



IBCIENCIAS IBCIENCIAS IBCIENCIAS



IBCIENCIAS



www.biociencias.unach.mx/ibciencias



Volumen 6 · Número 1 · Junio · 2023

Revista científica electrónica

Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, México



Volumen 6 · Número 1 · Junio · 2023

www.biociencias.unach.mx/ibciencias

IBCIENCIAS, volumen 6, número 1, Enero-Junio 2023, es una revista científica digital de publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Chiapas, a través del Instituto de Biociencias, Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México. Tel. (962) 64 2 7972, www.biociencias.unach.mx/ibciencias, ibciencias.revista@gmail.com. Editor responsable: Dr. Alfredo Vázquez Ovando. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2022-070614284600-102, ISSN en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número Dr. Alfredo Vázquez Ovando; Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México.

CONTENIDO

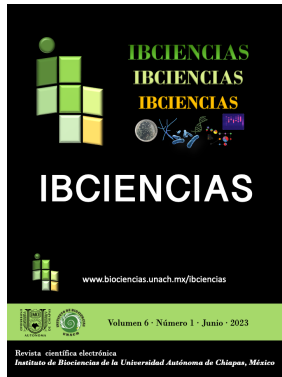
Junio de 2023 / Vol 6 / Num 1

- 1-9** **Control de la hiperhidricidad en callos embriogénicos inducidos en explantes foliares de café Robusta (*Coffea canephora* P.).** Cuauhtémoc Arteaga-Solano, Leobardo Iracheta-Donjuan, Pablo López-Gómez, Simitrio Ortiz-Curiel, Ismael Méndez-López.
- 10-17** **Efecto de *Bacillus* sp. sobre la incidencia y severidad de la moniliasis del cacao.** Víctor Jesús Albores-Flores, Saidy Lizbet Mejía-Velázquez, Julieta Grajales-Conesa, Dory Gledys Ramos-Pérez, Martha Alicia Tlatelpa- Díaz, José Alfonso López-García.
- 18-28** **Proteínas heterólogas en *Yarrowia lipolytica*: la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L.** Roberto Méndez-Eslava, Didiana Gálvez-López, Miguel Salvador- Figueroa, Raymundo Rosas-Quijano.
- 29-38** **Genes involucrados en el desarrollo foliar de *Jatropha curcas*.** Adriana Sánchez-Gutiérrez, Eber Rojas-Salmerón, Miguel Salvador-Figueroa
- 39-45** **Fermentación de vainas de *Vanilla planifolia*.** Mariana Montserrath Nájera-Hernández, Ana Gabriela Coutiño-Cortés.



Volumen 6 · Número 1 · Junio · 2023

www.biociencias.unach.mx/ibciencias



Control de la hiperhidricidad en callos embriogénicos inducidos en explantes foliares de café Robusta (*Coffea canephora* P.)

Cuauhtémoc Arteaga-Solano^{1,2}, Leobardo Iracheta-Donjuan^{1*}, Pablo López-Gómez¹, Simitrio Ortiz-Curiel¹, Ismael Méndez-López¹

¹Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tuxtla Chico, Chiapas, México.

²Universidad Tecnológica de la Selva. Ocosingo, Chiapas, México.

Resumen

Durante la inducción de callo embriogénico en *Coffea canephora* Pierre, son comunes los problemas de producción de callo hiperhidratado con poco potencial para la formación de embriones. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la respuesta morfogénica y relaciones hídricas de explantes de tres secciones de hojas tiernas y jóvenes de café Robusta (INIFAP 95-9), sometidas a diferentes concentraciones de sacarosa y gelificante, como agentes osmóticos. Para ello, se evaluaron dos tipos de hojas (hojas tiernas y jóvenes) y la sección del limbo foliar (basal, media y apical), cada tipo sometido a tres concentraciones de sacarosa: 30, 50 y 80 g L⁻¹ y tres concentraciones de phytigel: 5.2, 8 y 16 g L⁻¹. En las tres secciones de la hoja, la concentración de 8 g L⁻¹ de phytigel produjo callo de consistencia de calidad (arenosa compacta o de fácil dispersión); en hojas jóvenes, el tratamiento con 5.2 y 8 g L⁻¹ de phytigel fueron los mejores para producir este tipo de callo embriogénico. Los callos de las diferentes secciones tuvieron la capacidad de osmorregulación al mantener el potencial de turgencia (Ψ_p) con valores positivos por la acumulación activa de solutos. Con base a los resultados obtenidos fue posible identificar el tipo y sección foliar, a su vez el agente osmótico y la concentración más eficiente para reducir la hiperhidratación y generar callos con potencial embriogénico.

Palabras clave:

Agentes osmóticos
Café Robusta
Callogénesis
Hiperhidratación

Keywords:

Osmotic agents
Coffee Robusta
Callogenesis
Hyperhydration

Control of hyperhydricity in embryogenic callus induced in Robusta coffee leaf explants (*Coffea canephora* P.)

Abstract

During the induction of embryogenic callus in *Coffea canephora* Pierre, problems with the production of hyperhydrated callus with little potential for embryo formation are common. This work aimed to study the morphogenic response and water relations of explants from three sections of tender and young leaves of Robusta coffee (INIFAP 95-9), subjected to different concentrations of sucrose and gelling agent, as osmotic agents. For this, two types of leaves (tender and young leaves) and the section of the leaf blade (basal, middle, and apical) were evaluated, each type subjected to three concentrations of sucrose: 30, 50 and 80 g L⁻¹ and three concentrations of phytigel: 5.2, 8 and 16 g L⁻¹. For the three sections of the leaf, the concentration of 8 g L⁻¹ of phytigel produced callus of quality consistency (compact sandy or easily dispersed); in young leaves, the treatments with 5.2 and 8 g L⁻¹ of phytigel were the best to produce this type of embryogenic callus. The calluses of the different sections had the capacity for osmoregulation by maintaining the turgor potential (Ψ_p) with positive values due to the active accumulation of solutes. Based on the results obtained, it was possible to identify the type and leaf section, in turn the agent osmotic and the most efficient concentration to reduce hyperhydration and generate callus with embryogenic potential.

* Autor para correspondencia:

Campo Experimental
Rosario Izapa del Instituto
Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y
Pecuarias, Carretera
Tapachula-Cacahoatán Km
18. Tuxtla Chico, Chiapas,
México. C.P. 30870.
Teléfono: + 52 9621059535.
Correo-electrónico:
iracheta.leobardo@inifap.gob.mx

1. Introducción

El café es uno de los principales productos que se comercializan en el mercado mundial, con una producción de 10.5 millones de toneladas (Avila-Victor et al., 2023). Su producción se realiza normalmente en las zonas tropicales. Actualmente más de 80 países lo cultivan, de los cuales poco más de 50 lo exportan. Existe un gran número de especies del género *Coffea*; pero desde el punto de vista comercial, el *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre., tienen un importante papel en el mercado internacional, esto se debe a sus características de productividad, calidad de bebida y adaptabilidad (Clifford y Willson, 1985). Sin embargo, este cultivo enfrenta una serie de complicaciones que parten desde incidencia de plagas y enfermedades más agresivas con mayor frecuencia (Henderson, 2019). Aunado a eso, los tiempos de obtención de plantas son largos, esto como consecuencia del uso de la semilla como método tradicional para la obtención de los cafetos que, además han dado lugar a la alta variabilidad genética y fenotípica que se observa en las plantaciones actuales (Wintgens y Zamarripa, 2004); lo cual se traduce en baja calidad y rendimientos. Por ello, la multiplicación vegetativa juega un papel importante en especies perennes como el café, la cual puede ser por medio de estacas o injerto (Berthouly, 1997; Solano, 2001).

El uso de técnicas biotecnológicas de reproducción asexual, tal como el cultivo de tejidos vegetales, permite multiplicar genotipos élite en forma masiva y en un tiempo relativamente corto (López-Gómez et al., 2010). En este sentido, el cultivo de tejidos permite obtener a bajo costo gran cantidad de plantas mejoradas con características sobresalientes de rendimiento y calidad. Con el cultivo de tejidos vegetales, la propagación se puede realizar mediante la embriogénesis somática (Berthouly, 1997), la cual puede ser una alternativa no sólo de la propagación masiva, sino también como una herramienta útil en los programas de mejoramiento mediante transformación genética. Esta técnica de reproducción asexual ofrece grandes ventajas ya que permite multiplicar genotipos de forma masiva y en tiempos de 6 a 10 meses, dependiendo del genotipo (Gálvez-López et al., 2016; López-Gómez et al., 2016; Solano, 2001).

Durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática en café, son posibles algunas complicaciones en la fase de inducción de callo; específicamente en lo que se refiere a la condición fisiológica del callo generado a partir de explantes provenientes de hojas jóvenes o tiernas, los cuales manifiestan altos niveles de hiperhidricidad y una apariencia traslúcida de los tejidos. Esta condición corresponde a un desorden fisiológico que se presenta en los tejidos cultivados *in vitro*, especialmente en las hojas, que incide sobre la fotosíntesis, el intercambio gaseoso y la diferenciación morfogénica. En menor medida, los tallos y raíces resultan afectados por esta anomalía anatómica, que en ciertos casos van a impedir el establecimiento de plantas micropropagadas en condiciones *ex vitro* (Kevers et al., 2004; Saher et al., 2004; Ziv, 1991).

En el caso de callos hiperhidratados, estos reaccionan de dos formas distintas al ser sometidos a la multiplicación en medios líquidos; la primera de ellas es la desintegración de los agregados obtenidos en los medios semisólidos y la segunda es la incapacidad de diferenciación de las células en suspensión. Lo anterior trae como consecuencia retrasos en la obtención de líneas embriogénicas, así como pérdidas económicas.

Al respecto, en diferentes cultivos se ha planteado como alternativa de solución al problema de la hiperhidratación, el incremento de agentes osmóticos en el medio de cultivo, como es el caso de las fuentes de carbono (sacarosa) y los agentes gelificantes (Ivanova y Staden, 2011). El incremento de las concentraciones de las fuentes de carbono y los agentes gelificantes en el medio de cultivo semisólido, podría mejorar las relaciones hídricas de los tejidos, lo que permitiría disminuir la hiperhidricidad de los agregados celulares. Lo anterior se logra, ya que la sacarosa, el gelificante e incluso la concentración de sales minerales, retienen el agua y afectan el potencial matricial (Brand, 1993; Cárdenas, 1999) y osmótico del medio de cultivo (George, 1993; Yoshida et al., 1973). Estos componentes pueden promover estrés hídrico en los tejidos y ante este efecto el tejido o células inician la biosíntesis de ABA (ácido abscísico); lo que podría aumentar el contenido de este regulador y por ende propiciar la formación de callo de mayor calidad para embriogénesis somática. Por otro lado, la aplicación de agentes osmóticos en medios de cultivo provocaría competencia por el agua entre los agentes osmóticos del medio y las células hiperhidratadas, lo cual induciría la osmorregulación de los tejidos, mediante el mantenimiento del potencial de turgencia (Ψ_p) con valores positivos, mediante la acumulación activa de solutos, al disminuir el potencial osmótico (Ψ_π) e incluso el potencial hídrico (Ψ_w) del tejido (Quintana-Escobar et al., 2017). Lo anterior permitiría el control de los niveles de humedad de los tejidos e incluso mejorar la diferenciación de los callos. Es por ello que el objetivo de esta investigación fue estudiar la respuesta morfológica y relaciones hídricas de explantes de tres secciones de hojas tiernas y jóvenes de café Robusta (INIFAP 95-9), sometidas a diferentes concentraciones de sacarosa y gelificante, como agentes osmóticos.

2. Materiales y métodos

2.1. Material biológico

Se usaron hojas tiernas y jóvenes como explantes de plantas élite de *Coffea canephora*, genotipo INIFAP 95-9, provenientes del jardín clonal del INIFAP-CERI. Las hojas tiernas de un mes de edad presentaron coloración verde tierno y de textura suave, mientras que las hojas jóvenes, de tres meses, fueron de color verde oscuro y de textura áspera. Todas las hojas seleccionadas tuvieron un tamaño homogéneo, sin daños y sin presencia aparente de enfermedades.

2.2. Desinfección

Las plantas del genotipo a utilizar fueron asperjadas con una solución de Amistar® al 50% (Azoxyestrobilina 2 g L⁻¹) durante tres días antes del establecimiento *in vitro*. Las hojas utilizadas fueron lavadas con agua y detergente comercial; posteriormente fueron sumergidas en una solución previamente esterilizada de ácido ascórbico (0.1 g L⁻¹), ácido cítrico (0.15 g L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹) y Azoxyestrobilina al 50% (2 g L⁻¹). En estas condiciones las hojas fueron sometidas a vacío con una boba Welch Dou Seal® 1400 por 3 min, con la finalidad de eliminar el aire del tejido que impidieran el contacto con la solución fungicida-antioxidante. En seguida se desinfectaron con hipoclorito de calcio [Ca(ClO)₂] al 7% por 20 min, bajo la campana de flujo laminar, finalmente fueron enjuagadas tres veces con agua destilada esterilizada y colocadas en una solución con los antioxidantes mencionados anteriormente.

2.3. Clasificación del tipo de hoja y sección

Una vez finalizado el proceso de desinfección, las hojas tiernas y jóvenes fueron separadas y seccionadas en tres partes (basal, media y apical). Posteriormente se obtuvieron explantes de 1 cm², los cuales fueron sembrados en cajas de Petri de 12x100 mm con 20 mL de medio de cultivo esterilizado previamente a 121 °C y 15 lb por 20 min.

2.4. Medio de cultivo

El medio utilizado en esta etapa estuvo compuesto por la formulación de las sales inorgánicas de Yasuda et al. (1985), con las vitaminas descritas por Gamborg (2002), adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 1.125 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 5.2 g L⁻¹ de phytigel Sigma® y pH de 6.3, ajustado con hidróxido de potasio o ácido nítrico al 1N. Las cajas de Petri con el material vegetal establecido fueron selladas herméticamente. Después de dos semanas, los explantes fueron transferidos a cinco medios de cultivo diferentes, en los que se utilizó el mismo medio Yasuda et al. (1985) ya mencionado, pero usando dos concentraciones de sacarosa (50 y 80 g L⁻¹), dos de phytigel (8 y 16 g L⁻¹) y un testigo con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 5.2 g L⁻¹ de phytigel.

2.5. Tratamientos e incubación

Se generó un total de 36 tratamientos, producto de la combinación de los dos tipos de hojas (tiernas y jóvenes), las tres secciones del limbo de la hoja (basal, medio y apical) y seis concentraciones diferentes de agentes osmóticos (tres de sacarosa y tres de phytigel). Para efectos prácticos, los tratamientos se presentan por separado, 18 para hojas tiernas y 18 para hojas jóvenes. Para todos los tratamientos se utilizaron cajas de Petri desechables de 60x15 mm con 10 mL de medio de cultivo. Todos los tratamientos fueron colocados en un cuarto oscuro a 26 ± 1 °C y 50% de humedad relativa.

2.6. Variables evaluadas

A los 30 días se evaluaron las variables respuesta a excepción de la formación de embriones que fue evaluada a los 51 días,

las cuales se mencionan a continuación: Oscurecimiento de hoja, esta fue evaluada dependiendo del grado del cambio de coloración del explante que comprendieron rangos de 0 a 100%. La contaminación, este valor fue asignado con relación a la presencia o ausencia de hongos o bacterias en las unidades experimentales sin considerar el tipo, tamaño o grado de infección en el tejido. La callogénesis se evaluó de acuerdo a la ausencia o presencia de al menos un callo de 0.6 mm de diámetro. Para la necrosis, se asignaron como tejidos necróticos todos aquellos que no mostraron ninguna respuesta morfológica y una coloración café oscuro o negra y sin capacidad de reactivar el crecimiento. Para la formación de embriones, se evaluó la formación de embriones en sus diversas etapas (globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar), para ello se consideró que presentasen un color blanco, forma de cualquiera de sus etapas y textura compacta. El porcentaje de humedad se determinó de forma gravimétrica con base a la fórmula $H = \frac{(Pf - Ps)}{Pf} \times 100$; donde Pf es el peso fresco, Ps el peso seco. Peso fresco. Para esta variable, en condiciones asépticas se colectó todo el callo producido en los segmentos de hoja a los 30 días y se procedió a pesarlo en una balanza electrónica con precisión de mg. El peso seco se determinó en muestras sometidas a 70 °C por 48 h.

2.6.1. El potencial hídrico y sus componentes

La determinación del potencial hídrico se realizó colocando las muestras en cámaras psicométricas Wescor®, conectadas a un microvoltímetro wescor® HT-33T. Posteriormente, las muestras fueron congeladas durante 24 h con la finalidad de romper las membranas celulares y evaluar el potencial osmótico. Cada lectura contó con tres repeticiones, así mismo éstas eran de pesos homogéneos. Ambas lecturas fueron convertidas en bares mediante las ecuaciones de regresión lineal obtenidas en la calibración de las cámaras con diferentes soluciones de NaCl. El potencial de turgencia se calculó despejando y sustituyendo los valores de la ecuación algebraica del potencial hídrico ($\Psi_w = \Psi_\pi + \Psi_p$).

2.6.2. Consistencia del callo

Esta variable representa un indicador de lo granuloso y húmedo que puede estar un callo. Lo anterior está asociado con el grado de formación de agregados celulares y forma específica de las células. Para esta variable se consideró el siguiente criterio de evaluación; AC = consistencia arenosa compacta. El callo con esta consistencia fue de calidad, con células competentes para la multiplicación sin perder la capacidad de formar agregados celulares, conformado principalmente por células isodiamétricas. Al ser disgregado al tacto el callo se dispersa formando gránulos compactos, de consistencia arenosa. Este tipo de callo se considera como altamente reactivo para la formación de líneas embriogénicas en medios líquidos con alta capacidad de diferenciación de embriones. AFD = arenosa de fácil dispersión. Correspondió a callos con calidad intermedia/alta; también forman agregados celulares y está conformado por células isodiamétricas; en algunos casos es efectivo en la formación de líneas embriogénicas. Al ser disgregado al tacto el callo se

dispersa formando gránulos de menor tamaño que los del AC, pero con una consistencia arenosa parecida. P = consistencia pastosa. Son los callos de baja calidad; aunque forman agregados celulares idénticos a los de AC y AFD, al ser disgregado al tacto éste no se dispersa, queda unido formando una masa con características plásticas. Al ser colocados en medios líquidos para su multiplicación se oscurecen y mueren o en otros casos se multiplican, pero sin ninguna capacidad para diferenciar embriones somáticos. FD = de fácil dispersión. Son callos con apariencia embriogénica, es decir que forma agregados celulares, pero su coloración es más vítrea y al ser disgregado al tacto, se dispersa o desintegra por completo, sin dejar rastro aparente a simple vista. Este callo puede multiplicarse en medios líquidos, pero no responderá a la formación de embriones.

2.7 Diseño experimental y análisis de datos

La recopilación de los datos de cada una de las variables evaluadas en las distintas etapas del experimento fue realizada a los 3, 6, 10, 15 y 30 días después del establecimiento del cultivo. El diseño utilizado correspondió a un completamente al azar con arreglo factorial. Los análisis estadísticos se efectuaron por separado para cada tipo de hoja, 18 tratamientos para hoja tierna y 18 para hoja joven, aunque para el análisis factorial se consideraron los 36 tratamientos. Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias, con un nivel de significancia de 0.05, así como el cálculo del error estándar mediante el paquete estadístico SAS System para Windows 9.0.

3. Resultados y Discusión

A los 30 días después del establecimiento se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos de las variables de oscurecimiento y contaminación, tanto para las hojas tiernas como jóvenes; mientras que para las variables de callogénesis y formación de embriones sólo presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de la hoja tierna. En el caso de las necrosis solamente el tipo de hoja joven presentó diferencias significativas (Cuadro 1). Fue posible observar que los niveles de oscurecimiento fueron mayores para la hoja tierna con valores de 10 a 65%, comparado con las hojas jóvenes que presentaron de 0 a 42% de oscurecimiento (Cuadro 1). En el análisis factorial la hoja tierna presentó más del doble de oscurecimiento que la hoja joven (Cuadro 2). Así mismo, es importante señalar que la mayoría de los tratamientos constituidos por la sección media, en ambos tipos de hojas, fueron los que presentaron mayor porcentaje de explantes oscurecidos (Cuadro 1). Lo anterior es posible identificarlo en el Cuadro 2, donde no solo la sección media sino también la apical, presentaron un porcentaje promedio entre 34 y 35%. En la hoja tierna, el tratamiento 12 (Media/Phy16) fue el que indujo el menor cambio de coloración y el tratamiento 9 (Media/Sac80) fue el más reactivo para oscurecer los explantes (Cuadro 1). Para la hoja joven los porcentajes más bajos se registraron en los tratamientos 1 (Basal/Sac30), 4 (Basal/Phy5.2), 7

(Media/Sac30) y 10 (Media/Phy5.2), los cuales tuvieron en común el medio testigo con la concentración más baja de sacarosa y phytigel; mientras que el valor más alto se registró con el tratamiento 11 (Media/Phy8).

Los porcentajes de contaminación difirieron entre los tratamientos para cada tipo de hoja. Para la hoja tierna se encontró que el 88% de los tratamientos presentaron niveles bajos y favorables, los cuales fueron de 0 a 10%, así como un 20% como valor más alto (Cuadro 1). Por otro lado, en hojas jóvenes se observó un comportamiento contrario, donde los niveles de contaminación sobrepasaron a los consignados para las hojas tiernas, pues la gama de valores fue de 20 a 100%. Sin embargo, entre ambos tipos de hojas se detectó una similitud en la respuesta propiciada por los tratamientos 7 (Media/Sac30) y 10 (Media/Phy5.2); ambos indujeron los porcentajes más altos de contaminación, mientras que el valor más bajo para la hoja joven se presentó en el tratamiento 3 (Basal/Sac80).

En el caso del análisis factorial el tipo y sección de hoja, así como la concentración del agente osmótico, fueron los factores que influyeron en los niveles de contaminación; donde la hoja tierna, la sección basal y la segunda concentración del agente osmótico fueron los que en general contribuyeron a una menor manifestación de hongos (Cuadro 2). Los bajos niveles de contaminación en hojas tiernas se han relacionado directamente con la edad de la misma, ya que debido a que es un tejido nuevo su interacción con el ambiente, dígame incidencia y hospedaje de microorganismos, es menor comparado con un tejido joven (López-Gómez et al., 2010).

Para la variable de callogénesis se presentaron diferencias significativas sólo para la hoja tierna; aunque en este caso la mayoría de los tratamientos no difirió estadísticamente ($P < 0.05$), a excepción del tratamiento 18 (Apical/Phy16) que presentó el porcentaje más bajo (35%). Los tratamientos 5 (Basal/Phy8) y 17 (Apical/Phy8) presentaron los valores más altos (100%) de inducción de callo (Cuadro 1). En el Cuadro 1 fue posible identificar que ambos tipos de hojas, los tratamientos constituidos por la sección basal y apical indujeron los porcentajes más altos comparados con la sección media de la hoja. Estos resultados son similares con estudios realizados por Freire et al. (2004), en *Persea americana*, aunque en este caso se obtuvieron mayores porcentajes de formación de callos en las sección basal y media del limbo de la hoja, sobre todo cuando utilizaron como medio de cultivo las sales de Murashige y Skoog (1962) con 1 mg L^{-1} de picloram. Los autores en cuestión, relacionaron la mayor producción de callo al hecho de la cercanía del peciolo a la sección basal y al mayor desarrollo de la nervadura central de la sección media comparada con la sección apical. Si bien, en el caso del presente trabajo, ningún explante de café presentó nervadura central, la mayor producción de callo en la sección basal podría bien estar relacionada con una mayor cercanía al peciolo; así como a los mayores niveles de ácido indolacético que generalmente se reportan para la base de las hojas (Hartmann y Kester,

1989), mientras que la mayor producción de callo en la sección apical podría estar relacionada con una mayor distribución de carbohidratos, tal como señalan Hartmann y Kester (1989). Aunque no se registraron diferencias significativas para la hoja tierna, la sección basal y apical indujeron porcentajes promedio de 86 y 79%, respectivamente, mientras que la sección media sólo presentó el 73%. La misma relación fue observada en la hoja joven, aunque con porcentajes menores con respecto a la hoja tierna;

en este caso la sección basal y apical indujeron valores de 18 y 23%, respectivamente, y de 16% para la sección media. La capacidad morfogénica de las hojas tiernas con respecto a la mayor generación de callo en menos tiempo, comparado con el generado en hojas jóvenes, se debe principalmente a que los tejidos más tiernos tienen mayor capacidad de adaptación al establecimiento *in vitro* que los materiales adultos, es decir, entre menos diferenciado sea el tejido mejor será la capacidad de respuesta (López-Gómez et al., 2010).

Cuadro 1. Efecto de la combinación de tipos de explantes foliares con diferentes concentraciones de sacarosa y phytigel para el control de la hiperhidratación en *Coffea canephora* P. INIFAP 95-9. Datos promedio de 10 a 20 repeticiones a los 30 días después.

| Tratamiento | Oscurecimiento (%) | Contaminación (%) | Callogénesis (%) | Necrosis (%) | Formación de embriones (%) |
|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------|----------------------------|
| Hoja tierna | | | | | |
| 1. Basal/Sac30 | 17.5 ab† | 5.0 b | 95.0 a | 0.0 a | 25.0 abc |
| 2. Basal/Sac50 | 45.0 ab | 0.0 b | 85.0 a | 10.0 a | 30.0 abc |
| 3. Basal/Sac80 | 20.0 ab | 0.0 b | 85.0 a | 10.0 a | 25.0 abc |
| 4. Basal/Phy5.2 | 17.5 ab | 5.0 b | 95.0 a | 0.0 a | 25.0 abc |
| 5. Basal/Phy8 | 22.5 ab | 0.0 b | 100.0 a | 0.0 a | 55.0 a |
| 6. Basal/Phy16 | 45.0 ab | 10.0 ab | 60.0 ab | 30.0 a | 10.0 bc |
| 7. Media/Sac30 | 50.0 ab | 20.0 a | 70.0 ab | 10.0 a | 0.0 c |
| 8. Media/Sac50 | 35.0 ab | 0.0 b | 65.0 ab | 10.0 a | 20.0 abc |
| 9. Media/Sac80 | 65.0 a | 5.0 b | 65.0 ab | 15.0 a | 20.0 abc |
| 10. Media/Phy5.2 | 50.0 ab | 20.0 a | 70.0 ab | 10.0 a | 0.0 c |
| 11. Media/Phy8 | 45.0 ab | 0.0 b | 90.0 a | 10.0 a | 10.0 bc |
| 12. Media/Phy16 | 10.0 b | 0.0 b | 80.0 a | 0.0 a | 10.0 bc |
| 13. Apical/Sac30 | 50.0 ab | 10.0 ab | 85.0 a | 10.0 a | 5.0 c |
| 14. Apical/Sac50 | 45.0 ab | 0.0 b | 85.0 a | 10.0 a | 10.0 bc |
| 15. Apical/Sac80 | 53.7 ab | 0.0 b | 85.0 a | 10.0 a | 30.0 abc |
| 16. Apical/Phy5.2 | 50.0 ab | 10.0 ab | 85.0 a | 10.0 a | 5.0 c |
| 17. Apical/Phy8 | 26.2 ab | 0.0 b | 100.0 a | 0.0 a | 50.0 ab |
| 18. Apical/Phy16 | 45.0 ab | 10.0 ab | 35.0 b | 10.0 a | 20.0 abc |
| Hoja joven | | | | | |
| 1. Basal/Sac30 | 0.0d | 100.0 a | 0.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 2. Basal /Sac 5 0 | 25.0 abcd | 60.0 ab | 40.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 3. Basal/Sac80 | 5.0 d | 20.0 b | 20.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 4. Basal/Phy5.2 | 0.0 d | 100.0 a | 0.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 5. Basal/Phy8 | 37.5 ab | 30.0 ab | 30.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 6. Basal/Phy16 | 40.0 abc | 30.0 ab | 20.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 7. Media/Sac30 | 0.0 d | 100.0 a | 0.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 8. Media/Sac50 | 15.0 abcd | 70.0 ab | 30.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 9. Media/Sac80 | 40.0 abc | 60.0 ab | 10.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 10. Media/Phy5.2 | 0.0 d | 100.0 a | 0.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 11. Media/Phy8 | 42.5 a | 50.0 ab | 20.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 12. Media/Phy16 | 20.0 abcd | 60.0 ab | 40.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 13. Apical/Sac30 | 10.0 cd | 50.0 ab | 20.0 a | 20.0 a | 0.0 |
| 14. Apical/Sac50 | 10.0 bcd | 70.0 ab | 30.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 15. Apical/Sac80 | 40.0 abc | 60.0 ab | 40.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 16. Apical/Phy5.2 | 10.0 cd | 50.0 ab | 20.0 a | 20.0 a | 0.0 |
| 17. Apical/Phy8 | 7.5 abcd | 70.0 ab | 30.0 a | 0.0 b | 0.0 |
| 18. Apical/Phy16 | 20.0 abcd | 60.0 ab | 0.0 a | 10.0 a | 0.0 |

† Medias con letras distintas por columna y tipo de hoja son estadísticamente diferentes (Tukey \leq 0.05). Para el ANOVA, los datos de cada variable fueron transformados con la fórmula raíz x+1. Basal, Media y Apical: secciones de la hoja; Sac 30, 50 y 80 g L⁻¹: Diferentes concentraciones de sacarosa; Phy 5.2, 8 y 16 g L⁻¹ diferentes concentraciones de phytigel.

