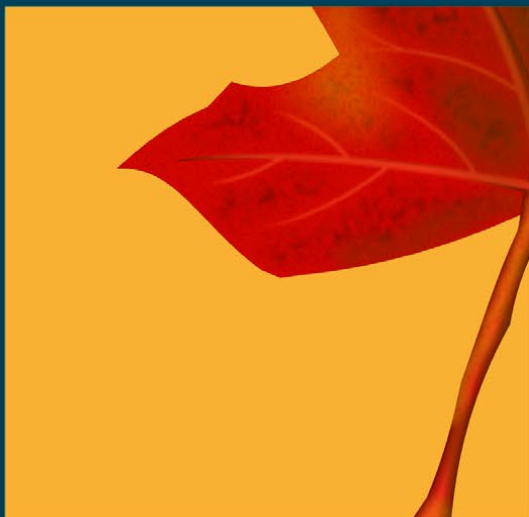
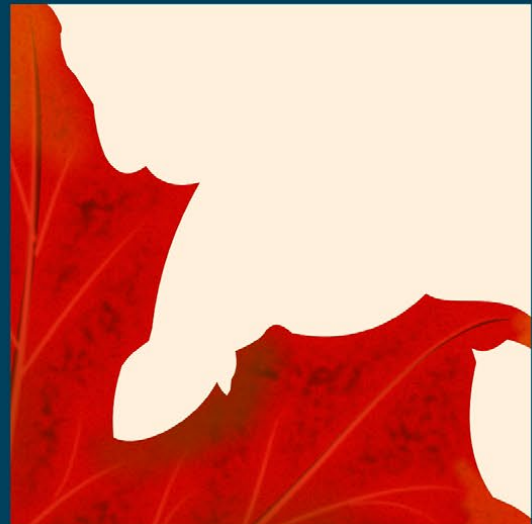


Cuadernos *de* Biodiversidad



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Técnicas biotecnológicas para la obtención de genotipos de Vanilla planifolia Jacks. resistentes a Fusarium oxysporum f. sp. vanillae
Biotechnological techniques for obtaining genotypes of Vanilla planifolia Jacks. resistant to Fusarium oxysporum f. sp. vanillae

M.A. Ramírez-Mosqueda^{1 y 2}, . L. G. Iglesias-Andreu^{2}, J. C. Noa-Carrazana², y A. A. Armas-Silva²*

¹ CENTRO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS, BOULEVARD DE LA BIODIVERSIDAD NO. 400 COL. CENTRO CP. 47600, TEPATITLÁN DE MORELOS, JALISCO, MÉXICO.

^{2*} INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA Y ECOLOGÍA APLICADA (INBIOTECA), UNIVERSIDAD VERACRUZANA, AV. DE LAS CULTURAS VERACRUZANAS NO. 101, CAMPUS PARA LA CULTURA, LAS ARTES Y EL DEPORTE, COL. EMILIANO ZAPATA, C.P. 91090, XALAPA, VERACRUZ, MÉXICO.

* AUTOR PARA CORRESPONDENCIA (LIGLESIAS@UV.MX) TEL.: +52 (228) 8 42 27 73

RESUMEN

El principal problema que enfrenta el cultivo de vainilla en el mundo es su susceptibilidad a plagas y enfermedades. Dentro de ellas destaca la pudrición de raíz y tallo causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. A pesar de ser México centro de origen y domesticación de la vainilla (*Vanilla planifolia*) actualmente no se cuentan con materiales genéticos resistentes a este patógeno, ni con métodos de control efectivos a esta enfermedad. Por ello, el Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana, Veracruz, México, desde hace siete años, ha emprendido un programa de mejoramiento genético/biotecnológico con el fin de obtener genotipos de vainilla resistente a este patógeno fúngico que puedan contribuir a frenar la pérdida de diversidad genética existente en el cultivo.

Palabras clave: Biotecnología, genotipos resistentes, mejora genética, pudrición de tallo y raíz.

