

# ACLIMATACIÓN DE HÍBRIDOS INTRAESPECÍFICOS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, OBTENIDOS *in vitro*

## ACCLIMATION OF INTRA-SPECIFIC HYBRIDS OF *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, OBTAINED *in vitro*

Hernández-Leal, E.<sup>1</sup>; Castillo-Martínez, C.R.<sup>4</sup>; Reyes-López, D.<sup>2\*</sup>; Corona-Torres, T.<sup>1</sup>; Avendaño-Arrazate, C.H.<sup>5</sup>; García-Zavala, O.J.J.<sup>1</sup>; Vaquera-Huerta, H.<sup>3</sup>; Villalobos-Navarro, F.<sup>4</sup>; Bonilla-Barrientos, O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Genética, Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. <sup>2</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Agrohidráulica. Dom. Con. San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. <sup>3</sup>Programa en Estadística, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. <sup>4</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos, Boulevard de la Biodiversidad Núm. 400, Col. Centro CP. 47600, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. <sup>5</sup>INIFAP-Campo Experimental Rosario-Izapa, INIFAP.

\*Autor para correspondencia: delfino\_reyes2001@yahoo.com.mx

### RESUMEN

Se desarrollaron vitroplantas de genotipos híbridos intraespecíficos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews obtenidos por semilla, ya que éstas no germinan de manera natural por falta de reservas nutritivas. Para asegurar la mayor sobrevivencia se evaluaron dos técnicas de preaclimatación y una de aclimatación utilizando 21 cruza intraespecificas y una autofecundación. Las vitroplantas tuvieron 4-7 cm de longitud y tres raíces. Se colocaron en recipientes de plástico de un litro con sustrato Peat moss® con los tratamientos: T<sub>1</sub> un vaso de plástico usado como tapa del frasco, T<sub>2</sub> una bolsa de nylon transparente como tapa, y en ambos casos cinco plantas por cruza. Ambos tratamientos se llevaron a cámara de germinación a 26 °C y 70% de humedad relativa. A los 53 días después de la preaclimatación se llevaron a un módulo de malla sombra (80%) para su aclimatación. Existieron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos de preaclimatación, registrando T<sub>2</sub> con mejores porcentajes de sobrevivencia de vitroplantas, debido que la técnica permitió un cambio gradual de las condiciones *in vitro* a las condiciones *ex vitro*. En la fase de aclimatación también se observó diferencias estadísticas significativas entre las cruza ( $P \leq 0.05$ ) debido a su condición genética.

**Palabras clave:** Sobrevivencia, vainilla, vitroplantas.

### ABSTRACT

Vitroplants were developed of intra-specific hybrid genotypes from *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews obtained by seed, since these do not germinate naturally for lack of nutritional reserves. To ensure the longest survival, two techniques for pre-acclimation were evaluated, and one for acclimation, using 21 intra-specific crosses and one self-fertilization. Vitroplants had 4-7 cm of length and three roots. They were placed in one-liter plastic recipients with Peat moss® substrate with the following treatments: T<sub>1</sub> one plastic cup used as tap for the container, T<sub>2</sub> one transparent nylon bag as lid, and in both cases five plants per cross. Both treatments were taken to the germination chamber at 26 °C and 70 % relative humidity. At 53 days after pre-acclimation they were taken to a module of shade mesh (80 %) for acclimation. Significant differences were found ( $P \leq 0.05$ ) between pre-acclimation treatments, finding T<sub>2</sub> with better percentages of vitroplant survival, because the technique allowed a gradual change from *in vitro* conditions to *ex vitro* conditions. During the acclimation phase, significant statistical differences were also observed between the crosses ( $P \leq 0.05$ ) due to their genetic condition.