Con respecto al análisis factorial (Cuadro 2), se observó que el tipo de hoja y la concentración del agente osmótico, fueron

las que afectaron la callogénesis al presentar diferencias significativas entre ambos niveles; de tal forma que la hoja

tierna superó en un 60% a la hoja joven; mientras que la concentración dos de sacarosa o phytigel superó con 10 a 15% a la concentración 1 (Testigo) y 3, respectivamente. Para la necrosis sólo se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de la hoja joven, en los cuales el 13 (Apical/Sac30), 16 (Apical/Phy5.2) y 18 (Apical/Phy16) tuvieron valores altos (10 y 20 %). Estos formaron parte de la sección apical de la hoja (Cuadro 1) y los tratamiento 13 y 16 corresponden al testigo. Por otro lado, se apreció una diferencia en el grado de sensibilidad de los explantes de hojas tierna y joven, ya que la hoja tierna reaccionó con mayor intensidad al medio de cultivo al producir un mayor porcentaje de necrosis (Cuadro

2). Sin embargo, para efectos de este trabajo los valores consignados de necrosis se consideran bajos. Por otro lado, se apreciaron diferencias significativas para la formación de embriones globulares en hojas tiernas (Cuadro 1). En este caso los tratamientos 5 (Basal/Phy8) y 17 (Apical/Phy8) generaron los mayores porcentajes de embriones, un 55 y 50% respectivamente; el resto de los tratamientos presentaron porcentajes de 0 a 30 %. No obstante, es importante mencionar que tanto la hoja tierna como la sección basal y la segunda concentración de sacarosa y phytigel propiciaron una mayor formación de embriones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis factorial de la interacción del tipo de explante y concentraciones de sacarosa y phytigel, como agentes osmóticos, en hojas tiernas y jóvenes de *Coffea canephora*. Datos a los 30 días después de la siembra.

| Factor | Oscurecimiento (%) | Contaminación (%) | Callogénesis (%) | Necrosis (%) | Formación de embriones (%) |
|--|--------------------|-------------------|------------------|--------------|----------------------------|
| Tipo de hoja | | | | | |
| Hoja tierna | 38.4 a† | 5.2 b | 79.7 a | 8.6 a | 19.4 a |
| Hoja joven | 17.9 b | 63.3 a | 19.4 b | 2.7 b | 0.0 b |
| Sección de hoja | | | | | |
| Basal | 24.5 b | 21.1 b | 63.8 a | 5.5 a | 18.8 a |
| Media | 34.8 ab | 29.4 a | 54.4 a | 6.1 a | 6.6 b |
| Apical | 35.4 a | 23.3 ab | 60.5 a | 8.3 a | 13.3 ab |
| Agente osmótico | | | | | |
| Sacarosa | 33.6 a | 24.8 a | 60.3 a | 7.0 a | 12.2 a |
| Phytigel | 29.6 a | 24.4 a | 58.8 a | 6.2 a | 13.7 a |
| Concentración del agente osmótico | | | | | |
| 1. Testigo | 27.2 a | 35.5 a | 57.7 b | 6.6 a | 6.6 b |
| 2. 50 g L ⁻¹ Sac o 8 g L ⁻¹ Phy | 31.9 a | 19.4 b | 68.3 a | 4.4 a | 19.4 a |
| 3. 80 g L ⁻¹ Sac o 16 g L ⁻¹ Phy | 35.6 a | 18.8 b | 52.7 b | 8.8 a | 12.7 ab |

† Medias con letras distintas por columna son estadísticamente diferentes (Tukey≤0.05) de acuerdo con la transformación raíz de X+1; Sac 50 y 80 g L⁻¹: Diferentes concentraciones de sacarosa; Phy 8 y 16 g L⁻¹ diferentes concentraciones de phytigel.

En el Cuadro 3 se consignan las relaciones hídricas y la acumulación de biomasa en hojas tiernas. En este caso se registró que para todas las secciones de hoja (basal, media y apical), el Ψ_w disminuyó de forma importante al incrementar de 30 a 80 g L⁻¹ la sacarosa o de 5.2 a 16 g L⁻¹ el phytigel; *i.e.*, el Ψ_w del medio con la concentración testigo de sacarosa (30 g L⁻¹) y phytigel (5.2 g L⁻¹) fue mayor. La disminución del potencial químico del agua de los callos, al elevar la concentración del agente osmótico, estuvo asociada con el incremento considerable de solutos en los callos. Esto se debió a que el Ψ_π disminuyó al elevar la concentración de los agentes osmóticos para cada sección de la hoja tierna (Cuadro 3). La disminución tanto del Ψ_w como del Ψ_π , al elevar la concentración del agente osmótico, propició el mantenimiento o incluso incrementos en el Ψ_p para la mayoría de las secciones de hoja tierna. Debido a estos resultados, se consideró que los callos de las diferentes secciones tuvieron la capacidad de osmorregulación al mantener el Ψ_p por la acumulación activa de solutos. Al

respecto, López-Gómez et al. (2011) consignan que las hojas de este mismo genotipo presentan una tolerancia a concentraciones elevadas de agentes osmóticos como el hipoclorito de calcio al 7 %. De igual forma Galvez-López et al. (2016), señalan que las hojas de este mismo genotipo presentan una marcada capacidad de ajustarse osmóticamente ante los incrementos de hipoclorito de calcio o sodio. Por otra parte, el medio de cultivo testigo, con las concentraciones más bajas de sacarosa (30 g L⁻¹) o phytigel (5.2 g L⁻¹), fue el menos indicado para controlar la humedad o hiperhidratación de los callos. Lo anterior estuvo asociado con el hecho de que estos tratamientos testigo presentaron, en todos los casos, un mayor porcentaje de humedad que fue de 72 a 83 %; mientras que los tratamientos con aumento de sacarosa y phytigel fueron de 63 a 76%. Todo ello significa que los callos en los tratamientos testigo presentaron mayor contenido de humedad o hiperhidratación. Por tal motivo fueron los callos con mayor peso fresco (Cuadro 3). Esto puede observarse en la Figura 1.

Cuadro 3. Relaciones hídricas y acumulación de biomasa en callos producidos en tres tipos de secciones de hojas tiernas de *C. canephora* P., INIFAP 95-9, sometidos a diferentes concentraciones de agentes osmóticos. Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

| Tratamiento | Ψ_w (bares) | $\Psi\pi$ (bares) | Ψ_p (bares) | Humedad (%) | Peso fresco (mg) | Consistencia de callo |
|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------|------------------|-----------------------|
| 1. Basal/Sac30 | -6.25±3.9 | -7.92±4.7 | 1.67±0.4 | 82.8 | 8.6 | DF |
| 2. Basal/Sac50 | -10.72±4.6 | -18.66±12.5 | 7.93±9.4 | 76.2 | 4.9 | AC y P |
| 3. Basal/Sac80 | -11.58±9.7 | -14.45±13.0 | 2.88±1.4 | 74.0 | 2.0 | AFD y P |
| 4. Basal/Phy5.2 | -6.25±3.9 | -7.92±4.7 | 4.81±5.2 | 82.8 | 8.6 | FD |
| 5. Basal/Phy8 | -14.16±3.9 | -28.07±17.5 | 13.91±14.1 | 76.8 | 5.6 | AC |
| 6. Basal/Phy16 | -14.60±7.4 | -17.49±8.4 | 2.89±1.5 | 77.0 | 4.2 | AFD y P |
| 7. Media/Sac30 | -6.28±2.2 | -12.37±4.4 | 3.08±2.5 | 81.6 | 10.3 | AFD |
| 8. Media/Sac50 | -14.30±6.5 | -34.63±24.9 | 20.33±18.6 | 72.2 | 2.4 | AFD |
| 9. Media/Sac80 | -11.56±10.7 | -17.92±12.6 | 6.35±5.4 | 72.0 | 1.4 | AC |
| 10. Media/Phy5.2 | -6.28±2.2 | -9.37±4.4 | 3.08±2.5 | 72.0 | 10.3 | AFD |
| 11. Media/Phy8 | -15.16±4.1 | -27.80±25.0 | 12.50±20.1 | 72.2 | 11.6 | AFD |
| 12. Media/Phy16 | -19.19±8.4 | -29.13±9.2 | 9.94±11.1 | 74.0 | 2.9 | AFD y P |
| 13. Apical/Sac30 | -5.32±2.7 | -7.46±4.0 | 2.14±1.8 | 83.8 | 17.5 | AFD |
| 14. Apical/Sac50 | -13.61±5.5 | -26.52±18.1 | 12.91±16.8 | 77.9 | 4.6 | AFD y P |
| 15. Apical/Sac80 | -13.45±9.5 | -17.69±10.8 | 4.24±3.5 | 71.0 | 1.7 | FD y P |
| 16. Apical/Phy5.2 | -5.32±2.7 | -7.46±4.0 | 2.14±1.8 | 83.8 | 17.5 | AFD |
| 17. Apical/Phy8 | -16.63±12.9 | -29.07±22.0 | 12.44±6.2 | 75.0 | 14.3 | AC |
| 18. Apical/Phy16 | -9.63±4.8 | -16.07±9.4 | 6.44±3.7 | 63.0 | 2.1 | AFD y P |

Ψ_w : potencial hídrico, $\Psi\pi$: potencial osmótico; Ψ_p : potencial de turgencia; Basal, Media y Apical: secciones de la hoja; Sac 30, 50 y 80: Diferentes concentraciones ($g L^{-1}$) de sacarosa; Phy 5.2, 8 y 16: diferentes concentraciones ($g L^{-1}$) de phytigel. AC= consistencia arenosa compacta. AFD= arenosa de fácil dispersión. P= consistencia pastosa. FD= de fácil dispersión.

Invariablemente se apreció que, sin importar la sección de la hoja tierna, los tratamientos 2, 5, 8, 11, 14 y 17, con concentraciones intermedias de sacarosa ($50 g L^{-1}$) o phytigel ($8 g L^{-1}$), fueron los que indujeron un menor $\Psi\pi$ o mayor acumulación de solutos y por tanto un mayor Ψ_p (Cuadro 3). Así mismo, estos tratamientos demostraron disminuir el contenido de humedad en los callos a valores de 72 a 77% y peso fresco de 2.4 a 14.3 mg.

diferenciación. En este caso este tipo de callo fue identificado en hojas tiernas sólo en los tratamientos 2 (Basal/Sac50), 5 (Basal/Phy8), 9 (Media/Sac80) y 17 (Apical/Phy8). Aunque en el tratamiento 2 (Basal/Sac50) el callo arenoso compacto estuvo mezclado con callo de consistencia pastosa, el cual no es deseable por no ser reactivo a la formación de líneas embriogénicas. Por tal motivo, se considera que el medio de cultivo con un incremento de $8 g L^{-1}$ de phytigel es recomendable para la producción de callo de calidad en la sección basal y apical de hojas tiernas; mientras que esta misma concentración en la sección media induce un callo de consistencia arenosa de fácil dispersión, lo cual se considera aceptable para la producción de líneas embriogénicas. En la sección media el incremento de $80 g L^{-1}$ de sacarosa produjo un callo arenoso compacto.

Lo anterior indica que los callos producidos por las diferentes secciones de hoja tierna tuvieron capacidad de osmorregulación y por tanto una disminución de la hiperhidratación; aunque esto no fue una garantía para la producción de callo de consistencia arenosa y compacta o callo arenoso de fácil dispersión. Sin embargo, en todos los tratamientos con presencia de callo arenoso y compacto, en su gran mayoría correspondieron a la concentración media del agente osmótico ($50 g L^{-1}$ de sacarosa u $8 g L^{-1}$ de phytigel). Lo anterior indica que el incremento de los agentes osmóticos en el medio de cultivo reduce la hiperhidratación y en ciertos casos mejoran la calidad del callo en hojas tiernas.

El Cuadro 4 presenta las relaciones hídricas y peso fresco para cada sección de hoja joven; en este se consigna que el incremento de las concentraciones de los agentes osmóticos

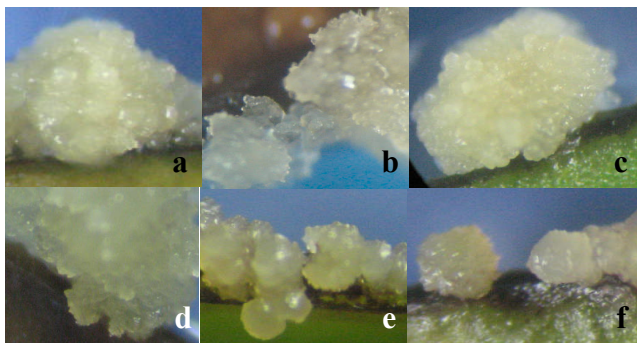


Figura 1. Callos generados a partir de secciones de hoja tierna en diferentes concentraciones de sacarosa y phytigel como agentes osmóticos para el control de la hiperhidratación. a) Callo en $30 g L^{-1}$ de sacarosa; b) $50 g L^{-1}$ de sacarosa; c) $80 g L^{-1}$ de sacarosa; d) $5.2 g L^{-1}$ de phytigel; e) $8 g L^{-1}$ de phytigel y f) $16 g L^{-1}$ de phytigel.

Al analizar los callos producidos en función de su calidad, se encontró que la consistencia arenosa compacta (AC), es la que caracterizó a los callos de mayor calidad, sin hiperhidratación, con potencial elevado para generar líneas embriogénicas con alta capacidad de multiplicación y

sólo influyó en la disminución del Ψ_w y Ψ_π en los tratamientos 2 (Basal/Sac50) y 18 (Apical/Phy16). Con el resto de los tratamientos, el aumento de la concentración de sacarosa y phytigel no afectó el Ψ_w . De forma general los tratamientos que si presentaron reducción del Ψ_w fueron los tratamientos 2 (Basal/Sac50), 7 (Media/Sac30), 10

(Media/Phy5.2) y 18 (Apical/Phy16). Así mismo estos manifestaron un incremento de la acumulación activa de solutos al disminuir el Ψ_π , aunque esto no repercutió en el mantenimiento del Ψ_p , con valores elevados. No obstante, de éstos, el tratamiento 7 y 10 correspondieron a callos en el medio con la concentración más baja de sacarosa y phytigel.

Cuadro 4. Relaciones hídricas y acumulación de biomasa en callos producidos en tres tipos de secciones de hojas jóvenes de *C. canephora* P., INIFAP 95-9, sometidos a diferentes concentraciones de agentes osmóticos. Promedio de tres repeticiones \pm error estándar.

| Tratamiento | Ψ_w (bares) | Ψ_π (bares) | Ψ_p (bares) | Humedad (%) | Peso fresco (mg) | Consistencia |
|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|------------------|--------------|
| 1. Basal/Sac30 | -9.32 \pm 6.1 | -19.45 \pm 13.7 | 7.45 \pm 3.9 | 73.5 | 2.0 | AFD |
| 2. Basal/Sac50 | -21.91 \pm 13.3 | -26.45 \pm 14.0 | 4.54 \pm 1.8 | 62.7 | 7.2 | AFD |
| 3. Basal/Sac80 | -15.75 \pm 11.6 | -19.32 \pm 11.3 | 3.57 \pm 0.6 | 65.7 | 1.57 | P |
| 4. Basal/Phy5.2 | -9.32 \pm 6.1 | -19.45 \pm 13.7 | 7.45 \pm 3.9 | 73.5 | 2.0 | AFD |
| 5. Basal/Phy8 | -17.45 \pm 10.4 | -19.37 \pm 9.7 | 1.92 \pm 0.8 | 72.7 | 1.65 | AFD |
| 6. Basal/Phy16 | -8.19 \pm 4.4 | -22.25 \pm 14.0 | 14.06 \pm 10.1 | 77.5 | 5.7 | AFD y P |
| 7. Media/Sac30 | -25.95 \pm 10.3 | -28.79 \pm 11.4 | 2.84 \pm 2.1 | 73.0 | 3.0 | AFD |
| 8. Media/Sac50 | -14.69 \pm 9.1 | -17.99 \pm 8.8 | 3.30 \pm 2.09 | 61.5 | 3.4 | AFD |
| 9. Media/Sac80 | -15.11 \pm 10.2 | -20.5 \pm 9.3 | 5.45 \pm 2.5 | 66.4 | 3.5 | P |
| 10. Media/Phy5.2 | -25.95 \pm 10.3 | -28.79 \pm 11.4 | 2.84 \pm 2.1 | 73.0 | 3.0 | AFD |
| 11. Media/Phy8 | -8.87 \pm 4.8 | -25.75 \pm 9.8 | 16.88 \pm 8.2 | 74.5 | 11.7 | AC |
| 12. Media/Phy16 | -9.35 \pm 4.5 | -20.84 \pm 11.9 | 11.49 \pm 10.8 | 62.5 | 3.5 | AC y P |
| 13. Apical/Sac30 | -14.54 \pm 8.0 | -19.81 \pm 8.6 | 5.27 \pm 4.3 | 71.5 | 9.2 | AFD |
| 14. Apical/Sac50 | -13.46 \pm 10.2 | -15.57 \pm 10.0 | 2.11 \pm 1.8 | 65.9 | 4.0 | P y FD |
| 15. Apical/Sac80 | -16.78 \pm 8.9 | -21.74 \pm 8.2 | 4.96 \pm 2.9 | 73.9 | 2.3 | P y FD |
| 16. Apical/Phy5.2 | -14.54 \pm 8.0 | -19.81 \pm 8.6 | 5.27 \pm 4.3 | 71.5 | 9.2 | AFD |
| 17. Apical/Phy8 | -13.37 \pm 8.6 | -20.79 \pm 7.0 | 7.42 \pm 1.9 | 75.0 | 6.8 | AFD y P |
| 18. Apical/Phy16 | -17.44 \pm 11.2 | -27.38 \pm 18.3 | 9.94 \pm 7.2 | 72.3 | 6.0 | AFD y P |

Ψ_w : potencial hídrico, Ψ_π : potencial osmótico; Ψ_p : potencial de turgencia; Basal, Media y Apical: secciones de la hoja; Sac 30, 50 y 80 g L⁻¹: Diferentes concentraciones de sacarosa; Phy 5.2, 8 y 16 g L⁻¹: diferentes concentraciones de phytigel. AC= consistencia arenosa compacta. AFD= arenosa de fácil dispersión. P= consistencia pastosa. FD= de fácil dispersión.

Lo anterior hace pensar que los incrementos de sacarosa y phytigel en las diferentes secciones de hojas jóvenes no influyeron en la reducción de la humedad o la hiperhidratación del callo generado. Sin embargo, podría existir la posibilidad de que el efecto de estos agentes osmóticos sea más tardado para el tejido con mayor grado de madurez que caracteriza a la hoja joven por lo que el tiempo de 30 días no haya sido suficiente para detectar tal efecto.

Por otro lado, la consistencia de los callos de mayor calidad y con potencial para generar líneas embriogénicas (AC) fue posible identificarlo en el tratamiento 11 (Media/Phy8) y 12 (Media/Phy16), lo cual puede observarse en la Figura 2.

Aunque en este último caso se generó callo de tipo pastoso de características no deseables y el cual es poco reactivo en la producción de líneas embriogénicas. Así mismo se pudo apreciar que para cada sección de hoja, todos los tratamientos con el medio testigo (1, 4, 7, 10, 13 y 16) generaron un callo arenoso, pero de fácil dispersión que puede ser aceptable para la producción de líneas embriogénicas.

Con base a los resultados obtenidos se considera que para la hoja joven no es viable hacer una recomendación confiable ya que el tiempo de 30 días parece no ser ni siquiera para la medición del callo. Por lo que es necesario evaluarlo a los 60 o incluso a los 70 días. No obstante, para las tres secciones de hojas se podría utilizar el medio testigo (30 g L⁻¹ de sacarosa

y 5.2 g L⁻¹ de phytigel) y adicionalmente el complementado con 8 g L⁻¹ de phytigel para la sección media de la hoja.

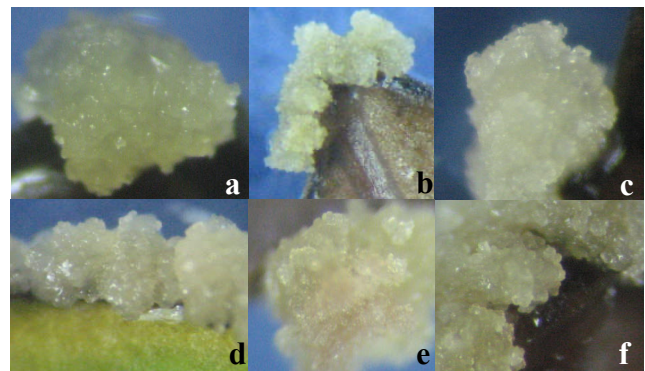


Figura 2. Callos inducidos a partir de secciones de hojas jóvenes con diferentes concentraciones de sacarosa y phytigel. a) Callo con 30 g L⁻¹ de sacarosa; b) 50 g L⁻¹ de sacarosa; c) 80 g L⁻¹ de sacarosa; d) 5.2 g L⁻¹ de phytigel; e) 8 g L⁻¹ de phytigel y f) 16 g L⁻¹ de phytigel.

4. Conclusión

Fue posible controlar la hiperhidricidad en callos inducidos a partir de diferentes secciones foliares. Los explantes de hoja tierna difirieron en capacidad y velocidad de respuesta

morfogénica y de osmorregulación con respecto a los explantes de hoja joven. Las secciones de hojas tiernas produjeron una mayor respuesta morfológica en cuanto a la producción de callo, embriones y peso fresco; así como una mayor capacidad de osmorregulación sobre todo en la sección basal y apical de la hoja, conforme se incrementó la concentración de sacarosa y phytigel. Se produjo callo de alta calidad (consistencia arenosa compacta) o intermedia (arenosa de fácil dispersión), con bajo contenido de humedad en cada una de las secciones de hoja tierna y joven, los cuales fueron los siguientes: a) Sección basal, media y apical de hoja tierna en medio de cultivo con 8 g L⁻¹ de phytigel. b) Sección basal y apical de hoja joven en medio de cultivo con 5.2 g L⁻¹ de phytigel y 30 g L⁻¹ de sacarosa. c) Sección media de hoja joven en medio de cultivo con 8 g L⁻¹ de phytigel.

Agradecimientos

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación “Desarrollo de protocolos para la propagación de plantas por embriogénesis somática de café y cacao”, con financiamiento Fiscal del INIFAP. SIGI: 11324919999.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

Avila-Victor CM, Ordaz-Chaparro VM, Arjona-Suárez EJ, Iracheta-Donjuan L, Gómez-Merino FC, Robledo-Paz A. 2023. *In vitro* mass propagation of coffee plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through indirect somatic embryogenesis. *Plants* 12: 1237.

Berthouly M. 1997. Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica* L. In: *Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura*. Heredia, Costa Rica. pp 25-49.

Brand M. 1993. Agar and ammonium nitrate influence hyperhricity, tissue nitreand total nitrogen content of serviberry (*Almelanchier arborea*) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1: 275-281.

Cárdenas LMA. 1999. Osmorreguladores en cultivo *in vitro* de porta injertos de cítricos. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados. Montecillo. Texcoco. Edo. de México, México. 94 p.

Clifford MN, Willson KC. 1985. Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. American Edition. Westport, Connecticut. 457 p.

Freire SM, Balsero F, Gomez K. 2004. Formación de callos de *Persea americana* Mill. cultivar Catalina a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 2: 85-90.

Gálvez-López, AL, Iracheta-Donjuan L, Medina-Ovando I, Aguirre-Medina JF. 2016. Relaciones hídricas en explantes foliares de *Coffea canephora* (Pierre) ex Froeher. *Agroproductividad* 9(10): 26-31.

Gamborg OL. 2002. Plant tissue culture. The technology. Part 1. Exegetics Ltd. Edington. 547 p.

George EF. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1, The Technology. Exergetics Ltd. Edington, Wilts. England. 574 p.

Harman TH, Kester ED. 1989. Propagation de plantas, principios y prácticas, Ed. Continental. México, D.F. 760 p.

Henderson TP. 2019. La roya y el futuro del café en Chiapas. *Revista Mexicana de Sociología* 81(2): 389-416.

Ivanova M, Staden JV. 2011. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104: 13–21.

Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommès J, Gaspar T. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: atypically stress-induced change of physiological. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181-191.

López-Gómez P, Iracheta-Donjuan L, Castellanos-Juárez M, Méndez-López I, Aguirre-Medina JF, Gutiérrez-Díez A, Ojeda-Zacarias MC, Pérez-Pérez BR. 2011. Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *Coffea* spp. cultivados *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(5): 645-657.

López-Gómez P, Iracheta-Donjuan L, Castellanos-Juárez M, Méndez-López I, Sandoval-Esquivéz A, Aguirre-Medina JF, Ojeda-Zacarias MC, Gutiérrez-Díez A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(3): 205-213.

López-Gómez P, Iracheta-Donjuan L., Ojeda-Zacarias MC, Ducos JP. 2016. Medio de cultivo e inhibidores de etileno en la embriogénesis somática de café. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(7): 1749-1757.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473.

Quintana-Escobar AO, Iracheta-Donjuan L, Méndez-López I, Alonso-Báez M. 2017. Caracterización de genotipos élite de *Coffea canephora* por su tolerancia a la sequía. *Agronomía Mesoamericana* 28(1): 183-198.

Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 120: 152-161.

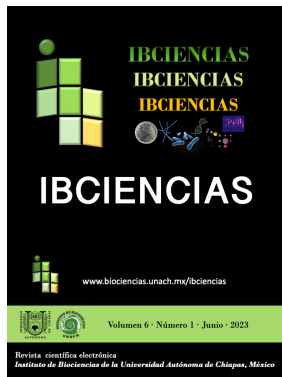
Solano W. 2001. Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en biorreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de *Coffea arabica* L. por embriogénesis somática. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Turrialba, Costa Rica. 87 p.

Wintgens JN, Zamarripa CA. 2004. Coffee propagation In: *Coffee growing, processing, sustainable production*. Ed: Wintgens JN. (ed) Wiley-VCH Nestlé. KGaA, Weinheimpp: 87-136.

Yasuda T, Fuji Y, Yamaguchi T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology* 26: 595-597.

Yoshida F, Kobayashi T, Yoshida T. 1973. The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cell of tobacco. Effects of sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cell. *Plant and Cell Physiology* 14: 329-339.

Ziv M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants En: *Micropropagation technology and application*. Ed: Debergh, PC & R.H. Zimmerman. Kluwer Academic Publisher. U.S.A. 479 p.



Efecto de *Bacillus* sp. sobre la incidencia y severidad de la moniliasis del cacao

Víctor Jesús Albores-Flores*, Saily Lizbet Mejía-Velázquez, Julieta Grajales-Conesa, Dory Gledys Ramos-Pérez, Martha Alicia Tlatelapa-Díaz, José Alfonso López-García

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

La moniliasis (*Moniliophthora roreri*), genera pérdidas económicas en la producción de frutos del cacao (*Theobroma cacao* L.). El control de la enfermedad ha sido con productos químicos y manejo integrado, con reducida eficiencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Bacillus* sp. sobre la incidencia y severidad de moniliasis en cacao. Se utilizaron 50 plantas de cacao Trinitario por tratamiento. Se establecieron 24 tratamientos donde se evaluaron semanalmente la incidencia y severidad de la enfermedad, considerando como factores principales 1) aplicación cada 7 días, 2) aplicación cada 14 días y 3) testigo. Una de las dos condiciones del manejo en campo fue la cubierta protectora plástica colocada a cada fruto y la segunda fue sin ella. El orden obtenido de los tratamientos, considerando menor incidencia, incidencia media y mayor incidencia, queda como sigue: "Cada siete días" < "Testigo" < "Cada 14 días". Por lo anterior, la suspensión de *Bacillus*, inhibe el desarrollo de la moniliasis en frutos de cacao con aplicaciones cada siete días, sin importar si se coloca la cubierta plástica o no, a los frutos. La cubierta utilizada provocó efecto inductor en el desarrollo de los frutos de cacao, además de alargar el tiempo de la etapa de incubación de la enfermedad.

Palabras clave:

Bacillus sp.
Biocontrol
Fitopatógenos
Fitopatología
Fruto

Keywords:

Bacillus sp.
Biocontrol
Plant pathogens
Plant pathology
Fruit

Effect of *Bacillus* sp. on the incidence and severity of frosty pod rot of cocoa

Abstract

Moniliasis (*Moniliophthora roreri*), generates an economic loss in the production of cocoa fruits (*Theobroma cacao* L.). The control of the disease has been with chemical products and integrated management, with reduced efficiency. The objective of this work was to evaluate the effect of *Bacillus* sp. on the incidence and severity of moniliasis in cocoa. 50 Trinitario cocoa plants were used per treatment. 24 treatments were established where the incidence and severity of the disease were evaluated weekly, considering as main factors 1) application every 7 days, 2) application every 14 days and 3) control. One of the two conditions of field management was the plastic protective cover placed on each fruit and the second was without it. The order obtained from the treatments, considering lower incidence, average incidence, and highest incidence, is as follows: "Every seven days" < "Control" < "Every 14 days". Therefore, the *Bacillus* suspension inhibits the development of moniliasis in cocoa fruits with applications every seven days, regardless of whether or not the plastic cover is placed on the fruits. The cover used caused an inductive effect on the development of cocoa fruits, in addition to lengthening the time of the incubation stage of the disease.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas. Boulevard Príncipe
Akishino sin número,
Colonia Solidaridad 2000
C.P. 30798. Tapachula
Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
alboresflores@gmail.com

1. Introducción

Theobroma cacao L. se cultiva principalmente en la franja Equatorial de América, Asia y África. Las semillas del cultivo de cacao son utilizadas para la elaboración de chocolate y derivados (Espinosa et al., 2015; Sánchez-Mora y Garcés-Fiallo, 2012). En México, el área cultivada es de aproximadamente 55 950 ha distribuidos principalmente en Tabasco, Chiapas, Puebla, Veracruz y Oaxaca (SIAP, 2020). Sin embargo, en los últimos diez años, el rendimiento de los frutos de cacao ha disminuido a un 20%, debido a que estos se ven fuertemente afectados por una enfermedad conocida como “moniliasis”, cuyo agente etiológico es *Moniliophthora roreri*, hongo hemibiotrófo que posterior a la penetración en el fruto del cacao genera inicialmente la fase biotrófica, posteriormente se produce la fase necrotrofica que es la destructiva y se expresa después de la tercera u octava semana de haber infectado el fruto (Albores et al., 2018; Phillips-Mora et al., 2006). Los principales síntomas que expresa el fruto posterior a la infección del hongo son: mancha aceitosa, decoloración, momificación, entre otros (López-Báez et al., 2015; Melnick et al., 2013).

