

VARIACIÓN DE FITOQUÍMICOS DE DOS GENOTIPOS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews BAJO CULTIVO EN ACAHAUAL

VARIATION OF PHYTOCHEMICALS OF TWO GENOTYPES OF *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews GROWN IN ACAHAUAL

Ibarra-Cantún, D.¹; Delgado-Alvarado, A.^{1*}; Herrera-Cabrera, B.H.¹; Salazar-Rojas, V.M.²

¹Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla No. 205, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla. C. P. 72760. ²Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C. P. 54090.

*Autor de correspondencia: adah@colpos.mx

RESUMEN

La vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivada en la región del Totonacapan, México, es producida en diferentes sistemas de manejo, donde las condiciones del cultivo pueden modificar la acumulación de fitoquímicos en los diferentes órganos de la planta. En el presente estudio se analizó la variación del perfil de acumulación de fitoquímicos en diferentes órganos de la planta de dos genotipos de vainilla bajo cultivo en acahual en la región del Totonacapan. Se utilizaron estructuras vegetativas (hoja y tallo) y reproductivas (flor, fruto verde y beneficiado) del genotipo III y del genotipo VI. La concentración de compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos condensados, flavonoides totales, saponinas y triterpenos totales se cuantificaron en todos los tejidos por métodos espectrofotométricos. Se encontraron diferencias significativas en la mayoría de las variables fitoquímicas asociadas a los tejidos por genotipo. El análisis Biplot de Componentes Principales permitió identificar las variables fitoquímicas que definieron perfiles de acumulación de fitoquímicos distintos para cada genotipo bajo cultivo en acahual.

Palabras clave: Orchidaceae, vainilla, acahual, estructuras vegetales, fitoquímicos, genotipos.

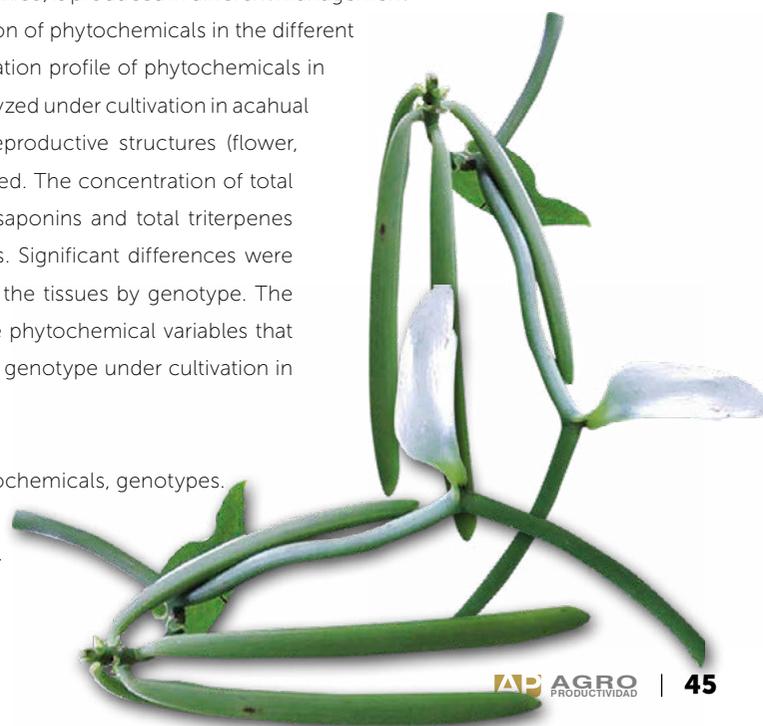
ABSTRACT

Vanilla (*Vanilla planifolia*) cultivated in the Totonacapan region, Mexico, is produced in different management systems where the crop conditions may modify the accumulation of phytochemicals in the different plant organs. In the present study the variation of the accumulation profile of phytochemicals in different organs of the plant of two genotypes of vanilla was analyzed under cultivation in acahual in the Totonacapan region. Vegetative (leaf and stem) and reproductive structures (flower, green and cured fruit) of genotype III and genotype VI were used. The concentration of total phenolics, total tannins, condensed tannins, total flavonoids, saponins and total triterpenes were quantitated in all tissues by spectrophotometric methods. Significant differences were found in most of the phytochemical variables associated with the tissues by genotype. The Biplot analysis of Principal Components allowed to identify the phytochemical variables that defined different phytochemical accumulation profiles for each genotype under cultivation in acahual.