**Keywords:** survival, vanilla, vitroplants.

**Agroproductividad:** Vol. 9, Núm. 11, noviembre. 2016. pp: 72-77.

**Recibido:** febrero, 2016. **Aceptado:** septiembre, 2016.

## INTRODUCCIÓN

La diversidad genética en las plantaciones de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) y el resto del mundo es limitada (Cibrián, 1999; Besse et al., 2004), ya que su modo de reproducción comercial es asexual por medio de segmentos cortados de tallo lo que hace que no se presente variación genética entre individuos (Divakaran et al., 2006) por otro lado para la obtención de frutos comerciales (Cápsulas o silicuas), las flores se polinizan manualmente en campo (Soto, 1999), pero los frutos contienen sustancias que inhiben la germinación de las semillas (Augstburger et al., 2000) y aunque éstas, contenidas en una capsula son numerosas (2-3 millones), se estima que sólo 2% a 3% pueden germinar en condiciones naturales (Luan et al., 2006). Una estrategia para ampliar la base genética en poblaciones con limitada variabilidad es el uso de la hibridación, en el caso de vainilla pueden utilizarse especies como *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. odorata* y *V. phaeanta* (Soto, 1999; Menchaca et al., 2011). Para la producción comercial de muchas orquídeas la germinación *in vitro* de sus semillas es importante (Arditti, 1984). Las plántulas obtenidas *in vitro* realizan fotosíntesis, sin embargo, al transferirse a condiciones *ex vitro* para su aclimatación, generalmente disminuyen el desarrollo y rendimiento fotosintético, debido a la falta de las condiciones particulares del cultivo *in vitro*, tales como alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, y baja concentración de CO<sub>2</sub> (Kadlecek et al., 2001). Dentro de un programa de mejoramiento genético en vainilla es necesario la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* para la obtención de vitroplantas híbridas. Sin embargo, es la transición de cultivo *in vitro* a cultivo *ex vitro* donde se debe asegurar

su sobrevivencia para ser establecidas en su lugar definitivo, por lo que en el presente trabajo se describen técnicas de preaclimatación utilizando 21 cruza intraespecíficas de *Vanilla planifolia*, y una autofecundación para posteriormente aclimatarlas en su lugar definitivo, conocimientos que contribuirán a fortalecer la fase de preaclimatación y aclimatación en vainilla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## Pre-aclimatación y aclimatación de híbridos

En el ciclo agrícola primavera-verano del 2013, se realizaron cruza con las accesiones del banco de germoplasma de vainilla de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), ubicado en Tenampulco, Puebla, México, el cual tiene un clima cálido-húmedo con abundantes lluvias en verano y una altitud de 210 m (INEGI 2006). Los frutos (Capsulas) de 21 cruza y una autofecundación (Cuadro 1) fueron cosechados a los 70 días después de la fecundación y se trasladaron al laboratorio de cultivo *in vitro* del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) ubicado en Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, para su regeneración *in vitro*.

Al término de la etapa de micropropagación, se sembraron 10 plántulas por cruza y por testigo. La siembra se realizó en recipientes de plástico transparente de un litro, como sustrato se utilizó peat moss®, el cual se esterilizó por 25 min en una olla exprés marca Vasconia® modelo 25X-1, fue hidratado con agua destilada estéril. Los vasos se llenaron a la mitad (0.5 L), las plántulas se extrajeron de los tubos de ensaye con pinzas estériles, se lavaron las raíces en un vaso con agua destilada estéril para eliminar

**Cuadro 1.** Material biológico para cruza intraespecíficas de *Vanilla planifolia* en 2013.

Accesión	Especie	♂	♀	Lugar de colecta
2	<i>V. planifolia</i> clon		×	Ejido La Corona, Márquez de Comillas, Chiapas
16	<i>V. planifolia</i> clon		×	San Javier Ocosingo, Chiapas
20	<i>V. planifolia</i> clon		×	Nuevo Becar, Othón P. Blanco, Quintana Roo
21	<i>V. planifolia</i> clon	×	×	Nuevo Becar, Othón P. Blanco, Quintana Roo
27	<i>V. planifolia</i> clon	×	×	Tenampulco El Viejo, Tenampulco, Puebla
28	<i>V. planifolia</i> clon		×	Tenampulco El Viejo, Tenampulco, Puebla
35	<i>V. planifolia</i> clon	×	×	La Palapa, Tenampulco, Puebla
36	<i>V. planifolia</i> clon	×		Primero de Mayo, Papantla, Veracruz
39	<i>V. planifolia</i> clon	×	×	Primero de Mayo, Papantla, Veracruz
41	<i>V. planifolia</i> clon		×	Segundo Cantón Fracción Villanueva, Tapachula, Chiapas
69	<i>V. planifolia</i> clon		×	Huatusco, Othón P. Blanco, Quintana Roo
71	<i>V. planifolia</i> clon	×		Huatusco, Othón P. Blanco, Quintana Roo
111	<i>V. planifolia</i> clon	×		Miahuatlán, Tihuatlán, Veracruz
112	<i>V. planifolia</i> clon	×	×	Copales Arroyo Blanco, San José Acateno, Puebla
115	<i>V. planifolia</i> clon	×		San Rafael, Veracruz
124	<i>V. planifolia</i> clon	×	×	Tihuatlán, Veracruz
195	<i>V. planifolia</i> clon	×		Caracoles, Tenampulco, Puebla
196	<i>V. planifolia</i> clon		×	Caracoles, Tenampulco, Puebla

