Informe final* del Proyecto J101 Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México

Responsable: M en C. Miguel Ángel Soto Arenas

Institución: Instituto Chinoin AC

Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología AC

Dirección: Lago Tangañica # 18, Granada, México, DF, 11520, México

Correo electrónico: msoto@miranda.ecologia.unam.mx

Teléfono/Fax: 262 3102, 294 2862, 262 3101, 294 2863, 622 9013 Fax: 531 4349

Fecha de inicio: Diciembre 13, 1996 Marzo 31, 1999 Fecha de término:

Principales

Informe final, Hoja de cálculo resultados:

informe final y otros resultados:

Forma de citar** el Soto Arenas, M.A.,1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoin AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J101. México D. F.

Forma de citar hoja Soto Arenas, M.A.,1999. Filogeografía y recursos genéticos de las

vainillas de México. Instituto Chinoin AC. Hoja de cálculo SNIBde cálculo

CONABIO proyecto No. J101. México D. F.

Resumen:

Se presentan las relaciones filogenéticas de las especies mexicanas de Vanilla, con base en caracteres moleculares de la región ITS de los genes ribosomales. Las 10 especies de vainillas mexicanas pertenecen a linajes distintos del género, aunque 8 forman parte del clado que incluye a las especies económicamente más importantes (V. planifolia y V. pompona) y representan una parte importante de los recursos genéticos secundarios de este cultivo. Se hicieron evaluaciones de la variación de los ITS y se determinó que su secuencia es específica para cada taxón y que constituye una herramienta útil para el reconocimiento de material estéril dentro de este grupo. Los recursos genéticos primarios de vainilla están conformados por los cultivares y especimenes silvestres de V. planifolia. Se obtuvieron secuencias nucleotídicas de regiones genómicas supuestamente hipervariables con objeto de colectar datos que permitieran establecer una genealogía en esta especie y contestar preguntas acerca del origen, diseminación y procesos de domesticación en este cultivo. Las secuencias obtenidas (parciales de los genes Adh, CaM y GapC4), muestran nula o poca variación, aunque en uno de los casos ésta es informativa v aparentemente permite reconocer clones y sitios de origen de los especimenes. Sin embargo, la variación hasta ahora detectada es insuficiente para realizar un análisis que brinde mayor información sobre la historia de V. planifolia. Se presentan los resultados de un estudio sobre la variación y estructura genética, de las plantaciones e individuos silvestres conocidos de V. planifolia, para lo cual se utilizaron datos de 15 loci electroforéticos polimórficos. Todas las localidades presentan valores bajos en niveles de heterocigosis (Ho=0.000 a 0.078). Distintos análisis: Fst, análisis fenéticos y de parsimonia, indican una estructura de muy definida a poco definida, pero existe. La variación está repartida principalmente en dos áreas distintas, el norte de Oaxaca y el norte de Veracruz, aunque individuos aislados de localidades de Tabasco, este de Oaxaca y Chiapas pueden ser muy diferentes electroforéticamente. Los índices de fijación (F) son positivos, muy altos y cercanos a 1, y difieren significativamente del esperado para un entrecruzamiento al azar. Los datos sugieren que ha existido endogamia. Se presentan valores de flujo génico y de tasas de entrecruzamiento; el flujo génico es bajo y el sistema de reproducción dominante es la autofertilización. Los valores de diversidad genotípica no refleian la existencia de una extensa propagación clonal y sugieren que las técnicas de electroforesis están sobrestimando el número de genotipos existente. Por último se señalan algunas observaciones sobre el manejo de los recursos genéticos de las vainillas cultivadas, indicándose rasgos

deseables de otras especies mexicanas silvestres susceptibles de ser incorporados a este cultivo. La conservación de los recursos genéticos de Vanilla planifolia requiere principalmente de un plan de manejo ex situ, debido a las condiciones críticas de conservación de esta especie en estado silvestre. Se recomienda la creación de un banco de germoplasma y el mejoramiento de las condiciones en las plantaciones, especialmente en Oaxaca, como una estrategia para el mantenimiento de la diversidad genotípica en las plantaciones.

* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx

^{**} El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

PROYECTO JI01. FILGGEOGRAFIA Y RECURSOS GENÉTICOS DE LAS VAINILLAS DE MÉXICO

REPORTE FINAL

Responsable del proyecto: Miguel

Ángel Soto Arenas

Sección de variación electroforética realizada con la colaboración de Angélica Cibrián Jaramillo

RESUMEN DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS

Se hizo una propuesta de las relaciones filogenéticas de las especies mexicanas del género Vanilla. Estas relaciones se establecieron a partir de datos de secuencias nucleotídicas del espaciador interno (ITS) de los genes nucleares ribosomales. Se evaluó la variación de las secuencias de ITIS, concluyéndose que éste es específico para cada taxón reconocido, y que la pequeña variación dentro de una especie, no es informativa en términos genealógicos. Sin embargo, la variación entre las especies fue abundante y suficiente para establecer una hipótesis filogenética sólida, mediante análisis de parsimonia.

Adicionalmente se colectaron datos de regiones nucleotídicas hipervariables, principalmente intrones o zonas ricas en intrones de genes codificadores de enzimas y proteínas importantes en el metabolismo basa] de las plantas, e.g. la calmodulina, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa, con el objetivo de detectar variación intraespecífica en Varilla plan folia, que permitiera establecer una hipótesis de las relaciones genealógicas en esta importante especie. Las variación nucleotídica encontrada fue nula en la ADH, muy pequeña en CaM y pequeña en G3PDH. Estas secuencias se analizaron por métodos de parsimonia. Sin embargo, los análisis de la estructura del gen putativamente homólogo, codificador de la G3PDH en maíz y la variación observada en V. planifolia sugieren que otras secciones de este mismo gen pueden ser estudiadas, con buenas posibilidades de encontrar variación abundante para establecer relaciones genealógicas. Por el momento el gen GAPC4 (el codificador de esta G3PDH) parece ser un marcador molecular adecuado para el reconocimiento de cultivares y especímenes de distintas regiones geográficas. Paralelamente se colectaron datos de variación electroforética para realizar la descripción de la variación y la estructura genética de Vanilla planifolia. Se incluyen descripciones formales de esta variación y estructura mediante análisis usuales de genética de poblaciones y se hace una evaluación de las bondades del método en este sistema.

Los niveles de variación genética son bajos a medios, la endogamia parece ser un factor importante en esta especie y existe diferenciación genética entre las regiones donde habita.

RESUMEN DE RESULTADOS

Se presentan las relaciones filogenéticas de las especies mexicanas de Varilla, con base en caracteres moleculares de la región ITS de los genes ribosomales. Las 10 especies de vainillas mexicanas pertenecen a linajes distintos del género, aunque 8 forman parte del ciado que incluye a las especies económicamente más importantes (*V. planifolia y V. pompona*) y representan una parte importante de los recursos genéticos secundarios de este cultivo. Se hicieron evaluaciones de la variación de los ITS y se determinó que su secuencia es específica para cada tazón y que constituye una herramienta útil para el reconocimiento de material estéril dentro de este grupo.

Los recursos genéticos primarios de vainilla están conformados por los cultivares y especímenes silvestres de *V. planifolia*. Se obtuvieron secuencias nucleotídicas de regiones genómicas supuestamente hipervariables con objeto de colectar datos que permitieran establecer una genealogía en esta especie y contestar preguntas acerca del origen, diseminación y procesos de domesticación en este cultivo. Las secuencias obtenidas (parciales de los genes Adh, CaM y GapC4), muestras nula o poca variación, aunque en uno de los casos ésta es informativa y aparentemente permite reconocer clones y sitios de origen de los especímenes. Sin embargo, la variación hasta ahora detectada es insuficiente para realizar un anuláis que brinde mayor información sobre la historia de *V. planifolia*.

Se presentan los resultados de un estudio sobre la variación y estructura genética, de las plantaciones e individuos silvestres conocidos de *V. planifolia*, para lo cual se utilizaron datos de 15 loci electroforéticos polimórficos. Todas las localidades presentan valores bajos en niveles de heterocigosis (Ho = 0.000 a 0.078). Distintos análisis, FST, análisis fenéticos y de parsimonia, indican una estructuración de muy definida a poco definida, pero existente. La variación está repartida principalmente en dos áreas distintas, el norte de Oaxaca y el norte de Veracruz, aunque individuos aislados de localidades de Tabasco, este de Oaxaca y Chiapas pueden ser muy diferentes electroforéticamente. Los índices de fijación (F) son positivos, muy altos y cercanos a 1, y difieren significativamente del esperado para un entrecruzamiento al azar. Los datos sugieren que ha existido endogamia. Se presentan valores de flujo génico y de tasas de entrecruzamiento; el flujo génico es bajo y el sistema de reproducción dominante es la autofertilización. Los valores de diversidad genotípica no reflejan la existencia de una extensa propagación clonal y sugieren que las técnicas de electroforesis están sobrestimando el número de genotipos existente.

Por último se señalan algunas observaciones sobre el manejo de los recursos genéticos de las vainillas cultivadas, indicándose rasgos deseables de otras especies mexicanas silvestres susceptibles de ser incorporados a este cultivo. La conservación de los recursos genéticos de *Varilla planifolia* requiere principalmente de un plan de manejo

ex situ, debido a las condiciones críticas de conservación de esta especie en estado silvestre. Se recomienda la creación de un banco de germoplasma y el mejoramiento de las condiciones en las plantaciones, especialmente en Oaxaca, como una estrategia para el mantenimiento de la diversidad genotípica en las plantaciones.

PROYECTO JI01. FILOGEOGRAFIA Y RECURSOS GENÉTICOS DÉ LAS VAINILLAS DÉ MÉXICO

REPORTE FINAL

<u>OBJETIVO 1</u>. Proponer una hipótesis sobre las relaciones filogenéticas de las especies mexicanas del género *Vanilla Plum. ex* Mill., con base en secuencias del espaciador interno transcrito (ITS) de ADN ribosomal.

OBJETIVO 2. Hacer evaluaciones de la variación intraespecífica de esta región del espaciador interno transcrito.

El género Vanilla Plum. ex Mill. incluye la única especie de orquídea de importancia económica, aparte de las especies ornamentales. Los frutos de V. *planifolia* G. Jackson producen la vainilla comercial una vez que las cápsulas carnosas se deshidratan y fermentan (Smith et al. 1992). Otras especies americanas también producen frutos fragantes, pero raramente se utilizan como fuente de aromatizantes.

Las más de 110 especies de *Vanilla* están ampliamente distribuidas en las zonas bajas de los trópicos del Viejo y el Nuevo Mundo, pero solamente dos especies aparte de *V. planifolia*, se cultivan en menor escala: *V. pompona* Schiede y V. *tahitiensis J.W.* Moore. Vanilla *pompona* es nativa de México, Nicaragua y Costa Rica, y se encuentra naturalizada en las Antillas. Otras especies afines, frecuentemente consideradas coespecíficas (V. *pseudopompona* Soto Arenas y *V. grand flora* Lindl.) son nativas de Panamá y Sudamérica, respectivamente. Estudios en curso parecen apoyar la idea de que *Vanilla tahitiensis* es un híbrido espontáneo entre *V. odorata Presl y V. planifolia* (Soto, Pignal y Alvarez-Buylla, datos no publicados). Las vainillas fueron llevadas a Tahití desde Filipinas (Rain, 1986), a donde los españoles llevaron este cultivo durante el periodo colonial.

En México se colectan frutos de V. *pompona* para usos locales en diversas regiones, principalmente en Nayarit y Oaxaca. *Vanilla odorata* es colectada ocasionalmente en la Selva Lacandona principalmente para aromatizar ron. Las cápsulas de Vanilla odorata se han colectado también en Ecuador y Bolivia con fines similares (Ames, 1925). Los mayas conocen la vainilla, a la que nombran"sisbic", *pero se* desconoce si utilizan alguna de las especies silvestres de la Península de Yucatán (V. insignis Ames y *V. phaeantha* Rchb. f.), o si se trata de la V. planifolia cultivada. A pesar de que la distribución de *V. odorata se* extiende hasta Bolivia, es obvio que una parte importante de los recursos genéticos de las vainillas cultivadas se encuentra en México; además, la morfología de las flores sugiere que las especies más cercanas a las cultivadas son también silvestres en México.

Sistemática. La poza génica secundaria de las vainillas cultivadas está constituída por las especies cercanas. Las vainillas cultivadas pertenecen a la sección Lamellosae del género y potencialmente puede cruzarse con otras especies americanas de la misma subsección o con especies asiáticas. Sin embargo, la sistemática compleja de Vanilla es un obstáculo para la planeación del fitomejoramiento de este cultivo, por lo que el esclarecimiento de la taxonomía y el entendimiento de las relaciones filogenéticas de las especies, aunque sea a nivel regional, es importante.

Tradicionalmente *Vanilla* ha sido considerado como un grupo taxonómicamente difícil debido a distintas razones. Existe muy poco material preservado en los herbarios porque se trata de especies hemiepífitas que florecen generalmente en el dosel de la selva, tienen muy bajas densidades poblacionales y florecen sincrónicamente. El poco material disponible es además difícil de estudiar debido a la mala preservación de las flores. Aunado a lo anterior debe mencionarse que los especímenes estériles son frecuentemente imposibles de identificar, pues el hábito hemiepífito conlleva una enorme variación en la morfología de tallos y hojas; por ejemplo, un mismo individuo puede presentar o no hojas en distintas partes de él expuestas a distintos ambientes lumínicos. Otro factor adicional que complica su estudio es que probablemente la mitad de las especies del género fueron descritas de material estéril.

Todos estos factores contribuyen a que no pueda determinarse con exactitud el número de especies válidas en el género. *Vanilla* ha sido revisado en dos distintas ocasiones (Rolfe, 1896; Portéres, 1954), pero ambas revisiones son incompletas, difíciles de utilizar y frecuentemente erróneas.

Un problema práctico al que se han enfrentado las personas interesadas en vainilla es la identificación de las especies y cultivares. Frecuentemente es imposible conseguir material fértil para realizar una determinación y la semejanza de las especies y la variación interna entre ellas no permite hacer identificaciones confiables con base en material vegetativo. Las dos mayores colecciones de vainilla, la de Union Camp, en Princeton, N.J. y la de los Jardínes Nacionales de Francia, están constituidas mayormente de especímenes no determinados que nunca han florecido.

En México se establecieron al final de la década de los 80's plantaciones de vainilla en la zonas chinanteca y mazateca de Oaxaca que incluían *V. cribbiana* Soto Arenas, V. *inodora* Schiede, V. *insignis, V. odorata, V. planifolia y V. pompona,* aunque la intención era cultivar solamente *V. planifolia. Vanilla cribbiana* no fue reconocida como distinta hasta hace un par de años y es vegetativamente indistinguible de V. *planifalia, a* pesar de no estar cercanamente relacionada a ella.

Ante esta problemática el uso de marcadores moleculares representa una alternativa para la correcta determinación de las especies, que aunque sofisticada y cara,

resulta infinitamente más barata que la inversión en el establecimiento de plantaciones con especies sin valor comercial.

Desde la perspectiva del fitomejorador Vanilla es un caso complejo. Un fitomejorador está interesado en los cultivares de la especie económicamente importante, en los individuos silvestres de esa especie, en las especies filogenéticamente próximas y por último en especies no tan cercanas (Smith et al., 1992). Todas ellas constituyen los recursos genéticos en los que pueden buscarse caracteres deseados para ser incorporados en el cultivo. Cuando la sistemática del grupo es compleja, pues no está claro el número de entidades, ni se ha determinado la monofilia del grupo, ni existen hipótesis filogenéticas sobre las relaciones de sus miembros, como es el caso de vainilla, es indispensable producir información sobre estos puntos antes de empezar el fitomejoramiento. El único intento de fitomejoramiento de vainilla que se ha realizado es el trabajo de Childers et al. (1959) en Puerto Rico, quienes intentaron tranferir genes de resistencia a V. planifolia hibridándola con vainillas silvestres de Puerto Rico, algunas de ellas tan distantemente relacionadas con V. planifolia (e.g. V. barbellata Rchb. f.), que la probabilidad de fertilización era extremadamente baja, y no existen registros en la literatura del destino de estas cruzas.

Varilla pertenece a un linaje basal en la familia de las orquídeas, tan primitivo que alguna vez fue considerado como una familia distinta por Lindley (1835). Datos recientes sugieren que el linaje vanilloide es el más basal entre las orquídeas con una antera (Dressler y Chase, 1995). Algo sorprendente es que a pesar del gran número de rasgos primitivos (e.g. hábito trepador, venación reticulada, polen en mónadas y semillas escleróticas), las flores de las vainillas tienen una estructura y mecanismos de polinización tan complejos como las orquídeas derivadas. El estudio de la evolución de la morfología floral en las vainillas puede ser ilustrativo para entender la evolución de las orquídeas con una antera.

Formalmente *Vanilla* pertenece a la subtribu Vanillinae de la tribu Vanilleae. No existe una evaluación crítica sobre la validez y monofilia de los géneros vanilloides. Garay (1989), separó de Vanilla al género monotípico *Dictyophyllaria*, así como al género *micotrófico Pseudovanilla*. *Sin* embargo, la circunscripción de Vanillinae y las subtribus relacionadas, Galeolinae y Lecanorchidinae es objeto de debate. Garay (1987) incluyó en Vanillinae a los géneros Palmorchis, *Neobarlettia, Dictyophyllaria, Vanilla, Cyrtosia y Rhizanthella*; mientras que Dressler (1993) consideró en Vanillinae a los géneros *Clematepistephium, Dictyophyllcaria, Epistephium, Eriaxis y Vanilla*. Este desacuerdo se origina por los diferentes pesos dados a caracteres particulares (e.g. semillas aladas, estructura del fruto, grado de fusión entre el labelo y la columna, y hábito de crecimiento). Los problemas sobre el establecimiento de las relaciones filogenéticas de estas orquídeas están siendo abordados

por Cameron y Chase (com. pers.) con la ayuda de marcadores moleculares, principalmente los genes rbcL y 185.

Rolfe (1896) dividió el género Vanilla en dos secciones, Aphyllae y Foliosae, mientras que Portéres (1954) reconoció 3 subsecciones dentro de Foliosae: Lamellosae. Papillosae y Membranacea, a saber (Los taza de Portéres no fueron apropiadamente tipificados y son nomenclaturalmente inválidos. La sección Foliosae y la subsección Membranacea deben ser la sección y subsección Vanilla, en cumplimiento con las normas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica; sin embargo en algunos casos se hará referencia a esta clasificación para facilitar la comunicación),

Debido a que la morfología floral de las vainillas mexicanas es en algunos casos muy similar entre ciertas *especies e incluso* desconocida para otras, desde un principio se planteó que para obtener una filogenia robusta deberían explorarse caracteres no morfológicos. Estos caracteres consisten de secuencias nucleotídicas de todo el espaciador interno transcrito (ITS) de los genes ribosomales, incluyendo la región codificadora 5.8S (véase Baldwin 1992, Hillis y Dixon, 1.991).

MATERIALES Y MÉTODOS

Taxa estudiados. El número de especies mexicanas reconocidas de Vanilla se ha incrementado recientemente. Williams (1941) reconoció 4, V. planifolia, V. inodora, V. pfaviana Rchb. f. (sinónimo de V. inodora) y V. pompona. Soto (1988) enlistó Vanilla mexicana (Sw.) Mill (la cual no es nativa de este país), V. odorata (basado en especímenes ahora referidos a V. insignis), V. pfaviana, V. planifolia y V. pompona.

Las especies de vainilla ahora reconocidas para México son Vanilla cribbiana Soto Arenas (roed.), V. hameri Soto Arenas (roed.), V. inodora, V. insignis, V. odorata, V. perplexa Soto Arenas, V. phaeantha, V. planifodia, V. pompona y una especie recién descubierta, muy similar a V. planifolia (Vanilla sp. M. Soto 8355, datos no publicados). Todas las especies fueron analizadas, tomándose 5 individuos de cada una, con las excepciones que a continuación se indican. Varilla hameri se conoce de México de un espécimen de herbario, estéril, de principios de siglo, y no ha vuelto a colectarse, el espécimen aquí analizado es hondureño. Vanilla phaeantha y Vanilla sp. MAS 8355 se conocen también de un espécimen en México. Varilla barbellata fue ilustrada por Anastasio Echeverría cerca de 1800 (Expedición de Sessé y Mociño), de una planta supuestamente mexicana, pero nunca ha sido localizada en México de nuevo, aunque existe en muchos sitios del Caribe. Una secuencia del ITS de V. barbellata fue proporcionada por el Dr. K. Cameron, obtenida de una planta de Puerto Rico. Paphiopedilum fairrieanum Pfitzer (de la subfamilia Cypripedioideae), y Palmorchis sp. (ubicada por Garay, 1987, en Vanillinae, o en la subtribu Palmorchideae por Dressler, 1993) fueron también analizados y definidos como grupos externos para enraizar los árboles, basados en argumentos discutidos

por Dressler y Chase (1995), y Dressler (1993); estos géneros no son miembros del ciado vainilloide, aunque cercanos a él. Evidencia molecular. Datos de secuencias nucleotídicas fueron colectados del espaciador interno transcrito, conocido por sus siglas en inglés, ITS, de la región de los genes 1826S de los genes nucleares del DNA ribosomal. Esta región es reconocida como útil para la reconstrucción filogenética, comparada con otros genes nucleares, por el alto número de copias que posee (Rogers y Bendich, 1987) y la rápida evolución concertada debida a un entrecruzamiento desigual (unequal crossingover) y a la conversión génica (Amheim, 1983; Wendel et al. 1995). A consecuencia de estos factores, la región ITS es generalmente homogénea, o casi, dentro de un genoma, y una sola secuencia de ITS puede caracterizar a un individuo. Adicionalmente, su evolución concertada y la recombinación sexual tienden a promover la uniformidad de la región ITS dentro de poblaciones en donde hay entrecruzamiento (Soltis y Kuzoff, 1993). El ITS tiene distintas tasas de evolución dentro y entre las distintas subunidades y espaciadores que lo componen (Jorgansen y Cluster, 1988). El ITS tiene tasas de substitución nucleotídica relativamente altas en los espaciadores transcritos, lo cual permite construir filogenias de taxa que han divergido relativamente recientemente. Análisis filogenéticos de secuencias de la región ITS de otras orquídeas (e.g. Lycaste, A. Ryan, com. pers.; Prostechea y Encyclia, W. Higgins et al., com. pers.) y otras plantas (Baldwin, 1992; Baldwin et al., 1991, 1993, 1995; Suh et al., 1993) generalmente producen resultados altamente corcondantes con filogenias de esas mismos taxa, basados en sitios de restricción de DNA de cloroplasto o en rasgos morfológicos. Además, la región ITS generalmente puede ser amplificada rápidamente mediante PCR (reacción en cadena de la polimeraza) y posteriormente secuenciada con sondas universales situadas en las regiones cistriónicas conservadas de los genes 18S y 26S (Liston et al., 1996). Una posible limitante de los ITS en la sistemática de plantas con flores es que esta región genómica es relativamente pequeña, generalmente menor que 700 pares de bases. Debido a que la región codificadora 5.8 S (164 pb) presenta muy poca variación, sólo menos de 536 pb son potencialmente sitios informativos.

Las secuencias de ITS *que se presentan en el* Apéndice 1 fueron obtenidas mediante amplificaciones por PCR (Saiki *et al.*, 1988) de preparaciones totales de DNA. *Extración de DNA*. El DNA total fue aislado de tejido fresco (hojas) o deshidratado en silica gel, utilizando una modificación del *protocolo Murray y* Thompson (1980). En cada extracción se utilizó tejido de un sólo individuo. Un segmento de 3-4 cm' de una hoja joven fue molida en nitrógeno líquido en un micromortero hasta que el tejido fue pulverizado. Aproximadamente 1 g de tejido pulverizado fue mezclado en otro micromortero con 1 ml del buffer de extracción CTAB 2X (1 OOmM Tris-HC1 pH 8, 1.4 M NaCI, 20mM EDTA, CTAB 2%, 0.3% b-ME, PVP 40 2%), hasta obtener un

fluido homogéneo. Todo el producto se transfirió a un tubo Eppendorf etiquetado. Se centrifugó a 10Kpor 8-10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 600µl de buffer de extracción. Se incubó a 60C por 10 minutos. Se añadieron 600µl de cloroformo-octanol (24:1 v/v) y se mezcló vigorosamente. Centrifugado a 7k por 12-15 minutos hasta que el sobrenadante estuvo claro. La fase superior acuosa (600 m1) se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 400111 de isopropanol frío mezclándose varias veces por inversión; se almacenó a -20C toda la noche para incrementar la precipitación. Centrifugado a 9K por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó 2 veces llenando el tubo con etanol al 70%, para remover el cloroformo-octanol, centrifugando a 9K por 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100-20dµ1 de TE (10n-1M tris-HCI ph8, EDTA 1 mM). Las amplificaciones por PCR se realizaron en volúmenes de 100pl en buffer Tris 10 mM (pH 8.3) que contenía 50mM KCI, 1.5 mM MgCl2, 100µM dNTP (25µM de cada nucleótido), 50pM de cada oligonucleótido, aproximadamente 1 11g templado, 1.25 unidades de polimeraza (Replitherm), 1 % BSA, and 5% DMSG. Se utilizaron los oligonucleótidos 265-25R (5'-TAT GCT TAA ACT CAG CGG GT-3') e ITS5 (5' -GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G -3') que amplifican toda la región ITS. El perfil de amplificación con 35 ciclos fue: 1" a 94C (desnaturalización), 20" a 55C (reasociación, "annealing"), y 1'130" a 72C (polimerización), en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Los productos de PCR se purificaron con QlAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Las amplificaciones purificadas fueron reamplificadas por PCR (25 ciclos) y purificadas, ya sea con QlAquick Gel Extraction KIT or con High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim). Secuenciación. La secuenciación cíclica y la química de tinción terminal (dye-terminator chemistry) se utilizaron para obtener las secuencias y las muestras se analizaron en un secuenciador fluorescente ABI modelo 373A, con los mismos oligonucleótidos (ambos sentidos), en el Departmento de Botánica y Fitopatología de la Universidad del Estado de Oregon, Corvallis.