El manejo agronómico del cultivo de cacao fue el procedimiento preferente para la reducción de la incidencia de enfermedades producidas por hongos (Ramírez-González et al., 2011). En el área de productos fitosanitarios la aplicación de agroquímicos se reducía al caldo Bordelés y fungicidas químicos (sistémicos y de contacto) para ejercer control a la enfermedad (Torres-Cruz et al., 2011). Sin embargo, la repentina aparición, y rápida diseminación de *M. roreri* trajo como consecuencias el descontrol (no había conocimiento para el manejo de la enfermedad) y disminución de la producción de cacao (Espinosa et al., 2015).

Entre las alternativas de manejo de la enfermedad sostenida para su control se encuentra el uso de microorganismos antagónicos, pertenecientes al género *Trichoderma*, *Streptomyces* y *Bacillus*, debido a que han mostrado efectos significativos, reduciendo la enfermedad a valores de incidencia del 70% y 50%, respectivamente (Cuervo-Parra et al., 2011; Villamil et al., 2015) marcando una diferencia del 10% al compararlo con tratamientos convencionales.

El género *Bacillus*, ha presentado resultados satisfactorios en el control de hongos fitopatógenos, al reducir valores de incidencia que oscilan entre 30 y 50% en contra de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, entre otros (Gong et al., 2015; Han et al., 2016; Mercado-Flores et al., 2014; Yáñez- Mendizábal et al., 2012; Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2013). Sin embargo, escasa es la información sobre el uso de cepas bacterianas en el control de la moniliasis del cacao a nivel de campo y el comportamiento en el crecimiento del fruto debido a este tipo de microorganismos, por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de *Bacillus* sp. sobre la incidencia y severidad de la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*), y en la dinámica del crecimiento del fruto.

2. Materiales y métodos

2.1. Área de estudio y establecimiento de los tratamientos.

El trabajo se realizó en el municipio de Tuxtla Chico, Chiapas México, (N 14°54.539 W 092°10.897; 314 msnm; temperatura media anual 26.4 °C; lluvia media de 4037 mm) en un cacaotal sembrado con la variedad Trinitario. En una hectárea del cultivo fueron establecidos 24 tratamientos (Cuadro 1) con 50 plantas cada uno. Los tratamientos estuvieron separados por dos hileras de plantas. En cada tratamiento se utilizó dos condiciones, la primera consistió en proteger los frutos con bolsas de celofán dulce sujetos al pedúnculo con hilo flexible y la segunda sin esta bolsa. Todos los tratamientos se ubicaron en el centro de la hectárea. Previo al establecimiento de los tratamientos se realizó el saneo general del área de estudio, eliminando todos los frutos enfermos. Para mantener aireación en el sistema productivo, se realizó una poda de los árboles. El aseguramiento de sanidad de los frutos se realizó desde el amarre de estos con la bolsa de celofán.

Cuadro 1. Tratamientos empleados en este estudio.

| Tratamientos | Sin bolsa | Con bolsa | Aplicación (Días) | Clave |
|--------------|-----------|-----------|-------------------|--------|
| | Edad | Edad | | |
| 1 | 2 | | 7 | T7SB2 |
| 2 | 4 | | 7 | T7SB4 |
| 3 | 6 | | 7 | T7SB6 |
| 4 | 8 | | 7 | T7SB8 |
| 5 | | 2 | 7 | T7CB2 |
| 6 | | 4 | 7 | T7CB4 |
| 7 | | 6 | 7 | T7CB6 |
| 8 | | 8 | 7 | T7CB8 |
| 9 | 2 | | 14 | T14SB2 |
| 10 | 4 | | 14 | T14SB4 |
| 11 | 6 | | 14 | T14SB6 |
| 12 | 8 | | 14 | T14SB8 |
| 13 | | 2 | 14 | T14CB2 |
| 14 | | 4 | 14 | T14CB4 |
| 15 | | 6 | 14 | T14CB6 |
| 16 | | 8 | 14 | T14CB8 |
| 17 | 2 | | T | TTSB2 |
| 18 | 4 | | T | TTSB4 |
| 19 | 6 | | T | TTSB6 |
| 20 | 8 | | T | TTSB8 |
| 21 | | 2 | T | TTCB2 |
| 22 | | 4 | T | TTCB4 |
| 23 | | 6 | T | TTCB6 |
| 24 | | 8 | T | TTCB8 |

2.2. Antifúngico utilizado

La cepa de *Bacillus* sp. fue proporcionada por El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), la producción de biomasa y antifúngico fue realizada en caldo dextrosa papa pH 6.5, 27 °C de temperatura y 180 rpm de agitación rotatoria. El adherente utilizado fue INEX-A®.

2.3. Aplicación del antifúngico a los frutos

La aplicación del antifúngico fue realizada cada 7 y 14 días por un periodo de un semestre de producción. El antifúngico

fue aplicado manualmente (2 mL por fruto) con una bomba aspersora de 5 L. La aplicación fue únicamente a frutos aparentemente sanos.

2.4. Desarrollo de la enfermedad

Se evaluó semanalmente la dinámica de la enfermedad junto a la eliminación de material enfermo que fungió como fuente de inóculo. La incidencia se determinó mediante la fórmula $I (\%) = (IF/TF) \times 100$; donde I = incidencia, IF = número de frutos enfermos y TF = Total de frutos. Para determinar la severidad de la enfermedad se utilizó la escala propuesta por Aránzazu et al. (2009) y Phillips-Mora et al. (2005), en la cual: 1 = Fruto sano; 2=1 a 25% del área necrosada; 3 = 26 a 50% del área necrosada; 4=51 a 75% del área necrosada y 5 = 76 a 100% del área necrosada.

2.5. Índice de severidad (ISE)

El índice de severidad se calculó utilizando la ecuación de Townsend y Heuberguer (1943). Se expresa como sigue: $ISE = \sum [(nb / (N-1) T) \times 100]$. Donde “n” es el número de frutos de cada grado, “b” es el grado, “N” es el número de grados empleados en la escala y “T” es el total de frutos evaluados.

2.6. Dinámica de crecimiento del fruto

Se determinó la cinética de crecimiento del fruto. Se midió con cinta métrica el largo del fruto, considerando a sanos y enfermos (hasta alcanzar necrosis completa). Se determinó la

velocidad de crecimiento de los frutos con los datos obtenidos.

2.7. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA. Donde existió diferencias significativas se aplicó una comparación de medias por Tukey (p=0.05). El software utilizado fue Infostat 2019 con conversión a R.

3. Resultados y Discusión

La semana en apareceré el síntoma de moniliasis, la longitud del fruto al inicio del síntoma de giba y de incidencia se presenta en el Cuadro 2. En la mayoría de los tratamientos el síntoma de enfermedad de moniliasis se observó a partir de la segunda semana después del inicio de las aplicaciones. En el tratamiento T7SB6, el síntoma apareció entre la tercera y cuarta semana post-inicio, en el T7CB2 el síntoma apareció a la cuarta semana y en el tratamiento T7CB6, fue en la quinta semana post-inicio. Únicamente en los tratamientos T7SB8 y T7CB8 no se presentó ningún síntoma de la enfermedad de la moniliasis.

En los tratamientos T14, correspondientes a SB2, CB2, SB4 y CB4, el síntoma de moniliasis apareció entre la segunda y tercera semana posterior al inicio del estudio. En el tratamiento T14SB8 el síntoma se observó entre la primera y segunda semana post-inicio del tratamiento.

Cuadro 2. Valores promedios de longitud de fruto, tiempo en aparecer los síntomas de Moniliasis e incidencia. (SDM: Semana en que se detecta el síntoma de moniliasis, LIDS: Longitud inicial del fruto al detectar el síntoma).

| Tratamiento | Condición | Edad | SDM | LIDS (cm) | Incidencia |
|-------------|-----------|------|--------------|----------------|---------------|
| C. 7 días | SB | 2 | 2.00±0.50 c | 3.05±0.30 g | 13.33±8.3 fg |
| | | 4 | 2.00±0.50 c | 5.20±0.48cde | 6.66±4.3 gh |
| | | 6 | 3.50±0.47 bc | 9.85±0.30 ab | 13.33±8.3 fg |
| | | 8 | 0.00±0.0 e | 0.00±0.0 h | 0.00±0.0 i |
| | CB | 2 | 4.00±0.57 ab | 5.05±0.30 def | 13.33±8.3 fg |
| | | 4 | 2.00±0.50 c | 4.60±0.46 def | 6.66±4.3 gh |
| | | 6 | 5.00±0.50 a | 10.07±0.46 a | 6.66±4.3 gh |
| | | 8 | 0.00±0.0 e | 0.00±0.0 h | 0.00±0.0 i |
| C. 14 días | SB | 2 | 2.38±0.28 bc | 4.15±0.40 ef | 86.66±6.3 a |
| | | 4 | 2.54±0.29 bc | 6.56±0.46 bcde | 73.33±5.2 bc |
| | | 6 | 2.00±0.50 c | 7.82±0.50 bcd | 46.66±8.2 d |
| | | 8 | 1.33±0.48 cd | 9.53±0.73 ab | 20.00± 5.2 ef |
| | CB | 2 | 2.18±0.30 c | 4.41±0.44 ef | 73.33±5.2 bc |
| | | 4 | 2.16±0.28 c | 5.94±0.42 cde | 80.00±8.6 ab |
| | | 6 | 1.90±0.30 cd | 7.82±0.46 bcd | 66.66±5.3 c |
| | | 8 | 2.00±0.50 c | 9.48±0.55 abc | 46.66±8.2 d |
| Testigo | SB | 2 | 2.66±0.55 bc | 3.96±0.84 fg | 26.66±6.6 e |
| | | 4 | 3.00±0.60 bc | 6.40±0.30 bcde | 30.00±5.3 de |
| | | 6 | 2.50±0.48 bc | 8.00±0.70 abcd | 30.00±5.3 de |
| | | 8 | 2.00±0.50 c | 9.50±0.46 abc | 13.33± 8.6 fg |
| | CB | 2 | 4.00±0.57 ab | 5.75±0.30 cde | 26.66±6.6 e |
| | | 4 | 2.00±0.50 c | 5.20±0.30 def | 26.66±6.6 e |
| | | 6 | 4.00±0.57 ab | 10.80±0.46 a | 13.33±8.6 fg |
| | | 8 | 2.00±0.50 c | 8.60±0.44 abc | 13.33±8.6 fg |

En los tratamientos testigo, en ambas condiciones, el síntoma apareció entre la segunda y la cuarta semana post-inicio, en

todas las edades. La diferencia entre tratamientos fue significativa (F: 5.51, gl: 2, p=0.0058), y entre edades

también (F: 4.58, gl: 3, $p=0.0458$). Únicamente entre condiciones no existió diferencias estadísticas (F: 0.1, gl: 1, $p=0.7539$).

El tiempo de incubación observado en este estudio es similar a lo reportado por Albores et al. (2018), quienes indican que el tiempo de incubación es el reflejo de la agresividad de la cepa presente en el área de estudio, dando un valor menor a las cinco semanas ya reportadas para esta enfermedad. En frutos de edad de dos, cuatro o seis semanas, la duplicación celular es mayor haciéndolos más susceptibles a la infección, caso contrario a la de ocho semanas de edad, donde los cambios en la composición del pericarpio es mayor al coincidir con la transición del estado inmaduro al estado juvenil, que según Ando et al. (2009) y Ten Hoopen et al. (2012), los tipos de componentes fenólicos y flavonoides cambia, volviéndose un tejido represivo para el desarrollo de hongos Fitopatógenos, como *M. royeri*. Explicación que soporta la falta de frutos enfermos en el tratamiento de 8 semanas de edad donde la aplicación de la suspensión de *Bacillus* fue cada siete días, en ambas condiciones. Sin embargo, la existencia de frutos enfermos de 8 semanas en los tratamientos correspondientes a T14, hacen pensar que la aplicación semanal (la mejor) de la suspensión ejerce una inhibición sobre la germinación de conidios de *M. royeri* presentes en la superficie de los frutos de cacao embolsados o no, y que no es recomendable realizarlo cada 14 porque se pierde el efecto. Lo anterior es similar a lo observado por Ley-López et al. (2018), en plántulas de tomate, donde explican que la incidencia de plantas enfermas por *Phytophthora capsici* fue menor en los tratamientos donde se aplicó suspensión de *B. thuringiensis* y *B. amyloliquefaciens* comparado con el tratamiento testigo, dejó inactivas o muertas a las esporas de este hongo, demostrándose con muestras de tejido bajo observación en microscopio.

De manera general la longitud del fruto de cacao al momento de observar la presencia del síntoma de moniliasis osciló de 3.05 a 10.80 cm. Se observó que la longitud del fruto está asociado a la edad de este y a la condición (Cuadro 2). Los frutos de cacao envueltos en bolsa tuvieron una diferencia mayor en mm respecto a los que estuvieron sin envoltura. De acuerdo con el tiempo de aplicación (cada 7 y 14 días) y el testigo, la longitud de los frutos por cada edad fue similar entre ellos y la excepción se centró en el tratamiento T7SB2 y en el testigo TTSB2.

La diferencia entre edades fue altamente significativa (F: 54.7, gl: 3, $p<0.0001$), entre condición fue significativa (F: 2.03, gl: 1, $p=0.03132$) y entre tratamientos no se encontró diferencias estadísticas (F: 0.04, gl: 2, $p=0.6692$).

En cacao, la variedad más resistente a la moniliasis es forastero (Takam et al., 2013), pero en el presente estudio la variedad fue trinitario y las condiciones fisicoquímicas del pericarpio del fruto de esta variedad es mayor a la de Criollo (Albores et al., 2018), y menor al forastero, considerando esta capacidad fisicoquímica como un efecto de barrera, no fue totalmente efectiva. Los frutos de menor edad son más susceptibles a la infección por *M. royeri*, lo que no les

permite seguir creciendo y por la falta de metabolitos con actividad antifúngica, el tejido tiende a morir fácilmente por la presencia del micelio necrotrófico que lo consume (Agrios, 2005).

La diferencia significativa en tamaño y tiempo de incubación, en la edad de dos semanas del tratamiento T7SB2 comparado con el T7CB2 y del testigo TTSB2 con respecto al T7CB2, está asociada a la presencia de la bolsa de celofán dulce. Está envoltura tiene la propiedad de ser moderadamente permeable al CO_2 y O_2 , al vapor de agua e impide la desecación, lo que la convierte en un empaque factible para la conservación de alimentos (Plank, 2005; Yunga, 2011). Por lo anterior proponemos que ejerció un efecto incubador - retrasador induciendo cambios fisiológicos en los frutos infectados, retrasando la generación de la necrosis en el tejido del pericarpio donde reprimió la generación del micelio necrotrófico (hipotético) y el almacenamiento de fenoles dañinos en el tejido (Bailey et al., 2013), reflejándose en el tamaño del fruto al momento de expresar el síntoma y en el tiempo de incubación.

Respecto a la incidencia, los tratamientos con aplicación de cada siete días del *Bacillus*, presentaron menores valores de incidencia que el tratamiento testigo y del que recibió aplicación cada 14 días. Los valores más altos de incidencia se observaron en los tratamientos que recibieron la aplicación del *Bacillus* cada 14 días, tanto en la condición embolsada como en la no embolsada. Estadísticamente, existió diferencias altamente significativas entre tratamientos (F: 1088.68, gl: 2, $p<0.0001$), y entre edades (F: 139.57, gl: 3, $p<0.0001$), pero no entre condiciones (F: 0.05, gl: 1, $p=0.8249$).

Respecto a los valores de incidencia y como se mencionó en párrafos anteriores, la aplicación de la suspensión de *Bacillus* en los tratamientos T7 está relacionado con la inhibición de conidios en la superficie del pericarpio. Por lo anterior, el número de frutos infectados, traducido a valores de incidencia fue menor, aunque el tiempo de incubación en frutos que si se infectaron haya sido de dos semanas. Lo antes expuesto se comparó con los tratamientos que recibieron aplicación de la suspensión del *Bacillus* cada 14 días, donde la incidencia de la enfermedad fue mayor y es posible que no haya existido suficiente inhibición de conidios, tal como lo reporta Ley-López et al. (2018), en plantas de tomate.

Por otro lado, los frutos enfermos observados en los tratamientos T7, pudieron tener menor tiempo de exposición a la suspensión de *Bacillus* en la zona próxima al pedúnculo, incluyendo que algunos conidios no se hayan lavado durante el escurrimiento del líquido. Además, la adherencia de la suspensión a la superficie del pericarpio no haya permitido que existiera mayor residualidad del mismo y hubieran quedado áreas de tejido sin exposición a la suspensión, lo que dio como resultado algunos frutos infectados.

En lo que respecta al momento en que se presentó la necrosis total de los frutos de cacao estudiados, de manera general osciló entre la quinta y octava semana post-inicio (Cuadro 3). Estadísticamente no existieron diferencias significativas

entre tratamientos (F: 2.63, gl: 2, $p=0.0526$), entre condición (F: 0.16, gl: 1, $p=0.0688$), pero sí entre edades (F: 4.78, gl: 3, $p<0.0042$).

De manera general, el tiempo de vida (Tv) que tuvieron los frutos después de detectar que estaban infectados, independientemente de la aplicación del *Bacillus* o no, fue de 2 a 3 semanas. Con excepción de los tratamientos de 8 semanas de edad con aplicación cada 7 días, no existieron diferencias significativas entre tratamientos, entre edades y entre condición. Según Phillips-Mora et al. (2007), después

de que el fruto es infectado transcurren de tres a cinco semanas para que se exprese la enfermedad y una vez expresado el síntoma, transcurren de 2 a 3 semanas antes de alcanzar una necrosis completa. En el presente estudio estuvimos dentro de rango de vida del fruto y que los frutos de cacao infectados, independientemente de la edad, inician el proceso de necrosis de 5 a 8 semanas después de la infección. Lo anterior les permite crecer un poco, pero no suficiente como lo hacen los frutos no infectados.

Cuadro 3. Valores promedio de longitud de fruto, tiempo de vida del fruto después de aparecer síntoma de Moniliasis, semana con total necrosis y severidad. (STN: Semana con total necrosis, LFTN: Longitud final del fruto al alcanzar total necrosis, Tv: tiempo de vida del fruto).

| T | Condición | Edad | STN | LFTN (cm) | Tv | Severidad |
|------------|-----------|------|-------------|---------------|------------|-----------|
| C. 7 días | SB | 2 | 5.5±0.64 b | 3.90±0.83 e | 2.5±0.28 a | 25.00 |
| | | 4 | 6.0±0.91 b | 6.50±0.83 d | 3.0±0.39 a | 8.33 |
| | | 6 | 7.5±0.64 ab | 10.70±1.16 bc | 3.0±0.28 a | 16.66 |
| | | 8 | 0.0±0.0 c | 0.00±0.0 | 0.0±0.0 b | 0.00 |
| | CB | 2 | 7.0±0.64 ab | 5.55±1.16 de | 2.0±0.28 a | 16.66 |
| | | 4 | 6.0±0.91 b | 5.60±0.92 de | 3.0±0.39 a | 8.33 |
| | | 6 | 8.0±0.91 a | 12.40±0.92 b | 3.0±0.39 a | 8.33 |
| | | 8 | 0.0±0.0 c | 0.00±0.0 | 0.0±0.0 b | 0.00 |
| C. 14 días | SB | 2 | 6.0±0.24 b | 7.56±0.83 cd | 3.0±0.10 a | 50.00 |
| | | 4 | 5.4±0.29 b | 9.17±0.76 c | 2.9±0.12 a | 33.33 |
| | | 6 | 5.7±0.37 b | 13.27±1.16 b | 3.0±0.16 a | 33.33 |
| | | 8 | 5.8±0.41 b | 16.74±1.18 a | 2.8±0.18 a | 25.00 |
| | CB | 2 | 5.8±0.29 b | 8.47±0.83 cd | 2.5±0.12 a | 41.66 |
| | | 4 | 5.7±0.26 b | 10.45±0.76 bc | 2.4±0.11 a | 41.66 |
| | | 6 | 5.8±0.30 b | 14.96±0.88 ab | 2.8±0.13 a | 58.33 |
| | | 8 | 6.0±0.34 b | 16.13±1.00 a | 2.7±0.15 a | 33.33 |
| Testigo | SB | 2 | 6.0±0.53 b | 4.70±1.52 e | 3.0±0.23 a | 25.00 |
| | | 4 | 6.3±0.53 b | 7.63±1.52 cd | 2.7±0.23 a | 16.66 |
| | | 6 | 7.0±0.53 ab | 11.03±1.52 bc | 2.7±0.23 a | 41.66 |
| | | 8 | 6.0±0.91 b | 10.40±2.64 bc | 3.0±0.39 a | 8.33 |
| | CB | 2 | 7.0±0.64 ab | 6.15±1.86 d | 2.0±0.28 a | 16.66 |
| | | 4 | 6.0±0.64 b | 6.45±1.86 d | 3.0±0.28 a | 16.66 |
| | | 6 | 7.0±0.91 ab | 11.30±2.64 bc | 2.0±0.39 a | 8.33 |
| | | 8 | 6.0±0.91 b | 9.70±2.64 c | 3.0±0.39 a | 8.33 |

Al término de vida de los frutos de cacao infectados, la longitud alcanzada de estos hasta la presencia de necrosis total fue mayor en los tratamientos correspondientes a T14, específicamente en los tratamientos CB6, SB6, CB8 y SB8. Respecto a la condición, de manera general los frutos que fueron embolsados fueron más grandes que los frutos no embolsados, independientemente del tratamiento. Los tratamientos donde los frutos fueron menores en longitud correspondieron a los tratamientos de T7. Se encontraron diferencias significativas la condición de manejo de los frutos (F: 6.14, gl: 1, $p=0.0154$) y diferencias altamente significativas entre tratamientos (F: 16.78, gl: 2, $p<0.0001$) y entre edades del fruto (F: 42.64, gl: 3, $p<0.0001$).

De manera general, los tratamientos de edades dos y cuatro, fueron las más susceptibles a la enfermedad, y la menos susceptibles es la de ocho semanas de edad. Se puede observar que, de manera jerárquica, tomando como criterio de selección los de menor incidencia, incidencia media y

mayor incidencia, los tratamientos quedan de la siguiente manera “Cada siete días” < “Testigo” < “Cada 14 días”.

La diferencia en los tamaños del fruto de cacao estuvo asociada a la envoltura protectora, que a pesar de ser una cubierta moderadamente permeable al CO₂ y O₂, al vapor de agua e impide la desecación (Plank, 2005; Yunga, 2011), proporcione un efecto incubación - retrasador que indujo cambios fisiológicos en los frutos infectados, y por ello la expresión de la enfermedad se retrasó, incluyendo la necrosis total de estos. Considerando los resultados de los tratamientos correspondiente a los T7, se recomienda aplicar la suspensión de *Bacillus* cada siete días, sin importar estar o no embolsados.

El mayor daño observado, medidos como ISE, a los frutos de cacao producido por síntomas de moniliasis, se presentó en los tratamientos que recibieron aplicación cada 14 días. En los tratamientos que recibieron aplicación cada 7 días, fueron los que menor daño tuvieron en los frutos de cacao. Al igual que en la incidencia, el ISE estuvo asociado a la capacidad

de infección del fruto, a las propiedades fisicoquímicas del fruto de cacao, al efecto inhibitorio que ejerció la suspensión del *Bacillus* y a la resistencia bioquímica o genética que tuvo la variedad de cacao utilizada, respecto a lo anterior Albore et al. (2018) indicaron que la concentración de fenoles, flavonoides y actividad peroxidasa, juegan un papel relevante contra el desarrollo del patógeno y que esta capacidad se encuentra sustentada por la resistencia genética del fruto.

En la velocidad de crecimiento (Figura 1), se observó que los frutos de los tratamientos de 2 y 4 semanas de edad, que recibieron la aplicación de la suspensión de *Bacillus* sp., cada 7 o 14 días, presentaron valores superiores a los observados en los frutos que no recibieron la aplicación de la bacteria, sin importar si estaban o no protegidos por la envoltura. Se observaron dos picos de velocidad máxima en las semanas cuatro y seis, donde el segundo valor máximo no se observó en el tratamiento testigo.

Lo anterior hace pensar que la cepa bacteriana al interactuar con el tejido del exocarpo del fruto de cacao puede expresar, además del efecto protector contra la infección del fruto por el patógeno que provoca la moniliasis, un efecto como promotor del crecimiento de tejido vegetal (PCTV), proponiendo posibles mecanismos: a) que la cepa penetre la cutícula y llegue a la capa epidérmica del exocarpo colonizándola, ocupando un espacio que no permita la penetración del patógeno, como lo menciona Chowdhury et al. (2015), Villareal-Delgado et al. (2018) y Yu et al. (2011), b) la producción de compuestos de bajo peso molecular con efecto directo sobre el crecimiento del patógeno limitando o inhibiendo su crecimiento (Jaafar et al., 2017; Villareal-Delgado et al., 2018; Zhang et al., 2016), c) que durante la interacción planta - *Bacillus* sp., se estimularon respuestas en el tejido induciendo la producción de fitohormonas (Bustos-Vázquez et al., 2020, Chowdhury et al., 2015; Yu et al., 2011), que promovieron la división celular en el fruto de cacao. A lo antes expuesto, Torres-de los Santos et al. (2020) indica que a nivel endógeno durante la interacción microorganismo - planta, se orquesta una variedad de respuestas donde se producen metabolitos que estimulan el crecimiento vegetativo, producción de metabolitos con actividad antimicrobiana y contra herbívoros, y es posible que esto haya ocurrido en el presente estudio en frutos de cacao después de la aplicación de la suspensión bacilar. A lo anterior no se ha demostrado que la cepa de *Bacillus* sp. utilizada hubiera colonizado el tejido del fruto.

El efecto observado en los frutos correspondientes al tratamiento de 8 semanas de edad (Figura 1 A y B), donde se reduce la velocidad de crecimiento a la semana tres, en ambos tratamientos (aplicación de 7 y 14 días), este comportamiento podría estar asociado a la etapa 2 de cambio que sufre los frutos de cacao donde se reduce la división celular y comienza el alargamiento de las células existentes en todo el tejido del fruto, acompañado de actividad metabólica involucrada a la síntesis de sustancias implicadas en la defensa del fruto; en el interior del mismo fruto se activa el desarrollo del óvulo a expensas del crecimiento del

embrión (Ten Hoopen et al., 2012). Lo anterior, necesitó aproximadamente de una semana, lo que hace pensar que estuvo asociado a la redirección - distribución de nutrientes indispensables en el fruto, dándole prioridad al inicio de la formación de semillas. La envoltura plástica de celofán funcionó como una cámara de incubación donde las condiciones ambientales ejercieron función de elicitar en las células del tejido del fruto la activación de esta etapa entre la semana 10 a la 11, muy marcada en los tratamientos con la envoltura comparado con el tratamiento sin envoltura.

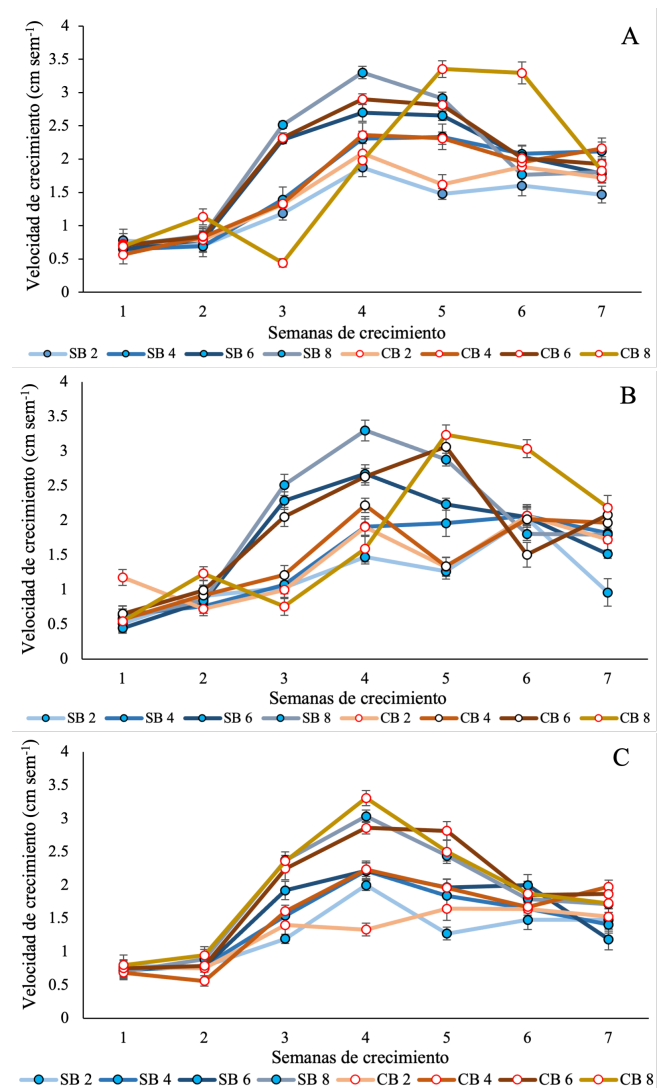


Figura 1. Velocidad de crecimiento de los frutos de cacao (A: con aplicación cada 7 días, B: con aplicación cada 14 días y C: Testigo). Los números 2, 4 y 6 son las edades de los frutos de cacao al inicio del estudio, para cada tratamiento.

4. Conclusión

La suspensión de *Bacillus* inhibe el desarrollo de la moniliasis en los frutos de cacao, cuando se realizó aplicaciones cada siete días, sin importar si se embolsan o no los frutos. La envoltura utilizada provocó un efecto inductor

en el desarrollo de los frutos de cacao, además el efecto de alargar el tiempo de la etapa de incubación de la enfermedad.

Agradecimientos

Los autores agradecen a El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) y al Instituto de Biociencias (IBC).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Albores-Flores VJ, García-Guzmán G, Espinoza-García FJ, Salvador-Figueroa M. 2018. Degree of domestication influences susceptibility of *Theobroma cacao* to frosty pod rot: a severe disease devastating Mexican cacao. *Botanical Sciences* 96(1): 84-94.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edn. New York. Elsevier Academic Press.
- Ando K, Hammar S, Grumet R. 2009. Age-related resistance of diverse cucurbit fruit to infection by *Phytophthora capsici*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134(2): 176-182.
- Aránzazu, F., N. Martínez, D. Guarán, and G. Palencia. 2009. Materiales de cacao en Colombia, su compatibilidad sexual y Modelos de siembra. Unión temporal de cacao de Colombia uno, Fedecacao-Corpoica. Bucaramanga. Pp. 8-9.
- Bailey BA, Crozier J, Sicher RC, Strem MD, Melnick R, Carazzolle MF, Costa G, Pereira GAG, Zhang D, Maximova S, Guiltinan M, Meinhardt L. 2013. Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 81, 84-96.
- Bustos-Vázquez GM, Torres ARI, Sánchez PS, Acosta CEY. 2020. Capítulo II: Microorganismos promotores de del crecimiento vegetal. Rhizobium, Azospirillum, Bacillus, Micorrizas arbusculares. En: Torres de los S. R. Interacciones en la rizosfera de las plantas. Importancia y señalización bioquímica y molecular. Consejo de Publicaciones UAT. Impreso en México. Pp. 27-59.
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology* 6: 780.
- Cuervo-Parra JA, Ramírez SM, Sánchez LV, Ramírez ML. 2011. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. *African Journal of Biotechnology* 10(52): 10657-10663.
- Espinosa GJA, Urestil GJ, Vélez IA, Moctezuma LG, Inurreta AHD, Gongora GSF. 2015. Productividad y rentabilidad potencial del cacao (*Theobroma cacao*) en el trópico mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6(5): 1051-1063.
- Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He W, Zhang JB, Liao YC. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 10(2): e0116871.
- Han T, You C, Zhang L, Feng C, Zhang C, Wang J, Kong F. 2016. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. *BioControl* 61: 195-205.
- Jaaffar AKM, Parejko JA, Paulitz TC, Weller DM, Thomashow LS. 2017. Sensitivity of *Rhizoctonia* isolates to phenazine-1-carboxylic acid and biological control by phenazine-producing *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 107: 692-703.
- Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Felix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS, Allende-Molar R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 215-232.
- López-Báez O, Ramírez-González SI, Espinosa-Zaragoza S, Moreno-Martínez JL, Ruiz-Bello C, Villarreal-Fuentes JM, González-Mejía O. 2015. Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. *Acta Agrícola y Pecuaria* 1(1): 16-23.
- Melnick LR, Strem MD, Crozier J, Sicher RC, Bailey BA. 2013. Molecular and metabolic changes of cherrille wilt of cacao and its effect on *Moniliophthora roreri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 84: 153-162.
- Mercado-Flores Y, Cárdenas-Álvarez IO, Rojas-Olvera AV, Pérez-Camarillo JP, Leyva-Mir SG, Anducho-Reyes M.A. 2014. Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. *Biological Control* 76: 36-40.
- Phillips-Mora W, Castillo J, Krauss U, Rodríguez E, Wilkinson M J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology* 54(4): 483-490.
- Phillips-Mora W, Coutiño A, Ortiz CF, López AP, Hernández J, Aime MC. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology* 55(4): 584.
- Phillips-Mora W, Wilkinson MJ. 2007. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97: 1644-1647.
- Plank R. 2005. El empleo del frío en la industria de la alimentación. Editorial Reverte. México. Pp. 807.
- Ramírez-González SI, López-Báez O, Guzmán-Hernández TJ, Munguía-Ulloa S y Moreno Martínez JL. 2011. El polisulfuro de calcio en el manejo de la moniliasis *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). *Evans et al. del cacao Theobroma cacao* L. *Tecnología en Marcha* 24(4): 10-18.
- Sánchez-Mora FD, Garcés-Fiallo. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.* en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria* 3:249-258.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Cierre de la producción agrícola por cultivo SAGARPA. México. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Disponible en línea en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (consulta julio 2020).
- Takam-Soh P, Ndoumbé-Nkeng M, Sache I, Ndong-Nguema EP, Gwet H, Chadoeuf J. 2013. Development stage – dependent susceptibility of cocoa fruit to pod rot caused by *Phytophthora megakarya*. *European Journal Plant Pathology* 135: 363-370.

- Ten Hoopen GM., Deberdt P, Mbenoum M, Cilas C. 2012. Modelling cacao frosty pod growth: implications for disease control. *Annals Applied Biology* 160: 260-272.
- Torres-Cruz M, Ortiz-García CF, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Nava-Díaz C. 2011. Efecto de Azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(1): 65–69.
- Torres-De los Santos R, Lourenco JDL, García DMA, Ruiz TJ. 2020. Capítulo III: Señalización bioquímica y molecular en el proceso de interacción microorganismo-raíz. En: Torres de los S. R. Interacciones en la rizósfera de las plantas. Importancia y señalización bioquímica y molecular. Consejo de Publicaciones UAT. Impreso en México. Pp. 61- 86.
- Townsend GK, Heuberger JW. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter* 27: 340-343.
- Villamil-Carvajal JE, Viteri-Rosero SE, Villegas-Orozco WL. 2015. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 68(1): 7441-7450.
- Villareal-Delgado MF, Villa-Rodriguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, de los Santos-Villalobos S. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.
- Yáñez-Mendizábal V, Zeriouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Pérez-García A, Teixidó N. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology* 132(4): 609-619.
- Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* 47(2): 138-145.
- Yunga M. 2011. Empaques y técnicas de la conservación de todo tipo de alimentos. Monografía para la obtención de título de Ingeniero Químico. Universidad Católica de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Zhang B, Qin Y, Han Y, Dong C, Li P, Shang Q. 2016. Comparative proteomic analysis reveals intracellular targets for bacillomycin L to induce *Rhizoctonia solani* Kühn hyphal cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Proteins and Proteomics* 1864: 1152-1159.
- Zhang X, Zhou Y, Li Y, Fu X, Wang Q. 2017. Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection*. 96:173-179.
- Zhao Q, Ran W, Wang H, Li X, Shen Q, Shen S, Xu Y. 2013. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IV1. *BioControl* 58: 283-292.



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Proteínas heterólogas en *Yarrowia lipolytica*: la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Roberto Méndez-Eslava, Didiana Gálvez-López, Miguel Salvador-Figueroa, Raymundo Rosas-Quijano*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

La expresión heteróloga de compuestos bioactivos en microorganismos surge como alternativa para satisfacer la demanda de productos básicos que necesita la sociedad moderna para la vida diaria. Este método busca competir con la producción tradicional que involucra síntesis química o enzimática, ya que presentan desventajas por contaminación ambiental o bajos rendimientos. En este sentido, *Yarrowia lipolytica* es un modelo de estudio desarrollado con las herramientas de la biología sintética y de la ingeniería metabólica, cuya finalidad ha sido la producción de diversos compuestos oleaginosos y, más recientemente, de proteínas recombinantes, que representan un mercado de cada vez mayor importancia para la industria biotecnológica. Entre las proteínas heterólogas expresadas en este sistema, la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L. se presenta como proteína funcional debido principalmente a sus propiedades nutraceuticas y antihipertensivas. En esta revisión se describen los principales avances sobre la producción de moléculas de interés biotecnológico e industrial en los sistemas de levaduras no convencionales, específicamente, la expresión de proteínas heterólogas en *Y. lipolytica*; se considera como ejemplo el caso de la globulina 11S de *A. hypochondriacus* L. Finalmente, se resumen las perspectivas para este sistema, así como las limitantes que quedan por superar.

Palabras clave:

Aditivos alimentarios
Expresión heteróloga
Ingeniería metabólica
Levaduras
Proteínas funcionales

Keywords:

Food additives
Heterologous expression
Metabolic engineering
Yeasts
Functional proteins

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
raymundo.rosas@unach.mx

Heterologous proteins in *Yarrowia lipolytica*: the 11S globulin from *Amaranthus hypochondriacus* L.

Abstract

The heterologous expression of bioactive compounds in microorganisms arises as an alternative to satisfy the demand for basic products that modern society needs for daily life. This method seeks to compete with traditional production that involves chemical or enzymatic synthesis, since it has disadvantages due to environmental contamination or low yields. In this sense, *Yarrowia lipolytica* is a study model developed with the tools of synthetic biology and metabolic engineering, whose purpose has been the production of various oleaginous compounds and, more recently, recombinant proteins, which represent an increasingly important market for biotechnology industry. Among the heterologous proteins expressed in this system, 11S globulin from *Amaranthus hypochondriacus* L. is presented as a functional protein for food supplementation mostly due to its nutraceutical and antihypertensive properties. This review describes the main advances in the production of molecules of biotechnological and industrial interest in unconventional yeast systems, specifically, the expression of heterologous proteins in *Y. lipolytica*; the case of the 11S globulin from *A. hypochondriacus* L. is considered as an example. Finally, the perspectives for this system are summarized, as well as the limitations that remain to be overcome.

1. Introducción

La creciente demanda de productos básicos de uso farmacéutico y nutricional, que sean elaborados mediante procesos ambientalmente responsables, sin los inconvenientes en el uso de los sistemas de expresión tradicional motivan el desarrollo de nueva investigación relacionada con la producción de compuestos bioactivos sintetizados por microorganismos o de forma heteróloga (Aditya et al., 2016; Bilal et al., 2020; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b; Larroude et al., 2018; Waterlander et al., 2018). Diferentes modelos no convencionales han sido estudiados con este fin, de entre los cuales destaca la levadura *Yarrowia lipolytica*, es un sistema atractivo, debido a su antigüedad de uso en la elaboración de alimentos como panes, quesos y bebidas fermentadas; a su plasticidad metabólica y a otras características sobresalientes como modelo de estudio en investigación (Nicaud, 2012; Fukuda, 2013; Madzak, 2015; Zinjarde, 2014).

En este sentido, la biología sintética y la ingeniería metabólica mantienen esfuerzos en conjunto para desarrollar plataformas de expresión y secreción a nivel de laboratorio que son únicas, las cuales permiten incrementar los rendimientos y reducir los costos de producción de vacunas, hormonas y otras proteínas importantes para la industria (Abdel-Mawgoud et al., 2018; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b). Debido a ello, a la fecha más de 130 proteínas provenientes de más de 80 especies se han logrado expresar en esta levadura, algunas de ellas con aplicaciones terapéuticas, mientras que otras catalizan reacciones enzimáticas de interés industrial, y algunas más han sido empleadas como aditivos en productos alimenticios (Kim et al., 2014; Korpys-Woźniak et al., 2020; Madzak, 2015; Madzak et al., 2004; Porro et al., 2005; Song et al., 2007). De las proteínas empleadas como suplementos para alimentos, la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L. ha llamado la atención de los investigadores por su potencial como proteína funcional, debido principalmente a su contenido en aminoácidos esenciales y por su posible aplicación como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades asociadas a la dieta, como la hipertensión (Castro-Martínez et al., 2012; Luna-Suárez et al., 2008; Luna-Suárez et al., 2010; Medina-Godoy et al., 2004; Muhammad et al., 2020; Nielsen et al., 1995; Valdez-Ortiz et al., 2005). La presente revisión aborda los principales avances relacionados con la expresión de proteínas heterólogas en sistemas de levaduras no convencionales, como *Y. lipolytica*; se analizan las diferentes herramientas moleculares que se han desarrollado con este propósito y se destaca el potencial de esta levadura como modelo biotecnológico para la producción de proteínas que pueden emplearse en diferentes ámbitos de la industria, enfatizando el caso de la globulina 11S de *A. hypochondriacus* L., la cual puede usarse para la elaboración de alimentos funcionales, un área que ha sido poco explorada.

2. Proteínas recombinantes como productos de interés biotecnológico e industrial

Los materiales y productos que demanda la sociedad moderna para la vida diaria dependen principalmente de la industria de combustibles fósiles y de precursores de hidrocarburos, los cuales generan preocupación en la colectividad global ya que los gases y subproductos derivados de la industria petroquímica provocan la disminución de la calidad del aire y otras formas de contaminación medioambiental. La crisis ambiental motiva el desarrollo de una industria sostenible mediante el uso de materias primas renovables, la búsqueda de bioprecursores, y en general, de recurrir a procesos que no dañen al ecosistema; además del desarrollo de nuevas formas de producir alimentos para cubrir la demanda mundial, la cual incrementa con el paso del tiempo. Ejemplo de estos procesos son la biosíntesis y las fermentaciones realizadas por microorganismos (ambos procesos estudiados por la biotecnología), en lugar de emplear síntesis química o enzimática, que además son costosas y presentan bajos rendimientos (Aditya et al., 2016; Bilal et al., 2020; Waterlander et al., 2018).

La biotecnología permite la producción de proteínas no nativas en diversos sistemas, como los microorganismos, formando así proteínas recombinantes o heterólogas. Producir estas proteínas dentro de un sistema determinado confiere a este último habilidades que le permiten realizar nuevas tareas. La rápida creación y optimización de diversas cepas productoras de estas moléculas ha sido posible gracias al uso combinado de herramientas de la biología sintética y de la ingeniería genética (Larroude et al., 2018; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b). Algunas de estas proteínas tienen aplicaciones terapéuticas, y juegan un papel importante en la medicina molecular al contribuir en el tratamiento de varias enfermedades. Un ejemplo sobresaliente de la producción de proteínas terapéuticas en levaduras fue la expresión de la insulina humana recombinante en el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* en el año 1987. Desde entonces, decenas de nuevos productos farmacéuticos como vacunas y factores sanguíneos han sido expresados en este y otros sistemas. El valor estimado de mercado de las proteínas terapéuticas, incluidos los productos a base de ácidos nucleicos y los productos a base de células modificadas, es de 70-80 mil millones de dólares (USD) con una tasa anual de crecimiento de 7-15%, lo que supone un esquema de producción económicamente factible para la industria biotecnológica (Kim et al., 2014).

Para que un bioproceso sea económicamente viable, la relación entre los costos de producción y el precio de venta del producto en el mercado deben ser favorables. Por tanto, la reducción de los costos es fundamental en la industria de la bioproducción, se espera que el proceso mediado por microorganismos compita con la producción química convencional, la cual emplea materias primas como el petróleo. Como se mencionó anteriormente, la maquinaria enzimática de un microorganismo puede modificarse gracias

a las herramientas de la ingeniería metabólica, con la intención de solventar las demandas de la industria, o para resolver dificultades inherentes al proceso de producción de una molécula determinada. La ingeniería metabólica mejora los rendimientos y la productividad de las cepas de microorganismos, modificando las vías sintéticas e inactivando reacciones competitivas, promoviendo la síntesis selectiva de la molécula deseada y reduciendo la formación de subproductos, para minimizar así los costos en la sección *downstream* de un bioproceso. Se ha referido que en el futuro moléculas tales como el dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO), metanol y metano podrían emplearse como fuentes de carbono para las cepas recombinantes, lo cual promovería el uso de este recurso, el cual es desechado por muchos sectores de la industria, además de que la competencia por el suministro es prácticamente inexistente, al mismo tiempo que son fuentes económicas de posibles sustratos. En este sentido, el objetivo de la ingeniería aplicada en la producción de proteínas heterólogas es el de convertir a una plataforma biotecnológica de expresión perfecta que incorpore todas las vías deseadas y pueda realizar un amplio número de actividades distintas, es decir, que una cepa sea capaz de degradar varios tipos de fuentes de carbono complejas, o de producir varias proteínas en un mismo microorganismo sin que esto represente un problema para la supervivencia del mismo. Sin embargo, se ha descrito que la carga metabólica afectaría el rendimiento del producto (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2018; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b). Más adelante se abordan las características de provecho y los aspectos limitantes relacionados con la carga genética en los sistemas de expresión.

3. Sistemas de expresión de proteínas heterólogas

Saccharomyces cerevisiae, *Escherichia coli* y las células de mamíferos son los sistemas hospedadores más utilizados para la producción de proteínas heterólogas con aplicaciones terapéuticas, y representan el 15%, 31% y 43%, respectivamente, de los productos biofarmacéuticos desarrollados; sin embargo, se ha reportado que presentan desventajas como la formación de cuerpos de inclusión, bajos rendimientos, crecimiento lento, se requiere de medios complejos y/o son susceptibles a la contaminación viral (Berlec y Štrukelj, 2013; Çelik y Çalık, 2012; Kim *et al.*, 2014).

El sistema de expresión ideal sería, entonces, una plataforma universal capaz de convertir de manera eficiente una amplia variedad de materias primas de bajo costo en productos de valor agregado. Sin embargo, los fenotipos relevantes para la producción de proteínas heterólogas suelen ser multifactoriales y con procesos metabólicos difíciles de descifrar. Las ventajas innatas de un sistema hospedero pueden incluir desde tolerancia a altas concentraciones de producto o precursor y tolerancia a las condiciones del procesamiento, dichos rasgos suelen ser complejos y difíciles de caracterizar, y por lo tanto no se transfieren de manera

sencilla a otra cepa u organismo preferido (Wagner y Alper, 2016).

Las levaduras, por su parte, han sido empleadas desde hace miles de años en la elaboración de alimentos como panes y quesos, y para producir bebidas alcohólicas a través de los procesos de fermentación, extendiéndose su uso cada vez más hasta emplearse en tareas menos tradicionales como la síntesis de proteínas terapéuticas, lo que hace que adquieran relevancia industrial (Kim *et al.*, 2014). Actualmente, las levaduras se encuentran por detrás de *E. coli* en cuanto al número de redes sintéticas que se han descrito, debido a su naturaleza eucariota. No obstante, a pesar de ser relativamente complejas, las levaduras poseen una variedad de ventajas que las vuelve atractivas como plataformas de expresión de proteínas; características como el crecimiento a alta densidad celular en una amplia variedad de fuentes de carbono, capacidad para realizar una variedad de modificaciones postraduccionales complejas, alta capacidad de secreción celular, poseen mayor tolerancia al proceso de fermentación industrial que otros sistemas bacterianos tradicionales, no son susceptibles a agentes infecciosos como los bacteriófagos, y se ha descrito que secretan pocas proteínas endógenas, lo que facilita el proceso de purificación de la proteína recombinante secretada. Si bien los hongos filamentosos también comparten muchas de estas características, a menudo son más difíciles de transformar con ADN exógeno (Blount *et al.*, 2012; Egermeier *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2014; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016b). Aunque los primeros trabajos de biología sintética en levaduras comenzaron con el modelo *S. cerevisiae*, hoy se conoce que esta levadura produce hiperglicosilación de los productos y estructuras de glicanos potencialmente alergénicas, lo cual es desfavorable para la producción de algunas proteínas terapéuticas humanas. En la última década, el campo de aplicación en levaduras se ha extendido a otros modelos denominados no convencionales, como *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* y *Yarrowia lipolytica*. La secuenciación completa del genoma de algunas de estas levaduras ya se encuentra disponible en bases de datos públicas (De Schutter *et al.*, 2009; Dujon *et al.*, 2004; Ravin *et al.*, 2013). Algunos ejemplos de proteínas y otros productos expresados en estos sistemas pueden apreciarse en el Cuadro 1.

3.1. *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica es una levadura oleaginosa dimórfica, no convencional, perteneciente al filo Ascomycota (subfilo: Saccharomycotina, antes llamado Hemiascomycetes), la cual se ha descrito que posee notable actividad lipolítica y proteolítica. Ha sido aislada de varios medios, entre ellos suelos, aguas marinas, micorrizas, carnes y alimentos lácteos, destacando varios quesos, además de tener relativa incidencia en aguas contaminadas con hidrocarburos (habitualmente habita entornos con sustratos de naturaleza hidrófoba) (Fukuda, 2013; Madzak, 2015; Nicaud, 2012; Zinjarde, 2014). Desde hace más de 50 años esta levadura ha ganado

popularidad entre académicos, investigadores y en la industria debido a que posee ventajas metabólicas distintivas, como tolerancia a los cambios de pH (tanto ácido como alcalino), concentración de sales, bajas temperaturas, baja actividad acuosa, posee una elevada capacidad de secreción (de manera natural secreta enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, esterasas, fosfatasa y RNAsas), y permite el uso de diversos compuestos orgánicos como materias primas (alcoholes, azúcares y ácidos orgánicos); esto la vuelve un microorganismo adecuado para una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas y para la expresión de metabolitos más allá de los ácidos grasos que típicamente se han estado trabajando en este modelo, que abarca productos derivados de pentosas fosfato, biocombustibles, metilcetonas, policétidos, terpenos, carotenoides, polímeros, enzimas, proteínas terapéuticas, nanopartículas, fármacos, nutraceuticos, ácidos orgánicos, aditivos y suplementos dietéticos, por mencionar algunos. También se ha propuesto como modelo de estudio del dimorfismo, del complejo mitocondrial, peroxisomas, acumulación de lípidos, y para la producción de diversas enzimas (Blazek et al., 2015; Celińska et al., 2018; Dulermo et al., 2017; Hanko et al., 2018; Jach et al., 2020; Kubiak et al., 2019; Larroude et al., 2018; Ledesma-Amaro y Nicaud, 2016a; Sekova et al., 2019; Vandermies y Fickers, 2019; Xie, 2017; Yan et al., 2018).

Y. lipolytica es una levadura de estado GRAS (generalmente reconocida como segura), designada así por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de EE. UU., por lo que se puede utilizar sin riesgo en los procesos industriales, es de fácil manipulación en condiciones de laboratorio, y entre lo más destacado de su fortaleza metabólica, esta puede acumular intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), precursores como acetyl-CoA y malonil-CoA; asimismo permite la manipulación de la vía de pentosas fosfato, lo que hace posible la generación de múltiples productos heterólogos (Bilal et al., 2020; Gálvez-López et al., 2019; Gao et al., 2017; Madzak, 2015; Markham y Alper, 2018; Miller y Alper, 2019; Wagner et al., 2018; Zinjarde, 2014).

4. Principales proteínas heterólogas expresadas en *Yarrowia lipolytica*

La levadura *Y. lipolytica* se ha convertido en un sistema popular para la expresión y secreción de moléculas de interés industrial, destacando de entre ellas a las proteínas. El uso de esta levadura para la obtención de compuestos valiosos se ha desarrollado en dos direcciones conectadas entre sí: como un hospedador para la producción de proteínas heterólogas y como una célula biocatalizadora. Usar a *Y. lipolytica* como hospedador a menudo requiere de modificar su metabolismo, introducir nuevas enzimas catalizadoras por medio de la expresión de proteínas foráneas; esto a su vez precisa del desarrollo de promotores sintéticos, genes sintéticos con codones optimizados, factores de transcripción artificiales y de la inserción de casetes de expresión. A pesar de aplicarse con mayor frecuencia en los sistemas procarióticos, se ha

descrito que la optimización de codones puede mejorar la eficiencia de traducción de genes heterólogos en levaduras, permitiendo que coincidan con la secuencia de nucleótidos del organismo huésped (Kim *et al.*, 2014). El uso de esta levadura como huésped para la expresión heteróloga se inició hace poco más de 35 años, en 1984, por Pfizer Inc. (EE. UU.) y un equipo del INRA en Francia. Desde entonces, más de 130 proteínas, de más de 80 especies se han producido con éxito en este modelo. Al principio, el uso de levaduras como sistemas para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes se vio afectado debido a las diferencias que existían entre la ruta de N-glicosilación de las levaduras y la de los mamíferos, ya que las levaduras, al modificar las glicoproteínas con N-glicanos de alta manosa, ocasionan que se reduzca la vida media de las proteínas producidas, volviéndolas inmunogénicas para los humanos y otros mamíferos, y reduciendo así su utilidad. Sin embargo, en la actualidad, para *Y. lipolytica* se han desarrollado cepas que producen glicoproteínas compatibles con humanos, probadas *in vivo* (Kim et al., 2014; Korpys-Woźniak et al., 2020; Madzak et al., 2004; Madzak, 2015; Porro et al., 2005; Song et al., 2007;). Otra limitante en la producción de proteínas recombinantes es que, durante la secreción, a menudo se ven sujetas a una escisión proteolítica por las proteasas que existen en la superficie celular, lo que reduce el rendimiento final y afecta la calidad de los productos; sin embargo, la construcción de cepas deficientes de proteasas mediante la delección múltiple de algunos genes podría emplearse para resolver este problema (Wu et al., 2013). Las cepas de tipo silvestre se han utilizado para producir proteínas unicelulares SCP (Single Cell Proteins) destinadas a la alimentación del ganado. Por otra parte, la empresa polaca Skotan SA comenzó recientemente a comercializar biomasa de esta levadura para su uso como levadura forrajera en Europa, y a desarrollar aplicaciones prebióticas y probióticas para la industria alimentaria. Esta levadura también se ha modificado para la expresión de un péptido antimicrobiano (Zhao et al., 2013). Algunas enzimas de importancia económica que han sido expresadas en *Y. lipolytica* incluyen lipasas, proteasas, amilasas, mananasas y lacasas. Las lipasas, una subclase de esterasas, catalizan la hidrólisis de lípidos y tienen diversas aplicaciones en la industria alimentaria, de detergentes, en biorremediación, como biocatalizadores para la producción de biodiesel y en química orgánica, además de utilizarse en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina. Las proteasas, enzimas capaces de hidrolizar diversos enlaces peptídicos por medio de diversos mecanismos catalíticos, tienen su principal aplicación en la industria alimentaria y de los detergentes, aunque también en el tratamiento de aguas residuales y en el ámbito médico. Las alfa amilasas son glucósido-hidrolasas muy importantes en el procesamiento del almidón. Las b mananasas son hemicelulasas capaces de hidrolizar los enlaces 1,4-β-D manosídicos de las cadenas de manano y sus derivados, y se emplean en la bioconversión de la biomasa lignocelulósica, así como en la industria de los alimentos y

piensos, de los detergentes, y en la extracción de petróleo. Las lacasas, por su parte, son oxidorreductasas de cobre capaces de oxidar una amplia gama de fenoles y arilaminas, y se pueden utilizar en la degradación de pesticidas, tintes e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (Han et al., 2013; Madzak, 2015).

Cuadro 1. Proteínas heterólogas y otros productos de uso industrial expresados en diferentes especies de levaduras no convencionales.

| Organismo | Productos |
|----------------------|---|
| <i>H. polymorpha</i> | Factor de crecimiento similar a la insulina Fitasa Hexosa oxidasa Hirudina Triacilglicerol lipasa Vacuna contra la hepatitis B |
| <i>K. lactis</i> | Ácido glicólico Ácido láctico Lactasa Quimosina |
| <i>P. pastoris</i> | Albúmina sérica humana Anticuerpo Anti-IL-6R Anticuerpo Anti-RSV Colágeno Ecalantida Factor de crecimiento HB-EGF Fosfolipasa C Insulina Interferón α 2b Isobutanol Nootkatona Ocriplasma Vacuna de la hepatitis |
| <i>Y. lipolytica</i> | ω -3 y ω -6 α -amilasa de <i>Oryza sativa</i> Ácido alfa-cetoglutárico Ácido alfa-linolénico Ácido cítrico Ácido eicosapentaenoico Ácido isocítrico Ácido itacónico Ácido succínico Biodiesel Citocromo P450 1A1 de <i>Homo sapiens sapiens</i> Endo- β -1,4-mananasa de <i>Aspergillus aculeatus</i> Epóxido hidrolasa de <i>Rhodotorula araucariae</i> Eritritol Interferón α 2b de <i>Homo sapiens sapiens</i> Lacasa I de <i>Pycnopus cinnabarinus</i> Leucina aminopeptidasa II de <i>Aspergillus oryzae</i> Lipasa B de <i>Candida antártica</i> Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> Lipasa extracelular YILIP2 Pancrelipasa Proquimosina de <i>Bos taurus taurus</i> Succinato Ácido gamma-linolénico Licopeno β -caroteno |

(Ekas et al., 2019; Kim et al., 2014; Madzak, 2015; Wagner y Alper, 2016).

