

Fitomejoramiento

Artículo de revisión

Avances y tendencias en mejoramiento genético de vainilla

Advances and trends in genetic improved of vanilla

 Alma Laura Ramos-Castellá ^{1*}  Lourdes Georgina Iglesias-Andreu ¹

¹ Universidad Veracruzana, Xalapa, México.

*Autor de correspondencia: Universidad Veracruzana, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte. Av. de las Culturas Veracruzanos No. 101, Col. Emiliano Zapata, C.P. 91090. Telephone /Fax number: (228) 842773. Xalapa, México. liglesias@uv.mx

Recibido: 17 de noviembre de 2020
Aprobado: 07 de febrero de 2022
Publicado: 5 de junio de 2022

Editor temático: Felix Alberto Guzmán Díaz, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]

Para citar este artículo: Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G. (2022). Avances y tendencias en mejoramiento genético de vainilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(2), e2339. https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num2_art:2339

Resumen: Las vainas de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrew) son la fuente natural de vainillina e internacionalmente son consideradas un producto de alto valor comercial. Sin embargo, el cultivo de vainilla presenta varios problemas que han impulsado el desarrollo de investigaciones para su mejoramiento genético mediante diversas estrategias. Estas investigaciones han desarrollado trabajos de prospección para establecer bancos de germoplasma y evaluado la hibridación sexual intra e interespecífica. Además, han empleado herramientas biotecnológicas, particularmente las basadas en el uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, para conservar in vitro el germoplasma disponible. Asimismo, han intentado ampliar la base genética combinando la inducción de mutagénesis con técnicas de selección ante diferentes agentes de estrés, hacer hibridación somática mediante fusión de protoplastos y usar técnicas de ingeniería genética para la inserción de genes. A pesar de que el mejoramiento de vainilla se inició desde mediados del siglo pasado, solo se ha registrado una variedad de vainilla a nivel mundial. A la fecha, la biotecnología está impulsando la generación y selección de material promisorio, sin embargo, aún faltan más resultados de campo que muestren una etapa avanzada de estos trabajos de mejoramiento. En conclusión, aún quedan aspectos por retomar en el mejoramiento de este valioso cultivo.

Palabras clave: domesticación, recursos genéticos, mejoramiento biotecnológico, resistencia a hongos, tolerancia a sequía.

Abstract: Vanilla beans (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) are the natural source of vanillin and are internationally considered a product of high commercial value. However, vanilla cultivation presents different problems that have prompted the development of research for its genetic improvement, encompassing various strategies to achieve this purpose. They have developed prospecting works for the establishment of germplasm banks, evaluated sexual intra and interspecific hybridization. Besides, they have used biotechnological tools, particularly those based on plant tissue culture techniques, to achieve in vitro conservation of available germplasm. Similarly, they are intended to broaden the genetic base through mutagenesis induction combined with selection techniques against different stress agents, perform somatic hybridization through protoplast fusion, and gene insertion using genetic engineering techniques. Although the improvement of vanilla began in the middle of the last century, only one variety of vanilla has been registered worldwide. Biotechnology promotes the generation and selection of promising material; however, there is still a lack of field results that show an advanced stage of these improvement works. Bottom line, there are still many aspects to consider in the improvement of this valuable crop.

Keywords: domestication, genetic diversity, biotechnological improvement, fungal resistance, drought tolerance.



Introducción

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews (Orchidaceae) es una orquídea tropical originaria de México, y el extracto de sus vainas es un producto de exportación con gran importancia en las industrias gastronómica, farmacéutica y cosmética (Anuradha et al., 2013; Arya et al., 2021). Dicho extracto contiene más de ochenta compuestos de importancia alimentaria con propiedades antimicrobianas y anticancerígenas (Anuradha et al., 2013; Aria et al., 2021). La vainilla es muy demandada en el mercado internacional, por lo cual se cultiva en diversas zonas tropicales del mundo y su principal productor es Madagascar (Soto Arenas, 1999).

El cultivo de vainilla presenta afectaciones por diversas enfermedades y factores abióticos, que merman significativamente su productividad (Hernández et al., 2019). Como respuesta, se han desarrollado programas para el mejoramiento genético del cultivo en diversas zonas vainilleras del mundo, principalmente en la Isla Reunión, Madagascar e India (Sasikumar, 2010). Algunos esfuerzos han implicado la realización de trabajos de prospección, la colecta de germoplasma de *V. planifolia* y diversas especies silvestres del género, y caracterizaciones morfológica y molecular. Sin embargo, los resultados de los estudios moleculares han revelado baja variabilidad genética en el germoplasma cultivado de *V. planifolia* (Bory, Lubinsky et al., 2008; Divakaran, Jayakumar et al., 2008; Verma et al., 2009; Ramos-Castellá, et al., 2017), lo cual está en concordancia con los bajos porcentajes de polinización cruzada referidos por Soto Arenas (1999), que, a su vez, implican la existencia de una baja heterocigosidad en este cultivo.

Asimismo, esta baja variabilidad explicaría la alta susceptibilidad de la vainilla ha mostrado, a diferentes factores bióticos y abióticos, así como los problemas de caída prematura de frutos, los cuales afectan directamente la productividad y la rentabilidad del cultivo (Bhai et al., 2006). En México, el aborto de frutos varió de 10 % a 50 %; en años recientes, sin embargo, de 2007 a 2011 este fenómeno causó la pérdida del 90 % de los frutos en el país (Hernández et al., 2019). La caída de frutos se asocia a estrés por altas temperaturas, humedad relativa menor de 80 % y presencia de enfermedades fúngicas (Bhai, et al., 2006; Hernández, et al., 2019). Por todo ello, se requiere el desarrollo de materiales genéticos promisorios de *V. planifolia* que satisfagan las necesidades de los productores, como son: la resistencia a infecciones fungosas, por ejemplo, las causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. vanillae (Fov), tolerancia al estrés hídrico, tolerancia a virus, mayor productividad, calidad y tamaño de fruto, mejor perfil aromático.

El sistema de propagación vegetativa y el limitado acervo genético han dificultado el desarrollo de los programas de mejora genética, pero gracias al uso de las técnicas de cultivo se ha logrado superar algunos de estos problemas, como la germinación de semillas híbridas intra e interespecíficas, la inducción de variaciones somaclonales potenciado con el uso de agentes mutagénicos y el cultivo de protoplastos, además de avances en ingeniería genética.

En este trabajo se realizan algunas reflexiones sobre los avances logrados y cómo la complementariedad de técnicas puede marcar la diferencia en lograr los objetivos propuestos para este importante cultivo.

Metodología

Se realizó un proceso de revisión bibliográfica sistemática. Se revisaron publicaciones de todas las regiones vainilleras a nivel mundial que incluyeron revistas de investigación científica, libros científicos, colecciones de Web Science, patentes, publicaciones de congresos y revisión de avances de proyectos. Esta revisión incluye la información publicada más relevante sobre los esfuerzos realizados para mejorar la planta de vainilla ante diversos factores que afectan su cultivo. Se ha incluido información desde el panorama histórico, los primeros registros de intentar el mejoramiento genético que iniciaron a mediados XX, hasta la información más actualizada sobre el tema.

