

Establecimiento de las bases biotecnológicas y ecológicas en la mejora genética de *Vanilla planifolia* Jacqs. (Orchidaceae)

L. G. Iglesias-Andreu^{1,*}, *A. Andrade-Torres*¹, *N. Flores-Estévez*¹,
*J. L. Giorgana Figueroa*², *M. Luna-Rodríguez*³, *S. L. Nahuat-Dhib*²,
*J. C. Noa-Carrazana*¹, *A. Ortiz-Ceballo*¹, *C. Reyes-Sosa*²,
*L. Rodríguez-Gil*² y *L. A. Saenz-Carbonell*⁴

1 INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA Y ECOLOGÍA APLICADA, UNIVERSIDAD VERACRUZANA. CAMPUS PARA LA CULTURA, LAS ARTES Y EL DEPORTE. AV. DE LAS CULTURAS VERACRUZANAS NO. 101, COLONIA EMILIANO ZAPATA, XALAPA, VERACRUZ.

2 INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA, YUCATÁN, AV. TECNOLÓGICO KM. 4.5 S/N, MÉRIDA, YUCATÁN.

3 LABORATORIO DE ALTA TECNOLOGÍA DE XALAPA, S.C, CALLE MÉDICOS NO. 5 COL. UNIDAD DEL BOSQUE XALAPA, VERACRUZ.

4 CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN. CALLE 43 NO. 130, CHUBURNÁ DE HIDALGO, MÉRIDA, YUCATÁN

* XLIGLESIAS@GMAIL.COM, AUTOR DE CORRESPONDENCIA

ABSTRACT

Vanilla planifolia Jacks is a genetic resource of socio-economic importance to the State of Veracruz, México. However, in recent years, this culture is facing a serious problem due to the fall of its fruits. To contribute to the conservation, improvement and management of *V. planifolia*, it has been developed a network project for the strengthening of academic

bodies sponsored by the Secretariat of public education. This paper presents some of the progress made in this context.

KEY WORDS:

Genetic improvement, fall fruits, Vanilla, biotechnology, mycorrhiza, Vermiculture.

INTRODUCCIÓN

La orquídea tropical *Vanilla planifolia* Jacks es una especie muy apreciada en el mercado nacional e internacional de especias, debido a que su extracto es usado como saborizante en productos alimenticios y como esencia en cosméticos y en perfumería. México fue hace ya muchos años el principal productor a nivel mundial de vainilla (Bautista, 2006; Moreno, 2006). Sin embargo, en la actualidad, México ocupa el cuarto lugar como productor y no figura entre los principales países que exportan vainilla (FAOSTAT, 2009). Esto se debe, entre otros aspectos, a la seria y compleja problemática que presenta este cultivo debido a la caída prematura de frutos, que está provocando graves afectaciones en la producción (Castillo, 1993; Castro-Bobadilla, 2008).

Es posible que esta problemática pueda deberse al manejo cultural que la misma ha tenido, ya que pese a que es una especie alógama ha estado sometido a un régimen estricto de propagación asexual, vía esquejes y a polinizaciones manuales de sus flores (autofecundación) para la producción de las cápsulas. Esto, sumado a su historia de cultivo a partir de un número muy reducido de clones, ha generado una pérdida sustancial de los niveles de variabilidad genética. Al respecto, Dequaire (1976) observó que la autofecundación sucesiva que ha tenido *V. planifolia* la ha llevado a manifestar fenómenos como la depresión consanguínea y mayor susceptibilidad a las enfermedades. Así mismo, se ha propuesto que la mayoría de las accesiones de *V. planifolia* cultivadas en el mundo derivan posiblemente del morfotipo Mansa (Bory *et al.*, 2008), lo que ha contribuido a reducir en gran medida los niveles de diversidad genética disponible en este cultivo, así como, a una pérdida o disminución de las interacciones que originalmente establece la vainilla con otras especies, como el caso de organismos simbióticos micorrízicos, lo cual pudiera también estar afectando el desarrollo y la calidad de las plantas y sus cápsulas.