♂=progenitor masculino; ♀=progenitor femenino.

los excesos de agar y evitar contaminaciones por bacterias u hongos. Las plántulas se trasplantaron a una profundidad de 3-5 cm, dependiendo de su tamaño (Figura 1), se aplicó Captan® 50 ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) como preventivo. Se probaron dos tratamientos de pre-aclimatación; el primero ( $T_1$ ) se emplearon cinco plantas de cada cruza y se taparon con un vaso de plástico de 1 L, se aseguró con cinta masking. El segundo tratamiento ( $T_2$ ), las cinco plantas se taparon con una bolsa de nylon transparente para 2 kg, sujetándola con una liga. Todas las plantas estuvieron dentro de la cámara de germinación a una temperatura de  $26.5 \text{ °C} \pm 5 \text{ °C}$ , humedad relativa de  $70\% \pm 5$ , un fotoperiodo de 16/8 h, de oscuridad, e intensidad lumínica de  $46 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$  proveniente de lámparas fluorescentes de 74W.

A los 10 días después de la siembra (dds), las plantas se regaron con agua esterilizada. La pre-aclimatación consistió en retirar la bolsa y el bote que funcionaron como tapa por 20 min, a cada bolsa que funciona como tapa ( $T_2$ ) se le hicieron dos orificios de 8.5 mm cada uno, aproximadamente, se volvieron a colocar los botes y las bolsas. A los 12 dds se realizó la misma actividad solo que las tapas se retiraron por 60 minutos, y a las bolsas de nylon se le hicieron dos orificios más a cada bolsa. A los 17 dds se aumentó el tiempo de destapado a 90 min, y a las bolsas se les hicieron cuatro orificios. A los 23 dds se destaparon por 120 min, y se aumentaron dos orificios más a las bolsas. A los 27 dds se dejaron destapadas durante

240 min los botes tapa, y a las bolsas se les hizo una abertura de 7 cm de forma horizontal. A los 30 dds se retiraron los botes y las bolsas a cada tratamiento de forma definitiva. Los riegos se realizaron con agua destilada estéril cada vez que fue necesario, como preventivo se realizaron aplicaciones de Captan® 50 ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), intercalándolo con Agri-mycin® 100 ( $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ), cada quince días. La aclimatación se realizó después de los 135 días de preaclimatación, las plantas fueron establecidas en un

módulo con malla sombra al 80%, se utilizaron arboles de cocuite (*Gliricidia sepium*) como tutor. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar. Se realizaron riegos con agua potable durante los primeros 30 días y se realizaron aplicaciones con Captan® 50 ( $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ), una vez al mes. Para el caso de la pre-aclimatación, las 21 cruza de vainilla y la autofecundación se evaluaron en una cámara de germinación bajo un diseño experimental completamente al azar con dos factores (Martínez, 1988). El diseño tuvo dos tratamientos y cinco repeticiones, dando un total de 220 unidades experimentales. La unidad experimental consistió de una planta. Tanto en la pre aclimatación como en la aclimatación se registró el diámetro del tallo (DT, en mm), altura de planta (AL, en cm), y contabilizó el número de plantas que sobrevivieron por cruza y por tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza detectó diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las cruza para AL, DT y sobrevivencia, y entre tratamientos sólo hubo diferencias para sobrevivencia. De las 22 cruza pre-aclimatadas bajo los dos tratamientos, 14 tuvieron el 100% de sobrevivencia en

ambos tratamientos (Cuadro 2). Las cruza 21×124, 124×21 y 124×28 presentaron 80% de sobrevivencia cuando se taparon con un vaso de plástico transparente, y 100% de sobrevivencia cuando se taparon con bolsa. El porcentaje de sobrevivencia de la cruza 28×39 fue de 80% cuando se