La edición de las secuencias complementarias de una misma muestra se realizó en los paquetes Gene Works (versión 2.0, IntelliGenetics, Inc. Mountain View, Cal., 1991) y SEQPUP (version 0.6, D.G. Gilbert, 1996).

La identidad de las secuencias se evaluó contrastando nuestras secuencias contra el GenBank por medio de BLAST.

La alineación de las secuencias se hizo utilizando los paquetes CLUSTAL W (Thompson et al. 1994), y se presenta en el Apéndice 2.

Análisis *filo genético*. Debido a que la calidad de la secuencias no fué homogenea para todas las muestras, se decidió utilizar sólo las secuencias nucleotídicas *con mejor* señal de secuenciación para cada *especie*, eliminando aquellas con un número excesivo de sitios no determinados (e.g. > 5%). Los sitios nucleotídicos alineados fueron vaciados

en una matriz de McClade (versión 3.04, W.P. Madison y **D.R.** Madison, 1992, Sinauer Associates Inc.). Los "gaps" se trataron como sitios faltantes. Los análisis filogenéticos se hicieron utilizando el programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 3.1, D.L. Swofford, The Illinois Natural History Survey). Se hicieron búsquedas heurísticas, siendo las opciones "stepwise addition" y "random addition sequence of taxa", con 50 réplicas, y ACCTRAN. Los valores de "bootstrap" fueron calculados para la matriz de datos moleculares en 100 réplicas; las opciones fueron "retener grupos compatibles con la regla de mayoría cle 50%, "stepwise addition" y "closest addition sequence of taxa".

RESULTADOS

El análisis filogenético de todas las *especies* resultó en 17 árboles igualmente parsimoniosos de 844 pasos, con un índice *de* consistencia (CI) = 0.762, índice de homoplasia (HI) = 0.238, CI excluyendo caracteres no informativos = 0.750, HI excluyendo caracteres no informativos = 0.250, índice de retención (RI) = 0.867 y CI rescalado (RC) = 0.661. El árbol de consenso *estricto* de estos 17 árboles igualmente parsimoniosos se muestra en la Fig. 1.

El análisis de "bootstrap" resultó en un árbol idéntico al árbol de consenso estricto de los 17 árboles más cortos (Fig. 2), por lo que pueden concluirse varios puntos a partir de ellos. Primeramente resulta importante resaltar que las secuencias de ITS de las Vanilla de México son específicas para cada especie. Tanto

Ramilla cribbiana, como V. pompona, V. insignis, V. odorata V. planifolia y V. inodora, esto es, las especies de las cuales se incluyeron varias secuencias, muestran valores de bootstrap no solamente altos, sino del 100 %. Esto permite disponer de una herramienta útil para la identificación de material, aún cuando no se disponga de estructuras reproductivas.

Segundo, nuestros *árboles* muestran que las especies de Vanilla analizadas son un grupo monofilético ya que los datos son compatibles con la definición de *Pahiopedilum y Palmnrchis* como grupos externos. Vanilla *inodora*, de la subsec. Membranacea es la especie más basal de todas, incluso más basa; que V. *barbellata*, *de* la secc. Aphyllae. Esto muestra que la clasificación generalmente aceptada del género, esto es que el grupo se divide en dos secciones Aphyllae y *Foliosae es* incompatible con la filogenia. Puede afirmarse que existen tres linajes que han divergido considerablemente entre las *especies mexicanas de Vanilla*.

El resto de las especies mexicanas de Varilla están relacionadas con V. *planifolia y V. pompona*, las especies más cultivadas y representan una fuente importante de caracteres en cualquier programa de mejoramiento de este cultivo. A diferencia de lo establecido en la literatura, V. *pompona y V.* planifolia no están estrechamente relacionadas.

Con respecto a nuestro segundo objetivo, se puede decir que la variación intraespecífica de los ITS, encontrada en las vainillas mexicanas no es informativa en términos genealógicos. Se considera que la variación es informativa si es congruente en dos o más especímenes. Aunque las secuencias colectadas dentro de una especie muestran algo de variación, esta variación es tan pequeña que no es posible establecer qué proporción refleja relaciones genealógicas o problemas técnicos de la secuenciación. Secuencias de especímenes de una misma especie que obtuvieron una buena señal de secuenciación son casi idénticas entre sí en toda la región ITS. Secuencias que tuvieron mala señal de secuenciación son más distintas y muestran gran número de sitios no determinados. Bajas señales de secuenciación se obtuvieron en especímenes que mostraron bajas concentraciones de amplificado.

En un intento por describir y evaluar esta variación, se analizaron las secuencias de distintos especímenes de *V. pompona*, la especie con mayor número de individuos secuenciados (son necesarios al menos 4). *Vanilla pompona está* conformada por dos conjuntos de poblaciones en México, uno de la vertiente del Golfo de México en Veracruz y el norte de Oaxaca, que se caracteriza por sus flores con segmentos extendidos de grandes dimensiones, y otras poblaciones de la costa Pacífica de México con flores semicerradas con segmentos de 213 de la longitud de las flores de las poblaciones de la vertiente del Golfo. Además, se incluyeron algunas secuencias de otros 2 taxa muy cercanamente relacionados y frecuentemente considerados por otros taxónomos sinónimos de V *pompona*, *V. pseudopompona* de *Panamá y V. grandiflora* de Sudamérica. Una forma escapada de este complejo se localiza en las Pequeñas Antillas y también se incluyó (las secuencias de estos especímenes de otros países serán depositadas próximamente en el GenBank).

La variación en las secuencias de ITS del complejo de V. *pompona* es de 38 sitios variables no informativos, 45 informativos y 597 constantes, de un total de 680 sitios alineados (véase la Tab. I).

El análisis filogenético de las secuencias de *V. pompona* y sus aliados encontró 15 árboles más cortos de 112 pasos con un Cl = 0.902, HI = 0.098, Cl excluyendo caracteres no informativos de 0.848, HI excluyendo caracteres no informativos = 0.151, RI = 0.885 y RC = 0.798. El árbol de consenso estricto se muestra en la Fig. 3 con los valores de bootstrap asociados a las ramas.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados son congruentes con datos morfológicos de las vainillas mexicanas. Vanilla *inodora* tiene una serie de rasgos ausentes en el resto de las especies, como inflorescencias no diferenciadas de los tallos vegetativos, columna fusionada al labelo sólo **en la** base, columna glabra en la superficie ventral, antera subapical, estigma cóncavo, labelo sin callo penicilado _v pétalos sin quilla dorsal

expuesta antes de la antesis. La divergencia morfológica es tan grande que se están analizando otras especies de la secc. Membranacea para evaluar la monofilia de *Vanilla*, que desafortunadamente en este momento no puede hacerse por la falta de material de otros países.

Vanilla barbellata, de la secc. Aphyllae aparece como basal al resto de las especies foliosas. Aunque V. barbellata no ha vuelto a colectarse en México desde hace dos siglos, es común en Cuba y Florida y eventualmente podría aparecer en las costas de la Península de Yucatán, tal como se encontró recientemente V. phaeantha. La secuencia nucleotídica de V. barbellata es más cercana a V. aphylla de Asia (K. Cameron com.pers.) y V. madagascariensis, que a ninguna otra, lo que sugiere que la secc. Aphyllae si puede ser monofilética a pesar de su distribución Pantropical. Todas las especies de la secc. Aphyllae se establecen en regiones costeras secas, especialmente en litorales rocosos calcáreos.

El resto de las vainillas hojosas de México forman un grupo monofilético bien definido. La especie más banal es *V. perpiexa*, que morfológicamente parece estar relacionada con V. *bicolor* Lindl y V. *hartii* Rol fe, la primera ampliamente distribuida en el Neotrópico y la segunda de Trinidad. Las otras vainillas hojosas de México se dividen en dos grandes grupos, que están bien definidos morfológicamente,

el de *V. pompona y* el de *V. planifolia. El* ciado de *V. pompona* incluye a V. *cribbiana, V. hameri y* a la ampliamente distribuida y variable *V. pompona*. Estan tres especies, así como numerosos taxa de Sudamérica muestran algunas características particulares, como frutos trígonos, las flores amarillas, muy grandes, con el labelo anaranjado, desprovisto de papilas, pero con un cojinete axial, y fragancias fuertes compuestas pricipalmente por limoneno. Sin embargo, V. *cribbiana* carece del labelo emarginado con un lóbulo apical prominente y el hábito fuertemente xerofítico de *V. pompona y V. hameri*.

El ciado que incluye a V. planifolia agrupa a especies con otra morfología bien definida, con frutos menos masivos y no marcadamente trígonos, llores verdosas, frecuentemente con papilas retrorsas sobre el ápice del labelo y márgenes erosos o denticulados. La especie más basal es V. insignis, aunque su posición basal no está sustentada por un valor alto de bootsrap. Vanilla odorata es el grupo hermano del ciado V. phaeantha-V. planifolia-Vanilla MAS 8355. La especie más cercana a V. planifolia es la nueva especie Vanilla sp., MAS 8355, y ambas están relacionadas de cerca con Vanilla phaeantha. Probablemente no existen en ningún otro lugar del mundo especies tan cercanas a V. planifolia como éstas. Un grupo de Amazonia, compuesto por V. appendiculata y 3 ó 4 aliados pudiera estar colocado de manera intermedia entre el grupo de V. insignis y el de V. planifolia. Vanilla sp. MAS 8355, es una especie extraordinariamente rara y conocida sólamente de uno o dos

especímenes y puede ser un elemento muy importante en programas de fitomejoramiento en estas orquídeas.

Todas las especies mexicanas de Vanilla de la seco. Foliosae, a excepción de V. inodora presentan frutos fragantes. No existen especies con frutos fragantes en Asia ni Africa, ni en ninguna especie de las subsec. Aphyllae o Membranacea, aunque algunas especies asiáticas foliosas tienen frutos comestibles (Teo, 1985). Los frutos fragantes de vainilla podrían ser una. adaptación a la dispersión por murciélagos. Observaciones que hemos llevado a cabo no han registrado ningún visitante diurno, aunque ha ocurrido alguna remoción durante la noche. Los frutos dispersados por murciélagos son generalmente verdes, colgantes o erectos y aromáticos (Vázquez-Yaes et al. 1975), todas estas características presentes en las cápsulas de Vanilla. El caracter frutos fragantes parece ser una plesiomorfía entre las especies mexicanas hojosas a partir de las más basal, V. perplexa. Esto sugiere que se podrían incorporar caracteres de otras muchas (casi 30) especies americanas sin que se perdiera el caracter de frutos fragantes en la decendencia. Los programas de hibridación de V. planifolia han contemplado a V. poiteai Rchb. f. (= V. eggersii Rolfe), V. barbellata, V. phaeantha v V. pompona. Aunque las dos primeras se utilizaron para transferir resistencia al ataque por Fusarium, no poseen frutos aromáticos. Por otra parte, la germinación exitosa dei grex V. planifolia-V. pompona, da; especies no cercanamente relacionadas, sugiere que no existen muchas barreras para crear híbridos viables en todo el ciad o que comprende a estas especies.

Entre las vainillas mexicanas se han caracterizado tres distintos sistemas de polinización (Soto, DaCosta y Alvarez-Buylla, en prep.). Uno de ellos involucra la polinización por abejas carpinteras (*Xylocopa*)y los *otros* dos a abejas Euglosini. Existen dos tipos de polinización por las abejas Euglossini entre las vainillas mexicanas, uno es el típico síndrome androeuglossofilo, en donde las *abejas macho* colectan fragancias de las flores. El otro es un sistema de polinización por engaño en donde las flores de vainilla no ofrecen ninguna recompensa y son visitadas tanto por machos como por hembras en busca de alimento.

Al sobreponer esta información en el árbol filogenético, *V. inodora,* la especie más basal es polinizada por abejas carpinteras (*Xylocopa*), el ciado de *V. pompona-V. hameri y V. cribbiana* es polinizado por abejas euglossine machos, y se sabe que *V. insignis, V. odorata y V.* planifolia tienen un sistema de polinización por engaño. Estos síndromes estan asociados a otras características más. Vanilla *pomponaV. hameri y V.* cribbiana producen grandes cantidades de limoneno y son polinizadas por abejas del género *Eulaema. Vanilla insignis-V.odorata-V planifolia son* polinizadas tanto por Euglossa como por *Eulaema y* producen pequeñas cantidades de 1-8 cineol. El sistema de polinización por engaño está asociado también a poblaciones hiperdispersas o fragmentadas. Ackerman (1986) sugirió que los sistemas de

polinización por engaño evolucionaron a partir de sistemas de recompensa en donde el éxito reproductivo no se perdía del todo en la ausencia de la recompensa, y que esto era más probable en poblaciones hiperdispersas. El análisis filogenético aquí presentado es la evidencia más sólida para apoyar la hipótesis de que les sistemas de engaño con abejas Euglossini evolucionaron a partir *de los* de recompensa.

Las abejas Euglossini han sido consideradas como un factor importante en la especiación rápida de algunos linajes de orquídeas (Dressler, 1981), asociados a poca divergencia morfológica. La poca divergencia morfológica y molecular (Fig. 1) observada entre las especies del grupo V. planifolia, que ha contribuido a la confusión taxonómica de sus miembros, podría ser atribuida a divergencia reciente.

En conclusión, el presente análisis propone hipótesis que cuestionan la clasificación infragenérica de Vanilla, así como sugieren que la monofilia del grupo debe ser evaluada con un *muestreo* más extenso con especies de otras regiones. La sección Foliosae es polifilética. El grupo típico de *Vanilla*, el que incluye a V. *inodora*, *está* bastante aislado de las especies productoras de frutos fragantes. Los caracteres morfológicos del grupo típico son tan distintos que ameritarían una segregación del resto de las especies en un género diferente a Vanilla. Gran parte de los recursos genéticos secundarios, ésto es, las especies cercanas a *Vanilla planifolia* se encuentran en México. Además de ser el sitio de origen y domesticación de V. *planifolia*, *México es* muy probablemente el área de diversificación del ciado que comprende a *V. planifolia*. Debido a la precaria condición de conservación en que se encuentran los recursos genéticos primarios (los individuos silvestres y cultivados) de *V. planifolia*, las especies cercanas representan una fuente de rasgos aún más importante que para otros cultivos.

El hecho de que en México se encuentren 5 grandes linajes de Vanilla, y que la diversidad morfológica sea igual o mayor que en Sudamérica conlleva a la propuesta de hipótesis biogeográficas interesantes.

Este patrón, mayor número de linajes en el norte del Neotrópico que en la parte sur del mismo, así como taxa basales en Centroamérica, es característico de grupos en los que se ha postulado un origen boreotropical (véase Lavin y Luckow, 1993), Así mismo explica el por qué de la gran diversidad de las selvas Centroamericanas, a pesar de su poca extensión territorial y cuestiona su caracter como una mera extensión de las selvas Sudamericanas. Vanilla aparentemente es un grupo que puede ser ilustrativo de la historia evolutiva de los taxa Pantropicales.

Si bien la región ITS resultó ser una fuente: valiosa de caracteres para establecer relaciones filogenéticas, aparentemente es muy poco informativa para indagar relaciones entre distintas poblaciones de una misma especie. La variación encontrada *más parece ser* debida a problemas técnicos que reflejar variación real. Los sitios variables se localizan concentrados en las zonas 1-58 y 646-68O de la alineación. Estas zonas son las que aproximadamente corresponden a las regiones codificadores del la

subunidad corta (sitios 1-25) y larga de los genes ribosomales (652-680), las cuales se sabe son más conservadas que los espaciadores y por ello, donde se reasocian los oligonucleótidos. Esto nos indica fuertemente que la variación encontrada es espuria y debida a problemas metodológicos y no un *reflejo de la* variación de los especímenes utilizados. Cualquier cuantificación de las tasas de substitución con estos datos daría resultados erróneos. Las distancias absolutas entre los especímenes analizados del complejo *V. pompona* se muestran en el Apéndice 3.

Esto pudo deberse a que los oligonucleótidos iniciadores no son exactamente iguales a la secuencia en las vainillas. Por ejemplo, en *V. insignis M. Soto 7668*, uno de los especímenes con mejor señal de secuenciación, el ITS 5 es: "GGN AAG AGA ATT TGT AAA CAA GG", mientras que en el oligonucleótido es "GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG GT", el número de sitios distintos es de 8. La zona 1-58 está asociada al oligonucleótido ITS-5, que es más diferente a la secuencia de Vanilla, que el oligonucleótido 26S-25R.

El árbol de la Fig. 3 muestra que la variación en un complejo de especies y poblaciones estrechamente relacionadas no corresponde con la clasificación taxonómica de las mismas. En él, los grupos hermanos tanto de *V grandiflora*, como de *V. pseudopompona* son *especimenes* de *V. pompona*. Además los especímenes de los dos grupos de poblaciones mexicanas, los del Golfo y los del Pacífico, tampoco forman clados discretos. Sin embargo, existe cierta congruencia en algunas partes de este árbol. Los especímenes *MAS 7747 y MAS 8509* se n ambos de Veracruz, lo mismo que *MAS 7878 y MAS 8614* provienen del occidente de México (de Guerrero y Jalisco, respectivamente). El espécimen Boussard 82.3.346 de Guadaloupe, Pequeñas Antillas, está asociado a los especímenes de Veracruz, con un alto valor de bootstrap (98%), lo que sugeriría que fue introducido desde Veracruz.

En conclusión. parece existir muy poca variación intraespecífica en las secuencias de la región ITS de los genes ribosomales y sin embargo, existe abundante variación informativa entre especies distintas. Estas características de los ITS de las vainillas mexicanas permitieron utilizar esta región genómica para análisis filogenéticos pero no genealógicos.

<u>OBJETIVO 3</u> (original). Describir la variación en las secuencias de la región hipervariable COOH terminal de un gen MADS-box (C-M1), para proponer una genealogía de *V. planifolia* y evaluarla con base en métodos (le coalescencia.

<u>OBJETIVO 3</u> (nuevo). Describir la diversidad y la estructura genética de *V. planifolia* con base en análisis de secuencias nucleotídicas (CAM, G3PDH y ADH) e isoenzimas.

Historia, usos y diseminación del cultivo. La vainilla era bien conocida desde tiempos prehispánicos. Fray Bernardino de Sahagún, menciona que el "tlilxóchitl" como la llamaban los aztecas, era vendida en los mercados indígenas y utilizada en una de las preparaciones del chocolate. La vainilla se menciona en el Códice Barberini (Cruz-Badianus) de 1552, como remedio para la fatiga y para aromatizar chocolate. En la segunda mitad del siglo XVI la vainilla era utilizada en la elaboración de chocolate en España (Correll, 1944).

Se desconoce desde cuando se ha cultivado, pero aparentemente crecía en el Jardín de Oaxtepec, durante los tiempos de Moctezuma II (Tezozomoc, 1847; Nuttal, 1922). La vainilla se exportó a España en pequeñas cantidades hasta el siglo XVIII, teniendo España el monopolio de su comercio. En 1676 William Dampier observó plantas de vainilla en la Bahía de Campeche y en Bocas del Toro, Panamá, dando alguna información sobre la forma en que crecía y como se curaban los frutos, aunque es probable que las plantas que él observó no fueran de *V. planifolia*, que no es nativa de esas áreas.

Fueron varios los intentos por llevar la vainilla a Europa. En 1739 Robert Miller llevó a Inglaterra esquejes, probablemente de *Vanilla insignis*, procedentes de la Bahía de Campeche, pero no prosperaron. La vainilla del comercio fue introducida de las Antillas a Europa por el Marquéz de Blanford, floreciendo un año después en la colección de Charles Greville, en 1807. Un año después fue descrita *como Vanilla planifolia* por G. Jackson con base en el mismo ejemplar de Greville.

La migración de *Vanilla planifolia* hacia los trópicos del Viejo Mundo parece haber seguido sólo dos o tres rutas distintas, vía Filipinas, vía Inglaterra y tal vez vía Francia. Blanco (1845). describió una vainilla con frutos aromáticos del Monte de Majaijai, Filipinas, como *V. majaijensis;* ya que no existen vainillas con frutos aromáticos en el sureste asiático, Blanco debe haber tenido un ejemplar escapado de V. *planifnlia*. Hamelin llevó plantas de vainilla (V. *tahitiensis, V. planifolia,* o ambas) a Tahití en 1848, procedentes de Manila, donde posteriormente se estableció como un cultivo importante de la Polinesia Francesa. Por otra parte, el espécimen tipo de V. *planifolia,* introducido a Inglaterra por Blanford, fue propagado, habiéndo sido mandados esquejes a los jardínes de Ambéres y París. Le Ambéres pasó al Jardín Botánico de Buitenzorg (hoy Bagar), en Java en 1819, donde Blume la describió como

V viridiflora en 1825, citando también *V*. aromatica. Para 18.46 ya existían plantaciones bien establecidas en Java y posteriormente ha sido un *cultivo importante en* Indonesia.

Se dice que Vanilla planifolia fue introducida a Reunión (Ridley, 1912) en 1793, desconociéndose el origen o ruta de migración del material, pero no fue un cultivo importante hasta que se descubrió la polinización artificial en 1841. De Reunión la vainilla pasó a Mauricio, y cerca de 1840 a Madagascar. Ya para 1886 la producción de vainilla en las Islas Mascareñas (Reunión, Mauricio y Rodríguez) y Java era mayor que en México (Mallory et. al. 1942). La variación genética de las vainillas <u>cultivadas</u> fuera de México parece ser extremadamente pobre por haberse originado de muy pocos esquejes.

Se desconoce cuando empezó a cultivarse vainilla en México en grandes cantidades. Mallory et. al. (1942) indican que los Totonacas y dos tribus más cultivaban vainilla para los *aztecas*. *De los* escritos de Humboldt (Voyage de Humboldt et Bonpland 2, pt. 3, p. 437 y Versuch über den politische i Zustand des Konigreichs Neu-Spanien, 1812) se deduce que su cultivo y manejo era extenso en Veracruz y existía en alguna medida en Oaxaca, de donde provenía la "vainilla de Teutila". Se sabe que la polinización artificial se practicaba a fines del siglo XIX en las plantaciones de franceses en Nautla. En 1942 cerca de 10,000 personas producían vainilla en el norte de Veracruz, y se estima que 50,000 personas estaban involucradas en su producción y manejo en 1920.

El auge en la producción de vainilla ha ocurrido en dos ocasiones, antes de la aparición de la vainilla sintética y durante la década de 1980. En Madagascar se produjeron 875 toneladas en 1929-1930, para después decrecer y nuevamente aumentar hasta 1,200 toneladas en años recientes.

La demanda mundial de vainilla natural se sitúa actualmente en unas 4000 toneladas anuales, *de las* cuales se satisface sólo **la**mitad. *De las 2000* toneladas que se producen actualmente, Madagascar suministra aproximadamente la mitad, mientras que México contribuye con 12 a 30 toneladas por a: ro, lo que contrasta con las cerca de 100 toneladas producidas a principios de siglo. La producción mexicana actual es comprada casi en su totalidad *por la Compañía* Coca-Cola.

Los precios de la vainilla tipo Bourbon (similar en calidad a la vainilla de México) fueron de 52.07 a 67.78 dólares americanos durante 1998. Los precios han experimentado una baja, principalmente por el incremento de la producción de Indonesia (700-800 Ton, el doble que en la década anterior).

<u>Distribución de Vanilla planifolia.</u> La distribución original de esta especie es imperfectamente conocida, al igual que la de muchas otras plantas cultivadas. Es muy dificil determinar cuales especímenes son silvestres y cuales son escapados. En distintas publicaciones se afirma que es nativa de amplias zonas de América tropical, lo cual es incompatible con la variación observada y sus requerimientos ambientales.

Con certeza, en México sólo han sido localizados individuos silvestres en Oaxaca y zonas limítrofes de Veracruz y Chiapas. Hasta años recientes, sólo existía un reporte de V. planifolia silvestre (R.E. Schultes y P. Reko 727, AMES), del norte de Oaxaca. Ahora se han localizado especímenes aislados en la región cárstica del norte de Oaxaca, formando una línea continua, justo en el pie de monte, desde la región de Atoyac, Veracruz, los cerros que rodean hacia el sur las presas Miguel Alemán y Cerro de Oro, Usila y Valle Nacional, hasta la región de Ayozintepec, Oax. No han sido localizados especímenes de V. planifalia en la región Mixe de Oaxaca, y vuelve a aparecer, aunque en forma más escasa cerca de Santa Mar .a Chimalapa, existiendo el registro de una población, probablemente ahora extinta, de la Selva del Ocote, en Chiapas. Especímenes aislados pudieran existir cerca de Teapa, Tabasco, en Laguna Ocotalito (parte alta de la Selva Lacandona), cerca de Bachajón y Chajul, en Chiapas. La especie nunca ha sido colectada silvestre en el norte de Veracruz o Puebla, donde supuestamente fue domesticada. Especímenes del norte de Yucatán (A. Schott 215 F, G.F. Gaumer & Sons 23352 AMES, 23909 F), se encuentran asociados a cenotes y áreas habitadas en la zona de selvas bajas del norte del estado, en un hábitat muy contrastante con el pie de monte del norte de Oaxaca. En las últimas semanas se han localizado especímenes aparentemente silvestres en el sur de Quintana Roo, cerca de la frontera con Belice.

Búsquedas sistemáticas no han localizado ningún espécimen en la región de Los Tuxtlas, en el Sononusco, o en la zona más húmeda del Uxpanapa-Chimalapas, ni en otras regiones de la Selva Lacandona. No existe tampoco en estado silvestre en la región de Pochutla, Oaxaca, de donde existe un registro de herbario (B, P. Reko 6279 AMES).