Keywords: Orchidaceae, vanilla, acahual, plant structures, phytochemicals, genotypes.

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 3, marzo, 2018. pp: 45-50.

Recibido: enero, 2018. **Aceptado:** marzo, 2018.



INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es originaria de las regiones húmedas tropicales de México y América Central (Besse *et al.*, 2004). En la naturaleza las plantas están expuestas a interacciones bióticas y abióticas complejas que, a lo largo del proceso evolutivo, han funcionado como presiones de selección que favorecieron la adaptación y diversificación de su metabolismo secundario, y con ello la variación cualitativa y cuantitativa en el patrón de acumulación de compuestos fitoquímicos en diferentes tejidos de las plantas.

Los fitoquímicos o metabolitos secundarios se originan como una respuesta de adaptación de la planta a su ambiente, asociadas ecológicamente con funciones de defensa de la planta (Mazid *et al.*, 2011), que tienen un alto potencial para ser utilizados como productos naturales en diferentes aplicaciones, como en la industria farmacéutica o como nutraceuticos entre otros; de manera que es esencial conocer los procesos y factores que regulan su rendimiento y calidad para optimizar su aprovechamiento (Radušienė *et al.*, 2012; Sampaio *et al.*, 2016).

En la región del Totonacapan existen diferentes sistemas de cultivo de vainilla, como el manejo en malla sombra (con 50 a 80 % de luminosidad), y el conocido como tradicional o acahual, donde las plantas se establecen en un arreglo agroforestal con tutores vivos como árboles de cítricos, pichoco, cocuite, entre otros. Este acomodo de plantas brinda entre 50 y 70 % de sombra y la ventilación necesaria que requiere el cultivo de vainilla para su óptimo desarrollo (Barrera-Rodríguez *et al.*, 2009), pero sobre todo mantiene las interacciones ecológicas naturales. En un trabajo previo (datos no publicados) se detectó que el sistema de cultivo tiene un efecto sobre el patrón de concentración de fitoquímicos de la planta de vainilla, donde

el sistema de acahual favorece la mayor acumulación de metabolitos secundarios, aunque se desconoce cómo se expresan estos compuestos en diferentes tejidos (vegetativo y reproductivo) de la planta.

Aunado a la variación en los sistemas de cultivo, dentro de la región Totonacapan se ha identificado variación genética y quimiotípica que presenta diferente comportamiento en la acumulación de metabolitos secundarios asociados con el aroma de vainilla (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012; Salazar-Rojas *et al.*, 2012). El presente trabajo tuvo como objetivo analizar la variación en los patrones de acumulación de fitoquímicos en tejidos vegetativos (hoja y tallo) y reproductivos (flor y frutos verde y beneficiado) de dos genotipos (Genotipo III y Genotipo VI) de vainilla cultivada en acahual, mediante componentes principales. Este estudio aporta conocimiento básico para la toma de decisiones sobre la identificación de otros tejidos de vainilla y germoplasma susceptible de ser aprovechado como fuente de productos naturales o nutraceuticos.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se eligieron plantas de vainilla del Genotipo III (Quimiotipo VI), considerado como un material modificado de manera importante por la selección del aroma de los frutos, y el Genotipo VI (Quimiotipo I) descrito como un material "silvestre", debido a que los compuestos menores del perfil de aroma de los frutos muestran menor expresión (Herrera-Cabrera *et al.*, 2016)

Los dos genotipos se cultivaron bajo el sistema de acahual (Figura 1), en el municipio de Papantla, Veracruz en la localidad de Primero de Mayo (Genotipo III) y en la Finca 20 Soles (Genotipo VI). El clima en ambos sitios fue cálido subhúmedo, con temperatura media anual mayor de 22°C y temperatura del mes más frío mayor de 18°C.



Figura 1. Plantas de vainilla (*Vanilla planifolia*) cultivadas en acahual.

Durante el periodo de floración (abril-mayo del 2013) se recolectaron hojas, tallos y flores de nueve plantas de cada genotipo de vainilla. Para la obtención de los frutos, durante el periodo de floración, se marcaron y polinizaron manualmente 30 flores. Después de 32 semanas de la polinización se recolectaron los frutos y se sometieron a un mismo tipo de curado (beneficiado) tradicional realizado por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez de acuerdo a los pasos descritos por Xochipa-Morante *et al.* (2016).

