



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

### ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN INFRAESPECÍFICA DE *Vanilla insignis* Ames BAJO EL ENFOQUE DE RECURSOS GENÉTICOS

NÉSTOR HERNÁNDEZ SILVA

TESIS  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2014



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN

CAMPUE- 43-2-03

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Néstor Hernández Silva**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Análisis de la variación infraespecífica de *V. insignis* Ames bajo el enfoque de recursos genéticos**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 20 de enero de 2014.

Néstor Hernández Silva

Vo. Bo. Profesor Consejero  
Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera

La presente tesis, titulada: **Análisis de la variación infraespecífica de *Vanilla insignis* Ames bajo el enfoque de recursos genéticos**, realizada por el alumno: **Néstor Hernández Silva**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

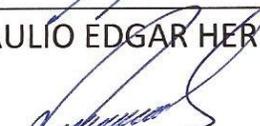
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

  
DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

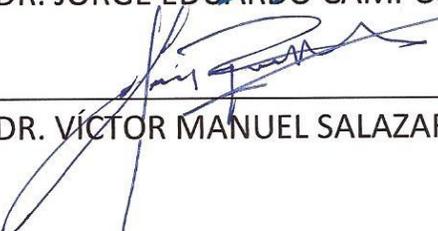
ASESOR:

  
DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:

  
DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

ASESOR:

  
DR. VÍCTOR MANUEL SALAZAR ROJAS

Puebla, Puebla, México, 20 de enero de 2014

# ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN INFRAESPECÍFICA DE *Vanilla insignis* Ames BAJO EL ENFOQUE DE RECURSOS GENÉTICOS

Néstor Hernández Silva, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

En la actualidad los efectos negativos de las interacciones bióticas y abióticas dentro del cultivo de *Vanilla planifolia* han devastado plantaciones de este recurso en todo el mundo. La generación de estrategias para su conservación y mejoramiento requiere del conocimiento de la variación que el género *Vanilla* alberga. *Vanilla insignis* es una especie silvestre genéticamente relacionada, con características agronómicas sobresalientes dentro del pool genético secundario de *V. planifolia*, particularmente en la resistencia a factores climáticos y patógenos. Por tal razón, se planteó conocer la variación infraespecífica de *V. insignis* por medio de la caracterización morfológica y molecular de poblaciones de *V. insignis* del estado de Quintana Roo, México. A través del análisis morfométrico del labelo como estructura altamente heredable, y de 14 loci microsatélites por ser el marcador molecular de mayor eficiencia en estudios de variación infraespecífica. Los resultados mostraron plasticidad morfológica de la especie hacia diferentes ambientes, y congruencia genética hacia un morfotipo eficiente. Se observó la existencia de cuatro morfotipos florales en *V. insignis*, uno de ellos con parecido al morfotipo propio de *V. planifolia*. Se observó una relación entre la forma del labelo y un gradiente altitudinal y de humedad del suelo de los sitios de colecta. La caracterización molecular mostró cuatro genotipos. Uno de ellos presentó las cuatro formas encontradas de *V. insignis* y el morfotipo de *V. planifolia*. El resto de los genotipos compartieron un morfotipo de *V. insignis*.

Palabras clave: conservación, mejoramiento, labelo, microsatélites, morfotipo, genotipo.

INFRASPECIFIC VARIATION ANALYSIS OF *Vanilla insignis* Ames UNDER THE  
APPROACH OF GENETIC RESOURCES

Néstor Hernández Silva, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Nowadays the negative effects of biotic and abiotic interactions in the crops of *Vanilla planifolia* plantations have devastated this resource around the world. The generation of conservation and improvement strategy requires the knowledge of the genus *Vanilla* holds. *Vanilla insignis* is a wild species genetically related, with outstanding agronomic characteristics within the secondary gene pool of *V. planifolia*, particularly in resistance to climatic and pathogens factors. For this reason, it is suggested to know the *V. insignis* infraspecific variation through morphological and molecular characterization of populations of *V. insignis* of Quintana Roo, Mexico state, through the morphometric analysis of the lip as highly heritable structure, and of 14 microsatellites as the molecular marker of increased efficiency infraspecific variation studies. The results showed morphological plasticity of the species to different environments and genetic consistency towards efficient morphotype. The existence of four floral morphotypes was observed in *V. insignis*, one with similar morphotype to *V. planifolia*. A relationship between the shape of the labellum and height and soil moisture gradient in collection sites was observed. Molecular characterization showed four genotypes. One of them presented the four forms found in *V. insignis* and the *V. planifolia* morphotype. The other genotypes shared one morphotype of *V. insignis*.

Key words: conservation, improvement, labellum, microsatellites, morphotype genotype.

Esta investigación fue financiada por:



**Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos - (SINAREFI; Clave: BEI-VAI-12-4)**



**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; Beca Maestría en Ciencias)**



**Subdirección de investigación del Colegio de Postgraduados-Campus Puebla.**



**Macroproyecto Investigación Aplicada Vainilla (2012-04-190442)**

A quienes expreso mi más profundo agradecimiento.

Agradezco y dedico esta tesis a:

Todas las personas que colaboraron directa e indirectamente para su elaboración.

Al Ing. José Gaspar Ku Ucan, a la Sra. Francisca Espinoza, al Sr. Francisco Ayala, al Sr. Arismendi y al Sr. Alejandro Gómez Amaro y toda su familia, porque sin apoyo incondicional no hubiera sido posible el desarrollo de esta tesis, y por conservar celosamente la variación que *V. insignis* alberga.

Al Sr. Francisco Javier Escárcega Lara.

A mi profesor consejero, el Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera, por su comprensión, apoyo, dedicación, esfuerzo, amistad y guía imprescindible para mi desarrollo humano y profesional. Soy afortunado por poder llamarme alumno suyo.

A mi consejo particular integrado por la Dra. Adriana Delgado Alvarado, el Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras y el Dr. Víctor Manuel Salazar Rojas, por la dedicación y tiempo invertido durante esta experiencia maravillosa.

Al M.C. Alejandro Montalvo Reyes y el servicio de secuenciación y análisis de fragmentos de la UNAM FES Iztacala.

A mis padres, Rafael y María, y a mi hermano Rafa, por su apoyo y amor, y por ser el mayor ejemplo de lucha constante para alcanzar la felicidad.

A mi dulce Mary, por haber sido por muchos años mi mayor motivación para ser un mejor ser humano, y por enseñarme que el amor vence cualquier obstáculo.

A mis muy queridos profesores, compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados-Campus Puebla, por sus consejos, ánimo y apoyo durante mi estancia en este mágico lugar.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
Justificación	2
Planteamiento del problema	3
Marco teórico	3
Marco geográfico	5
Marco biológico	5
Hipótesis	9
Objetivos	9
Literatura citada	10
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>15</b>
<b>Variación Morfológica de <i>Vanilla insignis</i> (Orchidaceae) en Quintana Roo, México</b>	<b>15</b>
1.1 Introducción	17
1.2 Materiales y métodos	18
1.3 Resultados	23
1.4 Discusión	30
1.5 Conclusiones	32
1.6 Literatura citada	33

<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>38</b>
<b>Variación morfológica y molecular de <i>Vanilla insignis</i> Ames (Orchidaceae) del estado de Quintana Roo, México</b>	<b>38</b>
2.1 Introducción	40
2.2 Materiales y métodos	42
2.3 Resultados	47
2.4 Discusión	54
2.5 Conclusiones	55
2.6 Literatura citada	56
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>61</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>64</b>

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La vainilla es el saborizante de mayor importancia a nivel mundial (Toussain-Samat, 2002). Su aroma se produce mediante la deshidratación y fermentación de frutos verdes maduros de *Vanilla planifolia* G. Jack (Orchidaceae) (Soto-Arenas, 1999). Durante este proceso se favorece la formación del ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainillinico (4-Hidroxi-3-metoxibenzoico), p-hidroxibenzaldehído y vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), principales compuestos fenólicos involucrados en el aroma de la vainilla (Wescott *et al.*, 1994; Sostaric *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2006).

Las interacciones bióticas y abióticas de vainilla en los bosques tropicales del oriente mexicano y la presión selectiva del hombre (Evans 1996) modificaron el genotipo de *Vanilla planifolia* en la región del Totonacapan (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012), hecho que atribuye a México el posible centro de origen (Soto-Arenas, 2006) y domesticación de este recurso genético (Salazar-Rojas *et al.*, 2011). Su uso, manejo y proceso productivo es uno de los legados agrobiológicos más importantes de México (Toussain 2002).

El efecto negativo de las interacciones bióticas y abióticas en la especie, tales como ataques por patógenos y su sensibilidad a cambios en el ambiente han afectado su producción en el mundo. Al ser México centro de origen y domesticación del recurso existen ventajas competitivas tales como la diversidad genética del género *Vanilla* que el país aún alberga (Salazar-Rojas *et al.*, 2011). Dentro del pool genético secundario de *V. planifolia*, *V. insignis* es una especie silvestre con características agronómicas prioritarias en la generación de estrategias de conservación y mejoramiento del recurso genético vainilla.

## Justificación

Los recursos genéticos son una parte de la naturaleza seleccionada por el hombre y transformada mediante interacciones biológicas, ecológicas y culturales (Darwin, 1859; Evans, 1996; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012) en un proceso de domesticación que conlleva a la modificación de su genotipo (Evans, 1996). De no preservarse un recurso genético, el elemento de la naturaleza puede ser explotado hasta agotarse (Parra, 1984). Por esta razón es necesario incrementar el conocimiento del pool genético tanto primario (acerca de la misma especie) como secundario (especies estrechamente relacionadas) (Soto-Arenas, 1999).

De las 107 especies que conforman el género *Vanilla* (Soto-Arenas y Dressler, 2010), alrededor de 20 producen frutos aromáticos, entre ellas *V. insignis* (Lubinsky *et al.*, 2008). Esta especie presenta una relación filogenética estrecha con *V. planifolia*, al ubicarse taxonómicamente dentro del subgénero *Xanata* grupo *V. planifolia* (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

*V. insignis* es la especie del género *Vanilla* con mayor tolerancia a diferentes condiciones ambientales, ejemplo de esto es su establecimiento en zonas con menos de 1000 y hasta más de 4,500 mm de lluvia año<sup>-1</sup>, con diferentes tipos de suelo tales como arcillosos, ácidos y/o inundados. Otra característica es su resistencia a patógenos como antracnosis (*Collectotrichum sp.*), la pudrición negra o de raíz (*Fusarium oxysporum*), la chinche roja (*Tentecoris confusos*) y el gusano peludo (*Plusia aurifera*), además, soporta temperaturas bajas que pueden ser de hasta 10°C (Soto-Arenas, 1999).

La similitud entre la disposición de los principales compuestos fenólicos de *V. insignis* y la disposición encontrada en *V. planifolia* silvestre es mayor que la presente en *Vanilla pompona* (Salazar-Rojas *et al.*, 2011), especie del género *Vanilla* que también se cultiva. La tolerancia a patógenos y cambios hídricos (Soto-Arenas, 1999) y similar aroma a *V. planifolia* en estado

silvestre (Salazar-Rojas *et al.*, 2011) colocan a *V. insignis* como especie sobresaliente dentro del pool genético secundario de *V. planifolia* (Soto-Arenas 1999).

### **Planteamiento del problema**

En la actualidad, la industria (cosmética, de perfumes, farmacéutica y alimenticia) demanda una producción anual aproximada de 300 toneladas de vainilla beneficiada (Brownell, 2011) que se traduce en una producción de vainas verdes de 1500 ton año<sup>-1</sup>, principalmente de *V. planifolia*. Esta producción se ha visto afectada por factores climáticos (ciclones, huracanes, tormentas, sequías y altas temperaturas), enfermedades [pudrición negra o de raíz (*Fusarium oxysporum*) y antracnosis (*Collectotrichum sp.*)], plagas [chinche roja (*Tentecoris confusos*) y gusano peludo (*Plusia aurifera*)], problemas fisiológicos y genéticos (aborto o caída prematura de fruto), de manejo (ausencia de paquete tecnológico, bajo rendimiento) y de mercado (fluctuación en los precios año con año), entre otros.

La escasa variación genética documentada acerca del germoplasma del género *Vanilla* (Soto-Arenas 1999; Soto-Arenas 2006; Mino *et al.*, 2006), su vulnerabilidad a la erosión genética y la destrucción de su hábitat ocasionada por fenómenos humanos y meteorológicos (Lubinsky 2003; Herrera *et al.*, 2012), impiden realizar estrategias de conservación, hecho que ha devastado la industria vainillera en plantaciones de México y de otros países (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012).

### **Marco teórico**

En individuos silvestres se desarrollan mecanismos evolutivos de adaptación hacia ecosistemas específicos (Darwin, 1859), como variación genética acumulativa, constante y proporcional al entorno (Frankel *et al.*, 1995). El desconocimiento de esta variación impide conservar y potenciar características de uso vegetativas, reproductivas y de calidad en beneficio de un recurso genético

(Herrera-Cabrera *et al.*, 2004; Salazar-Rojas *et al.*, 2011). Por esta razón es necesario incrementar el conocimiento acerca del pool genético, tanto primario como secundario de *V. planifolia* (Soto-Arenas, 1999).

Es posible conocer la variación infraespecífica, mediante el análisis de caracteres morfológicos menos sensibles a variación por efecto ambiental (Herrera-Cabrera *et al.*, 2004; Salazar-Rojas *et al.*, 2010). Estas características están presentes en las estructuras reproductivas y son consideradas de mayor relevancia dentro de criterios de clasificación (Emigh y Goodman, 1985; Podolsky y Holtsford, 1995; Herrera-Cabrera *et al.*, 2000). En flores zigomorfas, la simetría del labelo es una característica adaptativa que ha permitido la diversificación de las especies (Hunter, 1998; Endress, 1999), debido a que su relación con el polinizador aumenta la especiación y disminuye el flujo génico (Wilson *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006).

A nivel genético, el género *Vanilla* ha sido estudiado mediante Isoenzimas (Soto-Arenas 1999), RAPD y AFLP (Minoo *et al.*, 2007) entre otros. Sin embargo, el uso de microsatélites (SSR) ha demostrado ser de mayor funcionalidad en estudios de diversidad (Bory *et al.*, 2008) y de mayor detección polimórfica a nivel infraespecífico en *V. planifolia* (Bory *et al.*, 2008; Salazar-Rojas *et al.*, 2011). Este marcador se basa en secuencias repetidas de uno a cinco nucleótidos presentes en todos los genomas eucariotas (Tautz y Renz, 1984). Su variación se debe principalmente a un deslizamiento durante el proceso de replicación de ADN (Schlotterer y Tautz y Rens, 1992) y el polimorfismo resultante se analiza mediante primers de alto poder discriminatorio (Agarwal *et al.*, 2008), son codominantes, altamente reproducibles y permiten una cobertura amplia del genoma (Rafalsky y Tingey 1993; Powell *et al.*, 1996).

## Marco geográfico

En las especies que carecen de domesticación, como el caso de *V. insignis*, los posibles cambios en el genotipo entre diferentes especímenes son resultado de la interacción biológica-ambiental (Frankel *et al.*, 1995), por esta razón los individuos seleccionados para un estudio de variación deben representar distintos ambientes (Evans, 1996).

*V. insignis* forma parte de la diversidad biológica de los bosques tropicales existentes entre Honduras, Guatemala, Belice y México (Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Chiapas, Tabasco, Oaxaca, Veracruz y Puebla) (Govaerts 2003; Soto-Arenas y Dressler, 2010). Con excepción de la selva alta perennifolia, la península de Yucatán alberga todos los tipos de vegetación tropical en el país (INEGI, 1996). La mayor parte del territorio en Quintana Roo está clasificado como bosque tropical perennifolio (Rzedowski, 1990), en él se localizan regiones de selva alta subperennifolia, selva baja perennifolia, selva mediana caducifolia y selva mediana subperennifolia (INEGI, 1996). Otras características biológicas y geográficas que se pueden considerar como posible fuente de variación, son la fisonomía estructural de la vegetación (Balduzzi y Tomaseli, 1979), la evaporación real (Madery, 1990), el régimen de humedad del suelo (Maples, 1992), la insolación máxima (Hernández, 1990), la radiación solar (Galindo *et al.*, 1990), la precipitación total anual (CONABIO, 1998) y los rangos de humedad (García 1990).

## Marco biológico

El linaje *vanilloide* (subtribu *Vanillinae* de la tribu *Vanilleae*) es el más basal de la familia Orchidaceae con una antera (Soto-Arenas y Dressler, 2010). A pesar de que el género *Vanilla* conserva rasgos primitivos como sus hábitos trepadores, la venación reticulada, el polen en

monadas y semillas escleróticas, posee flores con estructura y mecanismos de polinización tan complejos como las orquídeas derivadas (Soto-Arenas 1999; Soto-Arenas y Dressler 2010).

El género *Vanilla* comprende dos subgéneros (*Vanilla membranacea* y *Vanilla Xanata*). *Vanilla membranacea* está conformado por dos grupos *Vanilla mexicana* y *Vanilla parviflora*, Y *Vanilla Xanata* por 18 grupos (Soto-Arenas y Dressler 2010). Los cuales presentan dos sub agrupaciones llamadas secciones, donde *Vanilla palmarum*, *Vanilla trigonocarpa*, ***Vanilla planifolia***, *Vanilla penicillata*, *Vanilla hostmanii* y *Vanilla pompona* pertenecen a la **sección xanata**(Tipo *Vanilla planifolia* G. Jackson) (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El resto, *Vanilla kinabaluensis*, *Vanilla albida*, *Vanilla annamica*, *Vanilla griffithii*, *Vanilla borneensis*, *Vanilla imperialis*, *Vanilla francoissii*, *Vanilla chalogii*, *Vanilla africana*, *Vanilla barbellata*, *Vanilla aphylla* y *Vanilla phalaenopsis* pertenecen a la sección *thetya* (tipo *Vanilla phalaenopsis*) (Soto-Arenas y Dressler 2010). Dentro del grupo *Vanilla mexicana* se encuentran las especies *Vanilla costarricenses*, *Vanilla guianensis*, *Vanilla inodora*, *Vanilla martinezii*, *Vanilla methonica*, *Vanilla mexicana*, *Vanilla oroana*, *Vanilla ovata*. El grupo de *Vanilla parviflora* está formado por las especies *Vanilla angustipetala*, *Vanilla parfifolia*, *Vanilla verrucosa*, *Vanilla brandei*, *Vanilla edwallii*, *Vanilla organensis* y probablemente por *Vanilla bertonensis* (Soto-Arenas y Dressler 2010).