**Figura 1.** Plantas en pre-aclimatación dentro de una cámara de germinación (CNRG). A la derecha el tratamiento con bolsa de nylon transparente; a la izquierda el tratamiento con vaso de plástico.

utilizó la bolsa como tapa de plástico. La mayoría de las cruza intraespecíficas de vainilla superaron lo registrado por Martínez *et al.* (2005), quienes utilizaron dos clones de *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla* y obtuvieron 75% y 85% de sobrevivencia respectivamente. La cruza 36×69 presentó 80% de sobrevivencia en ambos tratamientos, mientras que la cruza 124×27 presentó 60% para el tratamiento tapado por vaso, y 100% de sobrevivencia cuando se utilizó como tapa una bolsa de plástico. Las cru-

zas 195×16 y 112×21 fueron las que presentaron el valor más bajo de sobrevivencia, con 40% cuando fueron tapadas con un vaso. Esto pudo deberse a estomas poco funcionales, debido a la alteración en la forma de las células oclusivas (Gil, 1996), y a la absorción y transporte de agua ineficiente, debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote. Preece y Sutter (1991) mencionan que una ineficiencia fotosintética, debida a bajos contenidos de pigmentos del aparato fotosintético, puede afectar la sobrevivencia de plantas aclimatadas. El tratamiento que presento mejor respuesta a la pre aclimatación fue T<sub>2</sub>, ya que al utilizar una bolsa de plástico como tapa tuvo en promedio 98.26% de sobrevivencia, mientras que el T<sub>1</sub> fue de 89.57%, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Los primeros días que se extraen las plántulas del tubo de ensaye son críticos durante el proceso de pre aclimatación, la bolsa de nylon hace que se genere un microclima, al hacer orificios cada cierto tiempo a la bolsa, permite a las plantas que se vayan adaptando gradualmente al intercambio de gases, temperatura, humedad relativa, obligando que sus estomas realicen sus funciones gradualmente. En este sentido Abad (1989) menciona que también la eficiencia del proceso de adaptación depende, entre otros factores, de la elección del sustrato y de la obtención de una relación adecuada entre los componentes de la mezcla, que asegure una buena supervivencia en el trasplante.

En relación a la altura de planta (AL), la cruza 195×20 tuvo la mayor altura, con 15.75 cm, mientras que 20 cru-

zas estuvieron en un intervalo de 7.67 a 15.09 cm, siendo la cruza 28×39 la de menor altura con 7.2 cm. En diámetro de tallo (DT), la cruza 111×2 presentó el mayor valor con 2.33 mm, mientras que las cruzas 124×35 y 36×112 fueron las que tuvieron los valores más bajos; el resto de cruzas presentaron un diámetro de tallo de 1.84 a

2.28 mm. Para sobrevivencia, 14 cruzas tuvieron el 100%, mientras que las cruzas 112×21 y 195×16 mostraron los menores porcentajes (70%) de sobrevivencia. Morgado et al. (2000) mencionan que es fundamental que las plántulas sean de buena calidad y tengan buena aclimatación, porque de ello depende el porcentaje de supervivencia, la velocidad de crecimiento y la producción final de éstas en la fase de campo. Las diferencias encontradas en AL, DT y sobrevivencia fueron estadísticamente significativas (Cuadro 2) debido a que las cruzas realizadas dieron como resultado respuestas diferenciadas a pre aclimatación por sus diferencias genéticas. Al respecto, Foolad (2007) menciona que en especies autógamias, como la vainilla, la

heterosis no se expresa en igual magnitud que en especies alógamas.

Para el caso de la aclimatación en campo, igualmente el análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las cruzas para las tres variables (AL, DT y sobrevivencia) lo cual es un indicador de que las cruzas respondieron de manera diferente a los efectos del ambiente para su aclimatación. Esto es importante porque permitiría seleccionar aquellos materiales

