b	0.018b	56.40a	2042.70a	218.40a
32	289.46a	2171.10a	706.69a	10463.90a	0.028a	0.210b	0.068a	0.239b	3167.20a	0.306b	440.14a	0.041a	26.23b	1849.30a	206.64a
DMS	37.52	361.28	145.73	2211.90	0.007	0.041	0.005	0.047	484.61	0.047	158.76	0.010	11.07	417.35	36.11
Ciclo 2019															
30	255.41a	2563.20a	443.59a	9896.90a	0.026a	0.26a	0.045a	0.29a	3262.20a	0.33a	5537.60a	0.56b	1.85a	897.46a	185.26a
32	164.53b	1990.30b	334.22b	10434.50a	0.017b	0.21a	0.031b	0.22a	2489.00b	0.26b	7184.10a	0.67a	1.55a	759.18a	173.01a
DMS	19.16	400.01	61.88	1542.20	0.004	0.06	0.004	0.07	403.86	0.07	1683.50	0.10	0.33	146.90	34.10

C1: Ác. *p*-Hidroxibenzoico; C2: Ác. Vanílicico; C3: *p*-Hidroxibenzaldehído; C4: Vainillina; C1/C4: Ác. *p*-Hidroxibenzoico/Vainillina; C2/C4: Ác. Vanílicico/Vainillina; C3/C4: *p*-Hidroxibenbenaldehído/Vainillina; (C1C2)/C4: (Ác. *p*-Hidroxibenzoico + Ác. Vanílicico)/Vainillina; ΣCM: (Ác. *p*-Hidroxibenzoico + Ác. Vanílicico + *p*-Hidroxibenzaldehído); ΣCM/C4: (Ác. *p*-Hidroxibenzoico + Ác. Vanílicico + *p*-Hidroxibenzaldehído)/Vainillina; C5: Glucovainillina; C5/C4: Glucovainillina/Vainillina; C4/C5: Vainillina/Glucovainillina; C6: Alcohol vanílicico; C7: 3,4-Dihidroxibenzaldehído

La acumulación de compuestos aromáticos menores en los frutos verdes de los ciclos 2018 y 2019 se muestra en la Figura 4.6. En los frutos colectados en el ciclo 2018 se observó que la mayor acumulación de compuestos menores se dio a las 28 semanas de madurez. El 3,4-Dihidroxibenzaldehído sólo se detectó en las colectas del sistema malla sombra con tutor inerte (Barriles) en los frutos de menor madurez (28 Semanas). Así mismo, en las colectas de este sistema de manejo se observó un notable incremento en la acumulación del ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vaníllico de 28 a 32 semanas. Por su parte, las colectas de acahual (20 Soles) tuvieron un comportamiento diferente, ya que se dio una disminución de estos dos metabolitos aromáticos al aumentar la madurez de los frutos.

En el ciclo 2019 se observó que las colectas de malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) tienen una mayor acumulación de metabolitos en ambas fechas de corte. La tendencia de mayor acumulación de metabolitos en frutos de menor madurez sólo se observó en las colectas de malla sombra con tutor inerte (Barriles) y acahual (20 Soles), ya que fue evidente una mayor producción de *p*-hidroxibenzaldehído en los frutos de 32 semanas.

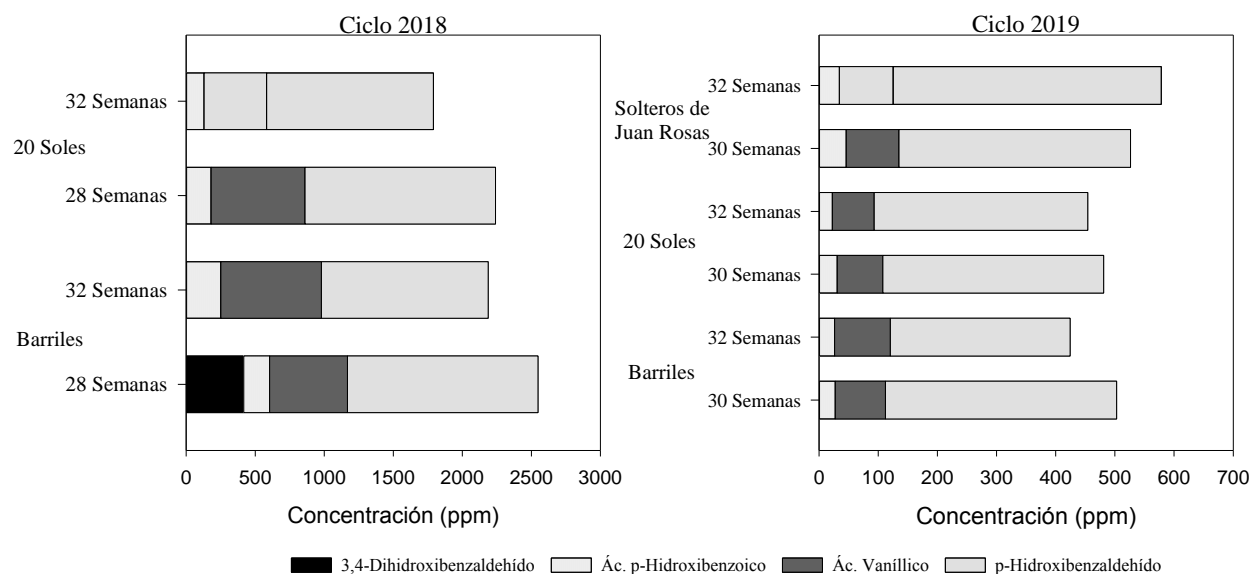


Figura 4.6. Concentración de compuestos menores en frutos verdes colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

En los frutos verdes de ambos ciclos de cultivo se observó un importante incremento en la acumulación de glucovainillina particularmente en el ciclo 2018, ya que los frutos colectados en el ciclo 2018 tuvieron aproximadamente el doble de concentración de este glucósido con



respecto a 2019. Palama *et al.* (2009) mencionan al respecto que las diferencias en la acumulación de este glucósido puede asociarse, además de factores fisiológicos como la madurez del fruto, a factores de tipo ambiental que promueven el metabolismo de esta molécula como la temperatura, el fotoperiodo, nivel de precipitación, ventilación y la cantidad de luz que recibe la planta.

A pesar de ser frutos verdes se encontró una importante concentración de vainillina libre, en especial en los frutos del ciclo 2018. Las colectas en acahual (20 Soles) mostraron una mayor concentración de vainillina y glucovainillina en ambos ciclos de cultivo, aunque también las colectas en malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) tuvieron concentraciones parecidas a las del sistema en acahual (20 Soles), en especial en los frutos de 32 semanas de madurez (Figura 4.7).

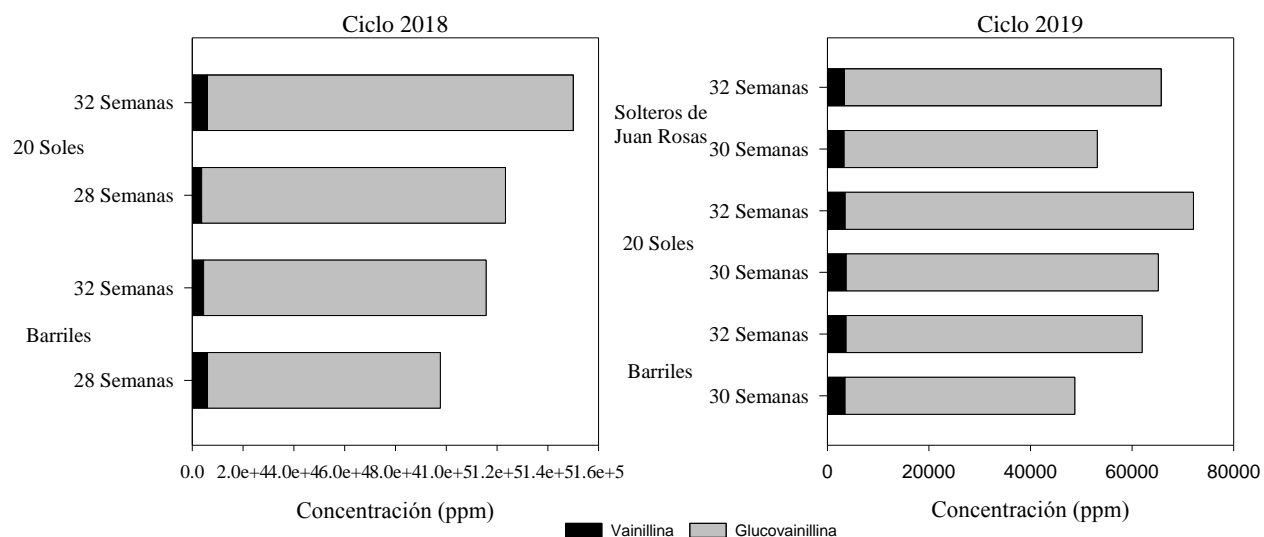


Figura 4.7. Concentración de vainillina y glucovainillina en frutos verdes colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

En los frutos beneficiados se observó una mayor diversidad de compuestos aromáticos (Figura 4.8). En el ciclo 2018 se observó una disminución en la acumulación de estos compuestos, la principal diferencia entre sitios y estados de madurez fue la presencia de alcohol vanílico puesto que no se detectó en los frutos con 32 semanas de madurez. Así mismo, la acumulación de este metabolito tuvo un comportamiento similar en ambos sitios de colecta. Los compuestos con mayor presencia en las colectas fueron el ácido vanílico y alcohol vanílico.

Las colectas de acahual (20 Soles) tuvieron una mayor acumulación de compuestos aromáticos, estas diferencias se dieron principalmente en el *p*-hidroxibenzaldehído y ácido vanílicico. La principal diferencia entre las colectas del ciclo 2019 se dio en la presencia de alcohol vanílico puesto que no se detectó en los frutos del sistema malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) con 32 semanas de madurez. Pero la colecta de 30 semanas tuvo la mayor concentración de este metabolito y mostró la mayor acumulación de compuestos aromáticos menores. La tendencia en las colectas fue la de disminuir en la acumulación de metabolitos entre frutos de 30 a 32 semanas. Los compuestos de mayor concentración en todas las colectas fueron alcohol vanílico y ácido vanílicico.

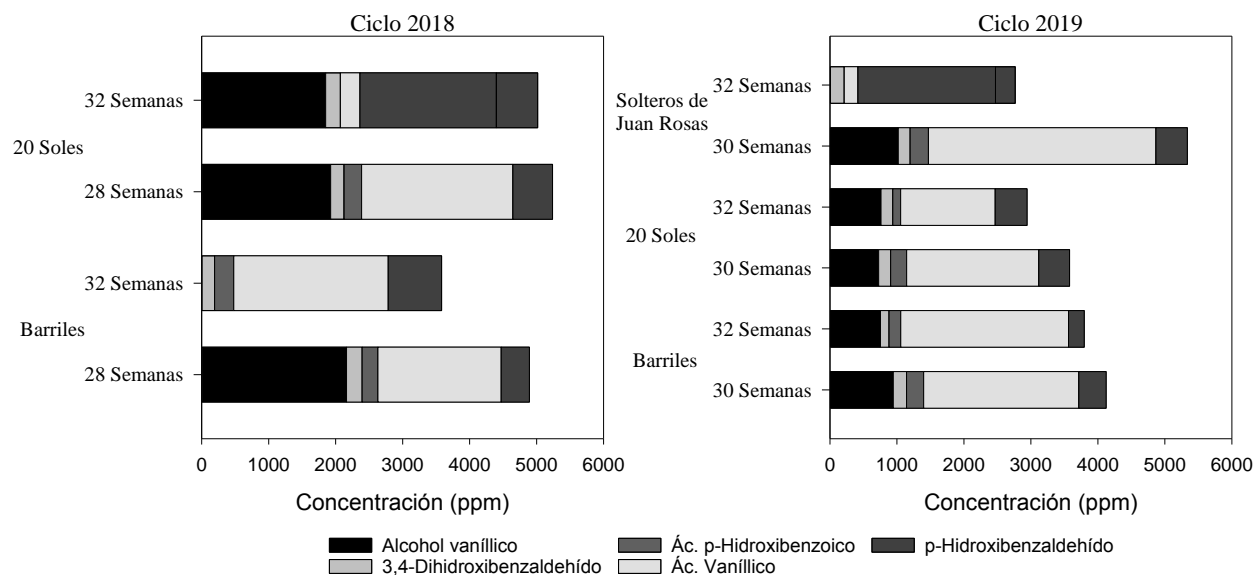


Figura 4.8. Concentración de compuestos menores en frutos beneficiados colectados durante los ciclos 2018 y 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

La acumulación de vainillina y glucovainillina en frutos beneficiados se muestra en la Figura 4.9. De acuerdo con esto, se observó un incremento en la concentración de vainillina de 28 a 32 semanas en el ciclo 2018. Los frutos cultivados en malla sombra con tutor inerte (Barriles) mostraron el mayor incremento entre estados de madurez, por lo que la colecta con 32 semanas de madurez tuvo la mayor concentración de vainillina. En las colectas del sistema acahual (20 Soles), el incremento en la concentración de este metabolito en frutos de 28 a 32 semanas no fue significativo. A pesar de ser frutos beneficiados se observó la presencia de glucovainillina, aunque en baja concentración.

Las colectas del ciclo 2019 tuvieron mayor concentración de vainillina que las del ciclo 2018. Los frutos de 20 Soles tuvieron la mayor acumulación de vainillina de las colectas evaluadas, al mostrar un evidente incremento en frutos de 28 a 32 semanas de madurez. Por su parte, los frutos de malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) no tuvieron diferencias significativas en la acumulación de este compuesto entre estados de madures. Con respecto a la glucovainillina, aún se observó una importante acumulación del glucósido en las diferentes colectas, especialmente en las colectas de acahual (20 Soles) lo que indica un considerable potencial para incrementar la concentración de vainillina libre.

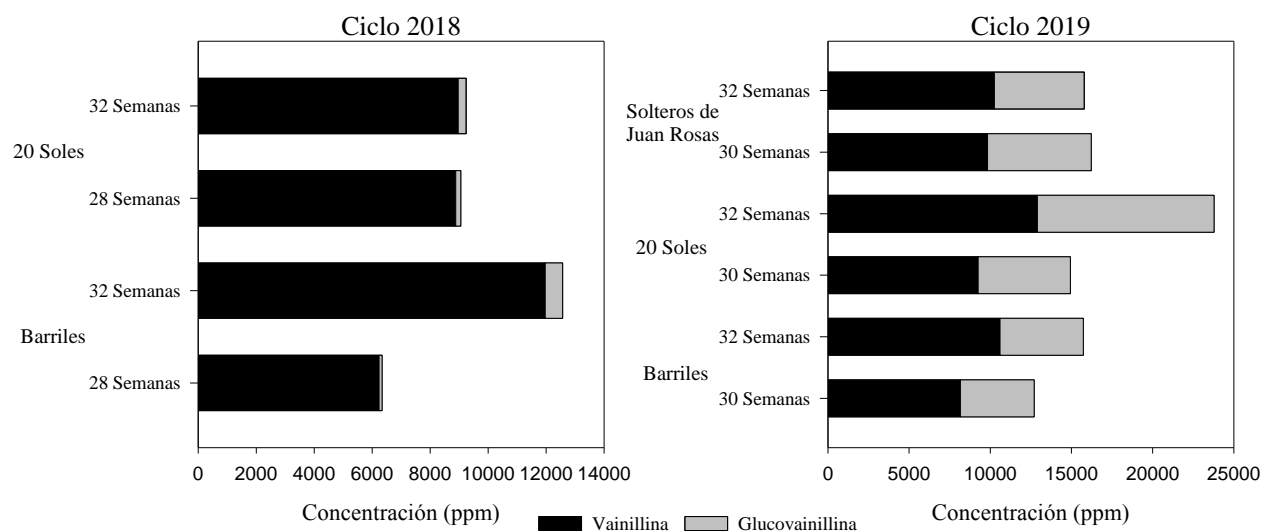


Figura 4.9. Concentración de vainillina y glucovainillina en frutos beneficiados colectados en tres sitios de la región Totonacapan, México durante los ciclos 2018 y 2019.

### Distribución de la variación de variables aromáticas

#### *Frutos verdes*

Con base en el análisis de componentes principales en frutos verdes de las 13 variables aromáticas se determinó que los dos primeros componentes explicaron 100 % de la variación total. El primer componente aportó 67.52 % de la variación y estuvo determinado por las variables ácido *p*-hidroxibenzoico, vainillina, la proporción C1/C4, la suma de compuestos menores ( $\Sigma$ CM) y su proporción con respecto a la vainillina ( $\Sigma$ CM/C4). El segundo componente aportó 32.48 % de la variación total y lo caracterizaron las variables ácido vanílico, glucovainillina y las proporciones Glucovainillina/C4 y C4/Glucovanillina (Cuadro 4.10).

Cuadro 4.10. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables aromáticas en las dos dimensiones de la caracterización de frutos verdes de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Variable	Componentes principales (CP)	
	CP1	CP2
Ác. <i>p</i> -Hidroxibenzoico (C1)	<b>0.333582</b>	0.074174
Ác. Vanílico (C2)	0.221652	<b>-0.367022</b>
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído (C3)	0.307623	0.200265
Vainillina (C4)	<b>-0.336266</b>	-0.041991
C1/C4	<b>0.333962</b>	0.070528
C2/C4	0.280812	-0.270011
C3/C4	0.31782	0.163851
(C1+C2)/C4	0.326211	-0.124949
$\Sigma$ CM (C1+C2+C3)	<b>0.330353</b>	0.099794
$\Sigma$ CM/C4	<b>0.331757</b>	0.089586
Glucovainillina	-0.119404	<b>0.455198</b>
Glucovainillina/C4	0.00301	<b>0.486649</b>
C4/Glucovainillina	-0.024795	<b>-0.485353</b>
<b>Valor propio</b>	<b>8.7778</b>	<b>4.2222</b>
<b>Proporción variación total</b>	<b>0.6752</b>	<b>0.3248</b>
<b>Variación acumulado</b>	<b>0.6752</b>	<b>1.0000</b>

Los valores marcados en negritas indican las variables que representan mayor influencia en cada componente principal

La distribución espacial de los dos componentes principales mostró la diferenciación de las tres colectas. Con base en el primer componente (CP1) se determinó que los frutos del sistema malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) se caracterizaron por tener la mayor concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico, la mayor proporción de C1/C4, compuestos menores ( $\Sigma$ CM) y  $\Sigma$ CM/C4, así como la menor concentración de vainillina. Las colectas de malla sombra con tutor inerte (Barriles) y acahual (20 Soles) mostraron semejanza en la concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico, ya que en ambos casos es menor que la reportada en los frutos de malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas).

Aunque estadísticamente no se observaron diferencias entre colectas, los sistemas malla sombra con tutor inerte (Barriles) y acahual (20 Soles) tuvieron mayor concentración de vainillina que los frutos de malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas). Además, presentaron la menor acumulación de compuestos aromáticos menores ( $\Sigma$ CM), así como la menor proporción de las relaciones C1/C4  $\Sigma$ CM/C4. De acuerdo con el segundo componente (CP2), los frutos de malla sombra con tutor inerte (Barriles) tiene una clara separación de las otras dos colectas.

Se diferencia del acahual (20 Soles) y malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) por tener la mayor concentración de ácido vanílico y mayor proporción de Vainillina/Glucovainillina. Así como la menor concentración de glucovainillina y su proporción con respecto a la vainillina. Por otra parte, los frutos de malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) tuvieron menor acumulación de ácido vanílico que el sistema en acahual (20 Soles), pero presentaron concentraciones estadísticamente similares de glucovainillina y también tuvieron proporciones similares de Glucovainillina/Vainillina y Vainillina/Glucovainillina (Figura 4.10).

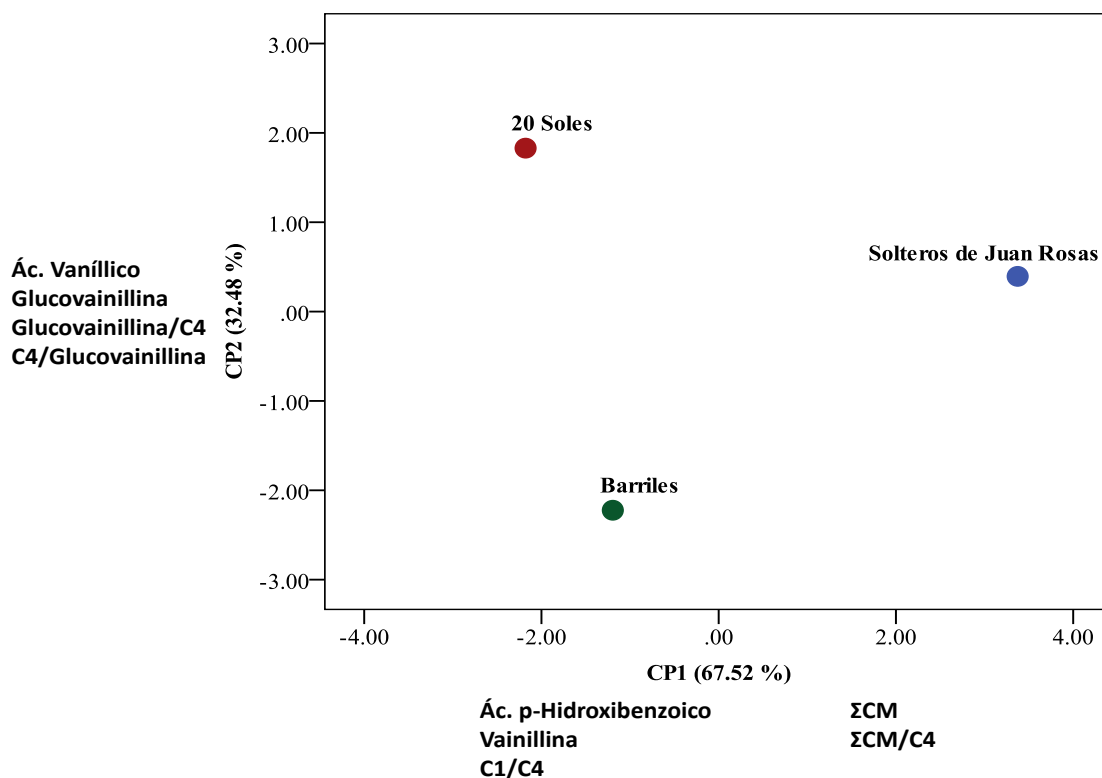


Figura 4.10. Dispersión de tres colectas de frutos verdes de *Vanilla planifolia* con base en los dos componentes principales del análisis de 13 variables aromáticas agrupadas por medias poblacionales.