Para contribuir al rescate, conservación y mejora genética de esta especie, que se encuentra sujeta a protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2010), el Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada

(INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana, está desarrollando desde el 2012, un programa de mejoramiento genético en *V. planifolia*, dentro del Proyecto de Red de Consolidación de Cuerpos Académicos. En este proyecto liderado por el CA-234, Biotecnología aplicada a la Ecología y Sanidad Vegetal, participan además el CA-173 (Ecología y Manejo de la Biodiversidad), el CA-ITMER-03, del Instituto Tecnológico de Mérida (Biotecnología y uso sustentable de Recursos Naturales), y especialistas del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Este proyecto de Red se origina a partir de la solicitud efectuada al INBIOTECA, en el año 2010, por el Sistema Producto Vainilla Veracruz A. C., para contribuir a potenciar el cultivo de vainilla en la región y el país. Para su desarrollo, se encuentran incorporados al proyecto, además, 4 estudiantes de doctorado en Ecología y Biotecnología, así como 5 estudiantes de Licenciatura en Agronomía y Biología de la Universidad Veracruzana y 4 estudiantes del Tecnológico de Mérida, Yucatán. Diversos estudiantes, de postdoctorado, doctorado y licenciatura, han estado vinculados a esta temática (Adame-García, 2012; Spinoso-Castillo, 2013; García-García, 2013; Musulé-Lagunes, 2013; Mis-Cua, 2013)

Para el desarrollo de los trabajos de mejora genética en este cultivo se requiere contar con una amplia base genética. Por ello, una de las primeras actividades que se desarrollaron fue visitar las diversas áreas vainilleras del país (Veracruz, Oaxaca, Puebla y Quintana Roo) y realizar encuestas a productores, a fin de obtener un diagnóstico adecuado del estado actual del cultivo y coleccionar germoplasma (tanto silvestre como cultivado de *V. planifolia*) en las diversas áreas vainilleras visitadas. En la actualidad, se cuenta con un banco de germoplasma constituido por 151 accesiones que se desarrollan bajo condiciones de invernadero. Cabe señalar que el 38% del germoplasma coleccionado está constituido por materiales silvestres. Se trabaja conjuntamente con el CA-ITMER-03 para establecer un banco de germoplasma *in vitro* con todo el material genético coleccionado. Ya se cuenta con protocolos efectivos para su conservación por lento crecimiento en medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962) (MS) empobrecido (Foto 1).

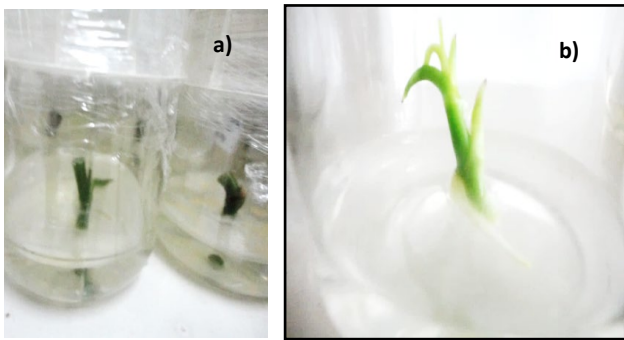


Foto 1. Conservación in vitro de *V. planifolia* por lento crecimiento. a) Desarrollo del explante, en medio MS adicionado con 1% de manitol. b) Desarrollo de vitroplántula después de 6 meses de conservación *in vitro*.