**Cuadro 2.** Comparación de medias de 22 cruzas de *Vanilla planifolia* pre aclimatadas.

Cruzas	AL	DT	Sobrevivencia
112 × 21	14.11abc	2.26ab	70c
124 × 27	13.80abc	2.28ab	90b
36 × 69	13.08abcde	1.90abcd	90b
124 × 28	15.08ab	1.98abcd	90b
124 × 21	13.62abc	2.02abcd	90b
21 × 41	12.02abcde	2.09abcd	100a
71 × 2	11.74abcde	2.17abcd	100a
111 × 39	13.85abc	2.06abcd	100a
111 × 2	13.64abc	2.33a	100a
195 × 20	15.75 <sup>a</sup>	2.11abcd	100a
124 × 2	13.33abcd	1.94abcd	100a
35 × 20	9.25cde	1.87bcd	100a
21 × 124	8.95cde	1.84bcd	90b
21 × 28	10.01abcde	2.09abcd	100a
39 × 196	10.32abcde	1.92abcd	100a
36 × 112	9.56abcde	1.82d	100a
28 × 39	7.28e	1.87bcd	90b
195 × 16	7.78de	1.89bcd	70d
115 × 21	10.08abcde	1.98abcd	100a
27 × 27	10.35abcde	2.23abc	100a
124 × 35	11.06abcde	1.76d	100a
71 × 112	7.67de	1.91abcd	100a
DMS	5.79	0.4367	8.79

Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales ( $\alpha \leq 0.05$ ); DMS=Diferencia mínima significativa; AL=altura de planta hasta el ápice (cm); DT=diámetro de tallo (mm); Sobrevivencia=plantas vivas (%).

**Cuadro 3.** Comparación de medias de 22 cruzas de *Vanilla planifolia* aclimatadas en campo.

Cruzas	AL	DT	Sobrevivencia
112 x 21	26.29a	2.32ab	70d
124 x 27	21.11ab	2.46ab	90b
36 x 69	20.43ab	2.34ab	70d
124 x 28	20.17ab	2.37ab	90b
124 x 21	19.83ab	2.65a	90b
21 x 41	19.20ab	2.48ab	90b
71 x 2	18.50ab	2.42ab	90b
111 x 39	18.13ab	2.25ab	80c
111 x 2	16.06ab	2.65a	90b
195 x 20	15.35ab	2.26ab	100a
124 x 2	14.77ab	2.38ab	100a
35 x 20	13.56ab	2.14ab	80c
21 x 124	13.33b	1.92ab	90b
21 x 28	13.33b	1.98ab	90b
39 x 196	12.65b	2.04ab	100a
36 x 112	11.95b	1.85b	100a
28 x 39	11.83b	2.29ab	90b
195 x 16	11.50b	2.15ab	70d
115 x 21	11.50b	2.09ab	90b
27 x 27	11.39b	2.41ab	90b
124 x 35	11.78b	2.14ab	90b
71 x 112	9.31b	1.93ab	80c
DMS	12.94	0.7835	9.35

Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales ( $\alpha \leq 0.05$ ); DMS=Diferencia mínima significativa; AL=altura de la base de la planta hasta el ápice (cm); DT=diámetro de planta tomado de la parte media de la planta (mm); Sobrevivencia=plantas vivas (%).

con la mejor expresión de características medidas y ser usados en el mejoramiento genético. La comparación de medias de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ) detectó a la cruz 112x21 como la de mayor altura (26.29 cm), 10 cruzas estuvieron en un intervalo de 9.31 a 13.33 cm (Cuadro 3). Para diámetro de tallo, las cruzas 111x2 y 124x21 tuvieron los mayores valores, ambas con 2.65 mm, mientras que la cruz 36x112 fue la que presentó el valor más bajo (1.85 mm); el resto de las cruzas tuvieron un diámetro de tallo de 1.92 a 2.48 mm. Con respecto al porcentaje de sobrevivencia, las cruzas 195x20, 124x2, 39x196 y 36x112 no se vieron afectados por el cambio de ambiente, ya que mantuvieron el 100% de sobrevivencia. Sin embargo, las cruzas 112x21, 36x69 y 195x16 mostraron los menores porcentajes de sobrevivencia con 70%. Estos resultados demuestran la amplia variabilidad genética

que se genera cuando se forman y utilizan cruzas intra-específicas en vainilla, lo que aporta evidencia de que es posible aumentar la reducida diversidad genética existente derivada de su cultivo.