El grupo *Vanilla palmarum* lo conforman *Vanilla bicolor*, *Vanilla palmorum* y *Vanilla savannarum* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El grupo de *Vanilla trigonocarpa* lo forman *Vanilla espondae*, *Vanilla hartii*, *Vanilla sprucely* y *Vanilla trigonocarpa* (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

En el grupo ***Vanilla planifolia*** están *Vanilla appendiculata*, *Vanilla bahiana*, *Vanilla cristagalli*, *Vanilla denticulata*, *Vanilla dubiana*, *Vanilla dungsii*, *Vanilla fimbriata*, *Vanilla helleri*, ***Vanilla insignis***, *Vanilla odorata*, *Vanilla planifolia*, *Vanilla phaentha*, *Vanilla viveiroi*, *Vanilla schawackeana*, *Vanilla tahitiensis* y *Vanilla uncinata* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El grupo

de *Vanilla penicillata* lo conforma únicamente la especie *Vanilla penicillata*. El grupo de *Vanilla hostmanii* se forma por las especies, *Vanilla cribbiana*, *Vanilla dressieri*, *Vanilla gardneri*, *Vanilla hostmanii* y *Vanilla ruiziana* (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

El grupo de *Vanilla pompona* lo forman *Vanilla calyculata*, *Vanilla chamisonis*, *Vanilla columbiana*, *Vanilla grandiflora*, *Vanilla pompona*, *Vanilla pseudopompona* y *Vanilla velozii* (Soto-Arenas y Dressler 2010). El grupo de *Vanilla kinabaluensis* integra las especies *Vanilla abundiflora*, *Vanilla giullianetii*, *Vanilla kaniensis*, *Vanilla kempteriana*, *Vanilla kinabaluensis*, *Vanilla klabatiensis*, *Vanilla ovalis*, *Vanilla platyphylla*, *Vanilla ramificans*, *Vanilla siamensis*, *Vanilla seranica*, *Vanilla sumatrana*, *Vanilla utteridoei* y *Vanilla wariensis* (Soto-Arenas y Dressler 2010). En el grupo de *Vanilla albida* se localizan *Vanilla albida*, *Vanilla andamanica*, *Vanilla harillandii*, *Vanilla montana*, *Vanilla moonii*, *Vanilla sanjapae*, *Vanilla yersiniana* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El grupo de *Vanilla annamica* se forma por las especies *Vanilla annamica* y *Vanilla somai*. En el grupo *Vanilla griffithii* se localizan las especies *Vanilla griffithii* y *Vanilla palembanica* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El grupo *Vanilla borneensis* está conformado por las especies *Vanilla borneensis* y *Vanilla diabólica* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El grupo de *Vanilla imperialis* integra las especies *Vanilla grandifolia*, *Vanilla imperialis*, *Vanilla ochyrae* y *Vanilla polylepsis* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El grupo de *Vanilla francoissii* lo forman las especies *Vanilla francoissii* y *Vanilla coursii*. El grupo de *Vanilla chalotii* lo forman las especies *Vanilla chalotii*, *Vanilla nigerica* y *Vanilla seretii* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El grupo de *Vanilla africana* está formado por *Vanilla acuminata*, *Vanilla africana*, *Vanilla crenulata*, *Vanilla hellei*, *Vanilla heterolopha*, *Vanilla ramosa* y *Vanilla zanzibarica*.

El grupo *Vanilla barbellata* lo forman las especies *Vanilla varkeri*, *Vanilla barbellata*, *Vanilla clariculata*, *Vanilla dilloniana* y *Vanilla poitaei* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). El grupo *Vanilla aphylla* se forma por las especies *Vanilla aphylla*, *Vanilla calopogon* y *Vanilla wightii* y por último, el grupo de *Vanilla phalaenopsis* lo forman las especies *Vanilla decaryana*, *Vanilla humblotii*, *Vanilla madagascariensis*, *Vanilla phalaenopsis*, *Vanilla perrieri*, *Vanilla roscheri* y *Vanilla walkeriae* (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

Sólo 15 de estas especies se encuentran reconocidas en México y Centroamérica (*Vanilla planifolia*, *Vanilla insignis*, *Vanilla costaricensis*, *Vanilla cribbiana*, *Vanilla dressleri*, *Vanilla martinezii* y *Vanilla sarapiquensis* *Vanilla calyculata*, *Vanilla hartii*, *Vanilla helleri*, *Vanilla inodora*, *Vanilla odorata*, *Vanilla phaeantha*, *Vanilla pompona* y *Vanilla trigonocarpa*) (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

*V. insignis* (Orchidaceae), es una angiosperma monocotiledónea (Hilu *et al.*, 2003), Pertenece al género *Vanilla*, del orden asparangale, del superorden lilianae, dentro de la subclase magnolidae, de la clase equisetopsita (Azeez, 2008). Es una hemiepífita vigorosa, de tallos floculantes subcilíndricos, con una notable ranura a lo largo de los entrenudos (probablemente para almacenamiento de agua de lluvia, ya que esta ranura se expande cuando los tejidos del tallo están completamente hidratados). Los tallos son rugosos-papilosos verde oscuro a verde olivo de 6 a 9 mm de grosor y de 10 a 17 cm de largo, con raíces terrestres pubescentes color pardo blanduzco de 2 a 3mm de grosor y raíces adventicias libres de forma cilíndrica color gris verdoso de 1mm de grosor, modificándose a forma semicilíndrica de 3 a 4mm de ancho al anclarse con el sustrato.

Sus hojas son elípticas, acanaladas y abruptamente acuminadas en el ápice, redondeadas en la base, con peciolo de hasta 11mm de largo y 4mm de ancho (Soto-Arenas y Dressler, 2010). La

inflorescencia es de 6 a 12 flores por racimo, con forma de candelabro, de 4 a 11cm de largo, con pedúnculos carnosos subcilíndricos ligeramente comprimidos, con raquis progresivamente esbelto hacia el ápice. La floración es sucesiva, de 1 a 3 flores abiertas a la vez, efímeras (de 8:00 a 14:00 horas, y comienzan a cerrar al medio día) muy vistosas, con sépalos pálidos color verde manzana, pétalos color crema y el labelo color blanco brillante, con el ápice verde, el callo verde, la columna blanca de 11 a 12.4cm de ancho y 11.9 cm de altura (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

## **Hipótesis**

### **General**

*Vanilla insignis* Ames (*Orchidaceae*) presenta variación entre poblaciones localizadas en diferentes condiciones biogeográficas del estado de Quintana Roo, México.

### **Particular**

El ambiente juega un papel importante en la variación morfológica y molecular de *Vanilla insignis* Ames (*Orchidaceae*)

## **Objetivos**

### **General**

Analizar la variación morfológica y molecular de *Vanilla insignis* Ames (*Orchidaceae*) del estado de Quintana Roo, México a fin de conocer la diversidad genética del pool genético secundario de *Vanilla planifolia* G. Jack.

### **Particulares**

- Realizar estudios de morfología en labelos de especímenes de *Vanilla insignis* Ames (*Orchidaceae*) del estado de Quintana Roo mediante análisis morfométrico.
- Conocer la variación genética de especímenes de *Vanilla insignis* Ames (*Orchidaceae*) del estado de Quintana Roo mediante su caracterización molecular.

## Literatura citada

- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* **27**: 617-631.
- Azeez S. 2008. Vanilla In: *Chemistry of Spices* CAB International, Wallingford 287-311.
- Balduzzi A. y Tomaseli R. 1979. “Carta fisionómico-estrutturale della vegetazione del Messico”. *Atti Istituto Botanico Laboratorio Crittogamico della Università Pavia*, s.6, XIII:3-43- Escala 1:4 000 000.
- Bory S., Da Silva D., Risterucci A.M., Grisoni M., Besse P., Duval M.F. 2008 Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: Polymorphism and transferability to other *Vanilla* species. *Scientia Horticulturae* **115**: 420-425.
- Brownell R.J. 2011. Fair Trade- the future of Vanilla? In D. Havkin-Frenkel & F. Belanger. *Handbook of Vanilla Science and Technology* 107-116.
- CONABIO 1998. “Precipitación total anual” México Escala 1:1 000 000.
- Darwin C. 1859. *The origin of species*. Feedbooks 1-463.
- Emigh T.H. y Goodman M.M. 1985. Multivariate analysis in nematode taxonomy. In: Barker K.R., Carter CC, Sasser J.N. Eds. *An advanced treatise on meloidogyne* **2**:197-204, Dept. of Plant Pathology, NCSU, North Carolina.
- Endress P. 1999. Symmetry in flowers-diversity and evolution. *International Journal of Plant Sciences* **160**: 3-23.
- Evans L.T. (1996) *The Domestication of Crop Plants. Crop evolution, adaptation and yield*, Cambridge University Press. Cambridge.
- Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J.J. 1995. The conservation of plant biodiversity.

- Galindo I., Castro S., Valdés M. 1990. “Radiación Solar Global Media Estacional III” en Energía: Producción, Consumo y Recursos Potenciales. VI.1.1. Escala 1:16 000 000. Atlas Nacional de México, Vol III. Instituto de Geografía UNAM. México.
- García E. 1990. “Rangos de humedad”. Extraído de Climas. IV.4.10. Atlas Nacional de México. Vol II. Escala 1:4 000 000. Instituto de Geografía UNAM. México.
- Govaerts R. 2003. *World Checklist of Monocotyledons Database*. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew ACCESS:1-71827.
- Hernández M.E. 1990. “Mayo: mes de máxima insolación” en Observatorios, Estaciones Meteorológicas e Insolación. IV.4.1. Atlas Nacional de México, Vol. II. Escala 1:8 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- Herrera-Cabrera B.E., Castillo-González F., Ortega-Pazkca R.A., Sánchez-González J.J., Goodman M.M. 2000. Caracteres para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: caso la raza Chalqueño. *Revista Fitotecnia Mexicana* **23**:335-354.
- Herrera-Cabrera BE, Castillo-González F, Sánchez-González JJ, Hernández-Casillas JM, Ortega-Pazkca RA, Goodman MM (2004) Diversidad del maíz chalqueño. *Agrociencia* **38**(2): 191-206.
- Herrera-Cabrera B.E., Delgado-Alvarado A. 2012 *Recursos genéticos uso y conservación. Apuntes mimeografiados de Recursos Genéticos y su Diversidad*. Colegio de Postgraduados-Campus Puebla. Puebla. México.
- Herrera-Cabrera B.E., Salazar-Rojas V.M., Delgado-Alvarado A., Campos-Contreras J., Cervantes-Vargas J. 2012. Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan region, México. *European Journal of environmental Sciences* **2**(1):37-44
- Hilu K.W., Borsch T., Muller K., Soltis D.E., Soltis P.S., Savolainen V., Chase M., Powell M., Alice L., Evans R., Sauquet H., Neinhuis C., Slotta T., Roher J., Chatrou L. 2003. Inference

- of angiosperm phylogeny based on matk sequence information. *American Journal of Botany* **90**:1758-1776.
- Hunter J. 1998. Key innovations and the ecology of macroevolution. *Tree***13**: 31-36.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI)-Instituto Nacional de Ecología (INE) 1996. “Uso de suelo y vegetación INEGI Agrupado por CONABIO” 1998. Escala 1:1 000 000. México.
- Kay K.M., Reeves R.G., Olmstead, Schemske D.W., 2005. Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Sostaceae): evidence of nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany***92**: 1899-1910.
- Lubinsky P. 2003. Conservation of wild Vanilla, In: Proceedings of Vanilla, First International Congress, Princeton, NJ 08540, New Jersey, USA, November 11-12.
- Lubinsky P., Cameron K.M., Molina M.C., Wong M., Andrzejewski S.L., Gómez-Pompa A., Kim S.C. 2008. Neotropical roots of a Polynesian spice: The hybrid origin of Tahitian vanilla, *Vanilla tahitiensis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany***95**(8): 1040-1047.
- Madery L.E. 1990. “Evapotranspiración real” en Hidrogeografía IV6.6. Atlas Nacional de México. Instituto de Geografía UNAM México. Vol. II. Escala 1:4 000 000.
- Maples-Vermeersch M. .1992. “Regímenes de humedad del suelo” en Hidrogeografía IV.6.2. Atlas Nacional de México Vol. II. Escala 1:4 000 000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Minoo D., Nirmal B.K., Ravindran P.N., Peter K.V. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Society of Horticulture* **108**: 414-422.
- Minoo D., Javakumar V.N., Veena S.S., Vimala J., Basha A., Saji K.V., Nirmal-Babu K., Peter K.V. 2007. Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related

- species as expressed by RAPD polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution* **55**(3):459-470.
- Parra V.M.R. 1954. "Recursos naturales ecosistemas y uso múltiple" en Cuevas, S.J. "Etnobotánica" (Notas del curso) Pág. 128. Depto. de Fitotecnia, Chapingo, Méx.
- Podolsky R.H. y Holtsford T.P. 1995. Population structure of morphological traits in *Clarkia, Dudleyana* I, comparison of Fst between allozymes and morphological traits. *Genetic* **140**:733-744.
- Powell W., Gordon M.C., Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plants Science* **1**: 215-222.
- Rafalsky J.A. y Tingey S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* **9**: 275-279.
- Rzedowski J (1990) "Vegetación Potencial". IV.8.2. Atlas Nacional de México. Vol II. ESCALA 1:4 000 000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Salazar-Rojas V.M., Herrera-Cabrera B.E., Delgado-Alvarado A., Soto-Hernández M., Castillo-González F., Cobos-Peralta M. 2011. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan región. *Genet Resour Crop Evol* **59**(5): 875-887
- Schlotterer C. y Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**: 2211-2215.
- Sharma A., Verma S.C., Saxena N., Chadda N., Singh N.P., Sinha A.K. 2006. Microwave and ultrasound assisted extraction of vanillin and its quantification by high performance liquid chromatography in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science* **29**: 613-619.

- Sostaric T., Boyce M.C., Spickett E.E. 2000. Analysis of the volatile components in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 5802-5807.
- Soto Arenas M.A. 1999 Informe final del Proyecto J101 Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín México, D.F.
- Soto-Arenas MA 2006. La vainilla. Biodiversitas Núm 66. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el uso y conocimiento de la biodiversidad. CONABIO, México.
- Soto-Arenas M.A., Dressler R.L. 2010. A revisión of the mexican and central american species of *Vanilla Plumier ex Miller* with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana* **9**(3): 285-354.
- Soto-Arenas M.A., Dressler R.L. 2010. A new infragetic classification and sinopsis of the genus *Vanilla Plum. Ex Mill. (Orcidaceae, Vanillinae)*. *Lankesteriana* **9**:355-398
- Tautz D. y Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**(10): 4127-4138.
- Toussain-Samat M. 2002. La vainilla en México una tradición con alto potencial. *Claridades Agropecuarias*.
- Wescott R.J., Cheetham P.S.J., Arraclough A.J.B. 1994 Use of organized viable vanilla plant aerial roots for the production of natural vanillin *Phytochemistry* **35**:135-138.
- Wilson P.M., Castellanos J.N., Houge J.D., Thomson W.S., Armbruster 2004. A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos* **104**: 345-361.
- Wilson P.M., Castellanos A.D., Wofle, Thomson J.D. 2006. Shifts between bee and bird pollination in penstemons. In: Waser N.M. y Ollerton J. Eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*, pp. 47-68, The University of Chicago Press, Chicago.

## CAPÍTULO 1

### VARIACIÓN MORFOLÓGICA DE *Vanilla insignis* (ORCHIDACEAE)

#### EN QUINTANA ROO, MÉXICO

*Vanilla insignis* posee mayor tolerancia a patógenos, fenómenos meteorológicos y menor contenido de vainillina pero similar aroma a *V. planifolia* J. silvestre. El objetivo del presente estudio fue conocer la variación morfológica infraespecífica de *V. insignis* mediante análisis del labelo de flores colectadas en el estado de Quintana Roo, México. El labelo está relacionado con características estructurales de la especie, interacciones bióticas y respuestas a heterogeneidad ambiental. Se colectaron 57 flores en Santa Elena (15), Laguna Guerrero (22), Caobas (4) y Huatusco (3) en el estado de Quintana Roo, y Tenampulco (6) y Iro de Mayo (7) en los estados de Puebla y Veracruz. Los sitios de colecta correspondieron a un gradiente altitudinal y de humedad del suelo. El labelo se diseccionó para su posterior análisis mediante morfometría, se le evaluaron 76 variables y se realizaron los análisis de varianza mediante diseño completamente al azar desbalanceado, análisis multivariado por componentes principales y análisis de conglomerados a través de agrupamiento jerárquico. Las variables analizadas del labelo de *V. insignis* fueron altamente significativas. El modelo explicó 88 % de la variación total estudiada con los tres primeros componentes principales. Se detectó variación infraespecífica. La región media del labelo tuvo mayor impacto en la diferenciación de cada morfotipo al explicar 56 % de la variación encontrada. El régimen de humedad del suelo y la altitud fueron los principales factores ambientales que ejercieron presión en *V. insignis* para la expresión de cuatro morfotipos florales detectados. Se identificó un morfotipo con similitud a *Vanilla planifolia*.

Palabras clave: ambiente, labelo, morfometría, recurso genético.