Elaboración de extractos

Compuestos fenólicos totales, taninos totales, taninos condensados y flavonoides

Para cada tejido se prepararon extractos en metanol a una concentración de 50 mg/mL (p/v), posteriormente los extractos se colocaron en un sonicador (AutoScience AS5150B) por 30 min y se maceraron por 24 h. Cada extracto se filtró y almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso (García-Salas *et al.*, 2010).

Saponinas. A 1 g de tejido fresco se le agregó 5 mL de agua destilada y se colocó en baño ultrasónico (AutoScience AS5150B) por 20 min, con intervalos de 10 min con 5 min de reposo. Posteriormente los extractos se filtraron y se almacenaron en viales a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso (García-Salas *et al.*, 2010).

Triterpenos totales. A 1 g de cada tejido fresco se adicionó 5 mL de etanol al 70 % y se maceró por 10 h, la mezcla se centrifugó a 5000 rpm, y el sobrenadante se evaporó en rotaevaporador (Heidolph, Laborota 4000). Después el residuo se extrajo 4 veces con butanol:agua (1:1). La fase orgánica se evaporó. Al residuo se agregó éter etílico y se mantuvo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h, por último, se secó y almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis (Zong-Cheng *et al.*, 2014).

Compuestos fenólicos totales (CFT)

Se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) con algunas modificaciones. La absorbancia de la mezcla se midió a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Scientific). Para la curva de calibración se usó ácido tánico (Sigma Aldrich) y los resultados se expresaron en $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de materia seca (MS).

Taninos totales (TT)

Se determinaron en el extracto de metanol basado en el método de (Makkar *et al.*, 1993). Los resultados se expresan en $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ MS.

Taninos condensados (proantocianidinas) (TC)

La cuantificación de taninos condensados se realizó de acuerdo a Porter *et al.* (1986). Los resultados se expresan en $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ MS.

Flavonoides totales (FLA)

Se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Barrón-Yáñez *et al.* (2011). A 500 μL del extracto de metanol se adicionó 1.5 mL de etanol al 80 %, 100 μL de solución cloruro de aluminio hexahidratado al 20 %, 100

μL de acetato de potasio 1 M y 2.8 mL de agua destilada. Se agitó e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se registró a 415 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300 Thermo Scientific). Para la curva de calibración se usó quercetina (Sigma Aldrich) y los resultados se expresaron en $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ MS.

Saponinas totales (SAP)

Se realizó mediante el método de ácido sulfúrico – vainilla descrito por Hiai *et al.* (1976). La absorbancia se leyó a 544 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300 Thermo Scientific). Saponina de Quillaja (Sigma Aldrich) fue utilizada como estándar y los resultados se expresaron en $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ MS.

Triterpenos totales (TER)

El contenido de Triterpenos totales se determinó a través del método colorimétrico con el sistema vainillina – ácido acético descrito por Fan y He (2006) con algunas modificaciones. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300 Thermo Scientific) a 550 nm. Se utilizó ácido oleanólico (Sigma Aldrich) como estándar y los resultados se expresaron en $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ MS.

Diseño experimental y análisis estadístico

La cuantificación de fitoquímicos se realizó con nueve repeticiones para cada estructura vegetal. El diseño experimental consideró al contenido de fitoquímicos en cada tejido vegetal como fuente de variación. Se realizó un análisis de varianza mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002) y un análisis de componentes principales biplot (ACP-b) con el propósito de representar simultáneamente el patrón

de agrupamiento de los compuestos fitoquímicos por tejido y el patrón de agrupamiento de las plantas de los genotipos analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza de la concentración de fitoquímicos en los distintos tejidos evaluados, indicó que hubo diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) por genotipo para la mayoría de las variables (Cuadro 1).

El coeficiente de variación tuvo una amplitud entre 0.21 a 36.97 %, y varió en relación con los fitoquímicos/tejido, aunque particularmente los terpenoides mostraron los coeficientes de variación más bajos en todos los tejidos.

En relación a los tejidos fue notable que el fruto beneficiado, a excepción de los taninos condensados (23.94 %), en la mayoría de los compuestos mostró los coeficientes de variación más bajos (0.23 a 9.6 %), que indicó que la dispersión de los valores alrededor de la media fue estrecho, posiblemente debido a que la concentración de los fitoquímicos después del periodo de beneficio de los frutos, que involucra la participación de enzimas, promueve la síntesis de contenidos similares de cada fitoquímico dependiendo del genotipo (Cuadro 1). Los compuestos fenólicos totales (CFT) solo mostraron diferencia significativa en hoja y flor, y la media osciló de 0.691 a

2.159 $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS. Mientras que los terpenoides (TER) tuvieron diferencia en todos los tejidos, de forma similar los taninos condensados (TC) y las saponinas (SAP) mostraron diferencias en casi todos los tejidos excepto en tallo y flor (Cuadro 1).

