

SELECCIÓN DE GENOTIPOS DE *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews RESISTENTES A *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, MEDIANTE BIOTECNOLOGÍA

SELECTION OF *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews GENOTYPES RESISTANT TO *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, BY BIOTEHNOLOGY

Ramírez-Mosqueda, M.A.^{1y2}; Iglesias-Andreu. L.G.^{1*}; Noa-Carrazana, J.C.¹; Armas-Silva A.A.¹

¹Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana. Av. de las Culturas Veracruzanas No. 101, Col. Emiliano Zapata, Xalapa, Veracruz. C.P. 91090. ²Centro Nacional de Recursos Genéticos. Boulevard de la Biodiversidad No. 400. Col. Centro. Tepatlán, Jalisco. C.P.47000.

*Autor para correspondencia: liglesias@uv.mx

RESUMEN

Uno de los principales problemas que enfrenta el cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) en México y el mundo es su susceptibilidad a plagas y enfermedades, dentro de las cuales destaca la pudrición de raíz y tallo causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. A pesar de que México es centro de origen y domesticación de la vainilla, actualmente no se cuentan con materiales genéticos resistentes a este patógeno. Por ello el Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana emprendió desde hace años, un programa de mejoramiento genético biotecnológico con el fin de obtener genotipos de vainilla resistente a este patógeno. Con este fin, plantas regeneradas a partir de callos, con altos porcentajes de polimorfismo obtenidas en estudios previos, fueron sometidas a concentraciones del 50 % (v/v) de filtrados fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. A la fecha se han obtenido un 27.7 % de plantas resistentes a esa concentración de filtrado fúngico las que se evaluarán bajo condiciones de campo.

Palabras clave: Vainilla, *Vanilla planifolia*, *Fusarium*, genotipos resistentes, filtrados fúngicos.

ABSTRACT

One of the main problems facing the cultivation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) in Mexico and the world is its susceptibility to pests and diseases, among which stands out the root and stem rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Although Mexico is the center of origin and domestication of vanilla, there are currently no genetic materials resistant to this pathogen. For this reason the Institute of Biotechnology and Applied Ecology (INBIOTECA) of the University Veracruzana has undertaken for years a biotechnological genetic improvement program in order to obtain vanilla genotypes resistant to this pathogen. To this end, plants (regenerated from callus) with high percentages of polymorphism obtained in previous studies, were submitted to concentrations of 50% (v/v) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. To date, 27.7% of plants resistant to this concentration of fungal filtration have been obtained, which will be evaluated under field conditions.

Keywords: Vanilla, *Vanilla planifolia*, *Fusarium*, resistant genotypes, fungal filtration.

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 3, marzo. 2018. pp: 70-74.

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



INTRODUCCIÓN

El cultivo de vainilla resulta de gran importancia para las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética a nivel mundial. Principalmente por que de sus vainas beneficiadas se extrae la vainillina, compuesto orgánico muy apreciado por sus cualidades aromáticas (Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2015). Sin embargo, uno de los problemas que enfrenta los productores de vainilla de México son las enfermedades provocadas por hongos, bacterias y virus. Entre ellas destacan las causadas por hongos por ser los más recurrentes. Algunos ejemplos de enfermedades fúngicas en vainilla son: la pudrición de tallo y raíz por ataque de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, marchitamientos por *Phytophthora* sp., roya por *Calospora vanillae* Massee, así como necrosis o antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Hernández-Hernández, 2011). Todos estos patógenos han ocasionado grandes pérdidas a nivel mundial; Madagascar es un ejemplo de ello ya que de ser el mayor productor de vainilla a nivel mundial en el 2010, ha ido abandonando el cultivo dado los serios problemas fitosanitarios confrontados, particularmente con *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (FAOSTAT, 2017).

Una situación similar está ocurriendo en México. Los vainillales se enfrentan actualmente a serios ataques de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* por lo que es posible que pierda el cuarto lugar en producción mundial de este cultivo (FAOSTAT, 2017). En gran parte el incremento observado en la susceptibilidad al ataque de patógenos ha sido atribuido a la pérdida de la diversidad genética que esta especie ha tenido (Soto-

Arenas, 1999; Minoo et al., 2006) en los últimos años. Estudios moleculares recientes efectuados por Borbolla-Peréz et al. (2016) y Ramos-Castellá et al. (2016) en Veracruz, Mexico, han puesto de relieve la limitada diversidad genética existente en el germoplasma cultivado de *V. planifolia*, pese a que México es centro de origen y domesticación de este cultivo.