En el análisis de conglomerados se observó que los sitios de colecta evaluadas fueron diferentes en el patrón de acumulación de metabolitos aromáticos. Las colectas de acahual (20 Soles) se caracterizaron por tener la mayor concentración de vainillina y glucovainillina, la mayor proporción Glucovainillina/Vainillina y valores intermedios de *p*-hidroxibenzaldehído y la proporción C3/C4.

Las colectas de malla sombra con tutor inerte (Barriles) tuvieron la mayor acumulación de ácido vanílico, alta proporción de Vainillina/Glucovainillina, menor concentración de glucovainillina y de la proporción Glucovainillina/Vainillina. También tuvo valores intermedios en las proporciones C2/C4, (C1+C2)/C4 y vainillina. Las colectas de malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) se distinguieron por presentar los frutos con mayor proporción de compuestos menores (C1, C1/4, CM, CM/C4, C3, C3/, C2, C2/, y (C1+C2)/C4), la menor concentración de vainillina y valores intermedios de glucovainillina y Glucovainillina/Vainillina (Figura 4.11).

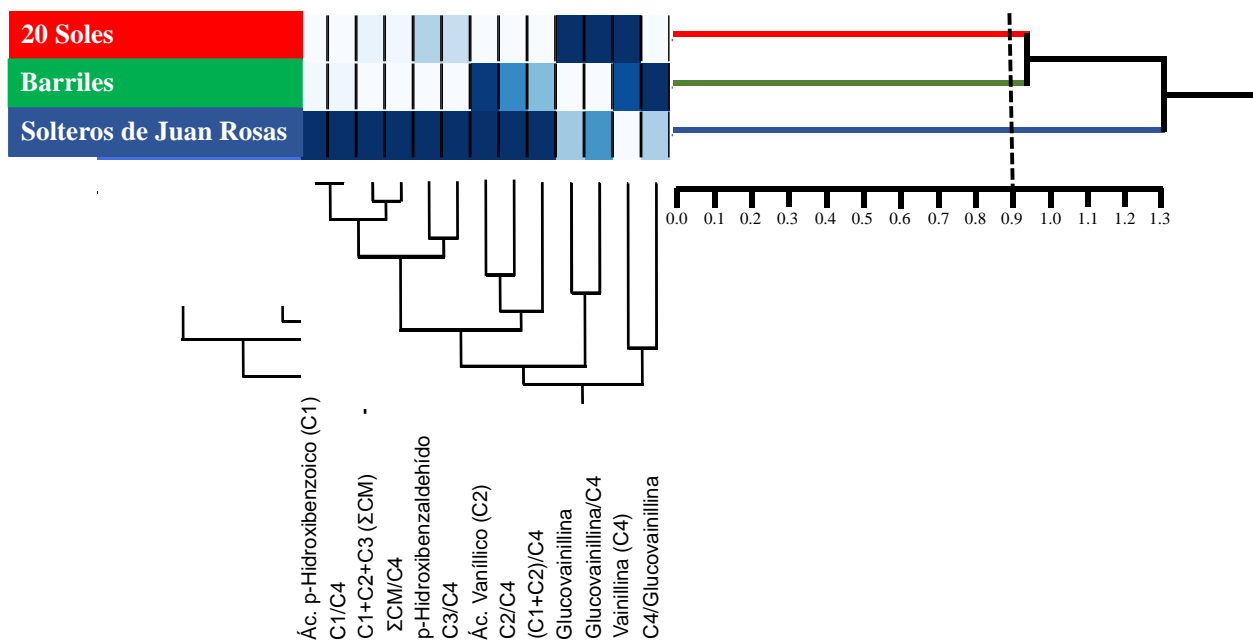


Figura 4.11. Dendrograma de tres colectas de frutos verdes de *Vanilla planifolia* basado en el promedio de 13 variables aromáticas colectados en el ciclo de cultivo 2019 agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

#### Frutos beneficiados

El análisis de componentes principales para las variables evaluadas en frutos beneficiados mostró que los dos primeros componentes explicaron el 100 % de la variación total. El primer componente (CP1) se definió por las proporciones C1/C4, C2/C4, (C1+C2)/C4 y  $\Sigma\text{CM}/\text{C4}$ , y explicó 81.32 % de la variación. El segundo componente (CP2) explicó 18.68 % de la variación y estuvo definido por el alcohol vanílico, 3,4-Dihidroxibenzaldehído y la proporción Vainillina/Glucovainillina (Cuadro 4.11).

Cuadro 4.11. Valores propios, proporción de la variación total y variación acumulada de las variables aromáticas en las dos dimensiones de la caracterización de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Variables	Componentes principales (CP)	
	CP1	CP2
Ác. <i>p</i> -Hidroxibenzoico (C1)	0.262192	0.240045
Ác. Vanílico (C2)	0.271833	0.187635
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído (C3)	-0.262761	0.237320
Vainillina (C4)	-0.266372	0.219096
C1/C4	<b>0.282044</b>	0.102890
C2/C4	<b>0.284843</b>	0.060652
C3/C4	-0.255409	0.270010
(C1+C2)/C4	<b>0.284733</b>	0.062861
$\Sigma$ CM (C1+C2+C3)	0.261283	0.244320
$\Sigma$ CM/C4	<b>0.283184</b>	0.088212
Glucovainillina	-0.272645	0.182432
Glucovainillina/C4	-0.271695	0.188501
C4/Glucovainillina	0.252272	<b>-0.282557</b>
Alcohol vanílico	0.223049	<b>0.374575</b>
3,4-Dihidroxibenzaldehído	0.019149	<b>0.596065</b>
<b>Valor propio</b>	<b>12.1980</b>	<b>2.8020</b>
<b>Proporción variación total</b>	<b>0.8132</b>	<b>0.1868</b>
<b>Variación acumulada</b>	<b>0.8132</b>	<b>1.0000</b>

Los valores marcados en negritas indican las variables que representan mayor influencia en cada componente principal

De acuerdo con el primer componente (CP1) los frutos cultivados en malla sombra (Solteros de Juan Rosas y Barriles) son semejantes en las proporciones de C1/C4, (C1+C2)/C4, C2/C4 y  $\Sigma$ CM/C4 ya que estadísticamente tienen valores similares. Mientras que el sistema en acahual (20 Soles) se diferenció de estos dos sitios por presentar las proporciones más bajas de dichas variables. Por otra parte, a partir del segundo componente (CP2) se determinó que el sistema acahual (20 Soles) y malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) presentaron características semejantes a partir de los valores de la proporción Vainillina/Glucovainillina. Así mismo, tuvieron la concentración más alta de alcohol vanílico y 3,4-Dihidroxibenzaldehído. En contraste, el sistema malla sombra con tutor inerte (Barriles) se diferenció de estos sitios por tener la menor proporción de Vainillina/Glucovainillina y alcohol vanílico. Además, aunque no se encontraron diferencias estadísticas en la concentración de 3,4-Dihidroxibenzaldehído, Barriles tuvo el valor más bajo de las tres colectas evaluadas (Figura 4.12).

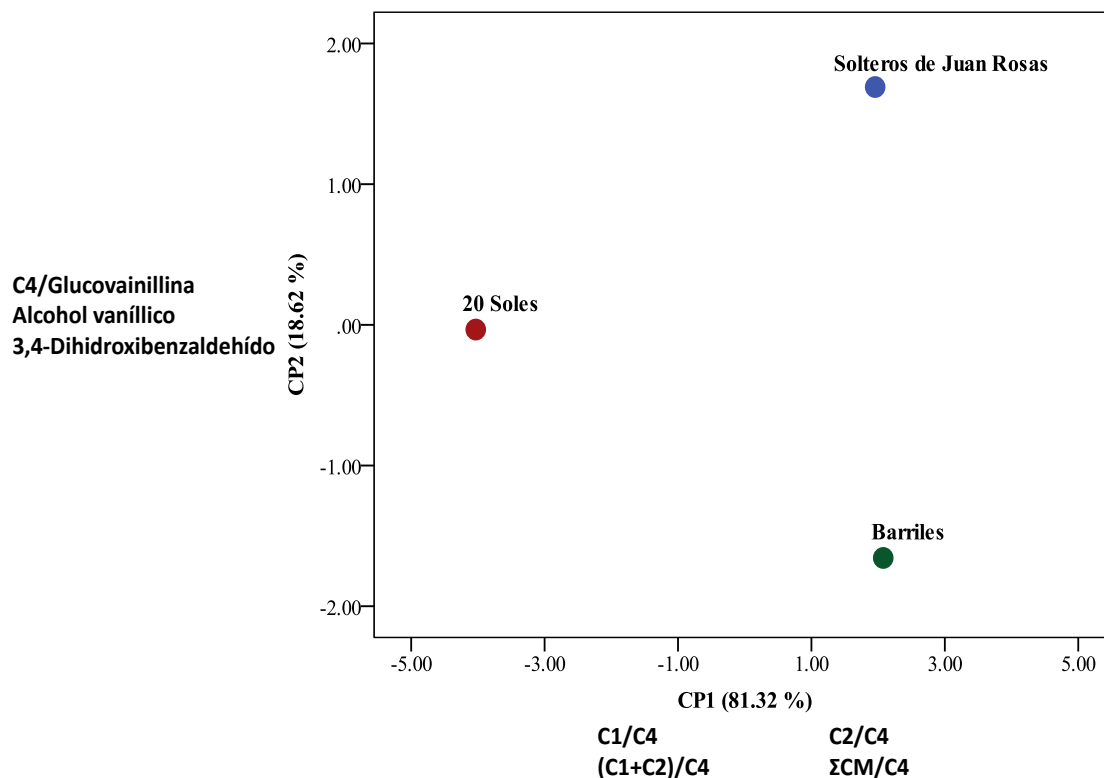


Figura 4.12. Dispersión de tres colectas de frutos verdes de *Vanilla planifolia* con base en los dos componentes principales del análisis de 13 variables aromáticas agrupadas por medias poblacionales.

Como se muestra en la Figura 4.13 las tres colectas presentaron características aromáticas diferentes. Los frutos en acahual (20 Soles) tuvieron como principales características la mayor concentración de *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina y glucovainillina; así como las proporciones más altas de Glucovainillina/Vainillina y C3/C4. También tuvo la concentración más baja de ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico y alcohol vanílico, al igual que las menores proporciones de compuestos menores con respecto a la vainillina ( $\Sigma$ CM, C1/C4,  $\Sigma$ CM/C4, C2/C4 y (C1+C2)/C4) y Vainillina/Glucovainillina. Los frutos en malla sombra con tutor inerte (Barriles) se caracterizó por tener valores medios de ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico y alcohol vanílico. Estas colectas tuvieron la mayor proporción de Vainillina/Glucovainillina y las concentraciones más bajas de *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina, glucovainillina, 3,4-Dihidroxibenzaldehído y la menor proporción de Glucovainillina/Vainillina y C3/C4. Por último, las colectas en malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) tuvieron mayor concentración de ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, alcohol vanílico y 3,4-Dihidroxbenzaldehído.



Este sitio presentó las mayores proporciones de CM, C1/C4, CM/C4, C2/C4 y (C1+C2)/C4. Además, tuvo concentración media de *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina y glucovainillina; al igual que valores medios en las proporciones Vainillina/Glucovainillina, Glucovainillina/Vainillina, y C3/C4.

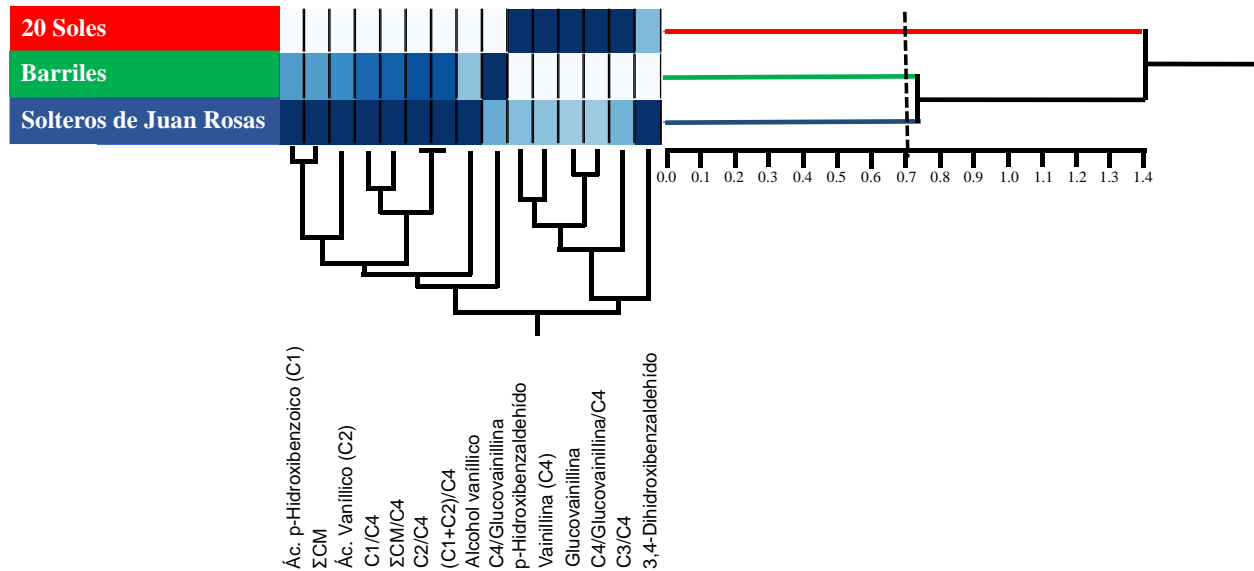


Figura 4.13. Dendrograma de tres colectas de frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* basado en el promedio de 13 variables aromáticas colectados en el ciclo de cultivo 2019 agrupadas por similitud de distancias. La intensidad en el color indica valores más altos en cada variable.

#### 4.4. CONCLUSIONES

En las características físicas de los frutos de vainilla verdes y beneficiados como el peso y el tamaño se encontraron diferencias entre sitios en los dos ciclos de cultivo evaluados. Los frutos del sistema acahual (20 Soles) y malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) mostraron características similares en el peso y tamaño de los frutos colectados en el ciclo 2019, aunque se cultivaron en sistemas de manejo diferentes. En los parámetros de color se observaron diferencias tanto entre sitios como entre estados de madurez. Los frutos verdes colectados en el ciclo 2018 presentaron tonos más oscuros con coloraciones verde-amarillento más intensos que las colectas del ciclo 2019. Los frutos cultivados en sistema malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) fueron similares en las características de color en los frutos verdes y beneficiados.

En los metabolitos precursores del aroma analizados en frutos verdes se encontraron importantes diferencias. La acumulación de glucovainillina en frutos verdes en el ciclo 2018 fue de aproximadamente el doble a las detectadas en los frutos colectados en el ciclo 2019. Estas diferencias se pueden asociar en parte a las diferencias ambientales entre ciclos de cultivo, ya que la síntesis de esta molécula es influenciada por parámetros de clima como la cantidad de luz, temperatura, fotoperiodo y precipitación. Sin embargo, se requiere ampliar el estudio para determinar con mayor certeza el parámetro climático con mayor influencia sobre la producción de este glucósido. Específicamente las colectas de frutos verdes cultivadas en el sistema de acahual, tuvieron las concentraciones más altas de glucovainillina, lo que representa un mayor potencial de producción de vainillina libre.

Los perfiles aromáticos de los frutos beneficiados indicaron que las colectas de frutos en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron mayor semejanza ya que presentaron las concentraciones de compuestos menores más altas, así como menor acumulación de vainillina que los encontrados en los frutos de acahual (20 Soles). Lo cual sugiere que, en términos de perfil aromático, las colectas de frutos beneficiados del sistema acahual tuvieron la mejor calidad ya que tuvo la mayor concentración de vainillina y la menor proporción de compuestos menores. Lo que puede ser un indicador de la influencia de los sistemas de manejo sobre los compuestos aromáticos de los frutos y que coincide con los resultados de otros estudios.

## **CAPÍTULO V. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE *Vanilla planifolia* CON DIFERENTE MADUREZ FISIOLÓGICA CULTIVADOS EN TRES SISTEMAS DE MANEJO**

### **RESUMEN**

Además de su aroma, la vainilla ha destacado por su actividad biológica potencial como fuente de antioxidantes, principalmente en los frutos beneficiados. El objetivo de este capítulo fue evaluar la capacidad antioxidante de frutos verdes y beneficiados con diferente madurez cultivados en sistema de acahual (20 Soles) y malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas; SJR), así como correlacionar estos resultados con el contenido de metabolitos secundarios totales (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales). La capacidad antioxidante de frutos verdes y beneficiados por la técnica de DPPH se realizó en extractos en metanol, mientras que para el método ORAC se utilizaron extractos en metanol (fracción hidrofílica) y en hexano (fracción lipofílica). El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza, prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) y correlación de Pearson. Los resultados señalaron que ambos frutos, verdes y beneficiados, con 32 semanas tuvieron mayor capacidad antioxidante, pero los frutos beneficiados tuvieron mayor capacidad antioxidante que los frutos verdes en la prueba de DPPH, particularmente las colectas de 20 Soles y SJR. De acuerdo con la prueba de ORAC, los frutos cultivados en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (SJR) tuvieron los valores ORAC más altos, especialmente en la fracción hidrofílica. Las principales correlaciones en frutos verdes se encontraron entre DPPH-compuestos fenólicos totales (CFT) y ORAC fracción lipofílica-terpenoides totales. Mientras que en frutos beneficiados las correlaciones se dieron entre DPPH con ORAC fracción hidrofílica, ORAC total y CFT; también hubo correlación entre ORAC fracción lipofílica con CFT y terpenoides totales. De acuerdo con esto se concluye que el estado de madurez y el sistema de manejo influyen en la capacidad antioxidante de los frutos. Las colectas con 32 semanas de madurez desarrollados en sistema de acahual y malla sombra con tutores vivos tuvieron mayor actividad potencial como captadora de radicales libres que los frutos cultivados en sistema de malla sombra con tutores inertes.

**Palabras clave:** antioxidantes, metabolitos secundarios, sistema de manejo, vainilla.

## CHAPTER V. ANTIOXIDANT CAPACITY OF *Vanilla planifolia* FRUITS WITH DIFFERENT PHYSIOLOGICAL MATURITY CULTIVATED IN THREE MANAGEMENT SYSTEMS

### ABSTRACT

In addition to its aroma, vanilla has highlighted for its potential biological activity as a source of antioxidants, mainly in cured pods. The objective of this chapter was to evaluate the antioxidant capacity of green and cured pods with different maturity cultivated in acahual system (20 Soles) and shade mesh (Barriles and Solteros de Juan Rosas; SJR), as well as to correlate these results with the content of total secondary metabolites (total phenolic compounds, flavonoids and terpenoids). The antioxidant capacity of green and cured pods by the DPPH technique was performed in extracts in methanol, while extracts in methanol (hydrophilic fraction) and in hexane (lipophilic fraction) were used for the ORAC method. Statistical analysis of the results was performed using an analysis of variance, Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ) and Pearson correlation. The results indicated that both green and cured pods with 32 weeks of ripeness had higher antioxidant capacity, but cured pods had higher antioxidant capacity than green pods in the DPPH test, particularly the accessions of 20 Soles and SJR. According to the ORAC test the pods grown in acahual (20 Soles) and shade mesh with living tutors (SJR) had the highest ORAC values, especially in the hydrophilic fraction. In green pods, the main correlations were found between DPPH-total phenolic compounds (TPC) and ORAC lipophilic fraction-total terpenoids (TT). While in cured pods, correlations occurred between DPPH with ORAC hydrophilic fraction, total ORAC and TPC; there was also a correlation between ORAC lipophilic fraction with TPC and total terpenoids. According to this, it is concluded that the ripeness and management system influence the antioxidant capacity of the pods. Accessions with 32 weeks of maturity grown in acahual and shade mesh with living tutors had the highest potential activity as free radical scavengers than pods grown in shade mesh with inert tutors.