La dispersión de las 18 muestras de tejido (nueve por cada genotipo de vainilla) representadas en el espacio

determinado por los dos primeros componentes principales explicó 63 % de la varianza total (Cuadro 2).

El componente principal 1 (CP1) explicó 54 % de variación a partir de variables relacionadas con la concentración de terpenoides en todos los tejidos (TERh, TERt, TERf, TERv, TERb), saponinas en hojas y tallos (SAPh y SAPt) y compuestos fenólicos totales en hojas y flores (CFTf y CFTf). El segundo componente (CP2) explicó 9 % de la varianza y se concentró principalmente en variables relacionadas con la concentración de compuestos fenólicos totales, taninos totales y flavonoides en frutos verdes (CFTt, CFTv, TTv, FLAv, FLAf). Así como saponinas y flavonoides en flores (SAPf y FLAf) (Cuadro 2).

Respecto a la distribución espacial de los primeros dos componentes principales en el análisis BIPLLOT, se identificaron dos agrupamientos, uno para las muestras analizadas y otro para las variables fitoquímicas (Fi-

Cuadro 1. Medias, coeficientes de variación y cuadrados medios por genotipo de las 30 variables fitoquímicas por tejido de la planta de vainilla cultivada en acahual en el Totonacapan, México.

Variable	Media ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS)	CV (%)	Cuadrados medios
			Genotipo
CFT _h	0.855	21.547	3.327**
CFT _t	0.691	20.270	0.208 ^{ns}
CFT _f	0.821	21.653	0.814**
CFT _v	1.870	12.126	0.157 ^{ns}
CFT _b	2.159	9.600	0.0001 ^{ns}
TT _h	0.400	24.562	0.203**
TT _t	0.332	14.166	0.0004 ^{ns}
TT _f	0.318	16.233	0.013*
TT _v	0.390	17.453	0.040*
TT _b	0.264	7.316	0.00001 ^{ns}
TCh	0.199	17.736	0.040**
TC _t	0.134	24.967	0.003 ^{ns}
TC _f	0.162	25.754	0.013*
TC _v	0.148	21.655	0.009*
TC _b	0.028	23.493	0.0005**
FLA _h	0.678	23.650	1.024**
FLA _t	0.377	16.756	0.159**
FLA _f	0.601	15.277	0.090*
FLA _v	1.120	19.899	0.003 ^{ns}
FLA _b	0.909	8.554	0.051 ^{ns}
SAP _h	0.045	17.480	0.006**
SAP _t	0.021	14.549	0.001**
SAP _f	0.003	36.973	0.00001 ^{ns}
SAP _v	0.169	10.733	0.005**
SAP _b	0.212	4.443	0.034**
TER _h	1.713	2.156	4.154**
TER _t	2.032	2.105	6.956**
TER _f	1.910	0.381	2.308**
TER _v	2.343	0.205	3.554**
TER _b	2.787	0.232	9.787**

CFT=compuestos fenólicos totales; TT=taninos totales; TC=taninos condensados; FLA=flavonoides; SAP=saponinas; TER=terpenoides; h=hoja; t=tallo; f=flor; v=fruto verde; b=fruto beneficiado. **=diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$); *=diferencias significativas ($P \leq 0.05$); ns=diferencias no significativas.

gura 2). El grupo 1, integró muestras correspondientes al genotipo VI que presentó como características, menor concentración de la mayor parte de los compuestos analizados en casi todos los tejidos. Únicamente registró concentraciones altas de saponinas, flavonoides y compuestos fenólicos totales en frutos verdes (SAPv, FLAv y

CFTv) y flavonoides en flor (FLAf) (Figura 2, símbolos color verde). Mientras que el grupo 2, agrupó muestras del genotipo III, que presentaron los valores mayores para terpenoides, en todos los tejidos vegetativos (hoja, tallo) y reproductivos (flor, fruto verde y beneficiado) analizados. Así como flavonoides, taninos y compuestos fenólicos

totales en tejidos vegetativos (Figura 2, símbolos color marrón). Al respecto Shanmugavalli *et al.* (2009) señalaron que las hojas de vainilla tienen metabolitos que presentan actividad inhibitoria contra patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Las altas concentraciones de diferentes fitoquímicos en el genotipo III, sugiere que presentan plantas más resistentes a patógenos, como se ha documentado en otras especies (Mazid *et al.*, 2011).