Resultados

Vanilla planifolia: origen, proceso de domesticación y explotación comercial

El género *Vanilla* Plum ex Miller es uno de los más antiguos, dentro de la familia Orchidaceae. De acuerdo con Bory, Grisoni, et al. (2008), hasta 2008 había descritas 110 especies en el género, de estas, 52 se encuentran en América, 31 en Asia y Nueva Guinea, 17 en África, siete en las islas del Océano Índico, y tres en la zona del Pacífico. Sin embargo, en la última década, al menos 16 nuevas especies han sido descritas en América y dos en Asia (tabla 1). Es muy probable que el número de nuevas especies continúe aumentando y que próximamente dispongamos de estudios filogenéticos de estas nuevas especies. De todas las especies del género *Vanilla* solo tres son cultivadas con fines comerciales, *V. planifolia*, *V. tahitensis* y *V. pompona* (Sasikumar, 2010). *V. pompona* se cultiva en las islas Guadalupe, Martinica y Dominica, y es utilizada en las industrias cosmética y de fragancias (Amiryousefi, et al., 2017). *V. tahitensis* es producida en la Polinesia Francesa y, al igual que *V. planifolia*, se utiliza en las industrias de saborizantes y fragancias (Lubiski, Cameron, et al., 2008); sin embargo, esta última abarca el 95% del mercado mundial (Bory, Lubinsky, et al., 2008). La distribución natural reconocida de *V. planifolia* incluye a México (Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco y Quintana Roo), Belice, Costa Rica, Guatemala y Honduras, pero su cultivo se ha extendido a regiones tropicales de América Central, América del Sur y Asia Pacífico (Soto Arenas & Dressler, 2010).

Tabla 1. Nuevas especies del género *Vanilla* descritas del 2010 a 2020

Especie	País	Referencia
<i>V. rebecca</i>	Guatemala	Archila et al., 2019
<i>V. marmorisense</i>	Cuba	C. M. Soto et al., 2019
<i>V. karen-christianae</i>	Costa Rica	Karremans & Lehman, 2018
<i>V. sotoarenasii</i>	Costa Rica	Azofeifa et al., 2017
<i>V. denshikoiran</i>	Colombia	Flanagan et al., 2018
<i>V. rivassi</i>	Colombia	Molinero et al., 2014
<i>V. javieri</i>	Colombia	Barona, 2018
<i>V. appendiculata</i>	Colombia	Barona, 2018
<i>V. espondae</i>	Colombia	Soto Arenas, 2010
<i>V. paulista</i>	Brasil	De Fraga et al., 2017
<i>V. capixaba</i>	Brasil	De Fraga et al., 2017
<i>V. arcuata</i>	Brasil	Pansarin & Miranda, 2016

<i>V. labelopapillata</i>	Brasil	Koch et al., Ilkiu, 2013
<i>V. paludosa</i>	Brasil	Pansarin et al., 2012
<i>V. yanesha</i>	Perú	Damian, 2019
<i>V. amoriquensis</i>	Perú	Damian & Mitidier, 2020
<i>V. sanguineovenosa</i>	Malasia	Raffi et al, 2017
<i>V. norashikiniana</i>	Malasia	Raffi et al., 2017

La vainilla fue una de las plantas de mayor importancia entre los pueblos prehispánicos mexicanos. Los totonacos la llamaron “Xahnat” y, posteriormente, los aztecas la denominaron Tlilxochitl (Arditti et al., 2009). Hasta antes del siglo XVIII, no se disponía en México de información sobre el cultivo de la vainilla. Los registros del Archivo General de la Nación (AGN), que datan de 1744, refieren que la vainilla producida en el Totonacapan resultaba netamente silvestre, y que los indígenas de esa región, se dedicaban a recolectarla en de las selvas (Kourí, 2000). El primer registro oficial que se tiene del cultivo de la vainilla data de 1767, en un pliego petitorio al virrey donde se informaba del establecimiento de un vainillal en el pueblo de Colipa, perteneciente al distrito de Misantla, Veracruz (Kourí, 2000). Por lo tanto, la transición de la fase de recolección de ejemplares silvestres hacia su cultivo comercial se inició hace apenas dos siglos y medio (Kourí, 2000).

Actualmente, se considera que dentro del Totonacapan (Veracruz, México) se encuentra la mayor variación del germoplasma cultivado de *V. planifolia* (Lubinsky, et al., 2008; Sclüter et al., 2007). Asimismo, en estudios recientes que evaluaron la variación en la composición de los cuatro principales fitoquímicos que definen el aroma y la calidad de las vainas (vainillina, ácido vanílico, p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxibenzoico), que definen el aroma y calidad de sus vainas, se evidencia la influencia del pueblo totonaca para lograr un mejor perfil aromático (Salazar-Rojas, et al., 2012).

Por su parte, las vainas de *V. planifolia* comercializadas en el Totonacapan, y que se consideran más domesticadas, presentan una cantidad de vainillina entre 10,407 a 18,657 ppm, así como una limitada proporción de compuestos menores como el ácido p-hidroxibenzoico (58-112 ppm), ácido vanílico (391-861 ppm) y p-hidroxibenzaldehído (219-733 ppm). A su vez, las vainas de *V. planifolia* provenientes de Oaxaca se caracterizan por presentar 19,118 ppm de vainillina y mayor proporción de compuestos menores: ácido p-hidroxibenzoico (255 ppm), ácido vanílico (1,315 ppm) y p-hidroxibenzaldehído (873 ppm).

En el material cultivado de Totonacapan se observa que la participación de los compuestos menores decrece en comparación con el material con características silvestres de Oaxaca (Salazar et al., 2012). Las vainas de *V. pompona* y *V. insignis*, presentan una baja cantidad de vainillina (1,115 y 866 ppm, respectivamente) y de compuestos menores [ácido p-hidroxibenzoico (63 y 48 ppm), ácido vanílico (83 y 43 ppm) y p-hidroxibenzaldehído (104 y 84 ppm)] (Herrera et al., 2012; Salazar et al., 2012). Con base en estos resultados, se concluye que, en la región de Totonacapan, a lo largo de los años, el germoplasma de *V. planifolia* ha sido sometido a un proceso de selección-domesticación guiada por las preferencias sensoriales del pueblo totonaca, y que, al mismo tiempo, su sistema de reproducción vegetativa ha contribuido a la preservación de la variación quimiotípica del perfil aromático de sus vainas (Herrera et al., 2012).

Aunque la hipótesis más aceptada es que la selección y domesticación de la vainilla fue realizada por el pueblo totonaca, los resultados del trabajo realizado por Colunga & Zizumbo (2004) sugieren que la vainilla es una de las plantas que iniciaron su selección y domesticación dentro del territorio Maya. Por ello, aún se desconoce si históricamente existieron uno o varios centros de selección y domesticación del cultivo, sobre los que incidieron los antiguos pueblos mexicanos.

Dispersión del cultivo y polinización manual

En el siglo XVI, los conquistadores españoles llevaron la vainilla a su país y después a toda Europa (Arditti et al., 2009). A finales del siglo XVIII y principios del XIX, el cultivo de vainilla se introdujo en las colonias francesas, inglesas y holandesas (Reunión, Java, India, Tahití y las islas Seichelles) (Bory, Grisoni et al., 2008). En el estudio de Bory, Lubinsky et al. (2008) se describe el proceso mediante el cual se establecieron las plantaciones de vainilla, a principios y mediados del siglo XIX, en las islas tropicales del Océano Índico. En el mismo documento se precisa que el morfotipo mexicano “Mansa”, proveniente del Totonacapan, dio origen a la gran mayoría de los vainillales que se cultivan en el mundo (Bory, Grisoni et al., 2008; Lubinsky, Bory, et al., 2008). Las plantaciones vainilleras en estas islas del Océano Índico, tenían como limitación la falta de fructificación debida a la ausencia de sus polinizadores naturales (Arditti et al., 2009). La producción a gran escala en las islas fue posible gracias al descubrimiento y uso extendido de la polinización manual (Arditti et al., 2009); con lo cual la forma de producción en los vainillales cambió, y, por lo tanto, la zona del océano Índico se convirtió en la mayor productora mundial de vainilla (Kourí, 2000).