**Key words:** antioxidants, secondary metabolites, management system, vanilla.

## 5.1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios realizados en especies aromáticas se han enfocado en la evaluación de sus propiedades funcionales con potenciales efectos terapéuticos (Stankovic *et al.* 2016). En especies como *Vanilla planifolia*, aun cuando el principal campo de aplicación se da en la industria farmacéutica y de alimentos (Funk y Brodelius 1994), también se destacan diversos ejemplos de actividad biológica por su efecto antiinflamatorio (Lim *et al.* 2008), neuroprotector (Gupta y Sharma 2014), antibacterial (Ngarmsak *et al.* 2006), antifúngico (Kim *et al.* 2014), antibiótico (Brochado *et al.* 2018), anticancerígeno (Bezerra *et al.* 2016) y antioxidante (Tai *et al.* 2011).

De manera específica, la importancia de evaluar la capacidad antioxidante en vainilla recae en el interés de encontrar nuevas fuentes naturales de antioxidantes (Shyamala *et al.* 2007). De acuerdo con Yamagisji y Matsui (2011) la capacidad antioxidante de una sustancia se define como la capacidad para inhibir daños por estrés oxidativo en determinadas moléculas, debido a la captación de radicales libres. Ciertos grupos de metabolitos secundarios como ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides pueden presentar esta actividad (Wu *et al.* 2011).

En particular, la capacidad antioxidante de los polifenoles suele ser efectiva en bajas concentraciones, por lo que su consumo se relaciona con la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras (Li *et al.* 2014). El principio de acción de la capacidad antioxidante se atribuye a sus propiedades reductoras. Lo que, a su vez, se asocia con agentes reductores que rompen las cadenas de los radicales libres al donar átomos de hidrógeno o evitando la formación de peróxidos (Kumaran y Karunakaran 2006).

La evaluación de la capacidad antioxidante se realiza a través de diferentes técnicas analíticas que se clasifican con base en su mecanismo de acción. De acuerdo con eso se mencionan dos grupos: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) como la capacidad total de captación de óxido radicales (TOSC) y capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC); y transferencia de electrón desapareado (SET, reducción de compuestos mediante la transferencia del electrón de un antioxidante) como la técnica de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (Cao *et al.* 2020; Chaves *et al.* 2020).

Bajo este contexto, el objetivo de este capítulo fue evaluar la capacidad antioxidante en los frutos verdes y beneficiados con 30 y 32 semanas de madurez en tres vainillales mediante los métodos de DPPH y ORAC. Así como correlacionar dicha capacidad con el contenido de metabolitos secundarios totales (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales).

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitios de estudio

Se seleccionaron tres sitios de colecta en la Región Totonacapan, Veracruz, durante el ciclo de cultivo 2019 mediante observación directa: el Rancho 20 Soles y la localidad Solteros de Juan Rosas ubicados en el municipio de Papantla, y el Rancho Xanathtlan en la localidad de Barriles perteneciente al municipio de Gutiérrez Zamora. Esto por mostrar características contrastantes en el manejo y sistema de producción; en este caso, acahual (Rancho 20 Soles), malla sombra con tutor vivo (Solteros de Juan Rosas) y malla sombra con tutor inerte (Barriles). Los sitios de ubicaron con un GPS Garmin Montana 650 y en el Cuadro 5.1 se indica su ubicación geográfica.

Cuadro 5.1. Ubicación geográfica de los vainillales bajo estudio en la Región Totonacapan, Veracruz.

Municipio	Localidad	Longitud	Latitud	Altitud (msnm)
Papantla	Rancho 20 Soles	-97.31	20.43	203
	Solteros de Juan Rosas	-97.34	20.34	176
Gutiérrez Zamora	Paso de Barriles	-97.14	20.46	29

msnm: metros sobre el nivel del mar

### Material vegetal

Durante los meses de abril y mayo de 2019 se polinizaron de manera manual aproximadamente 60 flores por sitio. La cosecha de frutos se realizó a las 30 y 32 semanas posteriores a la polinización. El material obtenido en este ciclo se separó en dos grupos, la mitad de frutos verdes se reservaron y procesaron en fresco. Los frutos restantes fueron beneficiados por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez del ejido Primero de Mayo, Veracruz. De acuerdo con el proceso descrito por Xochipa-Morante (2015), el proceso de beneficiado consistió en escaldar los frutos en agua a 75-80°C durante 8 a 10 segundos.

Posteriormente, las vainas se colocaron en una caja de madera (encajonado) donde conservan el calor y se favorecen las reacciones enzimáticas que dan pie al desarrollo de los compuestos aromáticos. Se procedió al secado al sol de los frutos en lapsos de 30 minutos a 2 horas, dependiendo de las condiciones del clima, para luego encajonar nuevamente

### **Procesamiento de material vegetal**

*Frutos verdes:* los frutos maduros se cortaron en rodajas con un grosor aproximado de 2 mm y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización durante 8 h bajo las siguientes condiciones: temperatura del colector -80 °C, presión de vacío 0.2 psi en una liofilizadora Labconco® (FreeZone Cat. 7400040). Una vez deshidratados, los frutos se molieron en un molino de carga (Krupps GX4100) hasta obtener una molienda uniforme y se tamizaron a fin de homogeneizar el tamaño de partícula a 420 µm y se almacenaron a 5 °C hasta el momento del análisis.

*Frutos beneficiados:* los frutos se congelaron a -20 °C y se molieron en un procesador de alimentos marca Nutribullet® Serie 600 hasta obtener una molienda uniforme. Los frutos molidos se almacenaron a 5 °C hasta el momento del análisis.

### **Evaluación de la actividad antioxidante**

#### *Preparación de extractos*

Para el análisis por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y para la fase hidrofílica del método ORAC (Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno) se prepararon extractos en metanol, y hexano para la fase lipofílica para el método ORAC. La concentración de los extractos para ambos métodos fue de 50 mg mL<sup>-1</sup>.

Las muestras se colocaron en un sonicador (Ultrasonic Cleaner AS5150B) durante 30 min en lapsos intermitentes de 10 min y se maceraron por 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 2 350 g durante 10 min para recuperar el sobrenadante y se almacenaron a -20 °C hasta el momento del análisis.

### *Método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)*

La técnica se basa en el método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995) adaptado a micrométodo. Para la prueba se mezclaron a velocidad media 50  $\mu\text{L}$  de extracto y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo DPPH 0.1 mM. La lectura se realizó cada minuto durante 30 min a 521 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo-Scientific Varioskan Flash). La determinación de actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición correspondiente al radical DPPH neutralizado por el extracto utilizado a partir de la Ecuación 8.

$$\% \text{ Inhibición} = \%I = \left[ \frac{A - A_1}{A} \right] (100) \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

A=Absorbancia del blanco

A<sub>1</sub>=Absorbancia de la muestra

La concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) que produce la disminución del 50 % de concentración de DPPH se calcula mediante la regresión de una curva de calibración, la cual se obtiene a partir del porcentaje de inhibición dado por las diferentes diluciones del extracto original.

### *Método ORAC (Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno)*

El estándar utilizado para la determinación del valor ORAC para la fase hidrofílica (metanol) y lipofílica (hexano) fue Trolox. Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada en los pozos que rodean la microplaca para generar una masa térmica protectora. Posteriormente se colocaron 25  $\mu\text{L}$  de extracto en cada pozo e incubaron a 37 °C por 10 min, más tarde se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína 0.1  $\mu\text{M}$  y se mantuvo en incubación a 37 °C por 30 min. Transcurrido el periodo de incubación se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de AAPH (2,2-Azobis-2-metilpropionamida) 153 mM. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de placa (Thermo-Scientific Varioskan Flash) cada dos min durante 90 min a una excitación de 485 nm y emisión de 520 nm. El cálculo de la AUC y AUC<sub>Neta</sub> se realizó a partir de las Ecuaciones 9 y 10. Mientras que la determinación del valor ORAC expresado en micromoles de equivalentes Trolox por gramo de materia seca ( $\mu\text{M}$  TE g-1 MS) se realizó como se indica en la ecuación 11.

$$AUC = 0.5 + \left( \frac{R2}{R1} \right) + \left( \frac{R3}{R1} \right) + \left( \frac{R4}{R1} \right) + \dots + 0.5 \left( \frac{R_n}{R1} \right) \quad (\text{Ecuación 9})$$



Donde:

R<sub>1</sub>: Lectura de fluorescencia en el inicio de la reacción

R<sub>n</sub>: Lectura de fluorescencia en la última medición

$$AUC_{Neta} = AUC_{Muestra} - AUC_{Blanco} \quad (Ecuación 10)$$

$$x = \left(\frac{y-b}{m}\right) \left(\frac{DF}{W}\right) \quad (Ecuación 11)$$

Donde:

y= AUC<sub>Neta</sub> de la pérdida de fluorescencia

b = Intercepción

m= Pendiente

DF = Factor de dilución

W = Peso de la muestra en gramos

X= Micromoles de equivalentes Trolox por gramos de materia seca (μM TE g<sup>-1</sup> MS)

### **Análisis estadísticos**

Se realizaron tres repeticiones por tipo de tejido (fruto verde y beneficiado) y estado de madurez de los frutos en los tres sitios evaluados. El análisis estadístico se realizó a partir del análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) y correlación de Pearson entre la actividad antioxidante y metabolitos secundarios totales (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales) para determinar el grado de asociación entre ambos grupos de variables.

### **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De acuerdo con el análisis de varianza que se muestra en el Cuadro 5.2 los coeficientes de variación en frutos verdes oscilaron entre 4-8 %, donde la fracción lipofílica evaluada por ORAC fue la variable con menor variación (4.40 %). Las diferencias estadísticas entre sitios de colecta fueron para las fracciones hidrofílica y lipofílica de ORAC, ORAC Total; mientras que para la prueba de DPPH no se encontraron diferencias estadísticas. Las variables evaluadas mostraron diferencias estadísticas por estado de madurez. Los coeficientes de variación para los frutos beneficiados tuvieron valores ente 4-15 %, la prueba DPPH tuvo la mayor variación (15.09 %) y ORAC fracción lipofílica y ORAC Total presentaron la menor variación (4.00 y 4.84 %, respectivamente). Así mismo, aunque no hubo diferencias estadísticas entre sitios de colecta, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estados de madurez.

Cuadro 5.2. Medias y coeficientes de variación de la capacidad antioxidante evaluadas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan, México.

Variable	Media	Coeficiente de variación (%)	Cuadrados medios		
			Sitio	Madurez	Error
Frutos verdes					
DPPH	9.2596	6.6345	0.6635ns	3.5467**	0.3774
ORAC fracción hidrofílica	9713.8360	7.1991	2216528*	7377677**	489026.77
ORAC fracción lipofílica	4443.6770	4.4035	369380.3720**	1506955.5470***	38286.9620
ORAC Total	14157.51	5.4576	4391782.48**	15553315.75***	597002.85
Frutos beneficiados					
DPPH	5.5760	15.0923	0.5732ns	4.6285*	0.7082
ORAC fracción hidrofílica	20698.40	6.1047	2256274.96ns	45293380.50***	1596620.31
ORAC fracción lipofílica	6318.45	4.0042	49614.40ns	2376418.48***	64010.35
ORAC Total	27016.62	4.8437	1663958.46ns	68419355.73***	1712490.07

\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$

Como se indica en el Cuadro 5.3, la prueba de medias entre sitios para frutos verdes no presentó diferencias estadísticas para la prueba DPPH. Sin embargo, se encontró que los frutos cultivados en los sistemas en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) fueron estadísticamente diferentes en la prueba ORAC fracción hidrofílica. Mientras que para ORAC fracción lipofílica de los frutos cultivados en malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) y acahual (20 Soles) fueron estadísticamente iguales, y a su vez, diferentes al sistema en malla sombra con tutores inertes (Barriles). Los frutos beneficiados no mostraron diferencias estadísticas entre sitios de colecta para ninguna de las variables evaluadas.

Cuadro 5.3. Valores medios por sitio para la actividad antioxidante por el método de DPPH y ORAC evaluadas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* colectados durante el ciclo de cultivo 2019 en tres sitios de la región Totonacapan México.

Sitio	Variable			
	DPPH CI <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	ORAC (μM ET g <sup>-1</sup> MS)		
		Fracción hidrofílica	Fracción lipofílica	ORAC Total
Frutos verdes				
Barriles	9.6405a	9063.90b	4171.90b	13235.90b
20 Soles	9.1112a	9809.30ab	4501.00a	14310.30ab
Solteros de Juan Rosas	9.0271a	10268.20a	4658.10a	14926.40a
DMS	0.9283	1056.70	295.68	1167.60
Frutos beneficiados				
Barriles	5.8612a	20310.90a	6219.50a	26530.30a
20 Soles	5.6191a	21405.40a	6398.40a	27803.90a
Solteros de Juan Rosas	5.2476a	20378.90a	6337.50a	26716.40a
DMS	1.2717	1909.40	382.31	1977.40

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha=0.05$ )

La prueba de medias por sitio y estado de madurez se muestra en el Cuadro 5.4. Para el cultivo en malla sombra con tutores inertes (Barriles) no se encontraron diferencias estadísticas entre estados de madurez para los frutos verdes en la prueba ORAC fracción hidrofílica. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticas para las pruebas DPPH y ORAC fracción lipofílica. De manera que el valor CI<sub>50</sub> más bajos para DPPH se reportaron en los frutos con 32 semanas de madurez, es decir, se requirieron concentraciones menores para inhibir el 50 % de los radicales libres debido a una mayor presencia de compuestos de tipo fenólico. Mientras que para ORAC fracción lipofílica los valores más altos se reportaron en los frutos con 32 semanas de madurez. En frutos beneficiados sólo se encontraron diferencias estadísticas para ORAC fracción lipofílica, donde los valores más altos se reportaron en frutos de 32 semanas. Los valores de ORAC Total mostraron diferencias estadísticas para los estados de madurez, de manera que los frutos verdes y beneficiados tuvieron la capacidad antioxidante mayor expresada en valores ORAC Total.

Los frutos verdes y beneficiados cultivados en el sistema de acahual (20 Soles) sólo mostraron diferencias estadísticas para ORAC fracción lipofílica y ORAC Total, en ambos casos los valores más altos se reportaron en frutos de 32 semanas. En el caso de las colectas de frutos verdes del sistema en malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) las diferencias estadísticas se reportaron en frutos verdes para ORAC fracción hidrofílica. En tanto que los frutos beneficiados tuvieron diferencias estadísticas en las pruebas DPPH para los frutos de 30 semanas y ORAC fracción hidrofílica en frutos de 32 semanas de madurez. Así mismo, se encontraron diferencias estadísticas en los valores ORAC Total de los frutos verdes y beneficiados.

Cuadro 5.4. Valores medios por tipo de tejido y estado de madurez para la actividad antioxidante por el método de DPPH y ORAC evaluadas en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* de tres sitios de la región Totonacapan México colectados durante el ciclo de cultivo 2019.

Sitio	Tejido	Madurez (Semanas)	DPPH CI <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	ORAC (µM ET g <sup>-1</sup> MS)		
				Fracción hidrofílica	Fracción lipofílica	ORAC Total
Barriles	Fruto verde	30	10.2225b	9298.60a	4358.10b	13656.70b
		32	9.0885a	11237.90a	4958.10a	16196.00a
		DMS	0.8002	2393.60	377.12	2531
	Fruto beneficiado	30	6.4110a	18840.00a	6083.60b	24923.60b
		32	5.3115a	21782.00a	6713.20a	28495.20a
		DMS	1.8540	3315.10	498.02	3521.20
20 Soles	Fruto verde	30	9.7166a	9318.50a	4184.60b	13503.10b
		32	8.5058a	10300.10a	4817.40a	15117.60a
		DMS	1.8186	1148.80	383.89	1314.60
	Fruto beneficiado	30	5.6812a	20385.00a	5705.80b	26090.80b
		32	5.5571a	22425.80a	6733.30a	29159.10a
		DMS	1.7335	2451.40	544.30	2634.7
Solteros de Juan Rosas	Fruto verde	30	9.1714a	8603.80b	3920.30a	12524.10b
		32	8.8828a	9524.10a	4423.50a	13947.70a
		DMS	1.3418	699.16	617.72	1109.90
	Fruto beneficiado	30	6.2812b	18111.20b	6076.00a	24187.20b
		32	4.2141a	22646.50a	6598.90a	29245.40a
		DMS	1.2837	2360	578.32	2708.60

Nota: Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Tukey ( $\alpha=0.05$ )

La capacidad antioxidante de frutos de vainilla se evaluó mediante dos métodos analíticos. La técnica de DPPH indicó la concentración requerida para reducir 50 % del radical libre DPPH (CI<sub>50</sub>) (Nenadis *et al.* 2007). De manera que bajos valores en el CI<sub>50</sub> se asocian con una alta capacidad antioxidante de los extractos de vainilla utilizados. Con base en esto, los valores de CI<sub>50</sub> para frutos verdes se encontraron en un rango de 8-11 mg mL<sup>-1</sup> con una tendencia a disminuir en su concentración al incrementar la madurez de los frutos, lo que indica una mayor presencia de compuestos con actividad antioxidante.

Las colectas del sistema en malla sombra con tutores inertes (Barriles) tuvieron valores de  $CI_{50}$  superiores a los demás sitios con 10.22 y 9.09 mg mL<sup>-1</sup> para las 30 y 32 semanas, respectivamente. Lo que indica que la capacidad antioxidante de estas colectas fue menor a la que presentaron las colectas de los sistemas en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas). Los frutos beneficiados tuvieron valores de  $CI_{50}$  de aproximadamente la mitad que los frutos verdes con un rango de 4-7 mg mL<sup>-1</sup>, lo que indica una alta cantidad de compuestos de tipo fenólico, así como una mayor capacidad antioxidante, ya que estos son los principales compuestos a los que se atribuye esta propiedad (Brainina *et al.* 2010).

La capacidad antioxidante depende de la madurez fisiológica de los frutos, el ambiente y prácticas de manejo (Vázquez-Briones *et al.* 2019), por lo cual los frutos de mayor madurez tuvieron una capacidad antioxidante mayor. Esta diferencia fue más notable en los frutos beneficiados del sistema malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas), donde se observó mayor diferencia en el  $CI_{50}$  entre frutos de 30 a 32 semanas de madurez. Lee *et al.* (2008) señalan que extractos con valores de  $CI_{50}$  inferiores a 10 mg mL<sup>-1</sup> actúan como un antioxidante de eficiencia alta, de acuerdo con esto los extractos de frutos beneficiados son considerados un producto de capacidad antioxidante alta.

Por otra parte, los extractos de frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia* tuvieron una capacidad antioxidante superior a los reportados en especies como la mora (*Rubus glaucus* Benth), el agraz (*Vaccinium floribundum*) y la remolacha (*Beta vulgaris* L.) con  $CI_{50}$  de 79.16, 53.33 y 141.88 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Torrenegra-Alarcón *et al.* 2016). A su vez, presentaron características similares al té verde (*Camelia sinensis*) con  $CI_{50}$  de 3.9 mg mL<sup>-1</sup> (Chang *et al.* 2020), zanahoria (*Daucus carota*)  $CI_{50}$  3.77 mg mL<sup>-1</sup>, alcachofa (*Cynara scolymus*)  $CI_{50}$  4.03 mg mL<sup>-1</sup> (Djenidi *et al.* 2020) y fresa (*Fragaria* sp.)  $CI_{50}$  5.6 mg mL<sup>-1</sup> (Hangun-Balkir y McKenney 2012).

En tanto que los frutos verdes tuvieron una capacidad antioxidante similar a la que presentan alimentos como el pepino (*Cucumis sativus*)  $CI_{50}$  7.21 mg mL<sup>-1</sup> (Djenidi *et al.* 2020) o el rambután (*Nephelium lappaceum*)  $CI_{50}$  9.32 mg mL<sup>-1</sup> (Muhtadi *et al.* 2016). La técnica ORAC mide la inhibición del efecto de radicales peroxilo en presencia de un antioxidante, a diferencia de la prueba de DPPH, valores ORAC más altos indican mayor capacidad antioxidante de un alimento (Fernández-Pachón *et al.* 2006).

En general, los frutos verdes tuvieron valores ORAC de 8, 603.80 a 10, 237.90 ( $\mu\text{M ET g}^{-1} \text{MS}$ ) en la fracción hidrofílica, con un incremento en este valor en los frutos de 32 semanas con respecto de los colectados a las 30 semanas de madurez (Cuadro 5.4). La mayor capacidad antioxidante en frutos verdes se encontró en las colectas del sistema en acahual (20 Soles), seguido de los sistemas en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas).

Los frutos beneficiados tuvieron valores más altos con un rango de 18, 111.20 a 22, 646.50 ( $\mu\text{M ET g}^{-1} \text{MS}$ ), al igual que en frutos verdes, el valor ORAC de los tejidos evaluados incrementa con la madurez. Lo que muestra una mayor presencia de compuestos de tipo fenólico. Los frutos con capacidad antioxidante mayor se encontraron en las colectas de 32 semanas cultivados en malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas), con una diferencia e incremento importantes en comparación con la colecta de 30 semanas. Estos resultados muestran que los valores ORAC en la fracción hidrofílica en frutos verdes fue de aproximadamente el doble que en la fracción lipofílica, mientras que en frutos beneficiados fue de aproximadamente tres veces.