El potencial de los beneficios a la salud u otras posibles actividades biológicas de los fitoquímicos presentes en las estructuras de la planta de vainilla ha recibido poca atención en la literatura. La mayor parte de las investigaciones previas sobre metabolitos secundarios en esta especie, solo se han enfocado en el fruto beneficiado, particularmente en los compuestos del aroma (Sinha *et al.*, 2008). Además de mostrar la abundancia y variación de los fitoquímicos en las diferentes estructuras de la planta, en este estudio fue posible identificar dos perfiles de acumulación de fitoquímicos en *V. planifolia* asociados con el genotipo, cuando son cultivados en condiciones acahual.

CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo mostraron que hubo variación en la concentración de compuestos fenólicos totales, taninos totales y condensados, flavonoides, saponinas y terpenoides en las diferentes estructuras de la planta de vainilla en relación con el genotipo. Se identificaron las va-

Cuadro 2. Valores propios, vectores propios y proporción acumulada de la variación explicada por cada variable en las primeras dos dimensiones de 30 variables fitoquímicas por tejido de vainilla cultivada en condiciones de acahual.

Variable	Compuesto	Tejido	Componente principal (CP)	
			CP1	CP2
CFT _h	Compuestos fenólicos totales	hoja	0.227	0.056
CFT _t		tallo	0.159	-0.312
CFT _f		flor	0.206	0.010
CFT _v		fruto verde	-0.098	0.348
CFT _b		fruto beneficiado	-0.002	-0.044
TTh	Taninos totales	hoja	0.190	0.194
TT _t		tallo	-0.034	0.063
TT _f		flor	0.136	-0.119
TT _v		fruto verde	0.168	0.326
TT _b		fruto beneficiado	-0.005	-0.111
TCh	Taninos condensados	hoja	0.209	0.038
TC _t		tallo	0.111	0.143
TC _f		flor	0.144	-0.237
TC _v		fruto verde	0.171	0.219
TC _b		fruto beneficiado	0.180	0.180
FLA _h	Flavonoides	hoja	0.224	0.141
FLA _t		tallo	0.214	0.112
FLA _f		flor	-0.159	0.348
FLA _v		fruto verde	-0.021	0.369
FLA _b		fruto beneficiado	0.144	0.104
SAP _h	Saponinas	hoja	0.232	-0.140
SAP _t		tallo	0.237	-0.044
SAP _f		flor	0.031	0.334
SAP _v		fruto verde	-0.184	0.101
SAP _b		fruto beneficiado	0.243	-0.001
TER _h	Terpenoides	hoja	0.246	-0.009
TER _t		tallo	0.245	-0.014
TER _f		flor	0.246	-0.017
TER _v		fruto verde	0.246	-0.022
TER _b		fruto beneficiado	0.246	-0.021
Autovalor			16	3
Proporción (%)			54	9
Acumulada			54	63

CFT=compuestos fenólicos totales; TT=taninos totales; TC=taninos condensados; FLA=flavonoides; SAP=saponinas; TER=terpenoides; h=hoja; t=tallo; f=flor; v=fruto verde; b=fruto beneficiado. Los valores en negritas indican las variables que influyen más en cada uno de los componentes principales.

riables fitoquímicas que definieron perfiles de acumulación de fitoquímicos distintos para cada genotipo bajo cultivo en acahual. El genotipo III tuvo los valores de concentración más altos en terpenoides, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos totales en la mayoría de las estructuras de la planta, y el genotipo VI solo tuvo concentraciones altas de saponinas, flavonoides y compuestos fenólicos totales en frutos verdes y flavonoides en flor.

LITERATURA CITADA

Barrera-Rodríguez A.I., Herrera-Cabrera B.E., Jaramillo-Villanueva J.L., Escobedo-Garrido J.S., Bustamante-González A. 2009. Characterization of vanilla production systems (*Vanilla planifolia* J.) under orange tree and mesh shade in the Totonacapan region. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 199-212.

Barrón-Yáñez R.M., García-Mateos M.R., Soto-Hernández M.R., Colinas-León T., Kite G. 2011. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34: 151-157.

Besse P., Da Silva D., Bory S., Grisoni M., Le Bellec F., 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.