Por ello las afectaciones ocasionadas por este patógeno en las áreas vainilleras del país constituye uno de los obstáculos mas importante para su producción comercial ya que no se cuenta en Mexico con genotipos mejorados de vainilla. Solo se han descrito algunos morfotipos como "Mansa" y "Rayada" en las áreas vainilleras del país. De ellas el morfotipo "Mansa" es el más cultivado por su mayor productividad (Soto-Arenas, 2003), pero es susceptible a este patógeno fúngico (Hernández- Hernández, 2011). Tampoco se cuenta con métodos efectivos de control de esta enfermedad. Por ello, se propuso desarrollar el presente trabajo para obtener genotipos productivos y resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* mediante el uso de herramientas biotecnológicas que ha demostrado ser una alternativa de gran interés para la obtención de genotipos de vainilla promisorios en rendimiento, calidad, y resistencia a este patógeno fúngico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para el desarrollo del presente trabajo se seleccionaron plantas regeneradas de callos friables, obtenidos a partir de semillas inmaduras de *V. planifolia*, morfotipo Mansa, que presentaron porcentajes altos de polimorfismo genético (Figura 1)

(Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2015).

Exposición *in vitro* de brotes de *V. planifolia* a filtrados fúngicos de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

Brotes (2-3 cm de longitud), fueron cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con 2.15 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina y 30 g L⁻¹ sacarosa. Al medio de cultivo se le adicionó la dosis letal media de 50 % (v/v) de filtrados fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, provenientes de la cepa mas patogénica seleccionada en estudios previos realizados (Ramírez-Mosqueda et al., 2015). Al cabo de seis semanas de exposición de los cultivos al filtrado del hongo, se evaluó el porcentaje de supervivencia de los brotes (Figura 1).

Enraizamiento y aclimatación

Los brotes que sobrevivieron a la dosis letal media del filtrado del hongo, fueron seleccionados, enjuagados con NaClO al 25 % y nuevamente enjuagados tres veces con agua destilada esteril. Posteriormente se procedió a su enraizamiento *in vitro*, para lo cual fueron transferidos a medio MS al 50 % de su concentración, sin reguladores de crecimiento vegetal. Para su aclimatación se tomaron vitroplántulas (6-8 cm de longitud) previamente enraizadas, y se transfirieron a contenedores de 50×30×5 cm conteniendo una mezcla 1:1 (v/v) de Peat moss (Premier, Rivière-du-Loup, Canada) y Agrolita® (Tlalnepantla de Baz, Mexico). Las plántulas se mantuvieron ocho semanas bajo condiciones de invernadero (sombra del 50 %, humedad relativa entre 80-95 % y temperatura de 28-32 °C). Se aplicó Nitrofoska® (N, 25; P, 10; K, 17) (PS, COMPO, Zapopan, México) como fertilizante foliar, una vez por

semana y se realizaron riegos tres veces por semana. Cuando las vitroplántulas alcanzaron una altura de 30 cm, se transfirieron a recipientes separados utilizando el mismo sustrato.

Exposición *in vivo* de plantas de *V. planifolia* a suspensiones de conidias de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

Cuarenta vitroplantas, previamente aclimatadas, fueron seleccionadas por su resistencia al 50 % del filtrado fúngico, para ser expuestas nuevamente a una suspensión de conidias ($40 \text{ conidias mL}^{-1}$) de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Después de cuatro semanas de cultivo se evaluó el porcentaje de plantas que no mostrasen sintomatología de la enfermedad para ser seleccionadas como resistentes (Figura 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta de los brotes de *V. planifolia* expuestos a filtrados fúngicos de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

Los resultados obtenidos revelaron una variabilidad en la respuesta de los brotes al filtrado fúngico. A las seis semanas de cultivo, se observó 37.5 % de supervivencia de los mismos al ser expuestos a dosis del 50% de filtrado fúngico (Figura 2).

Estos resultados evidencian la utilidad del método de selección *in vitro* empleado en este estudio para seleccionar líneas con resistencia a *F. oxysporum*. En diversos estudios se ha puesto en evidencia la utilidad de la selección *in vitro* para la obtención de genotipos con tolerancia a diferentes tipos de factores bióticos y abióticos (Bhatia *et al.*, 2004; Mahlanza *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013).