Colecciones de germoplasma

En la literatura consultada se reportan al menos 12 bancos de germoplasma de *Vanilla*. De acuerdo con esta información, los bancos de la región del Océano Índico conservan el mayor acervo genético de *Vanilla*, ya que iniciaron sus trabajos de prospección y mejoramiento desde mediados de siglo XX, y hoy en día es la zona que se considera más avanzada en la obtención de material mejorado de *Vanilla*. Estados Unidos e India le siguen en importancia en cuanto a la cantidad de especies y número de accesiones mantenidas en bancos de germoplasma.

El Instituto de Investigaciones Agronómicas de Madagascar (IRAM, sus siglas en francés: Institut de Recherches Agronomiques a Madagascar) junto al Instituto de Investigaciones Agronómicas Tropicales (IRAT, sus siglas en francés: Institut de Recherches Agronomiques Tropicales) establecieron una colección de germoplasma del género *Vanilla* durante las décadas de 1950 a 1990. Estas instituciones, llevaron a cabo uno de los programas de mejoramiento genético más ambiciosos que se haya hecho hasta el momento (Dequaire, 1976). En 1974 establecieron una colección de aproximadamente un centenar de accesiones de vainillas, introducidas y colectadas localmente, con las que se produjeron varios híbridos (Bory, Grisoni et al., 2008; Dequaire, 1976). En todos los casos se utilizó a *V. planifolia* como planta madre y a diferentes especies de *Vanilla* como progenitores masculinos. El objetivo central de esta investigación consistía en obtener plantas tolerantes a patógenos fúngicos, sin perder la calidad

aromática de las vainas (Dequaire, 1976). Aunque no se logró cumplir este objetivo, sí se obtuvo información de interés. Al respecto, se encontró que solo los híbridos entre especies americanas fueron capaces de producir descendencia, de igual forma se identificó un híbrido (*V. planifolia* × *V. tabitiensis*) que presentó mayor contenido de vainillina en comparación con el cultivo comercial (Dequaire, 1976). A finales de 1990 se llegó a mantener una colección de 22 especies y 250 híbridos, resultantes de los programas de cruzamientos (Dequaire, 1976). No obstante, esta colección se reportó como abandonada por Bory, Grisoni et al. (2008).

También en Madagascar, el Centro Nacional para la Investigación Aplicada al Desarrollo Rural (National Center for Reseach Applier to rural development) reporta que cuenta con centenares de híbridos, producto de años de investigación de mejoramiento genético que se iniciaron desde 1950. Dentro de este germoplasma se incluyen 19 híbridos de interés que continúan en investigación, dos de los cuales son sobresalientes: *Manitra ampotony* que se caracteriza por su alto contenido de vainillina, y *Tsy taitra* que posee fuerte resistencia a *Fusarium* (Grisoni & Fleuron, 2021).

En la Isla de la Reunión, la colección del Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD, sus siglas en francés: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) reportó alrededor de 500 accesiones de 30 especies del género *Vanilla* (Grisoni et al, 2007). Dentro de esta colección se destacan las seis variantes de *V. planifolia* (Mexique, Classique, Variegata, Aiguille, Sterile y Grosse Vanille). Los genotipos denominados “Mexique” y “Classique” corresponden a germoplasma derivado del genotipo comercial mexicano “Mansa”; el genotipo “Aiguille” fue obtenido por reproducción sexual; “Variegata” es un genotipo que presenta rayas amarillas en hojas y tallo (muy similar al encontrado en cultivares mexicanos y es descrito como morfotipo “Rayada”); “Sterile” es un genotipo triploide y “Grosse Vanille” es autotetraploide (Bory, Catrice et al., 2008; Bory, Lubinsky et al., 2008).

Otra colección importante es la reportada por el National Botanical Research Institute (NBRI) de India, donde se ha efectuado la caracterización molecular (usando RAPD e ISSR) de un híbrido entre *V. planifolia* y *V. wightii*, y ocho especies de *Vanilla*: *V. albida* Blume, *V. aphylla*, *V. andamanica* Rolfe, *V. planifolia*, *V. wightii* Lindl. ex Wight, *V. parishii* Rchb. f., *V. walkeriae* Wight, *V. tabitensis* (Verma et al., 2009). El Indian Institute of Spices Research reporta 300 accesiones de *Vanilla*, que representan 28 especies e híbridos (Divakaran et al., 2006). Asimismo, se reportan 21 accesiones del género *Vanilla* en el Indian Cardamin Reseach Institute (Sasikumar, 2010).

En el Centro de Investigación y Educación Tropical de la Universidad de Florida, Estados Unidos, están desarrollándose programas de genética, genómica y mejoramiento de vainilla. Estos cuentan con cerca de 200 accesiones correspondientes a 23 especies e híbridos (Chambers, 2019), también han obtenido un borrador del genoma de *V. planifolia* de 2,20 Gb, que representa el 97% de su tamaño estimado. Además, han usado marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP) para la identificación óptima de híbridos y estudios de diversidad genética (Ying et al., 2019).

En el Instituto de Investigación y Servicios Forestales (Inisefor), el Tecnológico de Costa Rica y la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA), iniciaron un programa de prospección de parientes

silvestres y del acervo genético secundario de *V. planifolia* con la finalidad de incrementar su variabilidad genética y conservar *ex situ* el germoplasma colectado (Azofeifa et al., 2014). En esta colección *ex situ* resguardan a *Vanilla sotoarenasii* M. Pignal, Azofeifa-Bolaños & Grisoni, especie recientemente encontrada en la provincia de Limón, Costa Rica (Azofeifa et al., 2017).

En Colombia se han desarrollado iniciativas para la conservación de materiales genéticos de *Vanilla*. Para esto, se han establecido huertos comunitarios con plantas de *V. denshikoira*, especie distintiva del noroeste del Amazonas colombiano, que es morfológicamente similar a las especies del grupo *V. planifolia* así como de *V. pompona* (Flanagan et al., 2018).

En México, la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) estableció un banco de germoplasma en Tenampulco, con fines de conservación y mejoramiento genético. Actualmente este banco resguarda 192 accesiones de las especies *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. insignis* y *V. odorata* (Reyes et al., 2014). Dentro del material cultivado de *V. planifolia*, este banco cuenta con algunos ejemplares del morfotipo “Oreja de Burro”, que se caracteriza por presentar vainas y hojas de mayor tamaño, y tallos más gruesos que el morfotipo comercial “Mansa”. Sin embargo, “Oreja de Burro” ha sido catalogado como un material improductivo, por su alto porcentaje de aborto de fruto (Castillo & Engleman, 1993). Por este motivo, entre los vainilleros se estableció un acuerdo para eliminarlo y evitar su propagación (Ramos et al., 2017).

En el Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana, México, se desarrolla un programa de mejoramiento genético usando herramientas biotecnológicas. Para establecer el banco de germoplasma se realizaron trabajos de prospección y colecta de *Vanilla*, el cual actualmente cuenta con accesiones de *V. planifolia* entre las que se destacan: los morfotipos “Mansa” y “Rayada” (figura 1a y b), materiales silvestres de *V. planifolia* provenientes de Oaxaca y Quintana Roo, y ejemplares de tres especies silvestres (*V. insignis*, *V. pompona*, y *V. odorata*) que se han caracterizado morfológica y molecularmente (Ramos et al., 2017). En la Polinesia Francesa se reporta la existencia de un banco de germoplasma conformado por 250 accesiones de *V. tabitensis* (Wong, 2005). En Tahití se conservan 140 accesiones de *V. tabitensis* con fines de investigación (Chambers, 2019).