En Guatemala no se han localizado especímenes silvestres de V. planifolia en años recientes (M. Dix y O. Mittelstaedt, com. pers), pero un ejemplar colectado por el Cónsul F.C. Lehmann (Lehmann 1436 G), sobre el Río Polochic en 1882 y los reportes de que los frutos eran recolectados de plantas silvestres (Malloiy et. al., 1942) en esa misma área, sugieren que existe o existió una población ahí. Del sur de Belice existen varias colecciones de V. planifolia, anteriores a 1955, especialmente del área cercana a Punta Gorda y San Antonio, en Toledo. Sin embargo, el área tiene principalmente sustratos graníticos y V. planifolia y sus aliados son francamente calcícolas. Existe una colecta de V. planifolia dudosamente silvestre de la costa Atlántica de Costa Rica. El resto de los reportes de V. planifolia de Honduras, Nicaragua, El Salvador, Panamá, Florida y Ecuador están basados en especímenes evidentemente escapados o cultivados, o en identificaciones erróneas de otras especies,

principalmente V. hostmanii Lindl., V. insignis y V. perplexa. Vanilla plan folia no

florece en climas ecuatoriales, como en Singapur, Papúa e la Amazonia Brasileña, lo que también sugiere que es originaria de latitudes más altas en los trópicos. Luer (1972)

menciona que *V. planifolia* fue muy probablemente introducida a Florida en épocas Precolombinas pues ha sido encontrada en áreas que se sabe fueron asentamientos indios. Fawcett y Rendl (19 10) mencionan que es evidentemente escapada en Jamaica.

La dificultad de establecer qué especímenes son silvestres o escapados queda evidenciada con la descripción en años recientes de Vanilla bampsiana Geerick (1982) de Zaire, una supuesta nueva especie que es en realidad un espécimen escapado de V. *plan* folia. Sin embargo, el conocer la distribución original de la especie es una pregunta básica para planear el manejo de sus recursos genéticos. Evidentemente cualquier tipo de manejo es diferente si la especie es endémica de Mesoamérica o de todo el Neotrópico.

Hábitat y Ecología. Vanilla planifolia ha sido raramente encontrada en forma silvestre en selvas perennifolias sobre terrenos cársticos muy accidentados, frecuentemente en la cima de lomeríos entre 250 y 750 m de altitud. A pesar de las altas precipitaciones, siempre mayores a 2500 mm, la selvas de cimas son achaparradas, muy ventiladas y edáficamente secas, donde las especies dominantes son Bernaullia fammea, Pseudobombax ellipticum, Dendropanax arboreus, Bursera simaruba, Gaussia gomezpompae, Cedrella mexicana, Robinsonella sp., Ficus tecolutensis, Dracaena americana, Trichospermum mexicanum, Pouteria sapota, y en ocasiones Dioon spinulosum y Cham aedorea metallica. En estas condiciones un individuo de V. planifolia puedecubrir grandes extensiones, hasta de cerca de 0.2 ha, aunque no en forma muy densa.

También ha sido vista en selvas con *Liquidambar*, *Clethra*, *Podocarpus y Quercus*, a unos 400 m s.n.m., cerca de Sta María Chimalapa, auncue con crecimiento menos vigoroso.

Vanilla planifolia es extraordinariamente rara, incluso en sitios bien conservados. Estimaciones de su densidad la situán en L individuo cada 2-10 km cuadrados en Chimalapas, o 1 en 4, en San Agustín, Jacatepec, Oaxaca. Vanilla planifblia florece sincrónicamente durante los meses de marzo-abril. Cada flor permanece abierta aproximadamente de las 7:00 a las 15:00 horas. Las flores son ligeramente fragantes, el olor varía un poco, siendo en algunos individuos similar a algunas flores nocturnas como Hymenocallis o decididamente fragantes a canela. Análais cromatográficos indican que la fragancia blanca (a flor nocturna) es debida a la presencia de linalol y que el olor a canela es debido a la presencia de 1-8 cineol (Soto, DaCosta y Alvarez-Buylla, datos no publicados). Vanilla planifolia es raramente visitada por insectos, aunque se ha visto a Euglossa viridissima visitar las flores y portar el polen. Euglossa viridissima es fuertemente atraída por el 1-8 cineol. La baja visitación, la escasa producción de frutos, 1 en 100-1000 flores, sugieren la existencia de un mecanismo de engaño. Otras especies de vainilla tienen flores fuertemente fragantes y atraen a abejas Euglossini que colectan fragancias activamente del labelo de la flor, lo que nunca ha sido observado en V. planifalia (Soto, DaCosta y Alvarez

Buylla, datos no publicados). Vanilla *planifolia* parece ser una especie bien adaptada a la hiperdispersión de sus poblaciones. Las abejas euglossine son bien conocidas como polinizadores a largas distancias, y el sistema de polinización *por* engaño ha sido planteado como característico de poblaciones con muy bajas densidades (Ackerman, 1986). Las semillas de las vainillas americanas con frutos fragantes son probablemente dispersadas por murciélagos, los cuales pueden transportar *los propágulos* a grandes distancias. Estos dos factores *sugieren* que no podría ocurrir diferenciación genética en áreas cercanas.

El sistema reproductivo de *V. planifolia incluye* tanto especímenes autoincompatibles (cv. "Oreja de Burro"), como autocompatibles (el resto de los especímenes conocidos). En éstos últimos existen individuos incapaces de autopolinizarse (e.g. cv. "Mansa"), algunos donde el porcentaje de autopolinización es bajo `4-6%: e.g. MAS *8526*) y otros donde este porcentaje alcanza el 20% (e.g. MAS *8611*). La existencia de este sistema reproductivo mixto podría favorecer la endogamia y diferenciación local, si los especímenes autocompatibles se autopolinizan frecuentemente.

No es posible entonces postular una hipótesis sobre la diversidad y estructura genética en V. *planifolia*. Por una parte, la dispersión del polen y semillas podrían favorecer la homogenización, mientras *que la* formación de frutos producto de autopolinizaciones podría favorecer la endogamia y la diferenciación local. Se desconoce la proporción en que cada uno de estos factores ha determinado la diversidad y estructura de *esta especie*.

<u>Variación morfológica.</u> Recientemente Smith et. al. (1992) han llamado la atención sobre la reducida diversidad genética que podría prevalecer en este cultivo. La escasa variación genética en las plantaciones puede atribuirse a los siguientes factores: -La especie ha sido tradicionalmente cultivada en la región más norteña del área en donde puede cultivarse en América, lo que sugiere que fue llevada desde sitios más sureños o que se originó de la población más norteña de la especie. -La propagación de *V. planifolia* es estrictamente vegetativa. Una planta grande puede dar lugar a muchos cientos de esquejes (ca. 2500). La germinación masiva sólo es *posible mediante técnicas in vitro no* disponibles a los cultivadores tradicionales, y no parece haber germinación alguna en las plantaciones.

-En el caso de una eventual germinación espontánea, esta sería más probablemente el resultado de una autopolinización, que se lleva a cabo artificialmente para la formación de cápsulas, lo que favorecería la existencia de homócigos. -Parte de la variación que *puede* llegar a detectarse puede ser producto de mutaciones somáticas. Si cientos de miles de plantas en Madagascar pertenecen a un mismo clon, no es improbable que cierta cantidad de mutaciones se originen espontáneamente (e.g.

"Sport"); tal puede ser el caso de las formas variegadas, corno el cv. "Albomarginata", que se, desconoce en América, o del ev. "Acamaya" en Veracruz.

-Ha existido selección artificial en contra de la variación para disminuir la incidencia de clones autoincompatibles.

-La variación morfológica de V. planifolia en las plantaciones del norte de Veracruz es muy limitada. Aunque se tienen pocos datos cuantitativos (e.g. Castillo y Engleman, 1993), las plantaciones de V. planifoia están conformados por individuos muy homogéneos. En la zona de Papantla se distinguen en la actualidad 3 cultivares, dos de los cuales fueron ya citados por Schiede en 1829. "Mansa" que es la más apreciada y común, "Oreja de burro", con grandes hojas, muy vigorosa, con frutos bisulcados y autoincompatible, y "Acamaya", con hojas variegadas. "Mansa" se conoce también como "Dura" o "Verde". La existencia del cv. "Oreja de burro" ha desalentado fuertemente la producción de vainilla, pues las plantaciones de este cultivar son totalmente improductivas y deben ser destruidas. En Oaxaca la variación morfológica es mucho mayor, pues existen individuos con hojas muy anchas (e.g. MAS 8480); o muy grandes y oblongas (e.g. MAS 8481), o con el labelo manchado de café, fuertemente cóncavo y con decidido olor a canela (1-8-cineol; e.g. MAS 8486), y existen distintos individuos en los cuales un porcentaje (4-6%) de las flores se autopoliniza, lo cual nunca ha sido observado en las plantaciones de Veracruz. En Oaxaca parecen existir también muchos especímenes indistinguibles morfológicamente del cv. "Mansa", y se ha documentado la existencia de material proveniente de Puntilla Aldama, Veracruz, en las zonas Chinanteca y Mazateca. Los pocos ejemplares de Tabasco, Chiapas, Centro y Sudamérica no presentan características notables con respecto al ev. Mansa, aunque los especímenes de Quintana Roo podrían ser algo distintos vegetativamente. Problemas en las plantaciones. Las plantaciones de vainilla son uno de los sistemas económicamente más redituables en el trópico cálido húmedo y tienen la ventaja de ser sistemas agroforestales con numerosas ventajas sobre cultivos anuales.

Las plantaciones mexicanas de vainilla son técnicamente pobres comparadas con las de otros países productores. En regiones indígenas, una o dos plantas de vainilla se mantienen en huertos caseros. En otras zonas, especialmente en el norte de Oaxaca, la vegetación secundaria se aclara para introducir esquejes, en densidades relativamente bajas. Plantaciones de árboles podados de leguminosas apropiadas (e.g. *Erythrina*, Gliricidia) pueden sostener mayores densidades y son ahora frecuentes en el norte de Veracruz, pero la mayor parte de ellas carece de los sistemas de irrigación necesarios para mantener altas densidades en plantaciones relativamente abiertas, y son manejados de manera deficiente, especialmente en cuanto al aporte de materia orgánica a la plantación.

En condiciones naturales las vainillas se establecen en las cimas de los cerros donde tienen una ventilación fuerte. Las grietas de karst llenas de humus

mantienen humedad, mientras que la planta puede trepar alto sobre los árboles circundantes y florecer en las partes expuestas al sol. Sin embargo, en las plantaciones las vainillas se mantienen achaparradas para poder polinizar las flores y cortar las cápsulas, distintos tallos se empalman unos sobre otros y las altas densidades y la cercanía de los bejucos al suelo reducen la ventilación de la plantación. Las plantaciones son pues ya en sí estresantes para las vainillas.

Aunque la vainilla experimenta sequía en su hábitat natural, las plantaciones del norte de Veracruz *parecen* estar fuertemente sujetas a stress hídrico, mostrando marchitamiento y marcas *foliares no* vistas en especímenes silvestres. Es muy probable que parte del sistema radicular y de la simbiosis micorrízica también se pierda bajo estas condiciones. La utilización de leguminosas deciduas, ausencia de sistemas de irrigación, escasa materia orgánica, establecimiento de plantaciones en *suelos que* pueden tener drenaje deficiente en la época de lluvias y cercanía de las plantaciones a su hábitat natural original (donde existen patógenes y herbívoros que naturalmente han estado asociados a las vainillas silvestres), han causado el abandono de machas plantaciones en el norte de Oaxaca, después de la sequía de la primavera de 1998. Por arriba de 350 m s.n.m. se han presentado heladas y nevadas recurrentes en Veracruz y Puebla que han acabado con los vainillales.

Las vainillas en las plantaciones están sujetas a un esfuerzo reproductivo inusual. En condiciones naturales la producción de frutos es generalmente del orden de 1 en 100-1000 flores producidas. En cultivo se incrementa hasta cerca de 20%. Hernández (1997), quien realizó experimentos con distintas frecuencias de polinización, ha determinado que los costos de la reproducción en las plantaciones con mayor frecuencia de polinización, son evidentes después del segundo y tercer año de reproducción consecutiva. Los efectos causados por los costos de reproducción acumulados son la disminución del crecimiento vegetativo, la reducción del número de inflorescencias y flores por individuo y el decremento del volumen de frutos. Sin embargo, muchos cultivadores sobrepasan el porcentaje de flores recomendado, o polinizan esta misma proporción en inflorescencias de plantas más débiles.

Mal manejo de las plantaciones y esfuerzo reproductivo mayor traen por consecuencia una mayor susceptibilidad al ataque de patógenos de los cuales la antracnosis (*Collectotrichum sp.*) y la pudrición negra o de raíz (Fusarium *oxysporum*) son los más peligrosos. La pudrición negra ha sido devastadora en casi todas las plantaciones de México, y también de otros países. En Puerto Rico fue la causa para desalentar el establecimiento de extensas plantaciones (Childers, et al. 1959).

Ante esta compleja situación, se han establecido varias líneas de investigación para solucionar el problema. Mejoramiento de las condiciones de las plantaciones ha sido llevado a cabo en Madagascar. Estudios con un enfoque clásico de fitopatología se han llevado a cabo sobre todo en Puerto Rico. En México hemos

propuesto dos estrategias para abordar el problema: a) estudios para establecer la relación adecuada entre crecimiento-sobrevivencia y esfuerzo reproductivo y b) análisis del germoplasma para ampliar la base genética *de* Vanilla planifolia, tanto con material coespecífico, como en especies cercanas.

Existen diversas maneras para describir la variación genética dentro de una especie. En los últimos 25 años se ha utilizado la variación electroforética de isoenzimas para hacer estas estimaciones. El análisis de la variación isoenzimática, aunque muy útil, ha sido desplazado en los últimos años por métodos de trabajo con DNA, que pueden ser más precisos y en algunos cases más informativos. Tales métodos incluyen la utilización DNA polimórfico amplificado azarosamente, mejor conocido por sus siglas en inglés RAPDs, microsatélites (repeticiones de secuencias simples) y variación en secuencias nucleotídicas conocidas. Tanto los datos de RAPDs como los microsatélites presentan serios problemas cuando se trata de extraer información genealógica de ellos. El Dr. W. Goldner, the Union Camp, Princeton, ha utilizado RAPDs en V. plan folia. y ha encontrado que no son reproducibles. Recientemente los AFLPs (un análisis que combina la especificidad de los sitios de restricción con la amplificación por PCR) han mostrado detectar más polimorfismos que otros tipos de análisis, particularmente en otras orquídeas (M. Chase, com. pers.) y pueden ser una herramienta útil en el futuro para identificar clones de vainilla. Dentro de regiones conocidas puede detectarse variación, ya sea mediante técnicas de SSCP (single strand conformation polymorphism), digiriendo con enzimas de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphism) o directamente secuenciando esas regiones; la ventaja de trabajar con regiones conocidas es que pueden establecerte mejor las relaciones entre los datos obtenidos, y establecer hipótesis de homología con datos, empíricos y no sólo de congruencia.

En este trabajo se decidió buscar variación nucleotídica en secuencias específicas de genes codificadores, porque el objetivo es obtener la mayor cantidad *de* información genealógica de ellos, además, el análisis de secuencias es más *poderoso y* tiene menos supuestos que cuando se trabaja con fragmentos. Esta búsqueda de variación se inició, sin éxito, en la región carboxilo terminal de genes MADS-box y se continuó en intrones de la Alcohol deshidrogenasa, de la calmodulina, y la gliceraldehido 3-fostato deshidrogenasa. Paralelamente se buscó variación isoenzimática que pudiera indicar cuales individuos eran los más distintos y que sirviera de pauta para la búsqueda de variación en las secuencias nucleotídicas. Debido a los riesgos que implicaba la búsqueda de variación en secuencias, la colecta de datos electroforéticos permitía asegurar la obtención de resultados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis del gen MADS-box se montaron los protocolos en el espécimen *M. Soto 8526*.

El RNA se extrajo por medio del RNAeasy PLant Total RNA Kit (20), QIAGEN, de 4 estados de botones florales, desde primordic.s florales hasta botones a 5 días de la antesis.

Posteriormente se sintetiz- el DNA complementario al RNA extraído mediante el 3 "RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (GIBCO BRL)

Las amplificaciones utilizando cDNA como templado se hicieron en volúmenes de 50 μl en buffer Tris 10 mM Tris (pH 8.3) que contenía 50mM KCI, 1.5 mM.MgC12, 100μM dNTP (25μM de cada nucleótido), 10 uM de cada oligonucieótido, aproximadamente 10 ng de templado, 1.25 unidades de polimerasa (Replitherrn). Al no obtenerse amplificaciones se variaron en distintos grados los reactivos y en algunos ensayos se añadió 1% BSA, y 5% DMSG. Los oligonucleótidos utilizados fueron PIGL 1 (5'TGA AGG ATC CTT TTC AAC GTC CAC ATT GC) y UAP (5' CUA CUA. CUA CUA GGC CAC GCG TGG ACT AGT AC3'). El perfil de amplificación AP3. con 35 ciclos fue: 2' a 95C (desnaturalización), 20"" a 45C (reasociación, "anneealing"), y 2' a 72C (polimerización), en un termociclacfor Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Se ensayaron también otros oligonucleótidos alternativos sin exito.

Al no poderse realizar las amplificaciones en un gen MADS-box, tanto por problemas técnicos como por falta de material adecuado, se decidió buscarla en otros sitios en donde otros investigadores están buscando variación intraespecífica. De todas la regiones genómicas las más promisorias para encontrar variación son los intrones (regiones no codificadoras) de algunos genes que codifican enzimas y proteínas del metabolismo básico. Estas regiones son ubicuas en las plantas y se sabe que tienen tasas de substitución mayores que las zonas codificadoras, aparentemente por no estar sujetas a selección. La Dra. Barbara Schaal sugirió secuenciar el intrón de la Alcohol deshidrogenasa. Recientemente Strand et al. (1997) propusieron el diseño de otros oligonucleótidos para la realización de genealogías intraespecíficas. De las 8 regicnes blanco para las que diseñaron oligonucleótidos, una es el intrón de la ADH ya sugerido por la Dra. Schaal. De las 7 restantes, el intrón de la Aspartato aminotransminasa (Aat) no amplifica para maíz (la única monocotiledónea para la cual existía información) así que no se utilizó. Los otros 6 sitios restantes se evaluaron haciendo búsquedas en el GENBANK para orquídeas y otras monocotiledóneas, con muy poco éxito. No existe ninguno de estos genes secuenciado para orquídeas y sólo uno de ellos está para Lilium. Con base en esta información se sintetizaron los oligonucleótidos para los intrones de ADH, CAM y G3PDII.

Especímenes estudiados para el análisis de las se^cuencias nucleotídicas. Se seleccionaron individuos de distintas áreas, así como los distintos cultivares tradicionalmente reconocidos en el norte de Veracruz. Estos son los especímenes del cv. Acamaya M. Soto (MAS) 8508, ev. Mansa MAS 8538, MAS 8520, cv. Oreja de burro MAS 8536, MAS 8526 de Usila, Oax. y A. Cibrián 13 de Teapa, Tabasco. También se hicieron amplificaciones en la especie hermana de V. planifolia, Vanilla. sp. MAS 8355 y en V. odorata, sin embargo la gran variación en el tamaño de las bandas obtenidas con respecto a V. planifolia, no ha permitido establecer cuales bandas son homólogas.

Extracción de DNA. Se utilizó el mismo protocolo descrito en el análisis filogenético del género.

Las amplificaciones por PCR se realizaron en uno o más volúmenes de 1 O0μ1 en buffer Tris 10 mM (pH 8.3) que contenía 50mM KCI, 1.5 mM M;-C12, 100μ.M dNTP (25μM de cada nucleótido), 10OnM de cada oligonucleótido, y se ensayaron de 10 a 100 ng de templado, 1.25 unidades de polimeraza (Replitherm), 1 % BSA y 5% DMSO. Altas concentraciones de templado dieron mejores productos de PCR. Para el intr-n de ADH se utilizaron los siguientes oligonucleótidos ADH2F (5'TACTTITGGGAACGIAAGGTA-3') y ADHX4R (5' - TCICCIACACTCTCIACAAT -3'). Para los intrones de la calmodulina los oligonucleól idas fueron CAMX 1F (5'

AGC CTNTTCGACAAGGATGG-3') y CAM X2R (5'-AGTGANCGCATCACAGTT) Para los intrones de la G3PDH los oligonucleótidos fueron GPDX7F (5'-GATAGATTTGGAATTGTTGAGG) y GPDX9R (AAGCAATTCCAGCCTTGG). El perfil de amplificación con 35 ciclos fue: 2' a 95C (desnaturalización), 20" a 45C (reasociación, "annealing"), y 2" a 72C (polimerización), en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Los productos de PCR se purificaron con QlAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Las amplificaciones purificadas fueron reamplificadas por PCR (35 ciclos) y purificados, ya sea con QlAquick Gel Extraction KIT or con High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim). Secuenciación, alineación y análisis fi logenético. Similar al de los ITS, excepto que en el análisis filogenético se realizaron búsquedas exhaustivas. Isoenzimas. Especímenes analizados. Para el análisis de isonzimas se colectaron 3-6 individuos de la mayoría de las plantaciones del norte de Veracruz, así como de la región de Usila, Oaxaca. Todos los especímenes silvestres que se obtuvieron, así como especímenes cultivados aislados, de áreas distintas a donde se establecen plantaciones, también se incluyeron. La mayor parte de las plantaciones se establecen con esquejes de un mismo espécimen, por lo que consideramos que pocas muestras de distintas partes de la plantación serían suficientes para reconocer los distintos genotipos; especialmente se escogieron muestras fenotípicamente diferentes. De algunas plantacionesnes se indagó el origen de los esquejes y datos del manejo que permitieran

estimar la clonalidad. Desafortunadamente el tipo de material colectado no fue uniforme. En las plantaciones se escogieron hojas jóvenes y sanas, mientras que los especímenes silvestres y de traspatio estaban frecuentemente enfermos y sin follaje nuevo. También es importante mencionar que a diferencia de las plantaciones de Veracruz, las plantaciones de Oaxaca son de establecimiento muy reciente (menos de 10 años de antigüedad) y en ocasiones se conoce el lugar de origen de la planta o las plantas madres, usualmente localidades silvestres muy cercanas a los pueblos donde ahora se cultiva.

A pesar de su reducido número, los especímenes colectados se aproximan más a un censo que a un muestreo de las *Varilla planifolia* de México. Nuestras localidades no representan poblaciones y no se conoce ninguna localidad con una población propiamente dicha. Lo más cercano a ello, son los 4 especímenes del Ejido San Agustín, Sta. Ma. Jacatepec, Oaxaca. Búsquedas *recientes* durante varias semanas, por *parte* de pobladores locales en Chimalapas han *resultado en 3* especímenes (no incluidos en este trabajo). Esto limita seriamente el tipo de análisis estadístico de los datos, dado el número limitado de muestras. Es en este contexto en que deben tomarse los resultados.

Algunos de los estadísticos (e.g. los F) son fuertemente afectados por números de muestra muy pequeños por lo cual se decidió realizar el análisis en dos niveles, local y regional. En el primero se presentan resultados de localidades (un ejido, una plantación o de un individuo aislado). En las regiones se agruparon todos los *especímenes como se* indica en la Tabla 2.

Para la colecta de los datos se utilizó la técnica de electroforesis para isoeniimas en geles de almidón (Saber, et. al., 1988; Wendel y Weeden, 1989). Las proteínas de la planta se separan en el gel dependiendo del pH del buffer del sistema, la carga neta de la proteína y su estructura tridimensional. Para la extracción de proteínas se molieron las hojas y tallos en un buffer de extracción preparado con tres partes de buffer VegII de Cheliak y Pitel (1984) y una parte del buffer propuesto por O'Malley et. al. (1980). Los geles se prepararon al 12% p/v de almidón hidrolizado (SIGMA S4501'.

Se utilizaron tres sistemas para la electreforesis: Sistema #2 TrisCitrat as (Miles et al., 1977), Mitton PP (Mitton et al., 1977) y Sistema R (May, 1992) con un total de 13 enzimas. Para la tinción de las enzimas se utilizaron recetas de Wyatt (1989, 6-pgd, GOT), Cheliak y Pitel (1984, FE), Conkle, et. al. (1982, MDH), modificada de Conkle et. al. (1982, GDH), modificada de Soltis et. al. (1983, ME, IDH), Hamrick et al. (1979) (G-6pd), Werth (1985, LAP), modificada de Werth (1985, SDH). Los geles se fijaron en alcohol etílico al 50% durante 24 horas y se refrigeraron envueltos en plástico.

Análisis de datos de isoenzimas. Se construyó una matriz con los genotipos de todos los individuos analizados. Esta matriz se analizó con el paquete BIGSYS-1 (Swofford y Selander, 1981) y se obtuvieron las frecuencias alélicas para cada locus en cada localidad y región. A partir de éstas se calcularon varios parámetros que permiten evaluar los niveles de variación genética y la estructura genética de V. planifolia. Así mismo, se utilizó el programa Tools for Population Genetic Analysis" (Miller, 1997) con el que se calcularon los estimadores de Weir y Cockerham, la prueba de G para determinar si las frecuencias alélicas observadas se debían o no al azar, y la prueba de Mantel.

Para el análisis de la variación genética se estimaron los siguientes parámetros:

- 1) Las frecuencias alélicas para cada locus y para cada población (Hedrick, 1983), donde p= (AA+112Aa)1 N y q=(112Aa+aa)N.
- 2) Li proporción de loci polimórficos, que toma valores entre 0-1, cuando es 0 no hay variación genética y cuando es 1 todos los loci analizados son polimórficos. Un locus se considera polimórfico si el alelo más común no excede el 95% o el 99% en la población dependiendo del criterio que se siga (Hedrick, 1983). Este parámetro se obtiene mediante la fórmula: P = x lm, dónde x es el número de loci polimórficos de una muestra de m loci.
- 3) E.- promedio de número de alelos por locus (A), que es el promedio aritmético de alelos por locus, $n_a = \sum_{ni}/m$, donde n es el número de alelo ti observados en el locus i y m es el número de loci bajo análisis.
- 4) La- heterocigosis promedio *esperada* (*He*), que se obtiene a partir del promedio de la heterocigosis esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los loci. Para un locus se estima como $H=1-\sum pi^2$, donde p; es la frecuencia de los alelos del locus i. H *toma valores de 0-1* (Hedrick, 1983).