5. Versatilidad de *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica también se ha empleado para producir ácidos grasos poliinsaturados, aceite unicelular y proteína unicelular. Los ácidos grasos poliinsaturados son comestibles, y aunque no son sintetizados por los mamíferos, son esenciales para la salud. Existe la intención de desarrollar cepas de *Y. lipolytica* productoras de ω -3 y ω -6, los cuales puedan ser utilizados como suplementación en piensos y alimentos, como alternativa económica y sostenible a la producción tradicional en la que estos compuestos se obtienen de aceites vegetales o del pescado. Se ha descrito que algunas cepas de esta levadura son capaces de producir biomasa con concentraciones de lisina, treonina y fenilalanina/tirosina más altos que los observados en la proteína de huevo estándar (Juszczak et al., 2013). DuPont Company ya comercializa biomasa de *Y. lipolytica* rica en ácido eicosapentaenoico (EPA) como alimento para peces, cuyo proceso ha sido optimizado y patentado (Verlasso™), además de suplementos dietéticos ricos en EPA (New Harvest™). Otros ejemplos de moléculas producidas por esta levadura y destinadas a la suplementación de alimentos incluyen al ácido cítrico, un conservador ampliamente utilizado por la industria, y a los carotenoides, pigmentos orgánicos lipofílicos empleados como colorantes y agentes antioxidantes. Por lo tanto, se conoce que esta levadura se utiliza con diversos fines en la industria alimentaria: en la fabricación de alimentos, la elaboración de aditivos y conservadores, la producción de biomasa como alimento o pienso, y en el proceso de transformación de los desechos alimentarios, por lo que se le considera como importante en aplicaciones relacionadas con comestibles. Los aspectos relacionados con la inocuidad de *Y. lipolytica* para su uso alimenticio refieren que naturalmente se le puede hallar en productos cárnicos, avícolas y lácteos, se consume como alimento y pienso, y a que se han obtenido aditivos de grado alimenticio de esta levadura (Madzak, 2015; Patsios et al., 2020; Zinjarde, 2014).

5.1. Cepas, vectores, vías de secreción y otros aspectos de ingeniería metabólica

La mayoría de los trabajos de expresión heteróloga han utilizado un número limitado de líneas de cepas endogámicas, entre las que destacan la cepa E129 y la serie de cepas Po1 (Po1d, f, g y h). La cepa E129 (MatA, lys11-23, leu2-270, ura3-302, xpr2-322) se produce a partir de múltiples cruces entre derivados de la cepa francesa de tipo silvestre W29 (MatA) y la cepa estadounidense YB423-12 (MatB). La serie de cepas Po1 se derivan únicamente de W29 y no contienen el retrotransposón Ylt1 que estaba ausente en esta cepa francesa de tipo silvestre. Po1d (MatA, leu2-270, ura3-302, xpr2-322) presenta altos niveles de secreción, delección de proteasa extracelular alcalina (AEP, codificada por el gen XPR2), auxotrofia por Leu- y Ura- no reversibles, y producción de invertasa recombinante (el alelo ura3-302 corresponde a la ruptura de URA3 por el gen SUC2 de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control del promotor

XPR2) permitiendo utilizar sacarosa o melaza como fuente de carbono. Las cepas Po1f, Po1g y Po1h fueron suprimidas para la proteasa extracelular ácida (alelo *xpr1-2*). Po1g también se equipó con una plataforma de acoplamiento pBR322 (ura3-302::URA3:pBR322) para futuras integraciones con vectores basados en pBR322 y retiene únicamente la auxotrofia por Leu-. Po1h fue modificada mediante la conversión del gen LEU2 para retener solamente la auxotrofia por Ura-. Todas estas cepas pueden ser adquiridas en la Biblioteca de Levaduras CIRM-Levures del INRA (<https://www6.inrae.fr/cirm/Levures>) y mediante el kit de expresión YLEX™ que puede adquirirse en Yeastern Biotech Co. (Taiwán) o Gentaur (Bélgica) (Madzak, 2015; Zinjarde, 2014).

En el área de la transformación de cepas, existen dos tipos de vectores con los cuales se puede transformar levaduras. Los primeros son los plásmidos episomales, también denominados como “replicativos”; el segundo tipo se refiere a los plásmidos que son linearizados con la intención de dirigir su integración en un locus preciso del genoma de la levadura, también conocidos como “integrativos”. Se sabe que ninguna cepa de *Y. lipolytica* posee episomas naturales, pero se han diseñado plásmidos replicativos que utilizan Secuencias de Replicación Autónoma / Centrómero (ARS / CEN) cromosómicas, las cuales son útiles cuando se requiere de expresión transitoria; no obstante, su uso para la expresión heteróloga se ve limitado por presentar un bajo número de copias (un promedio de uno a tres plásmidos por célula en condiciones selectivas) y a su alta frecuencia de pérdidas. Al respecto, los promotores inducibles ofrecen la ventaja de regular la expresión génica como respuesta a la presencia de determinadas moléculas químicas, las cuales pueden inducirla o reprimirla. Recientemente, se ha diseñado un plásmido mejorado de ARS / CEN fusionando un promotor corriente arriba de la región centromérica, aumentando así el número relativo de copias en un 80% y proporcionando un punto de partida para el desarrollo de plásmidos replicativos más potentes en esta levadura. Sin embargo, el uso de vectores integrativos sigue siendo la estrategia preferida empleada en la ingeniería de *Y. lipolytica* (Kim et al., 2014; Liu et al., 2014; Madzak, 2015; Shen et al., 2012;).

Se ha reportado que este sistema eucariota es eficaz en la secreción de moléculas. Para dirigir una proteína heteróloga a la vía secretora de *Y. lipolytica* con el fin de obtener su liberación en el medio de cultivo, de dirigirla a microcuerpos celulares como oleosomas o peroxisomas, o para su exposición en la superficie celular, se realiza una fusión traduccional con un señalizador adecuado en la secuencia madura de la proteína de interés; esto permite dirigir al nuevo polipéptido a la vía de secreción celular. En general, la secreción de proteínas requiere de múltiples etapas, e involucran los procesos de transcripción, traducción, translocación, y de modificaciones postraduccionales (plegamiento de proteínas, escisión de péptidos, glicosilación adicional, clasificación y finalmente secreción). Al respecto, se ha descrito que la sobreexpresión de factores de

plegamiento (chaperonas), o de enzimas redox, pueden mejorar la secreción de proteínas en el retículo endoplásmico; además, previenen la acumulación de proteínas mal plegadas (Hou et al., 2012; Kim et al., 2014). El direccionamiento de proteínas heterólogas a peroxisomas de *Y. lipolytica* se puede realizar mediante la fusión de una señal de direccionamiento peroxisómico (PTS) a su dominio C terminal. El tripéptido AKI, considerado como un PTS de consenso para los géneros relacionados *Yarrowia* y *Candida*, se ha utilizado para dirigir una polihidroxialcanoato sintasa bacteriana a los peroxisomas de *Y. lipolytica*, y el tripéptido SKL, más cercano al consenso PTS de *S. cerevisiae*, se ha utilizado para dirigir a la proteína verde fluorescente (GFP) a esta misma dirección (peroxisomas). Varias proteínas heterólogas se han dirigido a los oleosomas de *Y. lipolytica* y se han anclado en la superficie a través de la fusión al dominio C terminal de una oleosina vegetal, una proteína estructural incrustada en la membrana fosfolipídica de los oleosomas de las plantas (Haddouche et al., 2010; Madzak, 2015; Xue et al., 2013).

Algunos estudios reportan que los terminadores en los sistemas fúngicos pueden mejorar la producción de proteínas a partir de las transcripciones y pueden aumentar la abundancia de enzimas. Aunque los terminadores no se han caracterizado completamente para *Y. lipolytica*, los diseños sintéticos para *S. cerevisiae* siguen siendo funcionales en esta levadura, y en comparación con los terminadores endógenos comunes presentan una mejora del 70% en la expresión génica (Curran et al., 2015; Ito et al., 2013).

6. La globulina 11s de *Amaranthus hypochondriacus* L. como proteína funcional

La nutrición y el estilo de vida de los individuos juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión. De esta enfermedad se derivan otros padecimientos como la enfermedad coronaria, la enfermedad arterial periférica, la enfermedad renal en etapa terminal, y el accidente cerebrovascular. Se reporta que en el 2010 aproximadamente un billón de personas alrededor del mundo padecían hipertensión, y se estimó que para el 2025 la cifra se haya incrementado en un 60% (Glasser, 2001; Madureira et al., 2010; Nakahara et al., 2010). Los fármacos hipotensores producidos químicamente para el tratamiento y prevención de la hipertensión, captopril, propranolol y losartán, provocan efectos secundarios como tos seca, alteraciones del gusto, erupciones cutáneas y otras disfunciones en los órganos humanos (FitzGerald y Meisel, 2000). En ese marco, se sabe que algunas proteínas presentes en alimentos como la leche, huevo, pescado, y en muchas plantas ejercen actividad antihipertensiva, y son coadyuvantes en la prevención y tratamiento de estos padecimientos, lo cual ha llamado la atención de los investigadores. Estas proteínas nutracéuticas contienen péptidos bioactivos que se encuentran dentro de la secuencia de aminoácidos que las conforman y pueden ser liberados en el cuerpo por medio de la proteólisis enzimática durante la

digestión gastrointestinal, en donde una vez libres actúan como compuestos reguladores con actividad similar a la de las hormonas. Gracias a su potencial para mejorar la salud, los péptidos bioactivos son atractivos para utilizarse como componentes en alimentos funcionales, aunado al hecho de que representan una alternativa menos costosa y más saludable que el uso de fármacos, debido a que no conllevan al desarrollo de efectos secundarios (Erdmann et al., 2008; Hong et al., 2008). Se ha descrito que el dipéptido Val-Tyr (VY) además de ser fácilmente absorbido por el torrente sanguíneo, ha demostrado poseer actividad antihipertensiva en diversos estudios realizados con ratones y humanos; así también los tripéptidos Ile-Pro-Pro (IPP) y Val-Pro-Pro (VPP). A este respecto, las semillas del amaranto (*A. hypochondriacus* L.) son consideradas una excelente fuente de proteínas debido a su composición equilibrada de aminoácidos esenciales como la lisina (3.7 - 7.6%) y de aminoácidos azufrados (3.1 - 7.1%), además de ser fuente de minerales, calcio, hierro, fósforo, ácido fólico y vitaminas A, B1, B2, B3 y C (Valdez-Ortiz et al., 2005). Se ha descrito que la subunidad ácida de la amarantina (una proteína de almacenamiento de tipo globulina con un coeficiente de sedimentación 11.9S) posee potencial como proteína funcional y nutracéutica para suplementar alimentos debido a que su composición de aminoácidos está cerca del balance óptimo requerido en la dieta humana, además de poseer una notable estabilidad térmica y propiedades emulsionantes. Esta globulina 11S o amarantina es una molécula homoeámera con una masa molecular de 398 KDa, una porción denominada proamarantina de 50-52 KDa, y dos subunidades similares a los disulfuros, la subunidad ácida de 32-34 KDa y la subunidad básica de 22-24 KDa; dicha proteína ha sido expresada en diferentes sistemas, como *Escherichia coli*, además de plantas de maíz y semillas de tabaco transgénico, obteniendo un notable mayor rendimiento que en el sistema nativo y sin reacciones alérgicas. Recientemente, algunas investigaciones se han enfocado en mejorar las propiedades nutracéuticas y funcionales de la globulina 11S, mediante la inserción de genes que codifican péptidos con actividad antihipertensiva. Castro-Martínez et al. en el 2012 realizaron un trabajo durante el cual modificaron la estructura de la globulina 11S en su tercera región variable, expresando cuatro dipéptidos Val-Tyr colocados en tándem, además de agregar el oligopéptido Arg-Ile-Pro-Pro en la región C-terminal, al mismo tiempo que ensayaron con variables como la temperatura, velocidad de agitación y oxigenación, obteniendo una producción máxima de 99 mg de proteína modificada/L, cantidades mayores a las obtenidas en cultivo en matraces pero con menor estabilidad que la proteína no modificada. Como dato adicional, se reporta que existe poca información documentada acerca de parámetros eficientes a escala de biorreactor para la producción de amarantina (Castro-Martínez et al., 2012; Luna-Suárez et al., 2008, 2010; Medina-Godoy et al., 2004; Muhammad et al., 2020; Nielsen et al., 1995).

7. Perspectivas y principales retos

A pesar de los avances logrados en la ingeniería aplicada en levaduras, se han reportado algunas limitantes durante el proceso de producción de proteínas heterólogas, lo cual supone un área de oportunidad para desarrollar nueva investigación; tal es el caso de la propensión de esta levadura por la unión de extremos no homólogos NHEJ (Non-homologous end-joining), un mecanismo de reparación del ADN en donde las aberturas de doble hebra se ligan directamente, sin un donante de homología, lo que complica las integraciones específicas. Otro ejemplo son los sistemas de plásmidos episomales relativamente inestables. Es por ello que uno de los principales desafíos por superar se centra en mejorar la eficiencia de transformación. La posibilidad de aumentar y/o ajustar la expresión génica es crucial tanto para la producción de proteínas heterólogas como para la ingeniería metabólica en sí. Una desventaja adicional surge de la naturaleza dimórfica de *Y. lipolytica*, lo cual puede conducir a dificultades en el bioprocesamiento, específicamente cuando las células son filamentosas, aunque los estudios han demostrado formas de limitar el crecimiento a la forma de levadura. No obstante, las dificultades de la eficiencia de biotransformación en esta levadura pueden ser superadas mediante el empleo de las nuevas herramientas y tecnologías de última generación de la ingeniería genética, como el sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas), emparejadas con la endonucleasa Cas9, que permiten la edición dirigida del genoma mediante la integración de un ARN guía para inducir una ruptura de doble hebra DSB (Double Strand Break) en un locus específico y sin la necesidad de utilizar marcadores (Bilal et al., 2020; Markham y Alper, 2018; Schwartz et al., 2016; Swietalski et al., 2020; Timoumi et al., 2018; Wagner y Alper, 2016). El desarrollo relativamente reciente de este y otros sistemas emergentes permiten usar a *Y. lipolytica* como levadura de ensamblaje, lo que aumenta sus posibilidades de uso en diversas aplicaciones, como biocatálisis o bioconversión inmovilizada, desarrollo de biosensores y vacunas vivas, o detección de alto rendimiento de nuevas actividades enzimáticas. La capacidad de las levaduras para ensamblar y mantener genomas bacterianos completos demuestra que tienen las herramientas y la capacidad para el alojamiento de grandes redes sintéticas, pero todavía falta estudiar la respuesta celular al estrés de la sobreproducción de proteínas heterólogas. Los programas de biología sintética existentes ya ofrecen características para la optimización automática mediante el uso de codones de genes heterólogos, y esquemas de ensamblaje de ADN. Para los diseños futuros en biología sintética de levadura, será crucial comprender, cuantificar y modelar los límites de capacidad de la célula nativa. El desarrollo de plataformas de alto rendimiento permitirá el uso de esta levadura para la producción y análisis estructural de proteínas, lo que a su vez posibilitará un mejor uso de *Y. lipolytica* como fábrica

celular, y como microorganismo genéticamente modificado (GMM) que sea plenamente aceptado socialmente para aplicaciones en el ámbito medioambiental y en la industria de alimentos destinados a humanos (aunque existe información publicada sobre los aspectos básicos y aplicados de esta levadura, hace falta una revisión extensa de las aplicaciones relacionadas con la alimentación). Por último, las lecciones aprendidas en el desarrollo de estas nuevas herramientas para *Y. lipolytica* conducirán a metodologías que se pueden aplicar a otras levaduras oleaginosas prometedoras, como *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* y *Trichosporon oleaginosus* (Blount et al., 2012; Madzak, 2015; Markham y Alper, 2018; Wagner y Alper, 2016; Zinjarde, 2014).

8. Conclusión

El modelo de estudio *Yarrowia lipolytica* ha contribuido fuertemente en el conocimiento y aplicación de los avances tecnológicos y funcionales de la ingeniería metabólica para la producción de proteínas heterólogas. La globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L. es una proteína con potencial para la elaboración de productos alimenticios debido a sus bondades nutracéuticas y a su posible uso como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión; no obstante, aún quedan aspectos por mejorar durante el proceso de producción de estas proteínas: aumentar la eficiencia de transformación de las cepas recombinantes, desarrollar nuevas posibilidades de uso de *Y. lipolytica* (por ejemplo, para la expresión de nuevas moléculas), la caracterización de genes, el estudio y desarrollo de cepas sobreproductoras, y sobre cómo incluir todas sus cualidades metabólicas en nuevos modelos de estudio o en una sola cepa sin comprometer la supervivencia de la célula en el proceso, además de realizar una revisión más detallada sobre las aplicaciones de esta levadura en el campo de la industria alimentaria y que refuerce su uso seguro para la elaboración de productos destinados al consumo humano (como suplementos y probióticos, entre otros).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Abdel-Mawgoud AM, Markham KA, Palmer CM, Liu N, Stephanopoulos G, Alper HS. 2018. Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering* 50: 192-208.
- Aditiya HB, Mahlia TMI, Chong WT, Nur H, y Sebayang AH. 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66: 631-653.
- Berlec A. y Štrukelj B. 2013. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts

- and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40(3-4): 257-274.
- Bilal M, Xu S, Iqbal HMN, Cheng H. 2020. *Yarrowia lipolytica* as an emerging biotechnological chassis for functional sugars biosynthesis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61(4): 535-552.
- Blazcek J, Hill A, Jamoussi M, Pan A, Miller J, Alper HS. 2015. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for itaconic acid production. *Metabolic Engineering* 32: 66-73.
- Blount BA, Weenink T, Ellis T. 2012. Construction of synthetic regulatory networks in yeast. *FEBS Letters* 586(15): 2112-2121.
- Castro-Martínez C, Luna-Suárez S, Paredes-López O. 2012. Overexpression of a modified protein from amaranth seed in *Escherichia coli* and effect of environmental conditions on the protein expression. *Journal of Biotechnology* 158(1-2): 59-67.
- Çelik E y Çalik P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30(5): 1108-1118.
- Celińska E, Borkowska M, Białas W, Korpys P, Nicaud JM. 2018. Robust signal peptides for protein secretion in *Yarrowia lipolytica*: identification and characterization of novel secretory tags. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(12): 5221-5233.
- Curran KA, Morse NJ, Markham KA, Wagman AM, Gupta A, Alper HS. 2015. Short synthetic terminators for improved heterologous gene expression in yeast. *ACS Synthetic Biology* 4(7): 824-832.
- De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzép P, Van de Peer Y, Callewaert N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* 27(6): 561-566.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Couciet JL. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430(6995): 35-44.
- Dulermo R, Brunel F, Dulermo T, Ledesma-Amaro R, Vion J, Trassaert M, Thomas S, Nicaud JM, Leplat C. 2017. Using a vector pool containing variable-strength promoters to optimize protein production in *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories* 16(1): 31.
- Egermeier M, Russmayer H, Sauer M, Marx H. 2017. Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. *Frontiers in Microbiology* 8: 49.
- Ekas H, Deaner M, Alper HS. 2019. Recent advancements in fungal-derived fuel and chemical production and commercialization. *Current Opinion in Biotechnology* 57: 1-9.
- Erdmann K, Cheung BWY, Schröder H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19(10):643-54.
- FitzGerald RJ, Meisel H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition* 84(S1): 33-37.
- Fukuda R. 2013. Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77(6): 1149-1154.
- Gálvez-López D, Chávez-Meléndez B, Vázquez-Ovando A, Rosas-Quijano R. 2019. The metabolism and genetic regulation of lipids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Brazilian Journal of Microbiology* 50(1): 23-31.
- Gao S, Tong Y, Zhu L, Ge M, Zhang Y, Chen D, Jiang Y, Yang S. 2017. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production. *Metabolic Engineering* 41: 192-201.
- Glasser SP. 2001. Hypertension syndrome and cardiovascular events. *Postgraduate Medicine* 110(5): 29-36.
- Haddouche R, Delessert S, Sabirova J, Neuvéglise C, Poirier Y, Nicaud JM. 2010. Roles of multiple acyl-CoA oxidases in the routing of carbon flow towards β -oxidation and polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 10(7): 917-927.
- Han Z, Madzak C, Su WW. 2013. Tunable nano-oleosomes derived from engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering* 110(3): 702-710.
- Hanko EKR, Denby CM, Sánchez i Nogué V, Lin W, Ramirez KJ, Singer CA, Beckham GT, Keasling JD. 2018. Engineering β -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. *Metabolic Engineering* 48: 52-62.
- Hong F, Ming L, Yi S, Zhanxia L, Yongquan W, Chi L. 2008. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides* 29(6): 1062-1071.
- Hou J, Tyo KEJ, Liu Z, Petranovic D, Nielsen J. 2012. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 12(5): 491-510.
- Ito Y, Yamanishi M, Ikeuchi A, Imamura C, Tokuhiro K, Kitagawa T, Matsuyama T. 2013. Characterization of five terminator regions that increase the protein yield of a transgene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 168(4): 486-492.
- Jach ME, Baj T, Juda M, Świder R, Mickowska B, Malm A. 2020. Statistical evaluation of growth parameters in biofuel waste as a culture medium for improved production of single cell protein and amino acids by *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express* 10(1): 35.
- Juszczyk P, Tomaszewska L, Kita A, Rymowicz W. 2013. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresource Technology* 137(00): 124-131.
- Kim H, Yoo SJ, Kang HA. 2014. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research* 15(1):1-16.
- Korpys-Woźniak P, Kubiak P, Białas W, Celińska E. 2020. Impact of overproduced heterologous protein characteristics on physiological response in *Yarrowia lipolytica* steady-state-maintained continuous cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(22): 9785-9800.
- Kubiak M, Borkowska M, Białas W, Korpys P, Celińska E. 2019. Feeding strategy impacts heterologous protein production in *Yarrowia lipolytica* fed-batch cultures-Insight into the role of osmolarity. *Yeast* 36(5): 305-318.
- Larroude M, Rossignol T, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R. 2018. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Advances* 36(8): 2150-2164.
- Larroude M, Celinska E, Back A, Thomas S, Nicaud JM, Ledesma-Amaro R. 2018. A synthetic biology approach to

- transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene. *Biotechnology and Bioengineering* 115(2): 464-472.
- Ledesma-Amaro R y Nicaud JM. 2016a. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Progress in Lipid Research* 61: 40-50.
- Ledesma-Amaro R y Nicaud JM. 2016b. Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology* 34(10): 798-809.
- Liu L, Otoupal P, Pan A, Alper HS. 2014. Increasing expression level and copy number of a *Yarrowia lipolytica* plasmid through regulated centromere function. *FEMS Yeast Research*. 14(7): 1124-1127.
- Luna-Suárez S, Medina-Godoy S, Cruz-Hernández A, Paredes-López O. 2008. Expression and characterization of the acidic subunit from 11S Amaranth seed protein. *Biotechnology Journal*. 3(2): 209-219.
- Luna-Suárez S, Medina-Godoy S, Cruz-Hernández A, Paredes-López O. 2010. Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 148(4): 240-247.
- Madureira AR, Tavares T, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science* 93(2): 437-455.
- Madzak C. 2015. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(11): 4559-4577.
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. 2004. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology* 109(1-2): 63-81.
- Markham KA y Alper HS. 2018. Synthetic Biology Expands the Industrial Potential of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology* 36(10): 1085-1095.
- Medina-Godoy S, Nielsen NC, Paredes-Lopez O. 2004. Expression and characterization of a His-tagged 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 20(6): 1749-1756.
- Miller KK y Alper HS. 2019. *Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(23-24): 9251-9262.
- Muhammad A, Feng X, Rasool A, Sun W, Li C. 2020. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Advances* 43: 107555.
- Nakahara T, Sano A, Yamaguchi H, Sugimoto K, Chikata H, Kinoshita E, Uchida R. 2010. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-Like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(2): 821-827.
- Nicaud JM. 2012. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29(10): 409-418.
- Nielsen NC, Jung R, Nam YW, Beaman TW, Oliveira LO, Bassüner R. 1995. Synthesis and assembly of 11S globulins. *Journal of Plant Physiology* 145(5-6): 641-647.
- Patsios SI, Dedousi A, Sossidou EN, Zdragas A. 2020. Sustainable animal feed protein through the cultivation of *Yarrowia lipolytica* on agro-industrial wastes and by-products. *Sustainability* 12(4): 1398.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Recombinant Gene Expression* 31(3): 245-260.
- Ravin NV, Eldarov MA, Kadnikov VV, Beletsky AV, Schneider J, Mardanov ES, Smekalova EM, Zvereva MI, Dontsova OA, Mardanov AV, Skryabin KG. 2013. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* 14(1): 837.
- Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, Wheeldon I. 2016. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synthetic Biology* 5(4): 356-359.
- Sekova VY, Dergacheva DI, Isakova EP, Gessler NN, Tereshina VM, Deryabina YI. 2019. Soluble sugar and lipid readjustments in the *Yarrowia lipolytica* yeast at various temperatures and pH. *Metabolites* 9(12): 307.
- Shen MWY, Fang F, Sandmeyer S, Da Silva NA. 2012. Development and characterization of a vector set with regulated promoters for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 29(12): 495-503.
- Song Y, Choi MH, Park JN, Kim MW, Kim EJ, Kang HA, Kim JY. 2007. Engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of glycoproteins lacking the outer-chain mannose residues of N-glycans. *Applied and Environmental Microbiology* 73(14): 4446-4454.
- Swietalski P, Hetzel F, Seitz I, Fischer L. 2020. Secretion of a low and high molecular weight β -glycosidase by *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories* 19(1): 100.
- Timoumi A, Guillouet SE, Molina-Jouve C, Fillaudeau L, Gorret N. 2018. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(9): 3831-3848.
- Valdez-Ortiz A, Rascón-Cruz Q, Medina-Godoy S., Sinagawa-García SR, Valverde-González ME, Paredes-López O. 2005. One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology* 115(4): 413-423.
- Vandermies M y Fickers P. 2019. Bioreactor-scale strategies for the production of recombinant protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms* 7(2): 40.
- Wagner JM y Alper HS. 2016. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology* 89: 126-136.
- Wagner JM, Liu L, Yuan SF, Venkataraman MV, Abate AR, Alper HS. 2018. A comparative analysis of single cell and droplet-based FACS for improving production phenotypes: Riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering* 47: 346-356.
- Waterlander WE, Mhurchu CN, Eyles H, Vandevijvere S, Cleghorn C, Scarborough P, Swinburn B, Seidell J. 2018. Food Futures: Developing effective food systems interventions to improve public health nutrition. *Agricultural Systems* 160: 124-131.
- Wu M, Shen Q, Yang Y, Zhang S, Qu W, Chen J, Sun H, Chen S. 2013. Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in *Pichia pastoris* GS115. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40(6): 589-599.

-
- Xie D. 2017. Integrating cellular and bioprocess engineering in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* for biodiesel production: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 5: 65.
- Xue Z, Sharpe PL, Hong SP, Yadav NS, Xie D, Short DR, Damude HG, Rupert RA, Seip JE, Wang J, Pollak DW, Bostick MW, Bosak MD, Macool DJ, Hollerbach DH, Zhang H, Arcilla DM, Bledsoe SA, Croker K, McCord EF, Tyreus BD, Jackson EN, Zhu Q. 2013. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nature Biotechnology* 31(8): 734-740.
- Yan J, Han B, Gui X, Wang G, Xu L, Yan Y, Madzak C, Pan D, Wang Y, Zha G, Jiao L. 2018. Engineering *Yarrowia lipolytica* to simultaneously produce lipase and single cell protein from agro-industrial wastes for feed. *Scientific Reports* 8(1): 758.
- Zhao MX, Chi Z, Chi ZM, Madzak C. 2013. The simultaneous production of single-cell protein and a recombinant antibacterial peptide by expression of an antibacterial peptide gene in *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 48(2): 212-217.
- Zinjarde SS. 2014. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry* 152: 1-10.



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Genes involucrados en el desarrollo foliar de *Jatropha curcas*

Adriana Sánchez-Gutiérrez, Eber Rojas-Salmerón, Miguel Salvador-Figueroa*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

Jatropha curcas L. es una planta de la familia *Euphorbiaceae* cuyas semillas poseen alto contenido de aceite, el cual representa una fuente de energía alternativa. Además, es de rápido crecimiento y se adapta a diversas condiciones ambientales. Dado que la hoja es el órgano responsable de funciones vitales que determinarán la vida y productividad de la planta, comprender los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo foliar, permitirá el desarrollo de métodos adecuados para optimizar su producción y mejorar su resistencia en diferentes condiciones ambientales. A continuación, se abordarán aspectos moleculares involucrados en el desarrollo de las hojas de *J. curcas*. La formación de los primordios foliares inicia en los laterales del meristemo apical del brote (por sus siglas en inglés, SAM), posteriormente se establecen los ejes abaxial-adaxial, proximal-distal, medio-lateral, y finalmente el crecimiento intercalar. Esta revisión está enfocada en los procesos iniciales de la formación de las hojas. Entre los genes involucrados en dichos procesos descritos para *J. curcas* se encuentran, WUS, CLV1, CLV3, ARF y KNOXI (STM, KNAT1/2/6), KNOXI (STM, KNAT1/2/6), AS1/2, CUC, BOP, LOB, PIN1, miR164 y GA20OX, YAB (YAB1/2/3/5, CRC), HDZIPIII (PHB, REV, ATHB8, ATHB15), ZPR, SDN, miR166, AGO1/7/10 y SDN3/5, los cuales son abordados en distinto grado.

Palabras clave:

Abaxial-adaxial
Iniciación de la hoja
Meristemo apical del brote (SAM)
Proximal-distal
Regulación molecular

Keywords:

Abaxial-adaxial
Leaf initiation
Shoot Apical Meristem (SAM)
Proximal-distal
Molecular regulation

Genes involved in leaf development of *Jatropha curcas*

Abstract

Jatropha curcas L. is a plant from the *Euphorbiaceae* family whose seeds have a high oil content, which represents an alternative energy source. In addition, it is fast growing and adapts to various environmental conditions. Because the leaf is the organ responsible for vital functions that will determine the life and productivity of the plant, understanding the molecular mechanisms involved in leaf development will allow the development of appropriate methods to optimize its production and improve its resistance in different environmental conditions. Next, molecular aspects involved in the development of *J. curcas* leaves are addressed. The formation of leaf primordia begins on the sides of the shoot apical meristem (SAM), subsequently the abaxial-adaxial, proximal-distal, medio-lateral axes and finally intercalary growth are established. This review focuses on the initial processes of leaf formation. Among the genes involved in these processes described for *J. curcas* are WUS, CLV1, CLV3, ARF and KNOXI (STM, KNAT1/2/6), KNOXI (STM, KNAT1/2/6), AS1/2, CUC, BOP, LOB, PIN1, miR164 and GA20OX, YAB (YAB1/2/3/5, CRC), HDZIPIII (PHB, REV, ATHB8, ATHB15), ZPR, SDN, miR166, AGO1/7/10 and SDN3/5, which are addressed at different level.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
miguel.salvador@unach.mx

1. Introducción

La hoja es el órgano responsable de la fotosíntesis, respiración, regulación de la temperatura, sobrevivencia y productividad de la planta, además, contribuyen al flujo de nutrientes y a su estado nutricional (Jiajia et al., 2020; Omidbakhshfard et al., 2018). Estudios realizados en diversas plantas demuestran que el área foliar, la forma de las hojas y la tasa de fotosíntesis son determinantes en la productividad. En este sentido, Jiajia et al. (2020) reportaron que una hoja con forma “ideal” puede mejorar significativamente la producción de arroz. Además, el área de las hojas puede ser un parámetro para predecir de manera parcial el crecimiento general de la planta (Weraduwage et al., 2015). Koester et al. (2014) reportan que mejorando la captura de luz a través de la hoja se puede influir de manera positiva en el rendimiento de los cultivos. Por otro lado, en álamos, se reportó que los clones de mejor desempeño (Raspalje y Beaupré) fueron aquellos con hojas más grandes, alto índice de área foliar y altas tasas de fotosíntesis (Barigah et al., 1994). Por lo tanto, comprender el origen y formación de las hojas permite la posibilidad de mejorar los cultivos, optimizar la productividad de la planta y aumentar la resistencia a las condiciones ambientales.

Las plantas expresan hojas de diferentes formas y tamaños (Hajheidari et al., 2019; Zhang et al., 2020), a pesar de ello muestran patrones comunes en las redes de genes involucradas en cada etapa del desarrollo. Este proceso de desarrollo se ajusta según la especie, la etapa y las circunstancias ambientales (Li et al., 2020; Vasco y Ambrose, 2020). El desarrollo de la hoja en plantas dicotiledóneas es un proceso que involucra interacciones complejas, una multitud de vías reguladoras genéticas, hormonales, nutricionales y físicas como la luz y la temperatura (Brunkard et al., 2020; Muszynski et al., 2020; Schenkels et al., 2020; Testone et al., 2019). La mayoría de la información disponible sobre los mecanismos moleculares involucrados en la formación de las hojas está centrada en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y es escasa en otras especies, más aún en especies leñosas como *Jatropha curcas*. *Jatropha curcas* es un árbol perenne de la familia Euphorbiaceae. Es nativa de Mesoamérica y actualmente cultivada en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Adriano-Anaya et al., 2016; Kumar et al., 2017; Ovando-Medina et al., 2011). Sus semillas representan una fuente de energía alternativa prometedora debido a su alto contenido de aceite, además la planta es de rápido crecimiento y se adapta a diversos ambientes (Ha et al., 2019). *J. curcas* aún está en proceso de domesticación y muchos aspectos de su biología de desarrollo y de los mecanismos moleculares implicados en ello no han sido del todo estudiados. Las características del desarrollo vegetativo son importantes para la productividad de las plantas y, se ha reportado alto nivel de variación genética en los rasgos vegetativos de accesiones de *J. curcas*; entre ellos el área foliar, peso de la hoja, tasa de fotosíntesis y altura de la planta, siendo las accesiones centroamericanas las que presentan niveles más altos de

variación genética (Montes Osorio et al., 2014; Saadaoui et al., 2015).

Como antes se mencionó, la información respecto al desarrollo foliar de *J. curcas* es escasa, y la información disponible sobre los genes involucrados en el desarrollo foliar de *A. thaliana* que ha sido descritos en *J. curcas*, está enfocada principalmente en el papel de estos en el florecimiento. La formación de los primordios foliares inicia en los laterales del meristemo apical del brote (por sus siglas en inglés, SAM), posteriormente se establecen los ejes abaxial-adaxial, proximal-distal, medio-lateral, y finalmente el crecimiento intercalar. Por ello el objetivo de esta revisión es discutir la regulación de los genes involucrados en la iniciación, y el establecimiento de los ejes abaxial-adaxial, y proximal-distal del desarrollo de las hojas con enfoque en *J. curcas*.

2. Meristemo Apical del Brote (SAM)

Los órganos y tejidos de las plantas, se producen a partir de células madre pluripotentes ubicadas en las puntas de crecimiento, es decir, en SAM y en el meristemo apical de la raíz (por sus siglas en inglés, RAM) (Li et al., 2017; Wein et al., 2020). El SAM, es la fuente de todos los órganos de la superficie, mientras que, del RAM, se forman los órganos subterráneos. SAM contiene células pluripotentes que se dividen mitóticamente, pequeñas y casi esféricas, con un citoplasma denso y relativamente pocas vacuolas pequeñas (Dolzblasz et al., 2018; Kosentka et al., 2019)

El SAM tiene forma anticlinal, y está estructurado en diferentes zonas (Figura 1), zona central (CZ), zona periférica (PZ), centro organizador (OC), zona de costillas (RZ) y capas celulares (L1-L3) (Mandel et al., 2016; Swid et al., 2018). En CZ la división celular es menos frecuente, y actúa como un conjunto de células indeterminadas e indiferenciadas. En PZ las células se dividen con mayor frecuencia y se incorporan a los primordios de las hojas. En RZ se forma el cuerpo del tallo. La capa más externa (L1), comprende células epidérmicas que se dividen solo anticlinalmente, además, sirve como conducto para el transporte de auxinas y para que los patrones filotáticos se formen (Mandel et al., 2016). Las células de las capas internas L2 y L3 se dividen tanto anticlinal como periclinalmente y dan lugar a los tejidos internos de las hojas y el tallo (Alvarez et al., 2016).

A nivel de regulación genética en SAM, se sabe que en *Arabidopsis*, los genes de la familia WUSCHEL (WUS) se expresan en el OC, regulando la generación de células madre en los meristemos del brote y las flores. La proteína WUS se mueve de manera simplástica a través de plasmodesmos hacia el dominio suprayacente (la CZ) para encausar el destino de las células madre (Gaillochet y Lohmann, 2015). WUS promueve la actividad de las células madre, sin embargo, CLAVATA3 (CLV3) la suprime. El mecanismo implica que WUS activa directa o indirectamente la transcripción del gen que codifica CLV3, este péptido corto que es reconocido en el medio extracelular por CLAVATA1

(CLV1)/CLAVATA2 (CLV2) envía señales al promotor de WUS para reprimir su transcripción. A su vez, CLV3, Homeodominio-Leucina Zipper Clase III (HDZIP III) y ERECTA (ER) regulan el tamaño, la organización y la morfología del meristemo. CLV3 restringe la expansión del meristemo a lo largo del eje apical-basal, mientras que las vías de HDZIPIII y ER restringen la expansión lateral del meristemo (Mandel et al., 2016). Se ha reportado que las fitohormonas auxinas y citoquininas juegan un papel determinante en la proliferación y diferenciación celular (Skoog y Miller, 1957; Zhao et al., 2010). El dominio de señalización de citoquinina abarca el OC y las capas de células vecinas, donde la citoquinina promueve la expresión de WUS (Snipes et al., 2018).

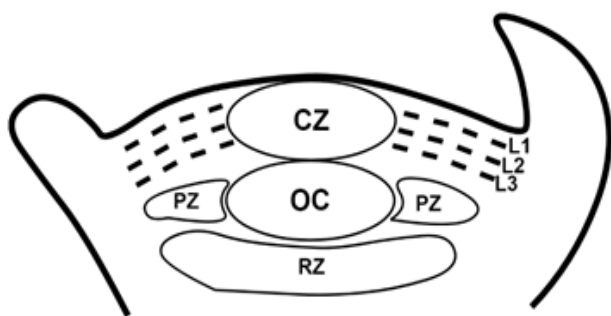


Figura 1. Estructura del meristemo apical del brote (SAM).

KNOXI (KNOTTED-LIKE HOMEODOMAIN Class I) es una familia de genes reportada en *A. thaliana* que incluye: SHOOTMERISTEMLESS (STM), BREVIPEDICELLUS (BP, también conocido como KNAT1), KNOTTED1-like *Arabidopsis thaliana* 2 (KNAT2) y KNAT6 (Hay y Tsiantis, 2010). Las células madre se mantienen en un estado indiferenciado en todo el SAM por la actividad de KNOXI STM. Además, la señal CLV3 también se transmite a través de la actividad cooperativa del complejo proteico del receptor CLV2 / CORYNE (CRN) y a través de la RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2), que en conjunto delimitan tres vías paralelas que median la comunicación de CZ a OC (Gaillochet y Lohmann, 2015). Se sabe que KNOXI STM regula la producción de citoquininas activando la expresión de ISOPENTENYL-TRANSFERASE (IPT7). A su vez, WUS facilita la señalización de citoquininas reprimiendo directamente la expresión de Type-A ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR), ARR7 y ARR15 (Adibi et al., 2016; Gaillochet et al., 2015), mientras que ARR7 actúa como un regulador negativo de la señalización de citoquininas (Lee et al., 2008).

La sinergia de la auxina con la citoquinina promueve la actividad de las células madre en el centro del meristemo para equilibrar la formación de órganos con la actividad pluripotente. Las señales de auxina a través del factor de transcripción (FT) de AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) y MONOPTEROS (MP) reprimen directamente la expresión

de ARR7 y ARR15, mejorando así la salida de señalización de citoquininas y por lo tanto la expresión de WUS (Gaillochet y Lohmann, 2015) (Figura 2).

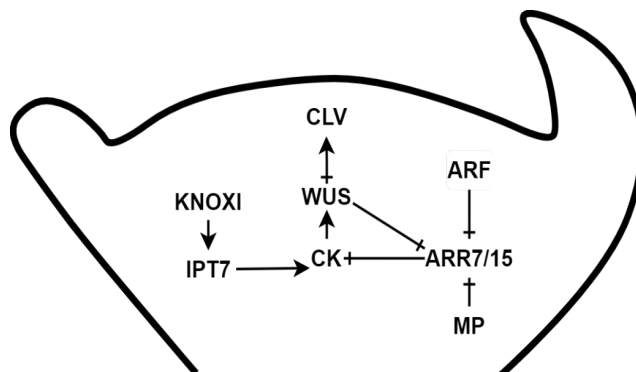


Figura 1. Redes en SAM. Regulación positiva (→). Regulación negativa (⊖).

3. Iniciación de la formación de la hoja

Las células que se convertirán en hojas se aglomeran en PZ. Posteriormente se originan los primordios foliares (P1, P2, P3, según vayan originándose). Después comienza el crecimiento y se establecen los ejes Abaxial-Adaxial y Proximal-Distal. Luego inicia el crecimiento de la lámina de la hoja en los ejes medio-lateral. Finalmente ocurre el crecimiento intercalar múltiples direcciones por toda la hoja. Estos son los pasos del desarrollo de la hoja en dicotiledóneas y puede variar dependiendo de la especie (Du et al., 2018; Li et al., 2017; Merelo et al., 2017; Swid et al., 2018)

Los máximos de auxina ("Aux", en la Figura 3) determinan los sitios de iniciación del primordio en los laterales del SAM. Además, la capa L1 permite el transporte de auxinas y que los patrones de filotaxis se formen en la superficie del SAM (Mandel et al., 2016). PAT (Polar Auxin Transport) establece los máximos de auxina mediante las proteínas transmembranales PINFORMED1 (PIN1), las cuales tienen un papel crucial en el transporte polar de auxinas (Adamowski y Friml, 2015), solo las células PZ que se superponen con los máximos periódicos de auxina están designadas para convertirse en hojas.

El aumento en la concentración de auxina reprime los genes KNOXI, lo cual induce el crecimiento de los promordios (Du et al., 2018; Fritz et al., 2018). El mantenimiento del estado reprimido de los genes KNOXI en el primordio de la hoja depende de los factores de transcripción del dominio ARP MYB, que reciben el nombre de ASYMMETRIC LEAF1 (AS1) en *Arabidopsis*, ROUGH SHEATH2 (RS2) en maíz y PHANTASTICA (PHAN) en *Antirrhinum* (Byrne et al., 2000; Timmermans et al., 1999; Tsiantis et al., 1999).

Otras fitohormonas están relacionadas con el desarrollo de las hojas. Las Citoquininas (CK) son hormonas vegetales con funciones en el desarrollo, la resistencia al estrés (Antoniadi et al., 2020), además de tener un importante papel durante la iniciación foliar y el mantenimiento de SAM (Gordon et al., 2009; Kurakawa et al., 2007; Werner et al., 2003). La

especificación de la iniciación foliar implica equilibrio y retroalimentación entre auxinas y citoquininas (Bar y Ori, 2014). El gen IPT7 (ISOPENTENYL-TRANSFERASE 7) está involucrado en la biosíntesis de citoquininas (Yanai et al., 2005). En *A. thaliana*, KNOXI regula positivamente a IPT7 dando como resultado la expresión de las CK. Esta vía es dependiente de KNOXI, aunque puede haber otras vías independientes de KNOXI.

Las giberelinas (GA) son fitohormonas que influyen en el crecimiento de la planta, y hay evidencias de su participación en el desarrollo de las hojas (Claeys et al., 2014). GIBBERELLIN 20-OXIDASE 1 (GA20ox1, también conocido como ATGA2OX1), gen de biosíntesis de GA, codifica GIBBERELLIN 20-OXIDASE (GA20ox), una enzima responsable de la biosíntesis de la GA (Nam et al., 2017). KNOXI inhibe directamente el gen de biosíntesis GA20ox1, para reducir los niveles de GA, y en otra vía, de manera indirecta, activa el gen catabólico GA2ox1 (GIBBERELLIN 2-OXIDASE 1) (Bolduc y Hake, 2009). La familia GA2ox en *A. thaliana*, contiene al menos cuatro genes: ATGA2OX1, ATGA2OX2, ATGA2OX3 y ATGA2OX4. ATGA2OX2 y ATGA2OX4 se expresan en la base de SAM y en los primordios foliares en desarrollo. KNOXI, regula negativamente la síntesis de GA, a través de la actividad de las CK. Como se describe previamente, el complejo KNOXI STM induce la biosíntesis de CK, las cuales son necesarias para activar la expresión de ATGA2OX2 (Jasinski et al., 2005).

Otros elementos involucrados en la regulación del desarrollo foliar son los micro-RNA (miRNA), pequeños RNA de aproximadamente 21nt que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional (Zeng et al., 2009). El gen miR164 codifica un microRNA, que entre otras funciones, se dirige a CUC2 para modular el dentado del margen de la hoja (Nikovics et al., 2006). La familia de genes CUC (CUP-SHAPED COTYLEDON) incluye a CUC1, CUC2 y CUC3. CUC2 también se expresa en el límite entre SAM y los primordios foliares. KNOXI mediante STM activa directamente la expresión de CUC1 (Hibara et al., 2003; Ishida et al., 2000; Spinelli et al., 2011; Takada et al., 2001). Tanto CUC1 y CUC2, son regulados negativamente por miR164. Se sugiere la posibilidad de que KNOXI y CUC se retroalimenten entre sí (Du et al., 2018)

El gen LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) codifica el FT LOB que establece el límite entre SAM y los órganos laterales iniciadores. LOB es regulado positivamente por el complejo AS1/2 (ASYMMETRIC LEAVES 1/2) (Bell et al., 2012; Shuai et al., 2002). Del mismo modo, BOP1/2 (BLADE ON PETIOLE 1/2) regula positivamente a LOB al inducir su transcripción (Ha et al., 2007). BOP1, un gen que codifica una proteína de dominio BTB (Broad-Complex/Tramtrack/Bric-a-brac) /POZ (Pox virus/Zinc finger) con repeticiones de Anquirina, se expresa en el primordio de la hoja joven. Además, transcripciones de BOP1 se han localizado en la base de los cotiledones en desarrollo cerca del SAM (Ha et al., 2004). BOP2

interacciona y parece ser genéticamente redundante con BOP1, en conjunto regulan la morfogénesis de la hoja, la flor y el fruto (Hepworth y Pautot, 2015; Khan et al., 2014). KNOXI está involucrado con BOP y AS1/2 en un circuito de retroalimentación negativa. KNOXI STM, es regulado negativamente por BOP1/2 (Ha et al., 2003), y su vez, este reprime la expresión de BOP1/2 para establecer un meristemo apical de brote embrionario funcional (Jun et al., 2010). Por otro lado, BOP1/2 induce la transcripción de AS2 (Jun et al., 2010), lo que permite la formación del complejo AS1/AS2 el cual reprime la expresión de KNOXI (KNAT1 y KNAT2) (Guo et al., 2008; Machida et al., 2015). Finalmente, KNOXI STM regula también negativamente a AS1 (Byrne et al., 2000, 2002; Scofield et al., 2013).

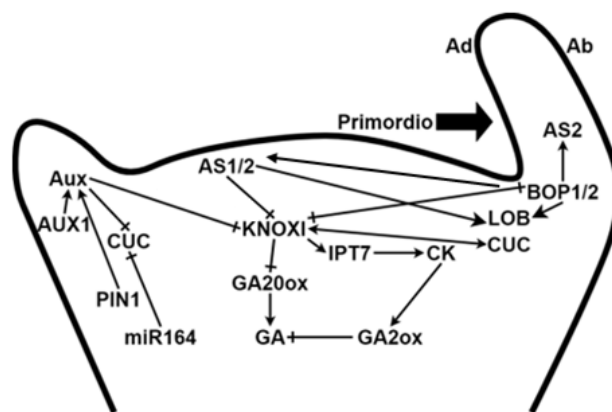


Figura 2. Regulación de la iniciación de la formación de la hoja. Regulación positiva (→). Regulación negativa (⊣).

4. Establecimiento de los ejes Adaxial-Abaxial

El establecimiento de los ejes Adaxial-Abaxial inicia con la separación de los primordios del SAM. La región más cercana a SAM se denomina adaxial y se convertirá en la parte superior de la hoja y la más alejada se denomina abaxial y se convertirá en la parte inferior de la hoja. Las interacciones entre los genes que regulan los patrones Adaxial-Abaxial están descritas de la siguiente manera: el FT HDZIPIII promueven el destino de las células adaxiales, y los FTs KANADI (KAN) y YABBY (YAB) promueven el destino de las células abaxiales (Fritz et al., 2018; Satterlee y Scanlon, 2019; Yang et al., 2019).

HDZIPIII contiene 5 genes en *Arabidopsis*: PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), REVOLUTA (REV), ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 8 (ATHB8) y ATHB15 (también conocido como CORONA <CNA>). PHB, PHV y REV pertenecen a un grupo que se expresa en el dominio adaxial de los primordios foliares en desarrollo, en la zona central de la SAM y en el polo xilema de la vasculatura, mientras que ATHB8 y ATHB15 se expresan exclusivamente en tejidos vasculares (Yamaguchi et al., 2012). Los miR165/166 interacciona con ARGONAUTE 10 (AGO10) y como resultado regulan de manera negativa la transcripción de HDZIPIII (PHV, PHB y REV) (Emery et al.,

2003; Tatematsu et al., 2015; Zhou et al., 2015). Los miR165/166 se expresan en el dominio abaxial de la hoja, mientras que los genes de ARGONAUTE 1 (AGO1), AGO7 y AGO10 se expresan en el lado adaxial de la hoja. Tanto AGO1 y AGO10 tiene afinidad de unión a miR165/166, sin embargo, AGO10 tiene mayor afinidad. AGO7 actúa de manera sinérgica con AS2 para promover el destino de las células adaxiales. El equilibrio de miR165/166 se mantiene por medio de la actividad degradadora de SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE 1 (SDN1) y SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE 2 (SDN2). Por otro lado, HDZIPIII también es reprimido por las proteínas LITTLE ZIPPER (ZPR), las cuales se localizan en la zona adaxial de los primordios foliares (Fritz et al., 2018; Satterlee y Scanlon, 2019; Yang et al., 2019).

La identidad de la zona abaxial es establecida por los genes KAN y YAB. YAB es una familia de genes que incluye al menos seis miembros: YAB1 (<AT2G45190> también conocida como ABNORMAL FLORAL ORGANS <AFO>, o FILAMENTOUS FLOWER <FIL>), YAB2, YAB3, YAB5, INO (INNER NO OUTER) y CRC (CRABS CLAW) (Bowman, 2000; Siegfried et al., 1999). Los genes YAB tienen un papel importante en el inicio y desarrollo de las hojas y los órganos derivados de las hojas en diversas angiospermas. Suprimen la expresión de genes específicos de meristemas en los primordios de las hojas, regulan el establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial de las hojas, el inicio del meristemo marginal y la diferenciación del floema en las venas de las hojas, por ejemplo, YAB1/2/3/5 marca el dominio abaxial de la hoja en desarrollo (Romanova et al., 2021). Además, YAB1 regula positivamente a KAN1, ARF4 y AS1 (Bonaccorso et al., 2012). YAB1/3 es regulado negativamente por BOP1/2 (C. M. Ha et al., 2010). También se observa regulación positiva por parte de KAN al activar a YAB (Chitwood et al., 2007; Yamaguchi et al., 2012; Yang et al., 2018).

KAN es miembro de la familia GARP de factores de transcripción, y es clave para la formación del meristemo, la identidad abaxial y el crecimiento de las hojas en *A. thaliana* (Huang et al., 2014). KAN tiene cuatro parálogos (KAN1-4) en *A. thaliana*, aunque KAN1 y KAN2 intervienen específicamente para determinar la polaridad abaxial de la hoja, los cuatro están involucrados en la determinación adecuada de la polaridad de los órganos (Zumajo-Cardona et al., 2019). KAN interacciona con HDZIPIII y AS1/2 y en ambos casos la interacción es una retroalimentación negativa. KAN restringe la expresión de AS2 al dominio adaxial a través de una interacción represiva directa (Ram et al., 2020; Zumajo-Cardona et al., 2019). KAN restringe a los FT HDZIPIII (PHB, PHV y REV) (Emery et al., 2003). La interacción de KAN y AS1/2 interviene en la polaridad de la hoja.

AS1/2 reprime a KAN2, ARF3/4, YAB5 y a miR166a (Husbands et al., 2015; Iwakawa et al., 2007; Iwasaki et al., 2013). Además, AS1/2 activa indirectamente a miR390 para reprimir a ARF3/4 (Iwasaki et al., 2013). miR390 tiene como

objetivo TAS3 (trans-acting small interfering RNA3); la expresión de TAS3 resulta en la biogénesis de tasiRNA (trans-acting small interfering RNA), a su vez, tasiRNA regula negativamente a ARF3/4 para regular la identidad abaxial de la hoja (Allen et al., 2005; Husbands et al., 2015; Luong et al., 2018; Machida et al., 2015; Matsumura et al., 2016; Pekker et al., 2005).

La hormona vegetal auxina está involucrada en patrón de las hojas a lo largo del eje adaxial-abaxial. KAN1 es un represor transcripcional que regula la biosíntesis, transporte y señalización de la auxina. Los genes relacionados con auxinas están regulados por KAN1 y REV. REV activa los genes relacionados con la auxina inicialmente y KAN1 funciona de manera antagónica a REV en la regulación de un grupo común de objetivos (Huang et al., 2014; Merelo et al., 2017; Ram et al., 2020) (Figura 4.)

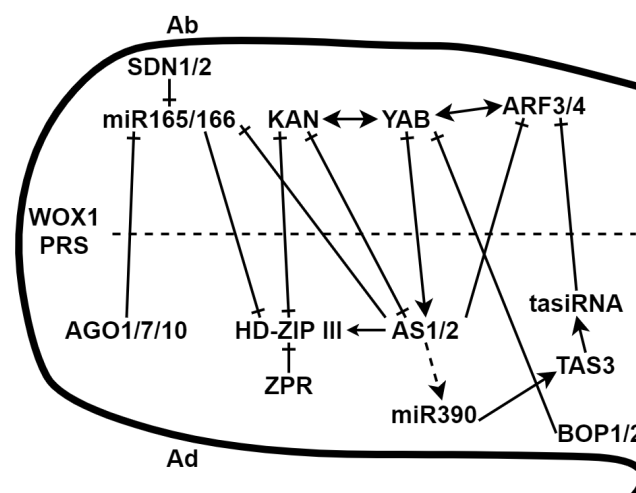


Figura 3. Establecimiento de los ejes adaxial-abaxial. Regulación positiva (→). Regulación negativa (⊖). Regulación positiva indirecta (--->)

5. Genes involucrados en el desarrollo foliar de *Jatropha curcas*

En este sentido, la información hasta ahora conocida de lo que sucede en *J. curcas* aun es escasa. Zhang et al. (2014), identificaron en *J. curcas*, la expresión génica de supuestos DEGs (Differentially expressed genes) en hojas, los cuáles podrían estar involucrados en el desarrollo foliar: ARF, Receptor protein kinase CLAVATA1 precursor, KNAT, YAB2, ARF IAA1, ARF4, Auxin-responsive protein IAA27, homeobox protein y homeobox transcription factor.

Por su parte, Wang et al. (2012) aislaron 52 miRNA (JcumiR001-JcumiR052) de hojas y semillas en *J. curcas*. Seis resultaron homólogos de miRNA ya conocidos, mientras que 46 fueron novedosos. De estos, 24 fueron detectados exclusivamente en hojas. Uno de los objetivos identificados de JcumiR004, es el gen homólogo ARF7. Además, se encontró que JcumiR004 puede afectar la composición del aceite de la hoja de *J. curcas* (Wang et al., 2012). Dado que el principal interés en esta planta es la

calidad y cantidad de aceite que produce y que pudiera utilizarse en la generación de biocombustibles, resulta interesante investigar qué genes regulados por JcumiR004 podrían estar involucrados tanto en el desarrollo foliar como en la composición del aceite.

Sun et al. (2017), reportaron que JcARF19 está presente en *J. curcas* y es un modulador positivo en sentido ascendente en la señalización de auxinas y además puede controlar el tamaño de los órganos de la planta. Plantas tratadas con agrobacterias que contenían vectores VIGS de JcARF19 expresaron hojas nuevas más pequeñas y distintas que las plantas control. También determinaron que JcARF19 era esencial para el proceso adecuado de transducción de señales mediado por auxinas en las células foliares de *Jatropha*. Es importante destacar que la sobreexpresión transgénica de JcARF19 aumentó significativamente el tamaño de la semilla y el rendimiento de la semilla en plantas de *A. thaliana* y *J. curcas* (Sun et al., 2017).

Zeng et al. (2009), reportaron 23 familias de miRNA que están involucradas en el desarrollo de 4 especies de *Euphorbiaceae* (*Ricinus communis*, *Jatropha curcas*, *Manihot esculenta* y *Hevea brasiliensis*). Los miRNA relacionados con la señalización de auxinas (familias miR160, miR164 y miR167) intervienen en la morfología floral y foliar, así como en la formación de raíces y brotes. miR164 tiene funciones en la formación de límites de órganos/iniciación del meristemo apical del brote (SAM). miR165/166 regula la polaridad de los órganos. miR172 y miR159 juegan un papel en la identidad del órgano floral y el desarrollo reproductivo y miR319 está relacionado con la formación de hojas arrugadas. Recientemente, Tang et al. (2020) identificaron 12 genes WOX en *J. curcas*. JcWOX3, JcWOX7 y JcWOX12 se expresaron altamente en semillas. En hojas, JcWOX6 se expresó levemente, JcWOX5 y JcWOX12 se expresaron moderadamente y JcWOX8 fuertemente, los cuales pudieran estar relacionado con la morfogénesis de las hojas.