Los valores ORAC para la fracción lipofílica en frutos verdes se encontró en un rango de 3920.30 a 4958.10 ( $\mu\text{M ET g}^{-1} \text{MS}$ ) con un notable incremento en función de la madurez de los frutos. Las colectas con mayor capacidad antioxidante en la fracción lipofílica de frutos verdes fueron las del sistema en malla sombra con tutores inertes (Barriles), seguidas de las colectas del sistema en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas). Los valores para frutos beneficiados se encontraron en un rango de 5705.80 a 6733.30 ( $\mu\text{M ET g}^{-1} \text{MS}$ ), y la colecta con mayor capacidad antioxidante fue la de 20 Soles con 32 semanas de madurez.

La capacidad antioxidante de la fracción hidrofílica de los frutos verdes y beneficiados se asocia principalmente a compuestos fenólicos derivados principalmente de ácidos benzoicos y cinámicos, así como de flavonoides (Servili *et al.* 2004). Mientras que en la fracción lipofílica los metabolitos que le confieren esta propiedad son principalmente carotenoides, tocoferoles, proantocianidinas poliméricas y taninos de peso molecular alto (Blanco *et al.* 2000). La literatura reporta que los extractos acuosos de frutos de *Vanilla planifolia* cultivados en Madagascar tienen valores ORAC de 1593  $\mu\text{M ET g}^{-1} \text{MS}$  (Dudonné *et al.* 2009), mientras que el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (2011) señala que la fracción hidrofílica de los frutos tiene 293  $\mu\text{M ET g}^{-1} \text{MS}$  y la lipofílica 931  $\mu\text{M ET g}^{-1} \text{MS}$ .

Los frutos verdes mostraron capacidad antioxidante similar a la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) 8515  $\mu\text{M ET g}^{-1}$  MS (Dudonné *et al.* 2009), semillas de chía negra (*Salvia hispanica*) 9800  $\mu\text{M ET g}^{-1}$  MS o arándanos (*Vaccinium corymbosum*) 9621  $\mu\text{M ET g}^{-1}$  MS. Mientras que los frutos beneficiados tuvieron características semejantes a la frambuesa negra (*Rubus occidentalis*) 19220  $\mu\text{M ET g}^{-1}$  MS, páprika (*Capsicum annuum*) 21932  $\mu\text{M ET g}^{-1}$  MS o azafrán (*Crocus sativus*) 19571  $\mu\text{M ET g}^{-1}$  MS (National Institute of Health 2020).

El análisis de correlación de Pearson de los ensayos de actividad antioxidante y metabolitos secundarios totales en frutos verdes indicó una correlación DPPH y compuestos fenólicos totales alta (-0.73838  $p=0.0018$ ), así como asociación entre las fracciones hidrofílica-lipofílica de ORAC (0.78123  $p=0.0001$ ) muy alta y con ORAC Total (0.98328  $p<0.001$ ) alta. Se observaron correlaciones entre ORAC fracción lipofílica-ORAC Total (0.88183  $p=<0.0001$ ) altamente significativas y con terpenoides totales (0.51475  $p=0.0021$ ) significativas, así como una correlación entre compuestos fenólicos totales con flavonoides totales (0.50854  $p<0.0001$ ) altamente significativa (Cuadro 5.5).

En frutos beneficiados se encontraron correlaciones entre DPPH-ORAC fracción hidrofílica (-0.48983  $p=0.0191$ ), ORAC Total (-0.49358  $p=0.0174$ ) y compuestos fenólicos totales (-0.82473  $p=0.0016$ ), así como entre ORAC fracción hidrofílica-ORAC fracción lipofílica (0.64725  $p: 0.0037$ ), ORAC total (0.98971  $p<0.0001$ ) y compuestos fenólicos totales (-0.65567  $p= 0.0031$ ). También se observó una correlación ORAC fracción lipofílica-ORAC total (0.74964  $p=0.0003$ ), compuestos fenólicos totales (0.72060  $p=0.0070$ ) y terpenoides totales (0.58028  $p=0.0017$ ); así como asociación entre compuestos fenólicos totales y flavonoides totales (0.45036  $p=0.0028$ ) (Cuadro 5.6). La correlación de la capacidad antioxidante de frutos verdes y beneficiados con los metabolitos secundarios totales mostró asociación entre DPPH-ORAC fracción hidrofílica (-0.44311  $p=0.0155$ ) y compuestos fenólicos totales (-0.84785  $p=0.0186$ ). La variable ORAC fracción hidrofílica se correlacionó con ORAC fracción lipofílica (0.76543  $p=0.0002$ ), ORAC total (0.98958  $p<0.0001$ ) altamente significativa y compuestos fenólicos totales (0.85388  $p=0.0073$ ); mientras que ORAC fracción lipofílica tuvo asociación con ORAC total (0.85009  $p<0.0001$ ), compuestos fenólicos totales (0.61191  $p=0.007$ ) y terpenoides totales (0.43532  $p= 0.0171$ ); y compuestos fenólicos se correlacionó con flavonoides totales (0.4580  $p=0.0136$ ) (Cuadro 5.7).

Cuadro 5.5. Análisis de correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante y los metabolitos secundarios totales evaluados en frutos verdes de *Vanilla planifolia*.

	DPPH (CI <sub>50</sub> )	ORAC FH	ORAC FL	ORAC TOTAL	CFT	FlavT	TerpT
DPPH (CI <sub>50</sub> )	1	-0.29029 0.2426	-0.33357 0.1761	-0.31659 0.2006	<b>-0.73838</b> <b>0.0018</b>	-0.48621 0.0408	-0.50834 0.0312
ORAC FH		1	<b>0.78123</b> <b>0.0001</b>	<b>0.98328</b> <b>&lt;0.001</b>	0.26798 0.2823	-0.09708 0.7016	0.12369 0.6248
ORAC FL			1	<b>0.88183</b> <b>&lt;0.0001</b>	0.23396 0.3501	-0.09034 0.7215	<b>0.51475</b> <b>0.0021</b>
ORAC TOTAL				1	0.27068 0.2773	-0.09969 0.6339	0.15608 0.5363
CFT					1	<b>0.50854</b> <b>&lt;0.0001</b>	0.41604 0.1218
FlavT						1	0.56340 0.1286
TerpT							1

ORAC FH: ORAC fracción hidrofílica; ORAC FL: ORAC fracción lipofílica; CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; TerpT: Terpenoides totales

Cuadro 5.6. Análisis de correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante y los metabolitos secundarios totales evaluados en frutos beneficiados de *Vanilla planifolia*.

	DPPH (CI <sub>50</sub> )	ORAC FH	ORAC FL	ORAC TOTAL	CFT	FlavT	TerpT
DPPH (CI <sub>50</sub> )	1	<b>-0.48983</b> <b>0.0191</b>	-0.36390 0.1377	<b>-0.49358</b> <b>0.0174</b>	<b>-0.82473</b> <b>0.0016</b>	-0.35212 0.1518	0.07513 0.7670
ORAC FH		1	<b>0.64725</b> <b>0.0037</b>	<b>0.98971</b> <b>&lt;0.0001</b>	<b>0.65567</b> <b>0.0031</b>	0.32389 0.1898	0.06781 0.7892
ORAC FL			1	<b>0.74964</b> <b>0.0003</b>	<b>0.72060</b> <b>0.0070</b>	0.22379 0.3720	<b>0.58028</b> <b>0.0017</b>
ORAC TOTAL				1	0.50011 0.0346	0.32321 0.1908	0.11148 0.6597
CFT					1	<b>0.45036</b> <b>0.0028</b>	0.07507 0.5895
FlavT						1	-0.33984 0.2119
TerpT							1

ORAC FH: ORAC fracción hidrofílica; ORAC FL: ORAC fracción lipofílica; CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; TerpT: Terpenoides totales



Cuadro 5.7. Análisis de correlación de Pearson entre la capacidad antioxidante y los metabolitos secundarios totales evaluados en frutos verdes y beneficiados de *Vanilla planifolia*.

	DPPH (CI <sub>50</sub> )	ORAC FH	ORAC FL	ORAC TOTAL	CFT	FlavT	TerpT
DPPH	1	<b>-0.44311</b> <b>0.0155</b>	-0.45604 0.0572	-0.46464 0.0521	<b>-0.84785</b> <b>0.0016</b>	-0.46793 0.0502	0.20606 0.412
ORAC FH		1	<b>0.76543</b> <b>0.0002</b>	<b>0.98958</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>0.85388</b> <b>0.0073</b>	0.2078 0.408	0.22677 0.3655
ORAC FL			1	<b>0.85009</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>0.61191</b> <b>0.007</b>	0.06452 0.7992	<b>0.43532</b> <b>0.0171</b>
ORAC TOTAL				1	0.42648 0.0776	0.48449 0.2636	0.28296 0.2552
CFT					1	<b>0.4580</b> <b>0.0136</b>	0.07507 0.5895
FlavT						1	-0.35987 0.2047
TerpT							1

ORAC FH: ORAC fracción hidrofílica; ORAC FL: ORAC fracción lipofílica; CFT: Compuestos fenólicos totales; FlavT: Flavonoides totales; TerpT: Terpenoides totales

#### 5.4. CONCLUSIONES

Los frutos beneficiados de *Vanilla planifolia* presentaron la capacidad antioxidante mayor al utilizar los métodos de DPPH y ORAC, en particular los frutos colectados a las 32 semanas de madurez. La fracción hidrofílica tuvo valores ORAC más altos que la lipofílica. En frutos verdes la fracción hidrofílica fue aproximadamente dos veces más alta que la lipofílica, mientras que en frutos beneficiados la diferencia fue casi del triple en el valor ORAC. La correlación entre compuestos fenólicos totales y DPPH tuvo valores negativos, esta correlación inversa indica que valores más bajos en CI<sub>50</sub> de DPPH se asocia con una mayor presencia de compuestos fenólicos. Con base en el sistema de manejo, los frutos cultivados en el sistema de acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) tuvieron la mayor capacidad antioxidante de las colectas evaluadas, lo que muestra el efecto del sistema de manejo respecto a los frutos cultivados en malla sombra (Barriles). Se sugiere que estas diferencias pueden asociarse a las condiciones de temperatura, humedad o radiación que inciden en el cultivo y que pueden promover una mayor producción de estos metabolitos, ya que las colectas de estos sistemas de manejo mostraron las concentraciones más altas de compuestos fenólicos y flavonoides totales.

## DISCUSIÓN GENERAL

*Vanilla planifolia* cuenta con una amplia distribución geográfica en el mundo. Al ser la única orquídea que produce frutos aromáticos comestibles es considerada una especie de alto valor económico, ya que los usos de la vainilla se extienden a industrias de cosméticos, alimentos y farmacéuticos, con lo cual es una de las especies con mayor demanda. Sin embargo, también tiene una gran importancia social y cultural ya que grupos originarios como los nahuas, mayas y totonacos se desarrollaron alrededor de esta especie. Hagsater *et al.* (2005) y Karner (2007) mencionan que en sus inicios los frutos de vainilla sólo se obtenían mediante la recolección en plantas silvestres, por lo cual carecían de valor económico (Kouri 2013).

La transición de la vainilla de especie silvestre a cultivada permitió al agricultor un mayor control sobre la producción de los frutos (Kouri 2000). Pero también dio lugar al establecimiento de diferentes sistemas de cultivo, en los cuales se desarrollaron prácticas de manejo empíricas que generan condiciones ambientales particulares. Barrera-Rodríguez *et al.* (2009) y Hernández-Hernández (2011) señalan que en México destacan tres sistemas de manejo que se diferencian por las prácticas aplicadas en el cultivo y que impactan en la producción de fruto.

En esta investigación se evaluaron tres vainillales en condiciones de establecimiento contrastantes: Barriles (malla sombra con tutores inertes), 20 Soles (acahual) y Solteros de Juan Rosas (malla sombra con tutores vivos); bajo la hipótesis de que la concentración de metabolitos secundarios, características físicas y rendimiento en frutos de vainilla (*Vanilla planifolia*) varía en función del sistema de manejo, condición ambiental y madurez fisiológica. Para abordar esta hipótesis se plantearon cinco objetivos distribuidos en cinco Capítulos. En el Capítulo I se determinó que las principales diferencias entre estos sistemas de manejo se encontraron en el tipo de tutor, manejo de sombra, densidad de plantas, altura de planta y fertilización. Los sistemas establecidos en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron la densidad de plantas más alta, así como plantas de mayor altura. Sin embargo, en el sistema en malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) se realizó un manejo de sombra diferente, debido a que se requiere la poda de tutores.

A diferencia del sistema en acahual (20 Soles), el porte bajo de plantas y tutores, junto con la baja densidad de plantas facilitó prácticas de polinización, control de enfermedades y cosecha. El sistema en Solteros de Juan Rosas aplicó fertilización orgánica, actividad que lo diferenció de los demás vainillales y que resulta del propósito que el productor tiene para el uso de los frutos que cultiva. Sin embargo, este sistema también se destacó por tener mayor incidencia de enfermedades como resultado de una condición de estrés generada por el microclima derivado de las prácticas de manejo.

Las diferencias en el establecimiento del cultivo también tuvieron efecto en la calidad física y rendimiento de fruto, ya que los tres sistemas de manejo fueron diferentes principalmente en la densidad de guías, frutos e inflorescencias (macetas florales); así como en el peso promedio, longitud y rendimiento de fruto. Los contrastes entre los sistemas de manejo evaluados indicaron que, aunque los sistemas en malla sombra tuvieron densidad mayor de plantas que el sistema en acahual, también tuvieron una densidad menor de inflorescencias, lo que tiene una relación directa en el rendimiento de fruto.

El sistema en malla sombra con tutores inertes (Barriles) tuvo el rendimiento más alto de los tres sistemas evaluados, pero también tuvo los frutos de menor peso y tamaño. A pesar de que 20 Soles (acaahual) y Solteros de Juan Rosas (malla sombra con tutores vivos) son sistemas de manejo diferentes, tuvieron semejanza en el peso y tamaño de los frutos, lo que representó mejor calidad física de los frutos, esto al considerar que los frutos verdes se comercializan por peso. Sin embargo, el sistema en Solteros de Juan Rosas tuvo el rendimiento más bajo a pesar de tener una densidad de plantas importante, causado por la presencia de enfermedades que favorecieron la caída prematura de frutos.

Autores como Fouché y Jouve (1999) y Soto-Arenas (2006) han mencionado que el manejo y el clima ejercen una influencia importante en la producción de fruto, ya que ambos aspectos se relacionan y pueden inducir la diferenciación floral y el crecimiento de las plantas. Pero una condición desfavorable también puede promover el desarrollo de enfermedades y afectar el rendimiento, condición que se observó en Solteros de Juan Rosas. El rendimiento y calidad física de los frutos pueden variar entre ciclos de cultivo, por lo que se requiere mayor investigación para determinar con mayor precisión el efecto del sistema de manejo.

Con base en el Capítulo II se observó que la condición ambiental suele ser diferente según el sistema de cultivo debido a las prácticas de manejo que se realicen, en este estudio los parámetros de clima con significancia estadística entre sitios o sistemas de manejo fueron principalmente la humedad relativa y la radiación fotosintéticamente activa (RFA). Se observó que los sistemas en malla sombra tuvieron los valores promedio más altos de temperatura con un rango promedio durante el cultivo de 28-30 °C y humedad relativa entre 68-81 %, así como RFA baja (11-17  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Esta condición pudo promover la caída prematura de fruto debido al estrés al que se someten las plantas y el desarrollo de enfermedades (Hernández-Hernández 2011), lo que afectó de manera importante el rendimiento de fruto en este vainillal. En contraste, el sistema en acahual registró valores más bajos de temperatura (27-28 °C) y humedad relativa (68-77 %), así como mayor incidencia de RFA (11-19  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) respecto a los sistemas en malla sombra. Este sistema de cultivo presenta la ventaja de tener una mayor ventilación y regulación de la temperatura (Hernández-Hernández y Lubinsky 2010), lo que puede contribuir a mejorar la fitosanidad del cultivo.

A través del análisis de correlaciones canónicas se observó que los parámetros de clima registrados tuvieron una influencia diferente sobre los componentes de rendimiento de los tres vainillales evaluados. Sin embargo, las principales correlaciones se encontraron entre la RFA y humedad relativa con la densidad de frutos e inflorescencias. Lo que indica que la RFA promueve la inducción floral, de manera que una condición de RFA baja limita el desarrollo de yemas florales. Mientras que la humedad relativa alta puede promover enfermedades y la abscisión de los frutos (Khandaker *et al.* 2016), situación que afecta de manera importante el rendimiento de fruto.

El microclima en los sistemas de manejo, además de mostrar diferencias en la producción de frutos, puede tener un efecto en el metabolismo de la planta de vainilla, y particularmente en el metabolismo secundario. Las variaciones en la producción de metabolitos secundarios ocurren en respuesta a los cambios ambientales (Ober 2005), sin embargo, también pueden variar en función de la madurez de los frutos o el tipo de tejido vegetal (Kim y Buell 2015).

En el Capítulo III de esta investigación se observó que la acumulación de metabolitos primarios como azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón presentó diferencias entre sistemas de manejo y estados de madurez, pero también hubo diferencias entre ciclos de cultivo. La glucosa se encontró en mayor abundancia en los frutos verdes más jóvenes (28 semanas) al ser uno de los metabolitos precursores de una amplia diversidad de moléculas (Lesage-Meessen *et al.* 1997), mientras que en frutos beneficiados la mayor acumulación se dio en los frutos con mayor madurez (32 semanas) como resultado de la hidrólisis del almidón, hemicelulosa y diversos glucósidos que generan el monosacárido en forma libre (Voragen *et al.* 1993; Azeez 2008).

Por otra parte, la acumulación de estas azúcares en frutos verdes fue mayor en el sistema en acahual (20 Soles), mientras que los sistemas en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron concentraciones más bajas y similares, lo que puede ser un indicador del efecto de la condición ambiental en el perfil metabólico de los frutos. La acumulación de azúcares en frutos beneficiados mostró importantes diferencias entre ciclos de cultivo, particularmente en la glucosa, esto pudo atribuirse a los periodos prolongados de almacenamiento de los frutos beneficiados en condiciones de refrigeración lo que pudo inducir un proceso de edulcoración por frío donde se da la hidrólisis del almidón en azúcares reductores (Sowokinos 2001).

Las diferencias entre sistemas de manejo y estado de madurez también se observaron en los pigmentos fotosintéticos. En este caso los frutos más jóvenes, y los cultivados en los sistemas en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) tuvieron las concentraciones más altas de clorofilas y carotenoides+xantofilas. A pesar de ser sistemas de manejo diferentes, la semejanza en la acumulación de pigmentos fotosintéticos se pudo asociar a la cantidad de luz que recibieron los frutos a lo largo del ciclo de cultivo. Es decir, la producción de pigmentos fotosintéticos se estimula con la luz solar y se degradan en el proceso de madurez de los frutos (Zhang *et al.* 2014), por lo que los frutos colectados en estos vainillales estuvieron expuestos a valores más altos de RFA, lo que se pudo comprobar en este estudio. El contenido de metabolitos secundarios evaluados por espectrofotometría mostró diferencias entre sitios de colecta y ciclos de cultivo.

Los frutos verdes y beneficiados colectados en el ciclo 2019 tuvieron concentraciones más altas de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos totales respecto al ciclo 2018, lo que puede ser un indicador de las diferencias en las condiciones microambientales en los vainillales que promovieron una mayor síntesis y acumulación de estos compuestos. Los frutos beneficiados mostraron concentraciones más altas de compuestos fenólicos totales, dado que, en su mayoría, estos compuestos contribuyen al aroma y el sabor de los frutos; mientras que los flavonoides y terpenos se acumularon en menor proporción. Así mismo, los frutos con 32 semanas de madurez se caracterizaron por tener la concentración mayor de estos compuestos.

Se destacó también que los frutos verdes y beneficiados cultivados en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) tuvieron las concentraciones más altas de los grupos de metabolitos evaluados. La producción de estos grupos de metabolitos se ve influenciada, entre otras cosas, por factores de estrés abiótico como el incremento importante en la temperatura o radiación (Edreva 2005; Soto-Hernández *et al.* 2019). El estrés ambiental puede aumentar la actividad de enzimas como la fenilamonioliasa y chalcona sintasa (Cheynier *et al.* 2013), lo que a su vez incrementa la producción de moléculas con potencial antioxidante como los compuestos fenólicos y los flavonoides (Klimov *et al.* 2008).

En este estudio, los sistemas en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) registraron los valores más altos de RFA particularmente durante el desarrollo de los frutos y, a su vez, mostraron una mayor acumulación de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos totales en frutos verdes. Estas diferencias también fueron evidentes entre ciclos de cultivo, ya que las colectas del ciclo 2018 mostraron concentraciones menores de metabolitos secundarios en relación al ciclo 2019. Lo cual puede mostrar la influencia de las variaciones en el microambiente en los diferentes ciclos de cultivo y los sistemas de manejo.

La acumulación de estas moléculas también varía en función de la madurez de los tejidos, ya que los frutos verdes y beneficiados más maduros tuvieron concentraciones más altas con respecto a frutos más jóvenes (Mohktar *et al.* 2021). No obstante, luego de periodos prolongados de almacenamiento o en etapas de senescencia la acumulación de los metabolitos secundarios mencionados puede verse disminuida debido a la acción de enzimas como la polifenol-oxidasa que inician procesos de oxidación (Fawole y Opara 2013).