ABSTRACT

The main problem facing the cultivation of vanilla in the world is its susceptibility to pests and diseases. Among them, root and stem rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Although Mexico is the center of origin and domestication of vanilla (*V*), there are currently no genetic materials resistant to this pathogen, nor effective control methods for this disease. Therefore, the Institute of Biotechnology and Applied Ecology (INBIOTECA) of the Veracruzana University, Veracruz, Mexico, for seven years, has undertaken a program of genetic/biotechnological improvement in order to obtain vanilla genotypes resistant to this fungal pathogen that can in turn slow the loss of genetic diversity present in the crop.

Keywords: Biotechnology, resistant genotypes, genetic improvement, stem and root rot.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia*: Orchidaceae) resulta de gran importancia para las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética a nivel mundial, debido principalmente, a que de sus vainas (frutos) beneficiadas se extrae la vainillina, compuesto orgánico muy apreciado por sus cualidades aromáticas (Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, 2015). Sin embargo, uno de los problemas que enfrentan los productores de vainilla en México, son las enfermedades provocadas por hongos, bacterias y virus. Entre estas, destacan aquéllas causadas por hongos, como las más recurrentes. Algunos ejemplos de enfermedades que afectan este cultivo son: la pudrición de tallo y raíz por el ataque de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (forma especial vainilla), los marchitamientos, causados por *Phytophthora* sp., la roya por *Calospora vanillae* Masee, así como las necrosis o antracnosis, producidas por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. (Hernández-Hernández, 2011).

Todas estas enfermedades han ocasionado grandes pérdidas en el cultivo de la vainilla a nivel mundial, destacando las causadas por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (Figura 1). En México, se ha indicado que este patógeno puede llegar a ocasionar pérdidas hasta en 67.4% de las plantas a los cuatro años de iniciada la infestación (Hernández-Hernández, 2011). Este patógeno, que tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo, ya que una vez establecido, puede llegar a destruir plantaciones enteras, haciendo imposible el crecimiento de cualquier genotipo de vainilla conocido.

Actualmente se considera que *F. oxysporum* en su forma especial *vanillae* como el principal agente causal más devastador y causante de la enfermedad de pudrición de tallo y raíz en vainilla dada su amplia distribución en las zonas vainilleras del mundo (Pinaría *et al.*, 2010). Madagascar constituye un claro ejemplo de las afectaciones fitosanitarias ocasionadas por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, ya que, de ser en el 2010, el mayor productor de vainilla a nivel mundial, tuvo que ir paulatinamente abandonando este cultivo (FAOSTAT, 2017).



Figura 1. Plantas de vainilla (*V. planifolia*) afectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. San Rafael, Veracruz, México. a) Amarillamiento y pudrición de tallo b) Marchitamiento completo de tallos y hojas. Fotos: Ramírez-Mosqueda (2015)

La presencia de este patógeno en los vainillales de Papantla, Veracruz, principal área productora de vainilla en México, fue reportada por Hernández-Hernández (2011) y Adame-García *et al.*, (2015). Sin embargo, a la fecha no se cuenta con un adecuado diagnóstico y control de esta enfermedad en la región, desconociéndose, de igual forma, su posible relación con la seria problemática de caída de frutos, que en los últimos años ha afectado seriamente al cultivo (Borbolla-Pérez *et al.*, 2016).

Por ello y pese a ser México, el centro de origen y domesticación de *V. planifolia* Jacks., actualmente ocupa el cuarto lugar en producción a nivel mundial (FAOSTAT, 2017). Incluso es de esperar que en los próximos años pierda esta posición, debido principalmente a la seria incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* en sus plantaciones comerciales. Cabe mencionar que esta seria problemática productiva que enfrenta el cultivo en México, se ha atribuido en gran parte, a la pérdida de su diversidad genética (Borbolla-Pérez *et al.*, 2016; Ramos-Castellá *et al.*, 2016) que ha originado una mayor susceptibilidad al ataque de patógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (Hernández-Hernández, 2011). En la actualidad, no se cuenta con métodos de control ni con variedades y/o genotipos mejorados de vainilla en México que permitan minimizar las pérdidas ocasionadas por este fitopatógeno

(Hernández-Hernández *et al.*, 2011). Al respecto se ha indicado que en las áreas vainilleras de México, se encuentran morfotipos de vainilla denominados “Mansa” y “Rayada” (Figura 2). De ellos, el morfotipo “Mansa” ha sido el más cultivado por su alta productividad (Soto-Arenas, 1999), pero resulta muy susceptible a este patógeno fúngico (Hernández-Hernández *et al.*, 2011).