Para estimar la repartición de la variación se obtuvieron los siguientes parámetros:

- 1) Se calculó el índice de fijación (F) para cada locus de cada región, del cual se obtuvo una media y el error estándar que se calculó con un método de remuestreo de jacknife (Weir, 1990). El índice de fijación se define como F = 1- (Ho / He) donde Ho es la proporción de heterócigos observados en promedio dentro de una subpoblación (Hartl y Clark, 1989) y He es la heterocigosis promedio esperada. Este parámetro toma valores de -1 a +1. Si la población se encuentra en equilibrio de Ha-dy-Weinberg, el índice de fijación es 0, de -1 si existen únicamente individuos heterócigos y de +1 si solo hay individuos homócigos (Hartl y Clark, 1989).
- 2) Se utilizó la $F_{is}(F)$ individuo-subpoblación) para estimar la diferenciación a nivel regional. Se estima como $F_{is} = (His Ho)IHs$, donde Ho es la proporción de homócigos observados en promedio dentro de una subpoblación y Hs es la proporción

de heterócigos esperada promedio a nivel de subpoblación (Hartl y Clark, 1989). Toma valores de -1 a +1. Cuando existe un exceso de homócigos en relación a los esperados. F_{is} es positiva y señala que es posible que la endogamia haya sido un factor importante en la estructura genética de la población. Cuando hay menos homócigos de los esperados la F_{is} es negativa y sugiere que podría existir selección a favor de los heterócigos (Linarti et al., 1981)

- 3) F_{ib} , (F individuo-total) mide la diferenciación total debida canto a la endogamia como a la deriva génica. Se obtiene como $F_{it} = (Ht Ho)I Ht$; Ht es la proporción de heterócigos esperada a nivel global . F_{ib} toma valores entre -1 a +1 (Hartl y Clark, 1989).
- 4) Se calculó la F_{st} (F subpoblación-total), que es la diferenciación entre regiones. Se obtiene como $F_{st} = (Ht Hs)IHt$. Hs es la proporción promedio de *heterócigos* esperada a nivel subpoblación y si todas las regiones son idénticas entre sí en términos de variación genética, su valor es 0, y si las regiones son todas diferentes (no comparten ningún alelo), entonces su valor es 1. A partir de este parámetro se estimó el flujo *génico*
- ningún alelo), entonces su valor es 1. A partir de este parámetro se estimó el flujo *génico* entre poblaciones, Nm, con **la** fórmula de Crow y Aoki (1984), donde $F_{st} = II(4aNm+1)$; $a = n/(n-1)^2$ y n es el número de subpoblacione, (regiones).
- 5) Se calcularon los estimadores de Weir y Cockerham (1984) f tetha y F, que son equivalentes a F_{is} F_{st} y F_{iT} pero que consideran la posibilidad de diferentes tamaños de muestra en términos de poblaciones observadas, individuos muestreados, loci registrados y alelos observados. Tetha puede tomar valores negativos, los cuales se interpretan como un signo de que la estructura poblacional es demasiado pequeña para se detectada. El programa utilizado para estos estimadores (TFPGA) emplea un procedimiento de "jackknife" para obtener los promedios, con su respectiva desviación estándar y el método de "boostrap" con 1000 replicas para estimar los niveles de confianza al 95% de los valores promedio (Miller, 1997).
- 6) Si **h** endogamia en una población se debe totalmente a la autofertilización y la población ha alcanzado un equilibrio endogámico, es posible calcular la tasa de entrecruzamiento. Se calcularon indirectamente las tasas de entrecruzamiento en equilibrio para la región de Veracruz y la región de Oaxaca, a partir de los índices de fijación F obtenidos para cada locus en las diferentes localidades. La fórmula utilizada fue (Hedrick, 1983): t eq = 1-F/I + F.
- 7) Se calcularon las distancias e identidades genéticas (Nei, 1978), tanto a nivel local como regional. La identidad genética se calcula como I=Jxy, / (JxxJyy), donde J_{xy} es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de una población sean idénticos, $J_{xx}y$ J_{yy}
- son las probabilidades de homocigosis en la población X y Y respectivamente (Hartl y Clark. 1989); la identidad genética toma valores de 0 si no se comparten alelos en un par cualquiera de poblaciones, a i si ambas tienen las mismas frecuencias alélicas. La

distancia genética toma valores de 4 si las poblaciones, tienen frecuencias alélicas idénticas, hasta si las poblaciones no comparten alelos, y se estima como D = -lnl.

Con las distancias genéticas se construyeron las matrices de similitud (por localidad y por región). Con la técnica de ligación de UPGMA se construyó un fenograma para todos los sitios y otro para 5 regiones (se eliminaron las que tenían un sólo. individuo).

8) Con todos los genotipos distintos se construyó una matriz para ser analizada por métodos de parsimonia, de manera similar al análisis de las secuencias de ITS de las especies de Vanilla. Los caracteres fueron definidos según el modelo de alelos compartidos (Mickevich y Mitter, 1981), ya que la definición de estados no es tan simple cuando los taxa terminales (o genotipos en este caso) tienen más de una condición (electromorfos). Esto consiste en que cada locus es un caracter cuyos estados son combinaciones de alelos. Cuando más de dos estados se presentan en los datos, se ordenan de la manera más parsimoniosa, esto es, los estados relacionados (que comparten alelos) se conectan de un modo tal que se minimice la suma total de evolución, esto bajo la suposición de homología de los electromorfos. Los caracteres cuyas estados fueron ordenados y las matrices de número de pasos entre los estados ordenados se indican en la Tabla 4. Los genotipos redundantes fueron eliminados. No se determinaron valores de bootstrap debido a que los valores de CI, HI y los cálculos de árboles de consenso estricto indicaban que era imposible obtener valores superiores al 50%; además el ordenamiento de caracteres imponía serias limitaciones en el tiempo de búsqueda.

9) Se calculó también el índice de diversidad Shannon-Weaver (1963) a nivel global con 7 5 genotipos y 98 individuos en total y a nivel regional, Veracruz (47 genotipos y 67 individuos en total), Oaxaca (25 individuos y 25 geno^tipos en total), Tabasco (2 genotipos y 2 individuos en total), Chimalapas, Chiapas y San Luis Potsí (los 3 últimos con 1 genotipo y 1 individuo). Este índice *se* define como: $H = -E p_i log p_b$ donde p_i es la proporción de individuos por genotipo. S e calculó la equitatibilidad come E = H/Hmax, donde H_{ala} , es el logaritmo del número de genotipos. Estos índices se uti [izaron como un estimador de la diversidad clonal.

RESULTADOS

No fue posible amplificar *genes* MADS-box y ante las limitaciones que imponía la necesidad de utilizar tejido de órganos florales, no se continuó desarrollando el establecimiento del protocolo adecuado.

Introres de la Alcohol deshidrogenase. Los productos de PCR de este par de oligonucleótidos fueron dos bandas tenues, una de ca. 200 pb y otra de ca. 600 pb. No fue posible purificar la banda de 600 pb, debido a su baja concentración o difícil

observación en la mayoría de los especímenes, pero si se pudo purificar, reamplificar y secuenciar la banda de 200 pb. Las secuencias correspondientes se encuentran en el Apéndice 2.

Estas secuencias no exhiben ninguna variación nucleotídica, por lo que no es una región genómica informativa para nuestros propósitos.

Intrones de la calmodulina. En distintos eventos se amplificaron más de un loci para los intrones de la Calmodulina. Estos fueron de 100, 250, 350, 500, 550 y 1500 pb en V. planifolia, de 800 y 1000 pb en V. odorata (MAS 8364), y de 1000 y 1600 pb en V. insignis (MAS 8611). Los resultados en V. planifolia eran erráticas y poco reproducibles. Finalmente se seleccionaron las bandas de 550 y 1500 pb, que fueron las más reproducibles y mejor amplificadas, se reamplificaron y se purificaron. Los reaniplificados de las bandas purificadas de 550 pb dieron por resultado bandas definidas de este mismo tamaño. Las reamplificaciones de bandas de 1500 pb dieron por resultado bandas definidas de 550 y 1500 ph y tenues de 100, 250 y 1700, lo cual era un resultado impredecible que indicaba que estaban ocurriendo artificios o contaminaciones.

Las bandas de 550 pb producto de la purificación de reamplificados de 550 ?h se denominaron "alpha". Aquellas bandas de 550 pb producto de la purificación de reamplificados de 1500 ph se denominaron "beta" Las secuencias de las bandas alpha y beta de 550 pb y las de 1500 se encuentran en el Apéndice 3.

Una vez secuenciadas se pudo establecer el por qué la banda de 1500 ph daba bandas de otros tamaños, especialmente una banda 550 beta que era más definida que la banda de 1500 pb.

En el locus de 550 pb, ambos alpha y beta, la reasociación (annealing) del oligonucleótido es notablemente buena, pues sólo difieren en 2/20 bases en el primer CAMXIF y2118 en el primer CAMX2P. Esto permite una reasociación muy buena. En cambio la reasociación de primer CAMIF en la secuencia de las bandas de 1500 pb es mala porque la similitud es de 7120 bases en CAMXIF y 7118 bases en CAMX2P. Debido a estas diferencias de reasociación entre los primers y las secuencias, la reamplificación del purificado de 1500 ph puede dar otro tipo de bandas si en el purificado existían algunas molecular contaminantes que tuvieran mayor avidez por el primer. A pesar de extremar precauciones para evitar contaminaciones, siempre se obtuvieron bandas definidas de 550 pb en las reamplificaciones de purificados de 1500 ph lo cual es indicio de un problema de la técnica y no (le la manipulación de las muestras.

La similitud entre las bandas alpha y beta de 550 pb es tan grande que sugiri⁶ inicialmente que se trata de un solo locus. Cuando analizadas en conjunto, las bandas alpha y beta se alinearon bien en 501 sitios, de los cuales 41 resultaron ser variables, pero sólo 9 de ellos fueron informativos. Como se tenán 2 secuencias (alpha

y beta) de un mismo individuo, la predicción sería que las secuencias del mismo individuo se agruparan entre sí en los árboles, lo cual no fine el caso.

Una búsqueda exhaustiva resultó e n 3 árboles igualmente parsimoniosos, no enraizados de una longitud de 47 pases, CI = 0.915, HI = 0.085, CI excluyendo caracteres no informativos = 0.692, HI excluyendo caracteres no informativos de 0.308, RI = 0.800 y RC = 0.732. El consenso estricto de estos tres árboles se muestra en la Fig. 4, Los valores de bootstrap se muestran sobre las ramas. *En este* arbol las secuencias del mismo individuo no se agrupan, por lo que la poca variación observada es mayor dentro de individuos que *entre* individuos, y puede ser atribuida a problemas de alineación y/o secuenciación. El que existan 3 árboles igualmente parsimoniosos, con tan pocos pasos, es congruente con una falta de estructura en los datos. En conclusión, el intrón de 550 pb de la calmodulina no es lo suficientemente variable para establecer relaciones genealógicas.

Las secuencias de la banda de 1500 pb sor. pobres y demasiado largas para ser secuenciadas sin oligonucleótidos internos. en 4_59 de ellos se alinean bien, mientras que un espécimen, A. Cibrian 13, presenta 200 ph iniciales no encontrados en las otras secuencias. Esto sugiere que en este caso más de un locus pudiera estar involucrado.

Intrones de la Gliceraldehído 3. fosfato deshidrogenara. El par de oligonucleótidos de

los intrones de la G3PDH produjeron una banda definida de ca. 700 pb y un par de bandas tenues de menos de 200 pb cada una. Estas últimas no fueron trabajadas. La banda de 700 pb fue secuenciada y mostró tener algo de variación.

La variación nucleotídica en las secuencias del gen codificador de G#PDH en V. Plan folia es baja. De un total de 628 sitios alineados, 123 son variables, pero sólo 6 de ellos son informativos. Es probable que algunos de estos sitios variables lleguen a ser también informativos si se incrementa el número de muestras. El número tan elevado de sitios variables podría también haberse visto incrementado por la calidad de una de las secuencias(la del cv. 'Oreja de burro' M. Soto 8536), que era menos limpia y mostró numerosos discrepancias en la alineación.

El análisis filogenético de estos datos resultó en un sólo árbol más parsimonioso de 134 pasos, CI = 0.985, HI + 0.015, Cl excluyendo caracteres no infonnativos de 0.778, HI excluyendo caracteres no informativos = 0.222.

En la Fig. 5 se muestra la geneaología inferida de la variación encontrada. El enraizamiento fue arbitrario, pues no existía evidencia de como polarizarlo, Existen tres clados con relaciones no resueltas. Uno que incluye un espéc amen aparentemente silvestre de Teapa, Tabasco, *A. Cibrián* 13, otro ciado con una planta de Usila, Oaxaca, *M. Soto 8526* más el ev. 'Oreja de burro' *M.* Soto *8536 y* un último ciado que incluye al ev. 'Mansa' M. *Soto* 8538 y el cv. 'Acamaya" M. *Soto* 8508, ambos de las plantaciones de Veracruz. Estos dos últimos clados 'Oreja de

burro"-M. *Soto 8526* y 'Mansa'- 'Acamaya`tienen valores altos de bootstrap, de 81 y 73%, respectivamente.

Isoenzimas.El Sistema R fue descartado debido a su baja resolución en varios loci. En total se tienen datos para 13 enzimas de 95 individuos coro un total de 17 loci, 14 de ellos polimórficos con al menos dos alelos distintos (ver Tabla 5). El número máximo de alelos por locus fue 4.

Variación dentro de las localidades. Las frecuencias alélicas en cada locus para las distintas localidades de Vanilla planifolia se presentan en el Apéndice 5. En todas las enzimas hay polimorfismo en al menos un locus, excepto en la RUB-1 y LAP-2 que son monomórficas en todas las localidades. En general se observa que hay algunos alelos con frecuencias muy bajas en Veracruz, como los alelos 3 y 4 de G-6PD-1 y GDH-1, mientras que estos mismos presentan frecuencias ligeramente más altas en las localidades oaxaqueñas.

El número promedio de alelos por locus (Tabla 6) en las localidades de Veracruz va de 1.2 a 1.6; de 1.5 a 1.8 en Oaxaca, de 1.4 en Tabasco, y de 1.0 en en Chiapas y San Luis Potosí. El bajo número de individuos utilizados en estos análisis podría estar afectando este resultado, pero en general, estos valores son bajos en comparación a los valores reportados para la mayoría de las plantas (Hamrick, 1996). El porcentaje de loci polimórficos es de 17.6 a 52.9 en las localidades de Veracruz, de 47.1 a 64.7 en Oaxaca y de 41.2 en Tabasco. Los valores más altos recaen en la región de Oaxaca. Si comparamos los valores promedio de estas regiones con valores reportados por Harnrick y Godt (1996) para plantas con características similares, observamos lo siguiente: las monocotiledóneas con sistemas de reproducción mixto (autocompabilidad y autocompatibilidad como Vanilla planifolia) en promedio tienen un 53% de polimorfismo. Plantas con un sistema de reproducción mixto y con una dispersión de semillas como la de Vanilla plan folia, tienen en promedio 42% de loci polimórficos. Y por último, plantas con una amplia distribución geográfica tienen un 60% de loci polimórficos. En todos los casos, los valores obtenidos para la región de Veracruz son menores a los reportados, incluso si los comparamos con reportes de otras orquideas (Arduino et al, 1995; 1996). Los valores de la región de Oaxaca caen dentro de los rangos reportados e incluso tienen valores más altos. Esto resulta interesante, pues en la región de Oaxaca es donde se concentra la mayor parte de los individuos silvestres y las plantaciones son muy recientes, muchas veces originadas con plantas silvestres provenientes de zonas cercanas.

Los valores de heterocigosis esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg son de 0.094 a 0.227 en las localidades de Veracruz, 0.217 a 0.295 en Oaxaca, y 0.255 en Tabasco. Estos valores son similares a los reportados para orquídeas de regiones templadas, que van de 0.274 a 0.50 (Arduino et al., 1996). Las heterocigosis observadas difieren de las esperadas pues se obtuvieron valores

significativamente más bajos. Se observa que las localidades de Veracruz tienen valores de cero o muy cercanos a cero, lo que indica que hay un exceso de homócigos. El valor *máximo para Veracruz es* de 0.059, que *sigue* siendo un valor bajo comparado con otras plantas. Con respecto a Oaxaca la heterocigosis observada es de 0.010 a 0.078 y en Tabasco de 0.059 Usualmente se obtienen valores de heterocigosis observadas y esperadas muy similares; cuando esto no sucede, las plantas suelen ser autcompatibles y se autofertilizan (Hedrick, 1983). Esto puede explicarse porque la mayoría de los individuos son autocompatibles. También podría ser el resultado de una selección artificial de los clones superiores en las plantaciones, pero no existe ninguna evidencia de que haya habido una manipulación genética en V. planifolia en México. El hecho de que no existan grandes diferencias en las tasas de *heterocigosis* entre las plantaciones de Veracruz (establecidas hace al menos dos siglos) y las de Oaxaca (de reciente establecimiento), apunta a que no ha habido una manipulación genética de *V. planifblia* en Veracruz.

Para conocer la heterogeneidad de las frecuencias alélicas por locus y distinguir si las diferencias encontradas entre regiones y entre localidades se deben o no al azar, se realizó una prueba de G (Sokal y Rohlf, 1981). Con la prueba de G también se e valúa la desviación de las frecuencias genotípicas para cada locus respecto a lo esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg y se determina si un locus está o no en equilibrio para todas las localidades (se excluyeron los loca monomórficos RUB-1 y LAP-2). En la Tabla 7 observamos que los valores obtenidos para todos los loci, excepto ACPH-1, son significativos (p<0.05). Esto quiere decir que todas las localidades son diferentes entre sí y que todos los loci, menos ACPH-2, están fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg. Un resultado similar se obtuvo al analizar las frecuencias genotípicas de cada locus con una chi-cuadrada, donde los únicos loci que no resultaron significativos son ACPH-1 y DIA-1.

Se calculó el índice de fijación F (Tabla (•) para cada locus de cada región. Este índice relaciona la proporción de homócigos observados y heterócigos esperados en promedio de una subpoblación. Si el único factor afectando las frecuencias genotípicas es la endogamia, el rango de esta expresión es de 0 a 1 y da una estimación del coeficiente de endogamia, aunque factores como selección, migración y deriva génica pueden afectar el resultado. En Vanilla planifolia se observa que la mitad de los valores obtenidos para la región de Veracruz, muestran valores de 1, lo que significa que hay una mayor proporción de individuos homócigos que heterócigos en al menos 50% de los individuos. El valor más bajo de *este* parámetro en Veracruz corresponde a la localidad de Joloapan (0.443), donde se encuentran, entre otras, *plantas del cv. "Oreja de burro"*, que son autoincompatibles. En Oaxaca, Tabasco, Chiapas y San Luis Potosí se observan valores cercanos a .. Estos resultados indican que las localidades están fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que coincide con

igual que los índices de Wright, un valor de 1.00 en 11 de los 17 loci analizados. Las medias de f y F son 0.9015 y 0.9159 respectivamente, similares a los valores obtenidos con la Fis y Fit de Wright. Ambos resultados indican que hay altos niveles de endogamia. Sin embargo, la Tetha calculada tiene un valor mínimo de -0.0389 (DIA-2) y un valor máximo de 0.3975 (ME-1), con un promedio de 0.1462. Este valor es bajo y difiere del obtenido con la F_{st}, pues sugiere que existe una estructura menos definida en las localidades de Vanilla planifolia. Para algunas orquídeas se han reportado resultados similares (0.179) utilizando la G_{st} de Nei (1973), comparable con los resultados de F_{st} y Tetha. Cabe mencionar que el estadístico propuesto por Weir y Cockerham es sensible al tamaño poblacional y en general resultan valores más bajos que los obtenidos con la F_{St}, lo que en parte explica la diferencia del valor obtenido por F_{St} Fluho génico. Se agruparon las localidades en 3 regiones Puntilla Aldama, Papantla y Oaxaca y se calculó el flujo génico de manera indirecta mediante la F_{sT}., de Wright y la Tetha de Weir y Cokerham. Este parámetro muestra el *flujo de* genes entre las poblaciones, pues determina el grado en el cual cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo de genes entre las poblaciones, entonces las poblaciones evolucionan juntas, pero si existe poco flujo de genes cada población evoluciona casi independientemente (Slatkin, 1994). Los valores promedio obtenidos para Vanilla planifolia mediante F_{St} son bajos (0.212) en comparación con otras plantas (Slatkin, 1987). En general valores de Nm menores a 1.0 representan situaciones donde el flujo génico es bajo y la deriva génica juega un papel importante en la estructura genética de las poblaciones (Hamrick, 1990); valores mayores de 1.0 no permiten la diferenciación. Los resultados de flujo génico obtenidos por FsT sugieren que en V. planifolia existe un bajo número de migrantes entrando y saliendo de cada población por generación y que hay poblaciones bien definidas. Esto apoya la suposición de que existe una estructura genética definida entre localidades y de que la deriva génica podría ser un factor importante para esta estructuración.

El valor promedio obtenido con Tetha es mayor a 1 (1.54) y la mayoría de los loci difieren de los obtenidos con F_{St} , en particular el locus DIA-2 cuyo valor es de 14.0. Este valor es muy alto en comparación con otras plantas e incluso con los demás *loci analizados de Vanilla planifolia*. En la Tabla 9 se muestran los valores de flujo génico entre pares de poblaciones estimados a través de M. Se observa que el flujo génico es bajo entre Oaxaca y las localidades de Puntilla Aldama (2.19) y Papantla (3.84). Entre Papantla y Puntilla Aldama el flujo génico es mayor (6.22). Esto *es* congruente con lo que esperabamos, ya que sabemos que hay un intercambio más intenso entre individuos de la región de Veracruz.

Por otro lado, para explorar si existe un patrón de aislamiento por distancia, se estimaron los niveles de flujo génico por pares de poblaciones utilizando el método propuesto por Slatkin (1993), obteniéndose M. La correlación entre la matriz de

lo obtenido por la prueba de G y la chi-cuadrada. Es muy probable que esta desviación del equilibrio se deba principalmente a la deriva génica.

Cabe resaltar que en casi todos los parámetros que describen los niveles de variación para Vanilla *planifolia*, la variación genética es mayor en las plantas silvestres o provenientes de plantaciones recientes (Oaxaca) que en las plantas cultivadas o provenientes de plantaciones antiguas (Veracruz). En las plantaciones no hay reproducción sexual pues la propagación de las plantas es por esquejes, por lo que las diferencias en variación y estructura genética entre Veracruz y Oaxaca, puede ser el resultado de diferencias entre las poblaciones que les dieron origen.

Las isoenzimas sugieren la existencia ele más genotipos en las plantaciones y localidades de los que originalmente eran esperados. En vista de ello, parece adecuado hacer un muestreo más extenso por plantación, tanto de Oaxaca como de Veracruz.

Variación dentro y entre regiones. Estructura genética. En la Tabla 8 se resumen los valores obtenidos de los índices de Wright y de Weir, que indican la estructura genética de las poblaciones. En cuanto a los índices de Wright, Fis, que estima la diferenciación a nivel regional, tiene un único valor negativo de -0.338 en el locus ACPH-2, mientras que el valor máximo es de 1.00 para 11 de los 17 loci. El promedio es de 0.869, valor muy alto, que indica que existe un exceso de homócigos en relación a los esperados a nivel subpoblacional y que la endogamia es un factor importante en la estructura de la población. Con respecto a la FIT, que mide la diferenciación total, nuevamente se observan valores muy altos. Al igual que el anterior, el valor negativo, -0.081, se encuentra únicamente en el locus ACPH-2 y hay valores de 1.00 para 11 de los 17 loci analizados.

Uno de los parámetros más informativos es la F_{sT} , que mide la cantidad de diferenciación genética entre subpoblaciones en relación a un grupo hipotético de subp^oblaciones, cada una homóciga pero con el mismo promedio global de frecuencias alélicas que las subpoblaciones reales. Cuando F_{sT} es diferente de cero, existe una parte de la variación repartida entre poblaciones, por lo que hay una estructura genética originada por migración o flujo génico. Cuantitativamente hablando, el rango de 0.05 a 0.15 para F_{st} indica una diferenciación moderada, de 0.15 a 0.25 hay diferenciación y arriba de 0.25 existe una diferenciación muy marcada (Hartl, 1980). En Vanilla planifolia obtuvimos un valor de F_{sT} , de 0.364, lo que indica que hay una diferenciación muy marcada, causada principalmente por deriva génica. Este resultado se obtuvo excluyendo a las localidades de Tabasco, Chiapas, San Luis Potosí (regiones con uno o dos individuos), pues si se incluyen en el análisis el valor o atenido aumenta hasta casi 0.45. Las localidades de Veracruz son claramente distintas de las de Oaxaca.

Por otro lado, tanto la f como la F de Weir y Cockerham tienen un único valor negativo en el locus ACPH-2 de -0.1405 y -0.C 664 respectivamente, y al

las distancias geográficas versus la matriz de M se analizó con **la** prueba de Mantel. Es importante resaltar que para éste análisis se agruparon la; localidades en 5 regiones, Puntilla Aldama, Papantla, Oaxaca silvestres, Oaxaca cultivadas y Chimalapas. Al graficar el logaritmo de las distancias geográficas versus el logaritmo de los valores de M, no se observa un patrón claro de aislamiento por distancia. La pendiente tiene un valor de 0.00, el valor de correlación es muy bajo (r=0.30); Fig. 6). Esto muestra que la distancia no influye en la estructura poblacional (al menos en los loci estudiados) y que los niveles de flujo génico no varían conforme aumenta la distancia geográfica. Los valores de M para pares de poblaciones van de 0.342 a 6.219, lo que corrobora que existe poco flujo génico entre la mayoría de las poblaciones. Los valores de p oscilan entre 0.1748 y 0.8352, y por lo tanto no son significativos (p50.05).