Caliskan O., Polat P.P. 2012. Effects of genotype and harvest year on phytochemical and fruit quality properties of Turkish fig genotypes. *Spanish Journal of Agricultural Research* 10: 1048-1058.

Fan J.P., He C.H. 2006. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 950-956.

García-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15: 8813-8826.

Herrera-Cabrera B.E., Hernández-Ruiz J., Delgado-Alvarado A. 2016. Variación de aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews silvestre y cultivada. *Agroproductividad* 9: 10-17.

Herrera-Cabrera B.E., Salazar-Rojas V.M., Delgado-Alvarado A., Campos-Contreras J., Cervantes-Vargas J. 2012. Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences* 2: 43-50.

Hiai S., Oura H., Nakajima T. 1976. Color reaction of some saponin and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica* 29: 116-122.

Makkar H.P.S., Bluemmel M., Borowy N.K., Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61: 161-165.

Mazid M., Khan T.A., Mohammad F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3: 232-249.

Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry* 25: 223-230.

Radušienė J., Karpavičiene B., Ždrunas S. 2012. Effect of external and

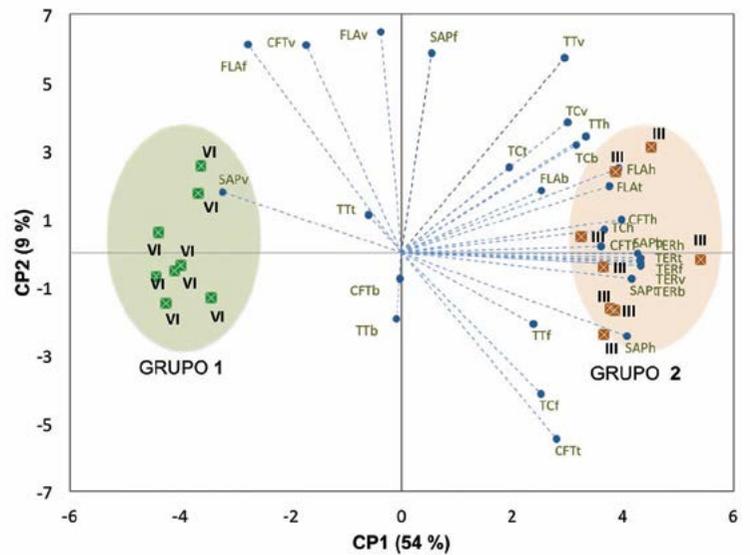


Figura 2. Dispersión de estructuras de la planta de los genotipos VI y III de *Vanilla planifolia* de acuerdo con 30 variables fitoquímicas, con base en los dos primeros componentes principales. CFT=compuestos fenólicos totales; TT=taninos totales; TC=taninos condensados; FLA=flavonoides; SAP=saponinas; TER=terpenoides; h=hoja; t=tallo; f=flor; v=fruto verde; b=fruto beneficiado. (X) Muestras de tejidos de genotipo VI. (X) Muestras de tejidos de genotipo III.

internal factors on secondary metabolites accumulation in *St. John's Wort*. *Botanica Lithuanica* 18: 101-108.

Salazar-Rojas V.M., Herrera-Cabrera B.E., Delgado-Alvarado A., Soto-Hernández M., Castillo-González F., Cobos-Peralta M. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59: 875-887.

Sampaio B.L., Bara M.T., Ferri P.H., Santos S., De Paula J. 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21: 1127-1137.

SAS. 2002. *Statistical Analysis Software Versión 9.0*. SAS Institute Inc. North Caroline. USA.

Shanmugavalli, N., V. Umashankar, and Raheem. 2009. Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *Indian Journal of Science and Technology* 2: 37-40.

Sinha, A.K., U.K. Sharma, and N. Sharma. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *Int. Journal of Food Science and Nutrition* 59: 299-326.

Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

Xochipa-Morante R.C., Delgado-Alvarado A., Herrera-Cabrera B.E., Escobedo-Garrido J.S., Arévalo-Galarza L. 2016. Influencia del proceso de beneficiado tradicional mexicano en los compuestos del aroma de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agroproductividad* 9: 55-62.

Zhong-Cheng K., Zhi-Ping Z., Zhi-Yuan X., Fang C., Shang-Qing H. 2014. Response surface optimized extraction of total triterpene acids from *Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl (Loquat) leaf and evaluation of their *in vitro* antioxidant activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13: 787-792.