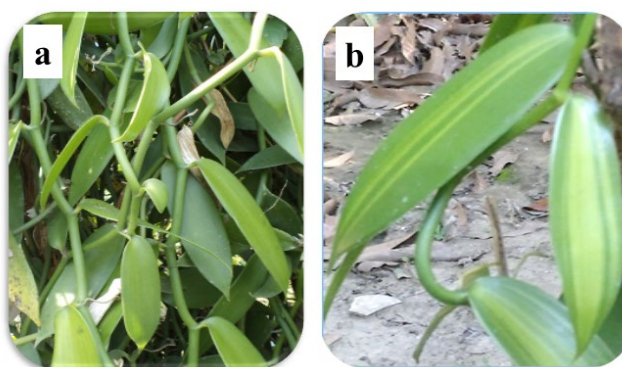


Figura 2. Morfotipos de *Vanilla planifolia* presentes en México; a) *V. planifolia* morfotipo “Mansa”, b) *V. planifolia* morfotipo “Rayada”. Fotos: Ramírez-Mosqueda (2015)

Teniendo todo lo anterior en cuenta, el INBIOTECA se propuso desde hace 7 años emprender un programa de mejoramiento genético para la obtención, por vía biotecnológica, de materiales genéticos promisorios altamente productivos y resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, para su explotación comercial.

IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN LA MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS

Las técnicas de cultivo *in vitro* aplicado al mejoramiento genético de plantas han resultado de gran interés para obtener genotipos promisorios a diferentes factores bióticos y abióticos (Sharma *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2012; Mahlanza *et al.*, 2013). Hoy en día se cuenta con numerosos trabajos de selección *in vitro* enfocados al mejoramiento genético para resistencia a enfermedades, sobre todo a patógenos fúngicos (Tabla 1).

Especie	Referencia
Melón (<i>Cucumis melo</i> L.)	Mégnégneau & Branchard (1988)
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	Binarová <i>et al.</i> (1990)
Gladiola (<i>Gladiolus grandifloras</i> Andrews)	Remotti <i>et al.</i> (1997)
Piña (<i>Ananas comosus</i> L.)	Borrás <i>et al.</i> (1998)
Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	Thakur <i>et al.</i> (2002)
Amaranto (<i>Amaranthus hybridus</i>)	Chen & Swart (2002)
Chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.)	Sharma <i>et al.</i> (2010)
Maracuya (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	Flores <i>et al.</i> (2012)
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	Mahlanza <i>et al.</i> (2013)

Tabla 1.

Trabajos previos de selección *in vitro* para la obtención de genotipos de diferentes especies vegetales resistentes a patógenos fúngicos.

Selección *in vitro*, de genotipos de vainilla resistentes a *F. oxysporum*

La selección *in vitro* de vitroplántulas con las características deseables, requiere del uso de agentes selectivos (metales pesados, sales, herbicidas, fitotoxinas, filtrados fúngicos, etc.), necesaria para ejercer la presión de selección que permita obtener materiales genéticos con resistencia a factores bióticos o abióticos (Mahlanza *et al.*, 2013). Para efectuar la selección *in vitro* se puede emplear dos métodos diferentes. Uno de ellos consiste en efectuar una selección directa en un solo paso, donde el agente de selección es utilizado en concentraciones dobles o triples de la MIC (concentración mínima que produce un 100 % de inhibición), y el segundo método consta de una selección en varios pasos, donde la concentración del agente selectivo se va incrementando gradualmente en cultivos sucesivos y frecuentes (Sharma *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2012; Mahlanza *et al.*, 2013).