El valor de sobrevivencia en pre aclimatación fue de 93.64% en promedio, mientras que en la aclimatación fue de 88.18%. Esta reducción de sobrevivencia en la etapa de aclimatación se debió que en campo las condiciones ambientales, tales como temperatura y humedad relativa fueron variables. Sin embargo, se observó variabilidad genética a la respuesta de aclimatación, ya que las cruzas 195x20, 124x2, 39x196 y 36x112 se aclimataron con mayor rapidez a las condiciones ambientales de campo.

## CONCLUSIONES

De los dos tratamientos evaluados en pre aclimatación el T2 en el cual se utilizó bolsa transparente de nylon con orificios que sirvieron de tapa permitió a las plántulas una pre aclimatación gradual a las condiciones ambientales, reflejando mayor porcentaje en sobrevivencia de vitro-plantas. Se observó respuesta diferenciada a la aclimatación entre las cruzas atribuido a su condición genética.

## LITERATURA CITADA

- Abad M. 1989. Los sustratos en horticultura ornamental. *Agrícola* Vergel 3: 146-152.
- Arditti J.E.R. 1984. Physiology of germinating orchid seed. *In: Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. III. (Ed) J Arditti. pp. 177-222. Cornell University Press: Ithaca, New York.
- Augstburger F., Berger J., Censkowsky U., Heid P., Miltz J., & Streit C. 2000. Vainilla. *Agricultura orgánica en el Trópico y Subtrópico*. Asociación Naturland, Gräfelfing, Alemania.
- Besse P., Da Silva D., Bory S., Grisoni M., Le Bellec E., Duval M-F. 2004. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science* 167: 379 - 385.
- Castillo M.R. y Engleman E.M. 1993. Caracterización de dos tipos de *Vainilla planifolia*. *Acta Botánica* 25: 49-59.
- Cibrián J.A. 1999. Variación genética de *Vanilla planifolia* en México. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM, México DF. 60 pp.
- Divakaran M., Babu N., Ravindran P.N., Peter K.V. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae* 108: 414-422.
- FAO 1995. Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos de América Central y México. Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos fitogenéticos. San José, Costa Rica.
- Foolad M.R. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int. J. Plant Genom.* 2007: 1-52.

- Gill R.I. 1996. Micropropagation of economically important tropical forest trees. Tree improvement for sustainable tropical forestry. QFRI-IUFRO Conference, Caloundra, Queensland, Australia 1: 230-233.
- INEGI 2006. [www.INEGI.gob.mx](http://www.INEGI.gob.mx). Fecha de consulta agosto 2015.
- Kadlecek P., Tichá I., Haisel D.Č.V. y Schäfer C. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161: 695-701.
- Luan V.Q., Thien N.Q., Khiem D.V., Nhut D.T. 2006. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. Nong Lam University Ho Chi Minh City, October 20-21. pp. 175-177.
- Martínez G.A 1988. Diseños experimentales. Métodos y elementos de teoría. Editorial Trillas, México D.F. 756 p.
- Martínez R.R., Azpiroz R.H.S. Rodríguez de la O J.L., Cetina A.V.M., Gutiérrez E.M.A. 2005. Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* *Eucalyptus urophylla* S T. Blake *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. *Revista Ra Ximhai*. 3: 591 – 597.
- Menchaca G.R., Ramos P.J.M., Moreno M.D., Luna R.M., Mata R.M., Vázquez G.L.M., Lozano R.M.A. 2011. Germinación *in vitro* de híbridos de *Vainilla planifolia* y *V. pompona*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 1:80-84.
- Morgado I.F., Carneiro J., Leles P., Barroso D. 2000. Residuos agroindustrias prensados como sustrato para producto de mudas de caña de azúcar. *Sci. Agrícola*. vol.57 (4). Piracicaba.
- Preece J.E. y Sutter E.G. 1991. Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. In: Debergh P.C., Zimmerman, R.H. *Micropropagation technology and application*. Editorial Dordrech Kluwer Academic Press. pp. 71-93.
- SAS Institute. 2002. *User's Guide of SAS (Statistical Analysis System)*. SAS Institute Inc. Cary, N. C. USA. 550 p.
- Soto M.A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoin AC. Informe final SNIB-Conabio, proyecto J101. México D. F.
- Soto A.M. 2008. Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla*. Disponible en Internet: [www.biodiversidad.gob.mx/genes/.../Vanilla/.../Proyecto20Vanilla.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/.../Vanilla/.../Proyecto20Vanilla.pdf). Consultado el 20 de abril del 2015.