Tasas de entrecruzamiento. Se calcularon las tasas de entrecruzamiento de manera indirecta para dos regiones, Veracruz y Oaxaca. La tasa de entrecruzamiento encontrada en la región de Veracruz es de 0.106 mientras que para Oaxaca es de 0.08 19 Estas son mugir bajas comparadas con la media reportada en hierbas (0.42), aunque la moda reportada para estas plantas se encuentra entre valores de 0.0 y 0.1, ya que la mayoría de las hierbas se autofecundan de manera casi exclusiva (Eguiarte, 1990).

Las tasas de entrecruzamiento obtenidas sugieren que el sistema reproductivo predominante en Vanilla planifolia es por autofecundación. Observamos que la tasa de entrecruzamiento de Veracruz es ligeramente mayor que la obtenida para Oaxaca, donde están la mayoría de individuos silvestres. Es probable que este resultado se deba a la presencia en Veracruz del cultivar "Oreja de burro", que se caracteriza por ser autoincompatible. Usualmente los niveles de variación genética correlacionan positivamente con los niveles de entrecruzamiento en las poblaciones o en las especies (Hamrick y Godt, 1989). En el caso de Veracruz, los niveles de variación y la tasa de entrecruzamiento son muy similares (valores muy bajos), lo que refuerza la idea de que la endogamia es un factor importante en la disminución de heterocigos en *Vanilla planifolia*. En Oaxaca la tasa de entecruzamiento es muy baja para los niveles de vari ación genética obtenidos, lo que podría atribuirse que los individuos hasta ahora observados son todos autocompatibles.

Sabemos que en Vanilla planifolia hay altos niveles de endogamia y que ha existido una selección (artificial) en contra de la variación para disminuir la incidencia de clones autoincompatibles, sin embargo *Vanilla planifolia* tiene un sistema mixto de reproducción en el que no conocemos la proporción real de individuos autocompatibles y autoincompatibles. Lande y Schemske (1985) sugirieron un modelo que demuestra que existe una tendencia evolutiva hacia uno u otro sistema reproductivo dependiendo de la historia de la especie, a los cambios ambientales y a las fuerzas evolutivas. Si una especie de larga historia ha sufrido cuellos de botella y baja eficiencia del polinizador entonces tendrá una baja depresión endogámica y se sele^ccionará la autofecundación

como sistema de reproducción. Si por otro lado *la especie se* distingue por tener poblaciones grandes que se entrecruzan, habrá un aumento en la endogamia y se seleccionarán mecanismos para prevenirla. En 1991, Holsiiiger propone que no siempre se seleccionará uno u otro sistema, sino que un sistema reproductivo mixto es evolutivamente estable siempre y cuando la autofertilización pueda evolucionar.

Las plantas cultivadas usualmente tienden a cambiar de un sistema reproductivo a otro debido a la selección artificial a la que están sujetas. Lande y Schemske (1985) en su modelo genético de depresión endogámica sugieren que especies que se autofertilizan pueden evolucionar con mayor facilidad a partir de especies con altos niveles de entrecruzamiento y no viceversa. Esto se aplica a las plantas cultivadas, donde la elección de individuos autoeompatibles que faciliten el cultivo tiende a homogeneizar la variación genética. Si bien es probable que exista poca variación genética en el sistema de reproducción en las plantas de Veracruz, sería interesante analizar las probabilidades de que Vanilla planifolia llegara a un sistema evolutivo único en algunos años debido a la selección artificial a la cual está sometida, al bajo número de individuos silvestres y en general a la historia de la especie. Distancias genéticas Entre localidades. Las distancias e identidades genéticas de Nei calculadas para todos los pares posibles de localidades y de regiones de Vanilla planifolia se muestran en Tabla 10a La distancia genética puede tomar valores de 0 a infinito. Si las frecuencias alélicas son iguales, D será igual a 0, y su valor irá aumentando conforme las frecuencias alélicas se vayan diferenciando. La identidad genética toma valores de 0 al; es de 1, si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas y de 0 si no comparten alelas. (Nei, 1987)a Entre Plan de Limón, Ver. y La Gran Lucha, Oax., existe una identidad de 1.0, lo que significa que tienen frecuencias alélicas idénticas. El valor mínimo de identidad es de 0.523, entre las localidades de Chiapas y Joloapan, mientras que la distancia máxima entre las localidades de Veracruz es de 0.996, entre Domínguez-Rafael Rosas y Rafael Cardeña-Zaragoza. En Oaxaca la idertidad máxima entre localidades es de 0.982, entre La Gran Lucha y San Agustín, y la mínima de 0a915 entre las localidades silvestres de Oaxaca y Cerro Verde.

El dendrograma obtenido por UPGMA utilizando las distancias genéticas de Nei (1987) no presenta una estructura tan definida como sugieren los resultados de estructura génica (F_{ST}). Sin embargo se observa una agrupación de las localidades de Veracruz, con excepción de Pueblillo, Solteros de Juan Rosas y Plan de Limón (localidades agrupadas con las plantaciones de Oaxaca), así como Joloapan que se encuentra muy separada del resto de las localidades. En esta localidad (así como en Ojital) se encuentra el cultivar "Oreja de burro".

Las plantaciones de Carlos Acosta y El Grango se localizan muy cerca una de otra en Puntilla Aldama y se sabe que se originaron a partir de un sólo esqueje, al igual que la de Miguel Acosta que contiene un sólo individuo variegado que se mantiene

por curiosidad (cv. "Acamaya"). Era de esperarse entonces que a excepción de esta últi ma todas las muestras de estos sitios tuviesen el mismo genotipo, lo cual no es así. En el dendrograma tampoco están agrupadas en la misma rama, y aunque las distancias entre ellas son muy pequeñas, estas distancias no son particularmente próximas comparadas con otras de Veracruz.

Por otra parte, la plantación de Rafael Cardeña en Papantla también se originó a partir de la de Carlos Acosta y en el fenograma se observan muy cercanas. Es muy probable que las plantaciones de C. Acosta, Cardeña, Zaragoza, Riva Palacio y El Gringo que en el dendrograma están en un grupo muy cercano, provengan de un solo esqueje. La única localidad silvestre de Veracruz, en Atoyac, se encuentra asociada a Isla de Juan Rosas, lo que sugiere que pudiera ser una planta escapada, más que silvestre. Al menos las localidades donde se conoce la existencia de más de un cultivar (Primero de Mayo, Miguel Acosta, Ojital y Joloapan) presentan mayores distancias que aquellas donde se conoce solamente uno.

Las plantas silvestres de Oaxaca se encuentran relativamente aisladas, pero algunas plantaciones están agrupadas con las plantaciones de Veracruz, como se menciono anteriormente (en particular Plan de Limón y La Gran Lucha que son idénticas). Es muy probable que algunas plantaciones oaxaqueñas se hayan establecido con plantas provenientes de Veracruz. En otras localidades oaxaqueñas (no incluídas en este trabajo) se ha podido constatar que el origen de las plantas es veracruzano. Tabasco se encuentra dentro del grupo que incluye tanto localidades oaxaqueñas como veracruzanas, probablemente porque uno de los genotipos de Tabasco (A. Cibrián 14) parece ser indistinguible de otro de Veracruz y el otro (A. cibrián 13) muy diferente de todos los demás.

Disitancias genéticas entre regiones. El dendrograma que incluye a las regiones de Puntilla Aldama, Papantla, Oaxaca, Tabasco y Chimalapas aparece en la Fig.8. La pos ción de Chimalapas es basal debido a que incluye un sólo individuo, que es un gen tipo distinto. Las otras regiones forman dos grupos bien definidos, Norte de Veracruz y Oaxaca-Tabasco, siendo la distancia entre Puntilla Aldama y Papantla menor a la que existe entre Oaxaca y Tabasco. El fenograma sugiere una estructuración entre las regiones.

Análisis de parsimonia entre genotipos de Vanilla planifolia. El otro análisis con los datos de isoenzimas consistió en un análisis de parsimonia donde se incluyó cada uno de los distintos genotipos, lo cual permite suponer que *generaría una* genealogía de ellos. El número de árboles igualmente parsimoniosos nunca fue encontrado en distintas búsquedas heurísticas, y se analizo el máximo de árboles que la memoria de la computadora permitía almacenar (20,100). Los árboles consenso resultantes se calcularon de distintas maneras, estricto, semiestricto, de Adams y de regla de mayoría de '0%. En este último se calculó también un árbol que presentara otros agrupamientos

compatibles. El árbol de consenso estricto no presenta ninguna estructura, mientras que el árbol de mayoría de 50% que muestra otros agrupamientos compatibles fue el que mayor estructura tenía. En la Fig 9. se presenta este árbol. No fueron calculados valores de pootstrap, pues el gran número de árboles no lo permitía, y la alta incidencia de homoplasias, la existencia de más muestras que caracteres y otros atributos adicionales de los datos sugería que ningún valor de bootstrap alcanzaría un porcentaje mayor al 50%. Árboles de consenso de distintas búsquedas heurísticas fueron similares. Este cladograma no muestra una correlación evidente ni con los taxa, ni con los cultivares, ni con los clones, ni con las regiones geográficas. Pero los individuos más distintos están agrupados en muy distintos clados, lo que sugiere una correlación aunque poco estricta.

Las muestras de V. *insignis y V. perplexa* fueron definidas como grupos externos, y sin embargo, los datos no permitieron que los especímenes de V. *planifolia* formaran un grupo monofilético. No es posible caracterizar o identificar especímenes de *V. planifólia* mediante datos de estas isoenzimas.

Se incluyeron muestras de los cultivares "Oreja de burro", "Mansa" y "Acamaya". Los distintos especímenes de cada cultivar no se agrupan formando grupos monofiléticos o siquiera parafiléticos. No es posible caracterizar o identificar los cultivares de *V. planifolia* mediante estas isoenzimas.

Las muestras MA58483, 8494 y 8498 fueron encontradas formando un "stand" silvestre. La morfología y las condiciones ambientales parece sugerir un sólo clon, o en el peor de los casos especímenes con relaciones de parentezco. Ellos no conforman un grupo monofilético, aunque si forman un ciado parafilético. Como ya se mencionó, las plantaciones de M. Acosta y C. Acosta de: Puntilla Aldama, Veracruz provenían de divisiones de un sólo esqueje inicial, y que fueron también el origen de la plantación de Cardeña en Papantla. Estos especímenes, que deben ser un mismo clon, están ampliamente diseminados en los distintos dados del árbol. No es posible caracterizar o identificar clones de V. planifolia mediante estas isoenzimas.

Los especímenes ACJ 13, MAS 8480, MAS 8111 y MAS 8486 y GS

5868 son muy distintos. Ya sea por presentar rasgos morfológicos que los permiten identificar, comportamiento reproductivo atípico (e.g. autopolinización) o por ser especímenes silvestres de áreas lejanas. Estos especímenes se encuentran ampliamente dispersos en el árbol, lo que sugiere que las isoenzimas aunque no sean tan útiles para reconocer cultivares o clones, si muestran una correlación con la variación de la espacie. También es importante señalar que en el árbol existen clados conformados exclusivamente o casi, por especímenes de una región geográfica particular. Aunque otras clados abarcan especímenes de muy distintas regiones.

En conclusión el análisis de parsimonia de los genotipos no es muy sólido ni muestra una estructura clara de las relaciones genealógicas de *Vanilla planifolia*. La aparente homogenización puede ser resultado) tanto de la baja resolución

de la técnica, como de factores biológicos que la promuevan, como la dispersión de polen y semillas a gran distancia. En este momento no es posible determinar cuál es el grado de influencia de éstas variables.

Diversidad genética. Se calculó el índice de diversidad de Shannon-Weaver a nivel global (todos lo genotipos de todos los individuos) y a nivel de regiones, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas y San Luis Potosí (ver Tabla 1 l.). Los valores obtenidos de H son altos en comparación con otras plantas, incluyendo los valores calculados de equitatibilidad, que en algunos casos son de 1.00, lo que indica que hay igual número de individuos que de genotipos.

Los resultados del análisis de diversidad son incompatibles con la existencia de una extensiva propagación vegetativa. Si una- plantación se origina de un sólo clon y plantaciones con un sólo genotipo dan lugar a otras más, se esperaría que los índices de diversidad y equitatibilidad tuvieran valores muy bajos, al menos en Veracruz, donde el cultivo de la vainilla se ha practicado por algunos siglos. Los valores de diversidad en Oaxaca sugieren que todos los especímenes colectados corresponden a genotipos distintos, lo cual tampoco factible, aunque suponíamos que la diversidad genotípica era mayor porque las plantaciones se originaron de muchos especímenes silvestres hace menos de diez años.

DISCUSIÓN

Secuencias nucleotídicas. Una vez determinado que existe variación en la secuencia nucleotídica en los intrones de CaM y GapC4, aun queda por resolver el tipo de homología que se establece entre los variantes observados. La historia de estos genes es poca conocida y se desconoce si las relaciones observadas son parálogas u ortólogas.

La calrnodulina es una pequeña proteína que se une al calcio en todos los organismos eucariotas, aparentemente con funciones regulatorias en muchas otras proteínas "blanco". El número de bandas amplificadas con los oligonucleótidos utilizados puede ser reflejo de que existen varios genes de la misma familia multigénica de CaM. Cada banda puede representar un locus distinto, y l. as diferencias de tamaño de las bandas podría ser atribuidas a variación en la longitud del intrón entre loci duplicados.

No fue posible establecer una hipótesis de homología de ninguna de las bandas de CaM amplificadas con alguna de las secuencia conocida. Probablemente porque se trata de un intrón con una tasa de substitución alta, y no es posible alinear alguna de las partes a una región codificadora más conservada. Variación intraespecífica en el único intr-n del gen de la Calmodulina en Plasmodium, *falcipcarwn* ha sido previamente reportada (Robson, 1993). En el gen CaM-3 de *Arabidopsis* existe un sólo intr-n de 491 pb.

El número de genes de Calmodulina reportados en distintos organismos es de uno en *Plasmodium falciparum (Robson, 1993), Saccharoinyces cerevisiae, Dictyostelium discoideum, Drosophila melanogaster y Aspergillus nidulans, 2* en sapos

(véase Davis et al., 1986), 3-4 genes (otro gen similar y al menos 5 seudogenes sin intrones) en humanos (Rhyner *et al.* 1994), 3 en ratas (Nojima H, 1989) y 3 en *Arcabidopsis* (Perera y Zielinski, 1992).

Los productos de las regiones codificadoras de distintos genes de Calmodulina en humanos y pollos (Ye y Berchtol, 1997) es idéntica, lo que se conoce como el principio de "multigenes-una-proteína". En Arabidopsis el polipéptido codificado por ACaM-3 es idéntico al codificado por ACaM-2 y difiere del codificado por ACaM-1 en 4 de 148 residuos (Perera y Zielinski, 1992). Sin embargo, existe evidencia de que los intrones (la región no transcrita) están involucrados en la regulación del gene. En Arabidopsis las diferencias en la acumulación de ACaM-I, -2 y -3 mRNA en ciertos tejidos es atribuible a diferencias en las tasas netas de transcripción.

No es posible en este momento establecer cual es la relación entre las secuencias de calmodulina obtenidas. Los árboles y la información disponible sugieren fuertemente relaciones parálogas entre ellas. Esto, aunado a la variación tan baja que fue encontrada, la descartan como una región potencialmente informativa para nuestros pro pósitos.

Con respecto a las secuencias del gen codificador de la G3PDH, éstas fueron contrastadas contra todo el GenBank por medio de BLAST. Las búsquedas sugirieron distintas secuencias con las que se compartía más similitud, todas ellas reportadas como codificadoras del genes de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Se analizaron por métodos de parsimonia usuales las 12 secuencias más similares a las obtenidas en Vanilla. Con esto pudo determinarse con cierta confianza que la secuencia de v. planifolia era muy probablemente homóloga al gen GapC4 de maíz (GenBank accession number X73152) y al gen GapCP1 de Pinus sylvestris (Gen Bank accession nuniber XAJO01706). Estas dos secuencias y la de V. planifolia formaron un ciado bien. definido (con un porcentaje de bootstrap de 85%) y distinto de otros genes codificadores de la G3PDH.

Las secuencias de *V. planifolia* se alinean bien con los exones 8, intrón 8, exón 9, intrón 9 exón 10 e intrón 10 de GapC4 de maíz. Así mismo determinamos *que existe poca* divergencia en los productos de las regiones codificadoras(secuencia de aminoácidos producto de la traducción de los exones), tanto en pino, como en maíz y vainilla. Sin embargo, existe gran divergencia en las secuencias de los intrones entre los tres taxa.

La estructura completa del gen GapC4 de maíz incluye pequeños intrones y exones intercalados, el menor de 23 y el mayor de 1458 pares de bases. Esta estructura permite alinear con precisión los exones, que tiene un tamaño muy

conservado y estimar la divergencia en los intrones donde las tasas de substitución son tan altas, pero que no se pueden hacer las alineaciones adecuadas entre taxa distintos. La estructura del gen GapC4 es idónea para la búsqueda de variación intraespecífica.

Un problema aun, no totalmente resuelto son el tipo de relaciones (parálogas u ortólogas) que guardan las secuencias de GapC4 de V. planifolia, aunque su gran similitud y congruencia geográfica apuntan hacia que son ortólogas. Sin embargo es posible encontrar evidencia acerca del tipo de homología empleando el método de Southern Blotting, el cual estamos realizando actualmente.

Las secuencias casi idénticas de los cultivares 'Mansa'y 'Acamaya' sugieren que 'Acamaya' podría ser una mutación somática de 'Mansa'.

Estos datos *sugieren* que las secuencias de GapC4 son útiles como marcador molecular para determinar el origen de los distintos especímenes, pero probablemente no muestra suficiente variación para realizar un análisis de coalescencia. Conociendo la estructura de GapC4 y que muestra variación en V. *planifolia*, hemos diseñado oligonucleótidos *para amplificar* una zona mucho mayor (ca. 1700 pb) para *maximizar* la probabilidad de encontrar variación. Debido a que *la secuenciación* de todos los especímenes colectados y de otros más por colectarse de V. planifolia puede ser extremadamente cara, se requiere evaluar la variación con técnicas más sencillas que la secuenciación directa, como análisis de fragmentos de restricción (RFLP) con endonucleasas de restricción, análisis de heteroduplex, SSCPs (single-stranded conformation polymorphism) o electroforesis en gel de gradientes desnaturalizados.

Los resultados son tan prometedores que seguimos trabajando en obtener más información de esta región genómica.

Isoenzimas. Es muy probable que la técnica de isoenzimas esté sobrestimando el número de genotipos reconocidos. Es particularmente raro que los especímenes de plantaciones que se sabe se establecieron de un sólo esqueje tengan genotipos diferentes. Una alternativa podría se que las diferencias se deban a mutaciones somáticas; otra que la técnica no esté permitiendo reconocer la existencia de identidad genotípica, y otra más que nuestra información sobre la historia de las plantaciones sea errónea.

La existencia de mutaciones somáticas es bien conocida entre plantas cultivadas, de hecho en existencia de "sports" ha sido descrita en muchos otros cultivos, especialmente de árboles frutales que se injertan. La presencia de individuos variegados (cv. Albomarginata en Madagascar o Acamaya en México) podría ser el resultado de tales mutaciones. Sin embargo, la variación electroforética observada es probablemente mayor que la esperada por mutación somática, aunque no *se* puede por el momento hacer una estimación precisa, pues se desconoce el número de meristemos, la tasa de

crecimiento y el tiempo que han estado establecidas la mayoría de las plantaciones, como para hacer una estimación de las tasas de mutación.

La actividad de las enzimas estudiadas podría estar afectada por el ambiente celular, o ser regulada por distintos loci que se expresan de distinta forma. Muchos de los estudios de variación genética con isoenzimas se han llevado a cabo en especies con follaje de corta vida, o a partir de semillas puestas a germinar, lo que iguala muchas de las condiciones ambientales que podrían afectar a las enzimas del metabolismo basal. En estas mismas especies de corta vida es factible realizar experimentos de cruzas y determinar la heredabilidad de los electromorfos, pero no es posible hacerlo en vainilla en un periodo razonable de tiempo.

En Vanilla la existencia de hojas de muy larga vida, que muestran metabolismo CAM, podría afectar notablemente la expresión de las isoenzimas, dependiendo del momento del día en que se colectó la hoja y su longevidad. Entre los especímenes de Puntilla Aldama que se tiene conocimiento que pertenecen a un sólo clon, se encontraron de 1 a 5 alelos distintos. Sin embargo, los especímenes que muestran mayor número de alelos distintos con respecto al genotipo más común de Veracruz son aquellos que muestran flores y hojas con marcadores morfológicos, como ACJ 13, MAS 8480, MAS 8111 y MAS 8486 y GS 5868, lo que sugiere que si bien no son tan precisos, los datos electroforéticos más dispares podrían estar fuertemente correlacionados con los especímenes morfológicamente más diferentes.

El hecho de que el análisis de parsimonia no encuentre un número finito de árboles, puede ser resultado de que la información de las isoenzimas carece de estructura. La baja estructuración en este análisis también puede deberse a que las diferencias entre las poblaciones son más cuantitativas (frecuencia alélica) que cualitativas (presencia/ausencia de un alelo derterminado). Varios de los genotipos de Veracruz difieren entre sí en un sólo alelo, por lo que es igualmente parsimonioso, en número de pasos, que sea colocado como grupo hermano de un genotipo, que junto a otro distinto.

Por el momento la pregunta de cuantos genotipos conforman las plantaciones de vainilla de México aún no puede responderse apropiadamente. Si bien las secuencias de las regiones hipervariables podrían ayudar a responder esta pregunta, tal vez sea necesaria una técnica más resolutiva, como los AFLPs para poder tener un marcador "fingerprintting" que nos permita decir inequívocamente cuantos clones existen.

Distribución geográfica de la variación, origen y domesticación del cultivo. La selva alta perennifolia de México está constituida por tres distintos manchones aislados unos de otros. A) el Soconusco, B) la región norte, poco extensa, de la Huasteca de San Luis Potosí y Puebla y el N de Veracruz, y por último C) la región sur, más extensa, del S de

Veracruz, N y NE de Oaxaca, y N y NE de Chiapas. El aislamiento y suelos graníticos y volcánicos del Soconusco deben ser factores importantes para explicar por qué V. planifolia no se distribuye en esa área.

A pesar de que Papantla (en la región norte) es ampliamente conocida ahora como productora de vainilla, se desconoce si fue el sitio de origen e introducción al cultivo. Registros del siglo XVI apuntan que la vainilla provenía de "Cuetlaxtlan", que podría ser Cotaxtla, en la Planicie costera de Veracruz o Cuetzalan, en Puebla, muy cerca de Papantla. Sin embargo, otras crónicas del siglo XVI mencionan igualmente Tabasco, y otras posteriores señalan Oaxaca.

El origen del cultivo, entonces, parece haber ocurrido en la región norte. Sin embargo, esto puede ser cuestionado porque no existen registros de poblaciones silvestres allí, y salvo el pie de monte, lejos de Paantla, la región norte parece ser excesivamente seca para la especie. Existen registros de poblaciones silvestres en distintas áreas de la región sur, y se sabe que fue una planta cultivada o al menos recolectada en esta región al final del siglo XVIII, pero que su utilización y/o comercialización desapareció totalmente hasta resurgir cerca de 1988.

Nuestros distintos conjuntos de datos sobre la estructura genética de V. planifolia no son todos congruentes entre sí. Algunos (e.g. Fig. 8) muestran una clara separación de las áreas de las regiones sur y norte, si bien con la región norte en una posición anidada, respecto a la región sur. Otros análisis muestran menos evidentemente esta separación (Figs. 7, 9 5, 4). En general puede decirse que casi todos los datos apuntan que los especímenes de la región norte son una muestra de los de la región sur, aunque haya existido cierta diferenciación. Esto es congruente tanto con la hipótesis de que el cultivo es originario de la región norte, como con la hipótesis de que fue llevado desde la región sur.

La región sur y la región norte están separadas en la actualidad por la zona seca del centro de Veracruz, pero evidentemente son regiones vicariantes entre sí. Los especímenes originales de la región norte deben haber representado una muestra de la especie en la región ancestral (sur-norte), por lo que su posición anidada entre los especímenes de la región sur, es congruente con la hipótesis vicariancista, si como suponemos la existencia de la barrera es muy reciente, o con la hipótesis del translado desde la región sur.

Sin embargo, el hecho de que la variación genética en el norte de Veracruz no sea notoriamente más baja que en el norte de Oaxaca, sugiere más que V. planifolia si es nativa del la región norte y que se extinguió ahí en estado silvestre. La variación de los datos electroforéticos no sustenta la idea previa de que en el norte de Veracruz la diversidad genotípica estaba reducida a 3 o pocos clones. La variación genética en las plantaciones del norte de Veracruz no parece haber sido afectada notoriamente por el manejo. Vanilla planifolia no es una especie propiamente

domésticada, pues no existe evidencia alguna de haber sido manipulada genéticamente, ya sea mediante selección de líneas mejoradas o hibridación. La manipulación ha sido únicamente respecto a la menor o mayor propagación de clones determinados.

La extinción de las poblaciones silvestres en la región norte pudo haber sido una situación análoga a la que está ocurriendo *actualmente con las* poblaciones silvestres de Oaxaca, donde los especímenes silvestres son *removidos para su* establecimiento en las plantaciones, con graves consecuencias para su sobrevivencia en estado silvestre.

Relación entre la variación genética y modos de producción, campesino, indígena y pequeños propietarios. La mayor parte de las plantaciones de V planifolia son manejadas por comunidades indígenas ylo campesinas. Sólo una plantación de propietarios particulares es tecnificada (Faibre, cerca de San Rafael Veracruz y establecida con material de Puntilla Aldama). Otras plantaciones de propietarios particulares no difieren de las indígenas/campesinas en origen del material y manejo. En la mayor parte de las localidades un mismo campesino puede tener una participación en la plantación del ejido o comunidad y mantener así mismo una plantación por su cuenta.

La mayor parte de la variación genética está en las comunidades indígenas, especialmente Mazateca y Chinanteca de Oaxaca y en segundo lugar entre los ejidatarios de las plantaciones del norte de Veracruz. Debe *tenerse* en cuenta, que el material del norte de Veracruz, aunque no tan diverso como el del norte de Oaxaca, puede contener clones superiores desde el punto de vista agronómico.