Por otro lado, se identificó el homólogo de PIN1 (AT1G73590) en *J. curcas*, el cual en *Arabidopsis* está involucrado en la regulación de la iniciación del desarrollo foliar, mediante la inducción de la biogénesis y señalización de las auxinas (Chen et al., 2017). Otros genes homólogos que en *Arabidopsis* participan en distintos momentos del desarrollo foliar, han sido identificados en *J. curcas*, cuyas funciones estudiadas están principalmente asociadas al desarrollo floral. JcKNAT6, controla el desarrollo floral y está involucrado en la diferenciación sexual de flores de *J. curcas* (Chen et al., 2017). Los homólogos JcWOX3, JcYAB1, JcYAB3, JcARF3, JcARF4, JcAS1, JcAS2, JcCUC2, JcCUC3, JcMP, JcPIN1, JcREV, JcWUS, JcSTM están implicados en el desarrollo de las inflorescencias. Mientras que los genes JcGA2OX2, JcGA2OX4, JcGA2OX5 están involucrados en la vía de señalización y metabolismo de GA (Chen et al., 2017), JcAux/IAA1 y JcARF, genes de respuesta primarios/tempranos a las auxinas consisten, están involucrada en el desarrollo del saco

embrionario. JcARF6 junto con JcARF8 regulan la elongación del tallo de la inflorescencia, elongación del filamento del estambre, dehiscencia de las anteras, elongación de las papilas estigmáticas, la maduración del gineceo y la apertura de las yemas florales (Xu et al., 2016). Además, genes homólogos de CLV1 en *J. curcas*: el Unigene4053_S7 está implicado en la diferenciación del estambre, mientras que el Unigene19315_S7, está involucrado en el desarrollo del saco embrionario (Xu et al., 2016).

6. Conclusión

La comprensión de las redes involucradas en el desarrollo de la hoja de *Jatropha curcas* ha tenido pocos avances. En esta revisión se tomaron como base los conocimientos que se tienen a la fecha del desarrollo de la hoja en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y mostramos los genes que se han identificado en *Jatropha curcas* y que pudieran estar relacionados con el desarrollo foliar. Dado que el principal interés en esta planta es el aceite que produce y su potencial para utilizarse en la generación de biocombustibles, genes como JcumiR004, JcumiR164, JcWOX12, JcWOX8, las familias ARF y CUC, y los relacionados con la síntesis de fitohormonas como citoquinas y giberelinas, podrían tomarse en cuenta en futuros estudios debido a su probable relación tanto con el desarrollo de las hojas como con la síntesis de aceite y el desarrollo de las flores, procesos que impactan en la tanto en la cantidad y calidad de semillas que la planta produce.

Debido a que el conocimiento sobre cómo estos genes están involucrados en las redes reguladoras del desarrollo de la hoja aún es limitado para *J. curcas*, creemos que lo expuesto en este documento, puede ayudar a la planificación de futuras investigaciones.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

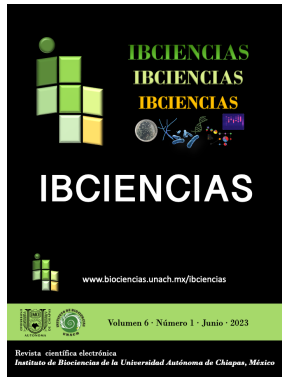
- Adamowski M, Friml J. 2015. PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. *Plant Cell* 27(1): 20–32.
- Adibi M, Yoshida S, Weijers D, Fleck C. 2016. Centering the organizing center in the *Arabidopsis thaliana* shoot apical meristem by a combination of cytokinin signaling and self-organization. *Plos One* 11(2): e0147830.
- Adriano-Anaya ML, Pérez-Castillo E, Salvador-Figueroa M, Ruiz-González S, Vázquez-Ovando A, Grajales-Conesa J, Ovando-Medina I. 2016. Sex expression and floral diversity in *Jatropha curcas*: A population study in its center of origin. *PeerJ* 4: e2071.
- Ali S, Khan N, Xie L. 2020. Molecular and hormonal regulation of leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences* 21(14): 5132.
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC. 2005. microRNA-

- directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121(2): 207-221.
- Alvarez JP, Furumizu C, Efroni I, Eshed Y, Bowman JL. 2016. Active suppression of a leaf meristem orchestrates determinate leaf growth. *ELife* 5: e15023.
- Antoniadi I, Novák O, Gelová Z, Johnson A, Plíhal O, Simerský R, Mík V, Vain T, Mateo-Bonmatí E, Karady M, Pernisová M, Plačková L, Opassathian K, Hejátko J, Robert S, Friml J, Doležal K, Ljung K, Turnbull C. 2020. Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nature Communications* 11(1): 4284.
- Barigah TS, Saugier B, Mousseau M, Guittet J, Ceulemans R. 1994. Photosynthesis, leaf area and productivity of 5 poplar clones during their establishment year. *Annales Des Sciences Forestieres* 51(6): 613-625.
- Bell EM, Lin W, Husbands AY, Yu L, Jaganatha V, Jablonska B, Mangeon A, Neff MM, Girke T, Springer PS. 2012. Arabidopsis lateral organ boundaries negatively regulates brassinosteroid accumulation to limit growth in organ boundaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(51): 21146-21151.
- Bolduc N, Hake S. 2009. The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. *The Plant Cell* 21(6): 1647-1658.
- Bonaccorso O, Lee JE, Puaah L, Scutt CP, Golz JF. 2012. FILAMENTOUS FLOWER controls lateral organ development by acting as both an activator and a repressor. *BMC Plant Biology* 12: 176.
- Bowman JL. 2000. The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Current Opinion in Plant Biology* 3(1): 17-22.
- Brunkard JO, Xu M, Regina-Scarpin M, Chatterjee S, Shemyakina EA, Goodman HM, Zambryski P. 2020. TOR dynamically regulates plant cell-cell transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(9): 5049-5058.
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA. 2000. Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* 408(6815): 967-971.
- Byrne ME, Simorowski J, Martienssen RA. 2002. ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development* 129(8): 1957-1965.
- Chen MS, Pan BZ, Fu Q, Tao YB, Martínez-Herrera J, Niu L, Ni J, Dong Y, Zhao ML, Xu ZF. 2017. Comparative transcriptome analysis between gynoeious and monoecious plants identifies regulatory networks controlling sex determination in *Jatropha curcas*. *Frontiers in Plant Science* 7: 1953
- Chen MS, Zhao ML, Wang GJ, He HY, Bai X, Pan BZ, Fu QT, Tao YB, Tang MY, Martínez-Herrera J, Xu ZF. 2019. Transcriptome analysis of two inflorescence branching mutants reveals cytokinin is an important regulator in controlling inflorescence architecture in the woody plant *Jatropha curcas*. *BMC Plant Biology* 19(1): 468.
- Chitwood DH, Guo M, Nogueira FTS, Timmermans MCP. 2007. Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex. *Development* 134(5): 813-823.
- Claeys H, De Bodt S, Inzé D. 2014. Gibberellins and DELLAs: Central nodes in growth regulatory networks. *Trends in Plant Science* 19(4): 231-239.
- Dolzbłasz A, Gola EM, Sokołowska K, Smakowska-Luzan E, Twardawska A, Janska H. 2018. Impairment of meristem proliferation in plants lacking the mitochondrial protease AtFTSH4. *International Journal of Molecular Sciences* 19(3): 853.
- Du F, Guan C, Jiao Y. 2018. Molecular mechanisms of leaf morphogenesis. *Molecular Plant* 11(9): 1117-1134.
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL. 2003. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Current Biology* 13(20): 1768-1774.
- Fritz MA, Rosa S, Sicard A. 2018. Mechanisms underlying the environmentally induced plasticity of leaf morphology. *Frontiers in Genetics* 9: 478.
- Gaillochet C, Daum G, Lohmann JU. 2015. O Cell, Where Art Thou? The mechanisms of shoot meristem patterning. *Current Opinion in Plant Biology* 23: 91-97.
- Gaillochet C, Lohmann JU. 2015. The never-ending story: From pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* 142(13): 2237-2249.
- Guo M, Thomas J, Collins G, Timmermans MCP. 2008. Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis. *Plant Cell* 20(1): 48-58.
- Ha CM, Jun JH, Fletcher JC. 2010. Control of arabidopsis leaf morphogenesis through regulation of the YABBY and KNOX families of transcription factors. *Genetics* 186(1): 197-206.
- Ha CM, Jun JH, Nam HG, Fletcher JC. 2004. BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45(10): 1361-1370.
- Ha CM, Jun JH, Nam HG, Fletcher JC. 2007. BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 control Arabidopsis lateral organ fate through regulation of LOB domain and adaxial-abaxial polarity genes. *The Plant Cell* 19(6): 1809-1825.
- Ha CM, Kim GT, Kim BC, Jun JH, Soh MS, Ueno Y, Machida Y, Tsukaya H, Nam HG. 2003. The BLADE-ON-PETIOLE 1 gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in Arabidopsis. *Development* 130(1): 161-172.
- Ha J, Shim S, Lee T, Kang YJ, Hwang WJ, Jeong H, Laosatit K, Lee J, Kim SK, Satyawana D, Lestari P, Yoon MY, Kim MY, Chitkineni A, Tanya P, Somta P, Srinives P, Varshney RK, Lee SH. 2019. Genome sequence of *Jatropha curcas* L., a non-edible biodiesel plant, provides a resource to improve seed-related traits. *Plant Biotechnology Journal* 17(2): 517-530.
- Hajheidari M, Wang Y, Bhatia N, Vuolo F, Franco-Zorrilla JM, Karady M, Mentink RA, Wu A, Oluwatobi BR, Müller B, Dello-Ioio R, Laurent S, Ljung K, Huijser P, Gan X, Tsiantis M. 2019. Autoregulation of RCO by low-affinity binding modulates cytokinin action and shapes leaf diversity. *Current Biology* 29(24): 4183-4192.
- Hay A, Tsiantis M. 2010. KNOX genes: Versatile regulators of plant development and diversity. *Development* 137(19): 3153-3165.
- Hepworth SR, Pautot VA. 2015. Beyond the divide: Boundaries for patterning and stem cell regulation in plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 1052.
- Hibara K, Takada S, Tasaka M. 2003. CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious

- shoot formation. *The Plant Journal* 36(5): 687-696.
- Huang T, Harrar Y, Lin C, Reinhart B, Newell NR, Talavera-Rauh F, Hokin SA, Kathryn-Barton M, Kerstetter RA. 2014. Arabidopsis KANADII acts as a transcriptional repressor by interacting with a specific cis-element and regulates auxin biosynthesis, transport, and signaling in opposition to HD-ZIPIII factors. *Plant Cell* 26(1): 246-262.
- Husbands AY, Benkovic AH, Nogueira FTS, Lodha M, Timmermans MCP. 2015. The ASYMMETRIC LEAVES complex employs multiple modes of regulation to affect adaxial-abaxial patterning and leaf complexity. *Plant Cell* 27(12): 3321-3335.
- Ishida T, Aida M, Takada S, Tasaka M. 2000. Involvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 41(1): 60-67.
- Iwakawa H, Iwasaki M, Kojima S, Ueno Y, Soma T, Tanaka H, Semiarti E, Machida Y, Machida C. 2007. Expression of the ASYMMETRIC LEAVES2 gene in the adaxial domain of Arabidopsis leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *The Plant Journal* 51(2): 173-184.
- Iwasaki M, Takahashi H, Iwakawa H, Nakagawa A, Ishikawa T, Tanaka H, Matsumura Y, Pekker I, Eshed Y, Vial-Pradel S, Ito T, Watanabe Y, Ueno Y, Fukazawa H, Kojima S, Machida Y, Machida C. 2013. Dual regulation of ETTIN (ARF3) gene expression by AS1-AS2, which maintains the DNA methylation level, is involved in stabilization of leaf adaxial-abaxial partitioning in Arabidopsis. *Development* 140(9): 1958-1969.
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M. 2005. KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology* 15(17): 1560-1565.
- Jiajia W, Jing X, Qian Q, Guangheng Z. 2020a. Development of rice leaves: How histocytes modulate leaf polarity establishment. *Rice Science* 27(6): 468-479.
- Jun JH, Ha CM, Fletchera JC. 2010. BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in Arabidopsis by directly activating ASYMMETRIC LEAVES2. *Plant Cell* 22(1): 62-76.
- Kawade K, Tanimoto H, Horiguchi G, Tsukaya H. 2017. Spatially different tissue-scale diffusivity shapes ANGUSTIFOLIA3 gradient in growing leaves. *Biophysical Journal* 113(5): 1109-1120.
- Khan M, Xu H, Hepworth SR. 2014. BLADE-ON-PETIOLE genes: Setting boundaries in development and defense. *Plant Science* 215-216: 157-171.
- Koester RP, Skoneczka JA, Cary TR, Diers BW, Ainsworth EA. 2014. Historical gains in soybean (*Glycine max* Merr.) seed yield are driven by linear increases in light interception, energy conversion, and partitioning efficiencies. *Journal of Experimental Botany* 65(12): 3311-3321.
- Kosentka PZ, Overholt A, Maradiaga R, Mitoubi O, Shpak ED. 2019. EPFL signals in the boundary region of the SAM restrict its size and promote leaf initiation. *Plant Physiology* 179(1): 265-279.
- Kumar S, Sreeharsha RV, Mudalkar S, Sarashetti PM, Reddy AR. 2017. Molecular insights into photosynthesis and carbohydrate metabolism in *Jatropha curcas* grown under elevated CO₂ using transcriptome sequencing and assembly. *Scientific Reports* 7(1): 11066.
- Lee DJ, Kim S, Ha YM, Kim J. 2008. Phosphorylation of Arabidopsis response regulator 7 (ARR7) at the putative phospho-accepting site is required for ARR7 to act as a negative regulator of cytokinin signaling. *Planta* 227(3): 577-587.
- Li Xiaojuan Cai W, Liu Y, Li H, Fu L, Liu Z, Xu L, Liu H, Xu T, Xiong Y. 2017. Differential TOR activation and cell proliferation in Arabidopsis root and shoot apices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(10): 2765-2770.
- Li Xiaoyu, Zheng Y, Xing Q, Ardiansyah R, Zhou H, Ali S, Jing T, Tian J, Song XS, Li Y, Müller-Xing R. 2020. Ectopic expression of the transcription factor CUC2 restricts growth by cell cycle inhibition in Arabidopsis leaves. *Plant Signaling and Behavior* 15(1): 1706024.
- Li Z, Li B, Shen WH, Huang H, Dong A. 2012. TCP transcription factors interact with AS2 in the repression of class-I KNOX genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 71(1): 99-107.
- Luong TQ, Keta S, Asai T, Kojima S, Nakagawa A, Micol JL, Xia S, Machida Y, Machida C. 2018. A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and DNA replication factors in establishment of adaxial-abaxial leaf polarity of Arabidopsis. *Plant Biotechnology*, 35(1): 39-49.
- Machida C, Nakagawa A, Kojima S, Takahashi H, Machida Y. 2015. The complex of ASYMMETRIC LEAVES (AS) proteins plays a central role in antagonistic interactions of genes for leaf polarity specification in Arabidopsis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4(6): 655-671.
- Mandel T, Candela H, Landau U, Asis L, Zelinger E, Carles CC, Williams LE. 2016. Differential regulation of meristem size, morphology and organization by the ERECTA, CLAVATA and class III HD-ZIP pathways. *Development* 143(9): 1612-1622.
- Matsumura Y, Ohbayashi I, Takahashi H, Kojima S, Ishibashi N, Keta S, Nakagawa A, Hayashi R, Sáez-Vázquez J, Echeverria M, Sugiyama M, Nakamura K, Machida C, Machida Y. 2016. A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of Arabidopsis. *Biology Open* 5(7): 942-954.
- Merelo P, Paredes EB, Heisler MG, Wenkel S. 2017. The shady side of leaf development: the role of the REVOLUTA/KANADII module in leaf patterning and auxin-mediated growth promotion. *Current Opinion in Plant Biology* 35: 111-116.
- Montes-Osorio LR, Torres-Salvador AF, Jongschaap REE, Azurdia-Perez CA, Berduo-Sandoval JE, Trindade LM, Visser RGF, van Loo EN. 2014. High level of molecular and phenotypic biodiversity in *Jatropha curcas* from Central America compared to Africa, Asia and South America. *BMC Plant Biology* 14(1): 77.
- Muszynski MG, Moss-Taylor L, Chudalayandi S, Cahill J, Del Valle-Echevarria AR, Alvarez-Castro I, Petefish A, Sakakibara H, Krivosheev DM, Lomin SN, Romanov GA, Thamocharan S, Dam T, Li B, Brugièrè N. 2020. The maize hairy sheath FRAYED1 (HSF1) mutation alters leaf patterning through increased cytokinin signaling. *Plant Cell* 32(5): 1501-1518.

- Nakata M, Matsumoto N, Tsugeki R, Rikirsch E, Laux T, Okada K. 2012. Roles of the middle domain-specific WUSCHEL-RELATED HOMEBOX genes in early development of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* 24(2): 519-535.
- Nam YJ, Herman D, Blomme J, Chae E, Kojima M, Coppens F, Storme V, Van Daele T, Dhondt S, Sakakibara H, Weigel D, Inzé D, Gonzalez N. 2017. Natural variation of molecular and morphological gibberellin responses. *Plant Physiology* 173(1): 703-714.
- Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P. 2006. The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(11): 2929-2945.
- Noor-Camellia NA, Thohirah LA, Abdullah NAP. 2012. Floral biology, flowering behaviour and fruit set development of *Jatropha curcas* L. in Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 35(4): 725-736.
- Omidbakhshfard MA, Fujikura U, Olas JJ, Xue GP, Balazadeh S, Mueller-Roeber B. 2018. GROWTH-REGULATING FACTOR 9 negatively regulates arabidopsis leaf growth by controlling ORG3 and restricting cell proliferation in leaf primordia. *PLoS Genetics* 14(7): e1007484.
- Ovando-Medina I, Espinosa-García FJ, Núñez-Farfán JS, Salvador-Figueroa M. 2011. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. *Scientific Research and Essays* 6(8): 1709-1719.
- Pekker I, Alvarez JP, Eshed Y. 2005. Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* 17(11): 2899-2910.
- Ram H, Sahadevan S, Gale N, Caggiano MP, Yu X, Ohno C, Heisler MG. 2020. An integrated analysis of cell-type specific gene expression reveals genes regulated by REVOLUTA and KANADI1 in the Arabidopsis shoot apical meristem. *PLoS Genetics* 16(4): e1008661.
- Romanova MA, Maksimova AI, Pawlowski K, Voitsekhovskaja OV. 2021. YABBY genes in the development and evolution of land plants. *International Journal of Molecular Sciences* 22(8): 4139.
- Saadaoui E, Martín JJ, Bouazizi R, Romdhane CB, Grira M, Abdelkabar S, Khouja ML, Cervantes E. 2015. Phenotypic variability and seed yield of *Jatropha curcas* L. introduced to tunisia. *Acta Botanica Mexicana* 110: 119-134.
- Sánchez-Gutiérrez A, Ovando-Medina I, Adriano-Anaya L, Vázquez-Ovando A, Salvador-Figueroa M. 2018. Dynamics of miR156 and miR172 involved in the flowering of *Jatropha curcas* L. *Acta Botanica Brasiliica* 32(1): 99-106.
- Satterlee JW, Scanlon MJ. 2019a. Coordination of leaf development across developmental axes. *Plants* 8(10): 433.
- Schenkels L, Saeyns W, Lauwers A, De Proft MP. 2020. Green light induces shade avoidance to alter plant morphology and increases biomass production in *Ocimum basilicum* L. *Scientia Horticulturae* 261: 109002.
- Scofield S, Dewitte W, Nieuwland J, Murray JAH. 2013. The Arabidopsis homeobox gene SHOOT MERISTEMLESS has cellular and meristem-organisational roles with differential requirements for cytokinin and CYCD3 activity. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 75(1): 53-66.
- Shuai B, Reynaga-Peña CG, Springer PS. 2002. The Lateral Organ Boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiology* 129(2): 747-761.
- Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, Bowman JL. 1999. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development* 126(18): 4117-4128.
- Skoog F, Miller CO. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118-130.
- Snipes SA, Rodriguez K, Devries AE, Miyawaki KN, Perales M, Xie M, Reddy GV. 2018. Cytokinin stabilizes WUSCHEL by acting on the protein domains required for nuclear enrichment and transcription. *Plos Genetics* 14(4): e1007351.
- Spinelli SV, Martin AP, Viola IL, Gonzalez DH, Palatnik JF. 2011. A mechanistic link between STM and CUC1 during Arabidopsis development. *Plant Physiology* 156(4): 1894-1904.
- Sun Y, Wang C, Wang N, Jiang X, Mao H, Zhu C, Wen F, Wang X, Lu Z, Yue G, Xu Z, Ye J. 2017. Manipulation of Auxin Response Factor 19 affects seed size in the woody perennial *Jatropha curcas*. *Scientific Reports* 7: 40844
- Swid N, Nevo R, Kiss V, Kapon R, Dagan S, Snir O, Adam Z, Falconet D, Reich Z, Charuvi D. 2018. Differential impacts of FtsZ proteins on plastid division in the shoot apex of Arabidopsis. *Developmental Biology* 441(1): 83-94.
- Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M. 2001. The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128(7): 1127-1135.
- Tang M, Bai X, Niu LJ, Chai X, Chen MS, Xu ZF. 2018. miR172 regulates both vegetative and reproductive development in the perennial woody plant *Jatropha curcas*. *Plant and Cell Physiology* 59(12): 2549-2563.
- Tang Y, Li H, Guan Y, Li S, Xun C, Dong Y, Huo R, Guo Y, Bao X, Pei E, Shen Q, Zhou H, Liao J. 2020. Genome-wide identification of the physic nut WUSCHEL-Related homeobox gene family and functional analysis of the abiotic stress responsive gene JcWOX5. *Frontiers in Genetics* 11: 670.
- Tatematsu K, Toyokura K, Miyashima S, Nakajima K, Okada K. 2015. A molecular mechanism that confines the activity pattern of miR165 in Arabidopsis leaf primordia. *The Plant Journal* 82(4): 596-608.
- Testone G, Baldoni E, Iannelli MA, Nicolodi C, Di Giacomo E, Pietrini F, Mele G, Giannino D, Frugis G. 2019. Transcription factor networks in leaves of cichorium endivia: New insights into the relationship between photosynthesis and leaf development. *Plants* 8(12): 531
- Timmermans MCP, Hudson A, Becraft PW, Nelson T. 1999. ROUGH SHEATH2: A Myb protein that represses KNOX homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* 284(5411): 151-153.
- Tsiantis M, Schneeberger R, Golz JF, Freeling M, Langdale JA. 1999. The maize rough sheath2 gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. *Science* 284(5411): 154-156.
- Vasco A, Ambrose BA. 2020. Simple and divided leaves in ferns: Exploring the genetic basis for leaf morphology differences in the genus *Elaphoglossum* (Dryopteridaceae). *International Journal of Molecular Sciences* 21(15): 5180.

- Vercruyssen L, Verkest A, Gonzalez N, Heyndrickx KS, Eeckhout D, Han SK, Jégu T, Archacki R, Van Leene J, Andriankaja M, De Bodt S, Abeel T, Coppens F, Dhondt S, De Milde L, Vermeersch M, Maleux K, Gevaert K, Jerzmanowski A, Benhamed M, Wagner D, Vandepoele K, De Jaeger G, Inzé D. 2014. ANGUSTIFOLIA3 binds to SWI/SNF chromatin remodeling complexes to regulate transcription during Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* 26(1): 210-229.
- Wang CM, Liu P, Sun F, Li L, Liu P, Ye J, Yue GH. 2012. Isolation and identification of miRNAs in *Jatropha curcas*. *International Journal of Biological Sciences* 8(3): 418-429.
- Wein A, Le Gac AL, Laux T. 2020. Stem cell ageing of the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Mechanisms of Ageing and Development* 190: 111313.
- Weraduwege SM, Chen J, Anozie FC, Morales A, Weise SE, Sharkey TD. 2015. The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 6: 167.
- Xu G, Huang J, Yang Y, Yao Y. 2016. Transcriptome analysis of flower sex differentiation in *Jatropha curcas* l. using rna sequencing. *Plos ONE* 11(2): e0145613.
- Yamaguchi T, Nukazuka A, Tsukaya H. 2012. Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: Evolution and development. *Plant and Cell Physiology* 53(7): 1180-1194.
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N. 2005. Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology*, 15(17): 1566-1571.
- Yang T, Wang Y, Teotia S, Wang Z, Shi C, Sun H, Gu Y, Zhang Z, Tang G. 2019. The interaction between miR160 and miR165/166 in the control of leaf development and drought tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports* 9(1): 2832.
- Yang T, Wang Y, Teotia S, Zhang Z, Tang G. 2018. The making of leaves: how small rna networks modulate leaf development. *Frontiers in Plant Science* 9: 824.
- Zeng C, Wang W, Zheng Y, Chen X, Bo W, Song S, Zhang W, Peng M. 2009. Conservation and divergence of microRNAs and their functions in Euphorbiaceae plants. *Nucleic Acids Research* 38(3): 981-995.
- Zhang L, Zhang C, Wu P, Chen Y, Li M, Jiang H, Wu G. 2014. Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to salt stress. *PLoS ONE* 9(5): e97878.
- Zhang Z, Runions A, Mentink RA, Kierzkowski D, Karady M, Hashemi B, Huijser P, Strauss S, Gan X, Ljung K, Tsiantis M. 2020. A WOX/Auxin biosynthesis module controls growth to shape leaf form. *Current Biology* 30(24): 4857-4868.e6.
- Zhao Z, Andersen SU, Ljung K, Dolezal K, Miotk A, Schultheiss SJ, Lohmann JU. 2010. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* 465(7301): 1089-1092.
- Zhou Y, Honda M, Zhu H, Zhang Z, Guo X, Li T, Li Z, Peng X, Nakajima K, Duan L, Zhang X. 2015. Spatiotemporal sequestration of miR165/166 by Arabidopsis argonaute10 promotes shoot apical meristem maintenance. *Cell Reports* 10(11): 1819-1827.
- Zumajo-Cardona C, Vasco A, Ambrose BA. 2019. The evolution of the KANADI gene family and leaf development in Lycophytes and Ferns. *Plants* 8(9): 313.



REVISIÓN BREVE

Fermentación de vainas de *Vanilla planifolia*

Mariana Montserrath Nájera-Hernández, Ana Gabriela Coutiño-Cortés*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es una orquídea nativa de las selvas tropicales del sureste de México y América Central. Es una planta perenne, terrestre, trepadora, de tallo flexible, simple o ramificado, de color verde brillante. México se ha ubicado como el quinto productor de vainilla a nivel internacional con 4.97 %, después de Indonesia (34.93 %), Madagascar (31.81%), China (11.63%) y Papua Nueva Guinea (6.97 %). A nivel nacional, Veracruz es el principal productor con 70%, le siguen Oaxaca y Puebla, que en conjunto aportan alrededor de 29% de la producción total. Desafortunadamente, no existen tratamientos homogéneos y estandarizados de fermentación y secado de *V. planifolia* que acentúen el sabor y aroma, y esto limita los ingresos de los productores. Por lo tanto, no es capaz de incursionar directamente en mercados como el de alimentos, bebidas, farmacia, cosméticos, artesanías, entre otros. Lo anterior plantea la necesidad de establecer un protocolo de fermentación (curado) de las vainas de *V. planifolia*, que permita unificar las etapas y el tiempo de fermentación, para que con ello se establezca un comercio justo al homogenizar las propiedades sensoriales del producto (extracto). Para aportar en ese sentido el primer paso es unificar los reportes que muestran esfuerzos de fermentación de las vainas de esta planta. El objetivo de esta revisión es recopilar información relacionada con el proceso y tiempo de fermentación de las vainas de *V. planifolia* para la obtención de saborizantes.

Palabras clave:

Aroma a vainilla
Curado
Extracto
Sabor
Vainillina

Keywords:

Vanilla aroma
Cured
Extract
Flavor
Vanillin

Fermentation of *Vanilla planifolia* pods

Abstract

Vanilla (*Vanilla planifolia*) is an orchid native to the rainforests of southeastern Mexico and Central America. It is a perennial, terrestrial, climbing plant with a flexible, simple, or branched stem, bright green. Mexico has been ranked as the fifth largest producer of vanilla internationally with 4.97%, after Indonesia (34.93%), Madagascar (31.81%), China (11.63%) and Papua New Guinea (6.97%). In the country, Veracruz is the main producer with 70%, followed by Oaxaca and Puebla, which together contribute around 29% of the total production. Unfortunately, there are no homogeneous and standardized fermentation and drying treatments for *V. planifolia* that accentuate the flavor and aroma, and this limits the income of producers. Therefore, it is not able to directly enter markets such as food, beverages, pharmacies, cosmetics, crafts, among others. The above raises the need to establish a fermentation (curing) protocol for *V. planifolia* pods, which allows unifying the stages and fermentation time, so that fair trade is established by homogenizing the sensory properties of the product (extract). To contribute with this, the first step is to unify the reports that show fermentation efforts of the pods of this plant. The objective of this review is to collect information related to the fermentation process and time of *V. planifolia* pods to obtain flavorings.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
ana.cortes@unach.mx

1. Introducción

Vainilla es una de las 155 especies del género *Vanilla* de la familia Orchidaceae (Flores-Jiménez et al., 2017). Dressler (2005), ha reportado que esta especie es originaria de México y Centroamérica. El género *Vanilla* es el único que cuenta con especies que produce frutos comestibles (Augstburger et al., 2000). La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews), es el segundo saborizante natural más importante en la industria alimentaria (Anilkumar, 2004; SAGARPA, 2010). De manera específica, *V. planifolia*, es la más importante por su demanda en la industria alimenticia, ocasionando un aprovechamiento del 95% de la producción mundial de esta especie (Bory et al., 2008). Después de que se cosechan los frutos de la vainilla se lleva a cabo un proceso de beneficiado o curado, en la cual se da la formación de vainillina y otros compuestos aromáticos y saborizantes, todo esto es para poder ser comercializada. Dicho proceso puede durar de 3 a 5 meses y no se cuenta con un método estandarizado para poder realizar de una manera correcta el proceso del beneficiado (McGregor, 2005).