Por otra parte, el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenos evaluados por cromatografía de líquidos (HPLC) hicieron más evidentes las diferencias entre ciclos de cultivo y, de manera particular, entre sistemas de manejo ya que, en su mayoría, la significancia estadística se dio entre sitios. Para el contenido de ácidos fenólicos, a pesar de que no hubo diferencias estadísticas entre estados de madurez para la mayoría de los metabolitos evaluados, se observó un incremento en su acumulación en los frutos con 32 semanas de madurez, independientemente del ciclo de cultivo en que se realizara la colecta.

Para el ciclo 2018 los metabolitos más abundantes fueron los ácidos protocatecuico, clorogénico y sirínico. Se observaron importantes diferencias entre sistemas de cultivo, ya que los frutos verdes y beneficiados cultivados en el sistema en acahual (20 Soles) tuvieron mayor diversidad y concentración de metabolitos que las colectas del sistema en malla sombra con tutores vivos (Barriles). Mientras que en el ciclo 2019 se detectó diversidad y acumulación de metabolitos menor en las colectas evaluadas respecto al ciclo 2018, lo cual pudo atribuirse en parte al periodo prolongado de almacenamiento al que se sometieron las muestras y que pudieron tener algún grado de oxidación (Quiñones *et al.* 2012).

Los sistemas de cultivo establecidos en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) presentaron mayor semejanza en el contenido y diversidad de ácidos fenólicos al presentar mayor acumulación de metabolitos en relación al sistema en acahual (20 Soles). Lo cual puede ser un indicador de la influencia del sistema de manejo sobre la producción de metabolitos secundarios. Entre las colectas de los tres sistemas de manejo evaluados, los ácidos ferúlico, *p*-cumárico y sinápico fueron los de menor concentración, Saltveit (2017) y Marchiosi *et al.* 2020 mencionan que estos metabolitos suelen encontrarse en bajas concentraciones debido a que son moléculas precursoras en diferentes momentos de la biosíntesis de nuevos compuestos.

El contenido de flavonoides no mostró diferencias notables en su diversidad o contenido entre estados de madurez y, al igual que en los ácidos fenólicos, las colectas del ciclo 2018 tuvieron mayor diversidad y acumulación de metabolitos en relación al ciclo 2019, sin embargo, se observaron diferencias entre sistemas de manejo. Los sistemas establecidos en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron mayor acumulación de flavonoides en los dos ciclos evaluados tanto en frutos verdes como beneficiados, respecto al sistema en acahual (20 Soles).

De acuerdo con Nabavi *et al* (2008) y Jugran *et al.* (2016) una mayor acumulación de estas moléculas podría ser un indicador de estrés oxidativo generado por una condición de estrés ambiental debido a incrementos o descensos importantes en la temperatura, lo que favorece una mayor producción de flavonoides.

Aunque no se encontraron diferencias importantes entre estados de madurez, la disminución en la acumulación de flavonoides en frutos con mayor madurez (32 semanas) puede asociarse en parte a su degradación como parte del proceso de madurez o a procesos de oxidación (Arena *et al.* 2012). Así mismo, fue evidente una menor acumulación de flavonoides en los frutos beneficiados, debido en parte al tratamiento térmico al que se sometieron los frutos. Puesto que la transición de fruto verde a beneficiado implica procesos de oxidación enzimática y la pérdida de agua para lograr la deshidratación del fruto, la disminución en la acumulación de los flavonoides puede atribuirse a su oxidación o posible lixiviación al generarse la ruptura tisular de los frutos (Häkkinen *et al.* 2000).

Por otra parte, el contenido de terpenos mostró un comportamiento diferente a los ácidos fenólicos y flavonoides ya que la mayor diversidad de metabolitos se encontró en las colectas del ciclo 2019, sin embargo, compuestos como el carnosol y estigmasterol presentaron concentraciones más bajas en este ciclo respecto a 2018. En relación a las diferencias entre sistemas de manejo del ciclo 2018 se observó que los sistemas en malla sombra y acahual fueron estadísticamente diferentes en el contenido de terpenos en frutos verdes y beneficiados, mientras que en el ciclo 2019 se observó que a pesar de haber diferencias estadísticas, los sistemas establecidos en malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) y acahual (20 Soles) mostraron cierta semejanza a pesar de ser sistemas de manejo diferentes, situación que también se observó en los metabolitos secundarios totales evaluados por espectrofotometría.

Así mismo, dentro de los parámetros de clima que suelen favorecer una mayor producción de los terpenos son el incremento en la temperatura o la radiación, ya que estos compuestos pueden desempeñar funciones de termoprotección (Singsaas *et al.* 1997). De esta manera, los frutos verdes (especialmente del ciclo 2019) mostraron concentraciones más altas de terpenos en relación a los frutos beneficiados ya que estuvieron sometidos a mayor cantidad de radiación (RFA) durante su desarrollo.



Esto lleva a sugerir que los sistemas en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) registraron valores más altos de RFA que promovieron la mayor producción de terpenos, lo cual se pudo confirmar con base en los resultados que se presentaron en el Capítulo II de esta tesis. Respecto a las diferencias entre estados de madurez, las variaciones se asocian en parte al balance entre la producción de estos metabolitos en la planta y su volatilidad, ya que a menudo suelen presentar esta propiedad (Singsaas 2000). Por lo cual se encontraron en general concentraciones menores en los frutos verdes y beneficiados más maduros.

Como se ha mencionado, el ambiente puede ser uno de los factores de mayor importancia que determina la composición química de un organismo vegetal. A partir del análisis de correlaciones canónicas se observó que a pesar de que los parámetros de clima evaluados pueden mostrar un efecto diferente sobre la composición química de los frutos, que dependen del sistema de manejo en que se cultive, existen asociaciones planta-ambiente en común. En general, se encontró que la RFA se relaciona principalmente con la producción y acumulación de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), metabolitos de almacenamiento como el almidón, pigmentos fotosintéticos y metabolitos secundarios totales.

Estas asociaciones se atribuyen a que una mayor exposición a la RFA genera una mayor producción de azúcares como resultado de una mayor actividad fotosintética (Greer y Weedon 2013). Por lo cual también se encontró asociación con los pigmentos fotosintéticos, que son necesarios para la captación de luz (Valladares y Niinemets 2008). Así mismo, su correlación con los compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos totales representa que la incidencia de cantidades más altas de radiación estimula la actividad de enzimas como la chalcona sintasa y fenilamonioliasa que promueven la producción de estos metabolitos a fin de evitar la oxidación por efecto de la luz solar actuando como fotoprotectores (Sharkey y Yeh 2001; Zhang *et al.* 2012; Pastore *et al.* 2013).

La asociación entre temperatura y humedad relativa con la acumulación de azúcares solubles fue otra constante entre los sitios evaluados. Esta relación indica que la producción de azúcares puede incrementar como respuesta al aumento en la temperatura para actuar como osmoprotectores (Yuanyuan *et al.* 2009).

La síntesis de estos metabolitos primarios también suele incrementar como resultado de un ambiente con baja humedad relativa, es decir, se promueve la producción de azúcares a fin de evitar la deshidratación de los tejidos al actuar como reguladores osmóticos (Yuanyuan *et al.* 2009).

Con base en lo anterior, podemos mencionar que si bien los perfiles químicos suelen preservarse de una manera más eficiente en especies con reproducción vegetativa, como es el caso de la vainilla, las variaciones químicas o quimiotipos pueden asociarse no sólo con el genotipo, sino también con los factores ambientales en que se desarrolle la especie (Levot y Levesque 1996). En este caso, las diferencias en los perfiles pueden ser un indicador tanto de las diferencias ambientales generadas como resultado de las prácticas de manejo realizadas. Aunque también se asocia con un determinado nivel de selección o manejo (Levot y Levesque 1996). Lo que puede ser un indicador de la influencia de las prácticas realizadas en los sistemas de manejo sobre la composición química de los frutos.

Además de conocer las características químicas de los frutos de vainilla para identificar algún metabolito de interés por su potencial actividad biológica, es importante conocer las variaciones de su perfil aromático teniendo en cuenta que la vainilla es apreciada principalmente por sus características aromáticas (Gallage y Møller 2018). De acuerdo con autores como Brodelius (1994) y Palama *et al.* (2009), el aroma de los frutos se expresa al final de su desarrollo en la planta y se acumulan principalmente en forma de glucósidos, aunque también es posible encontrar algunas moléculas en estado libre. Uno de los glucósidos de mayor importancia en los frutos verdes es la glucovainillina, ya que representa aproximadamente 90 % del potencial de vainillina libre, que es el metabolito aromático mayoritario en los frutos beneficiados (Brodelius 1994).

Palama *et al.* (2009) también señalan que la acumulación de glucósidos y moléculas libres incrementa con la madurez de los frutos, de manera que los frutos más maduros tendrán también una mayor cantidad de metabolitos aromáticos. Sin embargo, es durante el beneficiado donde ocurren una serie de reacciones que los frutos adquieren su aroma característico (Ramachandra-Rao y Ravishankar 2000). Dunphy y Bala (2011) señalan que el aroma de los frutos beneficiados puede variar en función del genotipo, origen geográfico, condiciones ambientales durante su desarrollo y madurez del fruto, entre otros.

Por otra parte, aunque el aroma es el principal parámetro de calidad en frutos beneficiados, se considera que criterios como el color y longitud del fruto contribuyen a definir su calidad y a su vez determinan su precio en el mercado (Curti-Díaz 1995). Bajo este contexto, en el Capítulo IV se describieron las características aromáticas y físicas (peso, tamaño y color) de frutos verdes y beneficiados cultivados en diferente sistema de cultivo y con diferente madurez a fin de mostrar sus diferencias en calidad física y aromática.

La evaluación de los parámetros de calidad física indicó que hay diferencias estadísticas significativas en el peso y tamaño de los frutos principalmente entre sistemas de manejo; mientras que las variables de color tuvieron diferencias entre estados de madurez. Las diferencias en el color de los frutos entre ciclos de cultivo también fueron notables puesto que los frutos verdes colectados en el ciclo 2019 tuvieron coloraciones más verdes y oscuras, en relación al ciclo 2018. Así mismo, los sistemas en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) tuvieron los frutos de coloración verde oscuro más intensas que las colectas de malla sombra con tutores inertes (Barriles). Estas diferencias se podrían asociar en parte a una mayor acumulación de pigmentos como la clorofila, ya que su producción se estimula con la exposición a la luz, y los resultados de la evaluación de los parámetros de clima mostrados en el Capítulo II de esta tesis indican que el ciclo 2019 recibió una mayor cantidad de radiación fotosintéticamente activa (RFA) respecto del ciclo 2018. De la misma forma que el acahual y malla sombra con tutores vivos registraron los valores más altos de RFA, especialmente en el periodo de desarrollo de los frutos. Las diferencias entre estados de madurez indicaron que los frutos verdes más maduros (32 semanas) tuvieron coloraciones más amarillentas que los frutos más jóvenes (28 o 30 semanas), resultado de la degradación de pigmentos por efecto de la maduración de los frutos (Nagle *et al.* 2016).

En frutos beneficiados el cambio de color de verde-amarillento a café oscuro se asocia con la actividad de enzimas como la polifenol-oxidasa y peroxidasa que generan los cambios de color (Reyes-López *et al.* 2008; Van Dyk *et al.* 2010). De esta manera, se pudo observar que los frutos beneficiados del ciclo 2019 fueron más oscuros y opacos con tonos más rojizos que las colectas del ciclo 2018. De la Cruz-Medina *et al.* (2009) señalan que hay una correlación entre el tamaño y la apariencia de los frutos beneficiados con el aroma, de manera particular con el contenido de vainillina.

Sin embargo, existen diversos factores asociados a la acumulación de este metabolito, por lo cual a pesar de ser un importante parámetro de calidad visual no garantiza una buena calidad aromática.

Respecto a las características aromáticas de los frutos se encontraron diferencias estadísticas entre sistemas de manejo y estados de madurez, especialmente en el ciclo 2019. Un aspecto importante a destacar es que en los ciclos 2018 y 2019 los sistemas en acahual y malla sombra se diferenciaron por la concentración de compuestos aromáticos. Las diferencias entre sistemas de manejo se observaron principalmente en el ácido vanílico y glucovainillina. De acuerdo con Ranadive (1992) el ácido vanílico es uno de los metabolitos cuya acumulación es altamente influenciada por el ambiente, con base en este criterio se observó que los sistemas en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron mayor semejanza en la concentración de este compuesto y se diferenciaron del sistema en acahual (20 Soles). Este comportamiento sugiere que los sistemas en malla sombra pudieron tener una condición ambiental similar que favoreció una mayor producción de este ácido.

La acumulación de glucovainillina mostró un comportamiento similar, los frutos verdes cultivados en malla sombra mostraron mayor semejanza entre sí al tener concentraciones menores respecto a los frutos del sistema en acahual, los cuales tuvieron la concentración más alta del glucósido y representa un potencial mayor de vainillina. La acumulación de compuestos aromáticos menores (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico y *p*-hidroxibenzaldehído) en frutos verdes y beneficiados fue mayor en las colectas del ciclo 2018. La concentración de glucovainillina reportada en literatura oscila entre 130 mM (40, 880 ppm) (Brillouet *et al.* 2010) y 338 mM (94, 340 ppm) (Odoux 2003) lo cual coincide con lo reportado en este estudio.

La diferencia entre tejidos se observó principalmente en que el alcohol vanílico y 3,4-dihidroxibenzaldehído sólo se detectó en los frutos beneficiados. Referente a la acumulación de vainillina en frutos beneficiados de los ciclos evaluados (2018 y 2019) se encontraron concentraciones que oscilaron entre 8, 900-10, 100 ppm, sin embargo, esto corresponde a valores inferiores a los de referencia establecidos en la NOM-182-SCFI-2011 donde indica un mínimo de 20, 000 ppm. Destacó que en los ciclos evaluados se encontraron concentraciones fuera de lo establecido en norma por la baja concentración de vainillina y los altos valores de ácido vanílico.

Estas diferencias se pueden atribuir a la dimerización de la vainillina durante el beneficiado, lo que causa la disminución de la vainilla libre (Gatfield *et al.* 2007). Otra hipótesis para explicar este fenómeno es que la vainillina es oxidada por la peroxidasa (Pérez-Silva 2006; Odoux 2011). A partir de estos resultados y tomando como referencia la proporción de compuestos menores en relación a la vainillina, los frutos cultivados en el sistema en acahual (20 Soles) tuvieron las mejores características aromáticas ya que tuvo la menor proporción de compuestos menores y la mayor concentración de vainillina. Mientras que los frutos de los sistemas en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) presentaron mayor semejanza, pero una calidad aromática menor, respecto a los frutos cultivados en acahual.

Además de su importancia comercial y como recurso fitogenético, la vainilla ha mostrado tener un potencial uso terapéutico (Stankovic *et al.* 2016). Dentro de la actividad biológica que se ha reportado se encuentran su efecto antiinflamatorio (Lim *et al.* 2008), neuroprotector (Gupta y Sharma 2014), antifúngico (Kim *et al.* 2014) y antioxidante (Tai *et al.* 2011). Sin embargo, una de las actividades biológicas que más han sido estudiadas en vainilla es su capacidad antioxidante. Esta propiedad le permite inhibir daños por estrés oxidativo al captar radicales libres gracias a la presencia de metabolitos secundarios de tipo fenólico (Wu *et al.* 2011). Por ello, en el Capítulo V se presenta la evaluación de la capacidad antioxidante de frutos verdes y beneficiados con diferente madurez cultivados en diferentes sistemas de manejo.

La capacidad antioxidante de frutos verdes presentó diferencias estadísticas significativas entre sistemas de manejo y estados de madurez, mientras que en frutos beneficiados sólo se encontraron diferencias entre estados de madurez. Con respecto a la prueba de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) en frutos verdes, los sistemas en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) tuvieron los valores de  $CI_{50}$  más bajos para frutos verdes y beneficiados (9.11 y 9.03 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) en relación al sistema en malla sombra con tutores inertes (Barriles) (9.64 mg mL<sup>-1</sup>), lo que representa concentraciones menores del extracto para inhibir los radicales libres en 50 % por lo que se considera que poseen mayor capacidad antioxidante. La prueba ORAC mostró la misma tendencia, de manera que los frutos verdes cultivados en acahual y malla sombra con tutores vivos tuvieron valores más altos que las colectas en malla sombra con tutores inertes con un ORAC total de 14, 310.30 y 14, 926.40  $\mu$ M ET g<sup>-1</sup> MS, respectivamente.

En el caso de los frutos beneficiados también se observó esta tendencia y destacó que el  $CI_{50}$  se redujo aproximadamente a la mitad y los valores ORAC incrementaron, puesto que los frutos beneficiados presentan concentraciones mayores de compuestos fenólicos que le permiten captar mayor cantidad de radicales libres. De esta manera podemos mencionar que los frutos verdes y beneficiados cultivados en 20 Soles y Solteros de Juan Rosas tuvieron mayor capacidad antioxidante que las colectas de Barriles. Las diferencias entre estados de madurez indicaron que los frutos con 32 semanas tuvieron mayor capacidad antioxidante que los frutos de 30 semanas. Al respecto, Vázquez-Briones *et al.* (2019) señalan que la capacidad antioxidante de un alimento depende de la madurez fisiológica de los frutos, la condición ambiental, así como de las prácticas de manejo. Situación que se comprobó en este estudio.

Por otra parte, Lee *et al.* (2008) mencionan que extractos con  $CI_{50}$  menores a 10 mg mL<sup>-1</sup> presentan una eficiencia alta como antioxidantes, por lo que se puede decir que los extractos de vainilla, especialmente de frutos beneficiados, poseen una capacidad antioxidante alta. Los extractos de frutos verdes mostraron características semejantes al pepino (*Cucumis sativus*) con 7.21 mg mL<sup>-1</sup> (Djenidi *et al.* 2020) o el rambután (*Nephelium lappaceum*) 9.32 mg mL<sup>-1</sup> (Muhtadi *et al.* 2016). Mientras que de acuerdo con Torrenegra-Alarcón *et al.* (2016), los valores mostrados en este estudio sugieren que los frutos beneficiados tuvieron capacidad antioxidante superior a la mora (*Rubus glaucus* Benth) (79.16 mg mL<sup>-1</sup>), el agraz (*Vaccinium floribundum*) (53.33 mg mL<sup>-1</sup>) y la remolacha (*Beta vulgaris* L.) (141.88 mg mL<sup>-1</sup>). Pero tuvieron valores similares al té verde (*Camelia sinensis*) con 3.9 mg mL<sup>-1</sup> (Chang *et al.* 2020), zanahoria (*Daucus carota*) con 3.77 mg mL<sup>-1</sup> (Djenidi *et al.* 2020) y fresa (*Fragaria* sp.) con 5.6 mg mL<sup>-1</sup> (Hangun-Balkir y McKenney 2012).

A partir de los valores obtenidos en la prueba ORAC se puede mencionar que los extractos estudiados de frutos verdes tuvieron una capacidad antioxidante similar a especies como la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) 8515  $\mu$ M ET g<sup>-1</sup> MS (Dudonné *et al.* 2009), semillas de chía negra (*Salvia hispanica*) 9800  $\mu$ M ET g<sup>-1</sup> MS o arándanos (*Vaccinium corymbosum*) 9621  $\mu$ M ET g<sup>-1</sup> MS. En contraste con los frutos beneficiados que tuvieron características similares a la frambuesa negra (*Rubus occidentalis*) 19220  $\mu$ M ET g<sup>-1</sup> MS, páprika (*Capsicum annum*) 21932  $\mu$ M ET g<sup>-1</sup> MS o azafrán (*Crocus sativus*) 19571  $\mu$ M ET g<sup>-1</sup> MS (National Institute of Health 2020).

En términos generales se observó que, a nivel agronómico, la presencia de cuerpos de agua fue el principal factor común y uno de los de mayor importancia para preservar el cultivo en los diferentes sistemas de manejo. Los sistemas que comparten tutores vivos y densidad menor de plantas tuvieron frutos de mayor calidad en lo referente al peso y tamaño, aunque tuvieron un rendimiento más bajo. Así mismo, la radiación fotosintéticamente activa (RFA) y la humedad relativa (HR) fueron los parámetros con mayor influencia sobre el rendimiento de fruto. Mientras que la RFA y temperatura tuvieron mayor influencia en la acumulación de metabolitos secundarios. Respecto a las características aromáticas de los frutos, los frutos del sistema acahual tuvieron calidad aromática mayor respecto a los sistemas en malla sombra debido a una menor proporción de compuestos menores respecto a la vainillina (Figura 7.1).