Debe mencionarse que una buena parte de la diversidad genética debe estar resguardada en los pocos especímenes cultivados *en huertos familiares*, especialmente en regiones apartadas de Oaxaca, Chiapas y Tabasco.

Propuesta de manejo y conservación de este recurso

La conservación de los recursos genéticos de Vanilla planifolia debe considerar los siguientes puntos:

- 1) Distribución "alargada" y tal vez originalmente vicariante. Se extiende sobre muchos cientos de kilómetros, pero en una franja muy angosta.
- 2) Alta especificidad de hábitat (pie de monte).
- 3) Densidades poblacionales extraordinariamente bajas.
- 4) Sistema reproductivo denso-dependiente.
- 5) Variación genética baja y distribución de la variación regionalmente estructurada.
- 6) Individuos silvestres distribuidos en pequeños parches generalmente no incluídos dentro del sistema de Arcas Naturales Protegidas.
- 7) Especímenes silvestres en áreas degradas y/o sujetas a fuerte disturbio y modificación del hábitat.
- 8) Especímenes silvestres bajo presión de colecta extremadamente alta. 9)
- :Propagación clonal extensa en las plantaciones.
- 10) Pérdida de material genético por mal manejo de las plantaciones.
- 11; Semillas que no se pueden almacenar en bancos de semillas.
- 12) Dificultad para el mantenimiento de "bancos de germoplasma de campo" por el gran tamaño de los especímenes y requerimientos culturales estrictos. 13;) Altos costos de mantenimiento y *riesgos de pérdida del* material con un banco de germoplasma in vitro.

Considerando estos puntos puede establecerse que la conservación ex situ es potencialmente más importante que la conservación in situ. Recomendaciones sobre las áreas de mayor diversidad genética y/o prioritarias para b conservación de los recursos genéticos de la Vainilla planifolia, susceptibles para conservación in situ. La mejor manera de conservar los recursos genéticos de Vanilla planifolia debería ser conservar el hábitat natural donde todavía crece. Desafortunadamente estos sitios están fragmentados, alterados o muy transformados, y frecuentemente se asocian a zonas de alta población. No se ha localizado una sola población saludable o numerosa en México. Probablemente lo más cercano a ello son los especímenes conocidos de la región de Sta. Ma. Chimalapa, en el Istmo de Tehuantepec, y los pocos especímenes que han sobrevivido a la sobrecolecta dentro de los terrenos comunales de los ejidos de la región de Ayozintepec. En cualquier caso el número de individuos es mucho menor del número mínimo recomendado para el mantenimiento de poblaciones viables.

La conservación in situ de la variación genética de *V. planifolia* no parece ser una estrategia viable bajo las condiciones actuales, aunque deben hacerse esfuerzos por favorecer la permanencia en estado silvestre de los pocos individuos conocidos.

Las selvas sobre karst en la región de Ayozintepec contienen muchas otras especies de distribución restringida, tales como Dioon spinulosum y Chamaedorea metallica. La permanencia de los fragmentos de selva probablemente está asegurada, pues lo abrupto del terreno imposibilita su uso pecuario o agrícola. En la práctica algunas de estas zonas funcionan como reservas ejidales forestales. Sin embargo, la permanencia de las vainillas no está asegurada con la permanencia del hábitat debido a la sobrecolecta de la que es objeto. Un sólo espécimen silvestre puede representar una entrada de dinero inusual, con su venta como esquejes, y tales especímenes eran o son buscados con mucho esfuerzo por parte de los pobladores locales. Una "cacería" de V. planifolia para localizar un sólo espécimen silvestre podía durar más de una semana antes de que se extinguiera en muchas regiones.

Recomendaciones para la conservación ex situ. La conservación ex sitas podría ser una alternativa más viable para conservar los recursos genéticos de V planifolia.

Un punto importante es la permanencia en las plantaciones de los genotipos actuales, la cual no es de ninguna manera segura debido al manejo técnicamente deficiente de los vainillales. Muchos genotipos valiosos pueden estarse perdiendo en Oaxaca por el abandono de las plantaciones, entre *ellos* algunos de los más distintos, como los de Cerro Verde.

Segundo, es necesario favorecer la diversidad genética de las plantaciones. En la actualidad existe una tendencia a establecer plantaciones del cv. Mansa, especialmente con esqueje de las plantaciones de Puntilla Aldama, Veracruz, tanto en Oaxaca como en Chiapas. No existe mucha evidencia de que este cultivar sea superior en desempeño o calidad de la producción con respecto a muchos otros especímenes.

Tercero, es necesario el establecimiento de un banco de germoplasma de campo, asociado a laboratorios con infraestructura básica para mantener especímenes que aseguren la permanencia de los genotipos ahora existentes. Instituciones como el Instituto Tecnológico Agropecuario de San Bartolo Tuxtepec, o el INIFAP en el norte de Veracruz podrían cumplir estas funciones. Un banco de germoplasma de campo de *V. planifolia* podría contener una gran parte, y tal vez la totalidad de la variación genética de esta especie, dado el reducido número de genotipos que aparentemente existen. Sin embargo, deben tomarse en cuenta que pueden existir limitaciones de espacio y que los costos de operación pueden ser muy altos.

Por último, es posible mantener a costos relativamente bajos gran parte o la totalidad de los genotipos conocidos de *V. planifolia* en una colección de cultivo de tejidos, Las desventajas son la variación somiclonal que puede llegar a presentarse, y que: puede alterar las características de los cultivares, y la permanencia de lacolección por periodos prolongados de tiempo. Además, el manejo de los "ex plantes" de V. planifolia ha resultado ser difícil, con grandes pérdidas, en ocasiones totales, al sacarse

de frasco. La permanencia de las colecciones depende fuertemente de la capacidad técnica y el interés de los técnicos encargados de su mantenimiento.

Probablemente la mejor estrategia para la conservación de los recursos genéticos de V. planifolia sea un enfoque combinado que incluya los distintos puntos, desde la permanencia de las plantas silvestres, el mejoramiento de las practicas de cultivo en las plantaciones, la diversificación del material a propagar y el establecimiento de bancos de germoplasma ex profeso.

Recomendaciones sobre el manejo de las plantaciones con lineamientos para el establecimiento de unidades de propagación que favorezcan la diversidad genética en los

viveros. Las condiciones de cultivo en las plantaciones de México deben mejorarse paya asegurar la permanencia de los genotipos de vainilla y para incrementar la producción. En general, las plantaciones deberían establecerse en sitios apropiados, con infraestructura de riego y con facilidades para la incorporación de materia orgánica.

Las plantaciones tradicionales, sin infraestructura están condenadas a producir unos cuantos kilos de vainilla por año, a diferencia de las plantaciones tecnificadas donde se ha alcanzado hasta 3 toneladas.

La producción de vainilla orgánica no es una alternativa muy viable, debida a que el mal manejo en las plantaciones tradicionales, conlleva la presencia de patógenos y herbívoros difíciles de controlar. La producción de vainilla orgánica debería intentarse sólo en plantaciones bien *manejadas*.

Las plantaciones "madre" de esqueje de vainilla deberían incluir tanto material local como proveniente de otras regiones. La extensión de los clones de Puntilla Aldama, podrían llegar a poner en riesgo la permanencia de clones locales en las plantaciones de Oaxaca y Chiapas. Sin embargo, es importante también evitar establecer plantaciones con esquejes del cv. "Oreja de burro". Ciertos vainillales podrían monitorearse, tanto en Veracruz, como en Oaxaca, para corroborar la calidad del esqueje que producen y ser de alguna manera certificados como unidades de propagación. Establecer los lineamientos para un programa de fitomejoramiento. Existen entre las

especies mexicanas de Vanilla muchos caracteres interesantes para ser evaluados e incorporados en este cultivo. Las especies más interesantes para programas de cruzas son *V. phaeantha, V. insignis, V. odorata y V. pompona*.

Childers et al (1959) reportaron que *V. phaeantha* es más resistente al ataque *de Fusarium oxysporum* que *V. planifolia*, y ambas están cercanamente relacionadas. Además, *V. phaeantha* puede establecerse en sitios *más secos y en suelos* estacionalmente inundados.

Vanilla *pompona* produce frutos fuertemente fragantes. Es una planta más, vigorosa y xerofítica. A diferencia de otras especies, puede crecer tanto en zonas

graníticas, como volcánicas y calcáreas, y es la única especie de frutos fragantes en el occidente de México. Probablemente su mejor cualidad sea la de producir un mayor número de frutos. Debido a su sistema de polinización distinto, en donde se ofrecen fragancias como recompensa, V. *pomposa* es polinizada naturalmente con mayor frecuencia que V. planifolia. Además, aparentemente es capaz de mantener un alto "fruit set' sin consecuencias negativas en la sobrevivencia de la planta y los futuros eventos reproductivos.

Vanilla cribbiana y V. hameri son en muchos sentidos similares a V. pompona, aunque V. cribbiana no es xerofítica. Una población de V. cribbiana se puede localizar sobre suelos volcánicos en la Sierra de Sta. Martha, Veracruz.

Vanilla odorata es después de V. planifalia la especie con frutos más fragantes. Si como suponemos V. odorata es uno de los padres de V. tahitiensis, ha conferido a su descendencia la capacidad de florecer menos estacionalmente y de producir flores en zonas ecuatoriales como Nueva Guinea, donde V. planifalia no ha sido exitosa. Aún existiendo V. tahitiensis, la importancia de V. odorata en los programas de mejoramiento de Vanilla está lejos de ser aprovechada. Vanilla adorara, a diferencia de V. plan folia, es una especie que puede establecerse en la vegetación secundaria (acahuales) y tolera mejor el cambio de condiciones que colleva la sucesión, pues se le ha observado en sitios de 2-3 años así como en condiciones de bosque maduro. Existen plantaciones tradicionales en el norte de Oaxaca, a partir de acahuales jóvenes, que contienen individuos de V. odorata y V. planifolia. En estas plantaciones V. odorata muestra una mayor resistencia a condiciones adversas de sequía, alta insolación, o sombra excesiva, así como un menor ataque de la chinche roja (Tentecoris confusos) y del gusano peludo (Plusia aurífera).

Vanilla insignis es la especie de vainilla más abundante y tolerante en México. Se establece en zonas con menos de 1000 mm de lluvia al año, hasta en zonas con más de 4500 mm. En la península de Yucatán está estrechamente asociada a los bajos inundables y tolera condiciones de lento drenaje o aún anegamiento. En Chiapas puede establecerse en sitios oligotróficos en sabanas con suelos arcillosos. En cl centro de Veracruz ha logrado establecerse en zonas de suelos volcánicos, ácidos, inapropiados para muchas otras especies de Vanilla. También es la especie que soporta mejor temperaturas por abajo de 10C. Es además de crecimiento vigoroso y se han localizado en Calakmul, Campoche. especímenes de más de 4,000 m² de extensión.

Vanilla perplexa es una especie poco vigorosa y con bajos 'fruit sets'''. Sin embargo, puede tolerar condiciones de alta humedad y sombra en el interior del sotobosque, donde ninguna otra especie de frutos fragantes sobreviviría por un periodo largo.

La divergencia de V. *harbellata y V. inodora* con respecto a las vainillas con frutos fragantes pudiera ser anterior al Eoceno-Mioceno (Soto, Cameron y Alvarez

Bu ylla, datos no publicados) y es muy poco probable que especies tan diferenciadas puedan hibridizarse exitosamente con V. planifolia.

AGRADECIMIENTOS. Quisieramos agradecer al Dr. Keneth Cameron por la secuencia de *Vanilla barbellata y* por algunos datos sobre V. aphylla y V. madagascariensis. La M. en C. Rosalinda Tapia brindó asesoría en el trabajo de laboratorio. A la Dra. Elena Alvarez-Buylla por su dirección y apoyo *para la* realización del trabajo molecular en su laboratorio. A la M. en C. *Caroline* Burgeff y a la Dra. Alicia Gamboa por su comentarios y recomendaciones en el trabajo de laboratorio. AlDr. Daniel *Piñero por su asesoría y* permitirnos trabajar en su laboratorio las técnicas de iso--nzimas. El Ing. Heriberto Larios, Presidente de la Asociación de Vainilleros de Papantla, Ver., participó durante el muestreo de las plantaciones del norte de Veracruz. La M. en C. Mariana Hernández proporcionó material de plantaciones distantes de la región de Usila, Oax. El Ing. Jesús Pérez *Mesa* proporcionó valiosa información sobre las vainillas del norte de Oaxaca. El M, en C. Gerardo Salazar contribuyó con material de regiones distantes.

REFERENCIAS

- Ackeiman, J.D. 1986. Coping with the epiphytic existence: pollination strategies. Selb*vana* 9: 52-60. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1(2): 108-113.
- Arduino, P. F. Verra, R. Cianchi, W. Rossi, B. Corrias, L. Bullini. 1996. Genetic variation and natural hibridization between *Orchis laxiflora and Orchis palustris* (Orchidaceae). Pl. Syst. *Evol.* 202:87-109 Ames, O. 1925. New and noteworthy orchids. *Sched. Orch. 9: 1-6.*
- Arnheim, N. 1983. Concerted evolution of multigene families. pp. 38-61 *In M.* Nei and R. Kohen (eds.). *Evnlutinn o/genes and proteins*. Sinauer, Sunderland MA.
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosornal DNA in plants: an example from the composite. *Molecular Phylogenetics and Evolution 1: 3* 16.
 - 1993. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: Chromosomal and morphological evolution reexamined. *Am. J. Bot.* 80(2): 222-238.
 - D.W. Kyhos, J. Dvorak, y G.D. Carr. 1991. Chloroplast DNA evidente for a North American origin of the Hawaiian silversword alliance (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 88: 1840-1843*.
 - M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell, y M.J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidente on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden 82:247-277*.
- Begon, M., J. Harper, C. Towsend. 1986. *Ecology, Individuals, Populations and Corr.munities*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 853 p
- Blanco.] 845. Flora de Filipinas. 2: 593.
- Castillo, R. y M. Engleman. 1993. Caracterización de dos tipos de Varilla planifblia. *Acta Bot. Mex.* 25: 49-59
- Chase, M.W. y H.G. Hills. 1992. Orchid phylogeny, flower sexuality and fragrance seeking. *BioScience* 42(1): 43-49.
- Chelilik, W.M. y Pitel, J.A. 1984. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. *Canad. J. Forest. Res* 14:740-743
- Childers, N.F., H.R. Cibes, y E. Hernández M. 1959. Vanilla-- The orchid of commerce. Pp. 477508 en C.L. Withner (ed.) *The Orchids. A Scientific Survey*. Ronald Press Co. New York.

- Conkle, M.T., P.D. Hodskiss, L.B. Nunnally y S.C. Hunter. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. *Gen. Tech. Rep. PSW-64*, Berkeley, C.A.
- Correll, D.S. 1944. Vanilla: Its history, Cultivation and importance. Lloydia 7: 236-264.
- Davis, T.N., M.S. Urdea, F.R. Masiarz y J. Thorner. 1986. Isolation of (he yeast Caimoclulin gene: Calmodulin is an essential protein. *Cedi* 47: 423-431.
- Donoghue, M.J. y M.J. Sanderson. 1992. The suitability of molecular and morphological evidence in reconstructing plant phylogenies. pp. 340-368 in P.S. Soltis, D.E. Soltis, and J.J. Doyle (eds.). *Molecular Systematics of Plants*. Chapman and Hall, New York.
- Dressler, R.L. 1981. *The Orchids. Natural History and Classification*. Harvard Uni.v. Press, Cambridge.
 - 1993. Phylogeny and Classifacation of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland, Oregon.
 - _ y M. Chase. 1995. Whence the orchids? pp. 217-226 in P.J. Rudall, P.J. Cribb, D.F. Cutler y C.J. Humphries (eds.) *Monocotyledons: Systematics and Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Eguiarte, L.E. 1990. *Genética de Poblaciones de* Astrocaryum mexicanum *Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz*. Tesis de Doctorado. Centro de EcologíaJUACP y P del CCH, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF
- Fawcett, W. y A.B. Rendle. 1910. Flora of Jamaica 1. Orchidaceae. British Museum (Natural History). Londres. pp. 19-20.
- Garay, L.A. 1987. Olim Vanillaceae. Bot. Mus. Leáf. 30(4): 223-237.
- Geerinck. 1982. Vanilla bampsiana. Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. 52: 345, fig. 1.
- Hamrick, J.L., y B. Linhartl y J.B. Mitton. 1979. Relationshs between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10:173
- Hamrick, J.L. y M. J. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species *en Plant Population Genetics, breeding* and germoplasm resources (ed. A.D.H. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler y B. S. Weir). pp 43-63. Sunderland, MA: Sinauer
- Harmick, J.L. y M. J. Godt. 1996. Effects of history traits on genetic diversity in plant species. Phil *Trans. R. Soc. Lond.* 351, 1291-1298
- Hartl D.L. 1980. Principies of population genetics. Sunderland, Massachussets. Sinauer Associates. 488pp.
- Hartl D.L. y A.G. Hartl. 1989. Principies of Population Genetics 2nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachussets.
- Hedrick, P.W. 1983. *Genetics of Populations. Jones* and Barlett Publishers, Inc. Boston p 623 Hernández Apolinar, M. 1997. *Crecimiento y Reproducción de Vanilla planifolia (Orchidaceae) era*
 - Usila, Oaxaca. Tesis de Maestría en Ciencias (Ecología y Ciencias Ambientales). Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F.
- Hillis, D. y M. T. Dixon. 1991. Ribsomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology 66: 411-453*.
- Holsinger, K.E. 1991. Mass-action models of plant mating systems: The evolutionary stability of inixed mating systems. Am. *Nat.* 138 pp 606-622
- Jorgansen, R.A. y P.D. Cluster. 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population *studies. Annals Missouri Botanical Garden 75: 1238-1247*.
- Karvanen, P. y G. Savolainen. 1993. Variation and inheritance of ribosomal DNA in Pinus sylvestris L. (Scots pine). *Heredity 71: 614-622*.
- Lande, R, y D. W. Schemske. 1985. The evolution of serf-fertilization and inbreeding depression in plants I. Genetic models. Evolution 39:24-40
- Lavin, M. y M. Luckow. 1993. Origins and relationships of tropical North American in the context of the boreotropics hypothesis. Am. J. *Bot.* 80(1): 1-14. 1993
- Lindley, J. 1835. Key to Structural, Physiological and Systematie Botany. London. Longman *et al.* p. 73
- Linhart, Y.B., J.B. Mitton, K.B. Sturgeon y M.L. 1981. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. *Heredity* 46:407-426
- Listor., A., W.A. Robinson, J.M. Oliphant and E.R. Alvarez-Buylla. 1996. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non-flowering leed plants. Syst. Bot. 21(2): 1-12.

- Luer, C.L. 1972. Native Orchids of Florida. p. 72 pl. 19. New York Bot. Garden.
- Madison, M. 1981. Vanilla beans and bees. Bull. Marie Selby Botanical Garden 8: 8.
- Mallory, L.D., D.F. Walter y K. Walter. 1942. Mexico's vanilla production. Foreign Commerce Weekly 7: 8-10, 23.).
- May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes *en* A.R. Hoezel (ed) *Molecular geneic* analysis *of populations*. *A practical approach*. IRL Press OxfordUniversity,
- Mickevich, M.F. y C.Mitter 1981. Treating polymorphic characters in systematics: A phylogenetic treatment of electrophoretic data. pp. 45-58. en Advances in Cladistics.
- Miller, M. 1997. *Tools for Population* Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program *for the* analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author.
- Mitton, J.B. J.L. Linhartl., J.L. Hamrick y J.S. Beckman. 1977. Observations on the *genetic* structure and mating system of Ponderosa Pine in the Colorado front *Range*. *Theor. Appl. Genet.* 51:5-13
- Murray, M.G. y W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Nei, M.1972. Genetic distante between populations. Amer. Natur. 106:376-384
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3321-3323
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:589-590
- Nojima, H. 1989. Structural organization of multiple rat calmodulin genes. J. Mal. Biol. 208(2): 269-289.
- O'Malley, D.M.N.C, Wheeler y R.P. Guries. 1980. *A manual for starch gel electrophoresis*. University of Winsconsin. Department of Forestry. Staff Paper No. 1 1
- Perera, I.Y. y R.E. Zielinski. 1992. Structure and expression of the Arabidopsis CaM-3 calmodulin *gene. Plant Mol. Biol. 19(4): 649-664*,
- Porterés, R. 1954. Le genere Vanilla et ses espéces. pp. 94-290 in G. Bouriquet (ed.) *Le Vanillier et la Vanille dans le Monde*. Enc. Biol. 46. Ed. Paul Lechevalier, Paris.
- Quijada, A., A. Listan, W. Robinson y E.R. Alvarez-Buylla. 1997. The ribosomal ITS region as a marker to detect hybridization in pines. *Mol. Ecol. 6:* 995-996.
- Rain, P. 1986. Vanilla Cookhook. Celestial Arts, Berkeley, Cal. 120 pp.
- Rasmussen, C.D., R.L. Means, K.P. Lu, G.S. May y A.R. Means. 1990. Characterization and expression of the unique Calrnodulin gene of Aspergilus nidulans. *J. Biol. Chem.* 265(23): 13767-13775.
- Rhyner, J.A., M. Ottiger, R. Wicki, T.M. Greenwood y E.E. Strehler. 1994. Structure of the human CALMI calmodulin gene and identification of two CALMI-related pseudogenes CALMIPI and CALM 1 p2. *Eur. J. Biochem.* 225(1): 71-82.
- Ridley, H.N. 1912. Spices. Pp. 23-93. London.
- Roubik, D.W. y J.D. Ackerman. 1987. Long-term ecology of euglossine-bees (Apidae: Euglossini) in Panama. *Oecologia (Berlin)* 73: 321-333.
- Robson, K.J. 1993. Sequence diversity in the intron of the calmodulin gene from Plasmodium *falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol* 60(1): 1-18
- Rogers, S.O. y A.J. Bendich. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy numbers and in the intergenic spacer. Plant *Molecular Biology 9: 509-520*.
- Rolfe, R.A. 1896. A revision of the genus Vanilla. Journ. Linn. Soc. 32: 439-478.
- Roth, V.L. 1991. Homology and hierarchies: problems solved and unresolved. *J. Evol.* Biol. 4: 167 194.
- Sang, T., D.J. Crawford y T.F. Stuessy. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92: 6813-6817.
- Schiede, K. 1829. Linnaea 4: 572-574.
- Shannon, C.E. y W. Weaver. 1949. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana.
- Slatkin M. 1994. Gene flow and Population Structure en L.A. Real (ed) Ecological Genetics . Princeton University Press, Princeton, New Jersey

- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science. 236:787792
- Smith, N.J.H., J.T. Williams, D.L. Plucknett y J.P. Talbot. 1992. *Tropical Forests and Their Crops*. Comstock Pub. Assoc.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1981. Biometry. W.H. Freemann, San Francisco.
- Soltis, E.D., C. H. Haufler, D.C.Darrow y G.J. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding *buffers*. *Gel and* Electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*. *Vol.* 73 Núm. 1
- Soltis, P.S. y R.K. Kuzoff. 1993. ITS sequence variation within and among populations of
- Lomatium grayi and L. laevigatum. Molecular Phylogenetics and Evolution 2: 166-170,
- Soto Arenas, M.A. 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. Orquídea 11: 233-277.
- M. Pignal, R. Tapia y E. Alvarez-Buylla (in prep.). On the origin of Vanilla *tahitiensis*.
 - _. N. DaCosta y E. Alvarez-Buylla. (unpublished) Floral biology of Mexican vanillas.
- Strand, N.E., J. Leebens-Mack, y B.G. Milligan. 1997. Nuclear DNA-based markers for plannt evolutionary biolology. *Mol. Ecol. 6:* 113-118,
- Stuber, C.W., J.F. Wendel, M.M. Goodman y J.S.C. Smith. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L.) Technical Bulletin 286. North Carolina Agricultural Research Service.
- Suh. Y., L.B. Thien, H.E. Reeve y E.A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. A m. J. Bat. 80(9): 1042-1055.
- Swofford, D.L. y W.P. Maddison. 1987. Reconstructing ancestral states under Wagner parsimony. *Math. Biosc.* 87:199-229.
- Swofford, D. L, y R.B. Selander. 1989. BIOSYS-1: a computer program, for the analysis of allelic variation in population genetic and biochemical systematics. Release 1. 7. Illinois. Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Teo, C.K.H. 1985. Native Orchids of Peninsula Malaya. Kyodo-Shing-Leeng Printing Ind. Singapore.
- Tezozomoc. 1847. Histoire Natural du Mexique. pp. 210-212. Paris.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.
- Vázquez-Lobo, A., S. Ortiz y E. Alvarez-Buylla. 1996. Mini-prep for easy DNA extraction of conifer species. Appendix 6 en A. Vázquez-Lobo Yuren. Filogenia de hongos endófitos del género Pinus L.: implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis.

 Fac. Ciencias, UNAM, M xico, D.F.
- Vázquez-Yanes, C., A. Orozco-Segovia, G. Francois y L. Trejo. 1975. Observations on seed dispersal by bats in a tropical humid region in Veracruz. *Biotropica 7:* 73-76.
- Weir, B.S. 1990. Genetic data analysis. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution 38(6): 1358-1370*
- Wendel, J.F. y N. F. Weeden. 1989. Visualization and Interpretation of Plants Isozymes en Soltis, D.E. y P.S. Soltis (eds.) *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press. Portland, Oregon pp. 87-105
- Wendel. J.F., A. Schnabel y T. Seelanen. 1995. Bi-directional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (Gossypiurn). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 92: 280-284.
- WeniJt, T. 1989. Las selvas de Uxpanapa, Veracruz-Oaxaca. Una evidencia de refugios florísticos *cenozoicos. Anales Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx. ser. Bot. 58: 29-54,33*1993. Composition, floristic affinities, and origins of the canopy tree flora of the Mexican
 - Atlantic slope rain forest. Pp. in T.P. Ratnamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.).
- Biological Diversity of Mexico. Origins and Distribution. Oxford Univ. Press. Williams, L.O. 1951. The Orchidaceae of Mexico Ceiba 2: 34-36.
- Ye. Q. y M.W. Berchtold. 1997. Structure and expression of the chicken calmodulin Y gene. Gene 194(1): 63-68.