2. *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews

2.1. Acerca del origen Totonaca de la vainilla

Antes que los españoles llegaran a América, en la región de Papantla (Veracruz), habitaba el pueblo Totonaca. Según se relata en la leyenda popular, los primeros reyes Totonacas ordenaron construir templos a sus dioses, entre estos dioses se encontraba Tonacayohua, la diosa de la siembra y los alimentos. Esta diosa tenía a su servicio doce jóvenes que desde niñas hacían votos de castidad. El rey Teniztli, consagró a su bella hija Tzacopontziza (Lucero del Alba), al culto de Tonacayohua. Tiempo después, el príncipe Zkotan Oxa (Joven Venado), se enamoró profundamente de Tzacopontziza, a pesar de saber que tal sacrilegio estaba penado con la muerte. Lucero del Alba fue raptada por Joven Venado y al ser descubiertos por los ofendidos sacerdotes, fueron degollados en el lugar y sus corazones sirvieron de ofrenda a la diosa. Así, en el lugar del sacrificio, brotó un arbusto y junto a su tallo, comenzó a crecer una orquídea trepadora. Una mañana la planta se cubrió de pequeñas flores y el sitio se impregnó de un exquisito aroma. Los sacerdotes y el pueblo no dudaron en creer que la sangre de los príncipes se había transformado en árbol y orquídea. Su sorpresa fue mayor, cuando las florecillas se convirtieron en largas y delgadas vainas que despedían un exótico perfume, como si el alma inocente de Lucero del Alba se prodigara en fragancias. Esta orquídea fue declarada planta sagrada y se elevó como ofrenda divina, hasta los adoratorios totonacos, quedando ligada a la cultura agrícola del pueblo. Así, de la sangre de una princesa nació la vainilla, que en totonaco fue llamada Caxi-Xanath, que significa “Flor Recóndita”. Hoy día, se reconoce a la región de Papantla como el centro de origen del cultivo de la vainilla y a los Totonacos, como sus primeros cultivadores y beneficiadores (Damirón, 1994). Con relación a la leyenda que se generó sobre la flor de vainilla, en el centro de Papantla, Veracruz, México se colocó

una escultura con un poema de la autoría de José de Jesús Núñez Domínguez; con la finalidad de recrear la historia de esta especie emblemática y de interés agroindustrial (Figura 1).



Figura 1. Escultura con texto de un poema del autor Núñez Domínguez (1887-1959) con relación a la leyenda de la flor de vainilla perteneciente a la cultura Totonaca. Tomado de Linares-García (2010).

El emperador azteca Itzcóatl (1427-1440) conquistó el territorio totonaca, denominado “Totonacapan”, dentro del cual se encuentra la región vainillera, siendo obligados los totonacos a pagar tributos diversos, en entre ellos el fruto de la vainilla. Bernal Díaz del Castillo, oficial de Hernán Cortés quizá fue el primer español que conoció la especie al observar a Moctezuma tomar una bebida preparada con semilla de cacao en polvo (chocolatl) y vainilla molida. Más adelante Cortés fue invitado por Moctezuma a tomar su primera taza de chocolate servida según la leyenda, en vasijas de oro con cucharas del mismo metal (Damirón, 1994).

Cuando Cortés regresó a España llevaba consigo una orquídea a la que ellos denominaron “vainilla”, debido a la forma alargada del fruto; así como los frutos del árbol del cacao (*Theobroma cacao* L.), ambos productos usados en la elaboración del chocolate. La vainilla y el cacao eran especias y frutos que nunca se habían probado en Europa, y provocaron un gran interés en los recursos naturales del “Nuevo Mundo” que recién habían encontrado. El rey Carlos V, mandó a los frailes dominicos y franciscanos a América, para que documentaran por escrito, los detalles de la cultura, sus riquezas, tanto naturales como materiales, sus usos y todo lo que podría ser de interés para la Corona (Gómez, 2008).

2.2. Generalidades de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews

Se ha reportado que para la producción comercial de vainilla sólo se cultivan tres especies; *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews o *Vanilla fragans* Salisbury, *Vanilla pompona* Schiede y *Vanilla tahitensis* Moore (Toussaint-Samat, 2002; Curti, 1995). *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews, es una orquídea endémica de Centroamérica y del sur de México. Esta especie es comercializada debido a su capacidad de producir vainillina, compuesto obtenido de las vainas, el cual

se ha convertido en uno de los saborizantes naturales más importantes y caros del mundo (Salazar-Rojas et al., 2012; Bory et al., 2008).

Vargas y Gámez (2014) han reportado que la planta de vainilla es una orquídea perenne, trepadora, de tallo flexible, cilíndrico, simple o ramificado, de color verde brillante, está constituido de 10 a 15 cm de longitud, de 1-2 cm de diámetro, cuenta con hojas alternas dispuestas en zig-zag y las guías pueden llegar a medir hasta 50 m de longitud. Las hojas son flexibles, subsésiles, elípticas, laureadas y succulentas como el tallo y, se disponen de manera alterna a lo largo del tallo acompañados de una yema, la cual no se desarrolla y tiene una raíz adventicia en el lado opuesto de la hoja (Figura 2). Además, se ha reportado que la hoja es una estructura importante, dado que su morfología es útil para la identificación de la especie y la variedad de la planta de vainilla (Vargas y Gámez, 2014).



Figura 2. Estructura de la planta de vainilla, es una orquídea trepadora con disposición de hojas alternas dispuestas.

Las flores se presentan en inflorescencia o racimos conocidos como “macetas” y brotan de las axilas de las hojas; por lo general, son simples de 5 a 8 cm de longitud y agrupadas. La

planta llega a tener de 10 a 15 racimos de flores, compuesto cada uno de por más de 10 flores individuales, las cuales son de color aperlado, blanco amarillento, cuyos brotes florales abren de uno a tres cada mañana en la primavera, pero mueren por las tardes y cuando son polinizadas dan lugar a un fruto carnoso y alargado, de 15 a 25 cm de longitud (Vargas y Gámez, 2014). De acuerdo con lo reportado por Vargas y Gámez (2014), el fruto es una cápsula dehiscente que presenta tres costados cóncavos, posee forma cilíndrica, es de color verde brillante cuando aún no está maduro y se torna de amarillo a café a medida que madura. Su longitud varía de 13 a 25 cm y su diámetro entre 10 y 15 mm (Figura 3).

La propagación de la vainilla se realiza por esquejes o bejucos de por lo menos 80 cm de longitud con cuatro o cinco yemas viables y obtenidos de plantas en producción. Las zonas donde se cultiva vainilla tienen temperatura entre 21 y 32 °C, con un promedio cercano a los 27 °C (Fouché y Jouve, 1999), y una precipitación pluvial entre 1600 y 2500 mm por año, con distribución uniforme durante el año. Sin embargo, requiere que se presente un período más seco (de uno o dos meses) para inducir la floración. Las áreas con una estación seca excesivamente prolongada no son adecuadas para el cultivo de vainilla, excepto que se establezcan sistemas de riego (McGregor, 2005; Damirón, 2004).

La floración de la vainilla se induce tanto con condiciones ambientales adecuadas, como con prácticas de cultivo apropiadas, entre las que pueden mencionarse el manejo de la sombra, las podas, el direccionamiento de la curvatura de la liana, la aplicación de abonos, entre otras. Asimismo, la floración, se ve influenciada por el nivel nutricional y los cambios metabólicos de la planta (Puthur, 2005; Puthur y Kumar, 2006; Tian et al., 2004). McGregor (2005), reportó que en Papua-Nueva Guinea la primera floración de la vainilla se presenta a los tres años, similar a lo reportado por Castro-Bobadilla y García-Franco (2007), quienes indicaron que, para Isla Reunión y México, también transcurrían tres años para apreciar la primera floración de la especie. Una vez la planta empieza a florecer lo seguirá haciendo cada año, durante unos 10 a 12 años. Es importante destacar que el género *Vanilla*, es el único de la familia de las orquídeas que produce frutos comestibles (Augstburger et al., 2000).

En México, todavía es posible obtener frutos de vainilla (*V. planifolia*) de manera natural, es decir, sin que las flores sean polinizadas manualmente, pero ocurre en un porcentaje muy bajo, generalmente del 1% del total de las flores. La polinización se le ha atribuido a la abeja sin aguijón *Melipona beechii*, al pájaro colibrí *Cynnis sp.*, murciélagos y últimamente a las abejas verdes y brillantes de las orquídeas *Euglossa viridissima* (Lubinsky et al. 2006; Hagstaer et al. 2005; Soto 1999).

Cuando la polinización se realiza de forma manual es mediante la remoción de la polinia con una aguja e insertándola entre el rostelo y el estigma (Fouché y Jouve, 1999). Para determinar el momento adecuado de cosecha, los productores, por experiencia utilizan índices con base a días

de polinización a maduración del fruto; pérdida de firmeza o ablandamiento de los tejidos y cambios de color de la epidermis del fruto. El fruto está listo para poder ser cosechado cuando han pasado mínimo seis y máximo nueve meses después de la polinización; la madurez comercial se inicia con cambios fisiológicos caracterizados por reblandecimiento del fruto al tocarlo y cambio de color verde brillante a verde amarillo opaco, el cambio de color se inicia por el ápice del fruto. Se requiere determinar el momento exacto de cosecha, pues frutos cosechados demasiado pronto, presentan mala calidad y bajo contenido de sustancias y, al contrario, las cápsulas demasiado maduras, pueden presentar dehiscencia (Augstburger et al., 2000).

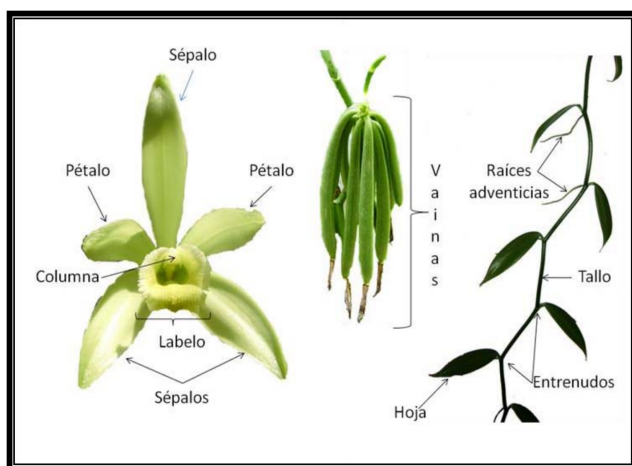


Figura 3. Estructura floral de vainilla, en donde se observa la presencia de tres sépalos, tres pétalos y un labelo. Asimismo, la estructura de las vainas que se forman posterior a la polinización de las flores. Tomado de Padilla-Vega (2010).

3. Compuestos aromáticos de la vainilla

La vainillina, es uno de los componentes naturales que dan sabor y olor a los extractos de vainilla (Negishi et al., 2009). Diversas investigaciones sobre el perfil químico de los extractos de la vainilla la colocan como el componente principal de las vainas ya curadas con una concentración aproximada de 0.3 a 3%, representando una parte del sabor y del olor de los extractos de vainilla (Shyamala et al., 2007). La vainillina es un compuesto con coloración ligeramente amarilla, es volátil y con un olor dulce. Se encuentra acumulado en las vainas verdes de la vainilla como forma de glucósido (Tenailleau et al., 2004). El aroma es liberado únicamente después del beneficiado, en donde el glucósido de la vainillina (glucovainillina) es hidrolizado por la β -glucosidasa (Gatfield et al., 2007; Odoux et al., 2003).

El precursor de la vainillina está presente en las vainas sin curar, en forma de un glucósido llamado glucovainillina o vainillina β -glucósido. Durante el proceso de curado este glucósido, se encuentra encapsulado en las estructuras celulares llamadas vacuolas, es hidrolizado para formar vainillina y glucosa mediante la acción de la β -glucosidasa

(Figura 4), que se encuentra en el citoplasma, periplasma, apoplastos, mesocarpio y pared celular. La actividad de esta enzima cambia la madurez de las vainas, siendo insignificante en las verdes y más alta en las amarillas (Arroyo, 2016). Otros constituyentes de aroma y sabor tales como el ácido p -hidroxibenzoico, el p -hidroxibenzaldeído y el ácido vanílico también están presentes en la vaina verde en sus formas glicosídicas y son liberados a través de la hidrólisis enzimática en el curado (Arroyo, 2016).

4. Saborizantes de *Vanilla planifolia*

Los saborizantes son sustancias con propiedades que son capaces de intensificar o conferir sabor a los alimentos. Dentro de estos se encuentran los saborizantes naturales y artificiales. Los saborizantes naturales se obtienen exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos o enzimáticos, a partir de materias primas naturales. Se entienden por materias primas naturales a los productos de origen animal o vegetal que sirven para el consumo humano, estas deben de contener sustancias odoríferas, ya sea en su estado natural o después de un tratamiento adecuado como la fermentación, entre otros (Mercosur/GMC/RES. N 10/06).

4.1. Productos elaborados con vainilla natural

Como antes se mencionó, la vainilla constituye uno de los productos naturales más redituables para la obtención de saborizantes. Algunos productos comerciales en los que utilizan vainilla natural para la producción de saborizantes incluyen a Zanilli® con un contenido de extracto natural de vainilla en agua y alcohol 25% v/v; Monin® con un contenido de agua, extracto natural de vainilla, edulcorante de estevia, eritritol, goma de xantana y ácido láctico; La Anita® compuesto de agua, etanol, colorante caramelo clase IV, extracto de vainilla natural, saborizante artificial, vainillina, 0.1% de benzoato de sodio y sorbato de potasio y; Gaya® que contiene vainilla, agua, alcohol, azúcar, sin conservadores ni colorantes artificiales, sin gluten y sin cumarina.

4.2. Saborizantes artificiales

Los saborizantes artificiales son compuestos químicos, que aún no han sido identificados en productos de origen animal o vegetal, son utilizados por sus propiedades aromáticas, en su estado primario o preparados para el consumo humano (Mercosur/GMC/RES. N 10/06). Algunos productos con sabor a vainilla que se consideran en este grupo incluyen a Pasa vainilla® que contiene agua, etanol, monopropilenglicol, color caramelo IV, vainilla, ethyl maltol, ethyl vainillin, sorbato de potasio 0.1%; La Anita® compuesto de agua, etanol, colorante caramelo clase IV, saborizante artificial, vainillina, benzoato de sodio y sorbato de potasio, etil maltol.

5. Fermentación

Se llama fermentación al proceso microbiano de oxidación incompleta, esto quiere decir que no requiere de oxígeno para poder realizarse y da como resultado una sustancia orgánica.

De acuerdo con Ondarse (2021), es un proceso de tipo catabólico, que da como resultado una transformación de moléculas complejas a moléculas sencillas y se genera energía química en forma de ATP. La fermentación consiste en un proceso de glucólisis (ruptura de la molécula de glucosa) que produce piruvato (ácido pirúvico), y que al carecer de oxígeno como receptor de los electrones sobrantes del NADH producido, emplea para ello una sustancia

orgánica que deberá reducirse para reoxidar el NADH a NAD⁺, obteniendo finalmente un derivado del sustrato inicial que se oxida. Los sustratos de las fermentaciones se incuban en bandejas, tanques o en recintos de temperatura y humedad relativa controladas. Dependiendo de dicha sustancia final, habrá diversos tipos de fermentación (Ondarse, 2021).

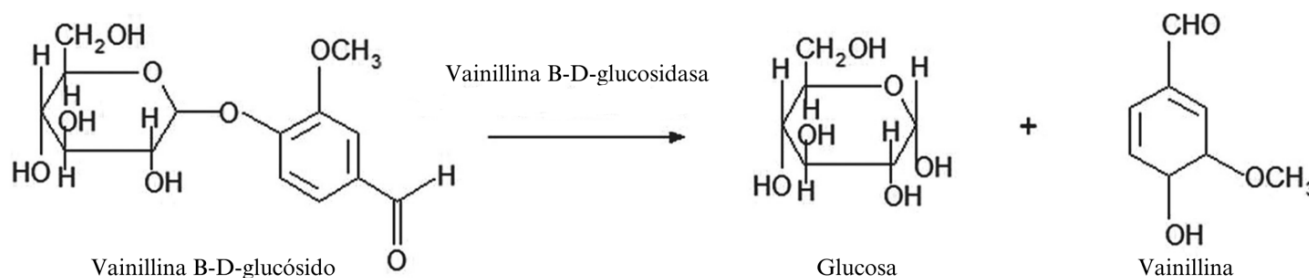


Figura 4. Formación de la vainilla por acción enzimática. Adaptado de Banerjee y Chattopadhyay (2018).

5.1. Proceso de fermentación de *Vanilla planifolia*

En México, durante siglos se ha llevado a cabo la fermentación de vainas de vainilla, este proceso coloquialmente se conoce como el curado o beneficio de las vainas, lo que permite el desarrollo de sabor y aroma característico de la vainilla. En este proceso se libera la glucovainillina acumulada en diferentes partes del fruto verde, que se hidroliza por acción catalítica de las enzimas β -glucosidasas y celulasas, para la formación de los compuestos responsables del aroma. El extracto natural de la vainilla tiene muchos compuestos que le dan el sabor característico, son más de 170 componentes aromáticos volátiles que se han identificado (Azeez, 2008; Rao y Ravishankar, 2000).

Los beneficiadores aplican diferentes procesos de fermentación, los cuales los definen en función de las condiciones climáticas, disponibilidad del producto, destino o uso de la vainilla, o si utilizan el sistema tradicional (bajo sol) o tecnificado (horno de convección). Pero tiene en común las cuatro principales etapas: marchitado, sudado, secado y acondicionado.

5.1.1. Etapas de fermentación de *Vanilla*

De acuerdo con lo realizado por los productores, se ha reportado que la cosecha de las vainas deberá iniciarse en la mañana, una vez que los frutos estén secos en forma natural. Las vainas deberán acomodarse de manera horizontal en cajas cosechadoras especialmente diseñadas para protegerlas y mantenerlas ventiladas. Estas mismas cajas sirven para transportar las vainas al beneficio (COVECA, s/f). Existen diferentes métodos de procesar las vainas de vainilla verde con el objetivo de que obtengan el color, olor y sabor característico de las vainas para consumo. El beneficio o curado, requiere la participación de personal especializado, de obreros que se forman paulatinamente en cada una de las fases que conlleva el manejo de la vainilla. De acuerdo con el avance y la experiencia adquirida, estas personas se

clasifican en: aprendices, tenderos, oficiales (de segunda y primera) y maestros. Estos especialistas ponen en juego los sentidos del tacto, olfato, vista y oído para coadyuvar en la obtención de un producto de alta calidad. El proceso de beneficiado se extiende desde enero a mayo, dependiendo del clima y considerando los días nublados y lluviosos que interrumpen el proceso (Hernández-Hernández, 2011).

Aunque existen reportes donde especifican generalidades del beneficio de las vainas, es necesario destacar que en la actualidad no existe un protocolo estandarizado que todos los productores puedan realizar, ya que ellos realizan la fermentación de las vainas de forma empírica y esto va transmitiendo de generación en generación. El objetivo del curado es detener el proceso vegetativo natural y acelerar los cambios que llevarán a la formación de los constituyentes aromáticos del sabor, principalmente la vainillina (Pacheco-Reyes, 2009).

A continuación, se describen las etapas más comunes que de acuerdo con los conocimientos compartidos por diversos productores, se ha aplicado en el proceso (Anandaraj et al., 2005; Damirón, 2004; Gillette y Hofman, 2000; Roldan et al., 1998):

Acopio: Consiste en cuantificar el volumen y conocer el estado de madurez y calidad de la vainilla con la que cuenta o recibe el productor.

Despezonado: Esta es una etapa de suma importancia, que consiste en separar manualmente el pedúnculo floral oprimiendo la base del raquis, ejerciendo presión y girando el pedúnculo con la yema de los dedos, evitando romper la punta del fruto.

Lavado del fruto: Después del despezonado se sumerge dos veces los frutos en una solución de agua con cloro al 0.6% de concentración (10 mL de cloro comercial al 6% por cada 100 mL de agua). No todos los productores realizan este paso.

Marchitado: Consiste en detener la actividad fisiológica del fruto verde, en esta etapa es cuando se inician las reacciones

causadas por enzimas que facilitaran el desarrollo del aroma y del sabor. El método tradicional y más común es utilizando agua caliente bajo diferentes condiciones, después de su inmersión, los frutos deben tener un color entre verde y café, el cual es el indicador de que se hizo un buen marchitado del fruto.

Sudado: Para el desarrollo de esta fase se promueven las reacciones enzimáticas mediante el incremento de la temperatura de las vainas al ser envueltas en franelas de algodón y ser introducidas a un cuarto diseñado para este fin, que debe ser lo suficientemente ventilado para evitar la presencia de hongos. Al finalizar esta etapa los frutos deben ser de color café “chocolate” y aroma suave. La humedad de los frutos es de entre 60-70%. Si los frutos no cambian el color, se colocan en bolsas de plástico negro y se exponen al sol hasta que se oscurezcan y el color se homogenice.

Secado/soleado: Posterior al sudado, cada mañana los frutos se sacan del cajón y se colocan sobre lonas o tarimas al aire libre para exponerlas a los rayos del sol e incrementen su temperatura entre 45-60 °C por períodos de 30 min a 2 h.

Depósito normal: Los beneficiadores en esta etapa clasifican los frutos beneficiados conforme a los criterios de aspecto y longitud. Una vez clasificados se envuelven en papel encerado y empaca en bolsas de plástico, hasta su comercialización.

6. Conclusión

Aún en la actualidad, no existe un único procedimiento estandarizado para la fermentación de vainas de vainilla, debido a que los productores realizan la fermentación de forma empírica. Aunque la mayoría de los productores coinciden en los pasos a realizar, difieren en el desarrollo de cada paso. Asimismo, no existe suficiente información sobre las reacciones bioquímicas que ocurren durante el proceso de la fermentación. Con base en lo anterior, se plantea la necesidad de establecer un protocolo estandarizado de fermentación que homogenice el producto y la calidad del extracto. De igual manera se requieren estudios bioquímicos que permitan saber específicamente las reacciones enzimáticas que suceden durante todo el periodo de la fermentación. Lo anterior podrá abonar para garantizar comercio con precios justos al trabajo de los productores de este cultivo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

Anandaraj M, Rema J, Sasikumar B, Suseela Bhai. 2005. Vanilla extension Pamphlet. Printer Castle. Kochi. India Pp. 1–11.
 Anilkumar A. 2004. Vanilla cultivation: A profitable agri based enterprise. Kerala Calling 2: 26-30.
 Arroyo N. 2016. Alternativas para mejorar el rendimiento de extracción de vainillina en frutos curados de vainilla.

Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Pp. 37-38.
 Augstburger F, Berger J, Censkowsky U, Heid P, Milz J, Streit C. 2000. Vainilla. 1 ed. Agricultura orgánica en el Trópico y Subtrópico. Asociación Naturland, Gräfelting, Alemania 5-8.
 Azeez S. 2008. Vanilla. En: Parthasarathy VA, Chempakam B, Zachariah TJ. (Eds.), Chemistry of Spices, CAB International, Pondicherry, India, Pp. 287–289.
 Banerjee G, Chattopadhyay P. 2019. Vanillin biotechnology: the perspectives and future. Journal of the Science of Food and Agriculture 99(2): 499-506.
 Bory S, Grisoni M, Duval MF, Besse P. 2008. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. Genetic Resources and Crop Evolution 55(4): 551-571.
 Castro-Bobadilla G, García-Franco JG. 2007. Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) crop systems used in the Totonacapan area of Veracruz, Mexico: Biological and productivity evaluation. Journal of Food, Agriculture and Environment 5: 136-142.
 COVECA. s/f. Monografía de la Vainilla. Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. Gobierno del estado de Veracruz. Xalapa, Veracruz. 28 p.
 Curti ED. 1995. Cultivo y beneficiado de vainilla en México. Organización Nacional de Vainilleros Indígenas de México 96 p.
 Damirón R. 2004. La vainilla y su cultivo. Veracruz Agrícola. Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria, Gobierno del Estado de Veracruz, México 50 p.
 Dressler RL. 2005. How many orchid species? Selbyana 26: 155-158.
 Flores-Jiménez A, Reyes-López D, Jiménez-García D, Romero-Arenas O, Rivera-Tapia JA, Huerta-Lara M, Pérez-Silva A. 2017. Diversidad de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y sus perfiles bioclimáticos en México. Revista de Biología Tropical 65(3): 975-987.
 Fouché JG, Jouve L. 1999. *Vanilla planifolia*: history, botany and culture in Reunion Island. Agronomie 19: 689-703.
 Gatfield I, Hilmer J, Weber B, Hammerschmidt F, Reid I, Poutot G, Bertram G. 2007. Chemical and biochemical changes occurring during the traditional Madagascar vanilla curing process. Perfumer & Flavor 32: 1-8.
 Gillete M, Hoffman P. 2000. Vanilla extract. En: Encyclopedia of Food Science and Technology. 2nd. Ed. John Wiley & Sons, New York. Pp. 2383-2399.
 Gómez L. 2008. *Vanilla planifolia*, the first Mesoamerican orchid illustrated, and notes on the La Cruz-Badiano Codex. Lankesteriana 8: 81-88.
 Hagstaer E, Soto-Arenas MA, Salazar-Chávez GA, Jiménez-Machorro R, López-Rosas M, Dressler RL. 2005. Las orquídeas de México: Orquídeas y gente. Instituto Chinoin, México DF. Pp. 38-71.
 Hernández-Hernández J. 2011. Mexican vanilla production. En: Havkin-Frenkel D, Belanger FC (Eds.) Handbook of vanilla science and technology. Wiley-Blackwell Publishing Ltd., NJ, USA. Pp. 3-24.
 Linares-García A. 2010. Statue depicting Tzacopontziza and Zhatan-Oxga from the Totonac legend about the origin of vanilla in Papantla, Veracruz by Teodoro Cano. En: OpenStreetMap. TazacoZkaPapantla.JPG
 Lubinsky P, Van Dam M, Van Dam A. 2006. Pollination of vanilla and evolution in Orchidaceae. Lindleyana 75: 926-929.

- McGregor A. 2005. Diversification into high-value export products: case study of the Papua New Guinea vanilla industry. Agriculture Management, marketing and finance service (AGFS) working document 2, Agriculture Support System Division, FAO, Rome. 9-15.
- Negishi O, Sugiura K, Negishi Y. 2009. Biosynthesis of vanillin via ferulic acid in *Vanilla planiflora*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 9956-9961.
- Ondarse D. 2021. Destilación. Buenos Aires, Arg: concepto de destilación. Recuperado de <https://concepto.de/destilacion/>
- Odoux E, Chauwing A, Brillouet J. 2003. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planiflora* Andrews) β -D-Glucosidasa. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 3168-3173.
- Pacheco-Reyes I. 2009. Evaluación del efecto de sonicación-microondas en el beneficiado de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Oaxaca, México.
- Padilla-Vega J. 2010. Estudio fisiológico de *Vanilla planifolia* Andrews (Orchidaceae), cultivada en un sistema agroforestal en Ixtacomitán, Chiapas, México. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur. México. 77 p.
- Puthur JT. 2005. Is no flowering on the vertically climbing branches of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) a mystery? Indian Journal of Arecanut, Spices and Medicinal Plants 7: 100-115.
- Puthur JT, Kumar VK. 2006. Studies on the role of nutrients and metabolites on flowering of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Journal of Plantation Crops 34: 90-93.
- Rao SR, Ravishankar GA. 2000. Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 289-304.
- Roldán I, Eleuterio C, Mata J, Lara M, Paz J. 1998. El cultivo de la vainilla en Usila, Oaxaca. Organización y autogestión campesina. Dirección General de Culturas Populares, SEP, México. Pp. 63-65.
- SAGARPA. 2010. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla mexicana. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/VAINILLA.pdf. Consultado: el 14 de marzo 2023.
- Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Soto-Hernández M, Castillo-González F, Cobos-Peralta M. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. Genetic Resources and Crop Evolution 59: 875-887.
- Shyamala B, Madhava M, Sulochanamma G, Srinivas P. 2007. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through *in vitro* models. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 7738-7743.
- Soto M. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto N.º J101. Instituto Chinoín AC, Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología AC. Granada, España. 106 p.
- Tenailléau EJ, Lancelin P, Robins RJ, Akoka S. 2004. Authentication of the irigin of vanillin using quantitative natural abundance C NMR. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 7782-7787.
- Tian YT, Chen SN, Zheng HD, Zhou HC, Yang MZ. 2004. The change of endogenous phytohormones in vanilla fragrans from flower bud differentiation to germination phases. Acta Botanica Yunnanica 26: 213-20.
- Toussaint-Samat M. 2002. La vainilla en México, una tradición con un alto potencial. Claridades Agropecuarias, 101: 3-16.
- Vargas HJ, Gámez VH. 2014. Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la sierra huasteca potosina. INIFAP. Centro de Investigación Regional Noroeste. ampo Experimental San Luis Potosí. Pp. 3-4.