Con base en estos programas de selección *in vitro* para obtener genotipos con resistencia a enfermeda-

des fúngicas, se propuso obtener genotipos de *Vanilla planifolia* resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* siguiendo el procedimiento experimental que se indica en en la Figura 3. Previo a los trabajos de selección *in vitro*, se determinó que la dosis letal media (DL50) del agente selectivo (en este caso filtrados fúngicos de la cepa mas patogénica de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* aislada en Papantla, Veracruz) fue del 30 % (v/v) del filtrado, lo cual causaba la muerte del 50 % de una población de brotes de *V. planifolia* (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2015) (Figura 3a y 3b).

Los resultados preliminares obtenidos no solo han permitido ampliar la base genética tan limitada, que tal como se ha indicado anteriormente, presenta este cultivo (Borbolla-Pérez *et al.*, 2016; Ramos-Castellá *et al.*, 2016) generando variación somaclonal a través de procesos de organogénesis indirecta (Figura 3c y 3d), además, se ha logrado seleccionar genotipos con un alto grado de resistencia a estos filtrados fúngicos, empleando cepas altamente patogénicas de este hongo (Figura 3e y 3f).

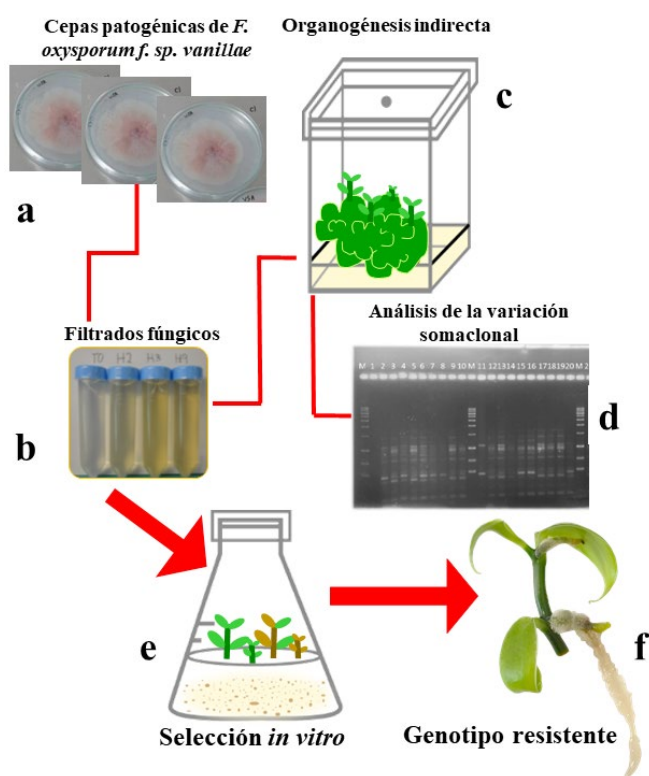


Figura 3. Estrategia experimental seguida para la selección *in vitro* de genotipos de *V. planifolia* resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* a) Selección de cepas patógenas, b) Obtención de filtrados fúngicos, c) Organogénesis indirecta, d) Análisis de la variación somaclonal, e) Selección *in vitro* con filtrados fúngicos, f) Obtención de genotipos resistentes. Foto: Ramírez-Mosqueda (2015)