Continuar la colecta y el resguardo de ejemplares silvestres en México y América Central son esenciales para rescatar la variación intraespecífica de *V. planifolia* (de la que se tienen pocos registros). Este aspecto es de suma importancia porque Divakaran et al., (2016) señalan que el acervo genético primario de *V. planifolia* se ha reducido y se encuentra seriamente amenazado debido, sobre todo, a la destrucción de sus hábitats naturales. Esta especie se encuentra resguardada en México dentro de la norma NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) y está sujeta a protección especial. Debido a este panorama, se ha trabajado en la creación de protocolos de conservación *in vitro* de esta especie (Divakaran, Babu & Peter 2006; Divakaran et al., 2016; Bello et al., 2015; E. Hernández et al., 2020). De igual forma, se han establecido protocolos para la crioconservación de brotes del germoplasma de *V. planifolia* mediante el método D-Cryoplate, obteniéndose resultados prometedores (F. Hernández et al., 2020).

Por último, cabe señalar que es importante considerar lo indicado por Flanagan (2016), en cuanto a la conveniencia de establecer una estrategia integrada de conservación *in situ*, *ex situ* y *circa situ* para conservar la diversidad genética, que aún está disponible, por medio de programas

participativos de conservación y uso sostenible de estos valiosos recursos, principalmente en la región de México y América Central donde se encuentran las especies más cercanas a *V. planifolia* (Soto Arenas, 1999).



Figura 1. Morfotipos de Vainilla *planifolia* encontrados en el Totonacapan, Veracruz, México. a) Mansa; b) Rayada.

De acuerdo con Soto Arenas (1999), las especies americanas de *Vanilla* se caracterizan por tener frutos más fragantes que las de otras regiones del mundo. Entonces debe considerarse que la hibridación con otras especies (aunque mejore la tolerancia a *Fov* u otros factores) podría afectar el perfil aromático del fruto y aumentar la necesidad de realizar programas de retrocruzamientos. Para lograr un mayor éxito en este aspecto, resulta necesario también considerar la variación de otros compuestos aromáticos que están presentes incluso en especies cercanas a *V. planifolia* (Salazar et al., 2012).

Resistencia a enfermedades fúngicas

La problemática más significativa que enfrentan los países productores de vainilla son las enfermedades fúngicas, que en gran medida se han visto favorecidas por condiciones inadecuadas de cultivo (Flanagan et al., 2018). Las enfermedades causadas por hongos ocasionan las mayores pérdidas productivas. Hasta ahora, algunos de los géneros causantes de enfermedades en vainilla incluyen a: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Sclerotium* y *Colletotrichum*. Los síntomas de la enfermedad causada por *Phytophthora meadii* McRae, aparecen como una pudrición de las vainas que se extiende hacia el tallo. Las partes de la vaina infectada se muestran acuosas, suaves y de color café oscuro (Bhai & Thomas, 2000). *Colletotrichum orchidophilum* Damm, P.F., es otro de los patógenos que ha ocasionado afectaciones entre 10% y 30% de las plantas de la vainilla de la Isla de la Reunión, al provocar la aparición de manchas oscuras en las flores, las vainas, las hojas y los tallos (Charron et al., 2018). Las afectaciones por *Sclerotium rolfsi* Sacc.

aparecen en hojas y tallos maduros, y se inician en los ápices de las vainas y avanzan como una putrefacción hacia el tallo, aunque aún no ha sido reportada como causante de grandes pérdidas entre los productores de vainilla (Thomas & Bhai, 2001).

La roya (*Uromyces joffrini*) se identifica con la presencia de pústulas de color naranja amarillentas en el lado abaxial de las hojas y, a medida que la infección crece, las pústulas se fusionan y eventualmente secan la hoja entera. Esta enfermedad es más frecuente en sistemas de cultivo tradicional con poca ventilación, sombra excesiva y abundante precipitación. Las plantas infectadas cesan su desarrollo y reducen su productividad, y la enfermedad puede defoliar la planta por completo e incluso a plantaciones enteras (Hernández, 2018).

Por otra parte, *Fusarium oxysporum* f sp. *vanillae* (Fov), se considera la enfermedad más destructiva para el cultivo de vainilla. Los síntomas aparecen como manchas negras en los tallos con límites progresivos y márgenes café; las manchas van progresando hasta secar segmentos del tallo, en ocasiones, a lo largo de los tallos, se presentan lesiones café y café oscuro con márgenes menos definidos (Fig. 2) (Bhai & Dhanesh, 2008). Este patógeno tiene la particularidad de poder sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo e infectar a las plantas de vainilla poco después de sembrarlas, así reduce el crecimiento y la productividad del cultivo (Bhai & Dhanesh, 2008; Pinaria et al., 2010).



Figura 2. Afectaciones de *Fusarium oxysporum* en diferentes tejidos de la planta de vainilla. a) Afectación en tallo; b) Afectación en hojas; c) Afectación en vainas.

En *V. planifolia* se han realizado estudios para determinar el mecanismo de infección de *Fov* (Koyyappurath et al., 2015). Se ha sugerido que la mejor estrategia para enfrentar a este patógeno es la obtención de genotipos resistentes (Fravel et al., 2003). Hoy en día se sabe que algunas especies de *Vanilla* (*V. pompona*, *V. phaeantha* Rchb. f., *V. barbellata* Rchb. f., *V. aphylla* Blume y *V. andamanica* Rolfe) poseen cierto grado de resistencia a este patógeno (Divakaran et al. 2006), por lo que se han desarrollado trabajos de hibridación para obtener genotipos que cuenten con cierta resistencia.

El primer registro del desarrollo de un programa de mejoramiento genético en América provino de Childers et al. (1959). Estos autores intentaron transferir genes de resistencia a factores bióticos y al estrés hídrico. Para ello, llevaron a cabo trabajos de hibridación de *V. planifolia* con ejemplares silvestres de Puerto Rico. Algunos de los materiales genéticos usados como progenitores eran distantes genéticamente y la compatibilidad de esos cruzamientos resultó extremadamente baja.

En el Instituto Indio de Investigación de Especies (IISR, sus siglas en inglés: Indian Institute of Spices Research) se ha trabajado para la obtención de plantas tolerantes a *Fov* y a *P. meadii*. Los resultados obtenidos mostraron que *V. andamanica* es tolerante al ataque de ambos hongos, mientras que *V. aphylla* es tolerante a *P. meadii*. Con base en estos resultados, se inició un programa de cruzamientos para obtener híbridos de *V. planifolia* con estas especies (Divakaran, Jayakumar et al., 2008). Estos materiales fueron evaluados citogenética, morfológica y molecularmente para obtener genotipos promisorios (Divakaran et al., 2006; Divakaran, Jayakumar et al., 2008). De igual forma, se seleccionaron 10 híbridos interespecíficos (*V. planifolia* x *Vanilla* sp. (A&N), *V. planifolia* x *V. tabitensis* y 15 híbridos de *V. planifolia* x *V. aphylla* con resistencia a *Fov* (Divakaran et al., 2006).

En la Isla Reunión, usando el método estandarizado de monitoreo en campo, se evaluó la susceptibilidad de diferentes accesiones de *Vanilla* a la pudrición de raíz causada por *Fov*. Para hacerlo, se evaluaron 18 especies e híbridos provenientes de cinco cruza diferentes. Además, se realizó una prueba de susceptibilidad *in vitro* con 12 especies de *Vanilla* e híbridos de cinco cruza, y un material proveniente de retrocruces [(*V. planifolia* x *V. pompona*) x (*V. planifolia* x *V. pompona*) x *V. planifolia*]. Este trabajo se realizó con la finalidad de establecer una selección temprana de accesiones resistentes y multiplicar material con alta resistencia a la pudrición de raíces. Los resultados en campo mostraron mayor resistencia al ataque de *Fov* por parte de las accesiones de *Vanilla* sp., *V. pompona*, *V. babiliana* Hoehne, *V. phaeantha* Rchb. f., *V. crenulata* Rolfe, dos híbridos de *V. planifolia* x *V. pompona* y *V. planifolia* x *V. phaeantha*, así como de tres accesiones de *V. planifolia*. Bajo condiciones *in vitro*, se llegaron a seleccionar 19 de 103 genotipos con resistencia a *F. oxysporum*, de estos, ocho fueron de *V. planifolia*, cuatro de *V. babiliana*, y cuatro de *V. pompona*, *V. crenulata*, *V. phalaenopsis* Rchb.f. ex Van Houtte y *Vanilla* sp. (Koyyappurath et al., 2015).

Como resultado de estas investigaciones el CIRAD ha patentado la primera variedad de vainilla denominada “Handa”, que se describe como notoriamente resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis vanillae*, presenta buen perfil aromático y frutos indehiscentes (Grisoni & Dijoux, 2019). Esta variedad fue obtenida por autopolinización de *V. planifolia* y el uso de técnicas de cultivo *in vitro*. Este resultado constituye un ejemplo de la importancia del uso de la biotecnología para

generar variación sin perder la calidad aromática de los frutos. La obtención de esta variedad fue un proceso de 18 a 20 años (Grisoni & Dijoux, 2019) que transcurrieron desde la autopolinización hasta las pruebas en campo. Esto muestra que el mejoramiento de esta especie es un proceso lento dadas las características biológicas de la planta, incluso con el uso de las técnicas biotecnológicas y sin necesidad de llevar a cabo retrocruzas.

Otro ejemplo de obtención de líneas mejoradas con tolerancia a *Fov* es el trabajo del Centro Indonesio de Biotecnología Agrícola e Investigación y Desarrollo de Recursos Genéticos (ICABIOGRD, sus siglas en inglés: Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resource Research and Development) en el que la variación somaclonal generada se amplió con el uso de radiación ionizante aplicada a semillas, callos y embriones somáticos. Sobre esta base luego se efectuó la selección *in vitro* en medio MS enriquecido con 15-75 mg/L de ácido fusárico. Los clones resistentes fueron nuevamente sometidos a selección con dosis de 75 mg/L de ácido fusárico y 50% de filtrados de *Fov* (Lestari et al., 2006) y, finalmente, fueron evaluados en campo (Lestari, 2012). De manera similar, la Universidad de Gadjah Mada, seleccionó *in vitro* vitroplántulas de un mutante de *V. planifolia*, que mostró tolerancia a 100 y 110 ppm de ácido fusárico (Nurcahyani et al., 2012). En INBIOTECA, de igual forma se logró la selección *in vitro* de brotes de *V. planifolia* resistentes a filtrados de *Fov* (50% v/v) (Ramírez et al., 2019).

En el Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO) de la Universidad Veracruzana, como una estrategia para mejorar la resistencia a enfermedades, se realizaron cruzamientos interespecíficos entre *V. pompona* ♀ x *V. planifolia* ♂ y *V. planifolia* ♀ x *V. pompona* ♂, que mostraron 85% y 57.9% de germinación, respectivamente, mientras que las semillas de autopolinización de *V. pompona* presentaron 5.3% de germinación y las de *V. planifolia* no germinaron. Las plantas híbridas presentaron mayor vigor que las obtenidas por autopolinización (Menchaca et al., 2011).

A modo de reflexión, cabe resaltar que falta la evaluación del perfil aromático de los frutos en todos los casos de obtención de híbridos interespecíficos, la cual determinaría su aceptación por parte de los productores. Por esto es importante detectar fuentes parentales con perfiles deseables, y de no estar presente en germoplasma silvestre podría generarse por medios biotecnológicos usando combinadamente la variación somaclonal y mutágenos físicos o químicos. La técnica de selección *in vitro* resulta muy viable para obtener líneas promisorias con tolerancia a *Fov* en un tiempo menor al del mejoramiento tradicional. Sin embargo, esta requiere la multiplicación masiva de los materiales y su evaluación en el campo.

Tolerancia a factores abióticos

La vainilla es una especie susceptible a factores abióticos. La sequía prolongada (más de 30 días) y la alta irradiación repercuten negativamente en su capacidad fotosintética y en el metabolismo general de la planta (Gantiva et al., 2020). A pesar de que la vainilla es una especie CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas), se ha observado que la captura nocturna de carbono y la acumulación nocturna de ácidos disminuyen significativamente durante condiciones de sequía moderada mantenida por 48 días, afectando negativamente todas las etapas de la fotosíntesis CAM (Gantiva et al., 2020). El impacto de la sequía es más fuerte si la planta se encuentra bajo condiciones de alta iluminación (63%), ya que se afecta el contenido de las clorofilas a, b, y total, así como de carotenoides, y se presenta disminución neta de la fotosíntesis (Díez, Moreno, &

Gantiva et al. 2017). En Kerala, India, las condiciones de temperatura elevada (32.6°C a 35.6°C) y baja humedad relativa (45.0% a 63.6%) imperantes entre los meses de febrero y abril, se han asociado con la caída prematura de frutos (Bhai et al., 2006). A pesar de esto, no se ha considerado suficientemente el mejoramiento genético de la tolerancia de la vainilla a factores abióticos.

En el Colegio de Horticultura de Kerala, India, se evaluó el comportamiento en campo de cinco materiales genéticos de *V. planifolia*, obtenidos por variación somaclonal bajo una condición de sequía por 10 días. A pesar del corto periodo de estrés, se observaron diferencias significativas entre los materiales con respecto al testigo, lo cual permitió seleccionar uno que tuvo degradación mínima de clorofila y alta tasa de evolución de oxígeno, como evidencia de una fotosíntesis efectiva (Chandran & Puthur, 2009).

En INBIOTECA, se realizó una selección *in vitro* con polietilenglicol (PEG₆₀₀₀) de plántulas de vainilla irradiadas con 13 Gy de rayos gamma. Después de 70 días en PEG, las plántulas irradiadas incrementaron significativamente el contenido de glicina betaína (GB) en comparación con el control (Ramos, 2016). Este trabajo puso en evidencia que la acumulación de GB constituye un mecanismo natural de protección de *V. planifolia* a la sequía y que la respuesta ante este factor abiótico puede mejorarse usando mutágenos físicos, como la radiación gamma (Ramos, 2016).

El mejoramiento de vainilla enfocado a la tolerancia a sequía resulta de gran importancia en México, ya que, mayoritariamente, las plantaciones establecidas no tienen sistemas de riego, por lo que depende de las lluvias de temporada (Sánchez et al., 2001), a la par que la sequía se ha incrementado (Villarreal & Herrera, 2018). Aunque Gantiva et al. (2020) plantean que las pérdidas por *Fov* podrían disminuirse cultivando vainilla en ambientes menos húmedos, es imperativo contar con variedades que tengan mayor tolerancia a la sequía.

Otros trabajos de mejoramiento aplicados a *V. planifolia*

Otra técnica biotecnológica que se ha empleado en este cultivo es la fusión de protoplastos. Esta permite la obtención de células desprovistas de pared celular gracias a la acción de un coctel enzimático. Para el caso de *Vanilla*, se utilizó una mezcla de celulosa, pectina y manitol, aplicada a tejido mesófilo de hojas jóvenes. Una vez obtenidos, los protoplastos se fusionaron utilizando la técnica de electrofusión, que consiste en la aplicación de un pulso de corriente eléctrica (Divakaran, Geetha, et al. 2008; Ortega et al., 2016). En *Vanilla*, la fusión de protoplastos, o hibridación somática, se empleó para obtener híbridos somáticos entre *V. andamanica* y *V. planifolia* (Divakaran, Geetha, et al., 2008; Divakaran et al., 2016). También se ha empleado para la hibridación de protoplastos entre *V. planifolia* y *V. pompona* (Ortega, et al., 2016). En ambos trabajos se obtuvo una alta viabilidad (mayor al 70%) de los protoplastos. Las plantas obtenidas por hibridación somática son diferentes a los híbridos obtenidos sexualmente, ya que pueden presentar diferencias a nivel nuclear y citoplasmático; es decir, se puede obtener híbridos somáticos típicos, poliploides ó aneuploides y con diferencias en el material genético extranuclear porque la fusión de protoplastos puede originar células con contenido citoplasmático de ambos parentales, de un solo parental, o híbrido, por ello es una técnica relevante para el mejoramiento genético. En esta especie ya se cuenta con protocolos efectivos para el aislamiento y fusión de

protoplastos, pero se requiere continuar con el crecimiento y proliferación de los híbridos somáticos.

La ingeniería genética es otra de las técnicas que se ha aplicado en la mejora genética de este cultivo. Utilizando PLBs (Protocorm Like Bodies) se ha logrado la transferencia de los genes reporteros nptII y GUS, vía *Agrobacterium tumefaciens* como vehículo de transformación, al genoma de *V. planifolia* (Malabadi & Nataraja, 2007). Un trabajo similar fue realizado por Rethesh y Bhat (2011) quienes también emplearon PLBs, cocultivados con la cepa EHA15 de *A. tumefaciens* y el vector binario pBI121, con los genes GUS y nptII. De igual forma, Gätjens y Montero (2012) establecieron un protocolo de transformación genética de meristemos radicales mediante bombardeo, empleando liposomas cristalizados como vectores de transformación genética. Estos trabajos constituyen los primeros intentos del uso de las técnicas de ingeniería genética en el mejoramiento de vainilla. A pesar de que se logró insertar genes reporteros, se requieren más estudios para avalar su posible empleo en la mejora genética de este cultivo. Además, debe revisarse la legislación de organismos genéticamente modificados en países como México, que es considerado el centro de origen y domesticación de vainilla.

Conclusión

La forma de hacer mejoramiento genético en este cultivo ha ido cambiando conforme hay más herramientas biotecnológicas disponibles. En el siglo pasado se trabajaba esencialmente con hibridación sexual y germinación de semillas para obtener híbridos intra e interespecíficos, y mejorar el perfil aromático y la tolerancia a Fov. Ahora vemos como, desde hace un poco más de 10 años, se han incrementado los esfuerzos de mejoramiento a diversos factores bióticos y abióticos. Hoy en día se utiliza una amplia gama de herramientas biotecnológicas, basadas en el cultivo de tejidos vegetales, para generar variación por diferentes vías y hacer selecciones tempranas. Vemos cómo estas técnicas suelen ser complementarias a la hibridación sexual intra e interespecífica, que sigue considerándose como un método importante de mejoramiento. Sin embargo, aún se requiere mayor conocimiento sobre la tolerancia natural a hongos, virus y estreses ambientales del germoplasma silvestre de *V. planifolia* y de sus especies afines.

Los avances logrados son pocos, lo cual está relacionado con el desarrollo natural de la especie, por ejemplo, un esqueje de vainilla puede tardar de tres a cinco años en tener su primera floración. Por esto, debe considerarse un tiempo significativamente superior para evaluar en campo a una planta resultante de mejoramiento genético. Además, en el caso de híbridos interespecíficos, debe considerarse la posible necesidad de retrocruzas. Por ello, son muy importantes las herramientas que nos permitan la selección temprana de caracteres de interés agronómico, como la tolerancia a *Fusarium* y sequía. La selección *in vitro* abre la posibilidad de evaluar una gran cantidad de germoplasma, a fin de escoger y multiplicar material promisorio.

La variedad “Handa” y otros materiales, recientemente obtenidos, con cierta tolerancia a Fov podrían contribuir a restaurar algunas áreas vainilleras afectadas por este patógeno. Sin embargo, actualmente, existe una disparidad entre el material genético que se genera por medios biotecnológicos y los que se evalúan en fase de campo. Por otro lado, aunque existen trabajos de ingeniería genética en Vainilla, a diferencia de otros cultivos, la transformación genética no es una tendencia actual para su mejoramiento. Esto puede deberse a que aún falta mucho conocimiento acerca de los genes que confieren tolerancia a los principales factores que afectan

al cultivo. Se requiere intensificar los esfuerzos de mejoramiento genético, dado que enfrentamos un panorama de cambio climático que modificará los patrones de lluvia, provocando sequías más prolongadas y la aparición de plagas y enfermedades más agresivas. Además, no se debe descartar el desarrollo de variedades poliploides capaces de producir vainas de mayor tamaño, y de variedades con mayor concentración de vainillina ó mayor productividad. No obstante, aunque queda un largo camino por recorrer, los avances obtenidos y las nuevas tecnológicas genómicas y epigenómicas, contribuirán a lograr un mayor progreso en los trabajos de mejoramiento genético y a solucionar las principales problemáticas que el cultivo enfrenta actualmente.

Descargos de responsabilidad

Todos los autores realizaron aportes significativos al documento y quienes están de acuerdo son su publicación y manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

Agradecimientos

El autor Alma Laura Ramos Castellá agradece al Consejo Nacional de Ciencia y (CONACYT) por la beca doctoral número 309921.

Referencias

- Amiryousefi, A., Hyvonen, J., & Poczai, P. (2017). The plastid genome of Vanillon (*Vanilla pompona*, Orchidaceae). *Mitochondrial DNA Part B* 2(2), 689-691 <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1383201>
- Anuradha, K., Shyamala, B. N., & Naidu, M. M. (2013). Vanilla- its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(12), 1250-1276. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.563879>
- Archila, F., Menchaca, R., & Chiron, G. (2019). Notes on Mesoamerican orchids. I: Vanilla, with a new species. *Richardiana*, 3, 71-79. <http://richardiana.jardinbotaniquedeguyane.com/wp-content/uploads/2019/05/Publication-Jardin-botanique-de-Guyane-30-Vanilla-rebecae.pdf>
- Arditti, J., Nagaraja, R., & Nair, H. (2009). History-pollination: Hand-pollination of Vanilla: How many discoverers? En T. Kull, J. Arditti & S. Wong (Eds.), *Orchid biology: reviews and perspectives X*. (pp. 233-347). Dordrecht. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8802-5_7
- Arya, S., Rookes, J., Cahill, D., & Lenka, S. (2021). Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavoring molecule. *Advances in Traditional Medicine*, 21, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00531-w>
- Azofeifa, J., Paniagua, A., & García, J. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1), 189-202. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43730495019.pdf>
- Azofeifa-Bolaños, J., Gigant, L. R., Nicolás-García, M., Pignal, M., Tavares-González, F. B., Hagsater, E., Salazar-Chávez, G., Reyes-López, D., Archila Morales, F. L., García-García, J.

A., Da Silva, D., Allibert, A., Solano-Campos, F., Rodríguez-Jiménez, G. C., Paniagua Vásquez, A., Besse, P., Pérez-Silva, A., & Grisoni, M. (2017). A new vanilla species from Costa Rica closely related to *V. planifolia* (Orchidaceae). *European Journal of Taxonomy*, 284, 1-16. <https://doi.org/10.5852/ejt.2017.284>

Barona, C. (2018) Two new records in Orchidaceae (Vanillinae) from southern most Colombian Amazonia: *Vanilla javieri* a new species, and *Vanilla appendiculata*. *Phytotaxa*, 375(4), 261-273. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.375.4.2>

Bello, B. J, García, G., & Iglesias, A.G. (2015). *In vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) under slow growth conditions. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(2), 165-171. <https://doi.org/10.35196/rfm.2015.2.165>

Bhai, R., & Thomas, J. (2000). Phytophthora rot- A new disease of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Indian Journal of Spices and Aromatic Crops*, 9, 73-75. <https://core.ac.uk/download/pdf/236022265.pdf>

Bhai, R., Iahwara, R., & Anandaraj, M. (2006). Yellowing and premature bean dropping in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Journal of Plantation Crops*, 34(2), 115-117.

Bhai, R., & Dhanesh, J. (2008). Occurrence of fungal diseases in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in Kerala. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 17(2), 140-148. <https://updatepublishing.com/journal/index.php/josac/article/view/4907>

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). *American Journal of Botany*, 95(7), 805-815. <https://doi.org/10.3732/ajb.2007332>

Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.-F., & Besse, P. (2008). Biodiversity and preservation of Vanilla: Present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 551-571. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9260-3>

Bory, S., Catrice, O., Brown, S., Leitch, J., Gigant, R., Chiroleu, F., Grisoni, M., Duval, M.-F., & Besse, P. (2008). Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Genome*, 51(10), 816-826. <https://doi.org/10.1139/G08-068>

Castillo, M., & Engleman, E. (1993). Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*. *Acta Botánica Mexicana*, 25, 49-59. <https://doi.org/10.21829/abm25.1993.682>

Chambers, A. (2019). Vanilla (*Vanilla spp.*) Breeding. En J. Al-Khayri, S. Jain & D. Johnson (Eds), *Advances in plant breeding strategies: Industrial and food crops* (pp. 707-734). Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-23265-8>

Chandran, S., & Puthur, J. T. (2009). Assorted response of mutated variants of *Vanilla planifolia* Andr. towards drought. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 1023-1029. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0321-4>

Charron, C., Hubert, J., Minatchy, J., Wilson, V., Chrysot, F., Gerville, S., Iood, R., Jeandel, C., & Grisoni, M. (2018). Characterization of *Colletotrichum orchidophilum*, the agent of black spot disease of vanilla. *Journal of Phytopathology*, 166 (7-8), 525-531. <https://doi.org/10.1111/jph.12714>

Childers, N., Cibes, H., & Hernández, E. (1959). Vanilla: The orchid of commerce. En C. Withner (Ed.), *The orchids: A scientific survey* (pp. 477-508). Ronald Press.

Colunga, G., & Zizumbo, V. (2004). Domestication of plants in Maya Lowlands. *Economic Botany*, 58, 101-110. https://www.academia.edu/4586391/Domestication_of_plants_in_Maya_Lowlands

Damian, A. (2019). *Vanilla yanesha* (Orchidaceae), a new species of the membranaceous-leaved group from the central rainforest of Peru. *Willdenowia*, 49(1), 5-9.

<https://doi.org/10.3372/wi.49.49101>

Damian, A., & Mitidieri, N. (2020). Living in the clouds: a new high-elevation species of *Vanilla* (Orchidaceae, Vanilloideae) from Perú. *Phytotaxa*, 451(2), 154-160.

<https://orcid.org/0000-0002-0233-9935>

De Fraga, C., Rodrigues, D., & Pansarini, E. (2017). Two new species of *Vanilla* (Orchidaceae) in the Brazilian Atlantic Forest. *Phytotaxa*, 296(1), 63-72.

<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.296.1.4>

Dequaire, J. (1976). L'amélioration du vanillier à Madagascar. *Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée*, 23, 139-158. <https://doi.org/10.3406/jatba.1976.3246>

Díez, G., Moreno, M., & Gantivia, E. (2017). Effects of light intensity on the morphology and CAM photosynthesis of *Vanilla planifolia* Andrews. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 70(1), 8023-8033. <https://doi.org/10.15446/rfna.v70n1.61736>

Divakaran, M., Nirmal, B., 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(4), 414-422.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.02.018>

Divakaran, M., Jayakumar, V., Veena, S., Vimala, J., Basha, A., Saji, K., Nirmal, K., & Peter, K. (2008). Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 459-470.

<https://doi.org/10.1007/s10722-007-9252-3>

Divakaran, M., Geetha, S., Nirmal B., & Peter, K. (2008). Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. *Current Science*, 99, 115-120.

https://www.researchgate.net/figure/Isolation-and-fusion-of-protoplasts-in-Vanilla-species-ab-Release-of-protoplast-from_fig1_289079949

Flanagan, N. & Mosquera-Espinoza, A. T. (2016). An integrated strategy for the conservation and sustainable use of native *Vanilla* species in Colombia. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 16(2), 1-19. <https://doi.org/10.15517/lank.v16i2.26007>

Flanagan, N., Ospina-Calderón, N. H., García, L. T., Mendoza, M., & Mateus, H. A. (2018). A new species of *Vanilla* (Orchidaceae) from the North West Amazon in Colombia. *Phytotaxa*, 364(3), 250-258. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.364.3.4>

Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003). Research review: *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157(3), 493-502. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>

Gantiva, E., Díez, M., & Moreno F. (2020). Efecto de la interacción luz-agua sobre la fotosíntesis de la *Vanilla planifolia* (Orquidaceae). *Revista Biología Tropical*, 68(4), 1250-1261.

<https://doi.org/10.15517/RBT.V68I4.41385>

Gätjens, O., & Montero, W. (2012). Desarrollo de una nueva metodología de transformación genética no tradicional, como estrategia potencial para inducir resistencia a infecciones fúngicas en vainilla (*Vanilla planifolia*) [Informe final de investigación, N.º 5402-2160-2701]. San Carlos, Costa Rica.

https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/2929/Informe_Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Grisoni, M., Moles, M., Besse, P., Bory, S., Duval, M.-F. & Kahane, R. (2007). Towards an international plant collection to maintain and characterize the endangered genetic resources of Vanilla. *Acta Horticulturae*, 760, 83-9. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.760.9>

Grisoni, M., & Dijoux, J.-B. (2019). Vanilla variety named 'Handa'. Washington: USPTO, 6 p. N° de dépôt : 14/999,830, N.° de brevet : US2017/0013762 P1, N° de dépôt: 14999,810, N° de brevet: USPP30964 P3. <https://patents.google.com/patent/US20170013762P1/en>

Grisoni, M., & Fleuron, N., (2021). The beautiful hills: half a century of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) breeding in Madagascar. *Genetic Resources and Crop Evolution* 68, 1691-1708. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01119-2>

Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras, C., & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, Mexico. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 43-55. <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.37>

Hernández, H. J. (2018). Vanilla diseases. En D. Havkin & F. Belanger (Eds.), *Handbook of vanilla science and technology* (pp 27-39). Wiley Blackwell.

Hernández, J., Curtí S., & Ríos, A. (2019). Retención de frutos en *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews como reguladores de crecimiento. *Agronomía Mesoamericana*, 30(3). <http://doi.org/10.15517/am.v30i3.33988>

Hernández, R., Dolce, N., Flores, C., Rascón, M., Ángeles, A., Folgado, R., & González, A. (2020). Advances in cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) shoot-tips: assessment of new biotechnological and cryogenic factors. *In Vitro Cellular*, 56(2), 236-246. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10069-w>

Hernández, L. E., Reyes, L. D., Castillo, M., Avendaño, A. C., Corona, T. T., García, Z. J., & Pascual, R. F. (2020). *In vitro* conservation of *Vanilla planifolia* hybrids in minimal growth conditions. *Agroproductividad*, 13(12), 3-10. <https://doi.org/10.32854/agrop.v13i12.1773>

Karremans, A., & Lehmann, P. (2018). A highly threatened new species of *Vanilla* from Costa Rica. *Orchids*, 304-307.

Koch, A. K., De Fraga, C. N., dos Santos, J. U., & Ilkiu, B. A. (2013). Taxonomic Notes on *Vanilla* (Orchidaceae) in the Brazilian Amazon, and the description of a new species. *Systematic Botany*, 38(4), 975-981. <https://doi.org/10.1600/036364413X674706>

Kourí, E. (2000). La vainilla de Papantla: Agricultura, comercio y sociedad rural en el siglo XIX. *Signos Históricos*, 3, 105-130. <https://www.redalyc.org/pdf/344/34400305.pdf>

Koyyappurath, S., Conéjéro, G., Dijoux, J. B., Lapeyre-Montès, F., Jade, K., Chiroleu, F., Gatineau, F., Verdel, J. L., Besse, P. & Grisoni, M. (2015). Differential responses of *Vanilla* accessions to root rot and colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. radices- vanilla. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01125>

Lestari, E., Sukmadjaja, D., & Mariska, D. (2006). Perbaikan ketahanan tanaman panili terhadap penyakit layu melalui kultur *in vitro*. *Journal Litbang Pertanian*, 25,149-153. https://www.academia.edu/18370313/PERBAIKAN_KETAHANAN_TANAMAN_PANILI_TERHADAP_PENYAKIT_LAYU_MELALUI_KULTUR_IN_VITRO

Lestari, E. (2012). Pemanfaatan kombinasi pemberian mutagen dan kultur *in vitro* untuk perakitan varietas unggul baru. *Agroinovas*, 34(64), 6-10. <https://www.litbang.pertanian.go.id/download/315/file/Pemanfaatan-Kombinasi-Pemb.pdf>

Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J., Kim, S.-C., & Gómez, A. (2008). Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62, Article number 127. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>

Lubinsky, P., Cameron, K. M., Molina, M. C., Wong, M., Lepers, A., Gomez, A., & Kim, S. C. (2008). Neotropical roots of a Polynesian spice: the hybrid origin of Tahitian vanilla, *Vanilla tahitensis*. *American Journal of Botany*, 95(8), 1040-1047. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800067>

Malabadi, R. B., & Nataraja, K. (2007). Genetic transformation of *Vanilla planifolia* by *Agrobacterium tumefaciens* using shoot tip sections. *Research Journal of Botany*, 2(2), 86-94. <http://10.3923/rjb.2007.86.94>

Menchaca, G. R., Ramos, P. J. M, Moreno, M. D., Luna, R. M., Mata, R. M., Vázquez, G. L., & Lozano, R. M. (2011). Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 80-84. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22945/23724>

Molineros, H. F., González, M. R., Flanagan, N., & Tupac, O. J. (2014). *Vanilla rivassii* (Orchidaceae), a new species from the Colombian Pacific Region. *Lankesteriana*, 13(3), 353-357. <https://doi.org/10.15517/lank.v13i3.14423>

Nurcahyani, E., Sumardi, I., Hadisutrisno, B., & Suharyanto, E. (2012). Penekanan perkembangan penyakit busuk batang vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) melalui seleksi asam fusarat secara *in vitro*. *Journal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 12(1), 12-22. <https://media.neliti.com/media/publications/83112-ID-penekanan-perkembangan-penyakitbusuk-ba.pdf>

Ortega, L. C., Iglesias, A. L., Beltrán, J. D., & Ramírez, M. A. (2016). Aislamiento y fusión de protoplastos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews y *Vanilla pompona* Schiede. *Revista Asociación Colombiana de Ciencias*, 1(28), 16-24. <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/121>

Pansarin, E., Aguiar, J., & Ferreira A. (2012). A new species of *Vanilla* (Orchidaceae: Vanilloideae) from Sao Paulo, Brazil. *Brittonia*, 64, 157-161. <https://doi.org/10.1007/s12228-011-9215-z>

Pansarin, E., & Miranda, M. (2016). A new species of *Vanilla* (Orchidaceae: Vanilloideae) From Brazil. *Phytotaxa*, 267(1). <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.267.1.9>

Pinaria, A. G., Liew, E. C. Y., & Burgess, L. (2010). *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australasian Plant Pathology*, 39, 176-183. <https://doi.org/10.1071/AP09079>

Raffi, A., Psyquay A., Abdullah, T., & Go, R. (2017). A new species from peninsular Malaysia. *Malayan Nature Journal*, 69(2), 17-22.

Raffi, A., Nordin, F., Psyquay, A., Dahalan, P., & Go, R. (2017). *Vanilla norashikiniana* R. Go et A. Raffi *sp. nov.*, a new Orchid species from peninsular Malaysia. *Malayan Nature Journal*, 69(3), 273-276.

Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Teixeira, J. A., Luna-Rodríguez, M., Noa-Carranza, J. C., Bautista-Aguilar, J. R., Leyva-Ovalle, O. R., & Murguía-González, J. (2019). *In vitro* selection of vanilla plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(40). <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2832-y>

Ramos, C. A. L. (2016). Obtención de líneas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews tolerantes al estrés hídrico [Tesis de doctorado, Universidad Veracruzana].

Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ortíz-García, M., Andueza-Noh, R. H., Octavio-Aguilar, P., & Luna-Rodríguez, M. (2017). 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 Resource*, 15(4), 310-320. <https://doi.org/10.1017/S1479262115000660>

Retheesh, S. T., & Bhat, A. I. (2011). Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from protocorm-like bodies of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20, Article number 262. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0057-2>

Reyes, D.; Flórez, A., Huerta, M., Kelso, H., Avendaño, C., Lobato, R., Aragón, A., & López, J. (2014). Variación morfométrica de fruto y semillas en cuatro especies del género *Vanilla*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 205-218. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282014000300002

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* Jacks. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources Crop Evolution*, 59, 875-887. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9729-y>

Sánchez, M. S., Becerril, A. E., Tijerina, L., & Santizo, J.A. (2001). Crecimiento y desarrollo de Vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24: 49-56. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/24-1/6a.pdf>

Sasikumar. B. (2010). Vanilla Breeding- a review. *Agricultural Research Communication Center*, 31(2), 139-144.

Schlüter, P. M., Soto, M. A. S., & Harris, S. A. (2007). Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany*, 61(328). [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2007\)61\[328:GVIVPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2007)61[328:GVIVPO]2.0.CO;2)

SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. 2da Sección, 30 de diciembre de 2010.

Soto-Arenas, A. M. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México [Proyecto N.º J101]. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf>

Soto-Arenas, M. A. (2010). A new species of *Vanilla* from south America. *Lankesteriana*, 9(3), 281-284. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/12020>

Soto-Arenas, M. A., & Dressler, R. L. (2010). A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla plumier* ex Miller with a characterization of their region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*, 9(3), 285-354. <http://doi.org/10.15517/LANK.V0I0.12065>

Soto, C. M., Esperon, P., & Sauleda, P. (2019) A new species of *Vanilla* Miller is described for Cuba. *New World Orchidaceae* 56, 1-7.

Thomas, J., & Bhai, S. (2001). Sclerotium rot- a new disease of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 9(2), 175-176. <https://www.updatepublishing.com/journal/index.php/josac/article/view/4680>

Verma, P. C., Chakrabarty, D., Jena, S. N., Mishra, D. K., Singh, P. K., Sawant, S. V., & Tuli, R. (2009). The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), 581-589. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.11.006>

Villarreal, M., Herrera, C. B. (2018). Requerimiento hídrico en el sistema de producción vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews)- Naranja (*Citrus sinensis* L.) en la región del Totonacapan, Veracruz, México. *Agroproductividad*, 11(3), 29-36. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/213>

Wong, M. (2005). Germplasm collection of *Vanilla tabitensis* in French Polynesia. In: Vanilla 2005 México, The International Symposium on the *Vanilla* Business, Veracruz, Mexico, 15-16, Nov. 2005.

Ying, H., Resende, M. F. R., Bombarely, A., Brym, M., Bassil, E., & Chambers, A. H. (2019). Genomics-base diversity analysis of *Vanilla* species using a *Vanilla planifolia* draft genome and genotyping-by-sequencing. *Scientific Reports*, 9, Article number 3416. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40144-1>