MORPHOLOGICAL VARIATION OF *Vanilla insignis* (ORCHIDACEAE)  
IN QUINTANA ROO, MÉXICO

*Vanilla insignis* has a higher tolerance to pathogens, weather events although lower vanillin content but similar aroma to wild *Vanilla planifolia*. The aim of this study was to determine the infraspecific morphological variation of *V. insignis* by analysis of the labellum of flowers collected from the state of Quintana Roo, Mexico. The labellum is related to structural characteristics of the species, biotic interactions and responses to environmental heterogeneity. Fifty-seven flowers were collected in Santa Elena (15), Laguna Guerrero (22), Caobas (4) and Huatusco (3) in the state of Quintana Roo, and Tenampulco (6) and Iro de Mayo (7) in the states of Puebla and Veracruz. The collection sites were related to an altitudinal and soil moisture gradient. The labellum was dissected for analysis by morphometry, which was assessed 76 variables and analysis of variance with unbalanced completely randomized design, multivariate principal component analysis and cluster analysis through hierarchical clustering were performed. Analyzed variables of the labellum were highly significant. The model explained 88 % of the total variation studied, with the first three principal components. Infraspecific variation was detected. The middle region of the labellum had a greater impact on the differentiation of each morphotype to explain 56% of the variation found. The soil moisture regime and altitude were the main environmental factors that brought pressure on *V. insignis* for the expression of four floral morphotypes detected. A morphotype was identified with similarity to *Vanilla planifolia*.

Keywords: environment, genetic resource, labellum, morphometry.

## 1.1 Introducción

El género *Vanilla* se conforma por 107 especies (Soto-Arenas y Dressler, 2010), de las cuales alrededor de 20 producen frutos aromáticos, entre ellas *V. insignis* (Lubinsky *et al.*, 2008). De acuerdo con la revisión taxonómica más reciente del género basada en caracteres morfológicos se reconoce una relación filogenética estrecha entre *V. insignis* y *V. planifolia*, por lo que se ubican taxonómicamente dentro del subgénero *Xanata* grupo *V. planifolia* (Soto-Arenas y Dressler, 2010). Particularmente se han reconocido características agronómicas importantes que no se encuentran en el germoplasma cultivado de *V. planifolia* como es mayor tolerancia a patógenos y cambios hídricos (Soto-Arenas, 1999). Y a pesar de presentar menor contenido de vainillina, su aroma es muy similar al del germoplasma de *V. planifolia* en estado silvestre (Salazar-Rojas *et al.*, 2011). por esta razón se considera que *V. insignis* es una especie prioritaria dentro del pool genético secundario de *V. planifolia*, de manera que el estudio de su variación es fundamental para el diseño y ejecución de estrategias de uso y conservación del género *Vanilla* en México.

*V. insignis* se distribuye en los bosques tropicales de Honduras, Belice, Guatemala y México (Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Chiapas, Tabasco, Oaxaca, Veracruz y Puebla) (Soto-Arenas y Dressler, 2010). Dado que la península de Yucatán alberga todos los tipos de vegetación tropical en el país, con excepción de la selva alta perennifolia (INEGI, 1996), se asume que dentro de esta región podría concentrarse la mayor proporción de poblaciones de *V. insignis*.

Para identificar variación infraespecífica a través de caracteres morfológicos es necesario evaluar aquellos que sean altamente heredables, es decir, menos sensibles a variación por efecto del ambiente (Herrera-Cabrera *et al.*, 2004). Estas características se han reconocido en las estructuras reproductivas, por lo que se consideran de mayor relevancia dentro de los criterios de clasificación (Emigh y Goodman, 1985; Podolsky y Holtsford, 1995; Herrera-Cabrera *et al.*,

2000). Ejemplo de estas estructuras son las flores, que han sido utilizadas en clasificación taxonómica (Podolsky y Holtsford, 1995; Salazar-Rojas *et al.*, 2010). La diversificación floral es moderada por las potencialidades y limitaciones estructurales de la especie, interacciones bióticas y respuestas a heterogeneidad ambiental, como cambios en temperatura y humedad del suelo, que puede presentarse en microclimas inclusive a pocos metros de distancia entre poblaciones (Shimono *et al.*, 2009).

En flores zigomorfas, la simetría es una característica adaptativa que ha permitido la diversificación de las especies (Hunter, 1998; Endress, 1999). Estas flores presentan un pétalo modificado (labelo) que está directamente relacionado con el polinizador, hecho que aumenta la especiación y disminuye el flujo génico (Wilson *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la forma de esta estructura es menos susceptible a variación por efecto ambiental (Catling, 1990; Ackerman y Galarza-Pérez, 1991; Borba *et al.*, 2007; Salazar-Rojas *et al.*, 2010).

Por lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo conocer la variación morfológica de *Vanilla insignis* a través del análisis del labelo de flores colectadas en diferentes condiciones ambientales del estado de Quintana Roo, México.

## 1.2 Materiales y Métodos

Durante abril de 2012 se colectaron 57 flores de *V. insignis* en 13 esquejes de las localidades de Santa Elena (3), Laguna Guerrero (5), Caobas (1) y Huatusco (1) en Quintana Roo, México, *V. insignis* (1) y *V. planifolia* (1) en Tenampulco, Puebla y *V. planifolia* (1) en el ejido 1ro de Mayo en Veracruz. Las flores de *Vanilla* ajenas a la península se consideraron como grupo externo para reforzar el análisis de variación morfométrica. La especie, localidad de procedencia, colecta, localización geográfica y número de repeticiones se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1** Vainillas evaluadas de las especies *insignis* y *planifolia* colectadas en diferentes localidades.

Especie	Localidad	Longitud*	Latitud*	Colecta (No)	Repeticiones (No)
<i>V. insignis</i>	Santa Elena	-88.39309	18.49429	1	4
				2	4
				3	7
<i>V. insignis</i>	Laguna Guerrero	-88.2667	18.68817	5	3
				8	8
				9	3
				15	3
				16	5
<i>V. insignis</i>	Caobas	-89.10422	18.44485	11	4
<i>V. insignis</i>	Huatusco	-88.84255	18.87066	13	3
<i>V. insignis</i>	Tenampulco	-97.40749	20.17031	18	3
<i>V. planifolia</i>	1ro de Mayo	-97.28221	20.29559	19	3
				22	7

\*Coordenadas UTM

Las localidades de colecta fueron seleccionadas por presentar diferente altitud y régimen de humedad del suelo, y mostrar constante las variables de temperatura, clima, radiación solar media y precipitación total anual. Las características ambientales de los sitios de colecta se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2** Estratificación de las condiciones ambientales en los sitios de colecta.

Localidad	Clima	Precipitación total anual (mm)	Régimen de humedad del suelo	Radiación solar media ( $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ )	Altitud (msnm)
Santa Elena	Aw1(x')	1200-1500	Ácuico	82 a 87	10
Laguna Guerrero	Aw1(x')	1200-1500	Ústico	82 a 87	10
Caobas	Aw1(x')	1200-1500	Ústico	78 a 82	150
Huatusco	Aw1(x')	1200-1500	Xérico	78 a 82	100
Tenampulco	Am	2000-2500	Údico	69 a 73	210
Iro de Mayo	Am	2000-2500	Údico	69 a 73	60

Construido con datos de CONABIO (2013)

La temperatura media anual fue de 22°C en todas las localidades de colecta

*Determinación de caracteres evaluados.* Las flores colectadas se almacenaron en solución preservadora (etanol 27%, ácido láctico 4%, ácido benzoico 3%, glicerina 3% y agua destilada 63%) dentro de recipientes de vidrio de 125 ml previamente etiquetados (Salazar-Rojas *et al.*, 2010). El labelo de las flores colectadas de *V. insignis* y *V. planifolia* fue diseccionado de la columna, sépalos y pétalos. Posteriormente se extendió en una placa de vidrio esmerilado con ayuda de un par de agujas de canevá, una lámpara con lupa y un estereoscopio para mayor precisión al corregir los dobleces del contorno del labelo. Debido a que la toma de las variables se realizó de forma digital utilizando una imagen fotográfica del labelo, éste se tiñó con azul de metileno a 0.08% para resaltar su contorno (Figura 1).

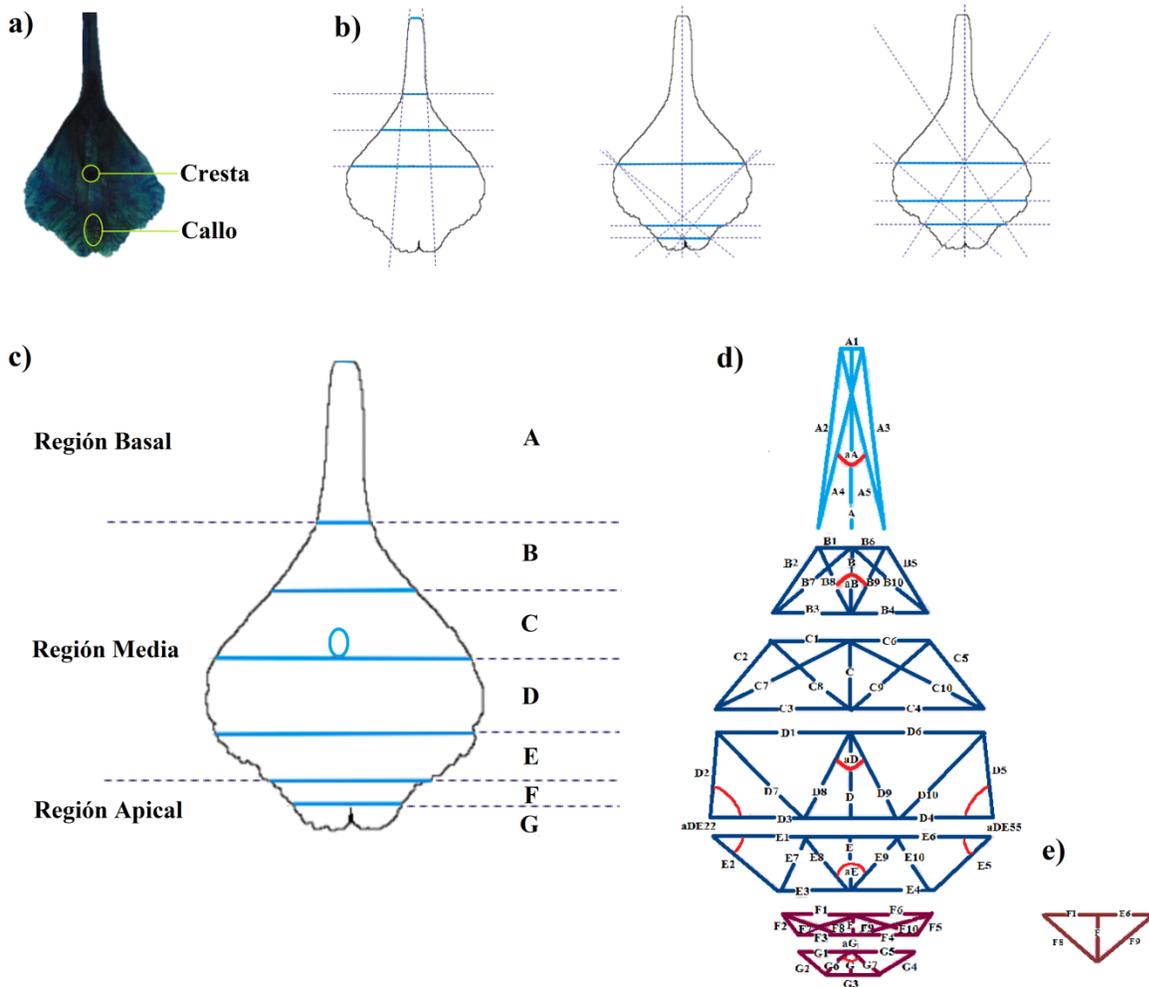
Al momento de realizar la toma fotográfica del labelo, se colocó una escala milimétrica para conocer su tamaño real. La imagen se estampó y se dividió, bajo un soporte biológico, en tres regiones (basal, media y apical) y siete secciones (A, B C, D, E, F y G), en las cuales se realizaron y tomaron datos de 69 trazos y siete ángulos que se utilizaron como variables morfológicas (Figura 1), con la ayuda del programa Corel Draw® Graphics Suite X4 (COREL 2007). Los datos obtenidos se almacenaron en una matriz realizada en Exel (Microsoft Exel 2010).

La región basal sección A correspondió a la parte del labelo unida a la columna y se formó con siete variables (A, A1, A2, A3, A4, A5 y aA). Para construir las secciones B y C de la región media, se colocó una línea horizontal por debajo de la cresta y otra línea horizontal a la mitad del espacio entre esta línea y la región basal. La sección B se creó con 12 variables (B, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10 y aB) y la sección C se integró con 11 variables (C, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C10). Para la obtención de la sección F de la región apical se trazó una línea al inicio de los lóbulos apicales y una línea guía perpendicular que unió el centro de ésta con el centro de la línea colocada debajo de la cresta. Posteriormente se trazaron cuatro líneas guía en forma de X y al unir los vértices se obtuvo otra línea divisora de ésta sección, la cual se integró por 11 variables (F, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9 y F10). Para la obtención de las secciones D y E de la región media, se trazaron cuatro líneas guía en forma de X dentro del espacio restante de la región media. La unión de los vértices permitió separar ambas secciones.

La región media sección D se formó con 14 variables (D, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, aD, aDE22 y aDE55) y la región media sección E la crearon 12 variables (E, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 y aE). Los lóbulos apicales formaron la sección G de la región apical y la integraron nueve variables (G, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 y aG). En caso de no presentar región apical completa, ésta se conformó únicamente con las variables F, F1, F6, F8 y F9 (Figura 1).

*Análisis Estadístico.* Se realizó un análisis de varianza para conocer la variación morfológica entre los esquejes mediante diseño en bloques completamente al azar desbalanceado, con el software estadístico SAS v 9.3 (SAS, 2011). Con el objetivo de interpretar la diversidad biológica de *V. insignis*, se clasificaron los individuos dentro de grupos similares mediante dos métodos numéricos basados en características morfológicas (Herrera-Cabrera *et al.*, 2000). Se realizó un estudio multivariado mediante componentes principales y análisis por conglomerados mediante

agrupamiento jerárquico. Ambos métodos se basaron en las medias de 11 esquejes de *V. insignis* y dos de *V. planifolia* para las 76 variables. El programa utilizado fue SAS v 9.3 (SAS, 2011).



**Figura 1** a) Labelo de *V. insignis* teñido con azul de metileno en el que se ubican cresta y callo. b) Líneas guía utilizadas para la formación de siete secciones. c) Esquema que representa la división de las regiones basal, media y apical, y las secciones A, B, C, D, E, F y G. d) Esquema en el cual se muestran 69 trazos y siete ángulos utilizados como variables. e) Esquema de las variables F, F1, F6, F8 y F9, en labelos carentes de región apical completa.

### 1.3 Resultados

*Análisis de Varianza.* El análisis morfométrico realizado en el labelo de flores de *V. insignis* determinó que los caracteres evaluados para el estudio presentaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.0001$ ) y significativas (variable aB) ( $P \leq 0.05$ ). Los valores de los coeficientes de variación (Cv) de las 76 variables analizadas en el labelo de *V. insignis* permitieron identificar dos grupos. El primero lo integraron 67 variables cuyo Cv presentó un rango entre 4.07 y 15.29%. El segundo lo formaron nueve variables con Cv entre 16.32 y 33.94%. Se observó que variables con Cv bajo mostraron valores elevados en su media. Por el contrario, variables con Cv elevado mostraron medias con valores bajos. Ejemplo de esto fue la variable F7. En variables de difícil medición, como el caso de los ángulos, mostraron Cv de mayor valor, como la variable aB, que fue la de menor significancia ( $P \leq 0.05$ ). Esto se debe a que a mayor Cv, menor es la representatividad de la media (Fernández-Fernández *et al.*, 2002). Lo mismo sucedió con variables ausentes en algunos morfotipos, tal como F2 y F5, que al presentar valores de “0” en la media muestral de los esquejes 11 y 18, el Cv no fue válido e incrementó el valor de toda la población (Vargas-Sabadías *et al.*, 1996) (Cuadro 3).

**Cuadro 3** Promedios, coeficientes de variación y cuadrados medios de las 76 variables evaluadas en el labelo de flores colectadas en 11 esquejes de *Vanilla insignis* y dos de *V. planifolia*.