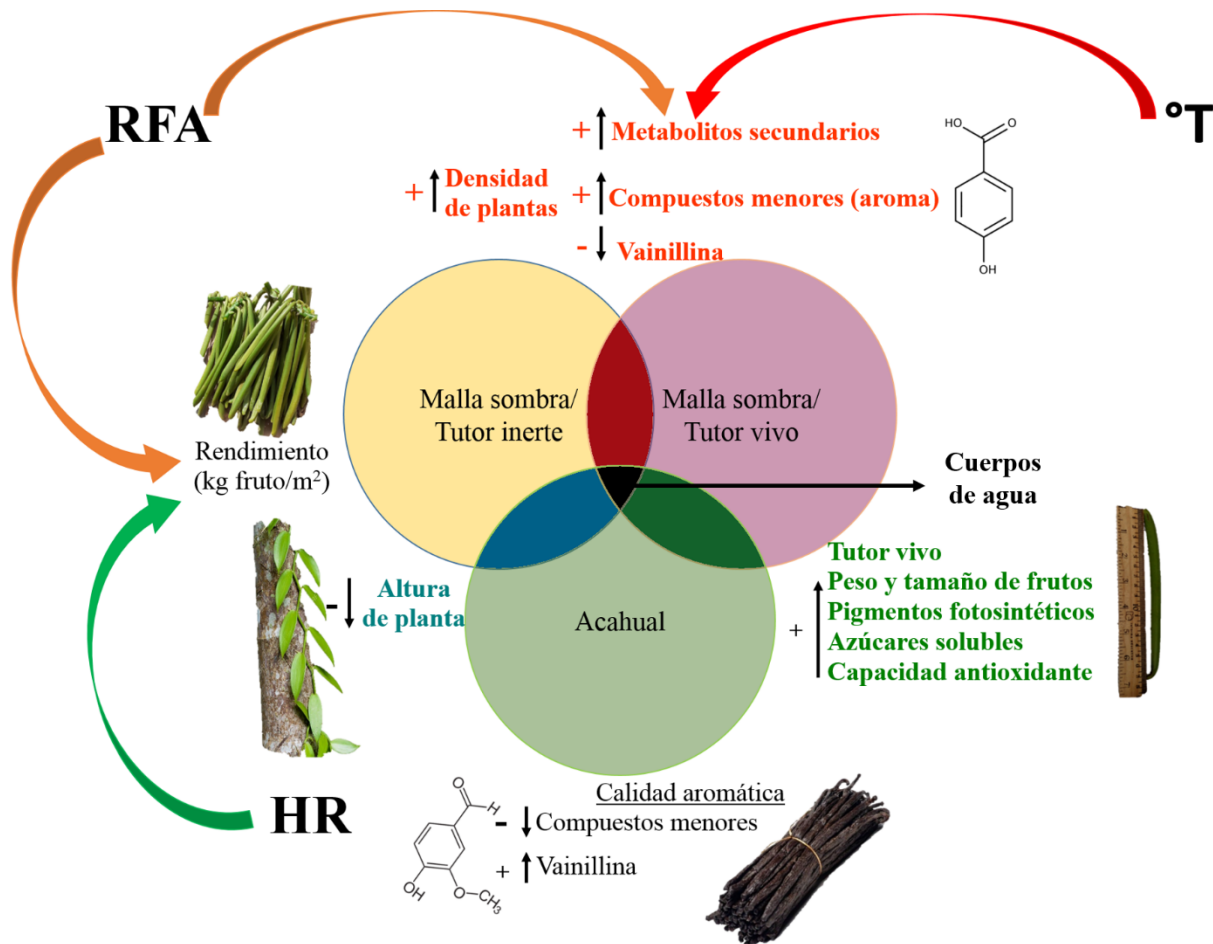


Figura 6.1. Asociación de los parámetros de clima (temperatura, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa) con variables agronómicas y químicas de *Vanilla planifolia*.

## CONCLUSIONES GENERALES

Con base en el planteamiento de la hipótesis general del trabajo: La concentración de metabolitos secundarios, características físicas y rendimiento en frutos de vainilla (*Vanilla planifolia*) varía en función de las prácticas de manejo, condición ambiental y madurez fisiológica. Se concluye que:

Las características del establecimiento y prácticas de manejo que realizan los productores en sus vainillales están determinadas por el propósito de cada uno. Las principales diferencias se centran en la calidad física de los frutos y rendimiento. Los sistemas establecidos en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) se caracterizaron por tener una densidad mayor de plantas respecto al sistema en acahual (20 Soles). Estas diferencias se reflejaron en el peso y tamaño de los frutos, ya que los frutos cultivados en acahual tuvieron peso y tamaño superior a los cultivados en malla sombra, por lo que tuvieron una mayor calidad física.

Con respecto al rendimiento de fruto, el sistema en acahual tuvo valores intermedios, con base en literatura se esperaba que los sistemas en malla sombra tuvieran los rendimientos más altos, aunque este fue el caso de Barriles no se observó en el sistema malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) ya que la presencia de enfermedades afectó de manera importante la producción de fruto. La humedad relativa y la radiación fotosintéticamente activa (RFA) fueron los parámetros de clima con mayor influencia sobre el rendimiento donde se correlacionaron principalmente con la densidad de inflorescencias (macetas) y frutos.

El sistema de manejo en los vainillales tuvo influencia en la calidad física, rendimiento de fruto y en su composición química. El tiempo de almacenamiento fue otro factor que influyó la acumulación de metabolitos primarios como los azúcares solubles al incrementar su concentración en frutos beneficiados debido a un proceso de glucosilación por frío. Los pigmentos fotosintéticos evaluados en frutos verdes fue un parámetro que permitió diferenciar los sistemas de manejo, los frutos en acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) tuvieron las concentraciones más altas de clorofilas, carotenos y xantofilas al tener mayor exposición a la RFA durante el ciclo de cultivo.



La influencia del sistema de manejo se observó en el contenido de metabolitos secundarios. Los frutos cultivados en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron la acumulación más alta de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides con lo que se logran diferenciar de los frutos en acahual (20 Soles), lo que sugiere una relación importante sistema de manejo-ambiente-metabolitos secundarios. Aunque también se encontraron diferencias entre ciclos de cultivo ya que el ciclo 2018 tuvo concentraciones mayores de los metabolitos en relación a 2019, atribuidas posiblemente a condiciones ambientales diferentes y probablemente de mayor estrés que favorecieron mayor acumulación de los compuestos. Los parámetros de clima de mayor correlación con los metabolitos primarios y secundarios fueron la RFA con los pigmentos fotosintéticos y azúcares. Mientras que la temperatura y humedad relativa tuvieron mayor asociación con los compuestos fenólicos y terpenoides.

Además de las diferencias en los perfiles de metabolitos secundarios, se encontraron diferencias en las características aromáticas y tamaño de los frutos verdes y beneficiados. Respecto a la calidad física de los frutos, las colectas de acahual (20 Soles) y malla sombra con tutores vivos (Solteros de Juan Rosas) registraron peso y tamaño superiores al sistema malla sombra con tutores inertes (Barriles). La evaluación de los metabolitos aromáticos en frutos verdes mostró que las colectas en acahual tuvieron concentraciones más altas de glucovainillina en relación a los sistemas en malla sombra, lo que representa una acumulación potencial mayor de vainillina. Las diferencias entre ciclos de cultivo también se observaron en la acumulación de glucósidos, puesto que el ciclo 2018 tuvo concentraciones de aproximadamente el doble respecto al ciclo 2019.

El perfil aromático en frutos beneficiados indicó la presencia de glucovainillina, lo que indica una hidrólisis incompleta del glucósido. Destacó también que el alcohol vanílico y 3,4-dihidroxibenzaldehído sólo se encontraron en frutos beneficiados. La concentración de vainillina fue menor a lo reportado en literatura, esto se asocia a procesos de dimerización y oxidación del compuesto. Así mismo, los sistemas en malla sombra (Barriles y Solteros de Juan Rosas) tuvieron mayor semejanza en la concentración alta de compuestos menores (ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico y *p*-hidroxibenzaldehído) y contenido menor de vainillina. Mientras que las colectas en acahual (20 Soles) tuvieron concentraciones más altas de vainillina y contenidos más bajos de los compuestos menores, lo que sugiere una calidad aromática mayor.

Por último, la capacidad antioxidante también marcó diferencias, entre sistemas de manejo, ya que la prueba DPPH mostró que los frutos cultivados en acahual (20 Soles) tuvieron valores  $CI_{50}$  menores. También se encontraron valores ORAC más altos en frutos verdes y beneficiados en frutos de acahual respecto al sistema malla sombra, por lo que tuvieron capacidad antioxidante mayor que los frutos de malla sombra.

### **PERSPECTIVAS Y ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN**

La presente investigación aportó información al conocimiento básico de *Vanilla planifolia* asociado principalmente a las diferencias entre sistemas de manejo y cómo las prácticas realizadas en cada uno de ellos se asocian a la producción de frutos y sus características químicas. Por ello, se proponen los siguientes planteamientos que permitirán desarrollar estudios bajo un enfoque similar a fin de proporcionar información útil para el productor y para el conocimiento científico:

- Realizar la evaluación en diferentes sistemas de cultivo de los componentes de rendimiento en al menos dos ciclos de cultivo más, que permitan sugerir nuevos elementos para complementar los propuestos en esta investigación y los reportados en literatura, ya que la información es aún limitada.
- Generar folletos a partir de la información obtenida en este estudio a fin de compartirla con los productores y que, junto con su conocimiento empírico, promuevan el desarrollo de **prácticas de manejo** al cultivo.
- Incrementar el número de repeticiones en la cuantificación de **compuestos aromáticos** para facilitar los análisis estadísticos multivariados y determinar con mayor certeza el o los parámetros de clima que favorecen una mayor producción de dichos metabolitos con el objetivo de obtener frutos de mayor calidad aromática.
- Realizar perfiles más amplios de **metabolitos secundarios** en los frutos de vainilla para identificar moléculas que puedan ser de interés por su potencial **actividad biológica**.

## 6.1. REFERENCIAS

- Akula, R., and Ravishankar, G.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11): 1720-1731.
- Amaral, J.S., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Pereira, J.A., and Ferreres, F. (2004). Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chemistry*, 88: 373-379.
- Anandaraj, M., Rema, J., Sasikumar, B., and Bhai, R.S. (2005). Vanilla (extension pamphlet). *Indian Institute of Spices Research, Calicut, Kelara, India*, 11 pp.
- Anikumar, A. (2004). Vanilla cultivation: A profitable agri-based enterprise. *Kerala Calling*, 26-30 pp.
- Arena, M.E., Postemsky, P., and Curvetto, N.R. (2012). Accumulation patterns of phenolic compounds during fruit growth and ripening of *Berberis buxifolia*, a native Patagonian species. *New Zealand Journal of Botany*, 50(1): 15-28.
- ASERCA. (2000). De nuestra cosecha. La vainilla en México, una tradición con un alto potencial. *Claridades Agropecuarias*, 101: 2-42.
- Azeez, S. (2008). Vanilla. En: V.A. Parthasarathy, B., Chempakam y T.J. Zachariah (Ed.). *Chemistry of Spices* (287-311 pp). Indian Institute of Spices Research, Kelara, India, CAB International.
- Azofeifa-Bolaños, J.B., Paniagua-Vázquez, A., y García-García, J.A. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1): 189-202.
- Baltazar-Nieto, P. (2010). Caracteres morfológicos de vainilla (*Vanilla planifolia* J.) utilizados por el agricultor en la selección de material reproductivo en cuatro municipios del Totonacapan, México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Puebla, México.
- Barrera-Rodríguez, A.I., Herrera-Cabrera, B.E., Jaramillo-Villanueva, J.L., Escobedo-Garrido, J.S., y Bustamante-González, A. (2009). Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* A.) bajo naranjo y en malla sombra en el Totonacapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(2): 199-212.
- Barrera-Rodríguez, A.I., Jaramillo-Villanueva, J.L., Escobedo-Garrido, J.S., and 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.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., and Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 216-232.
- Belitz, H.D., y Grosch, W. (1988). Química de los alimentos. Ed. Acribia España, Zaragoza.

- Berg, J.M. (2017). Light absorption by chlorophyll induces electron transfer. *Biochemistry*. 5<sup>th</sup> edition. U.S. National Library of Medicine.
- Bezerra, D.P., Soares, A.K.N., and de Sousa, D.P. (2016). Overview of the role of vanillin on redox status and cancer development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 1-9.
- Bhai, S., Dhanesh, J. (2008). Occurrence of fungal diseases in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in Kerala. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 17: 140-148.
- Bianchessi, P. (2004). Vanilla: agriculture and curing techniques. A photographic handbook for vanilla farmers. Veniu Vanilla Co. Santo, Vanuatu, 62 p.
- Blanco, A., Uccella, N., (2000). Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33: 475-485
- Bont, Z., Züst, T., Huber, M., and Erb, M. (2020). Variation in root secondary metabolites is shaped by past climatic conditions. <https://doi.org/10.1101/2020.01.25.919654>
- Borbolla-Pérez, V., Iglesias-Andreu, L.G., Escalante-Manzano, E.A., Martínez-Castillo, J., Ortiz-García, M.M., and Octavio-Aguilar, P. (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.
- Borbolla-Pérez, V., Iglesias-Andreu, L.G., Luna-Rodríguez, M., and Octavio-Aguilar, P. (2016a). Perceptions regarding the challenges and constraints faced by smallholder farmers of vanilla in Mexico. *Environment, Development and Sustainability* 19(6): 1-21.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.F., and Besse, P. (2008). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4): 551-571.
- Bouétard, Lefeuvre, P., Gigant, R., Bory, S., Pignal, M., Besse, P., and Grisoni, M. (2010). Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55:621-630.
- Brainina K.Z., Gerasimova E.L., Kazakov J.E., Khodos M. Oxidative stress: Nature, contribution to pathogenesis, protection and diagnosis. In: Budnikov G.K., editor. *Problems of Analytical Chemistry*. Nauka; Moscow, Russian: 2010. pp. 132–163.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28: 25-30.
- Brillouet, J.M., Odoux, E. (2010). *In vivo* kinetics of b-glucosidase towards glucovanillin and related phenolic glucosides in heat-treated vanilla pod (*Vanilla planifolia*, Orchidaceae). *Fruits*, 65(2): 85-95.
- Brillouet, J.M., Odoux, E., and Conejero, G. (2010). A set of data on green, ripening and senescent vanilla pod (*Vanilla planifolia*; Orchidaceae): anatomy, enzymes, phenolics and lipids. *Fruits*, 65: 221-235.

- Brochado, A.R., Telserow, A., Bobonis, J., Banzhaf, M., Mateus, A., Selkring, J., Huth, E., Bassler, S., Zamarréño, J., Zietek, M., Foerster, S., Ezraty, B., Py, B., Barras, F., Savitski, M., Bork, P., Göttig, S., and Typas, A. (2018). Species-specific activity of antibacterial drug combinations. *Nature*, 559: 259-263.
- Brodellius, P.E. (1994). Phenylpropanoid metabolism in *Vanilla planifolia* Andr. (V) high performance liquid chromatographic analysis of phenolic glycones in developing fruits. *Phytochemical Analysis*, 5:27-31.
- Bueno, J., Leuer, E., Kearney, M., Green, E.H., and Greenbaum, E.A. (2020). The preservation and argumentation of volatile terpenes in cannabis inflorescence. *Journal of Cannabis Research*, 2(27): 1-11.
- Cabrelli, D., Rebottaro, S., Effron, D. (2006). Caracterización del dosel forestal y del microambiente lumínico con diferente manejo, utilizando fotografía hemisférica. Quebracho (Santiago del Estero). Santiago del Estero.
- Cao, X., Yang, L., Xue, Q., Yao, F., Sun, J., Yang, F., and Liu, Y. (2020). Antioxidant evaluation-guided chemical profiling and structure-activity analysis of leaf extracts from five trees in *Broussonetia* and *Morus* (Moraceae). *Scientific Reports*, 10(1): 1-14.
- Caputi, L., and Aprea, E. (2011). Use of terpenoids as natural flavouring compounds in food industry. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, 3: 9-16.
- Carbonell-Bejarano, P., Maria, E.S., Torres-Pérez, R., Royo, C., Lijavetzky, D., Bravo, G. (2013). Thermotolerance responses in ripening berries of *Vitis vinifera* L. cv Muscar Hamburg. *Plant Cell Physiology*, 51: 1200-1216.
- Castillo-Martínez, R., y Engleman, E.M. (1993). Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*. *Acta Botánica Mexicana*, 25: 49-59.
- Castro, B.G. (2008). Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla. Tesis doctoral. Ecología y Manejo de Recursos Naturales. Instituto de Ecología, Veracruz, México. 93 p.
- Castro-Bobadilla, G., Martínez, A.J., Martínez, M.L., and García-Franco, J.G. (2011). Aplicación de riego localizado para aumentar la retención de frutos de *Vanilla planifolia* en el Totonacapan Veracruz. *Agrociencia*, 45: 281-291.
- Chaaban, H., Ioannou, I., Paris, C., Charbonnel, C., and Ghoul, M. (2017). The photostability of flavanes and evolution of their antioxidant activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 336: 131-139.
- Chang, C.I., and Lin, C.S. (2012). Phytochemical composition, antioxidant activity and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* Retzius extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1-7.

- Chang, M.Y., Lin, Y.Y., Chang, Y.C., Huang, W.Y., Lin, W.S., Chen, C.Y., Huang, S.L., and Lin, Y.S. (2020). Effects of infusion and storage on antioxidant activity and total phenolic content of black tea. *Applied Sciences*, 10: 1-10.
- Chaves, N., Santiago, A., and Alias, J.C. (2020). Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: Analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. *Antioxidant (Basel)*, 9(1): 1-14.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., and Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72: 1-20.
- Cicchetti, E., and Chaintreau, A. (2009). Quantitation of the main constituents of vanilla by reverse phase HPLC and ultra-high-pressure-liquid-chromatography with UV detection: Method validation and performance comparison. *Journal of Separation Science*, 32(17): 2043-3052.
- Consejo nacional de productores de vainilla. (2006). Logros y perspectivas de la vainilla en México. *Comité Nacional Sistema Producto Vainilla*, 1-30.
- Copolovici, L., and Niinemets, U. (2016). Environmental impacts on plant volatile emission. In: Blande, J.D., and Glinwood, R (Eds.) *Deciphering Chemical Language of Plant Communication*, Springer International Publishing, Switzerland, 175-210 pp.
- Curti-Díaz, E. (1995). Cultivo y beneficiado de la vainilla en México. Folleto técnico para productores. Organización Nacional de Vainilleros Indígenas. Papantla, Veracruz.
- Damirón-Velázquez, R. (2004). La vainilla y su cultivo. *Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria del Estado de Veracruz*, 50 p.
- De la Cruz-Medina, J., Rodríguez-Jiménes, G.C., and García, H.S. (2009). Vanilla: Post-Harvest operations. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1-50 p.
- Deborde, C., Moing, A., Roch, L., Jacob, D., Rolin, D., and Giraudeau, P. (2017). Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 102-103: 61-97.
- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). (2011). National nutrient database for standard reference. In: Charles, D.J. (Ed.) *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*, 566 pp.
- Derbesy, M., Uzio, R., Falque, V. (1989). Gousses de vainilla Comores. Banque de données pour la récolte 1989. *Parfums, cosmétiques, arômes*, 87: 77-90.
- Did-Pérez, T.S., y López-Malo, A. (2011). Extractos de vainilla: una mezcla de componentes químicos de aroma y sabor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1): 51-63.

- Díez, M.C., Moreno, F., and Gantiva, E. (2017). Effects of light intensity on the morphology and CAM photosynthesis of *Vanilla planifolia* Andrews. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 70(1): 8023-8033.
- Díez-Gómez, M.C., Osorio, N.W., and Moreno, F. (2015). Effect of dose and type of fertilizer on flowering and fruiting of vanilla plants. *Journal of Plant Nutrition*, 39(9): 1297-1310.
- Dignum, M.J.W., Kerler, J., and Verpoorte, R. (2001). Vanilla production: technological, chemical and biosynthetic aspects. *Food Revolution International*, 17(2): 199-219.
- Dignum, M.J.W., Van der Heijden, R., Kerler, J., Winkel, C., and Verpoorte, R. (2004). Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla  $\beta$ -glucosidase. *Food Chemistry*, 85:199-205.
- Djenidi, H., Khennouf, S., and Bouaziz, A. (2020). Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. *Progress in Nutrition*, 22(1): 224-235.
- Dodd, A.N., Borland, A.M., Haslam, R.P., Griffiths, H., and Maxwell, K. (2002). Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of Experimental Botany*, 53(369): 569-580.
- Dong, Z., Gu, F., Xu, F., and Wang, Q. (2014). Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. *Food Chemistry*, 149: 54-61.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P. Woillez, M., and Mèrillon, J.M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1768-1774
- Dunphy, P., and Bala, K. (2011). Green vanilla bean quality. *Perfumer & Flavorist*, 36: 38-46.
- Edreva, A. (2005). The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in the photoprotection. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106: 135-146.
- Elorza, M.P., López, H.M., Rodríguez, C.R., Maruri, G.J.M., Alarcón, P., A.S., and Elorza, M.O. (2014). Influence of light intensity on the photochemical activity of the vanilla plant (*Vanilla planifolia* Andr.). *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 2(4): 756-765.
- Exley, R. (2011). Vanilla production in Australia. In: D. Havkin-Frenkel y F.Belanger. *Handbook of Vanilla Science and Technology* (pp 69-78). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., and Clark, R. (2006). Physiology of growth and yield components in physiology of crop production. *Food Products Press*, Haworth Press Inc. Binghamton, New York, 61-94 p.
- Fang, X., Yang, C.Q., Wei, Y.K., Ma, Q.X., Yang, L., and Chen, X.Y. (2011). Genomics grand for diversity plant secondary metabolites. *Plant Diversity and Resources*, 33(1): 53-64.