Se está trabajando en la caracterización morfoagronómica y molecular de dicho germoplasma con el fin de establecer una base de datos de utilidad para los mejoradores de este cultivo. Con el análisis integral de los datos obtenidos se espera contribuir a la selección de fuentes parentales, para su empleo en los programas de hibridación y para evaluar si los niveles de variación molecular presentes en los sitios contrastantes en cuanto a caída de frutos, se encuentra asociado con esta seria problemática productiva. Por ello y con el fin de contribuir a incrementar la base genética en este cultivo, con propósito de mejoramiento, se están desarrollando diversos protocolos de cultivo de tejido encaminados a explotar la variación somaclonal. En este aspecto, se logró establecer un protocolo de organogénesis indirecta que permitió la obtención de suspensiones celulares, cuya viabilidad y dinámica se está estudiando. La variación somaclonal generada se está potenciando con el empleo de mutágenos químicos (azida de sodio (NaN₃), sulfato de dimetilo y colchicina) y el uso de bajas dosis de radiaciones ionizantes (radiaciones gamma y acelerador de partículas) con el apoyo de la Unidad Gamma Cell del Centro Estatal de Cancerología (Foto 2a), donde se están aplicando diversas dosis de radiaciones gamma a brotes de *V. planifolia* en fase de multiplicación. Los brotes sometidos tanto a radiaciones ionizantes como a mutágenos químicos han mostrado variación (Foto 2b).



Foto 2. Mutagénesis en *V. planifolia* a) Unidad Gamma Cell del Centro Estatal de Cancerología b) Variación en el tamaño de brotes de *V. planifolia* tratada con 25 mgL⁻¹ de colchicina, en relación al tratamiento control.

Diversos autores (Luckey, 1991; Van Harten, 1998; Iglesias *et al.*, 2010) han resaltado la utilidad del empleo de bajas dosis de radiaciones ionizantes, como los rayos gamma, para elevar la germinación, los rendimientos y la tolerancia a diferentes tipos de factores estresantes. La variabilidad que se está generando por esta vía resulta de gran interés para la obtención de líneas celulares tolerantes/resistentes a diversos factores abióticos (déficit hídrico) y bióticos (*Fusarium oxysporum*), factores que han sido implicados en la caída de frutos en este cultivo. Se espera próximamente proceder a la selección de materiales promisorios en este cultivo aplicando las dosis letales medias determinadas por el uso de agentes selectivos como el polietilenglicol (PEG 6000, SIGMA™), que compite con las moléculas de agua, simulando un déficit hídrico en el medio de cultivo y de filtrados fitotóxicos de *F. oxysporum*, provenientes de los aislamientos más patogénicos obtenidos de los sitios vainilleros en estudio.

Así mismo, se está estudiando la arquitectura de la raíz en vainilla tratadas con diferentes dosis de mutágenos químicos (azida de sodio y sulfato de dimetilo) con el fin de contribuir a mejorar la productividad de los vainillales y las interacciones de estas con la biota del suelo. Se están, además, estableciendo diversos protocolos para evaluar la respuesta de este cultivo al estrés hídrico a través de evaluaciones del contenido de algunos osmolitos

(contenido de prolina y glicina betaína) y de fosfolipasas específicas para fosfoinosítidos (PI-PLC). De igual forma, se está obteniendo el perfil de los fosfolípidos PIP2 (fosfatidilinositol-4-5 bifosfato), PIP (fosfatidil-inositol) y PA (ácido fosfatídico) y de proteínas, bajo condiciones de estrés hídrico.

Los materiales genéticos promisorios que se están ya seleccionando se micropropagarán para su evaluación en campo, con la participación de los productores. Para ello, se ha estado trabajando para establecer un método efectivo para la multiplicación rápida de genotipos promisorios mediante diferentes sistemas: el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA), el Bioreactor de Inmersión Temporal (BIT) y el Bioreactor de Inmersión por Gravedad (BIG) (Bello e Iglesias, 2012).



Foto 3. Sistema de Inmersión Temporal empleado en la micropropagación de *V. planifolia*

Ya se cuenta con una metodología y una patente en proceso (No. Folio Mx/E/2013/049708) que permitirá disponer de propágulos de *V. planifolia* en cantidad suficiente para cubrir la demanda actual de materiales genéticos saneados y más vigorosos de *V. planifolia* que demanda la explotación comercial de este cultivo.