Región	Variable	Medias	Coeficientes de Variación	Cuadrados Medios		
				Colecta	Error	
<b>Basal</b>	A	27.16	7.88	107.96***	4.58	
	A1	3.95	14.79	2.36***	0.34	
	A2	27.29	9.14	107.34***	6.21	
	A3	26.99	7.66	112.24***	4.27	
	A4	27.07	8.89	101.00***	5.80	
	A5	27.18	7.71	117.98***	4.39	
	aA	26.68	8.96	20.49***	5.71	
	B	11.91	7.92	14.88***	0.89	
	B1	4.42	11.23	3.28***	0.25	
	B2	11.68	13.11	19.26***	2.35	
	B3	12.16	8.35	20.01***	1.03	
	B4	12.24	10.14	15.54***	1.54	
	B5	12.00	10.66	11.55***	1.63	
	B6	4.45	11.10	3.36***	0.24	
	B7	12.53	6.93	21.20***	0.75	
	B8	11.85	10.21	20.84***	1.46	
	B9	11.98	10.25	13.73***	1.51	
	B10	12.97	7.50	15.53***	0.95	
	aB	41.31	33.94	71.17*	33.16	
	<b>Media</b>	C	11.98	7.75	15.68***	0.86
		C1	12.16	8.35	20.01***	1.03
		C2	11.98	7.83	15.88***	0.88
C3		19.84	6.07	66.28***	1.45	
C4		19.84	6.06	66.07***	1.45	
C5		11.90	8.02	15.38***	0.91	
C6		12.28	10.03	14.85***	1.51	
C7		19.60	7.17	66.64***	1.97	
C8		12.87	6.14	20.08***	0.62	
C9		12.69	7.34	17.38***	0.87	
C10		20.09	5.59	65.21***	1.26	
D		12.85	11.72	29.52***	2.27	
D1		19.84	6.07	66.28***	1.45	
D2		12.67	10.00	32.73***	1.60	
D3		20.70	5.56	44.38***	1.32	
D4	20.68	6.18	46.61***	1.63		
D5	12.66	10.19	31.83***	1.66		
D6	19.84	6.06	65.75***	1.45		
D7	13.60	10.11	37.49***	1.89		

\* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$

Continuación Cuadro 3

Región	Variable	Medias	Coeficientes de Variación	Cuadrados Medios	
				Colecta	Error
<b>Media</b>	<b>D8</b>	12.85	12.29	38.11***	2.50
	<b>D9</b>	12.84	12.17	37.37***	2.44
	<b>D10</b>	13.65	9.56	41.54***	1.70
	<b>aD</b>	62.42	10.21	350***	40.60
	<b>aDE22</b>	124.63	4.07	452.97***	25.67
	<b>aDE55</b>	125.83	4.24	362.18***	28.51
	<b>E</b>	7.69	15.29	13.32***	1.38
	<b>E1</b>	20.69	5.50	44.32***	1.29
	<b>E2</b>	9.57	12.12	17.58***	1.34
	<b>E3</b>	11.61	9.79	18.43***	1.29
	<b>E4</b>	11.54	8.73	18.73***	1.02
	<b>E5</b>	9.41	12.40	13.69***	1.36
	<b>E6</b>	20.69	6.30	46.70***	1.70
	<b>E7</b>	7.34	8.84	7.52***	0.42
	<b>E8</b>	7.82	6.02	5.74***	0.22
	<b>E9</b>	7.87	6.25	7.70***	0.24
	<b>E10</b>	7.46	7.88	7.06***	0.35
<b>aE</b>	89.41	6.03	231.01***	29.04	
<b>Apical</b>	<b>F</b>	5.07	13.93	3.59***	0.50
	<b>F1</b>	11.61	9.80	18.41***	1.29
	<b>F2</b>	4.47	16.32	14.79***	0.53
	<b>F3</b>	7.03	9.14	49.77***	0.41
	<b>F4</b>	7.21	9.73	52.20***	0.49
	<b>F5</b>	4.33	25.04	14.00***	1.17
	<b>F6</b>	11.55	8.73	18.55***	1.02
	<b>F7</b>	6.93	16.90	43.08***	1.37
	<b>F8</b>	11.73	12.35	22.94***	2.10
	<b>F9</b>	11.47	9.04	15.61***	1.08
	<b>F10</b>	7.39	9.53	57.09***	0.50
	<b>G</b>	3.14	14.21	14.63***	0.20
	<b>G1</b>	7.07	8.79	51.07***	0.39
	<b>G2</b>	4.34	17.88	24.53***	0.60
	<b>G3</b>	5.95	22.49	33.32***	1.79
	<b>G4</b>	4.21	18.51	21.66***	0.61
	<b>G5</b>	7.23	9.56	51.88***	0.48
<b>G6</b>	3.68	18.51	13.99***	0.47	
<b>G7</b>	3.54	20.64	12.80***	0.53	
<b>aG</b>	77.88	14.54	5714.72***	128.13	

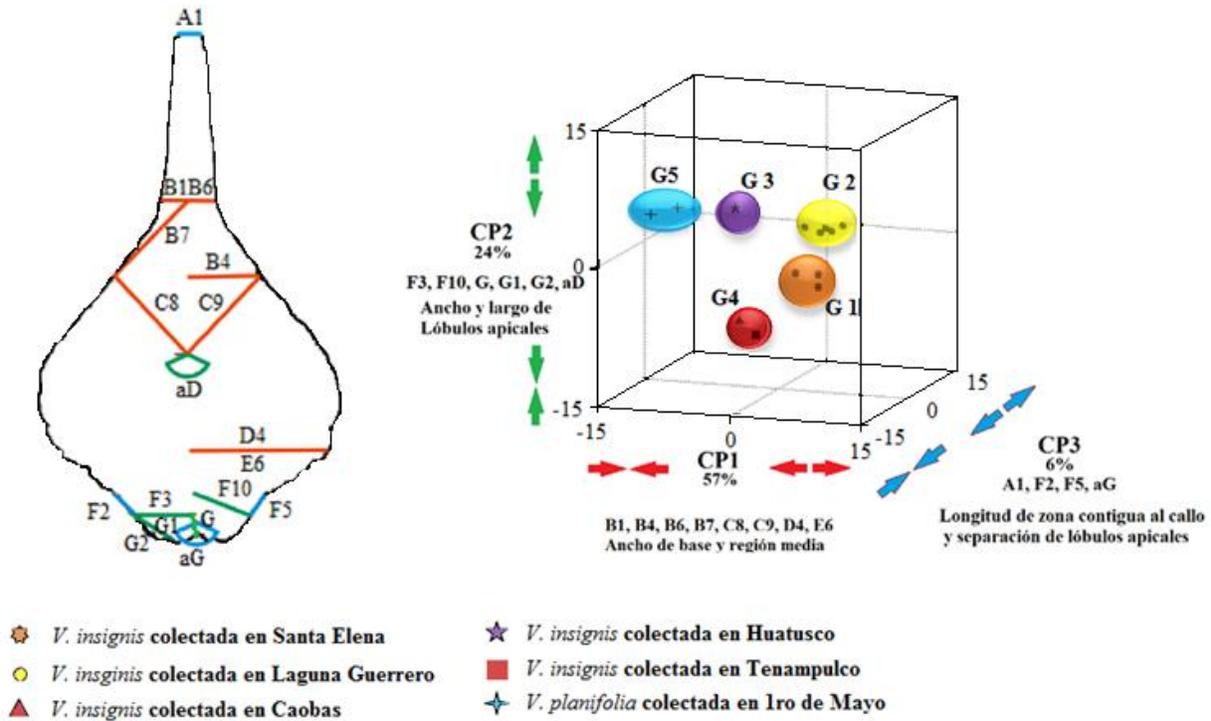
\* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$

*Distribución de la Diversidad.* La dispersión de 11 esquejes de *V. insignis* y dos de *V. planifolia* en el espacio determinado por los tres primeros componentes principales (CP1, CP2 y CP3), permitió conocer 87.9% de la variación acumulada con 76 variables evaluadas. Las variables de mayor peso involucradas en el CP1, que explicó 57% de la variación, fueron B1 = 0.145, B4 = 0.144, B6 = 0.146, B7 = 0.146, C8 = 0.145, C9 = 0.145, D4 = 0.144 y E6 = 0.144. El CP2 explicó 24% de la variación encontrada y las variables más importantes fueron aD = 0.196, F3 = 0.193, F10 = 0.193, G = 0.204, G1 = 0.193 y G2 = 0.198. El CP3 explicó 6% de la variación encontrada y se asoció con la forma de la zona contigua al callo del labelo con las variables F2 = 0.224, F5 = 0.250, además del ancho de la base del labelo con la variable A1= 0.258 y la extensión de los lóbulos apicales con la variable aG = 0.388 (Cuadro 4).

**Cuadro 4** Autovalores, Vectores propios y proporciones acumuladas de la variación explicada por las variables de mayor impacto en los primeros tres componentes principales de la caracterización de 11 esquejes de *V. insignis* y dos de *V. planifolia* (en negritas las variables que más impactan en cada componente principal).

Variable	Vectores Propios			Variable	Vectores Propios		
	CP1	CP2	CP3		CP1	CP2	CP3
<b>A1</b>	0.099	-0.028	<b>0.258</b>	<b>E6</b>	<b>0.144</b>	-0.015	-0.046
<b>B1</b>	<b>0.145</b>	0.025	0.059	<b>F2</b>	0.028	0.178	<b>0.224</b>
<b>B4</b>	<b>0.144</b>	0.009	-0.079	<b>F3</b>	0.076	<b>0.193</b>	0.087
<b>B6</b>	<b>0.146</b>	0.018	0.055	<b>F5</b>	0.032	0.168	<b>0.250</b>
<b>B7</b>	<b>0.146</b>	-0.017	-0.035	<b>F10</b>	0.075	<b>0.193</b>	0.081
<b>C8</b>	<b>0.145</b>	0.002	-0.077	<b>G</b>	0.065	<b>0.204</b>	-0.037
<b>C9</b>	<b>0.145</b>	-0.026	-0.003	<b>G1</b>	0.076	<b>0.193</b>	0.085
<b>D4</b>	<b>0.144</b>	-0.014	-0.049	<b>G2</b>	0.067	<b>0.198</b>	0.012
<b>aD</b>	-0.035	<b>0.196</b>	-0.144	<b>aG</b>	0.018	0.097	<b>0.388</b>
<b>Auto valor</b>	43.372	18.701	4.787				
<b>Variación de la proporción</b>	0.570	0.246	0.063				
<b>Variación acumulada</b>	0.570	0.816	0.879				

Con la gráfica de los primeros tres componentes se observaron cuatro grupos de *V. insignis* y uno de *V. planifolia* (Figura 2). El primer grupo se localizó dentro del cuadrante positivo-negativo-positivo (esquejes de Santa Elena) y se caracterizó por la presencia de flores con el labelo ancho y largo, lóbulos apicales pequeños y amplia zona contigua al callo. El segundo grupo se localizó dentro del cuadrante positivo-positivo-negativo (esquejes de Laguna Guerrero) y se caracterizó por la presencia de flores con el labelo ancho y largo, lóbulos apicales grandes y reducida zona contigua al callo. El tercer grupo se localizó dentro del cuadrante negativo-positivo-positivo (esqueje de Huatusco) y se caracterizó por la presencia de flores con el labelo angosto y largo, lóbulos apicales grandes y amplia zona contigua al callo. El cuarto grupo se localizó dentro del cuadrante negativo-negativo-negativo (esquejes de Caobas y Tenampulco) y se caracterizó por la presencia de flores con labelo angosto y por carecer tanto de lóbulos apicales como de zona contigua al callo. El quinto grupo se localizó dentro del cuadrante negativo-positivo-positivo (grupo externo de *V. planifolia*) y se caracterizó por la presencia de flores con el labelo angosto y pequeño, lóbulos apicales grandes y amplia zona contigua al callo (Figura 2).



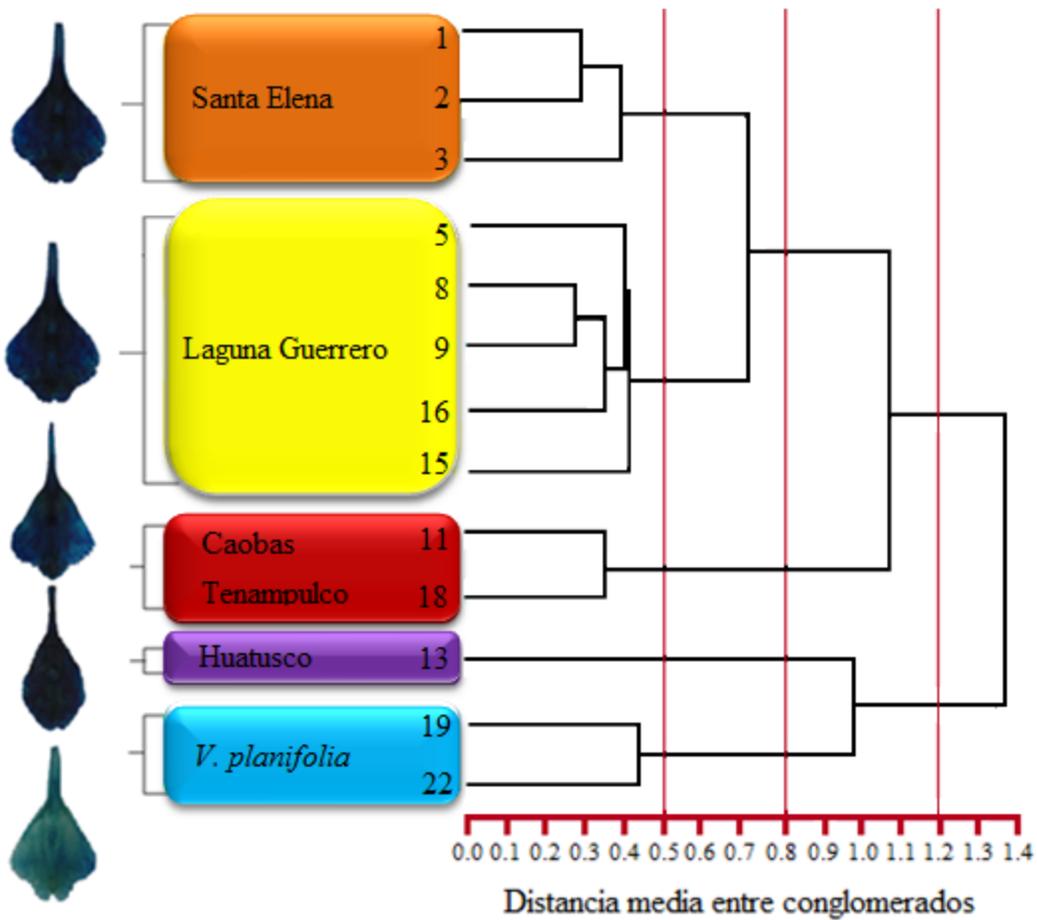
**Figura 2** Variables de mayor peso en cada componente principal y dispersión de 11 esquejes de *V. insignis* y dos de *V. planifolia* en función de los primeros tres componentes principales de 76 caracteres evaluados. El primer grupo se formó con los esquejes de Santa Elena. El segundo grupo lo conformaron esquejes de Laguna Guerrero. El tercer grupo lo integró el esqueje de Huatusco. El cuarto grupo se formó con esquejes de Caobas y Tenampulco. Los esquejes de *V. planifolia* formaron el quinto grupo. En el labelo se muestran los caracteres que mayor peso tienen por componente principal.

*Agrupación de la Diversidad.* Con el análisis de conglomerados mediante agrupamiento jerárquico de 11 esquejes de *V. insignis* y dos de *V. planifolia* utilizadas como grupo externo, se observaron dos agrupaciones en función del tamaño del labelo a una distancia euclidiana de 1.2 (Figura 3). El grupo de la parte superior se integró por esquejes con el labelo ancho (colectadas en Santa Elena,

Laguna Guerrero, Caobas y Tenampulco), mientras el conjunto de la parte inferior se agrupó esquejes con el labelo angosto (colecta de Huatusco y de *V. planifolia*).

A una distancia euclidiana de 0.8 los esquejes se distribuyeron dentro de cuatro grupos (Figura 3). De arriba hacia abajo, el primer conjunto unió esquejes con flores de labelo ancho y presencia de lóbulos apicales (Santa Elena y Laguna Guerrero). El segundo grupo se conformó con esquejes que presentaron labelos anchos y por carecer tanto de lóbulos apicales como de zona contigua al callo (Caobas y Tenampulco). El tercer conjunto agrupó esquejes con labelos angostos, lóbulos apicales grandes sin separación entre ellos y amplia zona contigua al callo (Huatusco). Finalmente el cuarto grupo unió esquejes con labelo angosto, lóbulos apicales grandes, separados entre sí y amplia zona contigua al callo (grupo externo de *V. planifolia*).

Posteriormente, a una distancia euclidiana de 0.5 los esquejes analizados formaron cinco grupos, tres de la distancia a 0.8 y dos producto de la separación, en el primer conjunto, de los esquejes de Santa Elena y Laguna Guerrero. La agrupación superior se caracterizó por la presencia de labelos anchos, lóbulos apicales grandes y estrecha zona contigua al callo (esquejes de Santa Elena). La agrupación inferior se caracterizó por la presencia de labelos anchos, lóbulos apicales pequeños y amplia zona contigua al callo (esquejes de Laguna Guerrero) (Figura 3).



**Figura 3** Análisis por conglomerados mediante agrupamiento jerárquico, construido con el promedio de 76 variables analizadas en 13 individuos. Se observa a una distancia media entre conglomerados de 0.5 cuatro morfotipos de *V. insignis* y un morfotipo de *V. planifolia*.

#### 1.4 Discusión

Se observó que el régimen de humedad del suelo y la altitud de los sitios de colecta se relacionaron con el tamaño y forma del labelo. Los esquejes de *V. insignis* de Santa Elena, Laguna Guerrero y Caobas, con régimen de humedad superior a 180 días de suelo inundado, mostraron mayor tamaño en la región basal y media del labelo, mientras las flores del esqueje de

*V. insignis* de Huatusco, con régimen de humedad del suelo inferior a 180 días, presentaron un morfotipo de menor dimensión, parecido a *V. planifolia* colectada en condiciones de luminosidad baja (69 a 73  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ ) similar a las condiciones donde se colectó *V. insignis* de Huatusco (78 a 82  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

En la región apical del labelo, se observó que a menor altitud del sitio de colecta, mayor tamaño de los lóbulos apicales y viceversa. Los esquejes de Santa Elena y Laguna Guerrero, con una altitud de 10 msnm, mostraron similitud en el tamaño y forma de los lóbulos apicales. El esqueje de Huatusco, con una altitud de 100 msnm, mostró labelos más angostos que los del grupo anterior y finalmente, los de Caobas y Tenampulco, con altitudes de 150 y 210 msnm, respectivamente, carecieron de estas estructuras.

Estas variaciones podrían ser resultado de un proceso microevolutivo (Herrera *et al.*, 2006; Hodgins y Barret, 2008), en que la supervivencia de un ente silvestre promueve una indispensable adaptación al entorno, reflejada en variación genética acumulativa, que contrasta entre poblaciones a través del tiempo en función del ambiente en que se desarrolla (Frankel, 1995; Sckemske y Bierzychudek, 2001; Armbruster, 2002; Judd *et al.*, 2007).

Si bien las estructuras reproductivas son menos susceptibles a estos cambios por efecto del ambiente (Herrera-Cabrera *et al.*, 2000), se ha documentado variación fenotípica en caracteres altamente heredables (Frazee y Marquis, 1994). Esto se debe a que la presión selectiva entre hábitats es afectada con barreras que impiden el flujo génico o intercambio de polen (Shimono *et al.*, 2009). Ejemplo de lo anterior, son los estudios de heterogeneidad ambiental temporal (Vogler *et al.*, 1999; Smichtt *et al.*, 2003; Rihimaki y Savolainen, 2004) que han demostrado variación en polen, óvulos, tamaño y forma de flores e inflorescencias en *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae) (Vogler *et al.*, 1999), variación infraespecífica en el color de la flor por efecto del ambiente en *Calceolaria uniflora* (Mascó *et al.*, 2004), o lo observado en flores de *Bletia*

*purpurea* (Orchidaceae), especie de mayor distribución del género *Bletia*, en que la variación morfológica detectada en uno de los sitios de colecta fue tal que un morfotipo encontrado se propuso como nueva especie *B. riparia* (Palestina y Sosa, 2002).