- Fawole, O.A., and Opala, U.L. (2013). Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review. *Science Horticulturae*, 159: 152-161.
- Fernández-Pachón, M.A., Villaño, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2): 110-122.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J. (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23: 213-226.
- Fiorini, D., Molle, A., Nabissi, M., Santini, G., and Benelli G. (2019). Valorizing industrial hemp (*Canabis sativa* L.) by-products: Cannanidiol enrichment in the inflorescence essential oil optimizing sample pre-treatment prior to distillation *Industrial Crops and Products*, 128: 581-589.
- Fisher, C., and Scott, T.R. (1997). Introduction. Problems in flavor research. *Royal Society of Chemistry, London, UK*.
- Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A., and Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 104-113.
- Flores-Jiménez, A., Reyes-López, D., Jiménez-García, D., Romero-Arenas, O., Rivera-Tapia, J.A., Huerta-Lara, M., and Pérez-Silva, A. (2017). Diversidad de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y sus perfiles bioclimáticos en México. *Revista de Biología Tropical*, 65(3): 975-987.
- Fouché, J.G., and Jouve, L. (1999). *Vanilla planifolia*: history, botany and culture in Reunion Island. *Agronomie*, 19(8): 689-703.
- Franke, K., and Fischer, K. (2015). Inbreeding interferes with the heat-chock response. *Heredity*, 114: 80-84.
- Funk, C., and Brodelius, P. (1994). *Vanilla planifolia* Andrews: in vitro biosynthesis of vanillin and other phenylpropanoids derivatives. In: Bajaj YSP (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plants VI*. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 3377-402 pp.
- Gallage, N., Jorgensen, K., Janfelt, C., Nielsen, A.J.Z., Naake, T., Dunski, E., Dalsten, L., Grisoni, M., and Lindberg-Moller, B. (2017). The intracellular localization of the vanillin biosynthetic machinery in pods of *Vanilla planifolia*. *Plant and Cell Physiology*, 59(2): 304-318.
- Gallage, N.J., and Moller, B.L. (2018). Vanilla: The most popular flavour. In: Scwab, W., Lange, B., Wüst, M. (Eds.) *Biotechnology of natural products*. Springer. Cham.
- Gangadhara, N.B., Nagaraja, R., and Basavaraja, M.K. (2010). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vanillae*, the causal agent of stem rot of vanilla in vitro. *International Journal of Science and Nature*, 2(1): 259-261.



- Garfield, I.L., Hilmer, J.M., Weber, B., Reib, I., and Bertram, H.J. (2007). Chemical and biochemical changes occurring during the traditional Madagascan vanilla curing process. Flavor Biotechnology Recent Highlight in Flavour Chemistry and Biology. Proceeding of the Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biotechnolgy, 8<sup>th</sup>, Eisenach, Germany, Feb. 27-Mar. 2, 2007, 395-398.
- Ghazoul, J., and Satake, A. (2009). Nonviable seed set enhances plant fitness the sacrificial sibling hypothesis. *Ecology*, 90: 369-377.
- Ghorai, N., Chakraborty, S., Gucchait, S., Saha, S.K., and Biswas, S. (2012). Estimation of total terpenoids concentration in plants tissues using a monoterpene, linalool as standard reagent. *Nature Protocol Exchange*, 1-7.
- Gonçalves, J.F. and Santos Junior, U.M. (2005). Utilization of the chlorophyll a fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 307-313.
- Gouvea, D.R., Gobbo-Neto, L., Sakamoto, H.T., Lopes, N.P., López, J.L.C., Meloni, F., and Amaral, J.G. (2012). Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniaeae) leaves. *Química Nova*, 35(11): 2139-2145.
- Greer, D.H., and Weedon, M.M. (2013). The impact of high temperatures on *Vitis vinifera* cv. Semi lion grapevine performance and berry ripening. *Frontier Plant Science*, 4: 491.
- Gross, M., Lewinsohn, E., Tadmor, Y., Bar, E., Dudai, N., Cohen, Y., and Friedman, J. (2009). The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculu, vulgare* Mill. Var. *vulgare* Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4): 308-316.
- Gu, F., Chen, Y., Hong, Y., Fang, Y., and Tan, L. (2017). Comparative metabolomics in vanilla pod and vanilla bean revealing the biosynthesis of vanillin during the curing process of vanilla. *AMB Express*, 7(1): 1-9.
- Gupta, S.D., and Jatothu, B. (2013). Fundamentals and applications of light-emitting diodes LEDs in *in vitro* plants growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, 7: 211-220.
- Gupta, S., and Sharma, B. (2014). Pharmacological benefits of agomelatine and vanillin in experimental model of Huntington's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 122: 122-135.
- Gurnani, N., Kapoor, N., Mehta, D., Gupta, M., and Mehta, B.K. (2014). Characterization of chemical groups and identification of novel volatile constituents in organic solvent extracts of cured Indian vanilla beans by GC-MS). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 22(5): 769-776.

- Hagsater, E., Soto-Arenas, M.A., Salazar-Chávez, G.A., Jiménez-Machorro, R., López-Rosas, M.A., y Dressler, R.L. (2005). Las orquídeas de México. México: Instituto Chinoín, 304 p.
- Häkkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Mykkanen, H.M., and Torronen, A.R. (2000). Influence of domestic processing and storage on flavonol content in berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 290-2965.
- Halkier, B., and Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 203-333.
- Hangun-Balkir, Y., and McKenney, M.L. (2012). Determination of antioxidant activities of berries and resveratrol. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 5(2): 147-153.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831-2846.
- Haslam, R., Borland, A., Maxwell, K., and Griffiths, H. (2003). Physiological responses of the CAM epiphyte *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae) to variations in light and water supply. *Journal of Plant Physiology*, 160(6): 627-634.
- Havkin-Frenkel, D. (2018). Vanillin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-12.
- Heaton, J.W., and Marangoni, A.G. (1996). Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends in Food Science and Technology*, 7(1): 1-15.
- Helming, D., Ortega, J., Guenther, A., Herriick, J.D., and Geron, C. (2006). Sesquiterpene emissions from loblolly pine and their potential contribution aerosol formation in the Southeastern US. *Atmospheric Environment*. 40: 4150-4157.
- Hernández-Hernández, J. (2005). Comparación de dos sistemas de producción intensiva de vainilla. En: Avances en la investigación agrícola, pecuaria, forestal y acuícola en el trópico mexicano. *Libro Científico No. 2*, Veracruz, México, 81-94.
- Hernández-Hernández, J. (2007). Tecnología de casa-sombra: Producción intensiva de vainilla en la región del Totonacapan. *Revista Agroentorno*, 90(10): 1-4.
- Hernández-Hernández, J. (2011). Vanilla diseases-yellowing and shedding of Young fruits. In: Havkin-Frenkel, D., and Belanger, F.C. (Ed.). *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Wiley-Blackwell, USA, 32-33 pp.
- Hernández-Hernández, J., and Lubinsky, P. (2011). Cultivation systems. In: Odoux, E., Grisoni, M. (Eds.). *Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles*. 75-95 pp. CRC Press Taylor & Francis Group, United States of America.
- Hernández-Hernández, J. (2013). Técnicas implementadas para el cultivo de vainilla en México. En: Araya-Fernández, C., Cordero-Solórzano, R., Paniagua-Vázquez, A., and Azofoifa-Bolaño, J.B. (Eds.) Seminario Internacional de Vainilla. Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamérica, 81-92 pp.

- Hernández-Hernández, J. (2014). Técnicas implementadas para el cultivo de vainilla en México. En: Araya-Fernández, C., Cordero-Solórzano, R., Paniagua-Vásquez, A., y Azoifeifa-Bolaños, J.B. (Eds.) I Seminario Internacional de Vainilla, 81-92.
- Hernández-Hernández, J., Curti-Díaz, S.A., y Ríos-Utreta, A. (2019). Retención de frutos en *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews con reguladores de crecimiento. *Agronomía Mesoamericana*, 30(3): 695-704.
- Hilmer, J.M., Hammerschmidt, F.J., Lösing, G. (2010). Authentication of vanilla products. In: Odoux, E., and Grisoni, M. (EDs.). *Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants*. CRC Press Taylor and Francis Group. 237 pp.
- Hu, L., Mateo, P., Ye, M., Zhang, X., Berset, J.D., Handrick, V., and Erb, M. (2018). Plant iron acquisition strategy exploited by an insect herbivore. *Science*, 361: 694-697.
- Huynh, N.T., Van Camp, J., Smagghe, G., and Raes, K. (2014). Improved released and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15:19369-19388.
- Ibarra-Cantún, D. (2017). Estudio del contenido de compuestos fitoquímicos en hoja, tallo, flor, fruto verde y beneficiado de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la región del Totonacapan, México. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados Campus Puebla, Puebla, Pue.
- Ibarra-Cantún, D., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B.E., Soto-Hernández, R.M., Salazar-Rojas, V.M., and Aguilar, M.I. (2018). Effect of the environmental condition of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews cultivation on phytochemical concentration. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(2): 151-165.
- Iglesias-Andreu, L.G., Andrade-Torrez, A., Flores-Estévez, N., Giogana-Figueroa, J.L., Luna-Rodríguez, M., Nahuat-Dhib, S.L., Noa-Carrazana, J.C., Ortiz-Ceballo, A., Reyes-Sosa, C., Rodríguez-Gil, L., y Saenz-Carbonell, L.A. (2014). Establecimiento de las bases biotecnológicas y ecológicas en la mejora genética de *Vanilla planifolia* Jacqs. (Orchidaceae). *Cuadernos de Biodiversidad*, 45: 1-6.
- Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI). (2009). Declaratoria general de protección de la denominación de origen vainilla de Papantla. Diario Oficial de la Federación, México, 107-109.
- Jadhav, D., Rekha, B.N., Gogate, P.R., and Rathod, V.K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93 (4): 421-426.
- Jugran, A.K., Bahukhanidi, A., Dhyani, P., Rawal, R.S., and Snandi, K. (2016). Impact of altitudes and habitats on valerenic acid, total phenolics, flavonoids, tannins, and antioxidant activity of *Valeriana jatamansi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179: 911-926.

- Kahane, R., Besse, P., Grisoni, M., Le Bellec, F., and Odoux, E. (2008). Bourbon vanilla: natural flavour with a future. *Chronica Horticulturae*, 48(2): 23-38.
- Kandiannan, K., and Dinesh, R. (2008). Vanilla. In: Parthasarathy, V.A., Kandiannan, K., Srinivasan, V. (Eds.). *Organic Spices*. New Indian Publinsing Agency, New Delhi, Indica, 439-443 pp.
- Karmakar, B., Vohra, R.M., Nandanwar, H., Sharma, P., Gupta, K.G., and Sobti, C. (2000). Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiaicol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal of Biotechnology*, 80: 195-202.
- Karner, J. (2007). Vanilla lands. En J. Karner (pp 6-10). *The biography of vanilla*, Crabtree Publishing Company, Canada.
- Karthik-Kumar, R.B., and Balamohan, T.N. (2013). Factors affecting the quality of vanilla. A review. *Journal of Agriculture and Allied Sciences*, 2(3): 37-41.
- Khairunniza-Bejo, S., Kamaruddin, S. (2014). Determination of Chokanan mango sweetness (*Mangifera indica*) using non-destructive image technique. *Aust J. Crop Sci*, 8: 475-480.
- Khandaker, M.M., Idris, N.S., Ismail, S.Z., Majrashi, A., Alebedi, A., and Mar, N. (2016). Causes and prevention of fruit drop of *Syzygium samarangense* (Wax apple). *Advances in Environment Biology*, 10(11): 112-123.
- Kim, J.H., Lee, H.O., Cho, Y.J., Kim, J., Chun, J., Choi, J., Lee, and Y., Jung, W.H. (2014). A vanillin derivative causes mitochondrial dysfunction and triggers oxidative stress in *Cryptococcus neoformans*. *Public Library of Science ONE*, 9(2): e89122.
- Kim, J., and Buell, C.R. (2015). A revolution in plant metabolism: Genome-Enabled pathway discovery. *Plant Physiology*, 169: 1532-1539.
- Klimov, S.V., Burakhanova, E.A., Dubinina, I.M., Alieva, G.P., Salnikova, E.B., Olenichenko, N.A., Zagoskina, N.V., Trunova, T.I. (2008). Suppression of the source activity affects carbon distribution and frost hardiness of vegetating Winter plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55: 308-314.
- Korthou, H., and Verpoorte, R. (2007). Vanilla. En: Berger, R.G. (Ed.) *Flavours and Fragances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer, Germany. 203-213 pp.
- Kouri, E.H. (2000). La vainilla de Papantla: Agricultura, comercio y sociedad rural en el siglo XIX. *Signos Históricos*, 1(3): 105-130.
- Kouri, E.H. (2013). El cultivo y comercio de la vainilla mexicana. En E. Kouri (pp 23-64). *Un pueblo dividido. Comercio, propiedad y comunidad en Papantla, México*. Fondo de cultura económica. México.
- Kumaran, A., and Karunakaran, R.J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97: 109-114.

- Leakey, C.L.A. (1970). The balance between vegetative and reproductive growth of vanilla vines (*Vanilla fragans* Salisb. Ames) and its control in nature and in cultivation. *Acta Horticulturae*, 21: 151-157.
- Lebot, V., and Levesque, J. (1996). Genetic control of kavalactones chemotypes in *Piper methisticum* cultivars. *Phytochemistry*, 43: 397-403.
- Ledezma, E., Ramírez, G., and Pino-Benitez, N. (2006). Forest orchids of the Choco region. *Lyonia*, 10(1): 17-31.
- Lee, Y.L., Jian, S.Y., Lian, P.Y., Mau, J.L. (2008). Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21: 116-124.
- Leong, G., Archavlis, A., and Derbesy, M. (1989). Research on the glucosides fraction of the vanilla bean. *Journal of Essential Oil Research*, 1: 33-41.
- Leong, G. (1991). Contribution à l'étude des hétérorosides des gousses de vanilla vertes. Tesis Université d'Aix-Marseille III, Marseille, France, 152 p.
- Lesage-Meessen, L., Haon, M., Delattre, M., Thibault, J., Colonna-Ceccaldi, B. and Asther, M. (1997). An attempt to channel the transformation of vanillic acid into vanillin by controlling method hydroquinone formation in *Pycnoporus cinnabarinus* with cellobiose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47: 393-397.
- Levot, V., and Levesque, J. (1996). Genetic control of kavalactones hemotypical in *Piper methisticum* cultivars. *Phytochemistry*, 43: 397-403.
- Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M., Li, H.B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6: 6020-6047.
- Li, B., Förster, C., Robert, C.A.M., Züst, T., Hu, L., Machado, R.A.R., and Erb, M. (2018). Convergent evolution of a metabolic switch between aphid and caterpillar resistance in cereals. *Science Advances*, 4: 1-14.
- Lichtenthaler, H.K., and Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591-592.
- Lim, P.O., Kim, H.J., and Gil Nam, H. (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 115-136.
- Lim, E.J., Kang, H.J., Jung, H. J., Sing, Y.S., Lim, C.J., and Park, E.H. (2008). Anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of vanillin in ICR mice. *Biomolecules and Therapeutics*, 16: 132-136.
- López-Méndez, S., y Mata-García, B. (2006). La vainilla en el Totonacapan, símbolo de la sustentabilidad. *Extensión al Campo*, 1(2): 21-28.
- Lu, C., Lu, Q., Zhang, J., and Kuang, T. (2001). Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf

- senescence of wheat plants grown in the field. *Journal of Experimental Botany*, 362: 1805-1810.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández-Hernández, J., Kim, S.C., and Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia*) Jacks. [Orchidaceae]. *Economic Botany*, 6(2): 127-138.
- Malinovsky, F.G., Thomsen, M.L.F., Nintemann, S.J., Jagd, L.M., Bourguine, B., Burow, M., and Kliebenstein, D.J. (2017). An evolutionarily young defense metabolite influences the root growth of plants via the ancient TOR signaling pathway. *ELife*, 6: 1-24.
- Marchiosi, R., dos Santos, W.D., Constantin, R.P., Anderson, R., Finger-Teixeira, A., Mora, T., de Oliveira, D.M., Foletto-Felipe, M.P., and Ferrarese-Filho, O. (2020). Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*, 19: 865-906.
- Martínez-García, P.J., Dicenta, F., and Ortega, E. (2012). Anomalous embryo sac development and fruit abortion caused by inbreeding depression in almond (*Prunus dulcis*). *Scientia Horticulturae*, 13: 80-84.
- Mata, G.B., Silecio, L.M., González, M.V.C., Almaguer, V.G., Espinosa, R.E., Karla, V., Ortíz, B., y Fajardo, F.M. (2007). Agricultura con sabor cítrico y aroma de vainilla en la región del Totonacapan. Universidad Autónoma Chapingo, 285 p.
- Maturano, M. (2002). Estudio del uso del agua y nitrógeno dentro del marco de una agricultura sostenible en las regiones maiceras Castellano-Manchega y Argentina. Castilla-La Mancha University, Spain.
- Mazid, M., Khan, T.A., and Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2): 232-249.
- Mazza, O., and Miniati, C. (1994). Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC Press, Boca Ratón, Fl.
- McCarthy, M.G. (1986). Influence of irrigation, crop, thinning and canopy manipulation on composition and aroma of Riesling grapes. MSc Thesis. University of Adelaide, Adelaide, Australia.
- Menon, P.P., Kuruliva, K.M., and Madhusoodanan, K.J. (2002). Yield prediction in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) from Indian Cardamom Research Institute. *Proceeding of placrosym*, 414-415 pp.
- Menon, S., and Nayeem, N. (2013). *Vanilla planifolia*: A review of a plan commonly used as flavoring agent. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review*, 20(2): 225-228.
- Mishra, V.K., and Kumar, N. (2017). Microbial degradation of phenol: A review. *Journal of Water Pollution and Purification Research*, 4(1): 17-22.

- Mithöfer, A., and Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 431-450.
- Modise, D.M., Likuku, A.S., Thuma, M., and Phuti, R. (2009). The influence of exogenously applied 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on fruit drop and quality of navel oranges (*Citrus sinensis* L.). *African Journal of Biotechnology*, 8: 2131-2137.
- Mokhtar, M., Bouamar, S., Di Lorenzo, A., Temporini, C., Daglia, M., and Riazi, A. (2021). The influence of ripeness on the phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of pumpkins (*Cucurbita moschata* Duchesne). *Molecules*, 26: 3623.
- Moore, B.D., Andrew, R.L., Külheim, C., and Foley, W.J. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *The New Phytologist*, 201(3): 733-750.
- Moreno, F., and Díez, M.C. (2011). Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. 109.
- Mu, A., Llusià, J., Liu, D., Ogaya, R., Asensio D., Zhang, C., and Peñuelas, J. (2018). Seasonal and diurnal variations of plant isoprenoid emissions from two dominant species in Mediterranean shrubland and forest submitted to experimental drought. *Atmospheric Environment*, 191: 105-115.
- Muhtadi, M., Hartanto, R.E., and Wikantyasning, R. (2016). Antioxidant activity of nanoemulsion gel of rambutan fruit peel extracts (*Nephelium lappaceum* L.) using DPPH and FTC method. *The International Conference on Science, Technology, and Humanity*, At: Yogyakarta, Indonesia Volume 2.
- Müller, P., Li, A.P., and Niyogi, K.K. (2001). Non photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*. 125: 1558-1566.
- Nabavi, S.M., Samec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., Suntar, I., Rastrelli, L., Daglia, M., Xiao, J., Giampieri, F., Battino, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S.F., Yousefi, B., Jeandet, P., Xu, S., and Shirooie, S. (2018). Flavonoid biosynthetic pathway in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology Advances*, 38: 107316.
- Nagle, M., Intani, K., Romano, G., Mahayothee, B., Sardud, V., Müller, J. (2016). Determination of surface color of all yellow mango cultivars using computer vision. *Internation Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 9: 42-50.
- National Institute of Health. (2020). ORAC values: Antioxidant values of foods and beverages. Disponible en: <https://search.nih.gov/search?utf8=%E2%9C%93&affiliate=nih&query=antioxidant+values>. Consultado en: Julio 2021
- Nenadis, N., Lazaridou, O., Tsimidou, M. (2007). Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 5452-5460.