Con la finalidad de determinar la presencia y el tipo de estructuras micorrícicas en plantas adultas de vainilla en campo y dilucidar la influencia de las lombrices de tierra y los abonos verdes en el control biológico de *Fusarium* y en la producción de vainilla que contribuyan a una más adecuada explotación comercial, se están desarrollando también estudios de micorrizas así como el enriquecimiento del sustrato por adición de lombricomposta y manejo adecuado del suelo.

Hasta el momento, en México, no se han realizado estudios morfológicos y moleculares con el fin de conocer la riqueza de hongos micorrícicos asociados a vainilla, pese a que se ha demostrado que son totalmente dependientes de esta interacción para la germinación de sus semillas (Dressler, 1990). También se sabe que una sola planta de vainilla puede tener varias especies de estos hongos asociados, y que pueden variar de una localidad a otra (Porras-Alfaro y Bayman, 2007), por lo tanto, resultan de gran importancia los estudios que dentro del proyecto de Red se están desarrollando para conocer los hongos micorrícicos autóctonos que se encuentran asociados a la vainilla con vistas a su multiplicación y uso en programas de producción agrícola. Se cuenta ya con un catálogo de hongos micorrícicos y sus descripciones morfológicas asociados con plantas de vainilla, en estos momentos se están trabajando en la caracterización molecular. Los resultados preliminares obtenidos sugieren que se tratan de nuevas especies (Foto 4). Se tiene previsto evaluar la efectividad del empleo de los mismos en la germinación de las progenies segregantes de los programas de hibridación que se desarrollan en el cultivo y en los materiales genéticos promisorios que se obtengan en este cultivo.



Foto 4. Sección de raíz terrestre de vainilla colonizada por hongo micorrízico.

Las investigaciones sobre lombrices de tierra, indican que existen más de 3500 especies a nivel mundial, se han utilizado especies de la familia Lumbricidae. En México, de las 129 especies de lombrices de tierra descritas, únicamente se han estudiado 10 especies. Las más estudiadas han sido las exóticas *Pontoscolex corethrurus* Müller (1856) y *Polypheretima elongata* Terrier (1872). Con el

propósito de conservar la fertilidad e incrementar la producción agrícola, se han desarrollado dos métodos para manejar la actividad biológica de las lombrices de tierra. El primero, llamado manejo in situ y/o Bioestimulación, consiste en incorporar residuos orgánicos para estimular la actividad local de las lombrices o la inoculación de poblaciones de lombrices geófagas (endoges y anecicas). El segundo, es el manejo ex situ, usa simplemente lombrices epigeas detritívoras como la “roja californiana” (*Eisenia fetida* o *Eisenia andrei*) para preparar compostas.

En México, existen evidencias del potencial agrícola que tienen algunas especies para cultivarlas masivamente y cuando se inoculan se incrementa la productividad de maíz. Esto sugiere la oportunidad de desarrollar paquetes tecnológicos que manejen la actividad biológica de lombrices nativas, con la biomasa y los recursos orgánicos óptimos, para incrementar significativamente la fertilidad del suelo y la productividad en cultivos rentables, como lo es la vainilla.

Los estudios que se están llevando a cabo permitirán, de igual forma, desarrollar paquetes tecnológicos que contribuyan a manejar la actividad biológica de las lombrices nativas, con la biomasa y los recursos orgánicos óptimos, a fin de que puedan incrementar significativamente la fertilidad del suelo y la productividad de este cultivo. Actualmente, se evalúa la influencia de la actividad de las lombrices de tierra y los abonos verdes en el crecimiento y productividad de vainilla (Foto 5).



Foto 5. Evaluación de enmiendas orgánicas y lombrices de tierra para incrementar el crecimiento y productividad de vainilla (*V. planifolia*) bajo invernadero

Los resultados preliminares que se han ido obteniendo no solo están contribuyendo a entender la compleja problemática productiva que presenta este cultivo, sino también a la consolidación del trabajo conjunto dentro de la Red establecida de Conservación, Manejo y Mejoramiento de Plantas. Estos trabajos pudieran además servir de base para el desarrollo de futuros trabajos que se desarrollen en otras especies de importancia agrícola amenazadas que presenten problemas similares.

REFERENCIAS

- Adame-García, J. 2012. Obtención de aislamientos bacterianos asociados a *Vanilla planifolia* Andrews, con propiedades antifúngicas. Tesis Doctoral. Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana.
- Bautista-Santiago, J. 2006. Comparación del crecimiento de esquejes de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) de dos procedencias en condiciones de invernadero. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrícola, Universidad Veracruzana.
- Bello-Bello, J. & Iglesias-Andreu, L.G. 2012. Desarrolla el INBIOTECA sistemas de biorreactores para la micropropagación de especies vegetales de importancia para el estado de Veracruz. *Revista Agroentorno*. Junio. pp7-8.
- Bory, S., Lubinsky, P., Risterucci, A.M., Noyer, J.L., Grisoni, M., Duval, M.F. & Besse, P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *Am. J. Bot.* 95 (7): 805-815.
- Castillo-Martinez, R. & Engelmann, E.M. 1993. Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*. *Acta Botánica Mexicana*. No 25. pp. 49-59.
- Castro-Bobadilla, G. 2008. Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México. Tesis Doctoral. Instituto de Ecología A.C. 93pp
- Dequaire, J. 1976. L'amélioration du vanillier à Madagascar. *Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée*. 23(7-12):140-158.
- Dressler, R.L. 1990. *The orchid's natural history and classification*. Cambridge, Massachusetts, and London, England: Harvard University Press. 332 pp.

- FAO STAT. 2009. Producción. Organización de las Naciones Unidas. Consultada 05 de Febrero de 2012: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Fragoso, C. 2001. Las lombrices de tierra de México (Annelida, Oligochaeta): diversidad, ecología y manejo. *Acta Zool. Mexic.* (Núm. Especial) 131-171.
- García-García, G.G. 2013. Establecimiento de un banco de germoplasma de micropropagación de *Vanilla planifolia* ex Andrews. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa, Universidad Veracruzana. 53pp.
- Iglesias-Andreu, L.G., Sánchez-Velásquez, L.R., Tivo-Fernández, Y., Luna-Rodríguez, M., Flores-Estévez, N., Noa-Carrazana, J.C. & Ruiz-Bello, C. 2010. Efecto de radiaciones gamma en *Abies religiosa* (Kunth) Schltd. et Cham. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 16(1): 5-12.
- Luckey, T. D. 1991. *Radiation Hormesis*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Mis-Cua, G.C. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo para la conservación in vitro de *V. planifolia* ex Jack Andrews. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida, Yucatán. 57pp
- Moreno-Ramírez, Y.R. 2006. Cultivo in vitro de embriones inmaduros de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis de Licenciatura. Campus Xalapa. Universidad Veracruzana.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Musulé-Lagunes, F.G. 2013. Hongos micorrízicos asociados a *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa, Universidad Veracruzana. 47 pp.
- Porras-Alfaro, A. & Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia.* 99(4):510-25.
- Ortiz-Ceballos, A.I. & Fragoso, C. 2007. Synergistic effect of a tropical earthworm *Balanteodrilus pearsei* and velvetbean *Mucuna pruriens* var. utilis on maize growth and crop production. *App Soil Ecol.* 35: 356-362.
- Spinoso-Castillo, J.L. 2013. Evaluación del efecto de polietilenglicol sobre el cultivo in vitro de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews). Tesis Licenciatura en QFB. Facultad de Químico Fármaco Biólogo, Campus Xalapa, Universidad Veracruzana.
- Van Harten, A.M. 1998. *Mutation Breeding. Theory and Practical Applications*. Cambridge University Press. 353 pp.