Por otra parte, un estudio de variación infraespecífica realizado en *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae) no reportó variación en estructuras reproductivas de individuos colectados en diferentes sitios (Borba *et al.*, 2007), debido probablemente a que dicha caracterización se realizó dando mayor peso a variables que describían sépalos y pétalos principalmente, y solo dos caracteres que explicaban el largo y ancho del labelo. Él cual es una estructura más estable (Salazar-Rojas *et al.*, 2010) en orquídeas principalmente (Ackerman *et al.*, 1991) y que ha tenido aplicación en estudios sistemáticos (Podolsky y Holtsford, 1995). En otros trabajos se menciona variación infraespecífica por efecto del ambiente, aunque no fueron utilizados caracteres altamente heredables, como lo observado en *Drias octopetala* (Rosaceae) (Max *et al.*, 1999).

## 1.5 Conclusiones

El análisis morfométrico realizado en labelos de *Vanilla insignis* determinó que existe variación infraespecífica morfológica en la orquídea en el estado de Quintana Roo, México.

Se estableció que las principales variables que explican la formación de los cuatro morfotipos en *V. insignis* son el ancho de la base y región media del labelo, el tamaño y forma de los lóbulos apicales y el tamaño y forma de la zona contigua al callo.

El régimen de humedad del suelo y la altitud fueron los principales factores ambientales que ejercieron presión en *V. insignis* para la expresión de los cuatro morfotipos florales detectados.

Con los primeros tres componentes principales se explicó 88% de la variación de las variables analizadas y se observó la formación de cuatro grupos morfológicos de *V. insignis* y uno de *V.*

*planifolia*. El análisis de conglomerados confirmó la formación de los cuatro morfotipos de *V. insignis*.

### **Literatura Citada**

- Ackerman J.D. y Galarza-Pérez M. 1991. Patterns and maintenance of extraordinary variation in the Caribbean orchid *Tolumnia (Oncidium) Variegata*. *Systematic Botany***16**(1):182-194.
- Armbruster W.S. 2002. Can indirect selection and genetic context contribute to trait diversification? A transition probability study of blossom color evolution in two genera. *Journal of Evolutionary Biology***15**:468-486.
- Borba E.L., Funch R.R., Ribeiro P.L., Smidt E.C., Silva-Pereira V. 2007. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Systematics and Evolution***267**:129-146.
- Catling PM. 1990. *Malaxis salazarii*, a new species from Mexico and northern Mesoamerica. *Orquidea***12**(1): 93-104.
- COREL (2007) CorelDRAW® Graphics Suite X4.
- Emigh T.H. y Goodman M.M. 1985. Multivariate analysis in nematode taxonomy. In: Barker K.R., Carter CC, Sasser J.N. Eds. *An advanced treatise on meloidogyne***2**:197-204, Dept. of Plant Pathology, NCSU, North Carolina.
- Endress P. 1999. Symmetry in flowers-diversity and evolution. *International Journal of Plant Sciences***160**: 3-23.
- Fernández-Fernández S. Cordero-Sánchez J.M. Córdoba A. María-Cordero J. Córdoba-Largo A. 2002. *Estadística Descriptiva*. Esic Market.

- Franco T.L. e Hidalgo R. 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia.
- Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J.J. 1995. *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press.
- Frazer J.E. y Marquis R.J. 1994. Environmental contribution to floral trait variation in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *American Journal of Botany* **81**: 206-215.
- Herrera-Cabrera B.E., Castillo-González F., Ortega-Pazkca R.A., Sánchez-González J.J., Goodman M.M. 2000. Caracteres r para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: caso la raza Chalqueño. *Revista Fitotecnia Mexicana* **23**:335-354.
- Herrera-Cabrera B.E., Castillo-González F., Sánchez-González J.J., Hernández-Casillas J.M., Ortega-Pazkca R.A., Major-Goodman M. 2004 Diversidad del maíz Chalqueño. *Agrociencia* **38**: 191-206.
- Herrera C.M., Castellanos M.C., Medrano M. 2006. Geographical context of floral evolution: Toward and improved research programme in floral diversification. In: Harder L.D. y Barret S.C.H. Eds. *Ecology and evolution of flowers*. pp. 278-294, Oxford University Press, New York.
- Hodgins K.A. y Barret S.C.H. 2008. Geographic variation in floral morphology and style-morphations in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany* **95**(2): 185-195.
- Hunter J. 1998. Key innovations and the ecology of macroevolution. *Tree* **13**: 31-36.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI)-Instituto Nacional de Ecología (INE) 1996. "Uso de suelo y vegetación INEGI Agrupado por CONABIO" (1998) Escala 1:1 000 000. México.

- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. 2007. *Plants systematics. A phylogenetic approach*. Sinauer Associates Inc. Sunderland.
- Kay K.M., Reeves R.G., Olmstead, Schemske D.W., 2005. Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Sostaceae): evidence of nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* **92**: 1899-1910.
- Lubinsky P. 2003. Conservation of wild Vanilla, In: Proceedings of Vanilla, First International Congress, Princeton, NJ 08540, New Jersey, USA.
- Lubinsky P., Cameron K.M., Molina M.C., Wong M., Andrzejewski S.L., Gómez-Pompa A., Kim S.C. 2008. Neotropical roots of a Polynesian spice: The hybrid origin of Tahitian vanilla, *Vanilla tahitiensis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **95**(8): 1040-1047.
- Mascó M., Noy-Meir I., Sérsic A.N. 2004. Geographic variation in flower color patterns within *Calcolaria uniflora* Lam. In Southern Patagonia. *Plant Systematics and Evolution* **244**: 77-91.
- Max K.N., Mouchaty S.K., Schwaegerle K.E. 1999. Allozyme and Morphological variation in two subspecies of *Dryas octopetala* (Rosaceae) in Alaska. *American Journal of Botany* **86**(11): 1637-1644.
- Microsoft Exel 2010. Microsoft Office Professional Plus 2010.
- Palestina R.A. y Sosa V. 2002. Morphological variation in populations of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) and description of the new species *B. riparia*. Brittonia. *The New York Botanical Garden Press* **54**(2): 99-111.
- Podolsky R.H. y Holtsford T.P. 1995. Population structure of morphological traits in *Clarkia*, *Dudleyana* I, comparison of Fst between allozymes and morphological traits. *Genetic* **140**:733-744.

- Rihimaki M. y Savolainen O. 2004. Environmental And genetic effects on flowering differences between northern and southern populations of *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **91**(7): 1036-1045.
- SAS (2011) SAS version 9.3 SAS Institute Inc. North Carolina.
- Salazar-Rojas V.M., Herrera-Cabrera B.E., Soto-Arenas M.A., Castillo-Gonzalez F. 2010. Morphological variation in *Laelia anceps* subsp. *Dawsonii* f. *chilapensis* Soto-Arenas (Orchidaceae) in traditional home gardens of Chilapa, Guerrero, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* **57**:543-552.
- Salazar-Rojas V.M., Herrera-Cabrera B.E., Delgado-Alvarado A., Soto-Hernández M., Castillo-González F., Cobos-Peralta M. 2011. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution* **59**(5): 875-887.
- Schmitt J., Stinchcombe J.R., Shane-Heschel M., Huber H. 2003. The adaptive evolution of plasticity: Phytochrome-mediated shade avoidance responses. *Integrative and Comparative Biology* **43**: 459-469.
- Schemske D.W. y Bierzychudek P. 2001. Perspective: evolution of flower color in the desert annual *Linanthus parryae*; wright revisited. *Evolution* **55**:1269-1282.
- Shimono Y., Watanabe M., Hirao A.S., Wada N., Kudo G. 2009. Morphological and genetic variations of *Potentilla matsumurae* (Rosaceae) between fellfield and snowbed populations. *American Journal of Botany* **96**(4): 728-737.
- Soto-Arenas M.A. 1999. Informe final del Proyecto J101 Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín, México, D.F.
- Soto-Arenas M.A. y Dressler R.L. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. Ex Mill. (Orchidaceae, Vanillinae). *Lankesteriana* **9**(3): 355-398.

Vargas-Sabadías A. 1996. *Estadística descriptiva e inferencial*. Universidad de Castilla La Mancha.

Vogler D.W., Peretz S., Stephenson A.G. 1999. Floral plasticity in an iteroparous plant: The interactive effects of phenotype, environment, and ontogeny in *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae). *American Journal of Botany* **86**(4): 482-494.

Wilson P.M., Castellanos J.N., Houge J.D., Thomson W.S., Armbruster 2004. A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos* **104**: 345-361.

Wilson P.M., Castellanos A.D., Wofle, Thomson J.D. 2006. Shifts between bee and bird pollination in penstemons. In: Waser N.M. y Ollerton J. Eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*, pp. 47-68, The University of Chicago Press, Chicago.

## CAPÍTULO 2

### VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Vanilla insignis* (ORCHIDACEAE)

#### EN QUINTANA ROO, MÉXICO

El objetivo del presente estudio fue conocer la variación morfológica y molecular de colectas de *V. insignis* realizadas en un gradiente altitudinal y de humedad del suelo en Quintana Roo, México. Para el análisis morfológico se utilizó el labelo de 13 colectas procedentes de Santa Elena (3), Laguna Guerrero (5), Caobas (1) y Huatusco (1) en el estado de Quintana Roo, y Tenampulco (1) y 1ro de Mayo (2) en los estados de Puebla y Veracruz. Para el análisis molecular se utilizaron hojas de 17 colectas procedentes de Santa Elena (4), Laguna Guerrero (6), Caobas (2) y Huatusco (3) en el estado de Quintana Roo y una de *V. insignis* y una de *V. planifolia* de 1ro de Mayo (2) en el estado de Veracruz. El labelo se digitalizó y sobre él se trazaron 69 líneas y siete ángulos utilizados como variables. Se realizó un análisis de varianza mediante diseño completamente al azar desbalanceado, análisis multivariado por componentes principales y conglomerados a través de agrupamiento jerárquico. Para el análisis molecular se utilizaron 14 loci microsatélites, se observó el Índice de Contenido Polimórfico, Heterocigosidad esperada y Heterocigosidad observada. Se utilizó el índice Jaccard para la construcción de un Cluster de similitud genética. Las variables morfológicas fueron altamente significativas. El modelo explicó 87.9% de la variación total. Con el análisis de conglomerados mediante agrupamiento jerárquico se observaron cinco morfotipos florales. El análisis molecular determinó que nueve de los 14 loci fueron polimórficos. Se identificaron 28 alelos. Se observaron bajos niveles en el Índice de Contenido Polimórfico y la presencia de cuatro genotipos. Se observó plasticidad morfológica hacia diferentes ambientes, y congruencia genética hacia un morfotipo eficiente.

Palabras clave: genotipo, labelo, microsatélite, morfotipo.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR VARIATION OF *Vanillainsignis* (ORCHIDACEAE)  
IN QUINTANA ROO, MEXICO

The objective of this study was to determine the morphological and molecular variation across collections of *V. insignis* made in height and soil moisture gradient in Quintana Roo, Mexico. For morphological analysis, the labellum of 13 collections from Santa Elena (3), Laguna Guerrero (5) Caobas (1) and Huatusco (1) in the state of Quintana Roo, and Tenampulco (1) and Iro de Mayo (2) in the states of Puebla and Veracruz was used. For the molecular analysis leaves 17 collections from Santa Elena (4), Laguna Guerrero (6), Caobas (2) and Huatusco (3) in the state of Quintana Roo and *V. insignis* and *V. planifolia* Iro de Mayo (2) in the state of Veracruz were used. The labellum was digitized and on it, 69 lines and seven angles used as variables were drawn. An analysis of variance was performed using unbalanced completely randomized design, multivariate principal components and clusters through hierarchical cluster analysis. For the molecular analysis, 14 microsatellite loci were used. Polymorphic Index Content, expected heterozygosity and observed heterozygosity was observed. The Jaccard index for the construction of a gene cluster similarity was used. The morphological variables were highly significant. The model explained 87.9% of the total variation. With cluster analysis using hierarchical clustering fivefloral morphotype was observed. Molecular analysis determined that nine of the 14 loci were polymorphic. 28 alleles were identified. Low levels in Polymorphic Content index and the presence of four genotypes were observed. Morphological plasticity to different environments, like a genetic congruence towards efficient morphotypewas observed.

Keywords: genotype, labellum, microsatellite, morphotype.

## 2.1 Introducción

De las 107 especies incluidas en el género *Vanilla* (Soto-Arenas y Dressler 2010) aproximadamente 20 producen frutos fragantes, entre ellas *Vanilla insignis* (Bory *et al.*, 2008). *V. insignis* se sitúa como prioritaria dentro del pool genético secundario de *V. planifolia*, ya que a partir de esta se obtienen vainas beneficiadas con menor contenido de vainillina pero similar aroma a *V. planifolia* en estado silvestre (Salazar-Rojas *et al.*, 2011), también la presencia de características agronómicas importantes y ausentes en el germoplasma cultivado de *V. planifolia*, especie de mayor cultivo para la obtención del recurso genético vainilla, como es mayor tolerancia a patógenos y cambios hídricos (Soto-Arenas, 1999) y la relación filogenética estrecha entre ambas especies (Soto-Arenas y Dressler, 2010). Por lo anterior, se considera que el estudio de la variación infraespecífica de *V. insignis* es fundamental para el diseño y ejecución de estrategias de uso y conservación del género *Vanilla* en México.

*V. insignis* se distribuye en los bosques tropicales de Honduras, Belice, Guatemala y México (Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Chiapas, Tabasco, Oaxaca, Veracruz y Puebla) (Soto-Arenas y Dressler, 2010). Con excepción de la selva alta perennifolia, la península de Yucatán alberga los diferentes tipos de vegetación tropical en el país (INEGI, 1996). Por esta razón se asume que la mayor variación de la especie podría concentrarse en esta zona.

En procesos microevolutivos, la diferenciación de poblaciones está asociada a factores ecológicos (Herrera *et al.*, 2006; Hodgins y Barret, 2008; Shimono *et al.*, 2009), en que la presión selectiva entre hábitats se ve afectada con barreras que impiden el flujo génico, inclusive entre microclimas a metros de distancia (Shimono *et al.*, 2009). En este sentido, la variación genética de una especie es resultado de su adaptación al entorno (Frankel 1995; Judd *et al.*, 1999; Sckemske y Bierzychudek 2001; Armbruster 2002), las potencialidades y limitaciones de su germoplasma,

interacciones bióticas y respuestas a heterogeneidad ambiental, como son cambios en temperatura y humedad del suelo (Shimono *et al.*, 2009).

Con la finalidad de conocer la variación infraespecífica, algunos estudios se han apoyado en el análisis de caracteres morfológicos menos sensibles a variación por efecto ambiental (Herrera-Cabreta *et al.*, 2004; Salazar-Rojas *et al.*, 2010). Estas características están presentes en las estructuras reproductivas y son consideradas de mayor relevancia dentro de criterios de clasificación (Emigh y Goodman, 1985; Podolsky y Holtsford, 1995; Herrera-Cabrera *et al.*, 2000). En flores zigomorfas, la simetría del labelo es una característica adaptativa que ha permitido la diversificación de las especies (Hunter, 1998; Endress, 1999), debido a que su relación con el polinizador aumenta la especiación y disminuye el flujo génico (Wilson *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006).

Por otra parte, el uso de marcadores moleculares han sido de gran utilidad en estudios de caracterización genética, tal como la elaboración de mapeo físico, marcaje genético, diversidad alélica y diversidad genética (Agarwal *et al.*, 2008).

En algunas especies de la familia Orchidaceae, características de resistencia, autopolinización y calidad aromática han dado pie a estudios de diversidad (Bory *et al.*, 2008). Con este propósito, el género *Vanilla* ha sido estudiado mediante Isoenzimas (Soto-Arenas 1999), RAPD y AFLP (Minoo *et al.*, 2006) entre otros. Sin embargo, el uso de microsatélites (SSR) ha demostrado ser de mayor funcionalidad en estudios de diversidad (Bory *et al.*, 2008) y de mayor detección polimórfica a nivel infraespecífico en *V. planifolia* (Bory *et al.*, 2008; Salazar-Rojas *et al.*, 2011). Este marcador molecular se basa en secuencias repetidas de uno a cinco nucleótidos presentes en todos los genomas eucariotas (Tautz y Renz 1984). Su variación se debe principalmente a un deslizamiento durante el proceso de replicación de ADN (Schlotterer y Tautz 1992) y el polimorfismo resultante se analiza mediante primers de alto poder discriminatorio (Agarwal *et*

al., 2008), son codominantes, altamente reproducibles y permiten una cobertura amplia del genoma (Rafalsky y Tingey 1993; Powell *et al.*, 1996).

Debido a que la plasticidad adaptativa es consecuencia de la selección natural producida en diferentes ambientes (Ward, 2012) este trabajo tuvo como objetivo conocer la variación morfológica de *Vanilla insignis* y determinar si ésta se origina a nivel genético, a través del análisis morfométrico del labelo y del análisis molecular mediante microsatélites en colectas realizadas en un gradiente altitudinal y de humedad del suelo en el estado de Quintana Roo, México.

## 2.2 Materiales y métodos

*Características de los sitios de colecta* Las localidades de colecta fueron seleccionadas por presentar diferentes condiciones de altitud y régimen de humedad del suelo, y mantener constantes las variables de temperatura, clima, radiación solar media y precipitación total anual. Estas características ambientales se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1** Estratificación de las condiciones ambientales en los sitios de colecta.

Localidad	Clima	Precipitación total anual (mm)	Régimen de humedad del suelo	Radiación solar media ( $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ )	Altitud (msnm)
Santa Elena	Aw1(x')	1200-1500	Ácuico	82 a 87	10
Laguna Guerrero	Aw1(x')	1200-1500	Ústico	82 a 87	10
Caobas	Aw1(x')	1200-1500	Ústico	78 a 82	150
Huatusco	Aw1(x')	1200-1500	Xérico	78 a 82	100
Tenampulco	Am	2000-2500	Údico	69 a 73	210
Iro de Mayo	Am	2000-2500	Údico	69 a 73	60

Construido con datos de CONABIO (2013)

La temperatura media anual fue de 22°C en todas las localidades de colecta

Para el análisis morfológico, durante abril de 2012 se colectaron 57 flores de *V. insignis* en 13 esquejes de las localidades de Santa Elena (3), Laguna Guerrero (5), Caobas (1) y Huatusco (1)

en Quintana Roo, México, *V. insignis* (1) y *V. planifolia* (1) en Tenampulco, Puebla y *V. planifolia* (1) en el ejido Iro de Mayo en Veracruz.

Para el análisis molecular, durante enero de 2012 se realizaron 15 colectas de hojas de *V. insignis* en las localidades de Santa Elena (4), Laguna Guerrero (6), Caobas (2) y Huatusco (3) en el estado de Quintana Roo y dos colectas, una de *V. insignis* y una de *V. planifolia* en el ejido Iro de Mayo en el estado de Veracruz, México.

Las colectas ajenas a la península se consideraron como grupo externo para reforzar el análisis de variación entre esquejes. La localidad de procedencia, especie, localización geográfica, número de colecta y número de repeticiones se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2** Vainillas evaluadas de las especies *V. insignis* y *V. planifolia* colectadas en diferentes localidades.

Localidad	Especie	Longitud*	Latitud*	C <sub>h</sub> (No)	C <sub>f</sub> (No)	R <sub>f</sub> (No)
Santa Elena	<i>V. insignis</i>	-88.39309	18.49429	1, 2, 3, 4	1	4
					2	4
					3	7
					5	3
					8	8
Laguna Guerrero	<i>V. insignis</i>	-88.2667	18.68817	5, 6, 7, 8, 9, 15	9	3
					15	3
					16	5
					11	4
Caobas	<i>V. insignis</i>	-89.10422	18.44485	10, 11	11	4
Huatusco	<i>V. insignis</i>	-88.84255	18.87066	12, 13, 14	13	3
Tenampulco	<i>V. insignis</i>	-97.40749	20.17031	-	18	3
Iro de Mayo	<i>V. insignis</i> / <i>V. planifolia</i>	-97.28221	20.29559	16	-	3
				17	19,22	7
Total	-	-	-	17	13	57

\*Coordenadas UTM

C<sub>h</sub> Colectas de hojas C<sub>f</sub> Colectas de flores R<sub>f</sub> Repetición de flores

Para la colecta de hojas, el número de repeticiones fue de dos en todos los casos.

*Análisis de la variación morfológica de V. insignis.* Las flores colectadas se almacenaron en solución preservadora (etanol 27%, ácido láctico 4%, ácido benzoico 3%, glicerina 3% y agua destilada 63%) dentro de recipientes de vidrio de 125 ml previamente etiquetados (Salazar-Rojas *et al.*, 2010). El labelo fue diseccionado de la columna, sépalos y pétalos, y posteriormente se le realizó una imagen digital. Bajo un soporte biológico, ésta se dividió en tres regiones (basal, media y apical) y siete secciones (A, B C, D, E, F y G), en las cuales se realizaron y tomaron datos de 69 trazos y siete ángulos que se utilizaron como variables morfológicas con la ayuda del programa Corel Draw® Graphics Suite X4 (COREL 2007). Los datos obtenidos se almacenaron en una matriz realizada en Exel (Microsoft Exel 2010).

Se realizó un análisis de varianza para conocer la variación morfológica entre los esquejes mediante diseño en bloques completamente al azar desbalanceado, con el software estadístico SAS v 9.3 (SAS, 2011). Con el objetivo de interpretar la diversidad biológica de *V. insignis*, se clasificaron los individuos dentro de grupos similares mediante dos métodos numéricos (Herrera-Cabrera *et al.*, 2000). Un estudio multivariado mediante componentes principales y un análisis por conglomerados mediante agrupamiento jerárquico. Ambos métodos se basaron en las medias de 11 esquejes de *V. insignis* y dos de *V. planifolia* para las 76 variables. El programa utilizado fue SAS v 9.3 (SAS, 2011). (La construcción, distribución y análisis de las variables se discute a detalle en el capítulo uno).

*Análisis de la variación molecular de V. insignis.* El material vegetal recolectado se almacenó en nitrógeno líquido al momento del corte dentro de paquetes de aluminio etiquetados con los datos de referencia (nombre del sitio, número de colecta, número de repetición, fecha y hora). Cada muestra se manipuló con guantes de látex y las disecciones se realizaron con una navaja de bisturí diferente para cada colecta para evitar la contaminación entre esquejes.

Para la obtención de ADN, las muestras fueron trituradas en morteros previamente esterilizados y congelados. El procedimiento se realizó con aplicaciones constantes de nitrógeno líquido para evitar pérdida de integridad del material. Posteriormente se colocaron 100 mg de tejido triturado dentro de tubos eppendorff de dos ml y se procedió con la extracción de ADN mediante el protocolo Dneasy Plant Kit de QUIAGEN ([Dneasy Plant Handbook 2012](#)). Se observó la integridad del producto mediante electroforesis en geles de agarosa a 0.8%, en medio TBE 10 X + BrET (0.003 mg/ml) durante 45 min a 110V. Los geles fueron expuestos en luz UV con un equipo Alpha Imager y visualizados con la aplicación Alpha EASE ([Alpha Innotech Corporation, v 6.0.0 2006](#)).

La amplificación de microsatélites consistió en la amplificación de 14 loci microsatélites a partir de primers marcados con los fluorocromos HEX y 6-FAM (Cuadro 3). Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µl con 25 ng de ADN, PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Taq ADN polimerasa (Red Gold Star, Eurogenetec) y 0.2 µM para cada primer. Las reacciones de PCR se realizaron en un GeneAmp PCR System 9700 termociclador bajo los siguientes lineamientos: un paso inicial de 4 min a 94°C, 34 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s en 60-53 °C (temperatura de hibridación se redujo a 0.7°C los primeros 10 ciclos), 1 min a 72°C y un paso final de 5 min a 72°C ([Herrera-Cabrera et al., 2012](#)). Los productos de PCR se analizaron en geles de 80 ml de TBE 10X y agarosa a 1.2%. Se colocó un µl de bromuro de etidio para visualizar las bandas al exponerse a luz UV. Los geles se corrieron durante 40 minutos a 90 Voltios en buffer TBE 10X. Se utilizó una escalera de 100bp de ADN (Invitrogen) como referencia molecular para estimar el tamaño de los amplificados.

Dentro de una placa para secuenciador de 96 pozos se colocaron 1 µl de amplificado, 9 µl de Formamida HiDi y 0.25 µl de ROX-500. El análisis se realizó en un secuenciador prisma ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Los resultados obtenidos por el secuenciador se analizaron en el Software Peak Scanner ([Peak Scanner v1.0 2006](#)) y el Software Geneious ([Geneious 5.6.6 2005](#)) para ver la calidad de los amplificadores y realizar una matriz para su posterior análisis. Se calculó el Índice de Contenido Polimórfico (PCI), Heterocigosidad esperada (He) y Heterocigosidad observada (Ho) con el complemento Microsatellite para Excel ([Microsoft Excel 2010](#)).

**Cuadro 3** Secuencia de 14 primers microsatélites para el género *Vanilla*. Las letras D y R indican primer directo y reverso respectivamente (Tomado de [Bory et al., 2008](#)).

Locus	Primer (5'-3')	Fluorocromo	Repetición (pb)	Tamaño (pb)	Accesión *
002	D: TGGATGTGCATTTGTG R: CGCATTCACTCACTGT	HEX	TG(8)	222	EF486644
003	D: TATAGATCCCTACATGC R: TCACATCCCTACATGC	6-FAM	CA(7)	349	EF486645
005	D: TTTGCTTGAACGTATGTC R: GCAAACATAGAAATGCAC	HEX	TG(6) TG(7) TG(6)	259	EF486646
010	D: GCACATAAAATACCTTACACC R: GTTCACGTCAGTGTGCT	6-FAM	CA(7) CA(6) CA(10)	346	EF486647
015	D: AGTGTCTTTGTGTGCCT R: TAGATAGTAAACCCATACTCAC	HEX	TG(9)	280	EF486648
016	D: TATGTGTGAGAGGGTGC R: CAATTAGTCACATCCATAAAC	6-FAM	TG(9)	320	EF486649
019	D: AAGTGCCCAATCTATC R: TGGATTCACCATGAC	HEX	TG(9)	222	EF486650
022	D: CAAAACACAAGGAAATGC R: TGCAAGCCCACAAGT	HEX	TG(9)	197	EF486651
025	D: GTGTAGCGGTCATACAA R: CATTTCATGGAAGTGGAG	HEX	TG(8)	231	EF486652
026	D: GCACATACATGCTTATTG R: CATGTTCTTATTGAGTGG	HEX	CA(9)	223	EF486653
028	D: AACATGCACAAGAAAC R: TTTATGCACCTTGTTAG	HEX	CA(9)	190	EF486654
031	D: ATTTCTCCCTCACTGTA R: AATCTCAGGTGCTATTGG	6-FAM	TG(9)	346	EF486655
047	D: CATGCTTACATCTTTGTGTT R: TAATGGACATGCACACTC	6-FAM	GT(6) GT(7)	301	EF486656
050	D: CTATGTGCGCTTTGG R: CACTCAAGAACATGCAAC	HEX	TG(7)	224	EF486657

\*Número de accesión en Gene Bank

## 2.3 Resultados

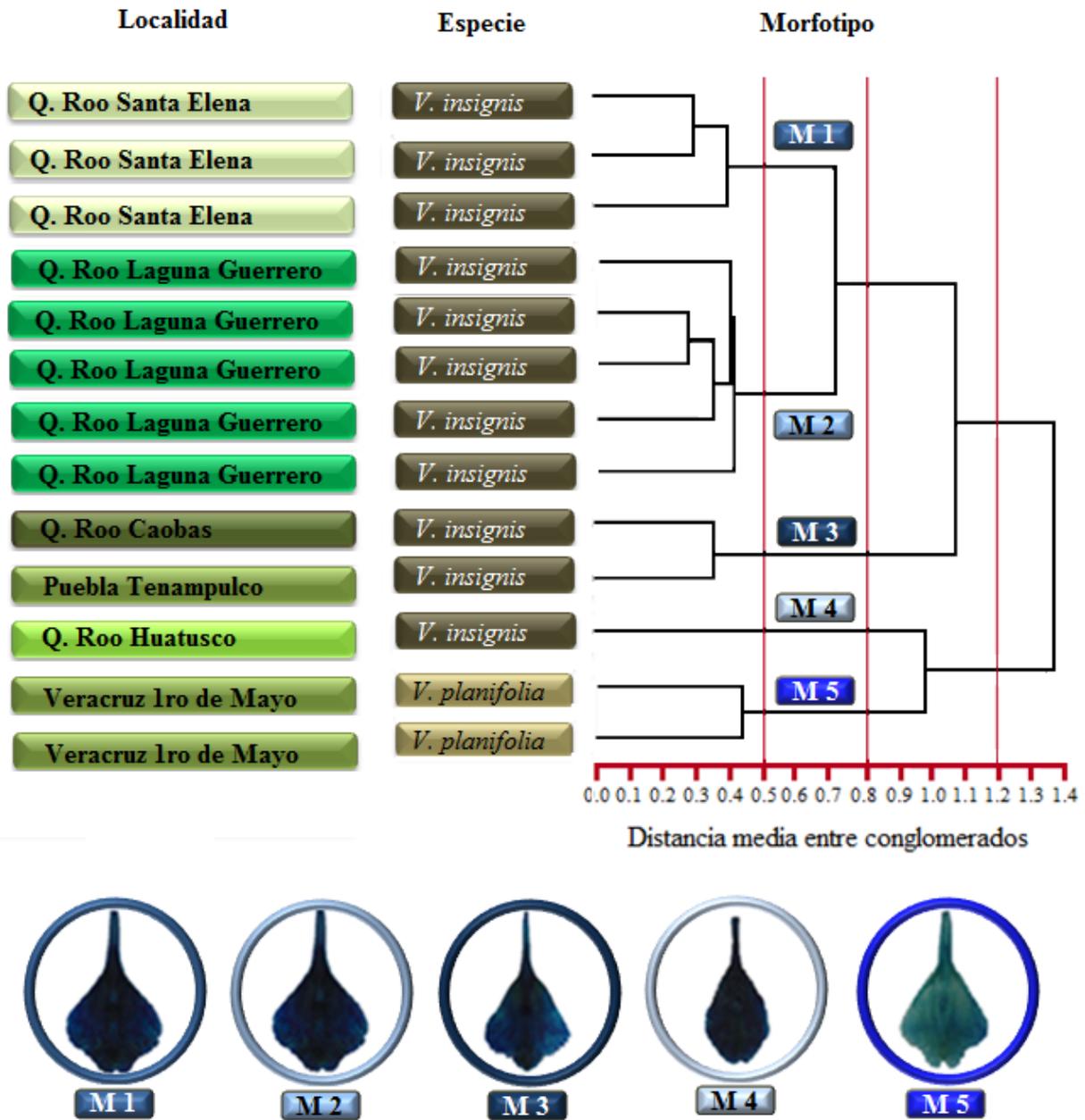
*Análisis de la variación morfológica de V. insignis.* Los 76 caracteres evaluados en 57 labelos de 11 esquejes de *V. insignis* y dos de *V. planifolia* presentaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.0001$ ). Con el estudio multivariado mediante componentes principales se observaron cuatro grupos de *V. insignis* y uno de *V. planifolia*. Los primeros tres componentes principales (CP) explicaron 88% de la variación acumulada con los caracteres evaluados.

Se determinó que las variables B1, B4, B6, B7, C8, C9, D4 y E6 (CP1) referentes al largo y ancho del labelo, las variables aD, F3 F10, G, G1 y G2 (CP2) relacionadas con el largo y ancho de los lóbulos apicales, y las variables F2, F5, A1 y aG (CP3) relacionadas con el largo y ancho de la zona contigua al callo, ancho de la base del labelo y extensión de los lóbulos apicales, explicaron 57%, 24% y 7% respectivamente, de la variación morfológica encontrada.

Mediante el análisis de conglomerados por agrupamiento jerárquico se reiteró la formación de cuatro grupos (morfotipos) de *V. insignis* y uno de *V. planifolia* a una distancia euclidiana de 0.5. (Figura 1)

El primer morfotipo (M1) se formó con colectas realizadas en Santa Elena y se caracterizó por la presencia de labelos anchos y largos, lóbulos apicales anchos y cortos, y estrecha zona contigua al callo. El segundo morfotipo (M2) lo formaron colectas de Laguna Guerrero y se diferenció del primero por presentar mayor tamaño de lóbulos apicales.. El tercer morfotipo (M3) se formó con colectas de Caobas y Tenampulco y se caracterizó por la presencia de labelos anchos y largos, y carecer tanto de lóbulos apicales como de zona contigua al callo. El cuarto morfotipo (M4) se formó con la colecta de Huatusco y se caracterizó por la presencia de labelos angostos, lóbulos apicales grandes sin separación entre ellos y amplia zona contigua al callo. El quinto morfotipo (M5) se formó con las colectas de Tenampulco y 1ro de Mayo (grupo externo de

*V. planifolia*) y se caracterizó por la presencia de labelos angostos, lóbulos apicales grandes, separados entre sí y amplia zona contigua al callo (Figura1).



**Figura 1** Análisis por conglomerados mediante agrupamiento jerárquico, construido con el promedio de 76 variables analizadas en 13 individuos. Se observa a una distancia media entre conglomerados de 0.5 cuatro morfotipos de *V. insignis* y un morfotipo de *V. planifolia*.

*Análisis de la variación molecular de V. insignis* Para comprobar si los cambios morfológicos del labelo están controlados genéticamente, se examinaron 14 loci microsatélites, de estos, nueve fueron polimórficos (SSR03, SSR05, SSR10, SSR15, SSR16, SSR22, SSR25, SSR47, SSR50) y cinco monomórficos (SSR02, SSR19, SSR26, SSR28, SSR31). El número de alelos por locus y el número de alelos exclusivos encontrados fue variable. Se encontró un total de 28 alelos con un promedio de tres alelos por locus dentro de los nueve loci polimórficos analizados en 16 individuos de *V. insignis* y uno de *V. planifolia*. Los loci SSR05, SSR15, SSR16 y SSR10 presentaron alelos exclusivos. Se observó un pequeño rango de variación en el índice de contenido polimórfico (PCI), de 0.38 (SSR03, SSR015) a 0.52 (SSR05), con una media de 0.49. La heterocigosidad esperada (He) presentó valores de 0.57 (SSR25) a 0.83 (SSR15), con promedio de 0.70. Mientras la heterocigosidad global observada (Ho) presentó un rango de 0.50 (SSR22) a 1.00 (SSR15, SSR47), con promedio de 0.81

Se determinó que el loci más informativo fue SSR05, al presentar el mayor valor de PCI, un alto nivel de Ho y contar con un alelo exclusivo. Por el contrario, los loci SSR22 y SSR25, a pesar de no presentar el valor de PCI más bajo, demostraron los valores más bajos de Ho, inclusive inferiores a su He (Cuadro 4).

**Cuadro 4** Parámetros de variación genética de nueve loci microsatélites utilizados en la caracterización molecular de individuos silvestres de *V. insignis* del estado de Quintana Roo, México.

Loci	Rango	Número de Alelos	Alelos Exclusivos	PCI	He	Ho
SSR03	344-352	2	-	0.38	0.71	0.77
SSR05	254-264	4	260	0.52	0.71	0.91
SSR10	328-340	4	328	0.42	0.76	0.87
SSR15	278-284	4	278	0.38	0.83	1.00
SSR16	324-328	3	328	0.41	0.82	0.85
SSR22	192-196	3	-	0.43	0.63	0.50
SSR25	226-234	3	-	0.39	0.57	0.51
SSR47	304-308	3	-	0.49	0.70	1.00
SSR50	232-236	2	-	0.37	0.59	0.87
Promedio	-	-	-	0.42	0.70	0.81

PCI Índice de Contenido Polimórfico, He Heterosigosis esperada, Ho Heterosigosis observada.

El mayor número de alelos por población se presentó en las colectas de Santa Elena (23). Por el contrario, la menor cantidad se localizó en las colectas de Caobas (9). Se observó un alelo exclusivo en Santa Elena dentro del loci SSR10, y tres alelos exclusivos en Laguna Guerrero dentro de los loci SSR05, SSR15 y SSR16. El rango de Heterocigosidad poblacional esperada (He) fue de 0.63 a 0.77, con promedio de 0.71. Por otra parte, el rango de Heterocigosidad poblacional observada (Ho) varió de 0.70 a 1.00, con promedio de 0.83. La mayor heterocigosidad observada se localizó en la colecta de *V. planifolia* y la de *V. insignis* en Iro de Mayo. El menor valor de Ho poblacional se observó en las colectas de Laguna Guerrero. A pesar de ser especies diferentes, las colectas de Iro de Mayo fueron genéticamente idénticas con la comparación de 26 de los 28 alelos encontrados.

Se observó que la localidad de Caobas, que presentó la menor cantidad de alelos (9), obtuvo un valor de Ho (0.83) similar a la localidad de la localidad de Santa Elena (0.82), que demostró la

mayor cantidad de alelos (23). La localidad de Huatusco fue la única en presentar un valor de  $H_o$  (0.81) inferior a su  $H_e$  (0.84) (Cuadro 5).

**Cuadro 5** Estratificación genética de 16 colectas de *V. insignis* y una de *V. planifolia* realizadas en cinco localidades mediante nueve loci microsatélites.

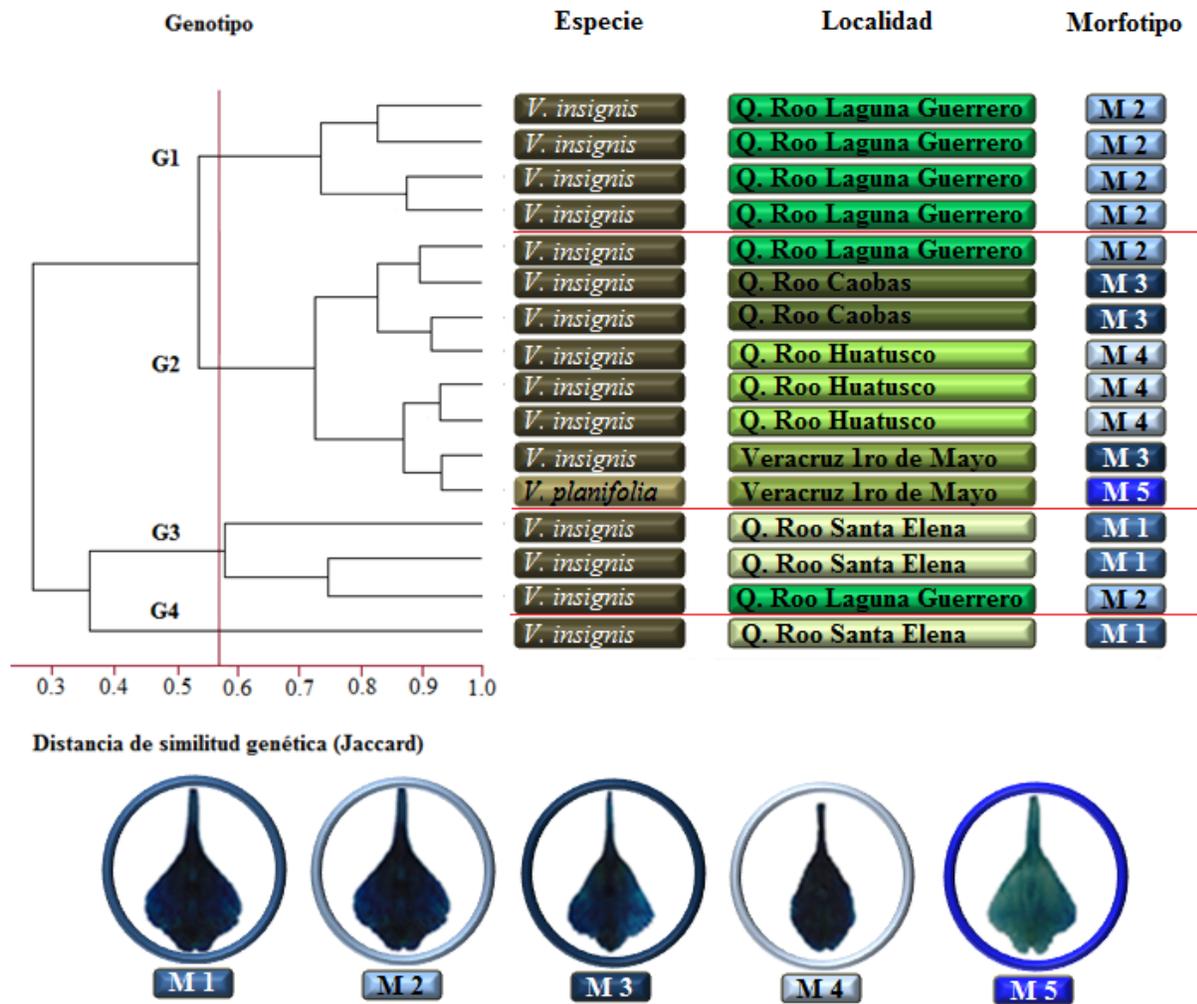
Localidad	Esquejes (No)	Alelos por población (No)	Alelos por locus (No)	Alelos exclusivos (No)	He	Ho
Santa Elena	4	23	2.55	1	0.77	0.82
Laguna Guerrero	6	21	2.33	4	0.63	0.70
Caobas	2	9	1.00	-	0.63	0.83
Huatusco	3	20	2.22	-	0.84	0.81
Iro de Mayo ( <i>V. insignis</i> y <i>V. planifolia</i> )	2	17	1.88	-	0.67	1.00
Promedio	-	-	-	-	0.71	0.83

He Heterocigosidad esperada, Ho Heterocigosidad observada.

Mediante el índice Jaccard se construyó un Cluster con nueve loci microsatélites para 16 individuos de *V. insignis* y uno de *V. planifolia*. A una distancia de similitud genética de 0.58 se observaron cuatro genotipos (G1, G2, G3, G4). De estos, dos genotipos dentro de las colectas realizadas en Santa Elena (G3, G4), tres en las colectas de Laguna Guerrero (G1, G2, G3), y uno en las colectas de Caobas, Huatusco y Iro de Mayo (G2). Se observó que dentro del genotipo dos, se expresaron cuatro de las cinco variantes morfológicas determinadas mediante el análisis morfométrico realizado al labelo (M2, M3, M4, M5). Los genotipos uno y cuatro fueron monomórficos al expresar los morfotipos uno y dos respectivamente. Por otra parte, estos dos morfotipos se expresaron dentro del genotipo tres.

De arriba hacia abajo, el primer genotipo (G1) se caracterizó por la presencia de alelos exclusivos y lo integraron cuatro de las seis colectas realizadas en Laguna Guerrero. Los individuos de este

genotipo expresaron la forma M1 dentro de la caracterización morfológica. El genotipo dos (G2) albergó una de las seis colectas realizadas en Santa Elena, y todas las realizadas en Caobas, Huatusco y 1ro de Mayo, y expresó las cuatro variaciones morfológicas encontradas (M1, M2, M3, M4), incluido el ecotipo de *V. planifolia*. El tercer genotipo (G3) se formó con dos colectas de Santa Elena y una de las seis realizadas en Laguna Guerrero. Este genotipo expresó la forma M1. El cuarto genotipo (G4) se formó con una de las cuatro colectas realizadas en Santa Elena y expresó la forma M1 (Figura 2).



**Figura 2** Genotipificación y fenotipificación de *V. insignis*. Cluster que muestra cuatro genotipos a una distancia de similitud genética de 0.58, formado a partir de nueve loci microsatélites en 16 colectas de *V. insignis* y una de *V. planifolia*. Se indica la especie, localidad de colecta y morfotipo para cada individuo analizado.

## 2.4 Discusión

El uso de microsatélites para el estudio de variación infraespecífica en *V. insignis* evidenció niveles de heterocigosidad y la formación de cuatro genotipos. Esto concuerda con lo observado en *V. planifolia*, en que el estudio de su variación permitió observar seis genotipos (Salazar-Rojas *et al.*, 2011; Herrera-Cabrera *et al.*, 2012).

En este trabajo, la variación morfológica y molecular mostró estar relacionada con las condiciones ambientales de los sitios de colecta. Se determinó que el ambiente y los mecanismos de plasticidad adaptativa propios de la especie (Shimono *et al.*, 2009), permitieron la formación de cuatro genotipos y cuatro formas diferentes del labelo (morfotipos). En los individuos procedentes de comunidades con régimen de humedad del suelo (RHS) superior a 180 días de suelo inundado, mostraron mayor tamaño en la región basal y media del labelo (Santa Elena, Laguna Guerrero y Caobas). Por otra parte, las flores del esqueje de *V. insignis* colectadas en Huatusco, con régimen de humedad del suelo inferior a 180 días presentaron un morfotipo de menor dimensión, parecido a *V. planifolia* colectada en condiciones de luminosidad baja (69 a 73  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ ) similar a las condiciones donde se colectó *V. insignis* de Huatusco (78 a 82  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Lo mismo ocurrió con el gradiente altitudinal de los sitios de colecta y su relación con el tamaño y forma de los lóbulos apicales, en que a menor altitud, mayor tamaño y viceversa. Se observó que el genotipo dos (G2) expresó las cuatro variantes morfológicas encontradas. A pesar de que los cambios del fenotipo en estructuras altamente heredables es menos sensible al ambiente (Herrera-Cabrera *et al.*, 2000), se ha documentado variación en estas estructuras (Frazee y Marquis, 1994), como en polen, óvulos, tamaño y forma de flores e inflorescencias (Vogler *et al.*, 1999; Smichtt *et al.*, 2003; Rihimaki y Savolainen, 2004) y color de la flor (Mascó *et al.*, 2004). En *V. insignis* el proceso de polinización por engaño reduce la transferencia de polen dentro de las inflorescencias y promueve largas distancias de traslado (Schiestl, 2005).

Este evento repercute directamente en la disposición del polen en polinios para asegurar su viabilidad ante las distancias recorridas por el polinizador (Peakall y Schiestl, 2004). Por esta razón se sugiere que la variación encontrada en la forma del labelo de *V. insignis* debe a procesos microevolutivos (Herrera *et al.*, 2006; Hodgins y Barret, 2008), en que la diversificación floral se moldea por las características estructurales de la especie, interacciones bióticas y respuesta al ambiente (Shimono *et al.*, 2009), en un proceso adaptativo que contrasta entre poblaciones a través del tiempo (Frankel, 1995; Sckemske y Bierzychudek, 2001; Armbruster, 2002; Judd *et al.*, 2007). Por otra parte, los genotipos G1, G3 y G4 compartieron el mismo ecotipo (E1). Éste último escenario se observó en individuos colectados en zonas próximas a la costa. Esta divergencia podría deberse a un proceso de deriva génica (Ward *et al.*, 2012), en que las características específicas del ambiente, tal como un régimen de humedad superior a 180 días de suelo inundado y una altitud de 10 msnm (INEGI, 1996) combinado con una restricción en el flujo génico pudo provocar la diferenciación en estas poblaciones (Shimono *et al.*, 2009).

## 2.5 Conclusiones

Los análisis morfológico y molecular determinaron que existe variación infraespecífica, tanto genética como fenotípica en *V. insignis*.

Sólo nueve de los 14 loci microsatélites utilizados en el estudio fueron polimórficos.

El genotipo dos albergó las cuatro expresiones morfológicas detectadas en la especie, incluido el morfotipo de *V. planifolia*.

Las colectas externas de *V. insignis* y *V. planifolia* utilizadas en el estudio fueron genéticamente idénticas

Los genotipos uno, tres y cuatro compartieron un solo morfotipo y se integraron con las colectas más cercanas a la costa.

### **Literatura Citada**

Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* **27**: 617-631.

Alpha EASE v 6.0.0 (2006) Alpha Innotech Corporation.

Armbruster W.S. 2002. Can indirect selection and genetic context contribute to trait diversification? A transition probability study of blossom color evolution in two genera. *Journal of Evolutionary Biology* **15**:468-486.

Bory S., Da Silva D., Risterucci A.M., Grisoni M., Besse P., Duval M.F. 2008 Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: Polymorphism and transferability to other *Vanilla* species. *Scientia Horticulturae* **115**: 420-425.

Bory S., Lubinsky P., Risterucci A.M., Noyer J.L., Grisoni M., Duval M.F., Basse P. 2008 Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany* **95(7)**: 805-815.

COREL (2007) CorelDRAW® Graphics Suite X4.

Dneasy Plant Handbook (2012) Sample and Assay Technologies. QUIAGEN 49 p.

Emigh T.H. y Goodman M.M. 1985. Multivariate analysis in nematode taxonomy. In: Barker K.R., Carter CC, Sasser J.N. Eds. *An advanced treatise on meloidogyne*. Dept. of Plant Pathology, NCSU, North Carolina **2**:197-204.

Endress P. 1999. Symmetry in flowers-diversity and evolution. *International Journal of Plant Sciences* **160**: 3-23.

- Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J.J. 1995. The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press.
- Frazer J.E. y Marquis R.J. 1994. Environmental contribution to floral trait variation in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *American Journal of Botany***81**: 206-215.
- Geneious 5.6.6 (2005) Geneious 5.6.6 Biomatters Ltd.
- Herrera-Cabrera B.E., Castillo-González F., Ortega-Pazkca R.A., Sánchez-González J.J., Goodman M.M. 2000. Caracteres para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: caso la raza Chalqueño. *Revista Fitotecnia Mexicana***23**:335-354.
- Herrera-Cabrera B.E., Castillo-González F., Sánchez-González J.J., Hernández-Casillas J.M., Ortega-Pazkca R.A., Major-Goodman M. 2004 Diversidad del maíz Chalqueño. *Agrociencia* **38**: 191-206.
- Herrera C.M., Castellanos M.C., Medrano M. 2006. Geographical context of floral evolution: Toward and improved research programme in floral diversification. In: Harder L.D. y Barret S.C.H. Eds. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press, New York.pp. 278-294,
- Herrera-Cabrera B.E., Salazar-Rojas V.M., Delgado-Alvarado A., Campos-Contreras J., Cervantes-Vargas J. 2012. Use and conservation of *Vanilla Planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences* **2(1)**: 43-55.
- Hodgins K.A. y Barret S.C.H. 2008. Geographic variation in floral morphology and style-morphations in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany* **95(2)**: 185-195.
- Hunter J. 1998. Key innovations and the ecology of macroevolution. *Tree***13**: 31-36.

- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI)-Instituto Nacional de Ecología (INE) 1996. “Uso de suelo y vegetación INEGI Agrupado por CONABIO” (1998) Escala 1:1 000 000. México.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. 2007. *Plants systematics a phylogenetic approach*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, p 464.
- Kay K.M., Reeves R.G., Olmstead, Schemske D.W., 2005. Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Sostaceae): evidence of nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* **92**: 1899-1910.
- Mascó M., Noy-Meir I., Sérsic A.N. 2004. Geographic variation in flower color patterns within *Calcolaria uniflora* Lam. In Southern Patagonia. *Plant Systematics and Evolution* **244**: 77-91.
- Microsoft Excel 2010. Microsoft Office Professional Plus 2010.
- Minoo D., Nirmal B.K., Ravindran P.N., Peter K.V. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Society of Horticulture* **108**: 414-422.
- Peak Scanner v1.0 (2006) The Peak Scanner™ Software Version 1.0
- Peakall R. y Schiestl F.P. 2004. A mark-recapture study of male *Colletes cunicularius* bees: implications of pollination by sexual deception. *Behav Ecol Sociobiol* **56**: 579-584.
- Podolsky R.H. y Holtsford T.P. 1995. Population structure of morphological traits in *Clarkia, Dudleyana* I, comparison of Fst between allozymes and morphological traits. *Genetic* **140**:733-744.
- Powell W., Gordon M.C., Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trend in Plants Science* **1**: 215-222.

- Rafalsky J.A. y Tingey S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* **9**: 275-279.
- Rihimaki M. y Savolainen O. 2004. Environmental And genetic effects on flowering differences between northern and southern populations of *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **91**(7): 1036-1045.
- SAS (2011) SAS version 9.3 SAS Institute Inc. North Carolina.
- Salazar-Rojas V.M., Herrera-Cabrera B.E., Soto-Arenas M.A., Castillo-Gonzalez F. 2010. Morphological variation in *Laelia anceps* subsp. *Dawsonii* f. *chilapensis* Soto-Arenas (Orchidaceae) in traditional home gardens of Chilapa, Guerrero, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* **57**:543-552.
- Salazar-Rojas V.M., Herrera-Cabrera B.E., Delgado-Alvarado A., Soto-Hernández M., Castillo-González F., Cobos-Peralta M. 2011. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution* **59**(5): 875-887.
- Schlotterer C. y Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**: 2211-2215.
- Schmitt J., Stinchcombe J.R., Shane-Heschel M., Huber H. 2003. The adaptive evolution of plasticity: Phytochrome-mediated shade avoidance responses. *Integrative and Comparative Biology* **43**: 459-469.
- Schemske D.W. y Bierzychudek P. 2001. Perspective: evolution of flower color in the desert annual *Linanthus parryae*; wright revisited. *Evolution* **55**:1269-1282.
- Schiestl P.F. 2005. On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *Naturwissenschaften* **92**: 255-264.

- Shimono Y., Watanabe M., Hirao A.S., Wada N., Kudo G. 2009. Morphological and genetic variations of *Potentilla matsumurae* (Rosaceae) between fellfield and snowbed populations. *American Journal of Botany***96(4)**: 728-737.
- Soto-Arenas M.A. 1999. Informe final del Proyecto J101 Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín México, D.F., p 7, 52.
- Soto-Arenas M.A. y Dressler R.L. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. Ex Mill. (Orchidaceae, Vanillinae). *Lankesteriana* **9(3)**: 355-398.
- Tautz D y Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12(10)**: 4127-4138.
- Vogler D.W., Peretz S., Stephenson A.G. 1999. Floral plasticity in an iteroparous plant: The interactive effects of phenotype, environment, and ontogeny in *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae). *American Journal of Botany***86(4)**: 482-494.
- Ward D., Shrestha M.K., Golan-Goldhirsh A. 2012. Evolution and ecology meet molecular genetics: adaptative phenotypic plasticity in two isolated Negev desert populations of *Acacia raddiana* at either end of a rainfall gradient. *Annals of Botany* **109**: 247-255.
- Wilson P.M., Castellanos J.N., Houge J.D., Thomson W.S., Armbruster 2004. A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos***104**: 345-361.
- Wilson P.M., Castellanos A.D., Wofle, Thomson J.D. 2006. Shifts between bee and bird pollination in penstemons. In: Waser N.M. y Ollerton J. Eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. The University of Chicago Press, Chicago pp. 47-68.

## CONCLUSIONES GENERALES

### Conocimiento y conservación del pool genético secundario

Para la construcción y desarrollo de programas de mejoramiento de un recurso genético, es necesario generar un estudio integral que abarque tanto la especie en cuestión, como las especies silvestres estrechamente relacionadas (Soto-Arenas, 1999). El desconocimiento acerca de la variación dentro de estas especies impide generar estrategias de conservación (Herrera-Cabrera *et al.*, 2012). De esta manera la variación genética que las interacciones bióticas y abióticas dentro de su hábitat han producido a través del tiempo corre el riesgo de desaparecer. Por esta razón es imprescindible generar programas de conservación, no sólo de los recursos genéticos, sino de especies consideradas primordiales dentro de su pool genético secundario.

Como estrategia de conservación y mejoramiento del recurso genético vainilla (*V. planifolia*), se plantea la conservación de *V. insignis* como especie sobresaliente dentro de su pool genético secundario. Para implementar correctamente esta estrategia es necesario realizar trabajos de caracterización, a fin de conocer la variación infraespecífica de *V. insignis*. Las metodologías empleadas en esta tesis permiten conocer parte importante de esta variación, de manera que es posible identificar a los individuos cuya conservación sea representativa de la variación de la especie.

Dentro de los programas de ecología de conservación, se plantea asegurar la existencia de las especies como parte integral de un ecosistema (*in situ*) (Koopowitz, 2001) con esquemas de protección y gestión de los ecosistemas (Heywood, 1992). Mediante estas acciones de conservación, la diversidad genética y su dinámica poblacional y evolutiva es protegida (Iriondo-Alegría, 2001). Por otra parte, la fragmentación de hábitats y reducción de poblaciones impide su éxito.

La conservación *ex situ* es una técnica que permite la conservación de una especie fuera de su hábitat. Esta técnica consiste en la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de sus condiciones naturales a través de su almacenamiento en bancos de germoplasma (semillas, *in vitro*, polen, ADN) y jardines botánicos (Iriundo-Alegría, 2001).

La desventaja de la conservación *ex situ* es la inexistente interacción de la especie con su medio ambiente. La falta de estas interacciones evita la evolución paulatina y constante (Frankel, 1995), primordial para las especies en estado silvestre. Es decir, en la preservación bajo un esquema *ex situ*, el germoplasma queda “congelado”, en una situación desfavorable al limitar su evolución.

*V. insignis* es la especie de mayor extensión en México (Soto-Arenas, 1999; Soto-Arenas y Dressler, 2010). Esta característica complica la generación de estrategias para la conservación de su hábitat y el diseño de programas de conservación *in situ*. Debido a las particularidades de la especie, se recomiendan los dos esquemas de conservación. La conservación *in situ* permitirá mantener constantes las interacciones de *V. insignis* con su entorno, y la conservación *ex situ* asegurará la preservación de una muestra representativa de la población mediante su confinamiento en bancos de germoplasma.

Los resultados obtenidos del análisis morfométrico y molecular realizado en *Vanilla insignis* determinarán que existe variación infraespecífica en la orquidea en el estado de Quintana Roo, México. De los cuatro fenotipos identificados, se mostró que el genotipo dos, alberga la variación morfológica estudiada que la especie ha producido como estrategia de supervivencia. Basado en estos resultados, se recomienda enfatizar los esfuerzos de conservación para este genotipo en particular.

## Literatura Citada

- Herrera-Cabrera B.E., Salazar-Rojas V.M., Delgado-Alvarado A., Campos-Contreras J., Cervantes-Vargas J. 2012. Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan region, México. European Journal of environmental Sciences **2**(1):37-44
- Soto-Arenas M.A. 1999. Informe final del Proyecto J101 Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín, México, D.F.
- Soto-Arenas M.A. y Dressler R.L. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. Ex Mill. (Orchidaceae, Vanillinae). Lankesteriana **9**(3): 355-398.
- Iriondo-Alegría J.M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales **16** (1):5-12.
- Heywood V.H. 1992. Efforts to conserve tropical plants. A global perspective pp. 1-14. In: Adams R.P., Adams J.E., Eds. Conservation of plant genes, DNA banking and *in vitro* biotechnology. Academic Press. San Diego California.
- Koopowitz H. 2001. Orchids and their conservation Timber Press, Portland, Or. 176 pp.
- Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J.J. 1995. The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press.

## LITERATURA CITADA

- Ackerman J.D. y Galarza-Pérez M. 1991. Patterns and maintenance of extraordinary variation in the Caribbean orchid *Tolumnia (Oncidium) Variegata*. *Systematic Botany* **16**(1):182-194.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports***27**: 617-631.
- Alpha EASE v 6.0.0 (2006) Alpha Innotech Corporation.
- Armbruster W.S. 2002. Can indirect selection and genetic context contribute to trait diversification? A transition probability study of blossom color evolution in two genera. *Journal of Evolutionary Biology***15**:468-486.
- Azeez S. 2008. Vanilla In: Chemistry of Spices CAB International, Wallingford. 287-311.
- Balduzzi A. y Tomaseli R. 1979. "Carta fisionómico-estructural de la vegetación del Messico". *Atti Istituto Botanico Laboratorio Crittogamico della Università Pavia*, s.6, XIII:3-43- Escala 1:4 000 000.
- Borba E.L., Funch R.R., Ribeiro P.L., Smidt E.C., Silva-Pereira V. 2007. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Systematics and Evolution***267**:129-146.
- Bory S., Da Silva D., Risterucci A.M., Grisoni M., Besse P., Duval M.F. 2008 Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: Polymorphism and transferability to other *Vanilla* species. *Scientia Horticulturae***115**: 420-425.
- Bory S., Lubinsky P., Risterucci A.M., Noyer J.L., Grisoni M., Duval M.F., Basse P. 2008 Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany***95**(7): 805-815.

- Brownell R.J. 2011. Fair Trade- the future of Vanilla? In D. Havkin-Frenkel & F. Belanger. Handbook of Vanilla. *Science and Technology* 107-116.
- Catling PM. 1990. *Malaxis salazarii*, a new species from Mexico and northern Mesoamerica. *Orquidea* **12**(1): 93-104.
- CONABIO 1998. "Precipitación total anual" México. Escala 1:1 000 000.
- COREL (2007) CorelDRAW® Graphics Suite X4.
- Darwin C. 1859. *The origin of species*. Feedbooks. 1-463.
- Dneasy Plant Handbook (2012) Sample and Assay Technologies. QUIAGEN. 49 p.
- Emigh T.H. y Goodman M.M. 1985. Multivariate analysis in nematode taxonomy. In: Barker K.R., Carter CC, Sasser J.N. Eds. *An advanced treatise on meloidogyne* **2**:197-204, Dept. of Plant Pathology, NCSU, North Carolina.
- Endress P. 1999. Symmetry in flowers-diversity and evolution. *International Journal of Plant Sciences* **160**: 3-23.
- Evans L.T. (1996) *The Domestication of Crop Plants. Crop evolution, adaptation and yield*, Cambridge University Press. Cambridge.
- Fernández-Fernández S. Cordero-Sánchez J.M. Córdoba A. María-Cordero J. Córdoba-Largo A. 2002. *Estadística Descriptiva*. Esic Market.
- Franco T.L. e Hidalgo R. 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia.
- Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J.J. 1995. *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press.

- Frazer J.E. y Marquis R.J. 1994. Environmental contribution to floral trait variation in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *American Journal of Botany* **81**: 206-215.
- Galindo I., Castro S., Valdés M. 1990. "Radiación Solar Global Media Estacional III" en Energía: Producción, Consumo y Recursos Potenciales. VI.1.1. Escala 1:16 000 000. Atlas Nacional de México, Vol III. Instituto de Geografía UNAM. México.
- García E. 1990. "Rangos de humedad". Extraído de Climas. IV.4.10. Atlas Nacional de México. Vol II. Escala 1:4 000 000. Instituto de Geografía UNAM. México.
- Geneious 5.6.6 (2005) Geneious 5.6.6 Biomatters Ltd.
- Govaerts R. 2003. *World Checklist of Monocotyledons Database*. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. ACCESS:1-71827.
- Hernández M.E. 1990. "Mayo: mes de máxima insolación" en Observatorios, Estaciones Meteorológicas e Insolación. IV.4.1. Atlas Nacional de México, Vol. II. Escala 1:8 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- Herrera-Cabrera B.E., Castillo-González F., Ortega-Pazkca R.A., Sánchez-González J.J., Goodman M.M. 2000. Caracteres r para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: caso la raza Chalqueño. *Revista Fitotecnia Mexicana* **23**:335-354.
- Herrera-Cabrera B.E., Castillo-González F., Sánchez-González J.J., Hernández-Casillas J.M., Ortega-Pazkca R.A., Major-Goodman M. 2004 Diversidad del maíz Chalqueño. *Agrociencia* **38**: 191-206.
- Herrera C.M., Castellanos M.C., Medrano M. 2006. Geographical context of floral evolution: Toward and improved research programme in floral diversification. In: Harder L.D. y Barret S.C.H. Eds. *Ecology and evolution of flowers*. pp. 278-294, Oxford University Press, New York.

- Herrera-Cabrera B.E., Delgado-Alvarado A. 2012 *Recursos genéticos uso y conservación. Apuntes mimeografiados de Recursos Genéticos y su Diversidad*. Colegio de Postgraduados-Campus Puebla. Puebla. México.
- Herrera-Cabrera B.E., Salazar-Rojas V.M., Delgado-Alvarado A., Campos-Contreras J., Cervantes-Vargas J. 2012. Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan region, México. *European Journal of environmental Sciences* **2**(1):37-44
- Hilu K.W., Borsch T., Muller K., Soltis D.E., Soltis P.S., Savolainen V., Chase M., Powell M., Alice L., Evans R., Sauquet H., Neinhuis C., Slotta T., Roher J., Chatrou L. 2003. Inference of angiosperm phylogeny based on matk sequence information. *American Journal of Botany* **90**:1758-1776.
- Hodgins K.A. y Barret S.C.H. 2008. Geographic variation in floral morphology and style-morph rations in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany* **95**(2): 185-195.
- Hunter J. 1998. Key innovations and the ecology of macroevolution. *Tree***13**: 31-36.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI)-Instituto Nacional de Ecología (INE) 1996. “Uso de suelo y vegetación INEGI Agrupado por CONABIO” (1998) Escala 1:1 000 000. México.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. 2007. *Plants systematics. A phylogenetic approach*. Sinauer Associates Inc. Sunderland.
- Kay K.M., Reeves R.G., Olmstead, Schemske D.W., 2005. Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Sostaceae): evidence of nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany***92**: 1899-1910.
- Lubinsky P. 2003. Conservation of wild Vanilla, In: *Proceedings of Vanilla, First International Congress*, Princeton, NJ 08540, New Jersey, USA.

- Lubinsky P., Cameron K.M., Molina M.C., Wong M., Andrzejewski S.L., Gómez-Pompa A., Kim S.C. 2008. Neotropical roots of a Polynesian spice: The hybrid origin of Tahitian vanilla, *Vanilla tahitiensis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany***95**(8): 1040-1047.
- Madery L.E. 1990. "Evapotranspiración real" en Hidrogeografía IV6.6. Atlas Nacional de México. Instituto de Geografía UNAM México. Vol. II. Escala 1:4 000 000.
- Maples-Vermeersch M. .1992. "Regímenes de humedad del suelo" en Hidrogeografía IV.6.2. Atlas Nacional de México Vol. II. Escala 1:4 000 000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Mascó M., Noy-Meir I., Sérsic A.N. 2004. Geographic variation in flower color patterns within *Calceolaria uniflora* Lam. In Southern Patagonia. *Plant Systematics and Evolution***244**: 77-91.
- Max K.N., Mouchaty S.K., Schwaegerle K.E. 1999. Allozyme and Morphological variation in two subspecies of *Dryas octopetala* (Rosaceae) in Alaska. *American Journal of Botany* **86**(11): 1637-1644.
- Microsoft Exel 2010. Microsoft Office Professional Plus 2010.
- Minoo D., Nirmal B.K., Ravindran P.N., Peter K.V. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Society of Horticulture* **108**: 414-422.
- Minoo D., Javakumar V.N., Veena S.S., Vimala J., Basha A., Saji K.V., Nirmal-Babu K., Peter K.V. 2007. Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution* **55**(3):459-470.

- Palestina R.A. y Sosa V. 2002. Morphological variation in populations of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) and description of the new species *B. riparia*. Brittonia. *The New York Botanical Garden Press* **54**(2): 99-111.
- Parra V.M.R. 1954. "Recursos naturales ecosistemas y uso múltiple" en Cuevas, S.J. "Etnobotánica" (Notas del curso) Pág. 128. Depto. de Fitotecnia, Chapingo, Méx.
- Peak Scanner v1.0 (2006) The Peak Scanner™ Software Version 1.0
- Peakall R. y Schiestl F.P. 2004. A mark-recapture study of male *Colletes cunicularius* bees: implications of pollination by sexual deception. *Behav Ecol Sociobiol* **56**: 579-584.
- Podolsky R.H. y Holtsford T.P. 1995. Population structure of morphological traits in *Clarkia, Dudleyana* I, comparison of Fst between allozymes and morphological traits. *Genetic* **140**:733-744.
- Powell W., Gordon M.C., Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trend in Plants Science* **1**: 215-222.
- Rafalsky J.A. y Tingey S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* **9**: 275-279.
- Rihimaki M. y Savolainen O. 2004. Environmental And genetic effects on flowering differences between northern and southern populations of *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **91**(7): 1036-1045.
- Rzedowski J (1990) "Vegetación Potencial". IV.8.2. Atlas Nacional de México. Vol II. ESCALA 1:4 000 000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- SAS (2011) SAS version 9.3 SAS Institute Inc. North Carolina.
- Salazar-Rojas V.M., Herrera-Cabrera B.E., Soto-Arenas M.A., Castillo-Gonzalez F. 2010. Morphological variation in *Laelia anceps* subsp. *Dawsonii* f. *chilapensis* Soto-Arenas

- (Orchidaceae) in traditional home gardens of Chilapa, Guerrero, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution***57**:543-552.
- Salazar-Rojas V.M., Herrera-Cabrera B.E., Delgado-Alvarado A., Soto-Hernández M., Castillo-González F., Cobos-Peralta M. 2011. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution***59**(5): 875-887.
- Schlotterer C. y Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**: 2211-2215.
- Schmitt J., Stinchcombe J.R., Shane-Heschel M., Huber H. 2003. The adaptive evolution of plasticity: Phytochrome-mediated shade avoidance responses. *Integrative and Comparative Biology***43**: 459-469.
- Schemske D.W. y Bierzychudek P. 2001. Perspective: evolution of flower color in the desert annual *Linanthus parryae*; wright revisited. *Evolution***55**:1269-1282.
- Schiestl P.F. 2005. On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *Naturwissenschaften* **92**: 255-264.
- Sharma A., Verma S.C., Saxena N., Chadda N., Singh N.P., Sinha A.K. 2006. Microwave and ultrasound assisted extraction of vanillin and its quantification by high performance liquid chromatography in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science* **29**: 613-619.
- Shimono Y., Watanabe M., Hirao A.S., Wada N., Kudo G. 2009. Morphological and genetic variations of *Potentilla matsumurae* (Rosaceae) between fellfield and snowbed populations. *American Journal of Botany***96**(4): 728-737.
- Sostaric T., Boyce M.C., Spickett E.E. 2000. Analysis of the volatile components in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 5802-5807.

- Soto-Arenas M.A. 1999. Informe final del Proyecto J101 Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín, México, D.F.
- Soto-Arenas MA 2006. La vainilla. Biodiversitas Núm 66. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el uso y conocimiento de la biodiversidad. CONABIO, México.
- Soto-Arenas M.A. y Dressler R.L. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. Ex Mill. (Orchidaceae, Vanillinae). *Lankesteriana* **9**(3): 355-398.
- Soto-Arenas M.A., Dressler R.L. 2010. A revisión of the mexican and central american species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana* **9**(3): 285-354.
- Tautz D. y Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**(10): 4127-4138.
- Toussain-Samat M. 2002. La vainilla en México una tradición con alto potencial. Claridades Agropecuarias.
- Vargas-Sabadías A. 1996. *Estadística descriptiva e inferencial*. Universidad de Castilla La Mancha.
- Vogler D.W., Peretz S., Stephenson A.G. 1999. Floral plasticity in an iteroparous plant: The interactive effects of phenotype, environment, and ontogeny in *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae). *American Journal of Botany* **86**(4): 482-494.
- Ward D., Shrestha M.K., Golan-Goldhirsh A. 2012. Evolution and ecology meet molecular genetics: adaptative phenotypic plasticity in two isolated Negev desert populations of *Acacia raddiana* at either end of a rainfall gradient. *Annals of Botany* **109**: 247-255.
- Wescott R.J., Cheetham P.S.J., Arraclough A.J.B. 1994 Use of organized viable vanilla plant aerial roots for the production of natural vanillin. *Phytochemistry* **35**:135-138.

Wilson P.M., Castellanos J.N., Houge J.D., Thomson W.S., Armbruster 2004. A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos***104**: 345-361.

Wilson P.M., Castellanos A.D., Wofle, Thomson J.D. 2006. Shifts between bee and bird pollination in penstemons. In: Waser N.M. y Ollerton J. Eds. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*, pp. 47-68, The University of Chicago Press, Chicago.