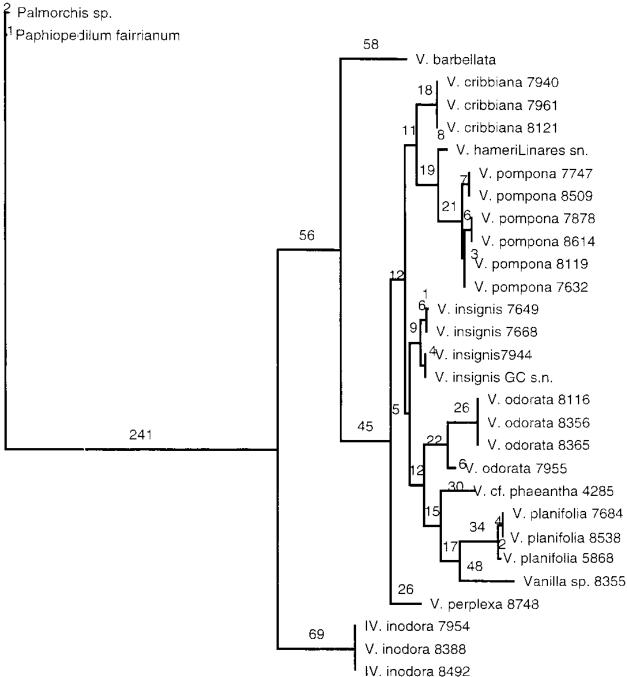


Fig. 1. Arbol de consenso estricto de 17 árboles igualmente parsimoniosos de 844 pasos y Cl = 0.752. Los valores asociados a las ramas representas distancias (número de bases nueleotídicas).

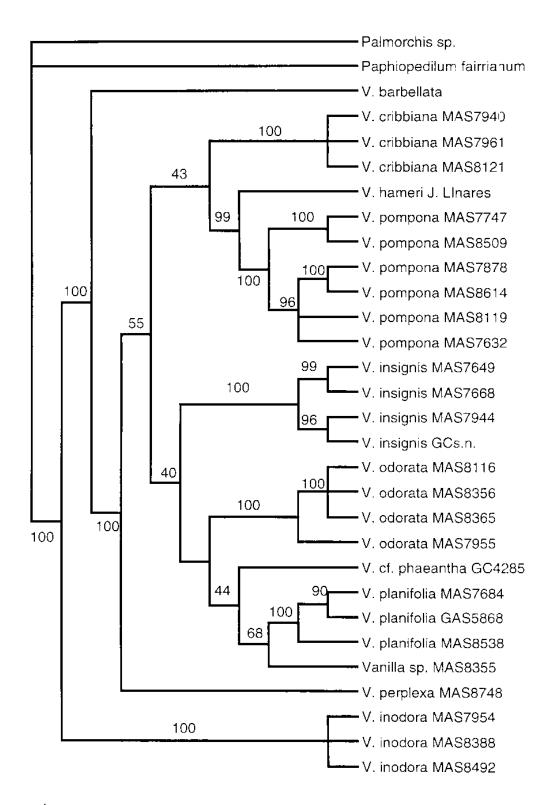


Fig. 2. Árbol de bootstrap según la regla de mayoría de 50%, con otros grupos compatibles con este árbol. Los valores asociados a las ramas indican el porcentaje en los que ese clado fue recuperado en las 100 réplicas.

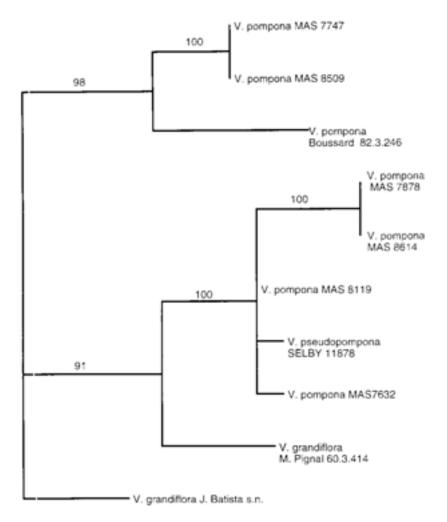


Fig. 3. Relaciones genealógicas de los ITS de distintos miembros del complejo de Vanilla)ompona Schiede. Arbol de consenso estricto de 15 árboles de la misma longitud (112 pasos, Cl 0.902). MASA 7747 del centro de Veracruz, MAS 8509 del norte de Veracruz, Boussard 82.3.345 1e Guadalupe, Pequeñas Antillas, MAS 7878 de Guerrero, MAS 8614 de Jalisco, MAS 8119 del corte de Oaxaca, SELBY 11878 de Panamá, MAS 7632 del sur de Oaxaca, M. Pignal 60.3.414 le Bahía, Brasil y J. Batista s.n. de Xingú, Brasil. Los valores asociados a las ramas representan porcentajes de bootstrap.

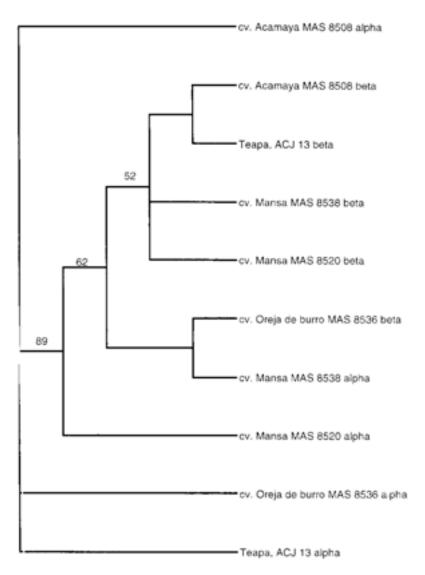


Fig. 4. Arbol de consenso estricto de 3 árboles igualmente parsimoniosos de las secuencias del gen de la calmodulina de Vanilla planifofia. Longitud = 47 pasos, CI = 0.915, HI = 0.085, RI = 0.800 y RC = 0.732. Los valores de bootstrap están indicados so-)re las ramas.

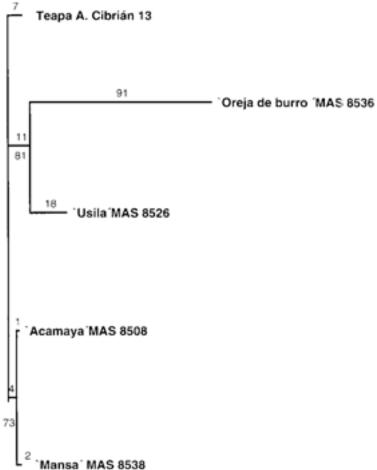


Fig. 5. Ardo; más parsimonioso de las secuencias del gen codificador de G3PDH (GAPC4) de distintos especímenes y cultivares de Vanilla planifolia. Los valores en la parte superior indican dirtancia (número de nucleátidos distintos), los valores en la parte inferior indican porcentajes de bootstrap. Longitud = 134 pasos, CI = 0.985, HI = 0.015, RI = 0.667, RC = 0.657.

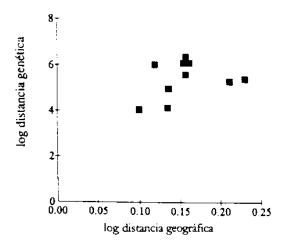


FIG. 6. Prueba de Mantea {Sokal, 1979) para 5 regiones de *Vainilla planifolia*. Se observa que la correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas es muy baja (r=0.3003). (Valores obtenidos con 100 permutaciones).

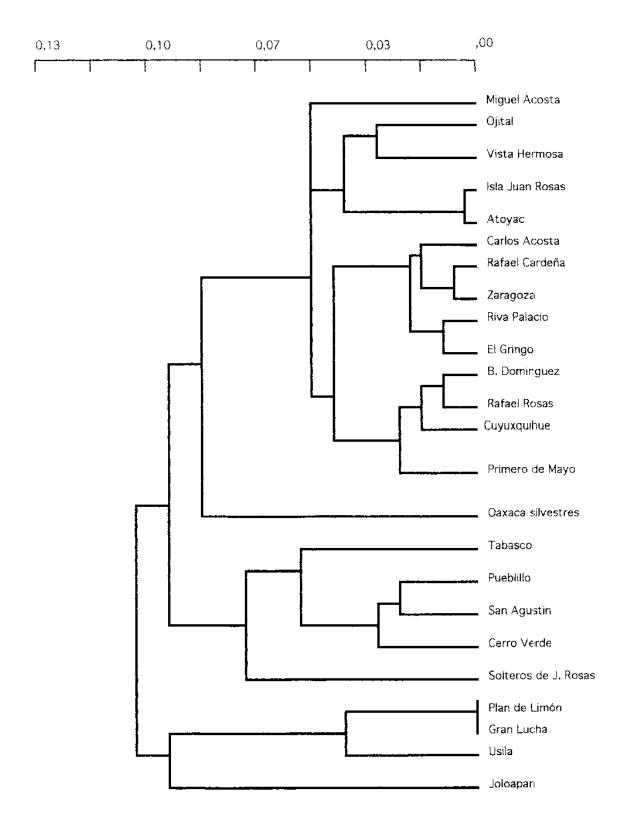


FIG. 7. Dendrograma obtenido por UPGMA utilizando las distancias genéticas de Nei 1987). Se representan las localidades de Veracruz y Oaxaca.

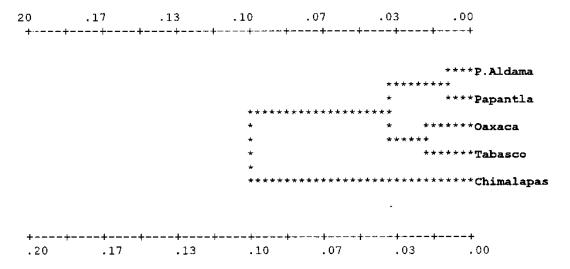


FIG 8. Dendrograma obtenido por UPGMA en base a las distancias de Nei (1987). Se agruparon las loca lidades en 5 regiones, *norte* de Veracruz (Papantla), centro de Veracruz (Puntilla Aldama), individuos *del norte* de Oaxaca (Oaxaca), Tabasco y sur de Oaxaca (Chimalapas).

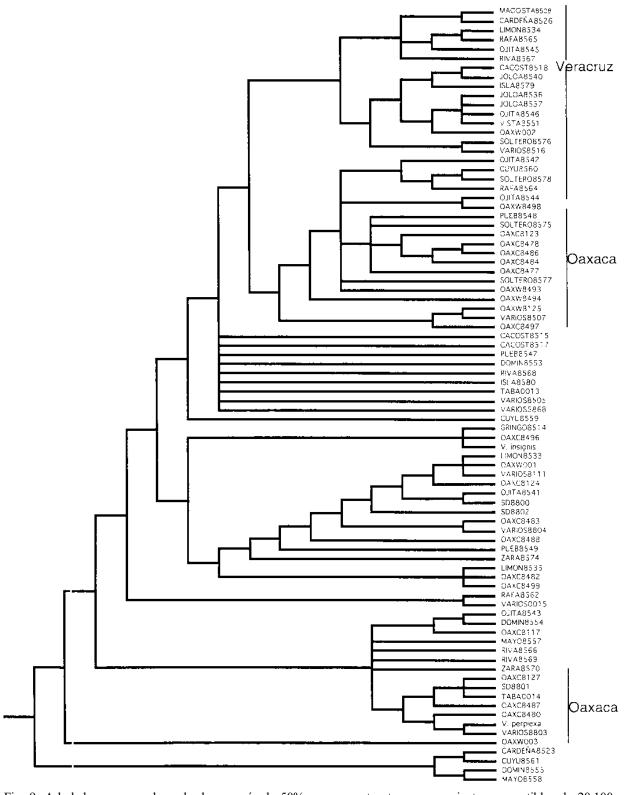


Fig. 9. Arbol de consenso de regla de mayoría de 50% que presenta otros agrupamientos compatibles de 20,100 árboles más cortos de una matriz de datos isoenzimáticos de distintos genotipos de Vanilla planifolia. Numero de pasos 126, CI = 0.310, HI = 0.667, RI

0.786, RC = 0.262.

 $\mbox{\bf TABLA 1.}$ Distancias nucleotídicas absolutas entre distintos especímenes del complejo de V Pompona

		1	2	3	4	5	6	7
1	V. pompona 7747	-						
2	V. pornpona 7878	36	-					
3	V. pompona 8509	0	36	-				
4	V. pompona 8614	36	0	36	_			
5	V. pompona 8119	29	12	29	12	-		
6	V. pompona 823246	27	50	27	50	51	-	
7	V. seudo pompona	31	15	21	15	2	54	-
8	V, pompona 603414	40	34	40	34	24	46	26
9	V. pornpona 7632	29	14	29	14	3	52	5
10	V. grandiflora	31	39	31	40	32	41	34

TABLA 2. Datos generales de la colecta de individuos de *Vanilla planifolia*.

VEI	Localidad RACRUZ	Municipio	Altitud(msnm)	Origen	# Individuos
1 2	Atoyac Miguel Acosta	Atoyac Rafael Delgado	450 20	Silvestre Plantación	1 2
3	El Gringo	Rafael Delgado	20	Plantación	3
4	Carlos Acosta	Rafael Delgado	20	Plantación	3
5	Rafael. Cardeña	Papantla	170	Plantación	5
6	Plan de Limón	Papantla	170	Plantación	3
7	Joloapan	Papantla	170	Plantación	5
8	Nuevo Ojital	Papantla	200	Plantación	6
9	Pueblillo	Papantla	50	Plantación	3
10	Vista Hermosa de	Papantla	170	Plantación	3
	Juarez				
11	Belisario de	Papantla	170	Plantación	3
	Domínguez	_			
12	Primera de Mayo	Papantla	170	Plantación	3
13	Cuyuxghihue	Papantla	100	Plantación	3
14	Rafael Rosas	Papantla	50	Plantación	4
15	Riva Palacio	Papantla	50	Plantación	4
16	Montaña Zaragoza	Papantla	50	Plantación	5
17	Soltero de Juan	Papantla	200	Plantación	4
	Rosas				
18	Otaltitlán				1
19.	Isla de Juan Rosas	Papantla	50	Plantación	4
20	Nautla	Nautla	20	Huerto	1
OA	XACA				
21	La Cueva	San Lucas Gjitlán	700	Nueva plantaci	
22	Cerro Verde	San Lucas Ojitlán	700	Nueva plantac	ión 2
23	Gran Lucha	San Juan Bautista	200	Nueva plantaci	ón 1
		Valle Nacional			

24 San Agustín		Santa Maria 80		Nueva plantación y 3	
		Jacatepec		silvestres	
25	Plan Juan Martínez	Santa Maria	80	Nueva plantación	y 1
		Jacatepec		silvestre	
26	Pueblo Viejo	Ayozintepec	60	Nueva plantación	1
27	Chiltepec	San José Chiltepec	150	Nueva plantación	2
28	Valle Nacional	San Juan Bautista			1
		Valle Nacional			
29	Usila	San Lucas Ojitlán		Nueva plantación	5
30	Arroyo Aguacate	San Lucas Ojitlán	700	Nueva plantación	1
31	Santa Ma.	Santa Maria		Silvestre	1
	Chimalapas	Chimalapas			
32	San Agustín	Santa Maria	400	Silvestres	1
		Jacatepec			
32	Sin datos precisos				4
TAE	ASCO				
33	Cárdenas	Cárdenas		Orquidario	1
34	Teapa	Teapa		Silvestre	1
СН	IAPAS				
35 (Chajul	Ocosingo		Silvestre	1
SAN	LUIS POTOSÍ				
36 7	amazunchale	Tamazunchale		Silvestre	1

TABLA 3. Información general de los individuos analizados. (Disponible en versión electrónica únicamente)

TABLA 4. Caracteres utilizados para el análisis de parsimonia de los datos de isoenzimas. Se anexan matrices de número de pasos entre los estados ordenados

	Caracter	i o	eso	•Num. estados
1	ACPH-1	no ordenado	2	3
2	DIA-1	día-1	1	4
3	GOT-1	got-1	1	2
4	IDH-1	no ordenado	2	4
5	SDH-1	no ordenado	2	2
6	GD14-1	no ordenado	2	3
7	MDH-1	no ordenado	2	4
8	MDH-2	no ordenado	2	4
9	ME-1	no ordenado	2	3
10	FE-1	fe-1	1	5

Matrices de estados ordenados

dia-1

	0	1	2	3			
0	0	1	2	1			
1	1	0	1	1			
2	1	i	0	1			
3	1	1	1	0			
dia-2							
	0	1	2	2			
	0	1	2	3	4	5	
0	0	1	2	2	2	2	
1	1	0	1	1	1	2	
2	2	1	0	1	2	2	
3	1	1	1	0	1	2	
4	2	2	2	1	0	2	
5	1	1	1	1	1	0	
•							

(continuación de TABLA 4)

got-1

	0	1	2	3	4	
0	0	1	2	2	2	
1	1	0	1	2	2	
2 3	2 2	1	0	2	2 2	
3	2	2	2	0	2	
4	2	2	2	2	0	
fe-1	0	1	2	3	4	
0	0	1	2	2	2	
1	1	0	1	2	2	
2	2	1	0	2	2	
3	2	2	2	0	2	
4	1	1	1	1	0	

TABLA 5. Sistemas enzimáticos ensayados en tejidos de *Vanilla planifolia*. Se indican los números de loci totales por enzima y los loci polimórfcos. Las letras en la estructura cuaternaria indican: M, *monómero; D, dímero; T, tetrámero; y en los sistemas*: M, Mitton pp; 2, #2 Tris-Citratos.

ACPH	DoM	M	2	2
DIA	EEE M	M	2	2
GOT	D	M	ı	1
RUB	Hilli T	24	1	0
LAP	M	M	2	1
IDH	11555 D	2	1	1
GDH	圖計 D	2	1	1
MDH	D	2	2	2
SDH	M	2	1	1
FE	M. M	M	1	1
G-6PD	100 D	2	1	1
6-PGD	D	2	1	1
ME	T	2	- 1	1
Total			17	15

ACPH: Fosfatasa ácida DIA: Diaforasa

RUB: Ribulosa-5' difosfato carboxilasa GOT: Glutamato oxalacetato transaminasa LAP: Leucil aminopeptidasa G-6PD: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 6-PGD: 6-fosfogluconato deshidrogenasa FE: Esterasa fluorescente ME: Enzima málica

IDH: Isocitrato deshidrogenasa
SDH: Shikimato deshidrogenasa
GDH: Glutamato deshidrogenasa
MDH: Malato deshidrogenasa

TABLA 6. Niveles de variación genética en los 17 loci para todas las localidades. Ho es la heterocigosis observada y He es la heterocigosis esperada (error estándar en paréntesis). F es el índice de fijación para todos los loci

Localidad	% Loci polimórf. (0.95)	Promedio de individuos por locus	Promedio de alelos por locus	Но	He	<u> </u>
			VERACRUZ			
Miguel Acosta	23.5	1.8(0.1)	1.2(0.1)	0.000(0.000)	0.157 (0.071)	1
El Gringo	17.6	3.0(0.0)	1.2(0.1)	0.000(0.000)	0.094(0.051)	
Carlos Acosta	29.4	3.0(0.0)	1.4(0.1)	0.05 (0.043)	0.161 (0.062)	0-633
Plan de Limón	4.5.4 41.2	2.9(0.1)	13(02) 1.4(0.1)	0.020(0.013) $0.020(0.020)$	0.141(0.042) $0.208(0.063)$	0.901
Joloapan	23.5	5.0(0.0)	1,2(01)	0.059(0.048)	0.106(0.051)	0.443
Nuevo Ojital	52.9	5.8(0.1)	1,6(0-2)	0.020(0.013)	0.217 (0-055)	806.0
Pueblillo	41.2	2.9(0.1)	1.4(0.1)	0.020(0.020)	0.215(0.066)	0.907
Vista Hermosa	29.4	2.9(0.1)	$1_{-}2(0-1)$	0.000(0-000)	0.157(0-051)	
B. Domínguez	29.4	18(0.1)	1.3(0-1)	0-000(0.000)	0-157(0.061)	1
Primero de Mayo	29-4	3.0(0.0)	1.4(0.1)	0.000(0.000)	0.173 (0.058)	1
Cuyusquihue	41-2	2.9(0.1)	1.4(0.1)	0-000(0.000)	0.188(0.054)	1
Rafael Rosas	41.2	4.0(0.0)	1.5(0.2)	0.000(0.000)	0.227(0.070)	
Riva Palacio	29.4	4.0(0.0)	1.4(0.1)	0.044(0.032)	0.145(0.057)	0.697
Mont. Zaragoza	47.1	4.9(0.1)	1.5(0.1)	0.012(0.012)	0.173 (0.048)	0.931
Soltero de Rosas	35.3	4.0(0.0)	1-4(0.1)	0.000(0.051	0.160(0.055)	•
Isla de J. Rosas	41.2	4.0(0.0)	1.4(0.1)	0.029(0.020)	0.15 (0.048)	0.813
Ver, silvestres	35.3	3.9(0.1)	1.4(0.1)	0.000(0.000)	0.176(0.062)	
			OAXACA			
La Gran Lucha	52.9	3.0(0.0)	1.5(0.1)	0.078 (0.061)	0.275(0.066)	0.716
San Agustin	47.1	3.8(0.1)	1.5(0.2)	0.029(0.029)	0.248(0.058)	0.883
Cerro Verde	64.7	(0.0)	1.8(0.2)	0.010(0.010)	0.295(0.061)	996.0
Usila	52.9	5701	1.502	0.024(0.024	0.2170.058	688-0

Oaxaca silvestres	58.8	7.8(0.1)	1.7(0.2)	0.029 (0.029)	0.260 (4.059)	0.888
			TABASCO			
Teapa/Cárdenas	41.2	2.0(0.0)	1.4(0.1)	0.059(0.040)	0.255(0.077)	0.769
			CHIAPAS			
Chajul	0.00	1.0 (0.0)	1.0(0.0)	0.000(0.00)	0.000(0.00)	1
			SANLUIS POTOSÍ	SÍ		
Taniazunchale	0.00	1.00(0.0)	1.0(0.0)	0.00()(0.00)		

(Continuación de la TABLA 6)

TABLA 7. Prueba de G y \mathbf{X}^2 para todos los loci en todas las localidades.

Locus	G	x ²
ACPH-1 ACPH-2	0.0000 0.4338*	0.0000 0.3634*
DIA-1	0.0000	0.4728
DIA-2	0, 0000	0.0000
GOT-1	0, 0000	0.0000
IDH-1	0.0000	0.0000
G6P-1	0.0000	0.0000
6PD-1	0.0000	0.0000
SDH-1	0, 0000	0.0000
GDH-1	0.0000	0.0000
MDH-1	0.0000	0.0000
MDH-2	0.0000	0.0000
ME-I	0.0000	0,0000
FE-1	0,0000	0.0000
LAP-1	0.0008	0.0488

^{*} Valores no significativos con p c 0.05

TABLA 8 . Valores de los estadísticos F de Wright y los estadísticos de Weir para todos los loci (desviación estándar en paréntesis calculada con un jacknife sobre todos los loci). *Los valores se* obtuvieron únicamente con 22 poblaciones, se excluyeron SU, Tabasco, Chiapas y Chimalapas.