Se trabaja actualmente para multiplicar masivamente estos genotipos resistentes en sistemas de inmersión temporal BIT®, a fin de contar con suficiente material para su posterior evaluación por los productores regionales de vainilla, a través de un mejoramiento genético participativo y de este modo contribuir a solucionar una de las problemáticas más importantes que enfrenta este cultivo, tan emblemático para el agro veracruzano. Por otra parte, se pretende utilizar estas herramientas biotecnológicas para mitigar la pérdida de la diversidad genética de este valioso cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por el financiamiento otorgado al proyecto de Red: “Bases Biotecnológicas para el Mejoramiento Genético de *Vanilla planifolia*”, que integra el cuerpo académico UV-CA-234. El primer autor (M A R M) agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca n° 275736, que permitió la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- Adame-García, J., Rodríguez-Guerra, R., Iglesias-Andreu, L.G., Ramos-Prado, J.M., & Luna-Rodríguez, M. (2015). Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla México. *Bot Sci*, 93:669–678. Doi. 10.17129/botsci.142.
- Binarová, P., Nedelnik, J., Fellner, M., & Nedbálková, B. (1990). Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 22:191-196. Doi. 10.1007/BF00033635.
- Borrás, O., Pires de Matos, A., Santos, R., Tapia, R., Arzola, M., Santos, R., & Pérez, M.C. (1998). Phytotoxic effect of culture filtrate from *Fusarium subglutinans* the causal agent of fusariosis of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Euphytica*, 104:73–77. Doi. 10.1023/A:1018387210157.
- Borbolla-Pérez, V.B., Iglesias-Andreu, L.G., Escalante-Manzano, E.A., Martínez-Castillo, J., Ortiz-García, M.M., & Octavio-Aguilar, P. (2016). Molecular and microclimatic characterization of two plantations of *Vanilla planifolia* (Jacks ex Andrews) with divergent backgrounds of premature fruit abortion. *Sci Hort*, 212:240–250. Doi. 10.1016/j.scienta.2016.10.002.
- Chen, W.Q., & Swart, W.J. (2002). The *in vitro* phytotoxicity of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* to five genotypes of *Amaranthus hybridus*. *Euphytica*, 127:61–67. Doi. 10.1023/A:1019980600219.
- FAOSTAT. (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics división. Producción y comercio de vainilla: país por producto. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. (Accedido: 22 de Oct 2017).

- Flores, P.S., Otoni, W.C., Dhingra, O.D., de Souza Diniz, S.P.S., dos Santos, T.M., & Bruckner, C.H. (2012). *In vitro* selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium* vascular wilt. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 108:37–45. Doi: 10.1007/s11240-011-0009-5.
- Hernández-Hernández, J. (2011). *Vanilla* Diseases. En: Havkin-Frenkel, D., & Belanger, F.C. (eds.), *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Wiley-Blackwell Publishing, UK. pp. 16–40.
- Mahlanza, T., Rutherford, R.S., Snyman, S.J., & Watt, M.P. (2013). *In vitro* generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. *Plant Cell Rep*, 32:249–262. Doi: 10.1007/s00299-012-1359-0.
- Mégnégneau, B., & Branchard, M. (1988). Toxicity of fusaric acid observed on callus cultures of various *Cucumis melo* genotypes. *Plant Physiol Biochem*, 26:585-588.
- Pinaria, A.G., Liew, E.C., & Burgess, L.W. (2010). *Fusarium* species associated with vanilla stem root in Indonesia. *Austral Plant Pathol*, 39:176–183. Doi: 10.1071/AP09079.
- Ramírez-Mosqueda, M.A., & Iglesias-Andreu, L.G. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 123:657–664. Doi: 10.1007/s11240-015-0868-2.
- Ramírez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu, L.G., Luna-Rodríguez, M., & Castro-Luna, A.A. (2015). *In vitro* phytotoxicity of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in *Vanilla planifolia* Jacks. *Sci Hort*, 197: 573–578. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.10.019.
- Ramos-Castella, A.L., Iglesias-Andreu, L.G., Martínez-Castillo, M., Ortíz-García, M., Andueza-Noh, R.H., Octavio-Aguilar, P., & Luna-Rodríguez, M. (2010). Evaluation of molecular variability in germplasm of vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in Southeast Mexico: implications for genetic improvement and conservation. *Plant Genet Resources*, 15:310–320. Doi: 10.1017/S1479262115000660.
- Remotti, P.C., Löffler, H.J.M. & Vloten-Doring L. (1997). Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus grandiflorus* cv. 'Peter Pears'. *Euphytica*, 96: 237–245. Doi: 10.1023/A:1003034215722.
- Sharma, T., Rathour, R., Plaha, P., Katoch, V., Khalsa, G.S., Patial, V., Singh Y., & Pathania, N.K. (2010). Induction of *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *psii*) resistance in garden pea using induced mutagenesis and *in vitro* selection techniques. *Euphytica*, 173:345–356. Doi: 10.1007/s10681-009-0099-x.
- Soto-Arenas, M.A. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. (Accedido: 22 de Oct 2017). <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/Infj101.pdf>.
- Thakur, M., Sharma, D.R. & Sharma, S.K. (2002). *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Plant Cell Rep*, 20:825-828. Doi: 10.1007/s00299-001-0412-1.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante