



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CARACTERIZACIÓN DEL POOL GENÉTICO SILVESTRE DE *Vanilla planifolia* G. Jack. (Orchidaceae) EN OAXACA

JESÚS HERNÁNDEZ RUÍZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2015



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

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

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

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 **Jesús Hernández Ruíz**, 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 **CARACTERIZACIÓN DEL POOL GENÉTICO SILVESTRE DE *Vanilla planifolia* G. Jack. (Orchidaceae) EN OAXACA**, 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, 09 de diciembre del 2015.

Jesús Hernández Ruíz

Vo. Bo. Profesor Consejero o Director de Tesis
Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera

La presente tesis, titulada: **Caracterización del pool genético silvestre de *Vanilla planifolia* G. Jack. (Orchidaceae) en Oaxaca**, realizada por el alumno: **Jesús Hernández Ruíz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA


ASESOR:


DR. JAVIER RAMÍREZ JUÁREZ

ASESOR:


DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:


DR. ÁNGEL BUSTAMANTE GONZÁLEZ

ASESOR:


DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

Puebla, Puebla, México, 09 de diciembre del 2015

CARACTERIZACIÓN DEL POOL GENÉTICO SILVESTRE DE *Vanilla planifolia* G. Jack.
(ORCHIDACEAE) EN OAXACA

Jesús Hernandez Ruíz, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2015

Los especímenes silvestres de *V. planifolia* forman parte del acervo genético primario y son de suma importancia para la conservación de la especie. Sin embargo, la información existente sobre poblaciones silvestres, las cuales en México se distribuyen principalmente en el estado de Oaxaca, es nula. El objetivo de la presente investigación fue conocer la distribución potencial y la variación morfológica, fitoquímica y genética que integra el acervo genético silvestre de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca. La delimitación de zonas potenciales se determinó mediante el modelo de máxima entropía (Maxent), con 22 variables bioclimáticas como predictores. La variación morfológica se evaluó a través del labelo de la flor. La variación fitoquímica se determinó con variables que definen la calidad aromática del fruto (vainillina, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzoico) mediante un análisis de cromatografía líquida de alta resolución. La variación genética se evaluó con 14 loci microsatélites para calcular el grado de diferenciación genética entre las poblaciones. El hábitat potencial de *V. planifolia* se distribuyó en cuatro zonas del estado de Oaxaca. Las variables que determinan la distribución son: precipitación y régimen de humedad del suelo. La mayor cantidad de variabilidad genética fue encontrada entre individuos (55%) que conforman las poblaciones silvestres de *V. planifolia*, las cuales poseen un 45 % de variabilidad genética entre ellas. La variación infraespecífica de las poblaciones silvestres de *V. planifolia* está determinada por dos genotipos (G1 y G2). El genotipo G1 expresa dos formas del labelo en condiciones del clima templado húmedo y dos aromas con concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\sum\text{CM}/\text{vainillina}$) de 8 a 11% y una de 13%. El genotipo G2 expresa dos formas del labelo, una que corresponde al clima templado húmedo del pacífico donde la expresión del aroma responde $\sum\text{CM}/\text{vainillina}$ de 9% y la expresión del labelo que corresponde al clima trópico húmedo, donde el aroma tiene una concentración de $\sum\text{CM}/\text{vainillina}$ de 12%.

Palabras clave: calidad aromática, distribución potencial, genotipos, morfometría, vainilla.

CHARACTERIZATION OF WILD GENE POOL OF *Vanilla planifolia* G. Jack.
(ORCHIDACEAE) IN OAXACA

Jesús Hernandez Ruíz, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2015

Wild specimens of *V. planifolia* are part of the primary gene pool and are important for the conservation of the species. However, there is a lack of information on the wild populations of vanilla, which in Mexico are mainly distributed in the state of Oaxaca. The objective of this research was to determine the potential distribution, and the morphological, phytochemical and genetic variation that integrates the wild gene pool of *V. planifolia* in the state of Oaxaca. The delineation of potential areas was carried out with the model of maximum entropy (Maxent), with 22 bioclimatic variables as predictors. Morphological variation was evaluated base on lip flower. Phytochemical variation was determined with variables defining aromatic fruit quality (vanillin, vanillic acid, p-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzoic), by analysis of high-performance liquid chromatography. The genetic variation was assessed using 14 microsatellite loci to estimate the degree of genetic differentiation between populations. Potential habitat of *V. planifolia* was distributed in four areas of the state of Oaxaca. The variables that determine the vanilla distribution were precipitation and soil moisture regime. Most genetic variability (55%) was found among individuals within wild populations of *V. planifolia*, while genetic variation between populations was 45%. The infraspecific variation of wild populations of *V. planifolia* is determined by two genotypes (G1 and G2). G1 genotype expresses two forms of the labellum in the humid temperate climate, two scents with concentrations of the sum of minor compounds on vanillin ($\Sigma\text{CM}/\text{vanillin}$) of 8 to 11%, and a scent with concentrations of 13%. Genotype G2 expresses two forms of the labellum of the flower; the first was associated with humid temperate climate of the Pacific, where the expression of flavor responds to $\Sigma\text{CM}/\text{vanillin}$ 9%; the second expression of the labellum was associated with tropical humid climate, where the aroma had a concentration $\Sigma\text{CM}/\text{vanillin}$ 12%.

Keywords: aromatic quality, morphometry, genotypes, potential distribution, vanilla.

DEDICATORIA

“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad.” (Julio Verne).
La culminación de esta tesis doctoral, está dedicada:

A Rosa Adriana Juárez
Fuente de amor, apoyo, sueños y comprensión,
gracias por ser mi compañera en esta travesía llamada vida.

A Ángel Gabriel y Luz Arlette
Mi motivación, alegría y cariño, ustedes mis hijos.

A Lucia y Nicolás
Ejemplo de esfuerzo, dedicación, calidad humana y amor a lo que se hace,
gracias padres, los amo.

Al Dr. Braulio Edgar
Por permitirme ser su alumno y guiarme en el proceso de formación académica

AGRADECIMIENTOS

“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad” (Karl Popper). La presente tesis doctoral se realizó gracias al esfuerzo de diferentes personas e instituciones a las cuales quisiera expresar mi agradecimiento:

A las personas de las comunidades de Arroyo iguana, Arroyo Aguacate, Santiago Tlatepusco, San Felipe Usila, Santiago Lalopa, Yae, Sochiapam, Santa María Chimalapa y Pluma Hidalgo, por su hospitalidad, y apoyo en la ubicación de poblaciones silvestres de vainilla.

Al Colegio de Postgraduados Campus Puebla por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó e hizo posible mis estudios de Doctorado.

Al Proyecto 2012-04-190442 “Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la producción de vainilla en México” y el SNITT (Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Rural Sustentable) que permitieron el financiamiento para el desarrollo de la investigación.

A los miembros del Consejo Particular de la presente investigación que me orientaron durante la investigación, escrito y desarrollo de la tesis doctoral: Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera, Dra. Adriana Delgado Alvarado, Dr. Ángel Bustamante González, Dr. Javier Ramírez Juárez, Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras. Especialmente al Dr. B. Edgar Herrera Cabrera, por su asesoría académica, consejos, comentarios, los cuales fueron indispensables para la investigación y sobre todo gracias por su amistad.

Al Dr. Víctor M. Salazar Rojas, por su tiempo al desarrollo de ideas, sugerencias y comentarios.

A mis compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados, por su convivencia y amistad a lo largo de este tiempo

Esta investigación fue financiada por:



Colegio de Postgraduados



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; Beca Doctoral)



Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Rural Sustentable



Proyecto 2012-04-190442 “Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la producción de vainilla en México”

Contenido

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Justificación	2
2. Planteamiento del problema	3
3. Hipótesis	4
4. Objetivos	4
5. Literatura citada	5
CAPÍTULO I	
Distribución potencial y características geográficas de poblaciones silvestres de <i>Vanilla planifolia</i> (Orchidaceae) en Oaxaca, México	7
<i>Resumen</i>	9
<i>Abstract</i>	10
<i>1.1 Introducción</i>	10
<i>1.2 Materiales y métodos</i>	11
<i>1.3 Resultados</i>	13
<i>1.4 Discusión</i>	19
<i>1.5 Agradecimientos</i>	21
<i>1.6 Literatura citada</i>	22
CAPÍTULO II	
Estructura de la variación morfológica del labelo en poblaciones de <i>Vanilla planifolia</i> G. Jack (Orchidaceae) en Oaxaca, México	27
<i>Resumen</i>	28
<i>Abstract</i>	29
<i>2.1 Introducción</i>	29
<i>2.2 Materiales y métodos</i>	30
<i>2.3 Resultados y discusión</i>	34
<i>2.4 Literatura citada</i>	43
CAPÍTULO III	
Variación de compuestos fenólicos en poblaciones silvestres de <i>Vanilla planifolia</i> G. Jack (Orchidaceae) en Oaxaca-México	48
<i>Resumen</i>	49
<i>Abstract</i>	50

3.1 Introducción	50
3.2 Metodología	50
3.3 Resultados y discusión	54
3.4 Conclusiones	61
3.5 Literatura citada	61
CAPÍTULO IV	
Variación morfológica, aromática y genética de poblaciones silvestres de <i>Vanilla planifolia</i> G. Jack. (Orchidaceae) en Oaxaca-México	65
<i>Resumen</i>	66
<i>Abstract</i>	67
4.1 Introducción	668
4.2 Materiales y métodos	68
4.3 Resultados	74
4.4 Discusión	83
4.5 Conclusiones	85
4.6 Literatura citada	86
CAPÍTULO V	
Estrategia de conservación de <i>Vanilla planifolia</i> mediante caracterización infraespecífica y representatividad ecológica en Oaxaca, México	90
<i>Resumen</i>	91
<i>Abstract</i>	92
5.1 Introducción	913
5.2 Materiales y métodos	93
5.3 Resultados	98
5.4 Discusión	107
5.5 Conclusiones	110
5.6 Literatura citada	111
CONCLUSIONES GENERALES	116

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Vanilla* pertenece a la familia de las orquídeas y contiene 110 especies (Govaerts et al., 2008). De las 15 especies que se distribuyen en México y centro América (Soto Arenas y Dressler 2010), destaca *Vanilla planifolia* G. Jack. por el sabor y aroma de las vainas en la industria de alimentos, perfumes y en preparaciones farmacéuticas (Reineccius, 1995, Walton et al., 2003).

Por la importancia económica que representa la vainilla, existe un esfuerzo a nivel global para caracterizar su diversidad, específicamente la variación entre y dentro de las poblaciones de *V. planifolia* (Bory et al., 2007; Grisoni et al., 2007). De tal forma que México como centro de origen de la especie (Verpoorte, 2011), es considerado como la zona donde se encuentra el acervo genético (pool genético) primario de *V. planifolia*, el cual está conformado por los cultivares y especímenes silvestres (Soto-Arenas, 1999).

La información sobre los cultivares a principios del año 2000 sugería que las plantaciones comerciales de vainilla en México, fueron establecidas a partir de un solo clon denominado “tipo mansa” (Ecott, 2004; Bory et al., 2007), lo cual propiciaría baja variación genética derivada de la constante multiplicación clonal (Minoos et al., 2007). Sin embargo en investigaciones posteriores se reportó la existencia de cinco quimiotipos, cada uno regulado por la expresión de un genotipo, los cuales fueron resultado de un proceso de domesticación realizado por grupos Totonacos en México (Salazar-Rojas et al., 2011; Herrera-Cabrera et al., 2012).

A pesar de la existencia de variación genética en cultivares, estos se encuentran sometidos a estrés biótico (Vanitha et al., 2012), reflejado en la caída de fruto e infección de hongos y bacterias (Joseph y Bhai, 2001) dado que los cultivares no se desarrollan en las condiciones ambientales idóneas. Por esta razón, se plantea la necesidad de conocer las características bióticas y abióticas en las que se desarrollan las poblaciones silvestres de vainilla, así como la variación a nivel morfológico de estructuras reproductivas como el labelo, la variación de compuestos fenólicos que determinan el aroma y la variación genética existente entre y dentro

de poblaciones silvestres. La información obtenida servirá como base para desarrollar propuestas, que integren conocimiento detallado sobre características, morfológicas, fitoquímica y genéticas de las poblaciones silvestre de vainilla en el estado de Oaxaca, para la articulación en la toma de desiciones sobre la conservación y o aprovechamiento del recurso genético.

1. Justificación

En México, la mayoría de las colectas de vainilla identificadas como silvestres provienen del estado de Oaxaca (Soto-Arenas, 1999; Cibrián-Jaramillo, 1999; Schlütter, 2007), donde los frutos se colectan para usos locales en comunidades de la Sierra Mazateca y Chinanteca en la región noreste del estado (Soto-Arenas, 1999). Este tipo de aprovechamiento es característico de las especies silvestres, dado que son colectadas sólo cuando es necesario y son mantenidas en los campos donde fueron encontradas (Vodouhè et al., 2012).

En Oaxaca, el manejo de la vainilla ha ido construyéndose y su cultivo se estableció a partir de 1986 (Carrasco et al., 2000), por lo cual es posible ubicar las plantas madres con las que se establecieron los cultivos (Soto-Arenas 1999). En contraste, en Veracruz y Puebla, lugares reconocidos como la zonas de domesticación y cultivo (Herrera-Cabrera et al., 2012), las poblaciones colectadas no han reportado especímenes en estado silvestre (Cibrián-Jaramillo, 1999; Schlütter, 2007).

El auge en la producción de vainilla en el mundo, durante la década de 1990 (Lubinsky et al., 2008), generó la recolección excesiva de plantas para el establecimiento de cultivos. Así mismo, la destrucción de su hábitat por fenómenos humanos y meteorológicos (Herrera-Cabrera et al., 2012) vulneró fuertemente a la especie en su entorno natural. Por lo anterior, un conocimiento detallado de la localización y variación morfológica, fitoquímica y genética de *V. planifolia* es un requisito previo para utilizar y conservar este recurso genético (Wan et al., 2014).

2. Planteamiento del problema

En México, se comenzaron a realizar estudios de variación entre y dentro de poblaciones a finales de los años noventa, mediante la técnica de electroforesis de isoenzimas (Cibrian-Jaramillo, 1999; Soto Arenas, 1999). Los resultados muestran que las plantaciones de vainilla en Veracruz se distinguen claramente de las poblaciones silvestres y cultivos de Oaxaca, estos últimos son los que tienen niveles de polimorfismo y heterocigosis más elevados.

Posteriormente, con el uso generalizado de marcadores moleculares en estudios de análisis de diversidad y variación genética en la familia Orchidaceae (Wang et al., 2004). Se realizaron estudios con marcadores moleculares de amplificación de ADN polimórfico (RAPD) en los cuales Schluter et al. (2007) agrupan la variación de México en dos grupos, uno constituido solamente por plantas en condiciones de cultivo en el estado de Veracruz y un grupo que contiene plantas silvestres procedentes de Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo.

Otros análisis con marcadores RAPD (Besse et al., 2004; Minoos et al., 2007), demostraron la existencia de baja diversidad genética en las zonas de cultivo que se encuentran fuera de Mesoamérica (Lunbisky et al., 2008). Así mismos la evaluación de diversidad mediante SSR (Bory et al., 2008), demostró que los cultivares que se localizan en la isla reuñón y a lo largo del océano Indico, poseen bajos niveles de variación, lo que fortalece el supuesto de que los cultivos de *V. planifolia* poseen un único Origen Clonal (Duval et al., 2006; Minoos et al., 2007). Lo anterior hace importante conocer la variación genética en las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en Oaxaca. Así mismo determinar si existe variación en caracteres florales del labelo y en los compuestos fenólicos que determinan el aroma en los frutos. El estudio detallado de la estructura genética, morfológica y fitoquímica de la especie podrán sentar bases teóricas para el desarrollo de estrategias para conservar y utilizar el recurso genético Vainilla.

3. Hipótesis

General

Existe variación morfológica, fitoquímica y genética dentro del pool genético silvestre de *V. planifolia*, el cual se estructura ambiental y espacialmente en el estado de Oaxaca, México.

Particulares

- 1.-Las variables ambientales: clima, precipitación, altitud, régimen de humedad, determinan la distribución espacial de las poblaciones silvestres de *V. planifolia*.
- 2.-Existe variación genética, morfológica y fitoquímica entre las poblaciones de *V. planifolia* que se distribuyen dentro del estado de Oaxaca.
- 3.-La información sobre la variación infraespecífica y de representatividad ecológica de las poblaciones de *V. planifolia* aportará información para formular una estrategia de conservación de la especie.

4. Objetivos

General

Conocer la variación morfológica, fitoquímica y genética, que integra el pool genético silvestre de *V. planifolia* y las zonas ecológicas donde se distribuye en el estado de Oaxaca, México.

Específicos

1. Identificar y ubicar poblaciones silvestres de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca.
2. Definir las zonas ecológicas donde se localizan las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca.
3. Analizar el tipo de polimorfismo (genético, morfológico, fitoquímico) y la estructura que existe en las poblaciones de *V. planifolia* de Oaxaca.
4. Formular una estrategia de conservación de las poblaciones silvestres de *V. planifolia* basado en la caracterización infraespecífica y representatividad ecológica de la especie.

5. Literatura citada

- Besse, P., Da Silva, D., Bory, S., Grisoni, M., Le Bellec, F., & Duval, M. F. (2004). RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science*, 167(2), 379-385.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.F., & Besse, P. (2007). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571
- 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(4), 420-425.
- Carrasco, T., Iturralde, D., & Uquillas, J. (Eds.). (2000). Doce experiencias de desarrollo indígena en América Latina. Fondo para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas de América Latina y el Caribe. 276 p.
- Cibrián-Jaramillo, A. (1999). Variación Genética de *Vanilla planifolia* en México. Tesis, Facultad de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, D.F., México. 56 p.
- Ecott, T. (2004). Vanilla: Travels in search of the ice cream orchid. Grove Press, New York. 352 p.
- Govaerts, R., M. A. Campacci, D. Holland Baptista, P. Cribb, A. George, K. Kreuz, & J. Wood. (2008). World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Link. <http://www.kew.org/wcsp/>
- Grisoni, M., Moles, M., Besse, P., Bory, S., Duval, M. F., & Kahane, R. (2007). Towards an international plant collection to maintain and characterize the endangered genetic resources of vanilla. In *XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: II International Symposium on Plant Genetic Resources of Horticultural* 760, 83-91 pp.
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras, C., & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 37-44.
- Joseph T, Bhai S (2001). Sclerotium rot-a new disease of vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) in India. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 9(2), 175-176.

- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J. H., Kim, S. C., & Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]) 1. *Economic botany*, 62(2), 127-138.
- Minoo, D., Jayakumar, 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 RAP D polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3), 459-470.
- Reineccius, D. G. (1995). Flavor Chemistry. In D. G. Reineccius (Ed.), *Source Book of Flavors*. Springer Science & Business Media. New York. 351-361 pp.
- 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.
- Schlüter, P. M., Arenas, M. A. S., & Harris, S. A. (2007). Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany*, 61(4), 328-336.
- Soto-Arenas, M. A. & R. L. Dressler. (2010). A revision 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. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chino AC. Informe Final SNIB-CONABIO, Proyecto J101. Link <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf>
- Vanitha, K., Karuppuchamy, P., Sivasubramanian, P. (2012). *Vanilla* insect pests and their natural enemies. *Indian Journal of Entomology*, 74(4), 319-322.
- Verpoorte, R. (2011). Prólogo In: Odoux E and M Grisoni M (Eds.), *Vanilla (Medicinal and aromatic plants-industrial profiles)*. CRC Press. 420 pp.
- Vodouhè, R., & Dansi, A. (2012). The “Bringing into Cultivation” Phase of the Plant Domestication Process and Its Contributions to *In Situ* Conservation of Genetic Resources in Benin. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505-515.
- Wan, J., Wang, C., Han, S., & Yu, J. (2014). Planning the priority protected areas of endangered orchid species in northeastern China. *Biodiversity and Conservation*, 23(6), 1395-1409.

CAPÍTULO I
DISTRIBUCIÓN POTENCIAL Y CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS
DE POBLACIONES SILVESTRES DE *VANILLA PLANIFOLIA*
(ORCHIDACEAE) EN OAXACA, MÉXICO

Capítulo aceptado como artículo de investigación en la Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation (ISSN-0034-7744), el mismo será publicado en el volumen 64 fascículo (1) de marzo del 2016.

Resumen

Los especímenes silvestres de *Vanilla planifolia* G. Jack forman parte del acervo genético primario, los cuales solo se han reportado en Oaxaca, México. El objetivo fue ubicar y describir características ecológicas en zonas potenciales de distribución. La metodología empleada consistió de cuatro etapas: 1) Elaboración de una base de datos con registros de herbario; 2) Construcción de la distribución potencial basado en los registros históricos de herbario para la especie, mediante el modelo de máxima entropía (Maxent), con el uso de 22 variables bioclimáticas como predictores; 3) Realización de búsquedas sistemáticas de individuos *in situ* con base en los registros de herbario y las áreas de distribución potencial en 24 municipios, para conocer la situación y la distribución del hábitat actual, y 4) Descripción mediante factores ambientales de los nichos ecológicos potenciales generados por MaxEnt. La revisión de las colecciones de herbarios reportó un total de 18 registros de *V. planifolia*, comprendidos entre los años de 1939 a 1998. La búsqueda sistemática de individuos en campo ubicó 28 plantas distribuidas en 12 sitios en 95 364 Km². Las variables que contribuyeron con mayor valor porcentual para determinar la estimación del modelo de distribución potencial en vainilla son precipitación del periodo más lluvioso (61.9 %), régimen de humedad del suelo (23.4 %) y precipitación del cuatrimestre más lluvioso (8.1 %). El hábitat potencial de la especie se distribuyó en cuatro zonas; trópico húmedo del golfo de México, templado húmedo, trópico húmedo y templado húmedo del pacífico. La precipitación anual osciló de 2 500 a 4 000 mm, con lluvias en verano y porcentaje de precipitación invernal de 5 a 10 %. El régimen de humedad y clima predominantes fueron údico tipo I (330 a 365 días de humedad) y cálido húmedo (Am/A(C)m). Las plantas se ubicaron en altitudes de 200 a 1 190 msnm, en laderas accidentadas, que por lo general están al pie de sistemas montañosos de 1 300 a 2 500 metros de altitud. En condiciones naturales la distribución de la especie no se limita a selva alta perennifolia, dado que se ubicó en bosque mesófilo de montaña y bosque tropical perennifolio. La ubicación de nuevos especímenes de *V. planifolia* en condiciones silvestres reduce 66 % el área potencial de distribución y la fragmenta al pasar de ser una zona continua a ser tres zonas geográficamente separadas, de manera tal que se pueden emprender o diseñar acciones de conservación enfocadas a áreas más específicas dentro del estado de Oaxaca, México.

Palabras clave: Características ambientales, máxima entropía, modelación, nicho ecológico, vainilla.

Abstract

Wild specimens of *Vanilla planifolia* represent a vital part of this resource primary gene pool, and some specimens of this species have been reported only in Oaxaca, Mexico. For this reason, the distribution of the species was studied to locate and describe the ecological characteristics of the areas where they are found, in order to identify potential areas of establishment. The method comprised four stages: 1) creation of a database with herbarium registers, 2) construction of the potential distribution based on historical herbarium records for the species, using the model of maximum entropy (MaxEnt) and 22 bioclimatic variables as predictors; 3) systematic search of individuals *in situ* based on herbarium records and areas of potential distribution in 24 municipalities, to determine the current situation and distribution of the habitat; 4) description of environmental factors of the potential ecological niches generated by MaxEnt. A review of herbarium collections revealed a total of 18 records of *V. planifolia* between 1939 and 1998. The systematic search located 28 plants distributed in 12 sites on 95 364 Km². The variables that contributed most in determining the potential vanilla distribution model were precipitation in the rainy season (61.9 %), soil moisture regime (23.4 %) and precipitation in the four months of highest rainfall (8.1 %). The potential habitat of the species was found to be distributed in four zones: wet tropics of the Gulf of Mexico, humid temperate, humid tropical, and humid temperate of the Pacific. Precipitation oscillated within the annual ranges of 2 500 to 4 000 mm, with summer rains, and winter precipitation as 5 to 10 % of the total. The moisture regime and predominating climate were udic type I (330 to 365 days of moisture) and hot humid (Am/A(C)m). The plants were located at altitudes of 200 to 1 190 masl, on rough hillsides that generally make up the foothills of mountain systems, with altitudes of 1 300 to 2 500 masl. In natural conditions, distribution of the species is not limited to high evergreen forests, since it was also found in mountain mesophyll and tropical evergreen forests. The location of new specimens of *V. planifolia* in its wild condition reduces the potential distribution area by 66 %. This area is fragmented into three areas separated geographically. Conservation actions can thus be designed and implemented, focusing on more specific areas within the state of Oaxaca, Mexico.

Key words: Ecological niche, environmental characteristics, maximum entropy, modeling, vanilla

1.1 Introducción

Vanilla planifolia es una de las plantas aromáticas más importantes de la industria alimenticia, originaria de las zonas tropicales de México, y como recurso genético, es considerado uno de los legados agrobiológicos más importantes de las culturas mesoamericanas (Bory, Grisoni, Duval & Besse, 2007; Lubinsky, Bory, Hernández, Kim & Gómez-Pompa, 2008; Herrera-Cabrera, Salazar-Rojas, Delgado-Alvarado, Campos-Contreras & Cervantes-Vargas, 2012).

Los especímenes silvestres y los cultivares de *Vanilla planifolia* conforman el acervo genético primario de la especie (Soto-Arenas, 1999). Por lo que, al ser establecidas las plantaciones comerciales de vainilla a partir del clon denominado tipo mansa en México (Ecott, 2004; Bory et al., 2007), clon con baja variación genética por efecto de la erosión genética derivada de la constante multiplicación clonal (Minoos et al., 2007). Esto tiene consecuencias directas en la conservación de la especie, de ahí que sea importante conocer la distribución de las poblaciones silvestres de vainilla, para diseñar acciones de conservación de sus zonas potenciales de distribución.

Los hábitats de plantas silvestres, como las orquídeas, han sido afectadas negativamente por la interferencia humana y el cambio climático (Robbirt, Davy, Hutchings, & Roberts, 2011; Sánchez, Osborne & Haq, 2011). Para evaluar estos efectos, los modelos de distribución de especies son una herramienta útil (Guisan & Zimmermann, 2000; De Marco Junior & Siqueira, 2009; Siqueira & Durigan, 2007), ya que permiten identificar áreas potenciales donde puede desarrollarse la especie, y predecir cambios en las zonas de distribución (Rezende, Oliveira-Filho, Eisenlohr, Kamino, & Vibrans, 2014). Uno de los modelos más eficientes en la predicción de distribución espacial de especies es el modelo Maxent (Phillips, Dudík, & Schapire, 2006; Lehtomäki & Moilanen, 2013). El cual ha sido usado exitosamente para estimar la distribución de la familia Orchidaceae (Wan, Wang, Han & Yu, 2014).

En México, la mayoría de las colectas de vainilla identificadas como silvestres provienen del estado de Oaxaca (Soto-Arenas, 1999; Cibrián-Jaramillo, 1999; Schlütter, 2002), donde los frutos se colectan para usos locales en comunidades de la Sierra Mazateca y Chinanteca en la región noreste del estado (Soto-Arenas, 1999). Este tipo de aprovechamiento es característico de las especies silvestres, dado que se colectan sólo cuando es necesario y son mantenidas en

los campos donde fueron encontradas (Vodouhè et al., 2012). En Oaxaca, el manejo de la vainilla ha ido construyéndose, y su cultivo se estableció a partir de 1986 (Carrasco, Iturralde & Uquillas, 2000), por lo cual es posible ubicar las plantas madres con las que se establecieron los cultivos (Soto, 1999). En contraste, en Veracruz y Puebla, lugares reconocidos como las zonas de domesticación y cultivo (Soto-Arenas, 2003), las poblaciones colectadas no han reportado especímenes en estado silvestre (Cibrián-Jaramillo, 1999; Schlütter, 2002).

El auge en la producción de vainilla en el mundo, durante la década de 1990 (Lubinsky et al., 2008), generó la recolección excesiva de plantas para el establecimiento de cultivos. Así mismo, la destrucción de su hábitat por fenómenos humanos y meteorológicos (Herrera-Cabrera et al., 2012) vulneró fuertemente a la especie en su entorno natural. Por lo anterior, un conocimiento detallado de la distribución actual de la especie es un requisito previo para utilizar y conservar el recurso genético dentro de un ecosistema (Barik & Adhikari, 2011; Wan et al., 2014). En función de lo anterior, el objetivo del presente estudio fue ubicar y definir las características ecológicas de las zonas potenciales donde se pueda desarrollar *V. planifolia* J., en el estado de Oaxaca, México.

1.2 Materiales y métodos

Área de estudio: El estado de Oaxaca está ubicado en el sureste de la República Mexicana, entre los 15°39' y 18°42' de latitud norte y entre los 93°52' y 98°32' de longitud oeste y tiene una superficie de 95 364 Km² (INEGI, 2010). El estado tiene una complejidad orográfica, presencia de distintas zonas térmicas, distribución desigual de lluvia. El efecto espacial diferencial de los sistemas meteorológicos, contribuye a que sea uno de los tres estados con mayor biodiversidad de México (García-Mendoza, Ordóñez & Briones-Salas, 2004).

Base de datos: Se elaboró una base de datos para incluir sitios y localidades donde se reporta la existencia de *V. planifolia* en Oaxaca, México. La información se obtuvo a partir de la revisión de las colecciones de los herbarios Oakes Ames Orchid Herbarium (AMES), Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO), **Herbario Nacional de México** (MEXU), y herbario del Instituto de Ecología (XAL).

Modelado de distribución potencial basado en los registros históricos: Con la base de datos de los ejemplares de herbario y mediante la aplicación del programa MaxEnt versión 3.3.3 (Phillips et al., 2006; Mbatudde, Mwanjololo, Kakudidi & Dalitz, 2012), se modeló preliminarmente la distribución geográfica de *V. planifolia*. Se utilizaron 22 variables como predictores (Cuadro 1). Un total de 19 bioclimáticas de resolución espacial de 0.5 minutos de arco fueron obtenidas de la base de datos WorldClim (www.worldclim.org). Los datos digitales de elevación (DEM, 90 m de resolución) se obtuvieron de CGIAR-CSI (<http://srtm.csi.cgiar.org>). Las capas en formato vectorial de uso de suelo y vegetación (CONABIO, 1998e), y régimen de humedad del suelo se obtuvieron de la cartografía de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 1998e; Maples-Vermeersch, 1992). Las tres últimas variables empleadas se consideraron debido a que determinan el espacio físico en que habita la especie (Challenger & Caballero, 1998). El régimen de humedad, principalmente, delimita la formación vegetal dominante y establece la abundancia de poblaciones y parámetros de presencia en orquídeas (Zotz & Schmidt, 2006; Blinova, 2008).

Actualización de áreas de distribución potencial: En el año de 2013, se localizó en campo la presencia de plantas de vainilla en 24 municipios del estado de Oaxaca. El trabajo de campo se realizó en los periodos fenológicos de floración (febrero a abril) y madurez fisiológica del fruto (noviembre). A partir de los registros de herbario y la primera distribución potencial generada con el programa MaxEnt, y con el apoyo de pobladores locales, se hizo una búsqueda *in situ* de individuos de *V. planifolia*. La base de sitios con registro de presencia de individuos de la especie fue actualizada con los nuevos lugares donde se ubicó la especie. Se estimó nuevamente la distribución potencial y la idoneidad del hábitat con el programa MaxEnt versión 3.3.3 (Phillips et al., 2006; Mbatudde et al., 2012), con las variables bioclimáticas y ambientales del Cuadro 1.

Descripción de las áreas potenciales de distribución: Con el programa MaxEnt se obtuvo las capas **GradientFile** de distribución potencial, basado en los registros históricos y obtenidos en campo. Las capas se exportaron al programa ArcGIS 10.1 y se convirtieron a formato vectorial para estimar el tamaño de las áreas potenciales. Para describir sus atributos, se realizó la sobreposición de las capas temáticas de clima (CONABIO, 1998a), precipitación (CONABIO,

1998b), temperatura media anual (CONABIO, 1998c), régimen de humedad (Maples-Vermeersch, 1992), zonas ecológicas (Toledo & Ordoñez, 2009), curvas de nivel (CONABIO, 1998d) y uso de suelo y vegetación de Oaxaca, México (CONABIO, 1998e).

Cuadro 1. Variables ambientales y bioclimáticas utilizadas para conocer la distribución geográfica de *V. planifolia* en Oaxaca, México.

Código	Descripción de variable	Unidades *
Bio1	Temperatura promedio anual	°C
Bio2	Oscilación diurna de la temperatura	°C
Bio3	Isotermalidad	Adimensionales
Bio4	Estacionalidad de la temperatura	CV
Bio5	Temperatura máxima promedio del periodo más cálido	°C
Bio6	Temperatura mínima promedio del periodo más frío	°C
Bio7	Oscilación anual de la temperatura	°C
Bio8	Temperatura promedio del cuatrimestre más lluvioso	°C
Bio9	Temperatura promedio del cuatrimestre más seco	°C
Bio10	Temperatura promedio del cuatrimestre más cálido	°C
Bio11	Temperatura promedio del cuatrimestre más frío	°C
Bio12	Precipitación anual	mm
Bio13	Precipitación del periodo más lluvioso	mm
Bio14	Precipitación del periodo más seco	mm
Bio15	Estacionalidad de la precipitación	CV
Bio16	Precipitación del cuatrimestre más lluvioso	mm
Bio17	Precipitación del cuatrimestre más seco	mm
Bio18	Precipitación del cuatrimestre más cálido	mm
Bio19	Precipitación del cuatrimestre más frío	mm
Bio20	Altitud	m
Bio21	Régimen de Humedad	°
Bio22	Vegetación	23 tipos

* °C= grados centígrados, CV= coeficiente de variación, m= metros, mm=milímetros.

1.3 Resultados

Información de especímenes de herbario: De la revisión de las colecciones de herbarios se reportaron un total de 18 registros de *V. planifolia*; dos en AMES, 11 en AMO, tres en MEXU y dos en proyectos CONABIO, comprendidos entre los años de 1939 a 1998. La mayoría de los sitios de ejemplares (AMO/FAA, AMO/6672, AMO/6673, AMO/6674, AMO/7630, AMO/8040, AMO/8117, AMO/8483, AMO/11027, MEXU/1236315, MEXU/1236324, CONABIO/j101) se distribuyeron en la región norte de Oaxaca. El resto de los registros se

localizaron en cuatro regiones. El ejemplar AMES/9034, colectado por R. E. Schultes y P. Reko en la región Mixe de Oaxaca en 1939, que hasta el año 1990, era considerado ejemplar único de *V. planifolia* silvestre. La accesión CONABIO/g024, única reportada para la región de Santa María Chimalapa. Las colectas AMO/16698, AMO/16697, MEXU/1236318 forman un complejo aglutinado en la región de la Sierra Norte, y el ejemplar AMES/60425 de la región de la Costa, colectado en 1941. El Cuadro 2, fue construido con datos de ejemplares de herbarios AMES, AMO, MEXU y de registros de inventarios de especies de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Los ejemplares de *V. planifolia* (Cuadro 2), se ubican dentro dos regímenes de humedad (RH). El údico, de 330 a 365 días de humedad el cual contiene a los especímenes que se encuentran ubicados al norte del estado. El ústico, de 180 a 270 días de humedad, el cual es característico de las colectas de la región Sierra Norte, Costa e Istmo de Tehuantepec. La vegetación en la que se reportan principalmente es selva alta perennifolia. La temperatura media anual es de 23 a 25°C, con una precipitación anual de 2 000 a 4 000 mm y altitudes inferiores a los 500 msnm (MEXU/1236315, CONABIO/j101, MEXU/1236318, AMES/9034, AMO/7630, AMO/8117, AMO/8483, AMO/11027, MEXU/1236324, AMES/604259). Los especímenes AMO/16698, AMO/16697, MEXU/1236318 se ubicaron en la Sierra Norte donde la temperatura media anual y la precipitación son 18°C y de 800 a 1 200 mm, respectivamente, y una altitud de alrededor de 750 m.

Modelos de distribución: Los modelos de distribución generados con el programa Maxent tuvieron valores de AUC (umbral acumulativo) de 0.902 y 0.980 para la base de datos de ejemplares de herbario y para la actualización de especímenes existentes en campo, respectivamente (Figura 1). El AUC fue medido por encima de la predicción al azar y también estuvo por encima del valor de la diferencia esperada entre la sensibilidad y especificidad para la especie (Figura 1). Basándose en estos resultados, a partir de estudios anteriores en la familia Orchidaceae, la distribución prevista para *V. planifolia* se considera altamente fiable.

Cuadro 2. Características bióticas y abióticas de los especímenes registrados de *V. planifolia* en Oaxaca, México.

Colección	Zona ecológica	RH *	Precipitación media anual (mm)	Vegetación	Clima	Temperatura media anual (°C)
AMO/FAA	Templada Húmeda	Údico	2000-2500	Encinar tropical	Am	25
AMO/6672	Templada Húmeda	Údico	2500-4000	Cultivo	Am	25
AMO/6673	Templada Húmeda	Údico	2500-4000	Cultivo	Am	25
AMO/6674	Templada Húmeda	Údico	2500- 4000	Cultivo	Am	25
MEXU/1236315	Templada Húmeda	Údico	2500-4000	Selva Perennifolia	A(f)	23
CONABIO/j101	Templada Húmeda	Údico	2500-4000	Selva alta Perennifolia	Am	25
AMO/16698	Templada Subhúmeda	Ústico	800-1200	Acahual derivado Selva Perennifolia	C(w2)	18
AMO/16697	Templada Subhúmeda	Ústico	800-1200	Acahual derivado Selva Perennifolia	C(w2)	18
MEXU/1236318	Templada Subhúmeda	Ústico	800-1200	Selva Perennifolia	C(w2)	18
CONABIO/g024	Tropical Húmeda	Ústico	1500-2000	Selva Caducifolia	Am	25
AMES/9034	Tropical Húmeda	Údico	2500-4000	Selva Perennifolia	A(f)	23
AMO/7630	Tropical Húmeda	Údico	>4000	Selva Perennifolia	A(f)	23
AMO/8040	Tropical Húmeda	Údico	>4000	Cultivo	Am	25
AMO/8117	Tropical Húmeda	Údico	2500-4000	Selva Perennifolia	Am	25
AMO/8483	Tropical Húmeda	Údico	2500-4000	Selva Perennifolia	Am	25
AMO/11027	Tropical Húmeda	Údico	2500-4000	Selva alta Perennifolia	A(f)	23
MEXU/1236324	Tropical húmeda	Údico	2500-4000	Selva alta Perennifolia	A(f)	23
AMES/60425	Tropical subhúmeda	Ústico	1500-2000	Selva Perennifolia	Aw1	23

* RH: Regimen de Humedad

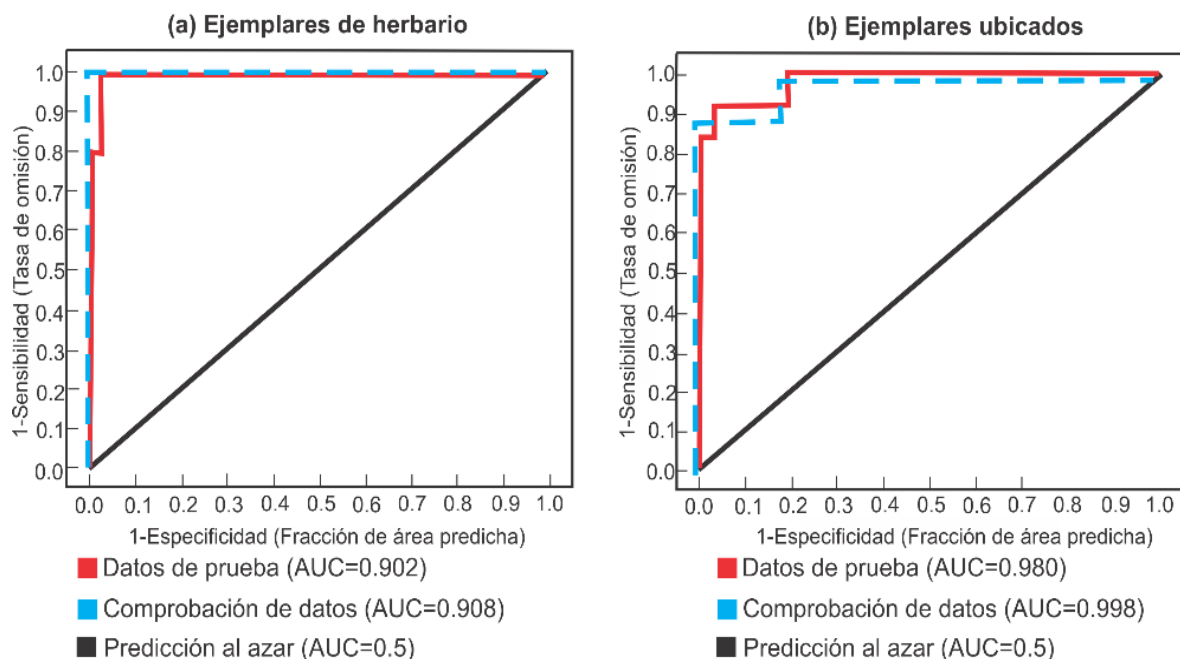


Figura 1. Sensibilidad y especificidad para los modelos de *V. planifolia*. La línea de color rojo muestra el ajuste del modelo a los datos de información de la especie. La línea azul indica el ajuste del modelo a los datos de pruebas de la especie y es la verdadera prueba de la capacidad de predicción del modelo (Phillips et al., 2006). La sensibilidad frente a especificidad se muestra para (a) el registro de herbario entre los años de 1939 a 1998; (b) la situación actual de la especie.

De las 22 variables utilizadas como predictores para el modelo basado en los registros de herbario, diez contribuyeron a determinar la estimación del modelo (Cuadro 3). Las de mayor importancia fueron la precipitación del periodo más lluvioso (50.1 %), el régimen de humedad (30.3 %) y la precipitación del cuatrimestre más lluvioso (10.4 %).

Para el modelo obtenido con base en los especímenes de *V. planifolia* localizados en campo, las variables con mayor relevancia en la determinación del modelo fueron también (Cuadro 3), precipitación del periodo más lluvioso (61.9 %), régimen de humedad (23.4 %) y la precipitación del cuatrimestre más lluvioso (8.1 %). Se observó que la delimitación de la especie está determinada por parámetros de precipitación y régimen de humedad del suelo.

Cuadro 3. Contribuciones porcentuales de las variables bioclimáticas en los modelos Maxent para *Vanilla planifolia*; en base al registro de herbario entre los años de 1939 a 1998 y la situación actual de la especie, 2013.

Variable	Registro herbario	Situación actual
Precipitación del periodo más lluvioso (Bio 13)	50.1	61.9
Régimen de humedad (Bio 21)	30.3	23.4
Precipitación del cuatrimestre más lluvioso (Bio 16)	10.4	8.1
Oscilación diurna de la temperatura (Bio 2)	0.4	2.8
Precipitación del cuatrimestre más frío (Bio 19)	1.4	1.5
Estacionalidad de la precipitación (Bio 15)	--	1
Isotermalidad (Bio 3)	0,1	0.6
Precipitación del cuatrimestre más cálido (Bio 18)	--	0.5
Temperatura mínima promedio del periodo más frío (Bio 16)	--	0.2
Vegetación (Bio 22)	4.8	0.1
Altitud (Bio 20)	0.3	--
Temperatura promedio del cuatrimestre más seco (Bio 9)	0.1	--
Precipitación anual (Bio 12)	2.1	--

Modelado de distribución potencial basado en los registros históricos: El modelado de distribución de *V. planifolia* en Oaxaca, México, a partir de los ejemplares de herbarios, se conforma en dos zonas potenciales (Figura 2). La primera se distribuye en el noreste del estado formando un área continua del municipio de San José Independencia, hacia San Felipe Usila, y se extiende hasta la región del Istmo. Cuenta con un área de 17 139.47 km² (Figura 2). La calidad del hábitat para la especie es entre alta a moderada, el régimen de humedad es údico tipo I (330 a 365 días), con condiciones templadas húmedas, clima tipo (Am) y precipitación anual de 2 500 a 4 000 mm. Solo el municipio de Santa María Chimalapa, presenta condiciones ecológicas del trópico húmedo, con un régimen de humedad údico tipo II (270 a 330 días) y precipitación anual de 1 500 a 2 000 mm.

La segunda zona potencial se encuentra situada al sur del estado, en la región de la costa del Pacífico, cerca del municipio de San Pedro Pochutla. Cuenta con una área de 12.46 km². La calidad del hábitat de *V. planifolia* es baja. Prevalecen características ecológicas de trópico subhúmedo, un régimen de humedad ústico, condiciones del templado húmedo, un clima tipo (Aw1) y una precipitación de 1 500 a 2 000 mm.

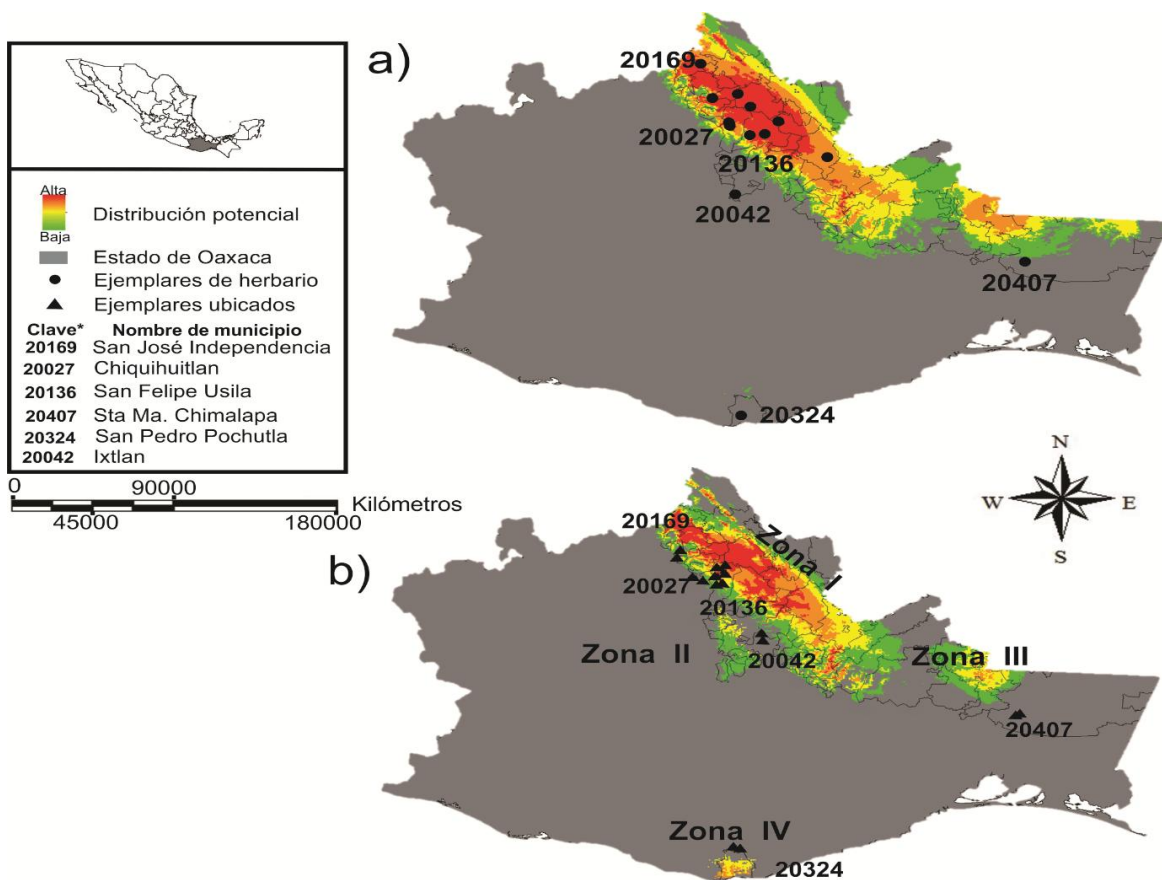


Figura 2. Distribución potencial de *V. planifolia* determinada a través del modelado de máxima entropía. La distribución del color de verde a rojo representa el aumento de la calidad del hábitat de la especie. Se muestran las distribuciones de la especie en dos periodos de tiempo (a) registro de 1939 a 1998; (b) situación actual, 2013.* indica clave del municipio tomado de INEGI, 2010.

Actualización de áreas de distribución potencial: La búsqueda sistemática de individuos de *V. planifolia in situ* arrojó la existencia de 28 plantas en el estado de Oaxaca. Ubicadas principalmente al noreste de zona de estudio y distribuidas en 12 sitios. Con base en la ubicación de los especímenes, el hábitat de la especie se distribuyó en cuatro zonas potenciales (Figura 2).

La zona potencial I, se ubica al noreste del área de estudio con una extensión de 9 191 km². La calidad del hábitat para la especie es de alta a media. El régimen de humedad del suelo es údico tipo I de 330 a 365 días de humedad. Es influenciado por la planicie costera del Golfo, lo cual propicia características de trópico húmedo. Tiene un clima cálido húmedo (Am), con una

precipitación que oscila entre rangos de 2 500 a 4 000 mm anuales, con lluvias en verano y porcentaje de precipitación invernal de 5 a 10 % y una altitud promedio de 154 m. La vegetación es selva alta perennifolia fragmentada. En el distrito de Ixtlán se tiene una condición de clima diferente, ya que es semicálido húmedo del grupo C. En él se localizaron dos individuos de *V. planifolia*, en una vegetación de bosque Mesófilo de montaña fragmentada, a una altitud de 1 190 m.

La zona potencial II, ubicada al sureste del distrito de Ixtlán (Figura 2), cuenta con un área de 1 050 km². La calidad del hábitat para la especie es de baja a media. El régimen de humedad de suelo es ústico (180 a 270 días de humedad), influenciado por la Sierra Norte de Oaxaca. Las características ecológicas corresponden al templado húmedo, clima tipo C(m), con precipitación de 2 000 a 2 500 mm anuales. La vegetación dominante pertenece a los géneros *Liquidambar*, *Podocarpus* y *Quecus*, y la altitud es por encima de los 880 m.

La zona potencial III, se ubica al oriente del estado de Oaxaca, en el municipio de Santa María Chimalapa. Cuenta con un área de 1 084 km² (Figura 2). La calidad del hábitat para la especie es de baja a media. El régimen de humedad del suelo es údico tipo II (270 a 330 días de humedad), con características de trópico húmedo, clima tipo (Am) y precipitaciones de 1 500 a 2 000 mm. La vegetación predominante es bosque tropical perennifolio a una altitud de 350 m. La zona potencial IV, se ubica dentro del distrito de Pochutla (Figura 2), cuenta con un área de 261 km². La calidad del hábitat para la especie es media. El régimen de humedad de suelo es ústico (180 a 270 días de humedad), influenciado por la costa del Pacífico. Las características ecológicas correspondieron al templado húmedo, con un clima cálido subhúmedo (Aw1) y precipitación de 1 500 a 2 000 mm. La vegetación dominante es selva alta perennifolia, a una altitud de 920 m.

1.4 Discusión

Las variables que contribuyen como predictores para el modelo de distribución de *Vanilla planifolia* J., basado en ejemplares de herbario reportados en el periodo de 1939 a 1998 son precipitación, régimen de humedad, oscilación diurna de temperatura, altitud y vegetación. Excepto la altitud y precipitación, se obtuvieron los mismos predictores para el modelo de

distribución potencial obtenido con la base actualizada a partir de los especímenes de *V. planifolia* localizados en el 2013. El modelo actualizado delimitó la zona de distribución en el estado de Oaxaca en un rango altitudinal de 200 a 1 190 m, ya que los reportes de especímenes previos solo ubicaban a la especie en un rango altitudinal de 250 a 750 m (Soto-Arenas, 1999). En la actualidad los individuos y poblaciones se encuentran en altitudes de 200 a 1 190 m, en laderas accidentadas, que por lo general están al pie de sistemas montañosos medios de 1 300 a 2 500 metros de altitud (Hernández-Santana, Ortiz-Pérez, Eng, & Figueroa, 2009), por lo que el intervalo de distribución para esta variable de altitud es más amplio.

La vegetación donde se ubicaron las plantas en 2013 correspondió a bosque mesófilo de montaña y bosque tropical perennifolio. En el bosque mesófilo, son pocos los reportes de presencia de la especie, dado que la mayoría de los ejemplares de los herbarios la ubican en selva alta perennifolia (Soto-Arenas & Dressler, 2010). Esto explica por qué el porcentaje de relevancia de esta variable desciende del 4.8 a 0.1 % en la contribución a la predicción de la distribución potencial.

Los resultados confirman la relevancia de las variables precipitación y régimen de humedad en la determinación de la abundancia de poblaciones y presencia de orquídeas, como lo indican Zotz y Schmidt (2006) y Blinova (2008). Fue notable que la precipitación (periodo y cuatrimestre más lluviosos) y régimen de humedad fueran las variables con mayor contribución porcentual al modelo de distribución potencial de *V. planifolia*.

En la zona de distribución potencial generada con los registros de herbario, no se localizaron en campo, las poblaciones relacionadas con las accesiones AMO/6674, AMO/6673, AMO/6672 (reportadas en Usila), MEXU/1236315 (reportado en Teutila), AMO/16698, AMO/16697 y MEXU/1236318 reportadas en el distrito de Ixtlán. Esto puede deberse al cambio en la estacionalidad de las precipitaciones de los últimos 50 años (Groisman et al., 1999), lo que afectó a las poblaciones de *V. planifolia*, ya que las orquídeas son sensibles a la cantidad y distribución de la precipitación (Wells & Cox, 1991; Janecková & Kindlmann, 2002).

La distribución potencial generada con registros comprendidos de 1939 a 1998, contaba con una área de 17 139.47 km². El área original, de acuerdo con la distribución potencial de este estudio, se encuentra actualmente fraccionada en tres áreas de distribución, que conjuntamente suman un área de 11 325 km². Esto representa una reducción del 66 % de la superficie potencial total. Dicha reducción del hábitat podría deberse a consecuencia de la exactitud del modelo de predicción dado que el aumento del número de plantas ubicadas, define las condiciones ambientales a un nivel mucho más exacto; esto se ha observado en estudios de especies de distribución restringida (Kadmon, Farber & Danin, 2003; Papeş & Gaubert 2007; Mateo, Felicísimo & Muñoz, 2010).

En la región sur del estado de Oaxaca, la zona potencial generada con los especímenes de herbario se restringe a una área de 12.46 km², donde la calidad del hábitat para la especie es baja. El único espécimen reportado (AMES/6279), actualmente es inexistente y búsquedas anteriores han resultado improductivas al tratar de localizar individuos en esta zona (Soto-Arenas, 1999). Sin embargo, durante la búsqueda sistemática en esta investigación se ubicaron dos plantas de *V. planifolia*, en el municipio de Pluma Hidalgo, de tal manera que la distribución potencial actual para la especie en esta región aumentó a 261 km².

Las cuatro zonas potenciales generadas a partir de los individuos existentes en 2013 poseen climas húmedos y precipitaciones por encima de los 1 500 mm anuales. Estas características determinarían el posible centro de origen de *V. planifolia* J., como lo sugieren Soto-Arenas (1999) y Soto-Arenas y Dressler (2010).

1.5 Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por el Fondo Sectorial de Investigación en materias Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos (SNITT-CONACYT-SAGARPA: 2012-04-190442 “Estrategia de investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la vainilla en México”).

1.6 Literatura citada

- Ackerman, J. D. (1986). Coping with epiphytic existence: pollination strategies. *Selbyana*, 9(1), 52-60.
- Barik, S. K. & Adhikari, D. (2011). Predicting geographic distribution of an invasive species *Chromolaena odorata* L. (King) H. E. Robins. In: Bhatt, J. R., Singh, J. S., Tripathi, R. S., Singh, S. P., Kohli, R. K. (Eds.) *Invasive Alien Plants – An Ecological Appraisal for the Indian Sub-continent*. CABI, Oxfordshire. 77-88 pp.
- Blinova, I. V. (2008). Populations of orchids at the northern limit of their distribution (Murmansk Oblast): Effect of climate. *Ekologiya*, 39(1), 26-33.
- Bory S, Grisoni, M., Duval, M.F., & Besse, P. (2007). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571.
- Carrasco, T., Iturralde, D., & Uquillas, J. (Eds.). (2000). *Doce experiencias de desarrollo indígena en América Latina*. Fondo para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas de América Latina y el Caribe. 276 p.
- Challenger, A. & Caballero, J. (1998). *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: pasado, presente y futuro*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Biología de la UNAM y agrupación Sierra Madre SC, México. 846 p.
- Cibrián-Jaramillo, A. (1999). *Variación Genética de Vanilla planifolia en México*. Tesis, Facultad de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, D.F., México. 56 p.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1998a). 'Climas' (clasificación de Koppen, modificado por García). Escala 1:1000000. México.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1998b). 'Precipitación total anual'. Escala 1: 1000000. México.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1998c). 'Isotermas Medias Anuales'. Escala 1:1000000, México
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1998d). 'Curvas de nivel para la República Mexicana'. Escala 1:250000.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1998e). 'Uso de suelo y vegetación de INEGI agrupado por CONABIO'. Escala 1:1 000 000.

- Modificado de: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) - Instituto Nacional de Ecología (INE), (1996). Uso del suelo y vegetación, escala 1:1 000 000. México.
- De Marco Júnior, P. & Siqueira, M.F. (2009). Como determinar a distribuicao potencial de especies sob uma abordagem conservacionista?. *Megadiversidade* 5, 65-76
- Ecott, T. (2004). *Vanilla: Travels in search of the ice cream orchid*. Grove Press, New York. 352 p.
- García-Mendoza, A., M. de J. Ordóñez, & M. A. Briones–Salas. (2004). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM / Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, World Wildlife Fund, México, D.F. 602 p.
- Groisman, P. Y., Karl, T. R., Easterling, D. R., Knight, R. W., Jamason, P. F., Hennessy, K. J., & Zhai, P. M. (1999). Changes in the probability of heavy precipitation: important indicators of climatic change. *Climatic Change*, 42(1), 243-283.
- Guisan, A., & Zimmermann, N. E. (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological modelling*, 135(2), 147-186.
- Hernández-Santana, J. R., Ortiz-Pérez, M. A., Eng, M., & Figueroa, M. (2009). Análisis morfoestructural del estado de Oaxaca, México: un enfoque de clasificación tipológica del relieve. *Investigaciones geográficas*, 68, 7-24. Recuperado en 04 de marzo de 2015, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-46112009000100002&lng=es&tlng=es.
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Campos-Contreras, J. E., 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.
- INEGI, (2010). Localidades de la República Mexicana, 2010, escala: 1:1. Obtenido de Principales resultados por localidad (ITER). Censo de Población y Vivienda 2010. Editado por Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D. F.
- Janecková, P., & Kindlmann, P. (2002). Key factors affecting shoot growth and flowering performance of *Dactylorhiza fuchsii*. In: Kindlmann, P., Willems, J. H., Whigham, D. F.

- (Eds.), *Trends and Fluctuations and Underlying Mechanisms in Terrestrial Orchid Populations*. 99-113 pp.
- Kadmon, R., Farber, O., & Danin, A. (2003). A systematic analysis of factors affecting the performance of climatic envelope models. *Ecological Applications*, 13(3), 853-867.
- Lehtomäki, J., & Moilanen, A. (2013). Methods and workflow for spatial conservation prioritization using Zonation. *Environmental Modelling & Software*, 47, 128–137.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J. H., Kim, S. C., & Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]) 1. *Economic botany*, 62(2), 127-138.
- Maples-Vermeersch, M. (1992). Regímenes de humedad del suelo en Hidrogeografía IV.6.2 Atlas Nacional de México. Vol. II. Escala 1:4000000. Instituto de Geografía, UNAM. México. http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadata/gis/rehsu4mgw.xml?_httpc
- Mateo, R. G., Felicísimo, Á. M., & Muñoz, J. (2010). Effects of the number of presences on reliability and stability of MARS species distribution models: the importance of regional niche variation and ecological heterogeneity. *Journal of Vegetation Science*, 21(5), 908-922.
- Mbatudde, M., Mwanjololo, M., Kakudidi, E. K., & Dalitz, H. (2012). Modelling the potential distribution of endangered *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkm. in East Africa. *African Journal of Ecology*, 50(4), 393-403.
- Minoo, D., Jayakumar, 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 RAP D polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3), 459-470.
- Papeş, M., & Gaubert, P. (2007). Modelling ecological niches from low numbers of occurrences: assessment of the conservation status of poorly known viverrids (Mammalia, Carnivora) across two continents. *Diversity and distributions*, 13(6), 890-902.
- Phillips, S. J., Dudík, M., & Schapire, R. E. (2006). Maxent software for species habitat modeling, version 3.3.1 Maxent software for species habitat modeling Version 3.2.

- Rezende, V. L., de Oliveira-Filho, A. T., Eisenlohr, P. V., Kamino, L. H. Y., & Vibrans, A. C. (2014). Restricted geographic distribution of tree species calls for urgent conservation efforts in the Subtropical Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 24(5), 1-15.
- Robbirt, K. M., Davy, A. J., Hutchings, M. J., & Roberts, D. L. (2011). Validation of biological collections as a source of phenological data for use in climate change studies: a case study with the orchid *Ophrys sphegodes*. *Journal of Ecology*, 99(1), 235-241.
- Sánchez, A. C., Osborne, P. E., & Haq, N. (2011). Climate change and the African baobab (*Adansonia digitata* L.): the need for better conservation strategies. *African Journal of Ecology*, 49(2), 234-245.
- Schlüter, P. M. (2002). RAPD variation in *Vanilla planifolia* Jackson (Orchidaceae) and assessment of the putative hybrid *Vanilla tahitensis* Moore. MBiochem Thesis, University of Oxford.
- Siqueira, M. F. D., & Durigan, G. (2007). Modelagem da distribuição geográfica de espécies lenhosas de cerrado no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*, 30(2), 233-243.
- Soto-Arenas, M. A., & Dressler, R. L. (2010). A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*, 9(2), 85-354.
- Soto-Arenas, M. A. (2003). *Vanilla*. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. (eds). *Genera Orchidacearum*, Vol 3, Orchidoideae (Part 2) Vanilloideae. Oxford university press. 402 p.
- Soto-Arenas, M. A. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoin AC. Informe Final SNIB-CONABIO, Proyecto J101. Link <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf>
- Toledo, V. M. & Ordóñez M. J. (2009). Zonas ecológicas de México. Extraído de los proyectos A006 y E021: 'Diagnostico de los escenarios de la biodiversidad en México' fases 1 y 2. Escala 1:1,000,000. Centro de Ecología, UNAM. El proyecto fue financiado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México.
- Vodouhè, R., & Dansi, A. (2012). The “Bringing into Cultivation” Phase of the Plant Domestication Process and Its Contributions to *In Situ* Conservation of Genetic

Resources in Benin. *The Scientific World Journal*, 2012, 176939.
doi:10.1100/2012/176939

Wan, J., Wang, C., Han, S., & Yu, J. (2014). Planning the priority protected areas of endangered orchid species in northeastern China. *Biodiversity and Conservation*, 23(6), 1395-1409.

Wells, T. C. E., & Cox, R. (1991). Demographic and biological studies of *Ophrys apifera*: some results from a 10 year study. *Population ecology of terrestrial orchids*, 47-62

Zotz, G., & Schmidt, G. (2006). Population decline in the epiphytic orchid *Aspasia principissa*. *Biological Conservation*, 129(1), 82-90.

CAPÍTULO II

ESTRUCTURA DE LA VARIACIÓN MORFOLÓGICA DEL LABELO EN POBLACIONES DE *VANILLA PLANIFOLIA* G. JACK (ORCHIDACEAE) EN OAXACA, MÉXICO

Resumen

En orquídeas, la variación en forma y tamaño de caracteres florales, como el labelo, se consideran una adaptación al ambiente que puede producir divergencia floral. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la variación morfológica infraespecífica a través del labelo de *Vanilla planifolia* G. Jack., en 122 flores provenientes de 28 ejemplares del estado de Oaxaca y dos de Veracruz, México. El labelo de cada flor se diseccionó y analizó mediante su morfometría, obteniéndose 60 variables que se agruparon en región basal, media y apical. Se realizaron análisis de varianza que consideraron las colectas como fuentes de variación y el ambiente de procedencia de cada individuo, además de los análisis de componentes principales y conglomerados. Entre colectas, las 60 variables analizadas fueron altamente significativas. Entre ambientes, 18 variables mostraron diferencias significativas, las cuales se sitúan en los lóbulos laterales y lóbulo medio del labelo, por lo que estas estructuras se consideran susceptibles a cambios ambientales. Las 42 variables restantes situadas en la región basal y media del labelo, las cuales se encuentran fusionadas a los márgenes de columna de la flor, no presentaron diferencia significativa. El modelo explicó 73 % de la variación total estudiada con los tres primeros componentes principales. Existe variación morfológica floral del labelo representada por cuatro morfotipos distribuidos en tres ambientes: templado húmedo grupo I y grupo II, templado húmedo del pacífico y tropical húmedo.

Palabras clave: ambiente, pool primario, divergencia floral, morfometría, vainilla.

Abstract

In orchids, variations in shape and size of floral traits, such as the labellum, are considered adaptations to the environment and can produce floral divergence. The objective of this study was to characterize infra-specific morphological variation of the labellum of *Vanilla planifolia* G. Jack., of 122 flower from 28 specimens from the state of Oaxaca and two specimens from Veracruz, Mexico. The labellum of each flower was dissected and analyzed by morphometry. Sixty variables were obtained and grouped into basal, middle and apical regions. An analysis of variance was performed considering the collections as sources of variation and the environment of origin of each individual. Principal components and cluster analyses were also conducted. Differences in the 60 variables analyzed were highly significant among the collections. Among environments, 18 variables showed significant differences, which were situated in the lateral and middle lobes of the labellum. Thus, these structures were considered susceptible to environmental changes. The remaining 42 variables situated in the basal and middle regions of the labellum, which were fused to the edges of the floral column were not significantly different among environments. With the first three principal components, the model explained 73 % of the total variation studied. Morphological variation of the flower labellum was represented by four morphotypes distributed in three environments: humid temperate group I and group II, Pacific humid temperate and humid tropical.

Key words: environment, primary pool, floral divergence, morphometry, vanilla.

2.1 Introducción

La fenología de floración se considera una característica clave en la biología reproductiva (Rathcke & Lacey, 1985). De ahí que la variación en caracteres florales como forma, color y tamaño ha sido considerada como una adaptación (Parachnowitsch & Kessler, 2010; Pang et al., 2012), que puede producir divergencia floral entre poblaciones geográficamente separadas (Schemske & Bierzychudek, 2001; Armbruster, 2002).

Dentro de la familia Orchidaceae, en las especies con sistemas de polinización por engaño, los polinizadores son restringidos por las condiciones ambientales, las cuales pueden ocasionar fluctuaciones del tamaño y forma en las flores (Parra-Cuadro & Vargas, 2007). Por lo que, la variación floral infraespecífica originada por diversos factores como deriva génica, aislamiento por distancia, selección natural o humana (Judd, Campbell, Kellogg, Stevens & Donoghue, 1999; Armbruster, 2002) es explicada mayormente por caracteres del labelo (Ackerman & Galarza-Perez, 1991; (Salazar-Rojas, Herrera-Cabrera, Soto-Arenas, & Castillo-González, 2009). De ahí que caracteres florales como estructura, configuración y tamaño del pollinarium, antera, callo y labelo se han utilizado para clasificar a la familia Orchidaceae y al género *Vanilla* (Cameron, 2004; Bory, Grisoni, Duval, & Besse, 2007; Soto-Arenas & Cribb, 2009).

Vanilla planifolia G. Jack., es nativa de las selvas tropicales del sureste de México (Verpoorte, 2011). De ella se obtiene vainilla, sustancia aromática, considerada como el saborizante más popular del mundo (Bory et al., 2008; Greule et al., 2010). Esta orquídea está enlistada en la categoría de alto grado de erosión genética (FAO, 1995). De acuerdo con la norma NOM-059-SEMARNAT-2010 se encuentra en riesgo, sujeta a protección especial en México. Para atender esta problemática, se debe mencionar que las plantaciones comerciales de vainilla fueron establecidas a partir del clon denominado tipo mansa (Ecott, 2004; Bory et al., 2007), por lo que la multiplicación clonal de la especie para su cultivo, la ha sometido a factores de erosión genética (Minoos et al., 2007). Por ello, identificar poblaciones silvestres, que conforman el pool genético primario, tienden a ser de la mayor importancia en acciones de conservación y como fuente potencial de variación para el rescate y mejora de este insustituible recurso genético.

Análisis de isoenzimas (Cibrián-Jaramillo, 1999), secuencias nucleotídicas (Soto-Arenas, 1999) y RAPDs (Schlüter, Arenas, & Harris, 2007), mostraron una diferenciación importante entre

poblaciones de vainilla de dos regiones en México, la de Veracruz con una mayoría de homocigotos y la del noreste de Oaxaca con una mayor diversidad genotípica con algunos individuos heterocigotos, lo que los sitúa como especímenes diferentes, potencialmente silvestres.

La información existente sobre variación entre poblaciones silvestres de *V. planifolia* es nula, lo que impide conservar y potenciar características de uso, reproductivas y de calidad en el recurso genético (Herrera-Cabrera et al., 2012). Por lo que al ser México centro de origen de la vainilla y contar con la denominación de origen “Vainilla de Papantla” para su protección (NOM, 2011), resulta imprescindible contar con información acerca del acervo genético primario y una metodología que permita identificar variación entre poblaciones. Por tal razón, el objetivo del presente trabajo fue identificar variación morfológica infraespecífica a través del labelo de *V. planifolia* G. Jack., en 28 colectas provenientes del estado de Oaxaca y su comparación con dos ejemplares de referencia colectados previamente en el estado de Veracruz, México.

2.2 Materiales y métodos

Sitio de estudio. El estudio se realizó en el estado de Oaxaca, México, ubicado entre los 15°39' y 18°42' de latitud norte y los 93°52' y 98°32' de longitud oeste. Con una superficie de 95,364 km² (INEGI, 2010). En cada uno de los 14 sitios de colecta de *Vanilla planifolia* G. Jack., se consideraron los factores de precipitación, régimen de humedad y zona ecológica, porque determinan la distribución de la especie (Hernández-Ruíz et al., 2016, en prensa). Las variables ambientales (Cuadro 1) se procesaron mediante el software JMP v.10 (Sall, Lehman, Stephens, & Creighton, 2012) para generar un clúster jerárquico de las 30 colectas. Posteriormente se contrastó el agrupamiento ambiental con la morfología del labelo de la especie.

Cuadro 1. Factores abióticos de los sitios de colecta de *Vanilla planifolia* en Oaxaca, México.

Sitio	Colecta	Precipitación media anual	Régimen de humedad del suelo	Zona ecológica
OAXACA				
Cerro caída	1, 2	> 4000	Údico Tipo I	Templada húmeda
Cerro hoja	3 – 8	> 4000	Údico Tipo I	Templada húmeda
Usila	9 – 11	2500 a 4000	Údico Tipo I	Templada húmeda
Stg. Tlatepusco	12, 13	2500 a 4000	Údico Tipo I	Templada húmeda
Cutzoo loo	14, 15	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Eluruua	16, 17	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Yacuini	18, 19	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Arroyo chorro	20, 21	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Agua mohecida	22 – 24	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Agua concuabe	25	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Cerro azul	26	1500 a 2000	Ústico	Tropical húmeda
Pluma Hidalgo	27, 28	1500 a 2000	Ústico	Templada húmeda del pacífico
VERACRUZ				
Rancho 20 soles	29*	2500 a 4000	Údico Tipo II	Templada húmeda
1ro. de Mayo	30*	2500 a 4000	Údico Tipo II	Templada húmeda

Construido con datos de CONABIO (2013). *Colectas de referencia.

Material biológico. Consistió en 122 flores de 30 ejemplares (colectas) de *V. planifolia*, colectadas en abril de 2013, en los sitios Cerro caída, Cerro hoja, Usila, Stg. Tlatepusco, Cutzoo loo, Eluruua, Yacuini, Arroyo chorro, Agua mojesida, Agua concuabe, Cerro azul, Zaragoza, Rancho 20 soles y 1° de Mayo. El número de flores por colectas por sitio y su ubicación geográfica, se presentan en el Cuadro 2.

La colecta y preservación de flores de *V. planifolia* en campo, consistió en: (i) Selección de flores; vigorosas y sin daños visibles, las cuales se cortaron desde la base del pedúnculo. (ii) Preservación; la flor se sumergió en una solución conservadora a base de etanol (50%), ácido láctico (4%), ácido benzoico (0.5%), glicerina (2.5%) y agua destilada (43%) en recipiente de vidrio de 150mL. (iii) Etiquetado; cada recipiente se identificó por dentro y fuera, con fecha, lugar, coordenadas UTM y número de colecta (Cuadro 2). (iv) Conservación; los recipientes se colocaron a temperatura ambiente en cuarto oscuro.

Cuadro 2. Localización geográfica de los sitios de colecta y número de repeticiones de *Vanilla planifolia* en Oaxaca, México.

Municipio	Localidad	Sitio	Longitud*	Latitud*	Colecta (N°)	No de flores por colecta
San Felipe Usila	Arroyo aguacate	Cerro caída	1981808	765380	1, 2	7
	Arroyo iguana	Cerro hoja	198514	766867	3 – 8	8
	San Felipe Usila	Usila	1978103	761904	9 – 11	5
Santiago Lalopa	Stg. Tlatepusco	Stg. Tlatepusco	1972242	763881	12, 13	6
	Quera Quiets	Cutzoo loo	1928187	791220	14, 15	6
Yae	Lachichina	Eluruua	1931801	791964	16, 17	8
		Yacuini	1931507	792295	18, 19	6
Sochiapam	Sochiapam	Arroyo chorro	1972072	747411	20, 21	7
Chiquihuitlan de B. Juárez	Loma Ojiteca	Agua mojesida	1992850	736520	22 – 24	6
		Agua concuabe	1993074	736191	25	7
Santa Ma. Chimalapa	Zacatal	Cerro azul	1865068	315789	26	3
Pluma Hidalgo	Pluma Hidalgo	Zaragoza	1761267	775017	27, 28	6
Papantla	Papantla	Rancho 20 soles	2259700	676976	29	6
	1° de Mayo	1° de Mayo	2245131	679382	30	7

Construido con datos de CONABIO (2013). *Coordenadas UTM.

Caracteres evaluados. La caracterización morfológica del labelo de *V. planifolia*, se realizó con base en la técnica y esquema de Catling (1990) modificado, a través de los siguientes pasos: (1) Disección de la flor y extensión del labelo en una superficie de cristal, (2) Impregnado del labelo con azul de metileno (0.08%), (3) Captura fotográfica del labelo con una cámara réflex Sony alfa 65v, equipada con una lente macro Sony DT 30mm F/2.8 SAM, (4) Las imágenes tomadas se procesaron mediante el programa CorelDrawX7 para la generación y evaluación de 53 trazos y 7 ángulos.

Las 60 variables analizadas se agruparon en tres regiones del labelo (Figura 1): región basal formada por la sección A (A, A1, A2, A3, A4, A5, aA, B1x), región media constituida por cuatro secciones: sección B (B, B2, B5, B7, B8, B9, B10, aB), sección C (C, C1x, C2, C5, C7, C8, C9, C10), sección D (D, D1x, D2, D5, D7, D8, D9, D10, aD, aDE22, aDE55), sección E (E, E1x, E2, E5, E7, E8, E9, E10, aE) y región apical integrada por dos secciones: sección F (F, F1x, F2, F5, F7, F8, F9, F10) y sección G (G, G1x, G2, G3, G4, G6, G7, aG).

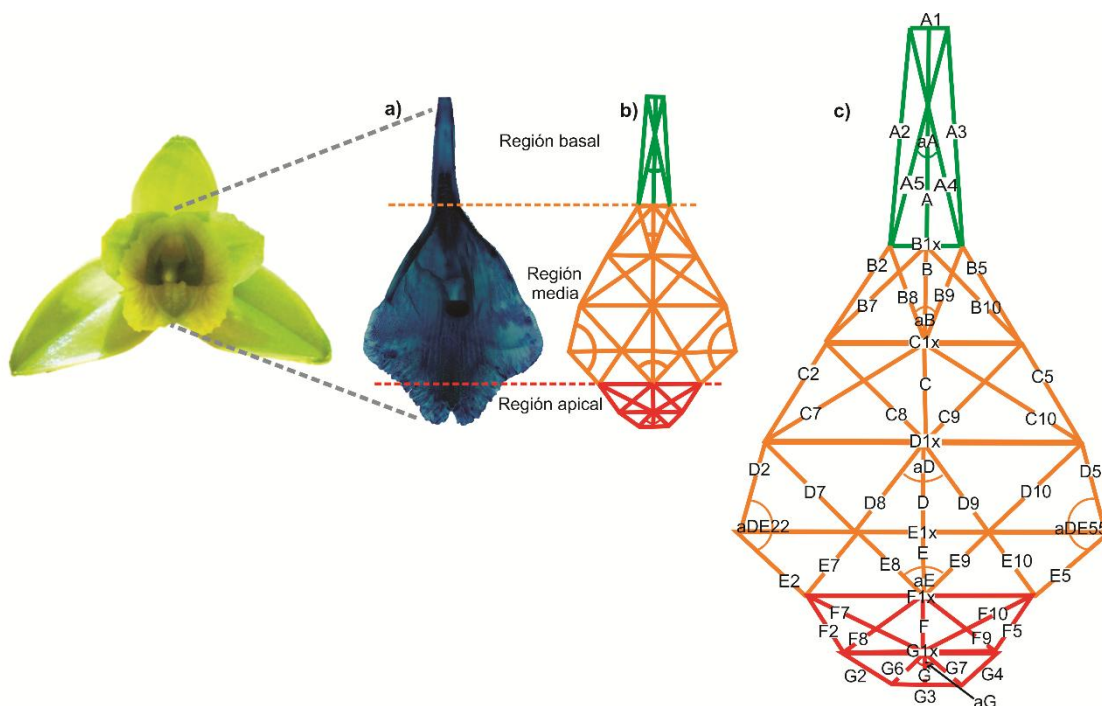


Figura 1. Flor y esquema del labelo de *Vanilla planifolia* G Jack. a) Labelo extendido en el que se indica la región basal, media y apical. b) Trazos y ángulos utilizados para el análisis. c) Nombre y ubicación de las variables utilizadas.

Análisis estadístico. Se realizaron dos análisis de varianza. En el primero las colectas fueron consideradas como fuentes de variación, de manera que se evaluaron 30 tratamientos con diferente número de repeticiones (número de flores) (Cuadro 2). Los caracteres por tratamiento se analizaron mediante un modelo equivalente al diseño completamente al azar desbalanceado (PROC GLM, SAS, 2002). La comparación de medias entre colecta se calculó con base en la media armónica (n), mediante la prueba de Tukey (SAS, 2002). En el segundo, se emplearon

los promedios de los datos de las 30 colectas, donde se consideró la zona ecológica de procedencia de cada colecta (Cuadro 1), mediante un análisis de varianza con factor anidado (la colecta anidada dentro de la interacción sitio-ambiente) mediante el paquete SAS V.9.0. (SAS, 2002), a fin de estimar de qué manera se estructura la forma del labelo en relación al ambiente.

El análisis multivariado de las colectas de *V. planifolia* se realizó mediante dos métodos de análisis numérico: componentes principales (ACP) con base en la matriz de correlaciones entre las variables seleccionadas, y análisis de conglomerados (CLUSTER) (Sneath & Sokal, 1973) con distancia media entre conglomerados, con ayuda del paquete estadístico SAS v 9.0 (SAS, 2002). Para los análisis numéricos se utilizaron las medias de los ejemplares en cada sitio de procedencia para cada uno de los 60 caracteres evaluados.

2.3 Resultados y discusión

Ambientes del sitio de estudio. A través de análisis de conglomerados las características ambientales de las colectas de *V. planifolia* a una distancia euclidiana de 1.8 definieron tres grupos Teh (Templado húmedo), Tep (Templado húmedo del pacífico) y Trp (Tropical húmedo) (Figura 2). El grupo Teh concentra 27 colectas, con características de la zona ecológica templada húmeda, régimen de humedad de suelo údico tipo I (330 a 365 días de humedad), clima cálido y precipitación de 2500 a 4000 mm anuales. El grupo Tep conformado por las colectas 27 y 28, tiene características de la zona ecológica templada húmeda del pacífico, régimen de humedad de suelo ústico (180 a 270 días de humedad), clima cálido subhúmedo (Aw1) y precipitación de 1500 a 2000 mm. El grupo Trp contiene la colecta 26, posee características de la zona ecológica tropical húmeda, régimen de humedad de suelo údico tipo II (270 a 330 días de humedad), clima cálido húmedo y precipitaciones de 1500 a 2000 mm.

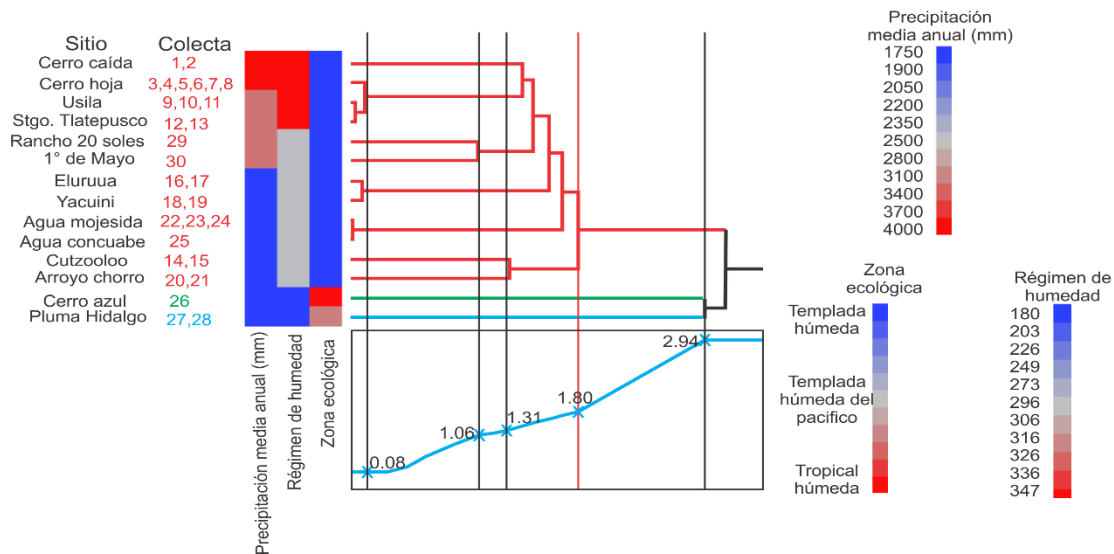


Figura 2. Agrupamiento de sitios y colectas de *Vanilla planifolia* G Jack. con base en características ambientales en Oaxaca, México.

Análisis estadístico. Las colectas de *V. planifolia* que se encuentran distribuidas en el estado de Oaxaca, presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en los 60 caracteres evaluados del labelo ($p \leq 0.01$), lo que infiere la existencia de variación morfológica entre colectas (Cuadro 3). De acuerdo con los coeficientes de variación, algunas variables tuvieron valores ligeramente mayores (14.01 a 15.33) asociados a la forma y tamaño del lóbulo medio.

Para el análisis entre colectas de vainilla procedentes de diferentes ambientes, la variación estadística se presentó en función de la característica del labelo evaluada, nueve variables (D5, E2, E5, E7, aE, F2, F7, F10, G7) mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), nueve variables (D2, F1x, F8, F9, G1x, G2, G4) mostraron diferencia altamente significativa ($p \leq 0.01$) y las 42 variables restantes que se ubican en la región basal y en la secciones B y C de la región media del labelo no presentaron diferencias estadísticas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores promedio, coeficientes de variación, cuadrados medios de error, colecta y ambiente para las 60 características del labelo en la evaluación de 30 colectas de *V. planifolia* G Jack., en Oaxaca, México.

Variable	Media (mm)	Coeficiente de variación	Cuadrados medios		
			Error	Colecta	Ambiente
I. Región basal del labelo					
A	16.32	4.57	0.55	5.13**	13.65 ^{ns}
A1	1.97	13.68	0.07	0.26**	0.25 ^{ns}
A2	16.42	4.45	0.53	4.60**	14.55 ^{ns}
A3	16.40	4.51	0.54	4.46**	14.18 ^{ns}
A4	16.56	4.45	0.54	4.63**	13.56 ^{ns}
A5	16.59	4.48	0.55	4.65**	13.54 ^{ns}
aA	21.99	8.79	3.73	16.44**	45.59 ^{ns}
B1x	4.45	9.42	16.20	0.56**	1.26 ^{ns}
II. Región media del labelo					
B	8.17	6.52	0.28	0.84**	2.22 ^{ns}
B2	9.26	7.19	40.92	1.13**	2.23 ^{ns}
B5	9.34	5.92	0.30	0.91**	0.24 ^{ns}
B7	10.48	6.41	0.45	1.17**	2.75 ^{ns}
B8	8.49	6.22	0.27	0.86**	2.42 ^{ns}
B9	8.50	5.82	0.24	0.85**	1.49 ^{ns}
B10	10.50	5.87	0.38	1.05**	1.90 ^{ns}
aB	30.11	10.1	9.26	42.32**	99.24 ^{ns}
C	8.21	4.92	0.16	0.69**	0.59 ^{ns}
C1x	13.29	7.83	1.08	2.70**	3.30 ^{ns}
C2	9.28	5.40	0.25	0.84**	0.21 ^{ns}
C5	9.35	5.48	0.26	1.11**	0.41 ^{ns}
C7	13.39	6.23	0.69	2.74**	0.67 ^{ns}
C8	10.60	5.34	0.32	1.16**	0.20 ^{ns}
C9	10.51	5.57	0.34	0.76**	0.41 ^{ns}
C10	13.54	5.75	0.6	2.53**	0.62 ^{ns}
D	7.37	7.3	0.29	1.05**	6.71**
D1x	21.85	5.68	1.54	7.48**	0.92 ^{ns}
D2	7.48	8.52	0.40	1.46**	8.62**
D5	7.38	7.47	0.30	1.19**	5.28*
D7	10.06	6.61	0.44	1.94**	7.56 ^{ns}
D8	8.40	6.62	0.30	0.84**	2.61 ^{ns}
D9	8.41	6.49	0.29	0.87**	2.05 ^{ns}
D10	10.00	6.70	0.44	2.17**	5.45 ^{ns}
aD	57.74	7.56	19.07	130.72**	22.96**
aDE22	124.88	5.48	46.84	210.89**	884.33 ^{ns}
aDE55	124.82	5.35	44.62	171.61**	667.88 ^{ns}
E	4.36	8.40	0.13	0.28**	0.45 ^{ns}
E1x	23.32	5.29	1.52	8.31**	2.89 ^{ns}

E2	6.73	7.67	0.26	1.33**	4.74*
E5	6.7	9.76	0.42	1.22**	5.82*
E7	4.99	8.79	0.19	0.54**	1.97*
E8	5.92	6.69	0.15	0.68**	1.68 ^{ns}
E9	5.94	7.52	0.20	0.58**	0.57 ^{ns}
E10	5.01	8.96	0.20	0.58**	1.18 ^{ns}
aE	86.12	4.71	16.47	39.99**	161.86*
II. Región apical del labelo					
F	2.63	8.84	0.05	0.12**	0.20 ^{ns}
F1x	13.04	8.05	1.10	5.58**	36.38**
F2	3.12	10.25	0.10	0.35**	4.12*
F5	3.17	12.08	0.14	0.28**	0.33 ^{ns}
F7	5.62	9.97	0.31	0.96**	4.11*
F8	6.91	10.14	0.49	1.81**	14.80**
F9	6.88	9.68	0.44	1.58**	8.80**
F10	5.60	12.13	0.46	1.05**	4.35*
G	2.42	15.33	0.13	0.54**	1.50 ^{ns}
G1x	9.67	8.54	0.68	3.27**	9.11**
G2	3.62	14.01	0.25	0.87**	11.97**
G3	4.15	14.48	0.36	1.11**	1.08 ^{ns}
G4	3.71	14.85	0.30	1.17**	7.94**
G6	3.24	12.36	0.16	0.67**	1.69 ^{ns}
G7	3.23	12.00	0.15	0.47**	1.47*
aG	81.81	9.20	56.76	418.37**	522.45 ^{ns}

** = $p \leq 0.01$; * = $p \leq 0.05$; ns=no significativo.

Para los ejemplares colectados en Oaxaca de *V. planifolia* G Jack, los 60 caracteres evaluados en el labelo, aportan información para la identificación de variación morfológica dentro de la especie. Lo que confirma que en la familia Orchidaceae y específicamente en *V. planifolia*, la utilización de caracteres del labelo resulta útil para conocer la variación infraespecífica (Ackerman & Galarza-Perez, 1991; Salazar-Rojas et al., 2009).

Entre ambientes las variables estadísticamente significativas se sitúan principalmente en dos sitios (Figura 3), el primero en los márgenes de los lóbulos laterales y donde se encuentra el callo penicilado formado por ocho escamas, flabeladas y premorsas, característico de la especie *V. planifolia* (Soto-Arenas & Cribb, 2010), y el segundo en los márgenes del lóbulo medio, donde se sitúan dos hileras conspicuas de papilas y de 2 a 4 hileras menos conspicuas (Soto-

Arenas & Dressler, 2012). Por lo cual las diferencias encontradas en las variables de la región media y apical del labelo (Figura 3) deben interpretarse como resultado del proceso de adaptación de las poblaciones (Chartier et al., 2013), en que la supervivencia en estado silvestre promueve una indispensable adaptación al entorno biótico y abiótico (Parra-Cuadro & Vargas, 2007; Cosacov, Cocucci, & Sérsic, 2013). Por otra parte se infiere que las variables situadas en la región basal del labelo (Figura 3) y en la sección B y C de la región media (Figura 1), áreas que se encuentran fusionadas a los márgenes de columna de la flor (Soto-Arenas & Cribb, 2010), son menos susceptibles a cambios ambientales en relación a la región media superior (sección D, E y F) y región apical del labelo.

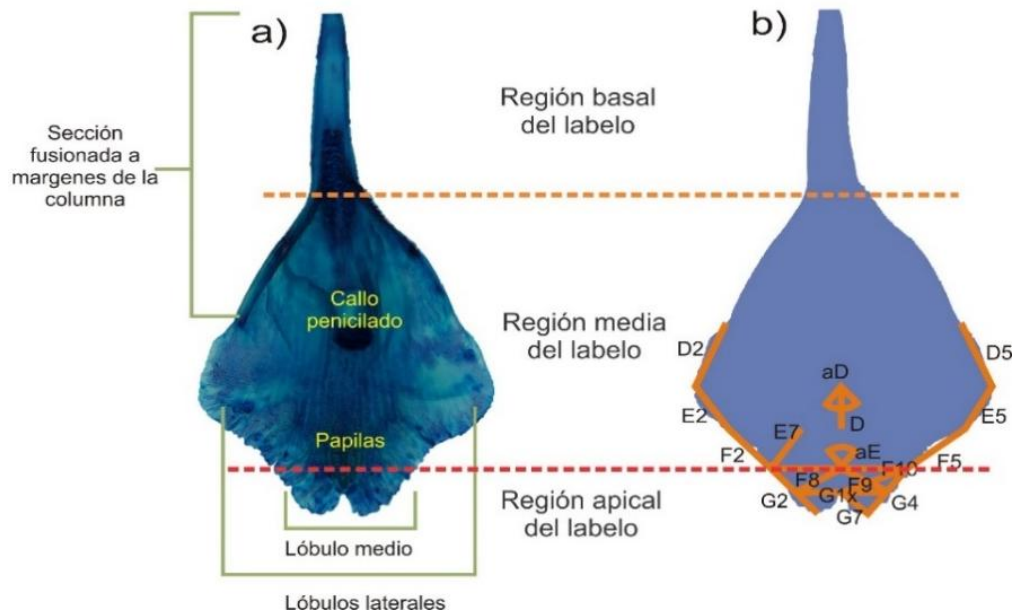


Figura 3. Labelo extendido de *Vanilla planifolia* G Jack., a) regiones y partes principales que conforman el labelo, b) variables estadísticamente significativas entre ambientes.

Distribución de variación morfológica. Con el valor promedio de las 60 variables evaluadas, las 122 flores agrupadas en 30 colectas de *Vanilla planifolia*, fueron sometidas a un análisis de componentes principales (CP), la dispersión de las 30 colectas representada en el espacio determinado por los tres primeros componentes principales explicaron 36%, 23% y 14% de la variación total, respectivamente.

El primer componente principal (CP1), presentó una mayor asociación con variables que determinan la forma y tamaño a la sección B y C de la región media del labelo, (B5=0.17, B10=0.18, C2=0.17, C8=0.18, C9=17.9, C10=0.18). El segundo CP2 estuvo determinado por la dimensiones y forma de la sección D (D=0.22, D2=0.20, D5=0.19, D7=0.19, aD=-0.26) y el tamaño del lóbulo medio (F1x=-0.19, F8=-198). El CP3 expresó el tamaño y apertura de los lóbulos laterales (E1x=0.24, E2=0.22, E3=0.23) y el tamaño horizontal de la región basal que se encuentra fusionada a la columna de la flor (aA=0.29, aB=0.25, B1x=0.26).

La distribución espacial de las colectas de acuerdo con los componentes principales uno, dos y tres (Figura 4), muestra que el material colectado en el ambiente con características templado húmedo (Teh) forman dos grupos, cercanos entre ellos, mientras que las colectas 27 y 28 provenientes del ambiente templado húmedo del pacífico (Tehp) y la colecta 26 ubicada dentro del ambiente tropical húmedo (Trh), constituyen grupos independientes y aislados entre sí.

La distribución morfológica con base al CP1 muestra que las colectas con mayor dimensión vertical y apertura en la regiones: media (B5, B10, C2, C8, C9, C10) del labelo, se distribuyen hacia el lado derecho de la gráfica y constituyen la colecta 26 del grupo IV, mientras que las de proporciones menores de las mismas variables se ubicaron en el lado izquierdo, y conforman las colectas 11, 12, 13, 16, 9, 7 14 10, 19, 15, 24, 25 y 2 del grupo I. El CP2 ubica del lado positivo, las colectas del grupo I y II que presentaron mayor tamaño horizontal de los lóbulos laterales (D, D2, D5, D7, aD), diámetro y longitud del lóbulo medio del labelo (F1x, F8) y en el cuadrante negativo se sitúo el grupo III y IV los cuales presentan menor tamaño en estas secciones. El CP3 coloca las colectas del grupo I y II en el cuadrante positivo debido a que presentaron mayor tamaño en la región basal del labelo (aA, B1x), así mismo, presentaron mayor tamaño en la sección E (E1x, E2, E5), por el contrario el grupo IV que se encuentra en el cuadrante negativo del CP3 presentó menor tamaño en estas dos regiones.

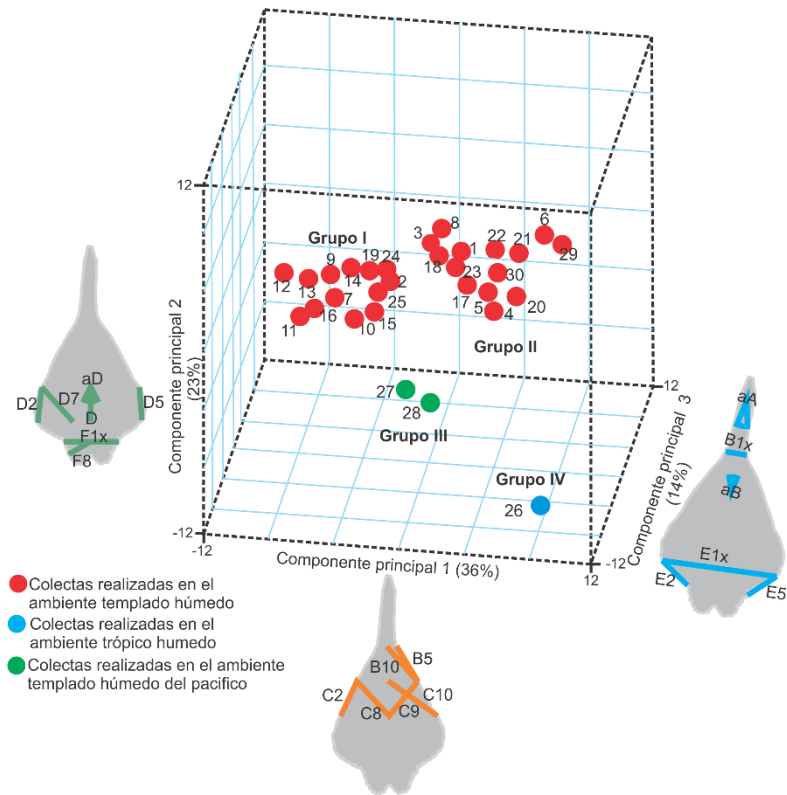


Figura 4. Dispersión de 122 flores agrupadas en la media de 30 colectas de *Vanilla planifolia* G Jack., con base en los tres primeros componentes principales (CP). El esquema de cada labelo en cada uno de los CP indica las variables de mayor peso explicativo en la variación total del modelo.

Las 122 flores agrupadas en la media de 30 colectas de *Vanilla planifolia* fueron sometidas a un análisis de conglomerados (Sneath & Sokal, 1973). Con ayuda del programa Past.v.3.0 (Hammer, Harper & Ryan, 2001) se calculó el número óptimo de grupos con base en un bootstrap de 70% de similitud entre grupos, que utiliza la distancia euclidiana y ligamento promedio como medida de distancia. A una distancia de 0.9 en el dendograma de la Figura 5, se observa el agrupamiento del complejo de *Vanilla planifolia* G Jack.

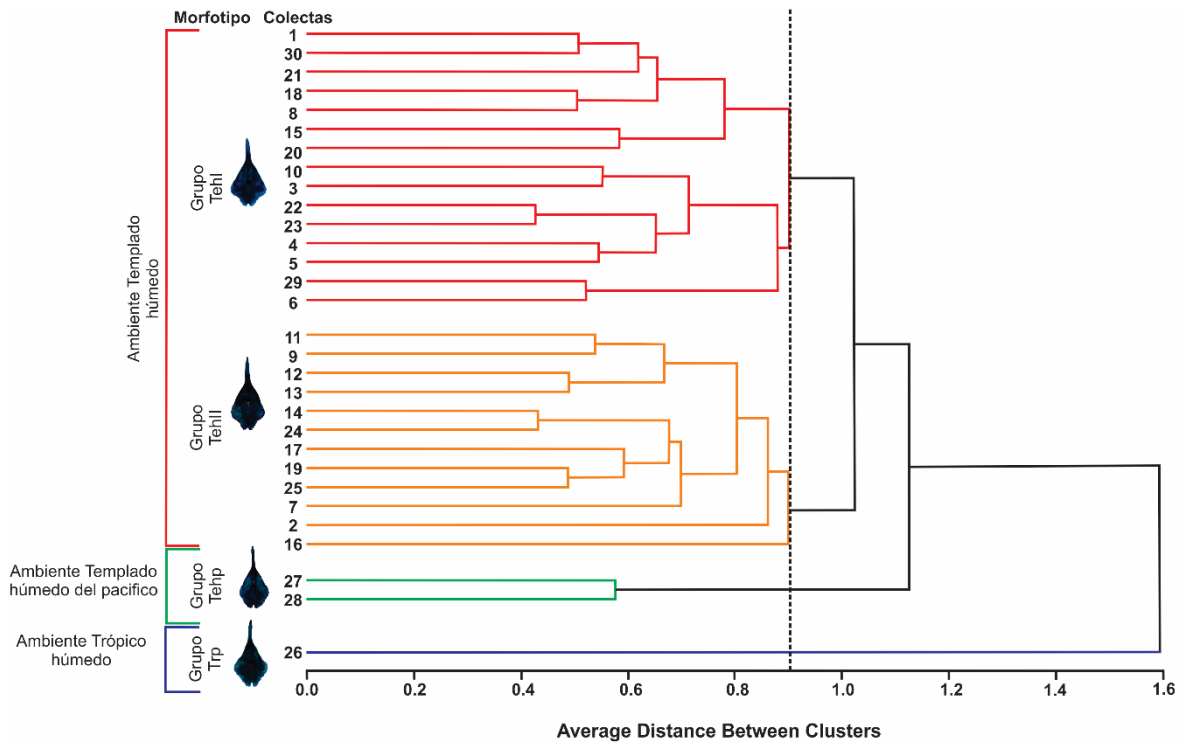


Figura 5. Dendrograma de la media de 30 colectas de *Vanilla planifolia* (122 flores) agrupadas, en el estado de Oaxaca, México, con base en el promedio de 60 caracteres a una distancia media entre conglomerados.

La descripción de la variación morfológica infraespecífica a través del labelo de *V. planifolia* G. Jack., dentro del complejo ambiental del estado de Oaxaca fue:

a) Grupo TehI: Formado por 15 colectas, se caracteriza por presentar el labelo con las dimensiones de mayor tamaño a lo ancho, con una media de 22.84 mm de longitud. Presenta una división muy pronunciada en la transición de la región media y los lóbulos laterales en forma trapecoide, invertido, angosto en su base (9.89 mm) y más ancho hacia el ápice (13.40 mm) (Figura 5). Este grupo contiene los dos ejemplares de Veracruz, por lo que se intuye que en algunas de las plantaciones de vainilla de ese estado, los esquejes provienen de esta región del estado de Oaxaca. Las colectas de este grupo se distribuyen en la zona ecológica templada húmeda.

b) Grupo TehII: Integrado por 12 colectas presentan el menor tamaño respecto al material analizado en la región media del labelo (20.62 mm de longitud) y en la región apical (9.07 mm

de longitud). La división entre la región media y apical en forma trapecoide es existente pero de menor dimensiones respecto al grupo TehI (Figura 5). Las colectas se distribuyen en la zona ecológica templada húmeda.

Las poblaciones de *V. planifolia* que se localizan al noreste del estado, poseen el morfotipo TehI y TehII, se encuentran delimitadas por la Sierra Norte de Oaxaca, la cual actúa como barrera geográfica dado que es un sistema montañoso que sobrepasa los 3000 msnm. Las poblaciones que se encuentran fuera de esta barrera geográfica y sometidas a condiciones ambientales del trópico húmedo y templado húmedo del pacífico expresaron el morfotipo Trh y Tehp, respectivamente (Figura 5), lo que se interpreta como la adaptación de una especie en estado silvestre al entorno donde se desarrolla (Armbruster, 2002; Shimono et al., 2009).

c) Grupo Tehp: Compuesto por dos colectas, que presentan un aumento de longitud en la base de los lóbulos apicales (10.68 mm de longitud) con respecto al grupo ThpI y ThpII pero mantiene un diámetro similar en la región media del labelo (22.3 mm), por lo que la división entre la región media y apical se difumina en una forma de un trapecoide, alargado, con base de 10.68 mm y más ancho hacia el ápice (14.55 mm), con un diámetro de 4.37 mm (Figura 5). Este grupo se distribuye en la zona ecológica templada húmeda influenciada por las costas del pacífico, de tal manera que el régimen de humedad del suelo es más seco (180 a 270 días) en relación al que se distribuyen los grupos TehI y TehII.

d). Grupo Trh: Constituido por una colecta, se define por presentar el labelo con las dimensiones de menor tamaño a lo ancho en la región basal (3.70 mm de longitud). El ancho de la región media del labelo es de longitud media (21.83 mm) con respecto a los demás grupos. Los lóbulos apicales son de mayor longitud (13.05 mm) y menor apertura (63°) respecto al resto de los ejemplares analizados, de tal manera que la división en la transición de la región media y apical crea una forma romboide (Figura 5). Esta colecta, se encuentra en un complejo aislado al este del Estado de Oaxaca donde las características del ambiente son del trópico húmedo, la altitud no rebasa los 480 msnm, la temperatura media anual es de 25° C y el régimen de humedad es de 180 días, este sitio de colecta es el más tropical donde se colectó la especie.

Las poblaciones que expresan los morfotipos Tehp y Trh, se encuentran separadas entre ellas, por el complejo de montañas pertenecientes a la sierra madre del sur que poseen la mayor altitud dentro del estado de Oaxaca, y se encuentran más cercanas a las costas del pacífico, características que han facilitado el aislamiento de las comunidades bióticas en esta región (Flores-Villela, 1993; Ceballos, 1995). De manera tal que la sierra madre del sur, funge como barrera geográfica que impide el flujo génico o intercambio de polen (Shimono et al., 2009), entre poblaciones de *V. planifolia* del sureste con las del noreste en el estado de Oaxaca. Por lo cual, las diferencias encontradas entre grupos deben interpretarse como resultado del proceso de adaptación de las poblaciones al ambiente (Herrera, Castellanos, & Medrano, 2006; Hodgins & Barrett, 2008; Chartier et al., 2013). Donde los complejos montañosos han servido como barrera geográfica (Rzedowski, 1962).

2.4 Literatura citada

- Ackerman, J. D., & Galarza-Perez, 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-colour evolution in two genera. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3), 468-486.
- Bory, S., Catrice, O., Brown, S., Leitch, I. J., Gigant, R., Chiroleu, F., Grisoni, M., Duval, M. F., Besse, P. (2008). Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Genome*, 51(10), 816-826.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.-F., & Besse, P. (2007). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571.
- Cameron, K. M. (2004). Utility of plastid *psaB* gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(3), 1157-1180.
- Catling, P.M. (1990). *Malaxis salazarii*, a new species from Mexico and northern Mesoamerica. *Orquidea* 12, 93-104.

- Ceballos, G. (1995). Vertebrate diversity in Neotropical deciduous forests. In Mares, M.A., Schmidley, D.J., (Eds) Latin American mammalogy: History, diversity and conservation. University of Oklahoma Press, Oklahoma. pp 167-198.
- Chartier, M., Pélozuelo, L., Buatois, B., Bessièrre, J.-M., & Gibernau, M. (2013). Geographical variations of odour and pollinators, and test for local adaptation by reciprocal transplant of two European Arum species. *Functional Ecology*, 27(6), 1367-1381.
- Cibrián-Jaramillo, A. (1999). Variación Genética de *Vanilla planifolia* en México. Thesis, Facultad de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, D.F., México.
- Cosacov, A., Cocucci, A. A., & Sérsic, A. N. 2013. Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting *Calceolaria polyrhiza*: do pollinators matter?. *Annals of Botany* 113, 251-266.
- Ecott, T. (2004). *Vanilla: Travels in search of the ice cream orchid*. Grove Press, New York. 352 p.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1995). International Technical Conference on Plant Genetic Resources. Report of the Sub-Regional: Preparatory Meeting for Central America, Mexico and the Caribbean. San José, Costa Rica. pp 21-24.
- Flores-Villela, O. (1993). Herpetofauna of Mexico: Distribution and endemism In: Ranmamoorthy, T.P., Lot, A., Fa, J. (Eds) Biological diversity of Mexico: Origins and distribution. Oxford University Press Nueva York. 253-280 pp.
- Greule, M., Tumino, L. D., Kronewald, T., Hener, U., Schleucher, J., Mosandl, A., & Keppler, F. (2010). Improved rapid authentication of vanillin using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values. *European Food Research and Technology*, 231(6), 933-941.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics, Version 3.0, Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electrónica*, 4(1), 209.
- Hernández-Ruíz, J., Herrera-Cabrera, B. E., Delgado-Alvarado, A. D, Salazar-Rojas, V. M., Bustamante-González, A., Campos-Contreras, J. E., & Ramírez-Juárez, J. (2016, In press). Distribución potencial y características geográficas de poblaciones silvestres de

- Vanilla planifolia* (Orchidaceae) en Oaxaca, México. *Tropical biology and conservation*. 64(1).
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras, C., & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 37-44.
- Herrera, C. M., Castellanos, M. C., & Medrano, M. (2006). Geographical context of floral evolution: towards an improved research programme in floral diversification [Capítulo de libro]. Retrieved July 6, 2015, from <http://digital.csic.es/handle/10261/38724>
- Hodgins, K. A., & Barrett, S. C. H. (2008). Geographic variation in floral morphology and style-morph ratios in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany*, 95(2), 185-195.
- INEGI, (2010). Localidades de la República Mexicana, 2010, escala: 1:1. Obtenido de Principales resultados por localidad (ITER). Censo de Población y Vivienda 2010. Editado por Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D. F.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (1999). Plant systematics: a phylogenetic approach. *Ecologia mediterranea*, 25(2), 215-216.
- NOM, (2011), Norma Oficial Mexicana NOM-182-SCFI-2011. Vainilla de Papantla, extractos y derivados - Especificaciones, Información Comercial y Métodos de Prueba, DOF: 18-08-2011.
- Minoo, D., Jayakumar, V. N., Veena, S. S., Vimala, J., Basha, A., Saji, K. V., 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.
- Pang, S., Pan, K., Wang, Y., Li, W., Zhang, L., & Chen, Q. (2012). Floral morphology and reproductive biology of *Dendrobium jiajiangense* (Orchidaceae) in Mt. Fotang, southwestern China. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(6), 469-474.
- Parachnowitsch, A. L., & Kessler, A. (2010). Pollinators exert natural selection on flower size and floral display in *Penstemon digitalis*. *New Phytologist*, 188(2), 393-402.

- Parra-Cuadro, V., & Vargas, C. F. (2007). Flowering synchrony and floral display size affect pollination success in a deceit-pollinated tropical orchid. *Acta Oecologica*, 32(1), 26–35.
- Rathcke, B., & Lacey, E. P. (1985). Phenological Patterns of Terrestrial Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 179-214.
- Rzedowski, J. (1962). Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México: algunas consideraciones sobre el factor endémico en la flora Mexicana. *Boletín de la sociedad Botánica de México* 27, 56-62.
- Salazar-Rojas, V. M., Herrera-Cabrera, B. E., Soto-Arenas, M. Á., & Castillo-González, F. (2009). 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(4), 543-552.
- Sall, J., Lehman, A., Stephens, M. L., & Creighton, L. (2012). *JMP start statistics: a guide to statistics and data analysis using JMP. Fifth Edition*. SAS Institute. 576 pp.
- SAS Institute Inc (2002) SAS/STAT Users guide fifth edition, volume 1 and 2. SAS Institute, Inc. Cary, N.C.
- Schemske, D. W., & Bierzychudek, P. (2001). Perspective: evolution of flower color in the desert annual *linanthus parryae*: wright revisited. *Evolution*, 55(7), 1269-1282.
- Schlüter, P. M., Arenas, M. A. S., & Harris, S. A. (2007). Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany*, 61(4), 328-336.
- 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.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, USA: WH Freeman and Co. 573 p.
- Soto-Arenas, M. A. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chino AC. Informe Final SNIB-CONABIO, Proyecto J101. Link <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf>
- Soto-Arenas, M.A. & Cribb, P.J. (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 revision 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.
- Verpoorte, R. (2011). Prólogo In: Odoux E and M Grisoni M (Eds.), *Vanilla (Medicinal and aromatic plants-industrial profiles)*. CRC Press. 420 p.

CAPÍTULO III

VARIACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE *VANILLA* *PLANIFOLIA* G. JACK (ORCHIDACEAE) EN POBLACIONES SILVESTRES EN OAXACA-MÉXICO

Resumen

En plantas silvestres los frutos aromáticos sirven para garantizar el éxito reproductivo de la especie. En el caso de *V. planifolia* G. Jack, los especímenes silvestres se ubican principalmente en Oaxaca. Donde la información sobre los compuestos fenólicos que determinan la calidad aromática del fruto es nula. El objetivo del presente trabajo fue conocer la variación aromática en vainilla por análisis de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en seis sitios del estado de Oaxaca-México. Se determinó la concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico (C1), ácido vanílico (C2), *p*-hidroxibenzaldehído (C3) denominados compuestos menores (CM), y vainillina (C4) y seis índices para inferir la relación entre compuestos: $\sum CM=C1+C2+C3$, $\sum CM/C4$, $C1/C4$, $C2/C4$, $C3/C4$, $C1+C2/C4$. Las variables se sometieron a tres análisis; de varianza que consideró el sitio y ambiente de procedencia como fuentes de variación, de componentes principales, y de conglomerados. Estas 10 variables fueron altamente significativas y entre ambientes la concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina, $\sum CM=C1+C2+C3$ y la interacción $C3/C4$, mostraron diferencias significativas, lo que sugiere que el polimorfismo fitoquímico de vainilla es parcialmente determinado por el ambiente. Los resultados muestran que el modelo explicó 98 % de la variación total estudiada con los tres primeros componentes principales. En condiciones silvestres, el aroma responde a una mayor concentración de compuestos menores en relación a vainillina, el cual está determinado por el índice ($\sum CM/C4$) que presentó valores de 9 a 12%. El estudio de la variación de los compuestos que determinan la calidad del aroma en *V. planifolia*, mostró la existencia de cuatro grupos dentro del germoplasma silvestre en el estado de Oaxaca, México. Grupo I (Oaxaca CA) ubicado en el ambiente tropical húmedo, el grupo III (Oaxaca PH) situado en el ambiente templado húmedo del pacífico y el grupo II (Oaxaca CLC) y grupo IV (Oaxaca U) ubicados en el ambiente Templado húmedo.

Palabras clave: calidad aromática, polimorfismo fitoquímico, , vainilla.

Abstract

Aromatic fruits of wild plants ensure reproduction of the species. In Mexico, wild specimens of *Vanilla planifolia* G. Jack are located mainly in the state of Oaxaca. There is no information on the phenolic compounds that determine the aromatic quality of the fruit. The aim of the present study was to determine the aromatic vanilla variation by High-performance liquid chromatography (HPLC), at six sites in the state of Oaxaca. Concentrations of hydroxybenzoic acid (C1), vanillic acid (C2), and hydroxybenzaldehyde, called minor components (CM), and vanillin (C4) were determined. In order to infer the relationship between compounds, six indices were estimated: $\Sigma CM = C1 + C2 + C3$, $\Sigma CM / C4$, $C1 / C4$, $C2 / C4$, $C3 / C4$, $C1 + C2 / C4$. Three statistical analyzes were performed: analysis of variance, considering the site and environment of origin as sources of variance, principal component analysis, and cluster analysis. Among sites, all 10 variables were highly significant. Among environments, the concentration of Hydroxybenzoic acid, Vanillic acid, Hydroxybenzaldehyde, vanillin, $\Sigma CM = C1 + C2 + C3$, and $C3 / C4$ interaction showed significant difference. Therefore, it can be inferred that the phytochemical vanilla polymorphism is partly determined by the environment. In wild conditions, the scent of vanilla is more related to a higher concentration of minor components in relation to vanillin, which is determined by the $(\Sigma CM / C4)$ index, that showed values of 9-12%. The results show that the first three principal components of PCA contain more than 98% of the total variation. The variation of the compounds that determine the quality of the aroma of *V. planifolia* (vanillin, p-hydroxybenzaldehyde, vanillic acid and 4-hydroxybenzoic acid) showed the existence of four groups in the wild germplasm of vanilla in the state of Oaxaca, Mexico)..(In the state of Oaxaca, phytochemical polymorphism, represented by four groups of wild germplasm was identified. The group I (Oaxaca CA) located in the tropical environment, the group III (Oaxaca PH) located in the humid temperate environment of the Pacific, the group II (Oaxaca CLC), and group IV (Oaxaca U) located in the environment temperate humid.

Key words: chemotypical variation, aromatic quality, vanilla.

3.1 Introducción

Vanilla planifolia es una orquídea con frutos aromáticos, originaria de México (Odux y Grisoni, 2011). El sabor y aroma de las vainas son de suma importancia en la industria de alimentos, helados, perfumes y en preparaciones farmacéuticas (Reineccius, 1995; Walton et al., 2003) y resultan de una mezcla compleja de compuestos volátiles producidos en frutos maduros expuestos a un proceso de beneficiado de entre tres a seis meses de duración (Sinha et al., 2008). La determinación de la calidad organoléptica en los frutos de la especie es determinada principalmente por cuatro compuestos fenólicos, debido a su alta concentración y participación en el aroma: vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) y ácido *p*-hidroxibenzoico (Bettazzi et al., 2006; Sinha et al., 2008).

Los especímenes silvestres y cultivares de *V. planifolia* conforman el acervo genético primario de vainilla (Soto-Arenas, 1999), dentro de los cultivares se ha reportado la existencia de polimorfismo químico (Gross et al., 2009), con variaciones en la composición y concentración típica de los metabolitos secundarios mayoritarios que determinan su calidad fitoquímica (Lebot y Levesque, 1996; Medina-Holguín et al., 2008), provenientes de un proceso de selección y domesticación realizado por grupos Totonacos en México (Herrera-Cabrera et al., 2012). Sin embargo, en las poblaciones silvestres, que se distribuyen principalmente en Oaxaca (Schlüter, 2007), la información sobre la variación de la calidad aromática es insipiente porque solo se ha utilizado como referencia comparativa en estudios de frutos de vainilla cultivados (Salazar-Rojas et al., 2011). Dado que en poblaciones naturales las plantas expresan variación en la composición aromática como la expresión de la variación genética en combinación con factores ambientales (Majetic et al., 2009), debido a que en la mayoría de especies con frutos aromáticos, estos sirven para atraer a los diseminadores de semillas y de esta manera garantizar el éxito reproductivo y evolutivo (Mardon et al., 2010; Corlett, 2011).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue conocer la variación aromática de poblaciones silvestres de *V. planifolia* a través del análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico y ácido *p*-hidroxibenzoico de vainas beneficiadas provenientes de seis sitios del estado de Oaxaca, México.

3.2 Metodología

Flores de *V. planifolia* G. Jack, de seis sitios del estado de Oaxaca fueron polinizadas manualmente y etiquetadas durante la segunda semana de abril y la primera de mayo de 2014 (Cuadro 1). Los frutos fueron colectados 33 semanas después a la polinización y sometidos a un proceso de beneficiado tradicional de 14 semanas, durante el cual los constituyentes aromáticos de los frutos presentes en sus formas conjugadas no-volátiles, se hidrolizan mediante la acción de la enzima β -glucosidasa y se transforman a su estado volátil (Ranadive, 1992).

Cuadro 1. Factores abióticos de los sitios de colecta de *V. planifolia* en Oaxaca.

Sitio	Clima	Precipitación media anual (mm)	Altitud (msnm)	Régimen de humedad del suelo [†]	Zona ecológica
Cerro caída	Am	> 4000	109	Údico Tipo I	Templada húmeda
Cerro hoja	Am	> 4000	200	Údico Tipo I	Templada húmeda
Usila	Am	2500 a 4000	148	Údico Tipo I	Templada húmeda
Lalopa	A(f)	1500 a 2000	885	Údico Tipo II	Templada húmeda
Cerro azul	Am	1500 a 2000	329	Ústico	Tropical húmeda
Pluma Hidalgo	Aw1	1500 a 2000	920	Ústico	Templada húmeda del pacífico

[†]Údico tipo I: 330 a 365 días de humedad, Údico tipo II: 270 a 330 días de humedad, Ústico 270 a 180 días de humedad.

El beneficiado fue realizado por el maestro beneficiador Veremundo Rodríguez, dicho proceso consistió en sumergir en agua caliente (90°C) por un minuto las vainas verdes, con el objetivo de detener el desarrollo vegetativo. Posteriormente las vainas se almacenaron en un cajón de madera cerrado durante 24 horas para enfriarlas lentamente. Las vainas se someten a 21 ciclos de un proceso denominado “asoleado-sudado” durante el cual las vainas se exponen al sol hasta alcanzar una temperatura de 45°C aproximadamente de 3 a 4 horas al día para después ser almacenadas en los cajones durante la noche para conservar su temperatura y favorecer con ello la actividad enzimática que hidroliza los precursores del aroma. Después de 5 o 6 sudados y dependiendo de la condiciones ambientales se realiza una actividad denominada oreado, que consiste en colocar las vainas en camillas de madera para ventilarse y evitar el riesgo de contaminación por hongos. Finalmente las vainas se colocaron en bolsas de plástico y se

congelaron a -80°C para mantener las características sensoriales del aroma de vainilla. El mantener homogéneo la edad de los frutos a la cosecha, el método de beneficiado, las mismas condiciones y tiempo de almacenamiento, y el método de extracción garantiza que la evaluación de los compuestos que determinan el aroma no fue afectado por los factores más influyentes en la concentración de los compuestos aromáticos en los fruto de vainilla (Ranadive, 1992).

Extracción. Los frutos beneficiados se refrigeraron a -80°C por 48 h y se trituraron en un molino de carga (Kurps Gx4100) de 25000 rpm. Posteriormente 0.5 mg de tejido se depositaron en viales de 20 mL en los cuales se adicionó 18 mL de una solución compuesta de agua y alcohol etílico grado HPLC (1:1) la cual se mantuvo en refrigeración por 24 hr a 4°C . La mezcla de tejido y solución (extracto) se agitó por 30 min a velocidad 6 en una parrilla digital de agitación (Thermo ScientificTM, CimarecTM, USA), y se colocó en refrigeración por 24 h. Posteriormente el extracto se agito durante 5 min , con una jeringa se tomó un mililitro que se filtró a través de un acrodisco de $0.45\ \mu\text{m}$ (PALL Life Sciences, membrana GHP, 13 mm) y se colocó en un vial de vidrio de 2 mL con tapa de rosca con septa pre-perforada. Los extractos de las muestras se colocaron en el automuestreador del HPLC (Series 200, Perkin ElmerTM) para inyectar $10\ \mu\text{L}$ a un caudal de $1\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$.

Reactivos. Todos los reactivos fueron de Sigma-Aldrich Co., USA, incluyendo los solventes, vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico y ácido *p*-hidroxibenzoico.

Análisis de compuestos fenólicos. Los extractos se analizaron mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Series 200 marca Perkin Elmer, detector UV-VIS, con una columna C18 $5\ \mu\text{m}$ $250\times 4.6\ \text{mm}$ (Serie 08010034K), volumen de inyección: $10\ \mu\text{L}$, flujo: $1.0\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$, fase móvil isocrática (H_3PO_4 0.01M: metanol (75:25) y solución metanol: agua (50:50), temperatura 30°C , tiempo de corrida 30 min, y detección a 254nm. Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se emplearon sustancias puras. La solución estándar se preparó en una solución etanol: agua (1:1) con $500\ \mu\text{g}\ \text{mL}^{-1}$ de vainillina (3 metoxi- 4-hidroxibenzaldehído); y $100\ \mu\text{g}\ \text{mL}^{-1}$ de ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico). A partir de esta mezcla se realizaron las diluciones necesarias para la obtención de las curvas de calibración.

Caracteres evaluados. La caracterización de los componentes del aroma de vainilla se evaluó mediante 10 variables dentro del análisis estadístico. Cuatro variables correspondieron al contenido de cada uno de los compuestos que definen calidad en vainilla: ácido *p*-hidroxibenzoico (C1), ácido vanílico (C2), *p*-hidroxibenzaldehído (C3) denominados como compuestos menores y vainillina (C4) (Bettazzi et al., 2006; Sharma et al., 2006). Y seis índices que relacionan el contenido de los compuestos menores en relación a la vainillina para inferir si existe relación entre la concentración de los compuestos: la sumatoria de compuestos menores ($\Sigma CM=C1+C2+C3$), la proporción total de compuestos menores entre contenido de vainillina ($\Sigma CM/C4$) y la interacción de los compuestos menores en proporción al contenido de vainillina a través de índices (C1/C4, C2/C4, C3/C4, C1+C2/C4).

Análisis estadístico. Para el análisis de compuestos aromáticos de vainilla se realizaron dos diseños estadísticos: 1) Análisis del efecto del ambiente sobre la concentración de compuestos aromáticos de *V. planifolia* como fuente de variación. Para lo cual se consideró a la zona ecológica como fuente de variación, y 2) Análisis de la concentración de compuestos aromáticos de los sitios de *V. planifolia*. El cual consideró al sitio de colecta como fuente de variación. Se evaluaron seis tratamientos con tres repeticiones. En ambos casos, los datos por tratamiento se analizaron mediante un modelo equivalente al diseño completamente al azar, desbalanceado (PROC GLM, SAS, 2002).

La comparación de medias entre localidades de procedencia se calculó mediante la prueba Tukey (SAS, 2002). La estadística multivariada de los caracteres de las vainas de *V. planifolia*, se realizó mediante: los análisis de componentes principales (PCA) y conglomerados (CLUSTER) (Sneath y Sokal, 1973) con distancia euclidiana y ligamento promedio como medida de distancia y método de agrupamiento, con ayuda del paquete estadístico SAS v 9.1 (SAS, 2002). Para los análisis numéricos se utilizaron las medias de los ejemplares en cada localidad de procedencia para cada uno de los 10 caracteres evaluados.

3.3 Resultados y discusión

Bajo las condiciones evaluadas por HPLC, el compuesto con menor tiempo de retención correspondió a ácido hidroxibenzóico con un promedio de 13.8 min. Posteriormente *p*-hidroxibenzaldehído con 15.5 min, ácido vanílico con 17.1 min y finalmente, vainillina con 20.1 min.

El efecto de la zona ecológica sobre el contenido de compuestos fenólicos de *V. planifolia*. (Cuadro 2), comprobó que existe diferencia significativa ($p < 0.0001$) sobre la concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina, sumatoria de compuestos menores y la interacción *p*-hidroxibenzaldehído/vainillina. Por su parte las variables *p*-hidroxibenzóico/vainillina, acidovanílico/vainillina, (C1+C2)/C4, $\sum CM/C4$, no registran diferencias significativas por el efecto ambiental, esta última ha sido considerada como una variación que es determinada por el genotipo (Herrera-Cabrera et al., 2012).

Cuadro 2. Medias y coeficientes de variación por ambientes de las 10 variables evaluadas en seis sitios de colecta de *Vanilla planifolia* del estado de Oaxaca.

	Variable	Media (ppm)	Coefficiente de variación
C1	Acido hidroxibenzóico	258.62**	14.4
C2	Acido vanílico	829.56**	17.0
C3	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	638.27**	21.8
C4	Vainillina	16208.47**	14.2
$\sum CM$ =C1+C2+C3	Suma de compuestos menores	1726.46**	9.0
C1/C4	Acido <i>p</i> -hidroxibenzóico/vainillina	1.62 ^{NS}	19.8
C2/C4	Acido vanílico/vainillina	5.42 ^{NS}	33.5
C3/C4	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído/vainillina	3.84**	25.6
(C1+C2)/C4	(C1+C2)/C4	7.04 ^{NS}	13.0
$\sum CM/C4$	Relacion CM/vainillina	10.89 ^{NS}	19.1

**= $P < 0.01$, NS= Estadísticamente no significativo

Con los resultados obtenidos se infiere que en poblaciones silvestres de *V. planifolia* puede existir un aumento o disminución en el índice de sumatoria de compuestos menores sobre vainillina, por la interacción que tiene el genotipo con el ambiente. Dado que en especies silvestres el aroma es resultado del proceso de adaptación de las poblaciones al entorno biótico

y abiótico para garantizar la supervivencia y reproducción de la especie (Chartier et al., 2013; Tuttolomondo et al., 2014). Los coeficientes de variación que poseen un valor elevado (25.6 a 33.5) están asociados a la elevada concentración del compuesto minoritario en relación al contenido de vainillina.

El análisis del efecto de los sitios de procedencia de *V. planifolia* sobre el contenido de compuestos aromáticos, comprobó diferencias significativas ($p < 0.01$) en cada variable analizada (Cuadro 3). De tal manera que existe diferencia entre cada uno de los sitios analizados, lo que sugiere que cada sitio expresa plasticidad fenotípica en la composición aromática. Se observó que los coeficientes de variación, para los compuestos menores (C1, C2, C3) y vainillina (C4) registraron valores de 6 a 12 % debido a que la evaluación corresponde a variación de nivel infraespecífico.

Cuadro 3. Medias y coeficientes de variación por sitio de las 10 variables evaluadas en seis sitios de colecta de *V. planifolia* del estado de Oaxaca.

	Variable	Media (ppm)	Coefficiente de variación
C1	Acido <i>p</i> -hidroxibenzóico	258.62**	12.4
C2	Acido vainílico	829.56**	11.2
C3	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	638.28**	8.6
C4	Vainillina	16208.47**	6.5
\sum CM =C1+C2+C3	Suma de compuestos menores	1726.46**	8.4
C1/C4	<i>p</i> -hidroxibenzóico/vainillina	0.02**	13.8
C2/C4	Acido vainílico/vainillina	5.42**	15.3
C3/C4	<i>p</i> -hidroxibenzaldehído/vainillina	3.85**	14.8
(C1+C2)/C4	(C1+C2)/C4	7.04**	13.2
\sum CM/C4	Relacion CM/vainillina	10.90**	12.2

**= $P < 0.01$

De acuerdo con la prueba de medias (Tukey), se distinguieron grupos diferentes en cada uno de los compuestos analizados (Cuadro 4). Con base en el contenido de ácido *p*-hidroxibenzóico se observaron tres grupos de medias. De los cuales, el primer grupo corresponde al sitio Cerro azul que registró el mayor contenido (357.6 ± 35 ppm), el segundo determinado por Lalopa con una concentración de 287.3 ± 22 ppm, finalmente el tercer grupo constituido por pluma Hidalgo,

Cerro hoja, Usila y Cerro caída (245.5 ± 53 ppm, 236.0 ± 26 ppm, 220.2 ± 11 ppm, 204.9 ± 27 ppm). De los compuestos que determinan calidad aromática en vainilla, ácido *p*-hidroxibenzóico se encuentra en menor concentración, los valores observados en determinaciones de vainilla cultivada, en promedio son de 200 ppm (Bettazzi et al., 2006; Salazar-Rojas et al., 2011). Sin embargo, en plantas silvestres, como las evaluadas, la concentración se encuentra por encima de este valor.

La concentración de ácido vanílico formó tres grupos de medias. El sitio con mayor contenido, correspondió a Usila (1117.65 ± 155 ppm). El segundo a Lalopa (875.5 ± 77 ppm), y el tercero con menor contenido lo forman los sitios Cerro azul, pluma Hidalgo, Cerro hoja y Cerro caída donde la concentración del compuesto es respectivamente 651.5 ± 56 ppm, 715.7 ± 120 ppm, 806.8 ± 62 ppm y 810.1 ± 26 ppm (Cuadro 4). El ácido vanílico fue el compuesto más abundante de los compuestos menores (CM) que definen el aroma de vainilla, el cual se ha reportado en concentraciones que llegan a las 2000 ppm (Sostaric et al., 2000). En condiciones de cultivo la concentración de ácido vanílico es influenciado por la cantidad de precipitación (Salazar-Rojas et al., 2011), sin embargo en poblaciones silvestres se observó que la concentración de este compuesto responde al régimen de humedad del suelo, dado que Usila, sitio con mayor concentración (1117.65 ± 155 ppm), se sitúa en un régimen de humedad de 330 a 365 días y el sitio con menor concentración (651.5 ± 56 ppm) se localiza en un régimen de humedad de 180 a 270 días de humedad.

El contenido de *p*-hidroxibenzaldehído entre sitios, osciló de 222.8 a 1141.1 mg·kg⁻¹ de vainilla beneficiada. Dentro de este rango y mediante la prueba de Tukey se distinguieron cinco grupos de medias (Cuadro 4). Este compuesto muestra un amplio rango de variación que depende del sitio de procedencia de las vainas (Ranadive, 1992; Salazar-Rojas et al., 2011).

La concentración de vainillina, de acuerdo con Tukey formó cuatro grupos. El primero con mayor concentración del compuesto agrupa a Pluma Hidalgo (19395.9 ± 239 ppm) y Cerro hoja (18630 ± 1318 ppm). El segundo conformado por Cerro azul con una concentración de 17554.6 ± 1594 ppm. El tercero integrado por Lalopa (14752.9 ± 1072) y Cerro caída (14903.6 ± 943). Y el cuarto con la menor concentración de vainillina conformado por Usila (12023 ± 558). Los

valores de este compuesto se encuentra entre el rango de vainillina reportado para *V. planifolia* el cual va de concentraciones de 10000-20000 ppm (Sinha et al., 2008).

Cuadro 4. Contenido medio, desviación estándar de compuestos menores y vainillina en los seis sitios de colectas de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca-México.

Sitio	Ac. <i>p</i> -hidroxi-benzóico		Ac. vanílico		<i>p</i> -Hidroxibenzaldehido		Vainillina		Σ CM/C4
	Media (ppm)	S.D.	Media (ppm)	S.D.	Media (ppm)	S.D.	Media (ppm)	S.D.	Media (%)
Cerro azul	357.6 ^a	35	651.5 ^b	56	1141.1 ^a	108	17554.6 ^{ab}	1594	12.1 ^b
Lalopa	287.3 ^{ab}	22	875.5 ^{ab}	77	557.7 ^c	41	14752.9 ^{bc}	1072	11.6 ^a
Pluma Hidalgo	245.5 ^b	53	715.7 ^b	120	912.0 ^b	50	19395.9 ^a	239	9.6 ^{ab}
Cerro Hoja Usila	236.0 ^b	26	806.8 ^b	62	405.3 ^d	22	18630.5 ^a	1318	9.1 ^{ab}
Cerro caída NOM-182-SCFI-2011	220.2 ^b	11	1117.6 ^a	155	222.8 ^e	28	12023.3 ^d	558	13.0 ^a
Havkin-Frenkel y Belanger, (2011).	204.9 ^b	27	810.1 ^b	26	590.5 ^c	29	14903.6 ^{bc}	943	10.0 ^{ab}
	58-100		219-498		411-861		20000 (mínimo)		
	10-255		887-994		635-1549		9296-22757		

Letras diferentes indican diferencia estadística, Tukey ($\alpha=0.05$), S.D.= desviación estándar.

La comparativa de la relación de interacción Σ CM/vainillina (Cuadro 4) denota que Usila y Cerro Azul se encuentran por encima del 12%, característica que definen a poblaciones silvestres de *V. planifolia* (Pérez-Silva et al., 2006; Salazar-Rojas et al., 2011). Los cuatro sitios restantes poseen participación de 9 a 11.6%, lo que se infiere como plasticidad fenotípica dado que el valor de la interacción Σ CM/vainillina puede aumentar o disminuir ligeramente, pero conserva la característica de una mayor participación de compuestos menores en relación a vainillina, aunado que en condiciones naturales las plantas con frutos aromáticos se adaptan al ambiente para atraer diseminadores y garantizar su éxito reproductivo (Mardon et al., 2010; Corlett, 2011).

La dispersión de los seis sitios de *V. planifolia*, representada en el espacio determinado por los tres primeros componentes principales, explicó en conjunto 98% de la variación global acumulada para las 10 variables estudiadas (Cuadro 5). El primer componente principal (CP1), explicó 60% de la variación global y estuvo determinado principalmente por ácido vanílico (C2), *p*-hidroxibenzaldehído (C3) y la interacción ácido vanílico/vainillina (C2/C4). El segundo componente (CP2) expresó 34% de la variación global y estuvo determinado en mayor proporción por la proporción ácido *p*-hidroxibenzóico por vainillina (C1/C4) y la proporción de compuestos menores en relación al contenido de vainillina del extracto, es decir, por el tipo de aroma (Σ CM/C4). Finalmente el CP3 expuso 4% de la variación global y se definió principalmente por ácido *p*-hidroxibenzóico (C1) y la proporción ácido *p*-hidroxibenzóico por vainillina (C1/C4).

Cuadro 5. Valores propios y proporción acumulada de la variación explicada para cada variable en las tres primeras dimensiones de la caracterización del aroma de *V. planifolia* en seis sitios de Oaxaca, México.

Variable	Componente principal (CP)		
	CP1	CP2	CP3
C1	0.265	0.348	0.616
C2	-0.400	0.070	0.051
C3	0.382	0.159	-0.284
C4	0.339	-0.265	0.227
Σ CM	0.309	0.332	-0.208
Σ CM/C4	-0.112	0.506	-0.333
(C1+C2)/C4	-0.362	0.244	-0.022
C1/C4	-0.022	0.514	0.450
C2/C4	-0.384	0.173	-0.099
C3/C4	0.350	0.243	-0.344
Autovalor	6.00	3.42	0.43
Proporción	0.60	0.34	0.04
Acumulada	0.60	0.94	0.98

De acuerdo con la distribución espacial de los primeros tres componentes principales, se distinguieron cuatro grupos (Figura 1). Con base en el CP1 los sitios con mayor valor de ácido vanílico (C2), *p*-hidroxibenzaldehído (C3) y la proporción ácido vanílico por contenido de vainillina (C2/C4) se ubican en la parte superior del gráfico (Grupo I), mientras que los sitios de menores valores se ubican en la parte inferior (Grupo IV). El CP2 concentró en el cuadrante positivo los sitios donde la proporción de compuestos menores (CM) por contenido de vainillina ($\Sigma CM/C4$) es mayor (Grupo I), mientras que de acuerdo al CP3, los sitios con mayor concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico (C1), proporción ácido *p*-hidroxibenzóico por contenido de vainillina (C2/C4) y menor proporción de ácido vanílico (C2) y *p*-hidroxibenzaldehído (C3) se agruparon en el lado positivo del eje (Grupo IV) (Figura 1).

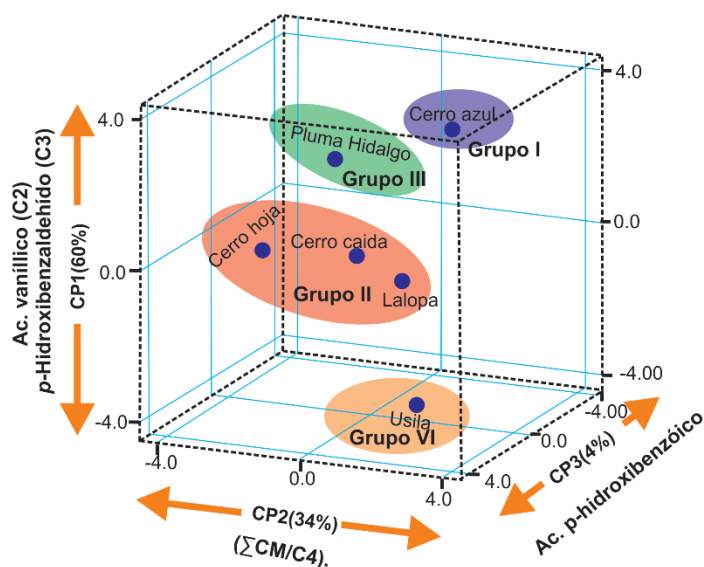


Figura 1. Dispersión de los sitios de colecta de *Vanilla planifolia* en el estado de Oaxaca, con base en los tres primeros componentes principales del análisis de 10 variables agrupadas por media.

A través del análisis de conglomerados se apreció que los sitios de colecta de *V. planifolia* responden al patrón de agrupamiento observado mediante análisis de componentes principales. A una distancia media de 0.7 del conglomerados se definieron cuatro grupos de acuerdo con el

grado de participación de compuestos menores (C1, C2, C3) y la relación de (C1, C2, Σ CM) con base en el contenido de vainillina.

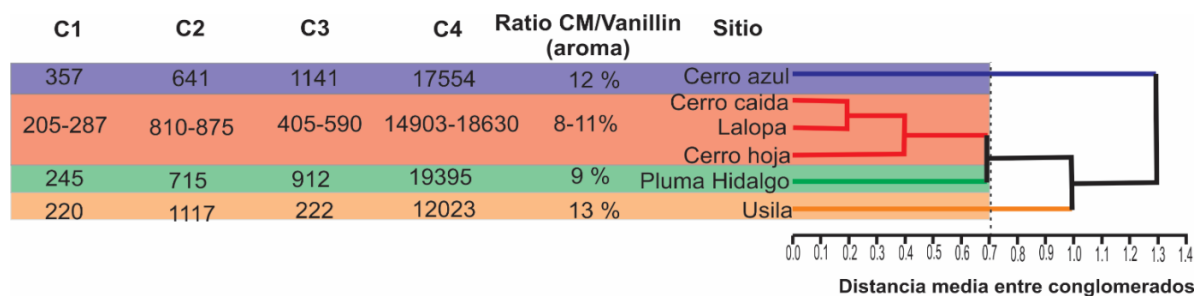


Figura 2. Dendrograma y agrupación de los sitios de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca, con base en el promedio de 10 variables y agrupamiento por distancias de similitud. (C1: ácido *p*-hidroxibenzóico, C2: ácido vanílico, C3: *p*-hidroxibenzaldehído, C4: vainillina, Σ CM/C4: proporción de compuestos menores por contenido de vainillina).

Grupo I (Oaxaca CA). Representado por el sitio Cerro azul. Se caracteriza por presentar la concentración más alta de ácido *p*-hidroxibenzóico (357 ppm) y de *p*-hidroxibenzaldehído (1141 ppm), así como bajo contenido de ácido vanílico (651 ppm). Posee un contenido de vainillina de 17574 ppm. La interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina (Σ CM/vainillina) es de 12% (Cuadro 8). Dentro del estado de Oaxaca se distribuye donde las características del ambiente son del trópico húmedo.

Grupo II (Oaxaca CLC). Integrado por tres sitios (Cerro caída, Cerro hoja y Lalopa). Se caracteriza por presentar una concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico de 204 a 287, *p*-hidroxibenzaldehído en un rango de 405 a 590 ppm, la concentración de ácido vanílico oscila de 810 a 875 ppm. Posee un contenido de vainillina de 14742 a 18630 ppm. La interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina (Σ CM/vainillina) es del 8 al 11%. (Cuadro 8). Estos sitios se encuentran donde las condiciones ambientales son templado húmedo.

Grupo III (Oaxaca PH). Lo conforma el sitio de Pluma Hidalgo. Se caracteriza por presentar una concentración intermedia de ácido *p*-hidroxibenzóico (245 ppm) y ácido vanílico (715 ppm) y la segunda mayor concentración de *p*-hidroxibenzaldehído (912 ppm). Posee el contenido de vainillina más elevado (19395 ppm). La interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\sum CM/vainillina$) es del 9%. (Cuadro 8). El sitio se localiza en el ambiente templado húmedo del pacífico.

Grupo IV (Oaxaca U). Lo representa el sitio de Usila. Se caracteriza por presentar una concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico de 220 ppm, la concentración más baja de *p*-hidroxibenzaldehído (222 ppm), la concentración más alta de ácido vanílico (1117 ppm) y una concentración de vainillina de 12023 ppm. La interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\sum CM/vainillina$) es de 13%. (Cuadro 8). Este sitio se ubica en condiciones ambientales del templado húmedo.

3.4 Conclusiones

El estudio de la variación de los compuestos que determinan la calidad del aroma en *V. planifolia* (vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico y ácido *p*-hidroxibenzoico), mostró la existencia de cuatro grupos dentro del germoplasma silvestre en el estado de Oaxaca, México.

En frutos silvestres de vainilla el contenido de los tres compuestos menores: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico y *p*-hidroxibenzaldehído, tienen una mayor concentración sobre el de vainillina. En poblaciones silvestres de *V. planifolia* el ambiente influye en los cuatro compuestos que determinan la calidad del aroma del fruto de vainilla.

3.5 Literatura citada

- Bettazzi, F., Palchetti, I., Sisalli, S., & Mascini, M. (2006). A disposable electrochemical sensor for vanillin detection. *Analytica Chimica Acta*, 555(1), 134-138.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M. F., & Besse, P. (2007). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571.

- Chartier, M., Pélozuelo, L., Buatois, B., Bessière, J.-M., & Gibernau, M. (2013). Geographical variations of odour and pollinators, and test for local adaptation by reciprocal transplant of two European Arum species. *Functional Ecology*, 27(6), 1367-1381.
- Corlett, R. T. (2011). How to be a frugivore (in a changing world). *Acta Oecologica*, 37(6), 674-681.
- Gross, M., Lewinsohn, E., Tadmor, Y., Bar, E., Dudai, N., Cohen, Y., & Friedman, J. (2009). The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*, Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 308-316.
- Havkin-Frenkel, D., & Belanger F.C. (2011). Handbook of Vanilla Science and Technology, First Edition. Wiley – Blackwell Publishing USA. 22-141 p.
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Campos-Contreras, J. E., & 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.
- Lebot, V., & Levesque, J. (1996). Genetic control of kavalactone chemotypes in *Piper methysticum* cultivars. *Phytochemistry*, 43(2), 397-403.
- NOM-182-SCFI-2011. (2011). Vainilla de Papantla, extractos y derivados Especificaciones, información comercial y métodos de ensayo (prueba). Diario Oficial de la Federación.
- Majetic, C. J., Raguso, R. A., & Ashman, T.-L. (2009). Sources of floral scent variation. *Plant Signaling & Behavior*, 4(2), 129-131.
- Mardon, J., Saunders, S. M., Anderson, M. J., Couchoux, C., & Bonadonna, F. (2010). Species, Gender, and Identity: Cracking Petrels' Sociochemical Code. *Chemical Senses*, 35, 309-321.
- Medina-Holguín, A. L., Holguín, F. O., Micheletto, S., Goehle, S., Simon, J. A., & O'Connell, M. A. (2008). Chemotypic variation of essential oils in the medicinal plant, *Anemopsis californica*. *Phytochemistry*, 69(4), 919-927.
- Odux, E. & Grisoni, M. (2011). Vanilla (medicinal and aromatic plants-industrial profiles). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 420p.
- Pérez-Silva, A., Odux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., & Günata, Z. (2006). GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a

- representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, 99(4), 728-735.
- Ranadive, A. S. (1992). Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1922-1924.
- Reineccius, D. G. (1995). Flavor Chemistry. In D. G. Reineccius (Ed.), *Source Book of Flavors*. Springer Science & Business Media. New York. 351-361 pp.
- 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.
- SAS Institute Inc (2002) SAS/STAT Users guide fifth edition, volume 1 and 2. SAS Institute, Inc. Cary, N.C.
- Schlüter, P. M., Arenas, M. A. S., & Harris, S. A. (2007). Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany*, 61(4), 328-336.
- 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(5), 613-619.
- Sinha, A. K., Sharma, U. K., & Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4), 299-326
- Sneath, P. H. A., & Sokal, R.R. (1973). Numerical taxonomy, the principles and practices of numerical classification. WH Freeman and Co, San Francisco. 573p.
- 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(12), 5802-5807.
- Soto-Arenas M. A (1999) Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chino AC. Informe Final SNIB-CONABIO, Proyecto J101. Link <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf>

- Tuttolomondo, T., Leto, C., Leone, R., Licata, M., Virga, G., Ruberto, G., & Bella, S. L. (2014). Essential oil characteristics of wild Sicilian oregano populations in relation to environmental conditions. *Journal of Essential Oil Research*, 26(3), 210-220.
- Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505-515.

CAPÍTULO IV

VARIACIÓN MORFOLÓGICA, AROMÁTICA Y GENÉTICA DE POBLACIONES SILVESTRES DE *VANILLA PLANIFOLIA* G. JACK. (ORCHIDACEAE) EN OAXACA-MÉXICO

Resumen

Dada la importancia de *Vanilla planifolia* como saborizante y aromatizante en la industria de alimentos y perfumes, existe un esfuerzo global para caracterizar la variación infraespecífica de la especie. Por lo cual el objetivo de la presente investigación fue determinar la variación morfológica del labelo, aromática y genética que existe en las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca. La variación morfológica se evaluó a través del labelo de la flor de vainilla, la variación fitoquímica se determinó con variables que determinan la calidad aromática de vainilla (vainillina, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzóico) mediante un análisis de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Para el análisis molecular se utilizaron 14 loci microsatélites para calcular el Índice de Contenido Polimórfico, Heterocigosidad esperada y observada. El grado de diferenciación genética entre las poblaciones se determinó mediante el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (R_{st}) y el análisis de varianza molecular (AMOVA). La mayor cantidad de variabilidad genética fue encontrada entre individuos (55%) que conforman las poblaciones silvestres de *V. planifolia*, las cuales poseen un 45 % de variabilidad genética entre ellas. La variación infraespecífica de las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en Oaxaca, está determinada por dos genotipos (G1 y G2). El genotipo G1, expresa dos formas del labelo en condiciones del clima templado húmedo y dos aromas con concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\sum CM/vainillina$) del 8 al 11 % y una del 13%. El genotipo G2, expresa dos formas del labelo, una que corresponde al clima templado húmedo del pacífico donde la expresión del aroma responde $\sum CM/vainillina$ del 9% y la expresión del labelo que corresponde al clima trópico húmedo donde el aroma tiene una concentración de $\sum CM/vainillina$ del 12%.

Palabras clave: calidad aromática, morfometría del labelo, vainilla, variabilidad genética.

Abstract

There is a global effort to characterize the infra variation of *Vanilla planifolia* because of its importance as a flavoring in food and perfume industry. Therefore, the objective of this research was to determine the morphological variation of the labellum, aromatic variation, and genetic variation of wild populations of *V. planifolia* in the state of Oaxaca. Morphological variation was assessed using the labellum of the flower vanilla, phytochemical variation was determined by variables that determine the vanilla aromatic quality (vanillin, acid vanillin, p-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzoic acid) by HPLC analysis (High Performance Liquid Chromatography). The Polymorphic Content index and the expected and observed heterozygosity were calculated based on 14 microsatellite loci for molecular analysis. The degree of genetic differentiation between populations was determined by the coefficient of gene differentiation between populations (RST) and analysis of molecular variance (AMOVA). Most genetic variability (55%) was found between individuals within wild populations of *V. planifolia*, while genetic variation between populations was 45%. The infraspecific variation of wild populations of *V. planifolia* in Oaxaca is determined by two genotypes (G1 and G2). G1 genotype expresses two forms of the lip in the humid temperate climate, two scents with concentrations of the sum of minor compounds on vanillin ($\Sigma\text{CM} / \text{vanillin}$) of 8 to 11%, and a scent with concentrations of 13%. Genotype G2 expresses two forms of the labellum of the flower; the first was associated with humid temperate climate of the Pacific, where the expression of flavor responds to $\Sigma\text{CM}/\text{vanillin}$ 9%; the second expression of the labellum was associated with tropical humid climate, where the aroma had a concentration $\Sigma\text{CM}/\text{vanillin}$ 12%.

Keywords: aromatic quality, morphometry of labellum, genetic variability, vanilla.

4.1 Introducción

Existe un esfuerzo a nivel global para caracterizar la diversidad de vainilla (Bory et al., 2007; Grisoni et al., 2007). Específicamente la variación entre y dentro de las poblaciones de *Vanilla planifolia*, dado su importancia en la industria de alimentos y perfumes (Walton, Mayer, & Narbad, 2003; Reineccius, 2013).

En México centro de origen de vainilla (Verpoorte, 2011), se comenzaron a realizar estudios de variación entre y dentro de poblaciones mediante la técnica de electroforesis de isoenzimas, a finales de los años noventa (Cibrian-Jaramillo, 1999; Soto Arenas, 1999), donde los resultados muestran que las plantaciones de vainilla en Veracruz se distinguen de las poblaciones silvestres y cultivos de Oaxaca, estos últimos son los que tenían niveles de polimorfismo y heterocigosis más elevados. Sin embargo, la técnica de electroforesis subestima la diversidad clonal, según lo observado en estudios poblacionales de *V. claviculata* (Nielsen & Siegismund, 1999; Nielsen, 2000).

Posteriormente con el uso generalizado de marcadores moleculares en estudios de análisis de diversidad y variación genética en la familia Orchidaceae (Wang et al., 2004; Choi et al., 2006), se realizaron trabajos con marcadores moleculares de amplificación de ADN polimórfico (RAPD) en los cuales Schluter et al. (2007), agrupa la variación de *V. planifolia* en tres grupos, uno de Costa Rica; un grupo mexicano que está constituido solamente por plantas en condiciones de cultivo en el estado de Veracruz y un grupo que contiene plantas silvestres procedentes de Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo. Otros análisis con marcadores RAPD (Besse et al., 2004; Minoos et al., 2006), al igual que un análisis realizado por Duval et al., (2006), con marcadores de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) demostraron la existencia de baja diversidad genética en *V. planifolia* en las zonas de cultivo que se encuentran fuera de Mesoamérica (Lunbisky et al 2008).

Finalmente el uso de marcadores microsatélites (SSR) por Bory et al. (2008), obtuvo un conjunto de 14 loci, los cuales representaron el primer conjunto de marcadores codominantes para evaluar los niveles de diversidad genética entre y dentro de poblaciones cultivadas y silvestres de *V. planifolia*. Esto debido a que el marcador SSR se basa en secuencias repetidas

de uno a cinco nucleótidos presentes en todos los genomas eucariotas (Tautz, & Renz, 1984). Su variación se debe principalmente a un deslizamiento durante el proceso de replicación de ADN (Schlotterer, & 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, & Tingey, 1993; Powell et al., 1996). La evaluación de diversidad mediante SSR (Bory et al., 2008), demostró que los cultivares que se localizan en la isla reuñón y a lo largo del océano Índico, poseen bajos niveles de variación infraespecífica, lo que fortalece el supuesto de que los cultivos de *V. planifolia* poseen un único Origen Clonal (Duval et al., 2006; Minoos et al., 2007).

Dado que el recuento temporal de análisis enfocados en la variación genética de *V. planifolia* sitúa a México como fuente única del acervo genético primario de la especie, particularmente el estado de Oaxaca. El objetivo de la presente investigación fue determinar la variación morfológica del labelo, aromática y genética que existe dentro y entre poblaciones silvestres que se desarrollan en el estado de Oaxaca, México.

4.2 Materiales y métodos

Área de estudio. El estudio se realizó en el estado de Oaxaca, México, ubicado entre los 15°39' y 18°42' de latitud norte y los 93°52' y 98°32' de longitud oeste, con una superficie de 95,364 km² (INEGI, 2010). Basados en la distribución potencial de *Vanilla planifolia* (Hernandez-Ruiz et al., en prensa), se ubicaron nueve sitios con presencia de la orquídea (Cuadro 1). En los sitios de colecta se consideraron los factores de precipitación, régimen de humedad y zona ecológica, porque determinan la distribución de orquídeas orquídeas (Zotz & Schmidt, 2006).

Cuadro 1. Factores abióticos de los sitios de colecta de *V. planifolia*, en Oaxaca, México.

Sitio	Precipitación media anual (mm)	Régimen de humedad del suelo	Zona ecológica
Cerro caída	> 4000	Údico Tipo I	Templada húmeda
Cerro hoja	> 4000	Údico Tipo I	Templada húmeda
Usila	2500 a 4000	Údico Tipo I	Templada húmeda
Santiago. Tlatepusco	2500 a 4000	Údico Tipo I	Templada húmeda
Santiago Lalopa	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Agua mohecida	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Agua concuabe	1500 a 2000	Údico Tipo II	Templada húmeda
Cerro azul	1500 a 2000	Ústico	Tropical húmeda
Pluma Hidalgo	1500 a 2000	Ústico	Templada húmeda del pacífico

* Údico tipo I = 330 a 365 días de humedad, údico tipo II 270 a 330 días de humedad y ústico 180 a 270 días de humedad.

Material biológico. Se ubicaron un total de 28 plantas de *V. planifolia* distribuida en ocho localidades y nueve sitios (Cuadro 2). Para el análisis de variación floral en el labelo se colectaron 80 flores de 22 plantas, durante el periodo fenológico de floración de la especie (abril-mayo) de 2013. El análisis del aroma requirió de flores de *V. planifolia* que fueron polinizadas manualmente durante la segunda semana de abril y la primera de mayo de 2013, para posteriormente los frutos ser colectados a las 28 semanas después de la polinización. Mediante este proceso se obtuvieron frutos de vainilla con condiciones de madures homogéneas para la adecuada determinación del aroma de seis sitios del estado de Oaxaca (Cuadro 2). Para el análisis molecular, se realizaron 28 colectas de hojas de *V. planifolia*, durante el mes de diciembre de 2013 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Localización geográfica de los sitios de colecta de flores, frutos y hojas de *Vanilla planifolia* en Oaxaca, México.

Localidad	Sitio	Longitud*	Latitud*	Esquejes por sitio (N°)	Material biológico colectado (N°)		
					Flores	Frutos	Hojas
Arroyo Iguana	Cerro caída	1981808	765380	6	19	20	12
Arroyo Aguacate	Cerro hoja	1985140	766867	2	7	10	4
San Felipe Usila	Usila	1978103	761904	4	9	10	8
Santiago Tlatepusco	Santiago Tlatepusco	1972242	763881	3	6	n/c	6
Santiago Lalopa	Cutzoo loo	1928187	791220	4	12	20	8
Loma Ojiteca	Agua mohecida	1992850	736520	2	12	n/c	4
	Agua concuabe	1993074	736191	1	7	n/c	2
Santa Ma. Chimalapa	Cerro azul	1865068	315789	3	3	10	6
Pluma Hidalgo	Pluma Hidalgo	1761267	775017	3	5	14	6
Total	---	---	---	28	80	84	56

*Coordenadas UTM, n/c= material biológico no colectado.

Variación morfológica. Las 80 flores de *V. planifolia* se evaluaron con base en la técnica y esquema de Catling (1990) modificado, a través de los siguientes pasos: (1) Disección de la flor y extensión del labelo en una superficie de cristal. (2) Impregnado del labelo con azul de metileno (0.08%). (3) Captura fotográfica del labelo con una cámara réflex Sony alfa 65v, equipada con una lente macro Sony DT 30mm F/2.8 SAM. (4) Las imágenes tomadas se procesaron mediante el programa CorelDrawX7 para la generación y evaluación de 53 trazos y 7 ángulos.

Las 60 variables analizadas se agruparon en tres regiones del labelo (Figura 1): región basal formada por la sección A (A, A1, A2, A3, A4, A5, aA, B1x), región media constituida por cuatro secciones: sección B (B, B2, B5, B7, B8, B9, B10, aB), sección C (C, C1x, C2, C5, C7, C8, C9, C10), sección D (D, D1x, D2, D5, D7, D8, D9, D10, aD, aDE22, aDE55), sección E (E, E1x, E2, E5, E7, E8, E9, E10, aE) y región apical integrada por dos secciones: sección F (F, F1x, F2, F5, F7, F8, F9, F10) y sección G (G, G1x, G2, G3, G4, G6, G7, aG).

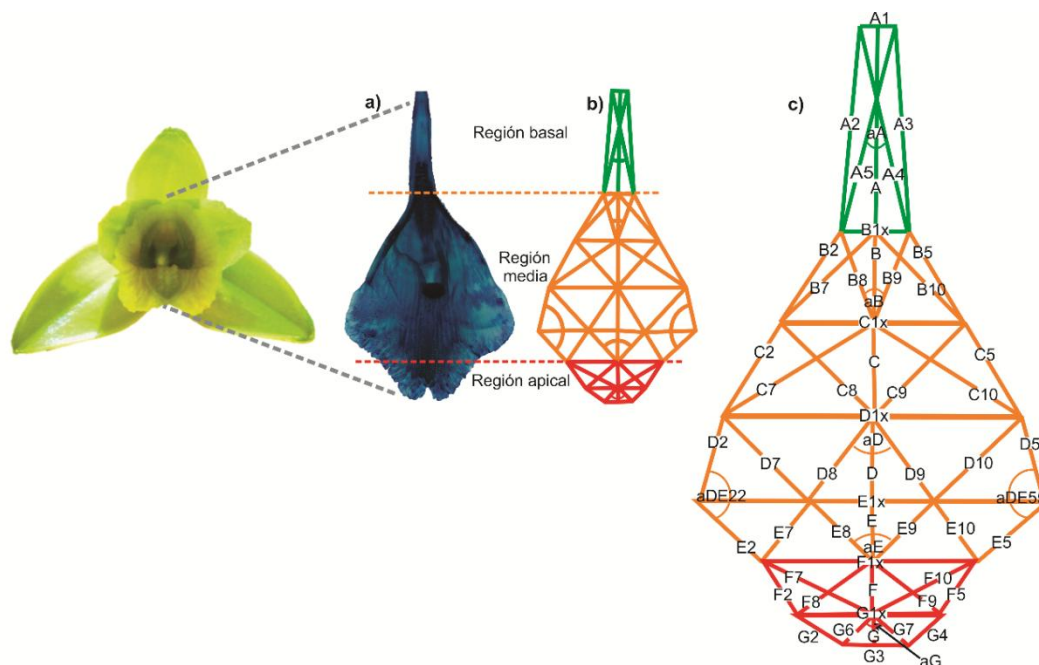


Figura 1. Flor y esquema del labelo de *Vanilla planifolia* G Jack. a) Labelo extendido en el que se indica la región basal, media y apical. b) Trazos y ángulos utilizados para el análisis. c) Nombre y ubicación de las variables utilizadas.

Variación del aroma. Los Frutos verdes colectados, fueron sometidos a un proceso de beneficiado tradicional de 14 semanas donde las condiciones de manejo se mantuvieron homogéneas. Los frutos beneficiados se refrigeraron a -80°C por 48 hr y se trituraron en un molino de carga Kurps Gx4100 de 25000 rpm. Posteriormente 0.5 mg de tejido se depositaron en viales de 20 mL en los cuales se adicionó 8 mL de una solución compuesta de agua y éter etílico grado HPLC (1:1). Los extractos se analizaron mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Series 200 marca Perkin Elmer, detector UV-VIS, con una columna C18 $5\ \mu\text{m}\ 250\times 4.6\ \text{mm}$ (Serie 08010034K), volumen de inyección: $10\ \mu\text{L}$, flujo: $1.0\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$, fase móvil isocrática ($\text{H}_3\text{PO}_4\ 0.01\text{M}$: metanol (75:25) y solución metanol: agua (50:50), temperatura 30°C , tiempo de corrida 30 min, y detección a 254 nm.

Para la caracterización de la calidad fitoquímica de *V. planifolia* se consideraron un total de 10 variables. Cuatro correspondieron al contenido de cada uno de los compuestos que definen la calidad en vainilla: ácido *p*-hidroxibenzóico (C1), ácido vainílico (C2), *p*-hidroxibenzaldehído (C3) denominados como compuestos menores, y vainillina (C4) (Bettazzi et al., 2006; Sharma

et al., 2006). Y seis índices que relacionan el contenido de los compuestos menores en relación a la vainillina para inferir si existe relación entre la concentración de los compuestos: la sumatoria de compuestos menores ($\sum CM=C1+C2+C3$), la proporción total de compuestos menores entre contenido de vainillina ($\sum CM/C4$) y la interacción de los compuestos menores en proporción al contenido de vainillina a través de índices ($C1/C4$, $C2/C4$, $C3/C4$, $C1+C2/C4$).

Análisis numérico. Los 60 caracteres evaluados en el labelo y las 10 variables que definen la calidad aromática de *V. planifolia* se sometieron al análisis multivariado de conglomerados (CLUSTER) (Sneath y Sokal, 1973) con distancia media entre conglomerados, con ayuda del paquete estadístico SAS v 9.0 (SAS, 2002). Para este análisis numérico se utilizaron las medias de los ejemplares en cada sitio de procedencia para cada uno de los caracteres evaluados.

Análisis de variación molecular. Para la obtención de ADN, las muestras de hoja fueron trituradas en morteros previamente esterilizados y congelados. El procedimiento se realizó con aplicaciones constantes de nitrógeno líquido. Posteriormente se colocaron 100 mg de tejido triturado en tubos de microcentrífuga 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 1.2%, en medio TBE 1 X, corridos durante 45 min a 115V, usando como intercalante Midori Green Direct (Nippon, MG06), para visualizar la integridad de la extracción al exponerse a luz UV en un transiluminador.

El análisis de diversidad genética 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 25µl con 25 ng de ADN, PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0.2 U Taq ADN polimerasa (Red Gold Star, Eurogenetec) y 1 µL 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 agarosa a 1.2%, bajo las condiciones anteriores. Se utilizó una escalera KAPA Express Ladder, DNA

Ladder 50 ng/μl (KAPA Biosystems, KL 6303), 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, 9μl de Formamida HiDi y 0.25 μl de ROX-500. El análisis se realizó en un secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con capacidad de análisis de fragmentos.

Cuadro 3. Secuencia de 14 primers microsátélites 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 (No)*
002	D: TGGATGTGCATTTGTG R: CGCATTCACTTGT	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: GCACATAAATACCTTACACC 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: GTGTAGCGGTTCATACAA R: CATTTCATGGAAGTGGAG	HEX	TG(8)	231	EF486652
026	D: GCACATACATGCTTATTG R: CATGTTCTTATTTGAGTGG	HEX	CA(9)	223	EF486653
028	D: AACATGCACAAGAAAC R: TTTATGCACCTTGTTAG	HEX	CA(9)	190	EF486654
031	D: ATTTCCCTCCCTCACTGTA 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 GenBank

Los resultados obtenidos se analizaron en el Software Geneious (Geneious 7.0 2005) para ver la calidad de los amplificados y realizar una matriz de alelos para su posterior análisis. Se calculó el Índice de Contenido Polimorfo (PCI), Heterocigosidad esperada (He) y Heterocigosidad observada (Ho) con el complemento The Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001), por medio

del programa MS Excel 2003. Para llevar a cabo la determinación del grado de diferenciación genética entre las poblaciones examinadas se utilizó el estadístico Rst y el análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992), con el programa GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2006). La significancia estadística de las pruebas se estimó con 9999 permutaciones a 95%. Las comparaciones múltiples fueron ajustadas por la Prueba de Bonferroni (Dunn-Sidak) a 95% (Sokal y Rohlf, 1995).

4.3 Resultados

Agrupamiento de la variación del labelo. La variación morfológica del labelo de las 80 flores agrupadas en la media de 22 colectas de *V. planifolia*, muestra que a una distancia euclidiana de 0.85 el agrupamiento del complejo de *V. planifolia* está determinado por cuatro grupos (Figura 2).

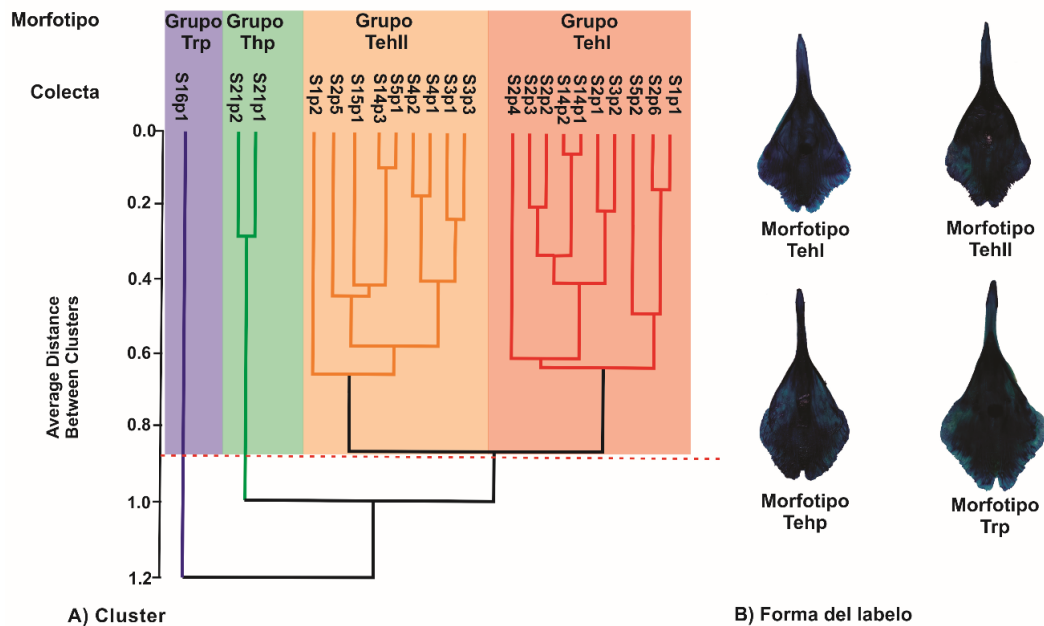


Figura 2. A) Dendrograma de 80 flores agrupadas en la media de 22 colectas de *Vanilla planifolia* G Jack., en el estado de Oaxaca, México, con base en el promedio de 60 caracteres a una distancia media entre conglomerados. B) forma del labelo correspondiente a cada morfotipo.

El grupo TehI, formado por 10 colectas, se caracteriza por presentar el labelo con las dimensiones de mayor tamaño a lo ancho, con una media de 22.84 mm de longitud, y una división pronunciada en la transición de la región media y los lóbulos laterales en forma trapezoide invertido, angosto en su base (9.89 mm) y más ancho hacia el ápice (13.40 mm).

El grupo TehII, integrado por nueve colectas presenta el menor tamaño respecto al material analizado en la región media del labelo (20.62 mm de longitud) y en la región apical (9.07 mm de longitud). La división entre la región media y apical en forma trapezoide es existente pero de menor dimensiones respecto al grupo TehI (Figura 2).

El grupo Tehp: formado por la colecta s21p1 y s21p2, presenta un aumento de longitud en la base de los lóbulos apicales (10.68 mm de longitud) con respecto al grupo ThpI y ThpII pero mantiene un diámetro similar en la región media del labelo (22.3 mm), por lo que la división entre la región media y apical se difumina en una forma de un trapezoide, con base una base de 10.68 mm y más ancho hacia el ápice (14.55 mm), con un diámetro de 4.37 mm.

El grupo Trp: constituido por la colecta S16p1 se define por presentar el labelo con las dimensiones de menor tamaño a lo ancho en la región basal (3.70 mm de longitud). El ancho de la región media del labelo posee una longitud de 21.83 mm. Los lóbulos apicales son de mayor longitud (13.05 mm) y menor apertura (63°) respecto al resto de los ejemplares analizados, de tal manera que este labelo presenta una forma romboide (Figura 2).

Agrupamiento de la variación del aroma. A través de análisis de conglomerados se apreció que los sitios de colecta de *V. planifolia*, a una distancia media de conglomerados de 0.7 responden al patrón de agrupamiento de cuatro grupos de acuerdo con el grado de participación de compuestos menores (C1, C2, C3) y la relación de la sumatoria de compuestos menores ($\sum CM$) con base en el contenido de vainillina (Figura 4).

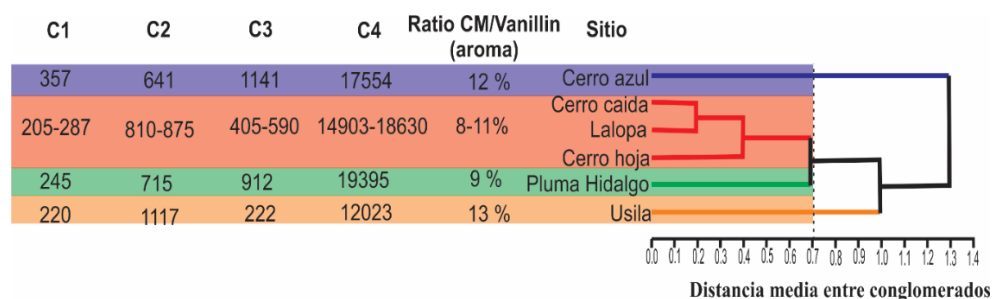


Figura 3. Dendrograma y agrupación los sitios de *Vanilla planifolia* en el estado de Oaxaca, con base en el promedio de 10 variables y agrupamiento por distancias de similitud. (C1: ácido *p*-hidroxibenzóico, C2: ácido vainílico, C3: *p*-hidroxibenzaldehído, C4: vainillina, Σ CM/C4: proporción de compuestos menores por contenido de vainillina).

El grupo Oaxaca CLC, integrado por tres sitios (Cerro caída, Cerro hoja y Lalopa). Se caracteriza por presentar una concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico de 204 a 287, *p*-hidroxibenzaldehído en un rango de 405 a 590 ppm, la concentración de ácido vainílico oscila de 810 a 875 ppm. Posee un contenido de vainillina de 14742 a 18630 ppm. Presenta una participación de ácido *p*-hidroxibenzóico en relación al contenido de vainillina de 1.5%. Los compuestos menores en el aroma del extracto en relación al contenido de vainillina son de 8 a 11%. (Figura 3).

El grupo Oaxaca U, lo conforma el sitio de Usila, se caracteriza por presentar una concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico de 220 ppm, la concentración más baja de *p*-hidroxibenzaldehído (222 ppm), la concentración más elevada de ácido vainílico (1117 ppm). Posee un contenido de vainillina (12023 ppm). Presenta una participación de ácido *p*-hidroxibenzóico en relación al contenido de vainillina de 1.8%. Los compuestos menores en el aroma del extracto en relación al contenido de vainillina es 13%. (Figura 3).

El grupo Oaxaca CA, representado por el sitio Cerro azul. Se caracteriza por presentar la concentración más alta de ácido *p*-hidroxibenzóico (357 ppm) y de *p*-hidroxibenzaldehído (1141 ppm), así como bajo contenido de ácido vainílico (651 ppm). Posee un contenido de vainillina de 17574 ppm. Presenta la participación más alta de ácido hidroxibenzóico en relación al contenido de vainillina (2%) y compuestos menores en el aroma del extracto en relación al contenido de vainillina de 12% (Figura 3).

El Grupo Oaxaca PH, lo conforma el sitio ubicado en Pluma Hidalgo. Se caracteriza por presentar una concentración intermedia de ácido hidroxibenzóico (245 ppm) y ácido vainílico (715 ppm) y la segunda mayor concentración de *p*-hidroxibenzaldehído (912 ppm). Posee el contenido de vainillina más elevado (19395 ppm). Presenta una participación de ácido *p*-hidroxibenzóico en relación al contenido de vainillina de 1.2%. Los compuestos menores en el aroma del extracto en relación al contenido de vainillina son de 9%. (Figura 3).

Variabilidad genética. Para determinar la variación genética de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca, se examinaron 14 loci microsatélites, de los cuales 13 fueron polimórficos (SSR002, SSR003, SSR005, SSR010, SSR015, SSR016, SSR019, SSR022, SSR025, SSR026, SSR031, SSR047, SSR050) y uno monomórfico (SSR028). El número de alelos por locus y el número de alelos exclusivos encontrados fue variable (Cuadro 4). Se encontró un total de 40 alelos con un promedio de tres alelos por locus dentro de los trece loci polimórficos analizados en 29 individuos de *V. planifolia*.

Cuadro 4. Parámetros de variación genética de 13 loci microsatélites utilizados en la caracterización molecular de individuos de *V. planifolia* del estado de Oaxaca, México.

Loci (mSSR)	rango	Nº de alelos	Alelos exclusivos	PCI	He	Ho
002	223-228	4	2(226, 228)	0.45	0.56	0.69
003	349-352	2	-	0.10	0.11	0.11
005	263-265	2	-	0.37	0.50	0.86
010	334-341	3	-	0.53	0.62	0.78
015	278-285	4	-	0.58	0.66	0.81
016	322-326	3	-	0.55	0.64	0.82
019	222-228	4	1(222)	0.46	0.57	0.87
022	190-192	2	-	0.37	0.50	0.86
025	233-235	2	-	0.38	0.51	0.93
026	202-204	2	-	0.36	0.48	0.73
031	340-352	8	4(340, 342, 343, 345)	0.66	0.72	1.00
047	305-309	2	-	0.38	0.51	1.00
050	230-232	2	-	0.34	0.44	0.63
Promedio	-	-	-	0.42	0.52	0.78

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

El valor entre paréntesis indica el tamaño del alelo en pares de bases.

Los loci SSR002, SSR019, SSR031 presentaron alelos exclusivos. Se observó un rango de variación en el índice de contenido polimórfico (PCI) que va de 0.17 (SSR003) a 0.71 (mSSR002), con una media de 0.66. La heterocigosidad esperada (He) presentó valores de 0.11 (mSSR003) a 0.72 (mSSR031), con promedio de 0.52. Mientras la heterocigosidad observada (Ho) presentó un rango de 0.11 (mSSR003) a 1.00 (mSSR031, mSSR047), con promedio de 0.78 (Cuadro 4). Se determinó que los loci más informativos fueron mSSR031, mSSR019 al presentar valores elevados de PCI 0,66 y 0.46 respectivamente, aunado a poseer valores elevados de heterocigosidad observada y contar con alelos exclusivos. Por el contrario, el loci que aporta menor cantidad de información es mSSR003, al presentar los valores más bajos de PCI, Ho y He. (Cuadro 4).

El mayor número de alelos por población se presentó en las colectas de *V. planifolia* de Cerro caída y Santiago Tlatepusco (13). Por el contrario, la menor cantidad se localizó en las colectas de Cerro azul y Pluma Hidalgo (10). Se observaron tres alelos exclusivos en Cerro caída, dos dentro del loci SSR002 y uno en SSR019, en Santiago Tlatepusco se detectaron dos alelos exclusivos dentro del loci SSR031 y en al sitio de la localidad Agua mohecida se observó un alelo exclusivo en el loci SSR031 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estratificación genética de 29 colectas de *V. planifolia* en nueve sitios de Oaxaca, mediante trece loci microsatélite

Sitio	Esquejes (N°)	Alelos por población (N°)	Alelos por locus (N°)	Alelos exclusivos (N°)	He	Ho
Cerro caída (s1)	6	13	2.38	3	0.55	0.82
Cerro hoja (s2)	2	12	1.75	-	0.54	0.71
Usila(s3)	4	12	2.08	-	0.53	0.79
Santiago Tlatepusco (s4)	3	13	1.92	2	0.47	0.69
Cutzoo loo (s5)	4	12	2.00	-	0.47	0.73
Agua mohecida (s14)	2	12	2.17	1	0.58	0.79
Agua concuabe (s15)	1	11	2.00	-	1.00	1.00
Cerro azul (S16)	3	10	1.90	-	0.52	0.73
Pluma Hidalgo (s21)	3	10	2.10	-	0.57	0.70
Promedio	-	-	-	-	0.58	0.77

He Heterocigosidad esperada, Ho Heterocigosidad observada.

El rango de heterocigosidad poblacional esperada (H_e) fue de 0.52 a 1.00, con un promedio de 0.58. El rango de heterocigosidad poblacional observada (H_o) oscilo de 0.69 a 1.00, con promedio de 0.77. El mayor H_o poblacional se localizó en los sitios de Agua concuabe, Cerro caída y Agua mohecida. El menor valor de H_o poblacional se observó en los sitios Santiago Tlatepusco, Pluma Hidalgo y Cerro hoja (Cuadro 5).

En el AMOVA se encontró que todas las pruebas de diferenciación para los diferentes niveles jerárquicos fueron altamente significativas ($p < 0.001$), no detectándose variación dentro de individuos (Cuadro 6). La mayor variación fue encontrada entre individuos 55% ($R_{IS}=1.00$, $p < 0.001$), luego entre poblaciones 45% ($R_{ST}=0.045$, $p < 0.001$).

Cuadro 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la variación genética de *V. planifolia*.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Variación (%)	Índice de Fijación
Entre poblaciones	8	3011975	376497	45	$R_{ST}: 0.45^{***}$
Entre individuos	22	2175942	98906	55	$R_{IS}: 1.00^{***}$
Dentro de individuos	31	741	24	0	$R_{IT}: 1.00^{***}$
Total	61	5188658		100	

gl: grados de libertad, R_{ST} : coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; R_{IS} : coeficiente de endogamia dentro de poblaciones; R_{IT} : coeficiente de endogamia total, $^{***} = p < 0.001$.

Para las muestras examinadas, los valores más altos de diferenciación genética pareada fueron observados entre los sitios Cerro caída (S1) y Cerro azul (S16) ($R_{ST}=0.832$); Cerro caída (S1) y Pluma Hidalgo (S21) ($R_{ST}=0.809$); Cerro caída (S1) y Agua concuabe (s15) ($R_{ST}=0.832$), los cuales fueron valores altamente significativos ($P \leq 0.01$). En los nueve sitios estudiados, se encontraron niveles de diferenciación genética, con valores estadísticos altamente significativos a excepción de las comparaciones entre el sitio Cerro hoja (S2) con los sitios Usila (S3), Santiago Tlatepusco (s4) y Agua mohecida (s14); el sitio Usila (S3) con Santiago Tlatepusco (s4); el sitio Santiago Tlatepusco (s4) con Agua mohecida (s14), Agua concuabe (s15); y el sitio Cerro azul (S16) con Pluma hidalgo (s21), que mostraron valores no significativos en la comparación de diferenciación genética (Cuadro 7).

Cuadro 7. Diferenciación genética entre poblaciones (R_{ST}) (debajo de la diagonal y distancia geográfica entre pares de poblaciones en kilómetros (sobre la diagonal) de *V. planifolia*. Pruebas significativas para los valores de R_{ST} entre pares de poblaciones fue conducido para 9999 permutaciones de los datos al azar.

Sitio	S1	S2	S3	S4	S5	S14	S15	S16	S21
S1	---	3	6	9	58	33	33	466	219
S2	0.589**	---	5	10	60	31	31	465	221
S3	0.463**	0.003 ^{ns}	---	6	58	29	30	460	217
S4	0.249**	0.014 ^{ns}	0.096 ^{ns}	---	52	34	35	461	211
S5	0.459**	0.323**	0.337**	0.122 ^{ns}	---	85	85	480	168
S14	0.467**	0.215 ^{ns}	0.411**	0.090 ^{ns}	0.082 ^{ns}	---	1	440	235
S15	0.801**	0.463**	0.375**	0.280**	0.037 ^{ns}	0.346**	---	439	235
S16	0.832**	0.601**	0.672**	0.559**	0.570**	0.485**	0.812**	---	471
S21	0.809**	0.506**	0.577**	0.467**	0.444**	0.402**	0.751**	0.35 ^{ns}	---

Ns= no significativo, **= $P \leq 0.01$

Al agrupar gráficamente la diferenciación genética, se observó que existe una relación estrecha entre los sitios Cerro azul (S16) y Pluma Hidalgo (S21), los cuales a su vez se separan del resto de los sitios (Figura 4). Los siete sitios (S15, S2, S5, S14, S3, S4, S1) que conforman un grupo a una distancia genética de 0.64 se localizan al noreste del estado de Oaxaca.

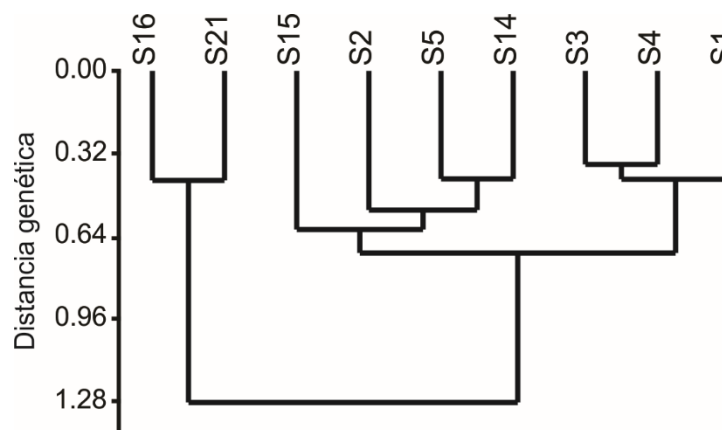


Figura 4. Dendrograma de representación gráfica de las distancias genéticas de los nueve sitios de *V. planifolia*.

La prueba de Mantel indicó que existe correlación significativa entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica entre pares de poblaciones ($R=0.49$, $P>0.01$) (Figura 5).

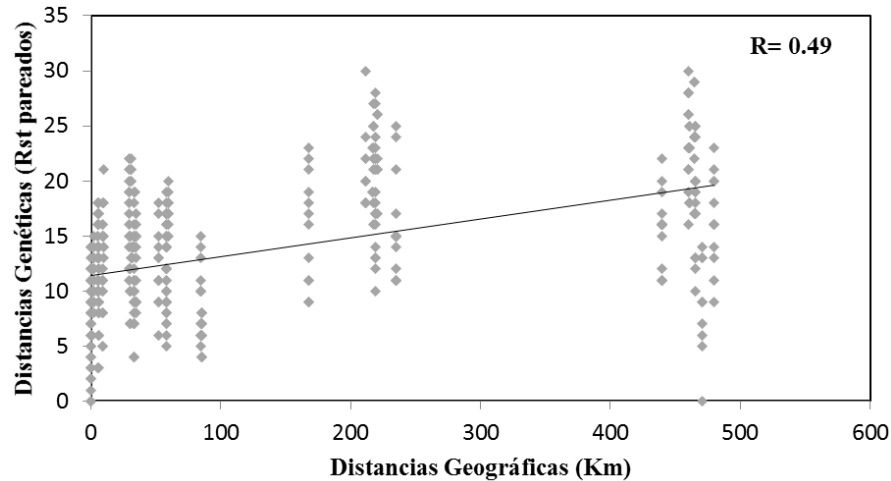


Figura 5. Prueba de mantel para todas las poblaciones ($P < 0.01$)

Las poblaciones que presentaron un valor de N_m mayor a uno (Cuadro 8), como el sitio de Santiago Tlatepusco (s4) entre el sitio Cerro hoja (S2) y entre el sitio Agua mohecida (s14), el sitio Agua concuabe (s15) entre el sitio Cutzoo loo (s5). Se infiere que en estas poblaciones silvestres de *V. planifolia* la deriva génica es despreciable y el flujo génico hace que todas poblaciones evolucionen de manera cohesiva como un conjunto. Para el resto de los sitios que poseen un valor menor a uno existe un proceso de deriva génica actuando de manera independientemente en cada una de los sitios.

Cuadro 8. Estimaciones de N_m pareado, en nueve sitios de *V. planifolia*, utilizando 13 microsatélites

Sitio	S1	S2	S3	S4	S5	S14	S15	S16	S21
S1	---								
S2	0.17	---							
S3	0.29	0.00	---						
S4	0.75	17.39	2.35	---					
S5	0.29	0.52	0.49	1.79	---				
S14	0.29	0.91	0.36	2.51	2.80	---			
S15	0.04	0.29	0.42	0.64	6.54	0.47	---		
S16	0.05	0.17	0.12	0.20	0.19	0.27	0.06	---	
S21	0.06	0.24	0.18	0.29	0.31	0.37	0.08	0.46	---

Mediante el índice Jaccard se construyó un Cluster con los 13 loci microsatélites polimórficos de 29 individuos de *V. planifolia*, de igual manera se incluyó en este análisis una colecta de *V. odorata* y de *V. inodora*, las cuales se consideraron como grupo externo para reforzar el análisis de variación genética entre esquejes de *V. planifolia* (Figura 6).

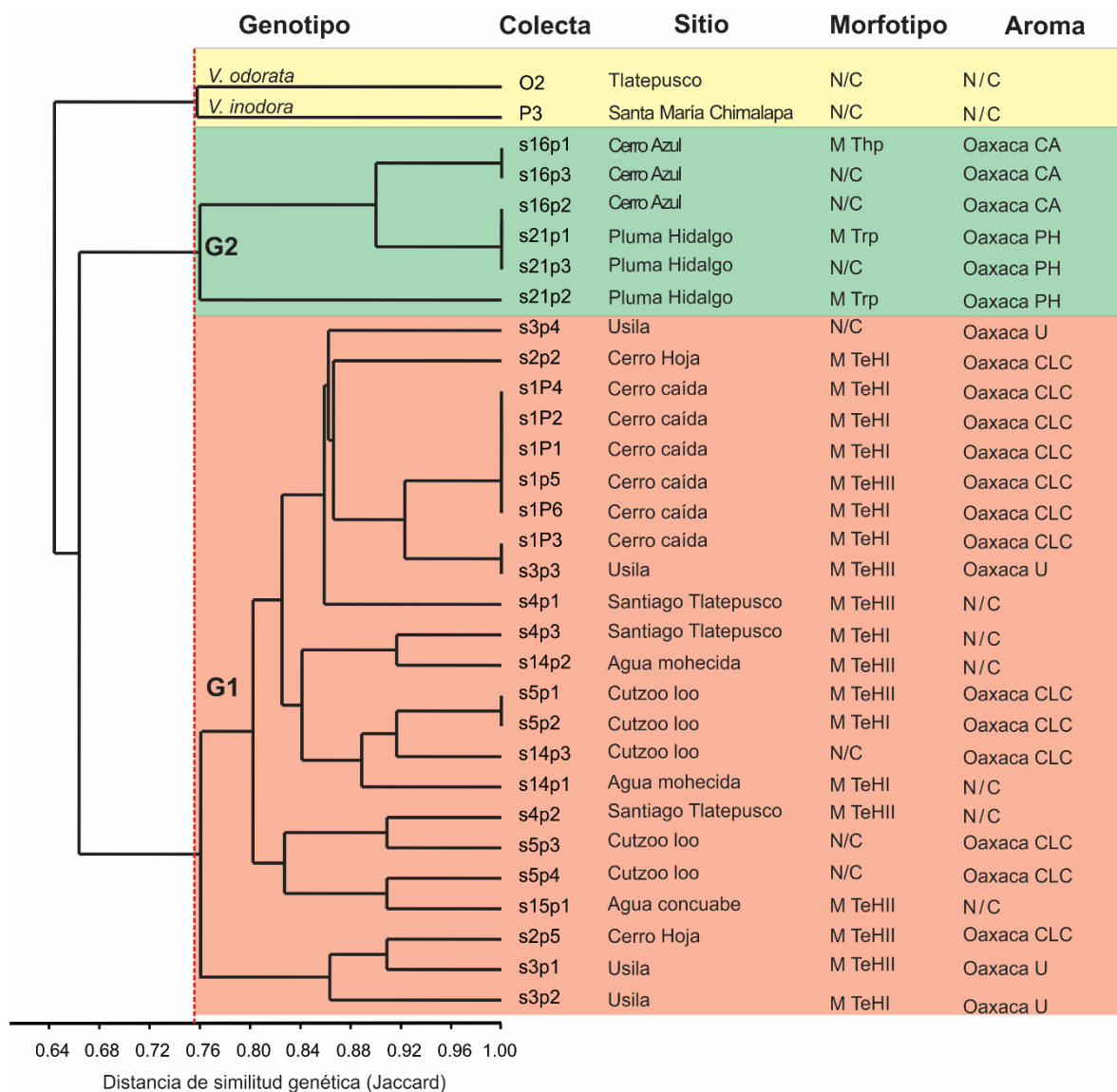


Figura 6. Dendrograma que muestra dos genotipos (G1 y G2) a una distancia de similitud genética de 0.75, formado a partir de 13 loci microsatélites en colectas de *V. planifolia*. Se indica la colecta, localidad, morfotipo de cada individuo y aroma promedio de cada sitio analizado (N/C= hace referencia que de esos esquejes no se pudieron colectar material biológico de flores y vainas).

A una distancia de similitud genética de 0.75 se observaron dos genotipos (G1, G2) (Figura 6). El genotipo uno (G1), se encuentra en todas las colectas que se ubican al noreste del estado de Oaxaca. Este genotipo presenta la expresión de dos morfotipos del labelo, la forma “TehI” y “TehII”, los cuales se caracterizan por tener un mayor tamaño en la región media del labelo con respecto al lóbulo medio del labelo. Así mismo el genotipo G1 expresa dos aromas, el primero denominado “Oaxaca CLC” el cual presenta una interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\Sigma\text{CM}/\text{vainillina}$) de 8 a 11%. Y el aroma “Oaxaca U” en el cual la interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\Sigma\text{CM}/\text{vainillina}$) es de 13%. Ambos morfotipos de labelo y aromas se expresan en el ambiente con condiciones del templado húmedo.

El genotipo dos (G2), se localiza en las colectas de dos sitios: Cerro azul que se localiza en la región del Istmo de Tehuantepec donde las características ambientales son propias del trópico húmedo y las de Pluma Hidalgo que se ubican hacia las costas del pacífico del estado de Oaxaca, donde la condición ambiental es templada húmeda del pacífico. Este genotipo expresa una forma particular del labelo en cada ambiente, la forma “Tehp” se ubica en el ambiente templado húmedo del pacífico y el morfotipo “Trh” se expresa en condiciones del trópico húmedo. El genotipo (G2) expresa dos aromas: “Oaxaca CA” el cual presenta una interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\Sigma\text{CM}/\text{vainillina}$) de 12% y se distribuye donde las características del ambiente son del trópico húmedo. Y el aroma “Oaxaca PH” que tiene una interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\Sigma\text{CM}/\text{vainillina}$) de 9%. Este aroma se ubica en el ambiente templado húmedo del pacífico.

4.4 Discusión

El uso de marcadores microsatélites (SSR) para el estudio de variación infraespecífica en *V. planifolia* evidenció niveles de heterocigosidad y la formación de dos genotipos. Esto concuerda con lo observado en *V. planifolia*, en que el estudio de su variación permitió observar cinco genotipos (Herrera-Cabrera et al., 2012).

El estudio con marcadores microsatélites encontró que el principal componente de la variación genética de *V. planifolia* corresponde a la variación entre individuos (55%) y entre poblaciones (45%), lo cual sugiere que existe una estructura poblacional entre los sitios de *V. planifolia* del estado de Oaxaca. Estudios anteriores habían encontrado una baja diversidad genética en las zonas de cultivo (Besse et al., 2004; Minoos et al., 2006; Lunbisky et al., 2008). Lo cual se atribuye principalmente por efecto de la erosión genética derivada de la constante multiplicación clonal de la especie (Minoos et al., 2007). Sin embargo, también puede estar ligada al tipo de marcadores moleculares utilizados (RAPD y AFLP).

La variación morfológica del labelo se interpreta como la adaptación de una especie en estado silvestre al entorno donde se desarrolla (Armbruster, 2002; Shimono et al., 2009). Debido a que las poblaciones de *V. planifolia* que se localizan al noreste del estado, poseen el genotipo G1 y expresan los morfotipos TehI y TehII, los cuales se encuentran delimitadas por la Sierra Norte de Oaxaca, la cual actúa como barrera geográfica. Dado que es un sistema montañoso que sobrepasa los 3000 msnm de tal manera que restringe el flujo génico hacia las poblaciones que se ubican en la costa del pacífico y el istmo de Tehuantepec, lugar donde se localiza el genotipo G2 el cual expresa los morfotipos Trh y Tehp en ambientes del trópico húmedo y templado húmedo respectivamente. De manera tal que los individuos están expuestos a cambios originados por factores climáticos (Manel et al., 2012).

Con los resultados obtenidos se infiere que en poblaciones silvestres de *V. planifolia* puede existir un aumento o disminución en la concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vainílico, *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina, características no reportadas como diferentes, dado que la mayoría de estudios de calidad aromática de vainilla se basan en evaluar ejemplares cultivados (Pérez-Silva et al., 2006; Sinha et al., 2008; Salazar-Rojas et al., 2011), que por la característica clonal de la especie (Ecott, 2004; Bory et al., 2007) y mediante un proceso de selección humana (Herrera-Cabrera et al., 2012) el único compuesto que reportaba variaciones influidas por el lugar del cultivo había sido ácido vainílico (Ranadive, 1992).

Por su parte la interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\Sigma\text{CM/vainillina}$) ha sido considerada como una variación que es determinada por el genotipo (Salazar-Rojas et al., 2011; Herrera-Cabrera et al., 2012). Sin embargo con los resultados obtenidos se infiere que en poblaciones silvestres de *V. planifolia* puede existir un aumento o disminución en la $\Sigma\text{CM/vainillina}$ por la interacción del genotipo con el ambiente (Pluhár et al., 2007; Llorens et al., 2014; Tuttolomondo et al., 2014). Debido a que el genotipo (G2) expresa dos aromas: uno con un índice de $\Sigma\text{CM/vainillina}$ de 12% (Oaxaca CA), el cual se distribuye en el ambiente trópico húmedo. El otro aroma con una interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\Sigma\text{CM/vainillina}$) de 9% (Oaxaca PH), este aroma se ubica en el ambiente templado húmedo del pacífico. Este fenómeno es propio de especies silvestres con frutos aromáticos debido a que el polimorfismo aromático es resultado del proceso de adaptación de las poblaciones al entorno biótico y abiótico para garantizar la supervivencia y reproducción de la especie (Chartier et al., 2013; Cosacov et al., 2013).

4.5 Conclusiones

El estudio de las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en Oaxaca, México, mostró que la mayor cantidad de variabilidad genética fue encontrada entre individuos (55 %) que las conforman, y entre poblaciones, la variabilidad genética cuantificada fue de 45 %.

La variación infraespecífica de las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en Oaxaca, está determinada por dos genotipos (G1 y G2). El genotipo G1, expresa dos formas del labelo en condiciones del clima templado húmedo y dos aromas con concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina de 8 a 11 % y una del 13 %.

El genotipo G2, expresa dos formas del labelo, una que corresponde al clima templado húmedo del pacífico donde la expresión del aroma responde a la concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina del 9% y la expresión del labelo que corresponde al clima trópico húmedo donde el aroma tiene una concentración de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina del 12%.

Se encontró aislamiento genético por distancia, ya que existen diferencias estadísticamente significativas en la diferenciación genética entre poblaciones para la mayoría de los sitios de *V. planifolia*, específicamente para las poblaciones de Pluma Hidalgo y Cerro azul.

En las poblaciones silvestres de *V. planifolia*, las variaciones de la forma del labelo y la concentración de los compuestos fenólicos que determinan la calidad del aroma en vainilla, son influenciadas directamente por el ambiente.

4.6 Literatura citada

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4), 617-631.
- Armbruster, W. S. (2002). Can indirect selection and genetic context contribute to trait diversification? A transition-probability study of blossom-colour evolution in two genera. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3), 468-486.
- Besse, P., Da Silva, D., Bory, S., Grisoni, M., Le Bellec, F., & Duval, M. F. (2004). RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science*, 167(2), 379-385.
- 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(4), 420-425.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.-F., & Besse, P. (2007). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571.
- Catling, P. M. (1990). *Malaxis salazarii*, a new species from Mexico and northern Mesoamerica. *Orquidea*, 12, 93-104.
- Chartier, M., Pélozuelo, L., Buatois, B., Bessière, J. M., & Gibernau, M. (2013). Geographical variations of odour and pollinators, and test for local adaptation by reciprocal transplant of two European Arum species. *Functional Ecology*, 27(6), 1367–1381.
- Cibrián-Jaramillo, A. (1999). Variación Genética de *Vanilla planifolia* en México. Tesis, Facultad de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, D.F., México. 56 p.

- Cosacov, A., Cocucci, A. A., & Sérsic, A. N. 2013. Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting *Calceolaria polyrhiza*: do pollinators matter?. *Annals of Botany* 113, 251-266.
- Duval, M. F., Bory, S., Andrzejewski, S., Grisoni, M., Besse, P., Causse, S., & Wong, M. (2006). Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. *Les Actes du BRG*, 6, 181-196.
- Ecott, T. (2004). *Vanilla: Travels in search of the ice cream orchid*. Grove Press, New York. 352 p.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras, C., & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 37-44.
- Llorens, L., Llorens-Molina, J. A., Agnello, S., & Boira, H. (2014). Geographical and environment-related variations of essential oils in isolated populations of *Thymus richardii* Pers. in the Mediterranean basin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 246-254.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J. H., Kim, S. C., & Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]) 1. *Economic Botany*, 62(2), 127-138.
- Manel, S., Gugerli, F., Thuiller, W., Alvarez, N., Legendre, P., Holderegger, R., & Taberlet, P. (2012). Broad-scale adaptive genetic variation in alpine plants is driven by temperature and precipitation. *Molecular ecology*, 21(15), 3729-3738.
- Minoo, D., Jayakumar, 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 RAP D polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3), 459-470.

- Nielsen, L. R. (2000). Natural hybridization between *Vanilla claviculata* (W. Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb. f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 133(3), 285-302.
- Nielsen, L. R., & Siegismund, H. R. (1999). Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). *Heredity*, 83(5), 560-567.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
- Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., Günata, Z. (2006). GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, 99(4), 728-735.
- Pluhár, Z., Héthelyi, É., Kutta, G., & Kamondy, L. (2007). Evaluation of Environmental Factors Influencing Essential Oil Quality of *Thymus pannonicus* All. and *Thymus praecox* Opiz. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 13(1), 23-43.
- Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*, 1(7), 215-222.
- Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1993). Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 9(8), 275-280.
- Ranadive, A. S. (1992). Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1922-1924.
- 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.
- Schlötterer, C., & Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*, 20(2), 211-215.
- Schlüter, P. M., Arenas, M. A. S., & Harris, S. A. (2007). Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany*, 61(4), 328-336.

- 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.
- Sinha, A. K., Sharma, U. K., & Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4), 299-326.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139(1), 457-462
- Sokal, R. R., y F. J. Rohlf. (1995). Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Co, New York. 887 p.
- Soto-Arenas, M. A. (1999). Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoin AC. Informe Final SNIB-CONABIO, Proyecto J101.
- Tautz, D., & Renz M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10), 4127-4138.
- Tuttolomondo, T., Leto, C., Leone, R., Licata, M., Virga, G., Ruberto, G., Bella, S. L. (2014). Essential oil characteristics of wild Sicilian oregano populations in relation to environmental conditions. *Journal of Essential Oil Research*, 26(3), 210-220.
- Verpoorte, R. (2011). Prólogo In: Odoux E and M Grisoni M (Eds.), Vanilla (Medicinal and aromatic plants-industrial profiles). CRC Press. 420 pp.
- Zotz, G., & Schmidt, G. (2006). Population decline in the epiphytic orchid *Aspasia principissa*. *Biological Conservation*, 129(1), 82-90.

CAPÍTULO V

ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN DE *VANILLA PLANIFOLIA* MEDIANTE CARACTERIZACIÓN INFRAESPECÍFICA Y REPRESENTATIVIDAD ECOLÓGICA EN OAXACA, MÉXICO

Resumen

Vanilla planifolia es una de las plantas aromáticas más importantes de la industria alimenticia, originaria de las zonas tropicales de México, lugar donde no existe una propuesta sólida sobre la conservación de las poblaciones silvestres de la especie. El objetivo de la investigación fue conocer la variación infraespecífica del acervo genético silvestre de *V. planifolia* y la representatividad ecológica de los ecosistemas donde se desarrolla para generar una propuesta de conservación. La variación morfológica se evaluó a través del labelo de la flor de vainilla, la variación fitoquímica se obtuvo con variables que determinan la calidad aromática de vainilla (vainillina, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-hidroxibenzóico) mediante un análisis de cromatografía líquida de alta resolución. Para el análisis molecular se utilizaron 14 loci microsátélites para calcular el Índice de Contenido Polimórfico, Heterocigosidad esperada y observada. El nivel de representatividad ecológica para *V. planifolia*, se realizó al integrar el mapa digital del estado de Oaxaca, polígonos de distribución potencial de *V. planifolia*, cartografía digital de tipos de vegetación, red de áreas naturales protegidas (ANP) y áreas destinadas voluntariamente a la conservación (ADVC), se calculó la superficie ocupada de cada tipo de vegetación dentro y fuera del sistema de ANP y ADVC, con la herramienta “calculate geometry”. La variación infraespecífica de *V. planifolia* está determinada genéticamente por dos genotipos, los cuales expresen morfotipos del labelo y aromas de acuerdo al ambiente donde se encuentren. Se plantea que para preservar esta variación es necesario establecer una conservación *in situ*, sin embargo la representatividad ecológica de los ecosistemas de vainilla es 2.3% en bosque mesófilo de montaña y 5.7% en selva alta perennifolia, estas áreas convergen con áreas de distribución de 30 especies catalogadas en riesgo o amenazadas. Se concluye que dado la amplia extensión de hábitat de *V. planifolia* y que las ANP existentes no cuentan con la representatividad ecológica adecuada, se requiere de un diseño específico, que permita identificar medidas factibles para la creación de nuevas ANP.

Palabras clave: Áreas naturales protegidas, conservación, plasticidad fenotípica, vainilla

Abstract

Vanilla planifolia is one of the most important herbs in the food industry, native to the tropics of Mexico, where there is no supported proposal on the conservation of wild populations of this species. The objective of this research was to determine the infra-variation of wild gene pool of *V. planifolia* and the ecological representativeness of the ecosystems where it grows to generate a conservation plan. Morphological variation was assessed using the labellum of the flower vanilla, phytochemical variation was determined by variables that determine the vanilla aromatic quality (vanillin, acid vanillin, p-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzoic acid) by HPLC analysis (High Performance Liquid Chromatography). The Polymorphic Content index and the expected and observed heterozygosity were calculated based on 14 microsatellite loci for molecular analysis. Ecological representativeness of ecosystems to *V. planifolia* was performed by integrating the digital maps of the state of Oaxaca, of *V. planifolia* potential distribution, vegetation types, network of protected natural areas (PNA) and voluntarily conservation areas (VCA); the area occupied by each type of vegetation within and outside the PNA and VCA systems were calculated with the ArcGis "calculate geometry" tool. The infraspecific variation of *V. planifolia* is genetically determined by two genotypes, which express morphotypes of the labellum and aromas depending on the environment where they grow. On the other hand, the ecological representativeness of ecosystems vanilla is 2.3% in cloud forest and 5.7% in high evergreen forest, which is considered a low representation. Also, these areas converge to the distribution of 30 species listed at risk or threatened. It was concluded that given the wide distribution of *V. planifolia* habitat and that existing ANP not have adequate ecological representativeness, it requires a specific design, to identify potential new protected natural areas. This can further be strengthened with a program of in situ conservation of the species.

Keywords: conservation, protected areas, phenotypic plasticity, vanilla

5.1 Introducción

La estrategia para la conservación, desde una perspectiva biológica, se realiza para establecer regiones, áreas, sitios o especies prioritarias a ser conservadas, (March et al., 2009). De tal manera que se determinen acciones clave que enfrenten con eficacia las causas que vulneren y pongan en riesgo la diversidad en cualquiera de sus escalas (Kristensen et al., 2001). Sin embargo, para diseñar acciones de conservación es primordial conocer las diferentes variantes que determinan la especie (Challenger, 1988; Herrera-Cabrera et al., 2010), así como la definición de las variaciones ambientales locales que la delimitan (Wan et al., 2014).

Los hábitats de las orquídeas en estado silvestres, se han visto vulnerados por la destrucción de su entorno por fenómenos humanos y meteorológicos (Robbirt et al., 2011; Sánchez et al., 2011). El acervo genético primario de *Vanilla planifolia* G. Jack, presenta dos problemáticas primordiales, una relacionada con la baja variación genética de los cultivares, causada por la constante multiplicación clonal para el establecimiento de cultivos comerciales (Ecott, 2004; Bory et al., 2007; Minoos et al., 2007). Por ello se considera una orquídea en la categoría de alto grado de erosión genética (FAO, 1995), además considerando a México como centro de origen de la vainilla (Verpoorte, 2011), se encuentra sujeta a protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2010).

La segunda problemática se centra en la falta de información sobre los especímenes silvestres, dado que en la región del Totonacapan (Puebla-Veracruz), donde el germoplasma se ha mantenido en condiciones de cultivo durante más de 250 años (Bory et al., 2007) no se han localizado o reportado poblaciones silvestres (Soto-Arenas y Dressler, 2010). Por otra parte, la mayoría de las colectas de vainilla identificadas como silvestres se localizan en el estado de Oaxaca (Soto-Arenas, 1999; Cibrián-Jaramillo, 1999), donde los frutos se colectan para usos locales en comunidades de la Sierra Mazateca y Chinanteca en la región noreste del estado (Soto-Arenas, 1999).

Este trabajo se centró en recabar información, sobre la variación genética, morfológica y fitoquímica de la especie y la representatividad del ecosistema que rodea en su estado silvestre a las poblaciones de *V. planifolia* que se distribuyen dentro del estado de Oaxaca. Para con base

en lo anterior, plantear el objetivo de proponer una estrategia de conservación de *Vanilla planifolia* para el Estado de Oaxaca, México.

Esto basado en la premisa que para que la conservación sea más eficiente es fundamental que los criterios de selección sean integrales y bien argumentados (Margules y Pressey, 2000). Por ello aunado a la variación infraespecífica de la especie objetivo principal a conservar (*V. planifolia*), se consideraron las áreas nacionales protegidas (ANP) federales, estatales, y áreas destinadas voluntariamente a la conservación, dado que las ANP fueron adoptadas a nivel mundial como la estrategia principal para la conservación de los recursos naturales (McNeely et al., 1994; Dudley, 2008).

5.2 Materiales y métodos

Área de estudio. Se delimitó basado en la distribución potencial de *V. planifolia* dentro del estado de Oaxaca (Hernandez-Ruiz et al., 2016 en prensa), el cual se encuentra ubicado en el sureste de la República Mexicana, entre los 15°39' y 18°42' de latitud norte y entre los 93°52' y 98°32' de longitud oeste, con tiene una superficie de 95 364 Km² (INEGI, 2010).

Material biológico. Se ubicaron un total de 34 plantas de *V. planifolia* distribuida en 12 sitios (Cuadro 1). Para el análisis de variación floral en el labelo se colectaron 108 flores de 28 ejemplares, durante el periodo fenológico de floración (abril-mayo de 2013).

El análisis del aroma requirió de flores de *V. planifolia* que fueron polinizadas manualmente durante la segunda semana de abril y la primera de mayo de 2013, para posteriormente colectar los frutos a las 28 semanas después de la polinización. Mediante este proceso se obtuvieron frutos de vainilla de seis sitios del estado de Oaxaca (Cuadro 1), con condiciones de madures homogéneas para la adecuada determinación del aroma. El análisis molecular, se colectaron dos hojas de 28 plantas de *V. planifolia*, distribuidas en ocho localidades, del estado de Oaxaca durante el mes de diciembre de 2013 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Localización geográfica de los sitios de colecta de flores, frutos y hojas de *Vanilla planifolia* en Oaxaca, México.

Localidad	Sitio	Longitud*	Latitud*	Esquejes por sitio (N°)	Material biológico colectado (N°)		
					Flores	Frutos	Hojas
Arroyo Iguana	Cerro caída	1981808	765380	6	19	20	12
Arroyo Aguacate	Cerro hoja	1985140	766867	2	7	10	4
San Felipe Usila	Usila	1978103	761904	4	9	10	8
Santiago Tlatepusco	Santiago Tlatepusco	1972242	763881	3	6	n/c	6
Santiago Lalopa	Cutzoo loo	1928187	791220	4	12	20	8
Loma Ojiteca	Agua mohecida	1992850	736520	2	12	n/c	4
	Agua concuabe	1993074	736191	1	7	n/c	2
Santa Ma. Chimalapa	Cerro azul	1865068	315789	3	3	10	6
Pluma Hidalgo	Pluma Hidalgo	1761267	775017	3	5	14	6
Yae	Eluruua	1931801	791964	2	8	n/c	n/c
	Yacuini	1931507	792295	2	6	n/c	n/c
Sochiapam	Arroyo chorro	1972072	747411	2	14	n/c	n/c
Total	---	---	---	34	108	84	56

*Coordenadas UTM, n/c= material biológico no colectado.

Variación morfológica. Las 108 flores de *V. planifolia* se evaluaron con base en la técnica y esquema de Catling (1990) modificado, a través de los siguientes pasos: (1) Disección de la flor y extensión del labelo en una superficie de cristal. (2) Impregnado del labelo con azul de metileno (0.08%). (3) Captura fotográfica del labelo con una cámara réflex Sony alfa 65v, equipada con una lente macro Sony DT 30mm F/2.8 SAM. (4) Las imágenes tomadas se procesaron mediante el programa CorelDrawX7 para la generación y evaluación de 53 trazos y 7 ángulos.

Las 60 variables analizadas se agruparon en tres regiones del labelo (Figura 1): región basal formada por la sección A (A, A1, A2, A3, A4, A5, aA, B1x), región media constituida por cuatro secciones: sección B (B, B2, B5, B7, B8, B9, B10, aB), sección C (C, C1x, C2, C5, C7, C8, C9, C10), sección D (D, D1x, D2, D5, D7, D8, D9, D10, aD, aDE22, aDE55), sección E (E, E1x,

E2, E5, E7, E8, E9, E10, aE) y región apical integrada por dos secciones: sección F (F, F1x, F2, F5, F7, F8, F9, F10) y sección G (G, G1x, G2, G3, G4, G6, G7, aG).

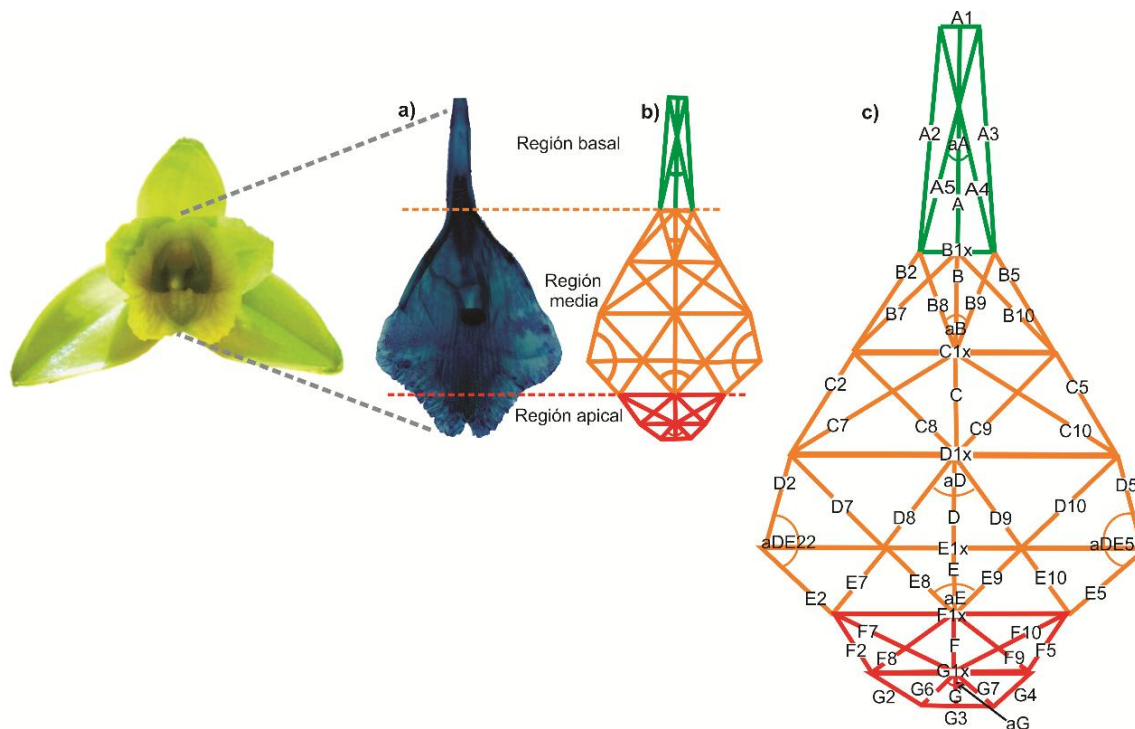


Figura 1. Flor y esquema del labelo de *Vanilla planifolia* G Jack. a) Labelo extendido en el que se indica la región basal, media y apical. b) Trazos y ángulos utilizados para el análisis. c) Nombre y ubicación de las variables utilizadas.

Variación del aroma. Los Frutos verdes colectados, fueron sometidos a un proceso de beneficiado tradicional de 14 semanas donde las condiciones de manejo se mantuvieron homogéneas. Los frutos beneficiados se refrigeraron a -80°C por 48 hrs y se trituraron en un molino de carga Kurps Gx4100 de 25000 rpm. Posteriormente 0.5 mg de tejido se depositaron en viales de 20 mL en los cuales se adicionó 8 mL de una solución compuesta de agua y éter etílico grado HPLC (1:1). Los extractos se analizaron mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Series 200 marca Perkin Elmer, detector UV-VIS, con una columna C18 $5\ \mu\text{m}$ 250x4.6 mm (Serie 08010034K), volumen de inyección: $10\ \mu\text{L}$, flujo: $1.0\ \text{mL min}^{-1}$, fase móvil isocrática (H_3PO_4 0.01M: metanol (75:25) y solución metanol: agua (50:50), temperatura 30°C , tiempo de corrida 30 min, y detección a 254nm.

Para la caracterización de la calidad fitoquímica de *V. planifolia* se consideraron un total de 10 variables. Cuatro correspondieron al contenido de cada uno de los compuestos que definen la calidad en vainilla: ácido *p*-hidroxibenzóico (C1), ácido vainílico (C2), *p*-hidroxibenzaldehído (C3) denominados como compuestos menores, y vainillina (C4) (Bettazzi et al., 2006; Sharma et al., 2006). Y seis índices que relacionan el contenido de los compuestos menores en relación a la vainillina para inferir si existe relación entre la concentración de los compuestos: la sumatoria de compuestos menores ($\sum CM=C1+C2+C3$), la proporción total de compuestos menores entre contenido de vainillina ($\sum CM/C4$) y la interacción de los compuestos menores en proporción al contenido de vainillina a través de índices (C1/C4, C2/C4, C3/C4, C1+C2/C4).

Análisis numérico. Los 60 caracteres evaluados en el labelo y las 10 variables que definen la calidad aromática de *V. planifolia* se sometieron al análisis multivariado de conglomerados (Sneath y Sokal, 1973) con distancia media entre conglomerados, con ayuda del paquete estadístico SAS v 9.0 (SAS, 2002). Para este análisis numérico se utilizaron las medias de los ejemplares en cada sitio de procedencia para cada uno de los caracteres evaluados.

Variación genética. Para la obtención de ADN, las hojas de *V. planifolia* preservadas a -80°C fueron trituradas en morteros esterilizados y congelados. Posteriormente se colocaron 100 mg de tejido triturado en tubos de microcentrífuga 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 1.2%, en medio TBE 1 X, corridos durante 45 min a 115V, usando como intercalante Midori Green Direct (Nippon, MG06) para visualizar la integridad de la extracción al exponerse a luz UV en un transiluminador.

El análisis de diversidad genética consistió en la amplificación de 14 loci microsatélites a partir de primers marcados con los fluorocromos HEX y 6-FAM (Bory et al., 2008). Las reacciones de PCR se realizaron en 25 μl con 25 ng de ADN, PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl_2 , 0.2 U Taq ADN polimerasa (Red Gold Star, Eurogenetec) y 1 μL 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 agarosa a 1.2%, bajo las condiciones anteriores. Se utilizó una escalera KAPA Express Ladder, DNA Ladder 50 ng/μl (KAPA Biosystems, KL 6303), 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, 9μl de Formamida HiDi y 0.25 μl de ROX-500. El análisis se realizó en un secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con capacidad de análisis de fragmentos.

Los resultados obtenidos se analizaron en el Software Geneious (Geneious 7.0 2005) para ver la calidad de los amplificados y realizar una matriz de alelos para su posterior análisis. Se calculó el Índice de Contenido Polimorfo (PCI), Heterocigosidad esperada (He) y Heterocigosidad observada (Ho) con el complemento The Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001), utilizando el programa MS Excel (EXCEL, 2003).

Representatividad ecológica de los ecosistemas donde se ubica Vainilla dentro de las ANP y ADVC del estado de Oaxaca. Para este análisis de filtro grueso, se utilizó como elemento de biodiversidad los tipos de vegetación: bosque mesófilo de montaña y selva alta perennifolia presentes en el estado de Oaxaca dado que estos tipos de cobertura vegetal son característicos del hábitat de la especie (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

Para determinar el área con presencia de vainilla que está representadas o cubiertas por las áreas naturales protegidas (ANP) federales y estatales y áreas destinadas voluntariamente a la conservación (ADVC), se consideró la área de distribución potencial de *V. planifolia* en el estado de Oaxaca por contener las variables bioclimáticas óptimas para la especie (Hernandez-Ruiz et al., 2016 en prensa).

Se integró la información cartográfica digital de la distribución potencial de *V. planifolia*, la red de áreas naturales protegidas (ANP) de carácter federales, ANP estatales y áreas destinadas voluntariamente a la conservación (ADVC) (CONANP, 2013) y los tipos de vegetación del mapa digital de uso de suelo y vegetación escala 1:250,000 (INEGI, 2010).

El proceso del análisis se realizó al integrar la cartografía digital en el programa ArcGis TM versión 9.3 en el siguiente orden: a) Mapa digital del estado de Oaxaca, b) Polígonos de distribución potencial de *V. planifolia*, d) Cartografía digital de tipos de vegetación y c) Cartografía digital de la red de ANP's y ADVC. Se combinaron los mapas digitales para su análisis y se calculó la superficie ocupada de cada tipo de vegetación dentro y fuera del sistema de ANP y ADVC, con la herramienta “*calculate geometry*” (Price, 2008).

Especies prioritarias dentro de zonas de distribución potencial de vainilla. Se consultó la distribución potencial y conocida de 422 especies catalogadas en riesgo y prioritarias dentro de la Norma Oficial Ecológica Mexicana (Nom-059-Semarnat-2010), en el portal de geo información del sistema nacional de biodiversidad (<http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>) para determinar el número de especies que convergen dentro de las zonas de distribución potencial de *V. planifolia*.

5.3 Resultados

Agrupamiento de la variación del labelo. La variación morfológica del labelo de las 108 flores agrupadas en la media de 28 colectas de *V. planifolia*, muestra a una distancia euclidiana de 0.85 el agrupamiento del complejo de *V. planifolia*, él cual está determinado por cuatro grupos (Figura 2).

El Grupo TehI, formado por 13 colectas, se caracteriza por presentar el labelo con las dimensiones de mayor tamaño a lo ancho, con una media de 22.84 mm de longitud, y una división muy pronunciada en la transición de la región media y los lóbulos laterales en forma trapecoide invertido, angosto en su base (9.89 mm) y más ancho hacia el ápice (13.40 mm). El Grupo TehII, integrado por 12 colectas presenta el menor tamaño respecto al material analizado en la región media del labelo (20.62 mm) de longitud y en la región apical (9.07 mm de longitud). La división de la región media y apical posee una forma trapecoide invertido es existente pero de menor dimensión respecto al grupo TehI (Figura 2).

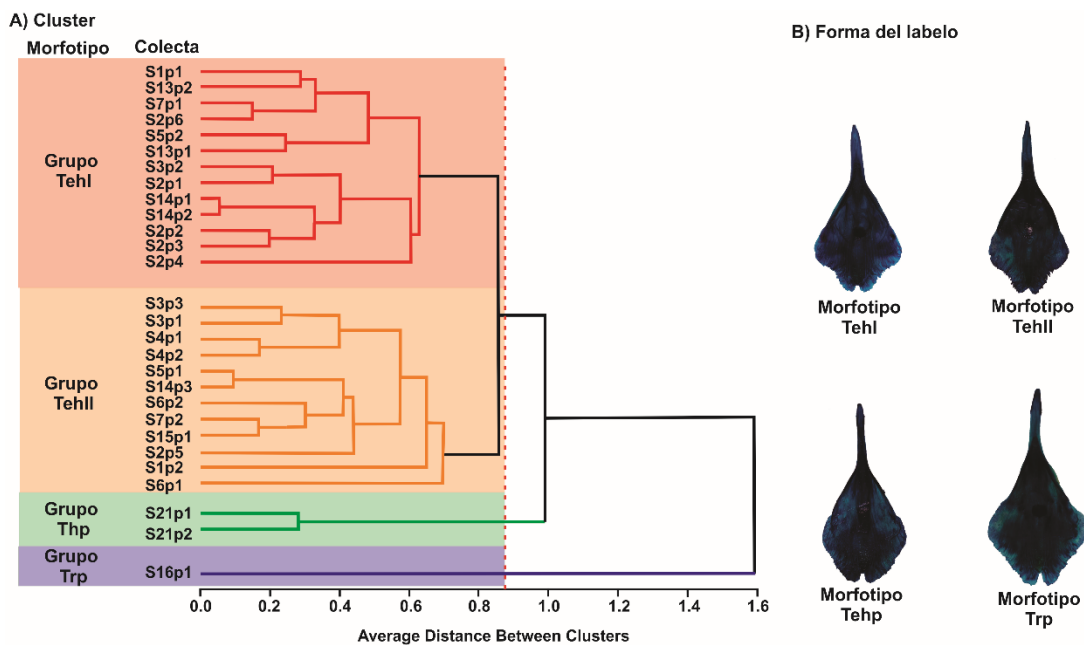


Figura 2. A) Dendrograma de 108 flores agrupadas en la media de 28 colectas de *Vanilla planifolia* G Jack., en el estado de Oaxaca, México, con base en el promedio de 60 caracteres a una distancia media entre conglomerados. B) forma del labelo correspondiente a cada morfotipo.

El Grupo Tehp: formado por las colectas S21p1 y S21p2, presenta un aumento de longitud en la base de los lóbulos apicales (10.68 mm de longitud) con respecto al grupo ThpI y ThpII pero mantiene un diámetro similar en la región media del labelo (22.3 mm), por lo que la división entre la región media y apical se difumina tomando una forma de un trapecoide, alargado, con base de 10.68 mm y más ancho hacia el ápice (14.55 mm), con un diámetro de 4.37 mm. El grupo Trp: constituido por la colecta S16p1 se define por presentar el labelo con las dimensiones de menor tamaño a lo ancho en la región basal (3.70 mm de longitud). El ancho de la región media del labelo tiene una longitud de 21.83 mm. Los lóbulos apicales son de mayor longitud (13.05 mm) con respecto al resto de los ejemplares analizados, de tal manera que este labelo presenta una forma romboide (Figura 2).

Agrupamiento de la variación del aroma. A través de análisis de conglomerados se apreció que los sitios de colecta de *V. planifolia*, a una distancia media de conglomerados de 0.7 responden al patrón de agrupamiento de cuatro grupos de acuerdo con el grado de participación

de compuestos menores (C1, C2, C3) y la relación de la sumatoria de compuestos menores ($\sum CM$) con base en el contenido de vainillina (Figura 4).

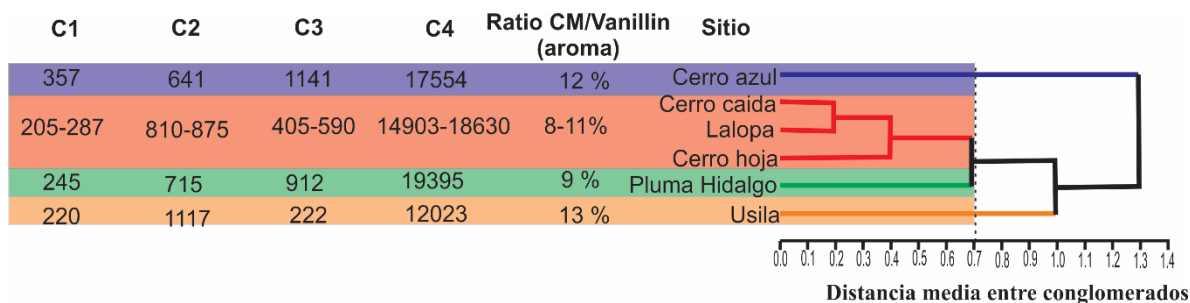


Figura 3. Dendrograma y agrupación los sitios de *Vanilla planifolia* en el estado de Oaxaca, con base en el promedio de 10 variables y agrupamiento por distancias de similitud. (C1: ácido hidroxibenzóico, C2: ácido vainílico, C3: *p*-hidroxibenzaldehído, C4: vainillina, $\sum CM/C4$: proporción de compuestos menores por contenido de vainillina).

El grupo Oaxaca CLC, integrado por los sitios Cerro caída, Cerro hoja y Lalopa. Se caracteriza por presentar una concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico de 204 a 287, *p*-hidroxibenzaldehído en un rango de 405 a 590 ppm, la concentración de ácido vainílico oscila de 810 a 875 ppm. Posee un contenido de vainillina de 14742 a 18630 ppm. Presenta una participación de ácido *p*-hidroxibenzóico en relación al contenido de vainillina del 1.5%. Los compuestos menores en el aroma del extracto en relación al contenido de vainillina son del 8 a 11%. (Figura 3). El grupo Oaxaca U, lo conforma el sitio de Usila, se caracteriza por presentar una concentración de ácido *p*-hidroxibenzóico de 220 ppm, la concentración más baja de *p*-hidroxibenzaldehído (222 ppm), la concentración más elevada de ácido vainílico (1117 ppm). Posee un contenido de vainillina (12023 ppm). Presenta una participación de ácido *p*-hidroxibenzóico en relación al contenido de vainillina del 1.8%. Los compuestos menores en el aroma del extracto en relación al contenido de vainillina es 13%. (Figura 3).

El grupo Oaxaca CA, Representado por el sitio Cerro azul. Se caracteriza por presentar la concentración más alta de ácido *p*-hidroxibenzóico (357 ppm) y de *p*-hidroxibenzaldehído (1141 ppm), así como bajo contenido de ácido vainílico (651 ppm). Posee un contenido de vainillina de 17574 ppm. Presenta la participación más alta de ácido *p*-hidroxibenzóico en relación al

contenido de vainillina (2%) y compuestos menores en el aroma del extracto en relación al contenido de vainillina de 12% (Figura 3).

El Grupo Oaxaca PH, lo conforma el sitio de Pluma Hidalgo. Se caracteriza por presentar una concentración intermedia de ácido hidroxibenzóico (245 ppm) y ácido vainílico (715 ppm) y la segunda mayor concentración de *p*-hidroxibenzaldehído (912 ppm) Posee el contenido de vainillina más elevado (19395ppm). Presenta una participación de ácido *p*-hidroxibenzóico en relación al contenido de vainillina del 1.2%. Los compuestos menores en el aroma del extracto en relación al contenido de vainillina son del 9%. (Figura 3).

Variación genética. El mayor número de alelos por población (13) se presentó en las colectas de *V. planifolia* de Cerro caída y Santiago Tlatepusco. Por el contrario, la menor cantidad (10) se localizó en las colectas de cerro azul y pluma Hidalgo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estratificación genética de 29 colectas de *V. planifolia* en 9 sitios de Oaxaca, mediante trece loci microsatélite

Sitio	Esquejes (N°)	Alelos por población (N°)	Alelos por locus (N°)	Alelos exclusivos (N°)	He	Ho
Cerro caída (s1)	6	13	2.38	3	0.55	0.82
Cerro hoja (s2)	2	12	1.75	-	0.54	0.71
Usila (s3)	4	12	2.08	-	0.53	0.79
Santiago Tlatepusco (s4)	3	13	1.92	2	0.47	0.69
Cutzoo loo (s5)	4	12	2.00	-	0.47	0.73
Agua mohecida (s14)	2	12	2.17	1	0.58	0.79
Agua concuabe (s15)	1	11	2.00	-	1.00	1.00
Cerro azul (s16)	3	10	1.90	-	0.52	0.73
Pluma hidalgo (s21)	3	10	2.10	-	0.57	0.70
Promedio	-	-	-	-	0.58	0.77

He Heterocigosidad esperada, Ho Heterocigosidad observada.

Se observaron tres alelos exclusivos en cerro caída, dos dentro del loci SSR002 y uno en el loci SSR019, en Santiago Tlatepusco se detectaron dos alelos exclusivos dentro del loci SSR031, y en el sitio de la localidad Agua mohecida se observó un alelo exclusivo en el loci SSR031. El

rango de heterocigosidad poblacional esperada (H_e) fue de 0.52 a 1.00, con un promedio de 0.58 (Cuadro 2)

El rango de heterocigosidad poblacional observada (H_o) oscilo de 0.69 a 1.00, con promedio de 0.77. El mayor H_o poblacional se localizó en los sitios de agua concuabe, Cerro caída y Agua mohecida. El menor valor de H_o poblacional se observó en los sitios Santiago Tlatepusco, pluma Hidalgo y cerro hoja (Cuadro 2).

Mediante el índice Jaccard se construyó un dendograma con los 13 loci microsatélites polimórficos de 29 individuos de *V. planifolia*, de igual manera se incluyó en este análisis una colecta de *V.odorata* y *V. inodora*, los cuales se consideraron como grupo externo para reforzar el análisis de variación genética entre esquejes de *V. planifolia* (Figura 4).

A una distancia de similitud genética de 0.75 se observaron los genotipos uno (G1) y dos (G2) de *V. planifolia*, los cuales se separan de las especies *V.odorata* y *V. inodora* utilizadas como grupos externos (Figura 4) con lo cual se infiere que existe variación genética infraespecífica dentro de las colectas de *V. planifolia*.

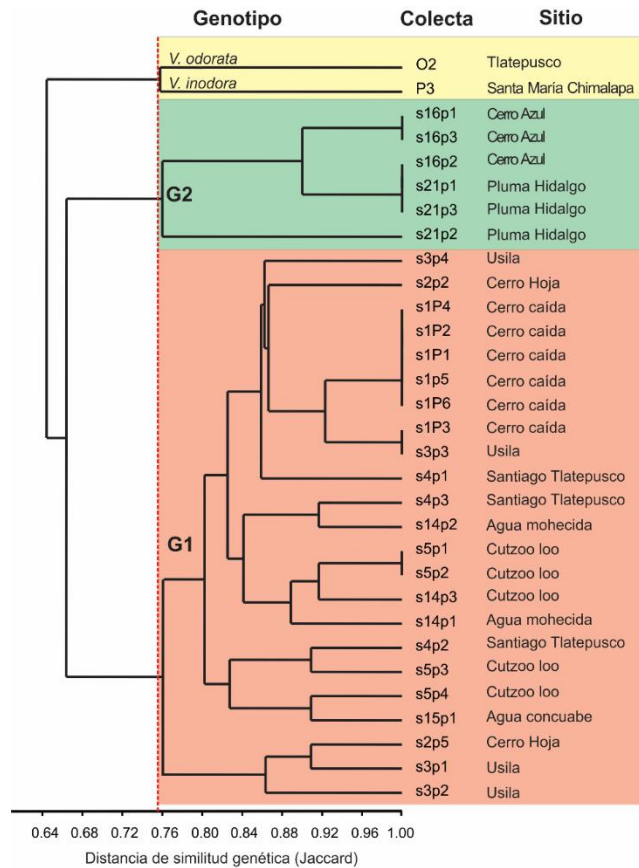


Figura 4. Cluster que muestra dos genotipos a una distancia de similitud genética de 0.75, formado a partir de 13 loci microsatélites en colectas de *V. planifolia*. Se indica la colecta y localidad.

Representatividad ecológica de los ecosistemas potenciales de *V. planifolia* dentro de las ANP y ADVC del estado de Oaxaca. En el estado de Oaxaca la cobertura vegetal de bosque mesófilo de montaña es de 221,624 ha, vegetación secundaria de bosque mesófilo de montaña 137,110 ha, selva alta perennifolia 520,596 ha y vegetación secundaria de selva alta perennifolia de 185,415 ha. De los cuales 33% de bosque mesófilo y 37% de selva alta se encuentran en las zonas de distribución potencial de *V. Planifolia* particularmente en la zona uno (Figura 5).

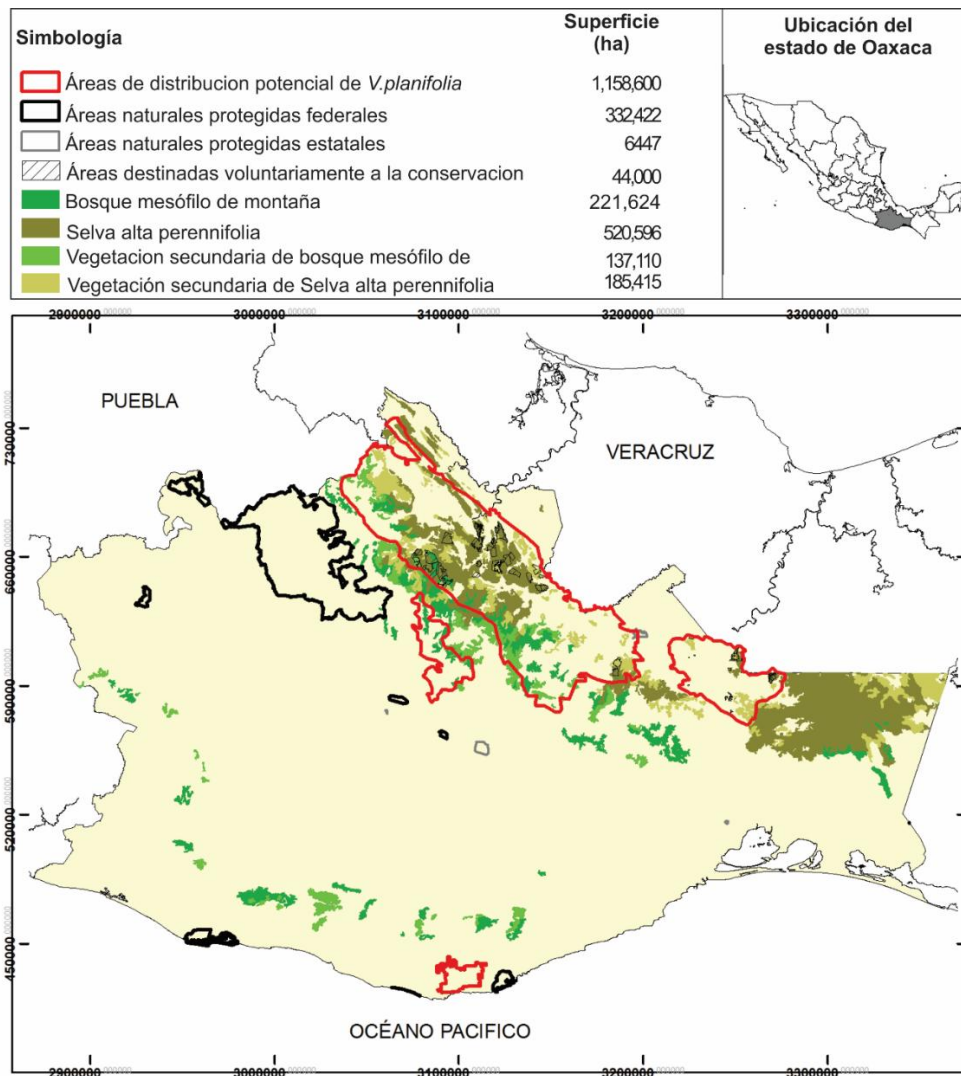


Figura 5. Distribución de zonas potenciales y cobertura vegetal idónea para el hábitat de *V. planifolia*, en relación a las áreas naturales protegidas federales, estatales y áreas destinadas voluntariamente a la conservación en Oaxaca, México.

De las 13 ANP federales, solo la Reserva de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán cuenta con la representatividad ecológica (0.5%) de bosque mesófilo de montaña, sin embargo esta se encuentra fuera de las zonas de distribución potencial de *V. planifolia*, de manera tal que las condiciones bioclimáticas no son óptimas para la especie objetivo a conservar. Así mismo de las seis ANP estatales ninguna cuenta con la representatividad del bosque mesófilo de montaña. Para el caso de la selva alta perennifolia, no cuenta con representatividad dentro de ninguna ANP federal o estatal. Cabe señalar que ninguna de las áreas naturales protegidas federales y estatales sitúa dentro de ellas la distribución potencial del hábitat para vainilla.

Sin embargo dentro de las cuatro zonas de distribución potencial de vainilla, existen 110 áreas destinadas voluntariamente a la conservación (ADVC), principalmente en la zona potencial uno y dos donde se encuentran 58 y 52 ADVC respectivamente. Considerando este mecanismo de áreas de conservación la representatividad del ecosistema para *Vanilla planifolia* sería del 2.3% en bosque mesófilo de montaña y 5.7% en selva alta perennifolia.

Especies prioritarias dentro de las zonas potenciales de distribución de vainilla en el estado de Oaxaca. La zona potencial de *V. planifolia* ubicada al noreste del estado de Oaxaca (Zona I) que contiene 58 de las ADV converge con la distribución de ocho especies catalogadas en peligro de extinción (Cuadro 3), cuatro mamíferos *Cyclopes didactylus* (oso hormiguero dorado), *Leopardus pardalis* (ocelote), *Leopardus wiedii* (tigrillo), *Leopardus wiedii* (tigrillo), *Tapirus bairdii* (tapir Centroamericano) y cuatro aves *Ara macao* (guacamaya roja), *Ara militaris* (guacamaya verde), *Colinus virginianus* (codorniz), *Harpia harpyja* (águila arpia). Así mismo en esta zona se encuentra la distribución de 17 especies catalogadas como amenazadas, de las cuales 10 son mamíferos; *Coendou mexicanus* (puerco espín tropical), *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi), *Leptonycteris curasoae* (murciélago hocicudo de curazao), *Lonchorhina aurita* (murciélago espada de tomas), *Megadontomys cryophilus* (ratón de Ixtlán), *Microtus oaxacensis* (meteorito de Tarabundi), *Reithrodontomys microdon* (ratón cosechero dientes pequeños), *Sorex veraepacis mutabilis* (Musaraña de Verapaz), *Lophostoma brasiliense* (murciélago oreja redonda brasileño), *Trachops cirrhosus* (murciélago labio verrugoso). Y siete plantas *Acosmium panamense* (chichipate), *Chamaedorea elatior* (junco de bejuco), *Chamaedorea liebmannii* (palma camedor), *Chamaedorea pinnatifrons* (cola de pescado), *Chamaedorea sartorii* (tepejilote chapanillo), *Dioon rzedowskii* (tush-kju), *Oncidium incurvum* (oncidium violeta).

En la zona I se localiza la distribución de siete mamíferos sujetos a protección especial; *Bassariscus sumichrasti* (cacomixtle tropical), *Cryptotis magna* (musaraña orejillas mayor), *Enchisthenes hartii* (murciélago frutero menor), *Microtus umbrosus* (meteorito de Zempoaltepec), *Potos flavus* (mico de noche), *Rhynchonycteris naso* (murciélago narigón), *Sorex veraecrucis* (musaraña de Saussure).

La zona II de distribución potencial de *V. planifolia*, que no contiene ninguna área destinada a la conservación, converge con la distribución de *Leopardus wiedii* (tigrillo), el cual esta catalogada en peligro de extinción (Cuadro 3), Así mismo en esta zona se encuentra la distribución de siete mamíferos catalogadas como especies amenazadas; *Acosmium panamense* (chichipate), *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi), *Leptonycteris curasoae* (murciélago hocicudo de curazao), *Megadontomys cryophilus* (ratón de Ixtlán), *Microtus oaxacensis* (meteorito de Tarabundi), *Reithrodontomys microdon* (ratón cosechero dientes pequeños), *Sorex veraepacis mutabilis* (Musaraña de Verapaz). También en esta zona se localiza la distribución de dos mamíferos sujetos a protección especial; *Cryptotis magna* (musaraña orejillas mayor), y *Sorex veraecrucis* (musaraña de Saussure).

La zona potencial de *V. planifolia* ubicada en la región del istmo de Tehuantepec (Zona III), que contiene 52 ADVC, converge con la distribución de ocho especies catalogadas en peligro de extinción (Cuadro 3), cinco mamíferos; *Chironectes minimus* (tlacuache de agua), *Cyclopes didactylus* (oso hormiguero dorado), *Leopardus pardalis* (ocelote), *Leopardus wiedii* (tigrillo), *Tapirus bairdii* (tapir Centroamericano), y tres aves; *Ara macao* (guacamaya roja), *Colinus virginianus* (codorniz), *Harpia harpyja* (águila arpía). Así mismo en esta zona se encuentra la distribución de ocho especies catalogadas como amenazadas, siete mamíferos; *Caluromys derbianus* (tlacuache arborícola), *Coendou mexicanus* (puerco espín tropical), *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi), *Leptonycteris curasoae* (murciélago hocicudo de curazao), *Lonchorhina aurita* (murciélago espada de tomas), *Mimon cozumelae* (murciélago lanza de cozumel), *Trachops cirrhosus* (murciélago labio verrugoso), y la planta *Acosmium panamense* (chichipate). En esta zona se localiza la distribución de cuatro mamíferos sujetos a protección especial; *Bassariscus sumichrasti* (cacomixtle tropical), *Cryptotis magna* (musaraña orejillas mayor), *Potos flavus* (mico de noche), *Rhynchonycteris naso* (murciélago narigón).

La zona potencial de *V. planifolia* ubicada hacia la región del pacífico (Zona VI), que no posee ninguna área de preservación de carácter federal, estatal o destinada voluntariamente, converge con la distribución de cinco especies catalogadas en peligro de extinción (Cuadro 3), dos mamíferos; *Leopardus pardalis* (ocelote), *Leopardus wiedii* (tigrillo), y tres aves; *Ara macao* (guacamaya roja), *Ara militaris* (guacamaya verde) *Colinus virginianus* (codorniz). Así mismo

en esta zona se encuentra la distribución de cuatro especies catalogadas como amenazadas, dos mamíferos; *Coendou mexicanus* (puerco espín tropical), *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi) y dos plantas; *Acosmium panamense* (chichipate), *Cryosophila nana* (palo de escoba). También se localiza la distribución de cuatro especies sujetas a protección especial; tres mamíferos; *Bassariscus sumichrasti* (cacomixtle tropical), *Cryptotis peregrina* (musaraña orejillas mexicana), *Potos flavus* (mico de noche) y la planta *Stenocereus chacalapensis* (pitayo gigante).

La zona de distribución potencial de vainilla que converge con el mayor número de especies prioritarias es la zona I (Cuadro 3), la cual debería considerarse como la principal y prioritaria al momento de tomar decisiones en el establecimiento de áreas de conservación.

Cuadro 3. Número de especies prioritarias enlistadas en las categorías de riesgo de la Norma Oficial Ecológica Mexicana.

Categoría de la especie	Número de especies por zona potencial			
	Zona I	Zona II	Zona III	Zona IV
Mamíferos en peligro de extinción	4	1	5	2
Aves en peligro de Extinción	4	0	3	3
Plantas en peligro de extinción	0	0	0	0
Mamíferos en condición amenazada	10	7	7	2
Aves en condición amenazada	0	0	0	0
Plantas en condición de amenaza	7	0	1	2
Mamíferos sujetos a protección especial	7	2	4	3
Aves sujetos a protección especial	0	0	0	0
plantas sujetos a protección especial	0	0	0	1
Número total de especies prioritarias	32	10	20	13

5.4 Discusión

La variación infraespecífica de *V. planifolia* se encuentra determinada por dos genotipos. El genotipo G1, expresa dos formas del labelo Grupo TehI, Grupo TehII (Figura 2), los cuales presentan como característica un mayor tamaño en la región media del labelo con respecto al lóbulo apical. Así mismo, el genotipo G1 expresa dos aromas Oaxaca CL (Figura 3), el primero (Oaxaca CLC) presenta una interacción de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina ($\sum\text{CM/vainillina}$) de 8 a 11%. Y el aroma Oaxaca U que posee una interacción de $\sum\text{CM/vainillina}$ de 13%. Ambos morfotipos de labelo y aromas se expresan en el

ambiente con condiciones del templado húmedo, donde el régimen de humedad del suelo es údico tipo I de 330 a 365 días de humedad. Es influenciado por la planicie costera del Golfo, lo cual propicia características de trópico húmedo, con una precipitación que oscila entre rangos de 2 500 a 4 000 mm anuales.

El genotipo G2, expresa dos formas del labelo Grupo Trp, Grupo Tehp (Figura 2) y dos aromas Oaxaca CA y Oaxaca PH (Figura 3) cada una de ellas en condiciones ambientales diferentes de tal manera que el morfotipo del grupo Trp y aroma Oaxaca CA, se localizan en un complejo aislado al este del Estado de Oaxaca donde las características del ambiente son del trópico húmedo, donde el régimen de humedad del suelo es údico tipo II (270 a 330 días de humedad) y precipitaciones de 1 500 a 2 000 mm. Por su parte la expresión del morfotipo del grupo Tehp y aroma Oaxaca PH se distribuye en la zona ecológica templada húmeda influenciada por las costas del pacífico, donde el régimen de humedad del suelo es de 180 a 270 días y la precipitación anual es de 1 500 a 2 000 mm.

Por lo cual la variación fenotípica del labelo y del aroma en relación al genotipo se infiere como la adaptación en estado silvestre al entorno biótico y abiótico (Parra-Cuadro y Vargas, 2007; Cosacov et al., 2013), este tipo de adaptaciones al ambiente reflejadas en caracteres florales se han observado en *Campanula rapunculoides*, *Calceolaria uniflora*, *Bletia purpurea* (Vogler et al., 1999; Mascó et al., 2004, Palestina y Sosa, 2002).

Por su parte el aroma de vainilla en estado silvestre se deduce como plasticidad fenotípica en términos de compuestos aromáticos, fenómeno observado en diferentes especies de reproducción clonal como mango, orégano y Kava (Majetic et al., 2009; Kulkarni et al., 2012). Dado que las plantas en condiciones naturales expresan variación en la composición del aroma para atraer a los diseminadores de semillas y de esta manera garantizar el éxito reproductivo y evolutivo (Corlett, 2011; Mardon et al., 2010).

Por lo anterior, se plantea que la variación infraespecífica de *V. planifolia* en estado silvestre es determinada por la expresión de la variación genética (Figura 4) en combinación con factores ambientales (Figura 2, Figura 3) (Majetic et al., 2009). Lo cual plantearía que la estrategia de

conservación para *V. planifolia* silvestre en el estado de Oaxaca podría optar por conservación *in situ* dado que esta se enfoca a preservar el hábitat y con ello las especies que contiene (Cuadro 3), así como su dinámica poblacional y los procesos adaptativos, de la especie objetivo (Iriondo-Alegría, 2001).

Sin embargo el establecer áreas de conservación *in situ* representa un alto costo económico y social, por lo cual una estrategia mas practica, es utilizar áreas naturales protegidas (ANP) existentes, como zonas de conservación para vainilla. Aunque se debe considerar que las 13 ANP federales y seis estatales dentro de la zona estudio ninguna cuenta con la representatividad ecológica del ecosistema bosque mesófilo de montaña y selva alta perennifolia, así como con las condiciones bioclimáticas idóneas para el establecimiento de una área de conservación para *V. planifolia* silvestre. Lo cual sugiere que la superficie nacional protegida actualmente en ANP es en gran parte resultado de criterios no relacionados con la protección de la biodiversidad (Margules y Pressey, 2000), dando lugar a ANP mal ubicadas, no funcionales y sin representación adecuada de los componentes de la biodiversidad (Cantú et al., 2004; Figueroa y Sánchez-Cordero, 2008).

Sí se consideran las características bioclimáticas adecuadas para la distribución de *V. planifolia*, y los tipos de vegetación bosque mesófilo de montaña y selva alta perennifolia, se ubicaron 110 áreas destinadas voluntariamente a la conservación (ADVC) las cuales podrían ser consideradas como óptimas para su conservación *in situ* en el estado de Oaxaca, México. Sin embargo, la representatividad del ecosistema para *V. planifolia* sería del 2.3% en bosque mesófilo de montaña y 5.7% en selva alta perennifolia. Estos porcentajes se encuentran por debajo del porcentaje que se considera en lineamientos internacionales, dado que en el IV Congreso Mundial de Parques se estableció como objetivo que las áreas naturales protegidas cubrieran de 10% a 12% de cada bioma para el año 2000 (McNeeley, 1993; Brooks et al., 2004; Naughton-Treves et al., 2005).

Por lo anterior, el porcentaje de representatividad ecológica de las áreas donde se podrían considerar zonas de conservación para los ecosistemas donde se desarrolla vainilla no poseen un nivel adecuado (Soulé y Sanjayan, 1998), por lo cual probablemente no sea ecológicamente viable para la conservación de la biodiversidad y los servicios de los ecosistemas.

Dada la baja representatividad de los ecosistemas de bosque mesófilo montaña y selva alta perennifolia en las áreas destinadas voluntariamente a la conservación (ADVC), se esperaría que mediante una gestión adecuada y bajo la premisa que el Plan Estratégico para la Diversidad Biológica, el cual establece que para el año 2020 la cobertura mundial de áreas protegidas deberá cubrir al menos 17%, se promueva la creación y ampliación de áreas protegidas, las cuales deberán incluir procesos de planeación sistemática de la conservación, basados en herramientas metodológicas que contribuyan a lograr la representatividad y conectividad ecológica, para obtener sistemas de ANP eficaces en la conservación de la biodiversidad y los servicios de los ecosistemas (CBD, 2012).

5.5 Conclusiones

La variación infraespecífica de las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en Oaxaca, está determinada por dos genotipos:

El genotipo G1, el cual expresa dos formas del labelo en condiciones del clima templado húmedo y dos aromas con concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina de 8 a 11 % y una del 13 %.

El genotipo G2, expresa dos formas del labelo, una que corresponde al clima templado húmedo del pacífico donde la expresión del aroma responde a la concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina del 9% y la expresión del labelo que corresponde al clima trópico húmedo donde el aroma tiene una concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina del 12%.

Dadas las dificultades de aplicar modelos *in situ*, por la amplia extensión de hábitat de la orquídea y porque en las áreas naturales protegidas existentes no cuentan con la representatividad ecológica adecuada, la estrategia para la conservación de vainilla requiere de un diseño específico en la creación de nuevas áreas naturales protegidas (ANP) y el fortalecimiento de las áreas destinadas voluntariamente a la conservación (ADVC), para cual se sugiere identificar medidas factibles, en escenarios reales que considere el contexto geográfico, biológico y ambiental, sino también que incluya los aspectos económicos y sociales para que se garantice la protección y preservación a largo plazo, de una parte vital del acervo genético primario de *V. planifolia* G. Jack., en el Estado de Oaxaca, México.

5.6 Literatura citada

- Bettazzi, F., Palchetti, I., Sisalli, S., & Mascini, M. (2006). A disposable electrochemical sensor for vanillin detection. *Analytica Chimica Acta*, 555(1), 134-138.
- 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(4), 420-425.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.F., & Besse, P. (2007). Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(4), 551-571.
- Brooks, T. M., M. I. Bakarr, T. Boucher, G. A. B. D. Fonseca, C. Hilton-Taylor, J. M. Hoekstra, T. Moritz, S. Olivieri, J. Parrish, R. I. Pressey, A. S. L. Rodrigues, W. Sechrest, A. Stattersfield, W. Strahm, & S. N. Stuart. (2004). Coverage provided by the Global Protected-Area System: is it enough?. *Bioscience*, 54(12), 1081-1091.
- Cantú, C., Gerald, W. R., Michael, S. J., & Strand, E. (2003). Conservation assessment of current and proposed nature reserves of Tamaulipas State, México. *Natural Areas Journal*, 23(3), 220-228.
- Catling, P.M. (1990). *Malaxis salazarii*, a new species from Mexico and northern Mesoamerica. *Orquidea* 12, 93-104.
- CBD. 2012. Convention on Biological Diversity. Aichi Biodiversity Targets. <http://www.cbd.int/sp/targets/>. Consulta marzo 2013.
- Challenger, A. & Caballero, J. (1998). Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: pasado, presente y futuro. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y

- Uso de la Biodiversidad. Instituto de Biología de la UNAM y agrupación Sierra Madre SC, México. 846 p
- Cibrián-Jaramillo, A. (1999). Variación Genética de *Vanilla planifolia* en México. Tesis, Facultad de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, D.F., México. 56 p.
- CONABIO. (2014). Localidades rurales y urbanas 1, 2010, escala: 1:1. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Datos estadísticos del 2010, del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). México, D.F.
- Corlett, R. T. (2011). How to be a frugivore (in a changing world). *Acta Oecologica*, 37(6), 674-681.
- Cosacov, A., Cocucci, A. A., & Sérsic, A. N. 2013. Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting *Calceolaria polyrhiza*: do pollinators matter?. *Annals of Botany* 113, 251-266.
- Dudley, N. 2008. Guidelines for applying protected area management categories. IUCN. Gland, Switzerland. 96 p.
- Ecott, T. (2004). *Vanilla: Travels in search of the ice cream orchid*. Grove Press, New York. 352 p.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1995). International Technical Conference on Plant Genetic Resources. Report of the Sub-Regional: Preparatory Meeting for Central America, Mexico and the Caribbean. San José, Costa Rica. 21-24 pp.
- Figuroa, F., & Sánchez-Cordero, V. (2008). Effectiveness of natural protected areas to prevent land use and land cover change in Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 17(13), 3223-3240.
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras, C., & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 37-44.
- INEGI, (2010). Localidades de la República Mexicana, 2010, escala: 1:1. Obtenido de Principales resultados por localidad (ITER). Censo de Población y Vivienda 2010. Editado por Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D. F.

- INEGI, (2013). Especies vegetales, Conjunto de Datos Vectoriales de uso del suelo y vegetación escala 1:250,000, serie V (Conjunto Nacional), escala: 1:250000. Edición: 1. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Aguascalientes, Aguascalientes.
- Iriondo-Alegría, J.M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales* 16(1), 5-24.
- Kati, V., Devillers, P., Dufrière, M., Legakis, A., Vokou, D., & Lebrun, P. (2004). Hotspots, complementarity or representativeness? Designing optimal small-scale reserves for biodiversity conservation. *Biological Conservation* 120(4), 471-480.
- Kristensen P. J., Rader C. J., & Sweeting, A. (2001). The strategic management approach: Practical planning for development managers. Conservation International, Washington, D.C. 162 p.
- Kulkarni, R. S., Chidley, H. G., Pujari, K. H., Giri, A. P., and Gupta, V. S. (2012). Geographic variation in the flavour volatiles of Alphonso mango. *Food Chemistry*, 130(1), 58-66.
- Majetic, C. J., Raguso, R. A., and Ashman, T. L. (2009). Sources of floral scent variation: can environment define floral scent phenotype?. *Plant Signaling & Behavior*, 4(2), 129-131.
- March, I. J., Carvajal, M.A., Vidal, R.M., San Román, J. E., Ruiz, G. (2009). Planificación y desarrollo de estrategias para la conservación de la biodiversidad, en *Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México. 545-573 pp.
- Mardon, J., Saunders, S. M., Anderson, M. J., Couchoux, C., & Bonadonna, F. (2010). Species, Gender, and Identity: Cracking Petrels' Sociochemical Code. *Chemical Senses*, 35, 309-321.
- Margules, C. R., & Pressey, R. L. 2000. Systematic conservation planning. *Nature*, 405(6783), 243-253.
- 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(1-2), 77-91.
- McNeely, J. A., Harrison, J., Dingwall, P. R., & Dingwall, P. (1994). Introduction: protected areas in the modern world. *Protecting nature: regional reviews of protected areas*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 1-28 pp.

- Minoo, D., Jayakumar, 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 RAP D polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3), 459-470.
- Naughton-Treves, L., Holland, M. B., & Brandon, K. (2005). The role of protected areas in conserving biodiversity and sustaining local livelihoods. *Annual Reviews Environment and Resources*, 30, 219-252.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. <http://www.ine.gob.mx/ueajei/norma59a.html>.
- Palestina, R. A., & Sosa, V. (2002). Morphological variation in populations of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) and description of the new species *B. riparia*. *Brittonia*, 54(2), 99-111.
- Parra-Tabla, V., & Vargas, C. F. (2007). Flowering synchrony and floral display size affect pollination success in a deceit-pollinated tropical orchid. *Acta Oecologica*, 32(1), 26-35.
- Price, M. (2008). Mastering ArcGIS. *PHOTOGRAMMETRIC ENGINEERING & REMOTE SENSING*, 153p.
- Robbirt, K. M., Davy, A. J., Hutchings, M. J., & Roberts, D. L. (2011). Validation of biological collections as a source of phenological data for use in climate change studies: a case study with the orchid *Ophrys sphegodes*. *Journal of Ecology*, 99(1), 235-241.
- Sanchez, A. C., Osborne, P. E., & Haq, N. (2011). Climate change and the African baobab (*Adansonia digitata* L.): the need for better conservation strategies. *African Journal of Ecology*, 49(2), 234-245.
- 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(5), 613-619.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, USA: WH Freeman and Co. 573 p.

- Soto-Arenas, M.A. & Dressler, R.L. (2010). A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla Plumier ex Miller* with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*, 9(3), 285-354.
- Soulé, M. E., & Sanjayan, M. A. (1998). ECOLOGY: Conservation Targets: Do They Help?. *Science*, 279(5359), 2060-2061.
- Verpoorte, R. (2011). Prólogo In: Odoux E and M Grisoni M (Eds.), *Vanilla (Medicinal and aromatic plants-industrial profiles)*. CRC Press. 420 p.
- Vogler, D. W., Peretz, S., & Stephenson, A. G. (1999). Floral plasticity in an iteroparous plant: the interactive effects of genotype, environment, and ontogeny in *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae). *American Journal of Botany*, 86(4), 482-494.
- Wan, J., Wang, C., Han, S., & Yu, J. (2014). Planning the priority protected areas of endangered orchid species in northeastern China. *Biodiversity and Conservation*, 23(6), 1395-1409.

CONCLUSIONES GENERALES

El hábitat de la *V. planifolia* silvestre en el estado de Oaxaca se distribuye en cuatro zonas potenciales:

La zona potencial I, se ubica al noreste del área de estudio con una extensión de 9 191 km². La calidad del hábitat para la especie es de alta a media. El régimen de humedad del suelo es údico tipo I de 330 a 365 días de humedad. Es influenciado por la planicie costera del Golfo, lo cual propicia características de trópico húmedo. Tiene un clima cálido húmedo (Am), con una precipitación que oscila entre rangos de 2 500 a 4 000 mm anuales, con lluvias en verano y porcentaje de precipitación invernal de 5 a 10 %. La vegetación es selva alta perennifolia fragmentada.

La zona potencial II, ubicada al sureste del distrito de Ixtlán, cuenta con un área de 1 050 km². La calidad del hábitat para la especie es de baja a media. El régimen de humedad de suelo es ústico (180 a 270 días de humedad), influenciado por la Sierra Norte de Oaxaca. Las características ecológicas corresponden al templado húmedo, clima tipo C(m), con precipitación de 2 000 a 2 500 mm anuales. La vegetación dominante pertenece a los géneros *Liquidambar*, *Podocarpus* y *Quecus* y la altitud es por encima de los 880 m.

La zona potencial III, ubicada al oriente del estado de Oaxaca, en el municipio de Santa María Chimalapa. Cuenta con un área de 1 084 km². La calidad del hábitat para la especies es de baja a media. El régimen de humedad del suelo es údico tipo II (270 a 330 días de humedad), con características de trópico húmedo, clima tipo (Am) y precipitaciones de 1 500 a 2 000 mm. La vegetación predominante es bosque tropical perennifolio a una altitud de 350 m.

La zona potencial IV, ubicada dentro del distrito de Pochutla y cuenta con un área de 261 km². La calidad del hábitat para la especie es media. El régimen de humedad de suelo es ústico (180 a 270 días de humedad), influenciado por la costa del Pacífico. Las características ecológicas correspondieron al templado húmedo, con un clima cálido subhúmedo (Aw1) y precipitación de 1 500 a 2 000 mm. La vegetación dominante es selva alta perennifolia, a una altitud de 920 m.

El estudio de las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en Oaxaca, México mostró que la mayor cantidad de variabilidad genética fue encontrada entre individuos (55 %) que las conforman, mientras que entre poblaciones la variabilidad genética cuantificada fue de 45 %.

La variación infraespecífica de las poblaciones silvestres de *V. planifolia* en Oaxaca está determinada por dos genotipos (G1 y G2). El genotipo G1 expresa dos formas del labelo en condiciones del clima templado húmedo y dos aromas con concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina de 8 a 11 % y una del 13 %. El genotipo G2 expresa dos formas del labelo, una que corresponde al clima templado húmedo del pacífico donde la expresión del aroma responde a las concentraciones de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina del 9% y la expresión del labelo que corresponde al clima trópico húmedo donde el aroma tiene una concentración de la sumatoria de compuestos menores sobre el contenido de vainillina del 12%.

Dada la variación infraespecífica de *V. planifolia*, se sugiere la aplicación de modelos *in situ* para su conservación. Sin embargo, por la amplia extensión de hábitat de la orquídea y porque en las áreas naturales protegidas existentes no cuentan con la representatividad ecológica adecuada, la estrategia para la conservación de vainilla requiere de un diseño específico que permita identificar medidas factibles, en escenarios reales, no solo que considere el contexto geográfico, biológico y ambiental, sino también que incluya los aspectos económicos y sociales, para que se garantice la protección y preservación a largo plazo de una parte vital del acervo genético primario de *V. planifolia* G. Jack., en el estado de Oaxaca, México.