- Ngarmsak, M., Delaquis, P., Toivonene, P., Ngarmsak, T., Ooraikul, B., and Mazza, G. (2006). Antimicrobial activity of vanillin against spoilage microorganisms in stores fresh-cut mangoes. *Journal of Food Protection*, 69: 1724-1727.
- Norma Mexicana NMX-FF-074-SCFI-2009. Productos no industrializados para el uso humano – Vainillina – (*Vanilla fragans* (Salisbury) Ames – Especificaciones y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación.
- Norma Oficial Mexicana NOM-182-SCFI-2011. Vainilla de Papantla, extractos y derivados – Especificaciones, información comercial y métodos de ensayo (prueba). Diario Oficial de la Federación.
- Novacek, M.J., Mason, S.C., Galusha, T.D., and Yaseen, M. (2013). Twin rows minimally impact irrigated maize yield, morphology and lodging. *Agronomy Journal*, 105:268-276.
- Numpaque, M.A., Gil-González, J.H., and Durango-Restrepo, D.L. (2015). Biotransformation of ferulic acid by the phytopathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Lasiodiplodia theobromae*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 69(1): 7835-7844.
- Ober, D. (2005). Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 10: 444-449.
- Odoux, E. (2000). Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages on the process traditionally used for curing *Vanilla fragans* beans in Réunion. *Fruits*, 55(2): 119-125.
- Odoux, E., Escoute, J., Verdeil, J.L., Brillouet, J.M. (2003). Localization of b-glucosidase activity and glucovanillin in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews), *Annals of Botany*, 92: 437-444.
- Odoux, E., Escoute, J., and Verdeil, L. (2006). The relation between glucovanillin,  $\beta$ -D-Glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans. *Annals of Applied Biology*, 149: 43-52.
- Odoux, E., Brillouet, J.M. (2009). Anatomy, histochemistry and biochemistry of glucovanillin, oleoresin and mucilage accumulation sites in green mature vanilla pod (*Vanilla planifolia*; Orchidaceae): a comprehensive and critical reexamination. *Fruits*, 64: 221-241.
- Odoux, E. (2011). Vanilla curing. In: Odoux, E. and Grisoni, M. (Eds.). *Vanilla. Medicinal and aromatic plants-Industrial Profiles*, CRC Press Taylor and Francis Group, U.S., 173-188 pp.
- Osorio, A.I., Gómez, N.M., Arango, D.A., Moreno, F.H., Díez, M.C., and Osorio, N.W. (2011). Establecimiento y manejo del cultivo de vainilla. En: Moreno, F., and Díez, M.C. (Eds.) *Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 45-48 pp.



- Osorio, A.I., Osorio-Vega, N.W., Díez, M.C., and Moreno, F.H. (2014). Nutrient status and vegetative growth of *Vanilla planifolia* Jacks as affected by fertilization and organic substrate composition. *Acta Agronómica*, 63(4): 326-334.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., y Bansal, Y.K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3): 293-304.
- Palama, T.L., Khatib, A., Choi, Y.H., Payet, B., Fock, I., Verpoorte, R., and Kodja, H. (2009). Metabolic changes in different developmental stages of *Vanilla planifolia* pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7651-7658.
- Palama, T.L., Fock, I., Choi, Y.H., Verpoorte, R., and Kodja, H. (2010). Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry*, 71: 567-573.
- Palama, T.L., Khatib, A., Choi, Y.H., Come, B., Fock, I., Verpoorte, R., and Kadja, H. (2011). Metabolic characterization of green pods from *Vanilla planifolia* accessions grown in La Réunion. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 258-265.
- Paradiso, R., and De Pascale, S. (2014). Effects of plant size, temperature, and light intensity on flowering of Phalaenopsis hybrids in Mediterranean greenhouses. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-9.
- Pardio, V.T., Flores, A., López, K.M., Martínez, D.I., Márquez, O., and Waliszewski, K.N. (2018). Effect of endogenous and exogenous enzymatic treatment of Green vanilla beans on extraction of vanillin and main aromatic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6): 2059-2067.
- Park, C.W., Kang, H.Y., Ahn, K.W., Shin, W.S., Woo, J.M., Lee, J.W., Kim, K.W. (2011). Salud a través de los bosques. Academia Nacional de Ciencias Forestales. Desarrollo del programa de curación. Servicio Forestal de Corea.
- Pastore, C., Zenoni, S., Fasoli, M., Pezzotti, M., Tornielli, G.B. and Filippetti, I. (2013). Selective defoliation affects plant growth, fruit transcriptional ripening program and flavonoid metabolism in grapevine. *BMS Plant Biology*, 13: 30.
- Pavarini, D.P., Pavarini, S.P., Niehues, M., and López, N.P. (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*. 176: 5-16.
- Pellegrini, N., Miglio, C., Del Río, D., Salvatore, S., Serafini, M., and Brighenti. (2009). Effect of domestic cooking method on the total antioxidant capacity of vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(2): 12-22.
- Peng, X., Misawa, N., and Harayama, S. (2003). Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1417-1427.
- Peñuelas, J., and Llusià, J. (2001). The complexity of factors driving volatile organic compounds emissions by plants. *Biologia Plantarum*, 44: 481-487.

- Pérez-Silva, A. (2006). Contribution à l'étude de la genèse des composés d'arôme au cours du procédé mexicain de transformation de la vanille (*Vanilla planifolia* G. Jackson). The Sciences, Montpellier II, 136 pp.
- Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodríguez-Jiménez, G., Robles-Olvera, V., García-Alvarado, MA., and Günata, Z. (2006). GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, 99: 728-735.
- Pichersky, E., and Lewinsohn, E. (2011). Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual Revision of Plant Biology*, 62: 549-566
- Porrás-Alfaro, A., and Bayman, P. (2007). Mycorrhizal fungi of vanilla: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99: 510-525.
- Pradeepkumar, T., Jyothibhaskar, B.S., and Satheesan, K.N. (2008). Spices. En: Peter, K.V. (Ed.). *Management of Horticultural Crops Part II, Journal of Horticulture Science Series Vol. 11*. New India Publishing Agency, Pitam Pura, New Delhi.
- Pridgeon, A. (2000). The illustrated encyclopedia of orchids, Timber Press, Portland, Ore, USA.
- Puthur, J. (2005). Influence of light intensity on growth and crop productivity of *Vanilla planifolia* Andr. *General and Applied Plant Physiology*, 31(3-4): 215-224.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1): 76-89.
- Rahman, K.U., Thaleth, M.K., Kutty, G.M., and Subramanian, R. (2019). Pilot scale cultivation and production of *Vanilla planifolia* in the United Arab Emirates. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(6): 1143-1150.
- Ramachandra-Rao, S., and Ravishankar, G.A. (2000). Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 289-304.
- Ranadive, A.S. (1992). Vanillin and related flavor compounds in *Vanilla* extracts made from beans of various origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40: 1922-1924.
- Ranadive, A.S. (2005). Vanilla cultivation. *The Proceedings of the First International Congress*. Princeton, N.J, USA.
- Ranadive, A.S., Szukutnica, K., Guerrero, J.G., and Frenkel, C. (1983). Vanillin biosynthesis in vanilla beans, in: 9<sup>th</sup> International Congress of Essential Oils. Singapore, Malaysia, 147-154 pp.
- Ranadive, A.S. (2011). Quality control of vanilla beans and extracts. In: Havkin-Frenkel, D., and Belanger, F. (Eds.) *Handbook of Vanilla Science and Technology* (144-159 pp). United Kingdom, Blackwell Publishing.
- Rao, S.R., and Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101-153.

- Reyes-López, D., Rodríguez-Morales, B., Kelso, Bucio, H., Huerta-Lara, M., Ibañez-Martínez, A. (2008). Beneficiado tradicional de vainilla. México. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla México.
- Rivera-Espinoza, Y., and Muriel, P. (2013). Vanilla. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 2(11): 203-210.
- Rocha-Flores, R.G.; Herrera-Cabrera, B.E., Velasco-Velasco, J., Salazar-Rojas, V.M., Delgado-Alvarado, A., Mendoza-Catillo, 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.
- Sadras, V.O., and Petrie, P.R. (2011). Climate shifts in south-eastern Australia: Early maturity of Chardonnay, Shiraz and Cabernet Sauvignon is associated with early onset rather than faster ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2): 199-205.
- Sagrero-Nieves, L., and Schwartz, S.J. (1988). Phenolic content of *Vanilla planifolia* as affected by harvest period. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1(4): 362-365.
- Salau, O.R., Momoh, M., Olaleye, O.A., Owoeye, R.S. (2016). Effects of changes in temperature, rainfall and relative humidity on banana production in Ondo state, Nigeria. *World Scientific News*, 44: 143-154.
- Salazar-Rojas, V.M., Herrera-Cabrera, B.E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo-González, F. and Cobos-Peralta, M. (2011). Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla – Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 59(5): 875-887.
- Salazar-Rojas, V.M., Sandobal-Zapotitla, E., Granados-Herrera, C.V., Cruz-Ruíz, Y., Herrera-Cabrera, B.E., y Campos-Contreras, J.E. (2016). Descripción estructural y funcional de caída prematura de frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad*, 9(11-B): 17-18.
- Saltveit, M.E. (2017). Synthesis and metabolism of phenolic compounds. In: Yahia, E.M. (Ed.) *Fruit and vegetable phytochemicals. Chemistry and Human Health* 2<sup>nd</sup> edition. 115-124 pp.
- Sánchez-Morales, S., Becerril-Román, A.E., Tijerina-Chávez, L., y Santizo-Rincón, J.A: (2001). Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24(1): 49-56.
- Santillán-Fernández, A., Trejo-Cabrera, M., Martínez-Sánchez, A., Martínez-Ángel, L., Vázquez-Bautista, N, and Luis-Mejía, S. (2019). Production potential of *Vanilla planifolia* Jacks in Totonacapan, Mexico, using geographic techniques. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4): 789-802.
- Sarangi, P.K., and Sahoo, H.P. (2009). Standarization of cultural conditions for maximum vanillin production through ferulic acid degradation. *Report and Opinion*, 1(5):49-51.

- Sarma, Y.R., Thomas, J., Sasikumar, B., and Varadarasa, S. (2011). Vanilla production in India. In: Odoux, E., and Grisoni, M. (Eds.). *Vanilla. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Ratón, FL. USA, 420 p.
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., and Gupta, A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6): 168-182.
- Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., and Kogel, K.H. (2009). Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant Journal*, 59(3): 461-474.
- Scholes, J.D., Lee, P.J., Horton, P., y Lewis, D.H. (1994). Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist*, 126, 213-222.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Plan rector del sistema producto vainilla en el estado de Puebla. (2012). Plan rector sistema producto vainilla, 57 p.
- Seigler, D.A. (2000). Plant secondary metabolism. Review. *New Physiology*, 147: 483-485.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*. 1054: 113-127.
- Shanmugavalli, N., Umashankar, V., and Raheem, A. (2009). Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(3): 37-40.
- Sharkey, T.D., and Yeh, S. (2001). Isoprene emission from plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 407-436
- Sharma, K., Ko, E.Y., Assefa, A., Ha, S., Nile, S.H., Lee, E.T., Park, S.W. (2015). Temperature-dependent studies on the total phenolic, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2): 243-252.
- Shyamala, B.N., Naidu, M.M., Sulochanamma, G., and Srinivas, P (2007). Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19): 7738-7743.
- Silva-Beltrán, N.P., Ruíz-Cruz., S., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Ornelas-Paz, J.J., López-Mata, M.A., Del Toro-Sánchez, C.L., Ayala-Zavala, J.F., and Márquez-Ríos, E. (2015). Total phenolic, flavonoid, tomatine and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. *International Journal of Analytical Chemistry*, 284071: 1-10.
- Singsaas, E.L., Lerda, M., Winter, K., and Sharkey, T.D. (1997). Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting leaves. *Plant Physiology*, 115: 1413-1420.

- Singsaas, E.L. (2000). Terpenes and the thermotolerance of photosynthesis. *New Phytology*, 146(1): 1-2.
- Sinha, A.K., Sharma, U.K., and Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Sciences and Nutrition*, 59(4): 299-326.
- Soto-Arenas, M.A. (2003). Vanilla. En: Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W., and Rasmussen, F (Ed.). *Genera Orchidacearum: Orchidoideae*. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Soto-Arenas, M.A. (2006). Los retos de un cultivo basado en una especie amenazada con una historia de vida completa. En: Memoria del Congreso Internacional de Productores de Vainilla. Papantla, Veracruz, Mayo.
- Soto-Arenas, M.A. (2006a). La vainilla: Retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. *Biodiversitas*, 66: 1-9.
- Soto-Arenas, M.A., y Solano-Gómez, A.R. (2007). Ficha técnica de *Vanilla planifolia*. En: Soto-Arenas, M.A. (Compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C. Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México, D.F.
- Soto-Arenas, M.A. (2009). Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla*. Reporte intermedio. *Instituto Chinoín, A.C.*
- Soto-Arenas, M.A., and Dressler, R.L. (2010). A revision of the mexican and central american species of *Vanilla plumier* ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana International Journal of Orchidology*, 9: 285-354.
- Soto-Hernández, M., García-Mateos, R., Palma-Tenango, M. (2019). Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. In: Soto-Hernández, M., García-Mateos, R., Palma-Tenango, M. (Eds.) *Plant physiological aspects of phenolic compounds*.
- Sowokinos, J.R. (2001). Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes. *American Journal of Potato Research*. 78: 221-236
- Stankovic, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatkovic, B., Stankov-Jovanovic, V., Mitic, V., Jovic, J., Comic, L., Kocic, B., and Bernstein, N. (2016). Antibacterial antioxidant activity of traditional medicinal plants from the Balkan. NJAS-Wageningen. *Journal of Life Sciences*. 78: 21-28.
- Sujatha, S. and Bhat, R. (2010). Response of vanilla (*Vanilla planifolia* A.) intercropped in arecanut to irrigation and nutrition in humid tropics of India. *Agricultural Water Management*, 97(7): 988-994.

- Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., and Ito, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1810: 170-177.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. In: *Plant Physiology*, Sinauer Associates.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2009). Auxina: a hormônio de crescimento. *Fisiología Vegetal Vol. 3*. Capítulo 7, 449-484 p.
- Takahashi, M., Inai, Y., Miyazawa N., Kurobayashi, Y., and Fujita, A. (2013). Identification of the key odorants in tahitian cured vanilla beans (*Vanilla tahitensis*) by GC-MS and an aroma extract dilution analysis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(3): 601-605.
- Takahashi, M., Inai, Y., Miyazawa, N., Kuribayashi, Y., and Fujita, A., (2013). Key odorants in cured Madagascar vanilla beans (*Vanilla planifolia*) of differing bean quality. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77: 606-611.
- Tanaka, E., Ávila-Quezada, G., Gardea, A.A., Muñoz, E., Ruíz, J.M., and Romero, L. (2009). Nitrogen metabolism in roots and leaves of Green bean plants exposed to different phosphorous doses. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 78: 11-16.
- Tang, Y., Kayan, B., Boser, N., and Pate, B. (2007). Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *Journal of Chromatography A*. 1152(1-2): 262-267.
- Tavares-González, F.B. (2018). Caracterización aromática y genética de cultivares de vainilla (*Vanilla* sp.) de México. Tesis de Doctorado, Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, Ver.
- Toledo, V.M., Ortiz, B., and Medellín, S. (1994). Biodiversity islands in a sea of pasturelands: indigenous resource management in the humid tropics of Mexico. *Etnoecología*, 2(3): 37-49.
- Tombe, M., and Liew, E.C.Y. (2011). Fungal diseases of vanilla. In: Odoux, E. and Grisom, M. (Eds.). *Vanilla*. CRC Press, Boca Ratón, FL.
- Torrenegra-Alarcón, M.E., Villalobos-Lagares, O.L., Castellar-Abello, E.A., León-Méndez, G., Granados-Conde, C., Pájaro, N.P., Caro-Soto, M.S. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante de las pulpas de *Rubus glaucus* B., *Vaccinium floribundum* K., y *Beta vulgaris* L. *Revista Cubana de plantas Medicinales*, 21(4): 1-8.
- Toth, S., Lee, K.J., Havkin-Frenkel, D., Belanger, F.C., and Hartman, T.G: (2011). Volatile compounds in vanilla: In: Havkin-Frenkel, D. and Belanger, F.C: (Eds.). *Handbook of vanilla science and technology*, USA, Wiley-Blackwell Pub, 183-219 pp.
- Turek, C., and Stintzing, F.C., (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 40-53.

- Uriarte-Pueyo, I., and Calvo, M.I. (2009). Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content. *Fitoterapia*, 80:8: 465-467.
- Valladares, F., and Niinemets, U. (2008). Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 39: 237-257.
- Van Dyk, S., Barry-McGlasson, W., Williams, M., and Gair, C. (2010). Influence of curing procedures on sensory quality of vanilla beans. *Fruits*, 65(6): 387-399.
- Van Dyk, S., Holford, P. Subedi, P., Walsh, K., Williams, M., and McGlasson, W.B. (2014). Determining the harvest maturity of vanilla beans. *Scientia Horticulturae*, 168: 249-257.
- Varela-Quirós, E. (2011). Vanilla production in Costa Rica. In: Havkin-Frenkel, D., and Belanger, F. (Eds.), *Handbook of Vanilla Science and Technology*, 40-49 pp.
- Vargas-Hernández, J. (2014). Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la sierra huasteca potosina. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Centro de investigación Regional Noreste Campo Experimental San Luis, San Luís Potosí, S.L.P. 31 p.
- Vázquez-Briones, M.C., Chávez-Reyes, Y., and Mata-García, M. (2019). Frutas tropicales como fuentes de antioxidantes y sus perspectivas en la industria de bebidas. *Ciencias biológicas y químicas*, 1:68-81.
- Venegas-Casanova, E.A. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *Scientia*, 4(2): 161-174.
- Verma, N., and Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plant*, 2(4): 105-113.
- Verpoorte, R., and Alfermann, A.W. (2013). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Springer Science and Business Media.
- Villarreal-Manzo, L.A., y Herrera-Cabrera, B.E. (2018). Requerimiento hídrico en el sistema de producción vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)-Naranja (*Citrus sinensis* L.) en la región del Totonacapan. Veracruz, México. *Agroproductividad*, 11(3): 29-36.
- Voragen, A.G.J., Schools, H.A., and Gruppen, H. (1993). Structural studies of plant cell-wall polysaccharides using enzymes. In: Meuser, F., Manners, D.J., Siebel, W. (Eds.) *The Proceedings of the International Symposium on Plant Polymeric Carbohydrates*, Berlin, 1-3. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK., 1-5 pp.
- Wang, S., Chen, C.T., and Wang, C.Y. (2009). The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chemistry*, 112: 676-684.
- Waterman, P.G., and Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Methods in Ecology, Oxford.

- Weeranwatanakorn, M., Wu, J.C., Pan, M.H., and Ho, C.T. (2015). Reactivity and stability of selected flavor compounds. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2): 176-190.
- Widhalm, J.R., and Dudareva, N. (2015). A familiar ring to it: Biosynthesis of plant benzoic acids. *Molecular Plant*, 8(1): 83-97.
- Wink, M (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3-19.
- Wongsheree, T., Wongs-Aree, C., Srilaong, V., and Jitareerat, P. (2013). Vanilla cultivation and curing in Thailand. *Acta Horticulturae*, 1011: 213-218.
- Wu, Y.Y., Li, W., Xu, Y., Jin, E.H., and Tu, Y.Y. (2011). Evaluation of the antioxidant effect of four main tea flavin derivatives through chemiluminescence and DNA damage analyses. *Journal Zhejiang University Science*. 12: 744-751.
- Xie, X.B., Li, S., Zhang, R.F., Zhao, J., Chen, Y.C., Zhao, Q., Yao, Y.X., You, C.X., Zhang, X.S., and Hao, Y.J. (2012). The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin accumulation and fruit coloration in response to low temperature in apples. *Plant Cell Environment*, 35: 1884-1897.
- Xochipa-Morante, R.C. (2015). Influencia del proceso de beneficiado en la calidad de los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* J. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Puebla, 42-53 pp.
- Yamagishi, S., and Matsui, T. (2011). Nitric oxide, a Janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy-friend or foe. *Pharmacological Research*, 64: 187-194.
- Yang, Y., Kayan, B., Bozer, N., Pate, B., Baker, C., and Gizir, A.M. (2007). Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1152: 262-267.
- Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L., and Hongbo, S. (2009). Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology*, 8(10): 2004-2010.
- Zaubin, R., Tombre, M., and Liew, E.C.Y. (2011). Vanilla production in Indonesia. In: Odoux, E., Grisoni, M. (Eds.). *Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles*. 283-294 pp. CRC Press Taylor & Francis Group, United States of America.
- Zhang, S., and Mueller, C., (2012). Comparative analysis of volatiles in traditionally cured Bourbon and Ugandan vanilla bean (*Vanilla planifolia*) extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60: 10433-10444.
- Zhang, M.X., Wen, Y.Q., and Duan, C.Q. (2012). Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of antocyanins in grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*. 57: 74-83.
- Zhang, W., Liu, T., Ren, G., Hörtenseiner, S., Zhou, Y., Cahoon, E.B., and Zhang, C. (2014). Chlorophyll degradation: The tocopherol biosynthesis-Related phytol hydrolase in *Arabidopsis* seeds is still missing. *Plant Physiology*, 166(1): 70-79.



- Zhang, W., Liu, T., Ren, G., Hörtenseiner, S., Zhou, Y., Cahoon, E.B., and Zhang, C. (2014a). Chlorophyll degradation: The tocopherol biosynthesis-Related phytol hydrolase in *Arabidopsis* seeds is still missing. *Plant Physiology*, 166(1): 70-79.
- Zhang, Y., Mo, L., Chen, F., Lu, M., Dong, W., Wang, Q., Xu, F., and Gu, F. (2014b). Optimized production of vanillin from green vanilla pods by enzyme-assisted extraction combined with pre-freezing and thawing. *Molecules*, 19: 2181-2198.
- Zotz, G., and Andrade, J.L. (2002). La ecología y la fisiología de las epífitas y las hemiepífitas. En: Kattan, G.H., and Guariguata, M.R. (Ed.). *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Libro Universitario Regional, San José, Costa Rica, 691 p.
- Zúñiga-Bravo, F.G. (2014). Las transformaciones del territorio y el patrimonio cultural en el totonacapan veracruzano, México, basadas en la actividad turística como estrategia de desarrollo regional. *Cuadernos de Turismo*, 34: 351-372.