Enraizamiento y aclimatación

Al cabo de cuatro semanas de cultivo se observó 100 % de enraizamiento en los brotes que sobrevivieron a la dosis de filtrado fúngico aplicado. Después de ocho semanas de cultivados los brotes enraizados bajo condiciones de invernadero, se pudo constatar 91 % de supervivencia (Figura 3), los cuales no mostraron signos de la enfermedad. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo (91 % de supervivencia), concuerdan con los valores de supervivencia referidos por diversos autores, durante el proceso de aclimatación de esta especie, que varían entre un 70-95 % (Tan *et al.*, 2013; Zuraida *et al.*, 2013).

Respuesta de las vitroplántulas de *V. planifolia* a suspensiones de conidias de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* bajo condiciones de invernadero

Los resultados obtenidos bajo condiciones de invernadero mostraron que 27.7% de las vitroplántulas expuestas a suspensiones de conidias de este patógeno resultaron resistentes (Figura 4). Resultó de interés constatar similitud en los porcentajes de vitroplántulas resistentes a patógenos fúngicos obteni-

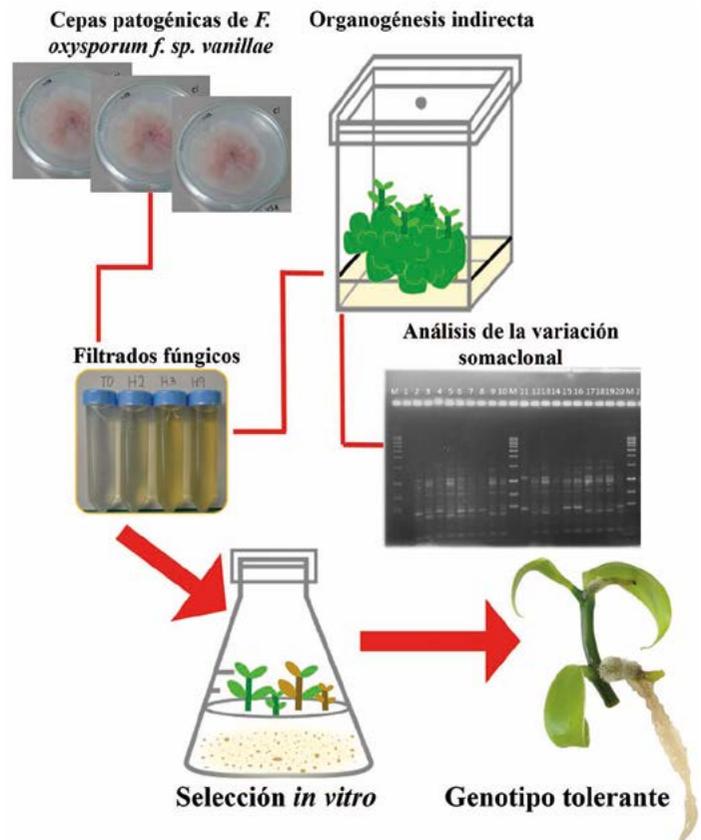


Figura 1. Diagrama para la obtención de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

dos en otros trabajos de selección *in vitro* efectuados (Flores *et al.*, 2012; Kuanar *et al.*, 2013; Mahlanza *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013).

Análisis integral

Los genotipos de *Vanilla planifolia* resistentes al patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* obtenidos en este estudio, fueron posible gracias a la variación somaclonal generada, en el material en estudio, por el proceso de organogénesis indirecta inducido, siguiendo el protocolo propuesto por Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2015). Al igual que lo obtenido en este trabajo diversos estudios realizados han demostrado la utilidad del empleo de las variantes somaclonales en los trabajos de mejoramiento genético biotecnológico, para la obtención de genotipos promisorios, a factores particular-

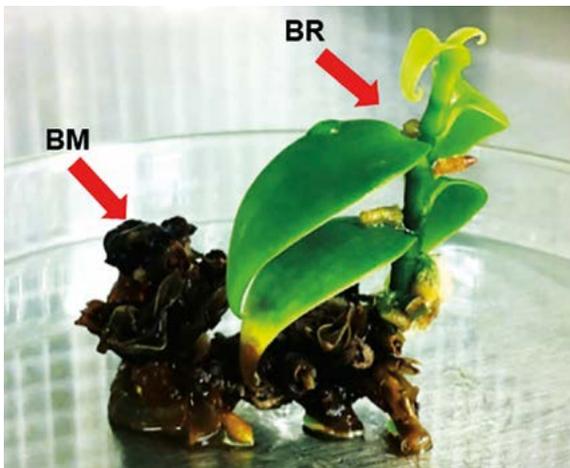


Figura 2. Respuesta de brotes y vitroplantulas de *Vanilla* a la dosis de 50% de filtrados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. BM=Brote Muerto y BR=Brote Resistente.



Figura 3. Plantas de *Vanilla planifolia* resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* después de ocho semanas en proceso de aclimatación.

mente bióticos (Sharma *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2012; Mahlanza *et al.*, 2013).

El empleo de agentes selectivos capaces de ejercer la presión de selección necesaria a factores bióticos, constituye actualmente una vía de gran utilidad para obtener materiales genéticos con resistencia a diversos agentes patógenos en diversas especies cultivadas (Mahlanza *et al.*, 2013). Por ello, desde el punto de vista metodológico, los resultados obtenidos en este trabajo, abren nuevas perspectivas para la obtención de genotipos de una forma más rápida y efectiva, que mediante un programa de mejora convencional.

La obtención de genotipos de vainilla con resistencia a este importante agente patógeno tienen a su vez un gran valor práctico para los productores que a la fecha no cuentan con materiales resistentes ni con un control efectivo de la enfermedad en sus áreas vainilleras. Por ello se están multiplicando masivamente estos materiales genéticos promisorios a nivel de biorreactores a fin de transferirlos a los productores para su final valoración bajo condiciones de campo. El INBIOTECA



Figura 4. Respuesta de las vitroplantulas proveniente del programa de selección *in vitro* a supenciones de conidias de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* bajo condiciones de invernadero. Izquierda=Planta resistente y Derecha=Planta susceptible.

tiene el compromiso de seguir contribuyendo a solucionar la gran problemática que acongoja a este sector productivo de nuestro país y de otros países vainilleros interesados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PRO-MEP) 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. MARM agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecno-

logía (CONACyT) por la beca N° 275736, que permitió la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- 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. *Scientia Horticulturae* 212: 240–250.
- FAOSTAT ("Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017. Statistics división. Producción y comercio de vainilla: país por producto. <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> (Consultada 22 de octubre 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 and Organ Culture* 108: 37–45.
- Hernández-Hernández J. 2011. Vanilla Diseases. In: Havkin-Frenkel D., Belanger F. C. (eds.). *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Wiley-Blackwell Publishing, UK, pp: 16–40.
- Hu C.H., Wei Y.R., Huang Y.H., Yi G.J. 2013. An efficient protocol for the production of chit42 transgenic Furenzhi banana (*Musa* spp. AA group) resistant to *Fusarium oxysporum*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 49: 584–592.
- Kuanar A., Nayak P.K., Subudhi E., Nayak S. 2013. *In Vitro* Selection of Turmeric Somaclone Resistant to *Fusarium oxysporum* f.sp. Zingiberi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 84: 1077–1082.
- 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 Reports* 32: 249–262.
- Minoo D., Nirmal-Babu K., Ravindran P.N., Peter K. V. 2006. Inter specific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae* 108: 414–422
- 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 and Organ Culture* 123: 657–664.
- 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. *Scientia Horticulturae* 197: 573–578.
- Ramos-Castella A. L., Iglesias-Andreu L. G., Martínez-Castillo M., Ortiz-García M. Andueza-Noh R. H., Octavio-Aguilar P., Luna-Rodríguez M. 2016. Evaluation of molecular variability in germplasm of vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in Southeast Mexico: implications for genetic improvement and conservation. *Plant Genetic Resources* 15: 310–320.
- 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. *pisi*) resistance in garden pea using induced mutagenesis and *in vitro* selection techniques. *Euphytica* 173: 345–356.
- Soto-Arenas M.A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf>. (Consultado el 22 octubre 2017).
- Tan B.C., Chin C.F., Alderson P. 2013. Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 457–463.
- Zuraida A.R., Liyana K.H.F., Nazreena O.A., Wan W.S., Che C.M.Z., Zamri Z., Sreeramanan S. 2013. A Simple and efficient protocol for the mass propagation of *Vanilla planifolia*. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1685–1692.