Locu	Fis	Fit	Fst	f	F	Tetha
ACPH-1	1.000	1.000	.373	1.000	1.000	0.164
ACPH-2	338	081	.192	141	067	0.064
DIA-1	.472	.555	.156	0.720	0.708	-0.090
DIA-2	.495	.571	.151	0.563	0.547	-0.038
GOT-1	.916	.951	.411	0.956	0.959	0.062
IDH-1	1.000	1.000	.342	1.000	1.000	0.115
G6P-1	1.000	1.000	.459	1.000	1.000	0.227
6PD-1	1.000	1.000	.365	1.000	1.000	0.201
SDH-1	1.000	1.000	.345	1.000	1,000	0.096
GDH-1	1.000	1.000	.406	1.000	1.000	0.177
MDH-1	1.000	1.000	.348	1.000	1.000	0.092
MDH-2	1.000	1.000	.319	1.000	1.000	0.063
ME-1	1.000	1.000	.499	1.000	1.000	0.397
FE-1	1.000	1.000	.248	1.000	1.000	-0.070
LAP-1	1.000	1.000	.241	1.000	1.000	0.011
Promedio	.869	.917	.364	0.901	0.915	0.146
	(0.371)	(0.302)	(0.105)	(0.075)	(0.064)	(0.037)

TABLA 9. Número de migrantes por generación entre pares ce poblaciones de Vanilla *planifolia* calculados a partir de FsT promedio (ver TABLA 8)

Población	Puntilla Adama	Papantla	Oaxaca
Puntilla Aldama		6.22	2.19
Papantla			3.84
Oaxaca			

TABLA 10. Identidades 1 (sobre la diagonal) y distancias D (bajo la diagonal) genéticas insesgadas de Nei (1978) para pares de localidades de *Varilla planifolia*.

h	2	1		5	4	7		Q
1 Miguel Acosta	****	_942	.944	.962	.948	.854	.940	.952
2 Gringo	.059	**	.922	.952	.914	.891	.926	.958
3 Carlos Acosta	.058	.081	****	.984	.950	.951	.978	.890
4 Rafael Cardeña	.039	.049	. c)16		.937	.902	.962	.904
5 Plan de Limón	.054	.090	.051	.065	****	.946	.968	.925
6 Joloapan	.158	.115	.051	.104	.056	****	.958	.843
7 Ojital	.062	.077	.022	.039	.032	.043	****	.919
8 Pueblillo	.049	.043	.116	.101	.078	.171	.084	****
9 Vista Hermosa	.059	.080	.026	.038	.090	.068	.024	.115
10 Domínguez	.072	.117	.078	.037	.062	.177	.068	.142
11 Primero de Mayo	.063	.107	.052	.028	.028	.136	.068	.114
12 Cuyuxquihui	.041	.089	.085	.054	.069	.185	.080	.043
13 Rafael Rosas	.045	.046	.071	.029	.043	.139	.027	.061
14 Ríva Palacio	.058	.097	.013	.016	.023	.105	.036	.123
15 Zaragoza	.025	.037	.018	.004	.023	.091	.027	.033
16 Soltero de J. Rosas	.106	.088	.153	.128	.152	.193	.079	.041
17 Isla Juan Rosas	.024	.072	.037	_047	_051	.111	.022	.046
18 Oaxaca silvestres	.077	.127	.079	.092	.063	.132	.063	.055
19 Gran Lucha	.110	.093	.091	.098	.000	.065	.064	.076
20 San Agustín	_070	.039	.060	.055	.044	.083	.039	.026
21 Cerro Verde	.168	.090	.180	.157	.100	.176	.129	.038
22 Usíla	.193	.134	.226	.217	.062	.157	.169	.107
23 Tabasco	.075	.046	.040	.029	.024	.085	.055	.073
24 Atoyac	.039	.084	.040	.048	.048	.089	.020	.089
25 Chiapas	.306	.417	.477	.390	.398	.649	.418	.360
26 San Luis Potosí	.306	.219	.261	.218	.139	.236	.180	.173

h					12	1 /	15	14
1 Miguel Acosta	.942	.930	.939	.960	.956	.944	.976	.900
2 Gringo	.924	.890	.898	.915	.955	.908	.964	.916
3 Carlos Acosta	.974	_925	.949	.919	.931	.987	.983	.858
4 Rafael Cardeña	.963	.964	.973	.947	.971	.984	.996	.880
5 Plan de Limón	.914	.940	_973	.933	.958	.977	.977	.859
6 Joloapan	.935	.838	.873	.831	_870	.901	.913	.825
7 Ojital	.976	.934	.935	.923	.974	.965	.973	.924
8 Pueblillo	.892	.868	.892	.958	.941	.884	.968	.960
9 Vista Hermosa	****	.942	.936	.953	.943	.930	.964	.916
10 Domiguez	* .059	****	.994	_995	.996	.976	.976	.879
11 Primero de Mayo	.066	.006	****	.981	.974	.985	.990	.864
12 Cuyuxquihui	.048	.005	.019	****	.984	.936	.992	.944
13 Rafael Rosas	.059	_004	.026	.016	a****	_972	.991	.953
14 Riva Palacio	.072	.025	.015	.067	.028	****	.990	.841
15 Zaragoza	.037	.025	.010	.008	.009	.010	****	.923
16 Soltero de J. Rosas	.088	.129	.146	.058	.048	.173	.081	****
17 Isla de Juan Rosas	.025	.061	.051	.029	.022	.051	.022	.032
18 Oaxaca silvestres	_065	.081	.057	.045	.054	.074	.049	.083
19 Gran Lucha	.138	.098	.066	.093	.049	.052	.040	_147
20 San Agustín	.064	.090	.062	.046	.005	.057	.013	.042
21 Cerro Verde	.204	.16B	.143	.119	.073	.143	.086	.104
22 Usila	.237	.191	.158	.162	.128	.172	.136	.210
23 Tabasco	.085	.049	.026	.070	.022	.007	.011	.135
24 Atoyac	.013	.054	.045	.048	.028	.051	.035	.079
25 Chiapas	_448	.350	.371	.331	.307	.380	.392	.444

L	17	10	10	20	21	22	22	24
1 Miguel Acosta	.976	.926	.896	.932	.846	.824	.928	.962
2 Gringo	.930	.881	.911	.962	.914	.875	.955	.919
3 Carlos Acosta	.964	.924	.913	.942	.835	.797	.961	.961
4 Rafael Cardeña	.954	.912	.906	.946	.854	.805	.971	.953
5 Plan de Limón	.950	.939	1.000	.957	.905	.940	.976	.953
6 Joloapan	.895	.876	.937	.920	.838	.855	.919	.915
7 Ojital	.978	.939	.938	.967	.879	.845	.947	.980
8 Pueblillo	.955	.947	.927	.974	.962	.898	.930	.915
9 Vista Hermosa	.975	.937	.871	.938	.816	.789	.919	.988
10 Domínguez	.941	.923	.907	.923	.846	.826	.952	.947
11 Primero de Mayo	.950	.945	.936	.940	.866	.854	.974	.956
12 Cuyuxquihue	.971	.956	.911	.956	.888	.850	.933	.953
13 Rafael Rosas	.978	.947	.952	.995	.930	.880	.978	.972
14 Riva Palacio	_951	_929	.949	.944	.867	_842	.993	.951
15 Zaragoza	.978	.953	.961	.987	.918	.873	.989	.966
16 Soltero de J_ Rosas	.969	.920	.863	.959	.901	.810	.873	.924
17 Isla de Juan Rosas	****	.973	.908	.973	.878	.827	.945	.996
18 Oaxaca silvestres	.027	****	.937	.968	.915	.881	.915	.981
19 Gran Lucha	.096	.065	****	.982	.969	.984	.980	.913
20 San Agustín	.027	.032	.018	****	.970	.921	.972	.956
21 Cerro Verde	.130	.089	.032	.030	****	.955	.950	.875
22 Usila	.190	.127	.016	.083	.046	****	.916	.846
23 Tabasco	.056	.056	.020	.028	.051	.087	****	.957
24 Atoyac	.004	.019	.091	.045	.134	.167	.043	****

25 Chiapas	.362	.348	.404	.414	.452	.395	.409	.338
26 San Luis Potosí	.264	.214	.058	.113	.074	.123	.121	.272

Localidad 1 Miguel Acosta 2 Gringo	.737 .659	_737 .803
3 Carlos Acorta	_621	.771
4 Rafael Cardeña	.677	.804
5 Plan de Limón	.672	.870
6 Joloapan	.523	.790
7 Ojital	.658	.B35
8 Pueblillo	.697	_841
9 Vista Hermosa	.639	.721
10 Domínguez	.705	.811
11 Primero de Mayo	.690	.841
12 Cuyuxquihui	.718	.805
13 Rafael Rosas	.736	.870
14 Riva Palacio	.684	.843
15 Zaragoza	.676	.B63
16 Soltero de J. Rosas	.642	.786
17 Isla Juan Rosas	.696	.768
18 Oaxaca silvestres	.706	.807
19 Gran Lucha	.668	.944
20 San Agustín	.661	.893
21 Cerro Verde	.636	.928
22 Usila	.674	.884
23 Tabasco	.664	.886
24 Atoyac	.713	.762

25 Chiapas **** .529 26 San Luis Potosí .636 ****

TABLA 11. Valores de diversidad, H, a nivel regional y a nivel global calculados con el índice de Shannon-Weaver (1963). *Se muestra* también la Equitatividad, E, para cada localidad.

Localidad	Н	E	
Regional			
Veracruz	1.564	0.935	
Oaxaca	1.397	1.00	
Tabasco	0.301	1.00	
Global	1.758	.937	

APENDICE 1. Secuencias nucleotídicas de la región del espaciador interno transcrito (ITS) de distintos especímenes de las especies de *Vanilla* de México

specie	Colector	Numero Caracter	tipa long-prec	Descripcion CNCAGCCAGNNNNACTCCGGAANGATNATTGTTGAGATCACATAATAATTGATCGAGNTAATCTGTGAGGATCAGTTTA CTTTGGTCAGCCAGCATTTGCTGTTGCAGTGACCCAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTGGGAGCTTTCTTGCTGAGCAT CTGAACCCTAGTCCCGCCAGTTTTGCCAGCAACTCATATTGTTGAAGGGGCCGCATGCTGCCTCGACCC TCCCCAAATTATTTTTAACAACTCTCAGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA AATGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCCCCCGACCCCATCAGGCCAACGGCAC GCCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCAAACATACTGTTCAGCCGGTGCGCATGTGAGT TTGGCCCCTTGTTTTTGGTACGGGGGTCTAAGCCGCTGCATGGGCTTTTGAATGCGCCAGCAAATTGCAAGAGGTGGACC ACTGTGCTGCAACAAGTGTTTTTTTGCAGAATTGCCCCGCGTTGTCGTTATTAATTTGAAGACCCTTTTTGAA
Paimorchis sp	M. Soto	8775 Secuencia de ITS		TCAGNCCGNNAACTGCGGAAGGACATIGTIGAGATCACATAATAATIGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTT GGTCACCATGGGCATTTGCTGTIGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCICCTTGGGAGCTTTACTTT GGTCACCATGGGCATTTGCTGTIGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCICCTTGGGAGCCTTCTTGCTTGCTGACCCTCCC CAAATTATTI TITTAACAACTCTCAGCAACGAGTATCTCGGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAAT GGTGTGAATIGCAAGACCATCGAGCTCTTTGAACGAACGTTGCCCCCGAGGCCATCAGGCCAAGGCAAGGCC TGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTTAATGAAGCTGTCCAAACATAGTGTTCAGCCCGTGCGGAIGTGAGTHG GCCCTTGTTCTTTGTACGGGGGGGTCTAACCCTCAGTGAGTCTTTTGAGTCCTAAATACGGCAAGAGGTGAACACTCTG GCTGCAACAAGTGTTGTGCGAATGCCCCGCGHTGTCGTTTTAGATGGGCCAGCATAATTTGAAGACCCTTTTGAACCCCCA TTGGAGGCCCGTCAACCCATGATCAGTTGACGGCCATHTGGTTGCGACCCCAGTCAGTNGAGA TTGGAGGCCCGTCAACCCATGATCAGTTGACGGCCATHTGGTTGCGACCCCAGTCAGTNGAGA
²aphiopedilum fairrianum	M. Soto	8776 Secuencia de ITS		CTGTAGGTGAACTGCGGAAGGTCATTGACGAGAGCCACGAATGATCGAGTGATCCGTGCAACCTGTGGGGGTCCGACGA CCGATTGACGTCGCCTTCTTCCATCGCATCG
/anilla barbellata	K. Cameron	s.n. Secuencia de ITS		TICNGTAGGTGAACTGCGGAAGGACATTGACGAGAGGTTTGAATGACGGAACGATCTGTCCGACATTGGGAGTGCGACGGTGTGTTGTTCCGTAGCGCGCGTTGTTGATGACGGAACGATCTGTCCGACATTGGGAGTGCGACGGTTGTTCGACGCGTGTCTTTCGTAGCCGTCTTTGCTATCACGCGGAGCTCGACGTTATGGGGGACAAACAA
Zandla cribbiana	M. Soto	7940 Secuencia de ITS		ACTGGATGTTGTGGTGTTGTGGCCAGCAAGAATCGATGTCGTCGTGCGACCGGGGGGGATGCCCCGCATAGATCCATTCCGTCC

/anda eusbana	M. Soto	7961 Sectencia de ITS. Q. C.	GTGAACTGCGGAAGGACATTGACGAGAGGTTTGAATGACGGAACGATCTGTCCGACATTGGGAGTGNGACGGTTGTTCG ATGTCGCGTTCTTTCGTAGCGCGTCTCTTTGATTGACGAGGCTCGACGTTATTGGGACACATTGGGACGATTGTTCGACG ATGTCCGCTTCTTTCGTAGCCCGTCTCTTTCACCTCGCAGACTCCACGCTTATTGGGACACAAAACAAAAAAAA
∕ani‼a cribbiana	M. Scto	8121 Secuencia de l'IS Q C	TGAACTGCCGAAGGACATTGACGAGAGG I TTGAATGACGGAACCATCTGTCCGACATTGGGAGTGCGACGGTTGTTCGA TGTCGCG I TCTTCGTAGCGCGTCTCTTCCTATCACGCGGACCTCGACGTTATGGGGGACANAACAAAAGCTTATGGCCG TGGTCAGGCCCCAAGGAGAGAGACAAATGTTAAGCTGGCAAACGAGTATCCCGTTGTCGCCAGGTCCATGGAGTCCTGGCA ATCGAACGACTCTCGACAACAGGATATCTTAGCTCGCACATGGATGAAACGAACG
/anitla cribbiana	M. Scło	8730 Secuencia de ITS Q. G.	TITATNGNACGGNGNGTGGCGNNNNNNAACNATNTCCGCGAAGGGGGAACNATGAANCCGTTATTGGGGNTGANAC TCACACTAAANAGANCNTTNTANTGGNGGGTNGTNGTTNCCACGGNNNNNCICNNCANAANGCGNNNANATACNATAA NTTGTNNNNACNGTCNTGNNCGNAGNNGGATNNAATNCCGAGGTAGTTTACACCCCNGNGTCCCCGTTGNAAGTNCTTG GGCNAANANNAAGCGGNNCTTTCNAAACAACNGATATGTCGGNNNTCGCATAGAATAAAAATGCAAGGAAT TANGATA CGGNTTGTNAANAGTAAAATCCCGTGAACCANCCN ITTTTTTGNCGCCAGTTGNGCCNGAGNAAAANAANCI TAGGCCAC GCCTGNATGTTGTTTATGNNNNCCCTCGCNCN ICTNNGAANCNTNGAATCTNTNGGTNTGNI TCCTCANCCCCGTNCTGT ANGCGATGGNTGCNACCCCNNGCAATGCATGGINI TGNNAATNNNANAGTNNCGGNGNCTNTCGACCNCAATANCNNN TGGATGGCNCTGAAGGTGGTGTATNNNCCANNANGANGNAGTGTTGTNGAGCAACCGANGGNGGCAACGAGCATATC NATCCAGNNCCNGTCNGCGTATAGTNNAGNGGGTG
zamia circulatia	IW. 5000	orato aguienta Del ITS Q C	NAGGGGGGGNGGCTCCTNANCCATANTCAATNGGGGAANGCACCAGACCGNTTGNTGNGNGCAATAAANATCAAAAN NGNTNTNNNGGGGCCGGNNNGTNCAANGGNGCGCANAGNCTCAAAAACAAANTTCGTTAAAATGGCCNACAGTNAANA GNCCANGCGTTTGAAATGGGCNACAGTNAANA GNCCANGCGTTGNNCANNNGGACANNGNCTCCCCTTTMNTT CACACCCNGGAAANTGNGTGGANNNNNGGCNNICGGCCTTTGGAATAAANAANCGCCANGNGANAATAGAGAAACNGT GTTTGTNAANTTGNANAANTNCCCGTAAACCATCCATTTTTTAACNCNAGTTGGGCCCGAGGATGCAANCNGAGGGCC CGCCTGCATGGGTGTAGTGCNNCTGATCGCTCCTTNCGNAANCNNTGGAATCTTTGGTTTGG
/anilla cribbiana	M. Solo	8777 Secuencia de ITS Q C	

			CNTTGGNAAICCGTAGTGAACCTGCTGAAGCAICATTGACGAGAGGTTIGAATGATGGACGACCGATCTGTCCAACCTGTGG GAGTGCGACGGTTGATCGATGTCGCTTTC111CGTAGCGCGTGCTCT1CCTATCACGTGGAGCTCGACGTTATGGGGATA AACAAAAGCTTATGGGCGTGGTAACGCGCCAAGGCAGTCCAAATGTTAAGCTGGCAAGCGAGCAAGTGTGTGT
Zazilta hameri	J Linares	sin Secuencia de ITS Q C	
/ænii ^t a inodora	M' Sata	7954 Secuencia de IBS Q C	NTTCCNGCACGCGAACTGCGGAAGGACATT CACGATGTTCCAAACGATCGTGCGACTTGTGCAACT IGTGAGCCCCCGAC GTCCGTTTGACGTCGCATTCTTCACTTGCGCTCTTTTGCGCAGCCTTGTGCGACTTGGCGCACAACCAAC
Azriii a modora	W 300	7954 Secuencia de 115 Q C	TTTCCGGTAGGGNGACTGCGNAAGGACATTGACAAGGTTCGNNNCNATGNAACNNTCTNTCCCANATGTGAAAGTGAAA
/aniila inodora	M. Soto	8347 Secuencia de ITS Q C	CGGTTGTTTTACGTCNCGTINTTNTNAGGGNGNGCTCTNNCTAINNCNAAGAGCTGGAAGTNNTTGGNGATAAACTGC NTATGGGNGTGGTCAGGCNCCNAGGAAAGANCAAATGTTNAGCTGGCNANCGAGNANGCCGTGTGTGNTCAGGTCCATT GAGTCCTTGCAACCCNCTCCNACACCGGATATNTTGGCTCTCGCATCGATNAAGAACGCAGCNAAATGCGATAC GTGTTGTNAATNGTAAAATCCCGTNNNCCATCCATTTTTGANCGCAAGTTGCGCCCGAGNATGCAANCNGANGGCACG CCNGCATGGGCGTAATGAGACCCGTCCCTCTTGCGGAAGCNTGNAATCTCTTGGTTTGCTTCCTNGGCCCCGTTGCGGA GGCGATGATGAGACCCGTTCAATGGCATGGC
			NITCCNGCACGCGAACTGCGGAAGGACATTGACGATGTTCCAAACGATGTCCGACTTGTGCAACTTGTGAGGCCGCGAC GTCCGTTTGACGTCGCATTCTTCCATTGCGTGGGCTCTCGCTTTTGCCCAGACCTTATGTGCAGTGGGGGACAACCAGCGTG TGGGCGCAGTCTTGCGCCAAGGGAGGAGCAAACGTCATCTTGGCAATTGCCCATCCCAAGGGTCCGGTGCGGCTTGGCAA TAGGTCATTGAATGACTCTCGACAACGGATATCTTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATATGTGTTG TGAATTGTAGAATCCCGTGAACCATCCATTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGATGCAAGCCGAGGGCCCTCTTTTTTGGAACGCATGG GGGCGCAATGCGATACGTCCCTTGCAGAAGCTTGGGATCGCCATTTTGGGTCCCCGGGCCTTTTTTTGAAACGCATGG GTGGCTCCCCATGCTACGCCATGCCGTGCGAAGCGTGGGTTGTTCCATCCCGAAGAACTCCAGCCAAGAAGTGCACCCTTCG TGTGGATTCGTACCGCCATGCCAATGGCACATGTCGTTCCATCCCGAAGACCCTCAGAAAAATCCAGCTCCATGCTCCTTCG TGTGGATTCGTCACCCCAGTCCAATGGCACATGTCGTTCCATCCCGAAGACCCTCAGAAAAATCCAGCTCCATGCTCCTTCG
Zanilla inodora	M. Seto	8388 Secuencia de ITS Q C	1919911199199991999999999

			ATAGGTCATTGAATGACHOLOGOACAACCGATATCTTGCCTCTCGCATCGATGAGAACAACGTAGCGATAATGATGATGAGAACCGATAATGACGATATGTGT TGTGAATTGTAGAATCCCGTGAACCATCCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGATGCAAGCCGACGGCACCCCTGC ATGGGCGCAATCCGTTCTTTCCAGAACCCTTGCGATCGCCATTTTTGGGTCCCCGGCCCTTTTTTGAACCCATC GGTGGCTCCCCATGCTACGCCTGCGGTGTCGAACCCTTGGTGTTGTTTGT
Zarella inodora	M. Soto	8492 Secuencia de ITS Q C	
/amilia ingdyra	M. Soto	8626 Secuencia de ITS. Q. C.	CCGATATTTGAACAGATGCGGNATTTNTTTACTCATGTANGANNNNGGGCNTTTTNGNGNTTTTTGCNAGCAAGANAC NTANTGNTGAN TANGTNGGCGAGGNATHTTNTTTACTCATGTANTGANTANTTGANGANTACGCACCAAGGGNAAANAC NTANTGNTGANTANTAGTNAGGNATHTGNGGCATATTGNGGCATTTTGNGGCATCTCTCCCTAGGGNCNCCAAGANTTCANGGNITAGGAAATAAGGNN NCAGTTAGAATNNACNINTNCCACNAACAGGATGNTTNGGTTTNGGNTCTNGNANCAATGAAGAGGAGTAGGGAAAAGAGGGGAAAAGCCTGCATGAAATAGTAAAAAGCCNTGAACAAGTGCACCATGAAGAAGGGGCAAAGCCTGCATGNGCNCAATNCGATACGGCCCCTTACANAAGNITGGGATTACCAATTTTTTGGAAGNITGAAGTGCACCAAGTGCCCCGGNCCNTTTTTTGGAAGNITGAAGTGGCTCCCCGGNCCNTTTTTTGGAAGNITGAGGGTGGCTCCCCATGNTACGAGAGGGCCAAAGGCCTCAGAAGAGTGAAAAGAGTGAACAGGTGAACAGGTGAACAGGTGAACAGGTGAAAAAGGCCCCATGNTNNTTNGAGAGNTACAGAAGAGCCCCATGNTNNTTNGAGAGAAAANCGAGCCCCATGNTNNTTNGNGTGTATNCTTCAAGCNANNCCAGTGNACATGTAGTTCCNTANNNNAGACCATCAGNAANNCGAGCCCCATGNTNNTTNGNGTGTATNCTTCAAGCNANNCCAGTGNGNTC
			INTITIGGNAAGAGAANTTGTAAACAAGGTTTNCNGTAAGGNGACCNTNATTAACNNACAAGACATGACGATAGTTCGA ATGATCGAACGATCCGTCCAACATGTGGGAGTGCGACGGTCGTTCGACGTCGCGTTCTTTCGTAGCCCCGTCCTCCACCGA TCACCCGGAGCTCGACGTTATGGGGGATNAACAAAAGCTTATGGGCGTGGTCAGGCGCCAAGGGAGGAAATGTTAAG CTGGCAAGCGAATTGCTGTGTGTCGTCAGGTCAATTGAGTCCTGGCAATCGAACGACTCTCGACAACCGATATCTTGGC TCTCGGCATCGATGAAGAACGCGACGAAATGCGATACGTTTGTGAATTGTAGAATCCCCTCCGTGAACCATTTTTTTT
/anilia insignis	M. Soto	7649 Sechenda de ITS Q C	TTTTTGGNAAGAGAATTTGTAAACAAGGTTTNCNGTAAGGNGACCNTNATTAACCACAAGACATGACGATAGTTCGAAT GATGGAACGATCCGTCCAACATGTGGGAGTGCGACGGTCGTTCGACGGCGCGTTCTTTCGTAGCCGCGTGCTCCAGCGATC ACGCGGAGCTCCAACCATTATGGGGGGTCAACAAAGCTTATGGGCGTGGTCAGCGCCCAAGGGAGAACAAATGTTAAGCT GGCAAGCGAGTTATGCTGTGTGCGTCAGGTCAATTGAGTCCTGGCAATCGAACGACTCTCGACAACGGATATCTTGGCTC TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTGTTGTGAATTGTAGAATCCCGTGAACCATCCAT
Zanilla insignis	M Soto	7668 Sectional de ITS Q C	

NCTOCNGCACGGANCTGCGGAAGGACATTGACGATGTTCCAAACGATCGTGCGACTTGTGCAACTTGTGAGGCCGCGAC GTCCGTTTGACCTCGCATTCThNNATTGCGTGGGCTCTCGCTTTTGCCCACACGTATCTCCAGTGCCGGACAACCAGGGT GTGGCCGCAGTCTTGCGCCAAGGGAGGAGCAACGTCATCTTGGCAATTCCCCAAGGGTCCCAAGGGTCCCTGCGCTTGGCA

			TNETTNONAGAGAATTTGTAAACAGCELINCNGEAAGGNGACCHTNATTAACACAAGACATGACGAEACELICGAAT GATGGAACGAECGAECACAACACTGTAGAGGHCAACGTCACCHTNATTAACACAACACCATGACCACCAACGAECAACGAACGAACGAACGAACACACAACAACAACGTAAGCCTAGACGACGAACGA
Zar ila insegnos	M. Seto	7944 Secuencia de ITS - Q - C	NGANGGGAGGNGTAANNNILTANANNITNATAGNA INGNOGTGAGGAGNGGNAANTONNIATAGNGATGGGNAGGTA GTGNNNGTGAAANTOAANTTATTATTANNTAGTGGNAGGTA GTGNNNGTGAAANTOAANTOAANTOAANTOAANTAGTGGNAGGNAGGNAGATTAGTAANTAGTGGNAG TAGANATTAATTANTAGTGGNAG TAGANATTAATTANTAGTGGNAG TAGANATTAATTANTAGTGGNAG TAGANATTAATTANTAGTGGNAG TAGANATTAATTANTAGTGGNAG TAGANATTAGTAAATAGAAGNTN ATTAGATTA TAGANAATTAGAAGAAGNTA ATTAGATTAG
Zabila insignis	M. Soto	7957A Secuencia de ITS - Q - C	GCACGTNATCGANCGCATAGTCGTATNTTCATNATTNAAGATGAANNGGCGGAGGGCN NTTCCNNTAAGNNNACCNNCNNAACCNNNNNACNNGACGANAGTTCGAATGATGAACGATCCGNCCAACNTGTCGG AGTGCGACGGTCGTTNGACGTCNCNTTCTTTNGTAGCCCCGACCGATNACCCCNNGCTCGACGTTATGGGCGAT AAACAAAAGCTTATGAGTCCTGGCGACCGACAGCGAGAGCCAATGTTAAGCTCGCAAGCGAGTATGCTGTGTCGTC AGGTCAATTGAGTCCTGGCAATCGAACCGANTNTCGACCACACGGATATCTTGGCTCTCCACATTGATGAAGAACGCACCGAA ATGCGATACGTGTTGTGGAATTGTAGAATCCCGTCCCTCCC
Zanula insigers	G. Carnevali	s.n. Secuencia de ITS. Q. C.	TTAAGAANNNOTONNNOAGGATCATENNOTAGAGGEEN LAATGATGGNNOONNOTGEOCAACACGTNNNAGEGCGACTG TNNATCNACN LCCCGTTCTTTCGTANCGNGEGCNNENGCNACCACGCCCGCCCCCCCCCCCCCC
Zanilia odoratu	M. Soto	7960 Socuencia de ITS I Q III C	

/anilla perplexa

M. Sota

7955 Secuencia de ITS, Q, C

Zanilla odorāta	M Soto	8116 Secuencia de IIS O C	TNNNAGANACCTGNNNCAGGATCATIGACTAGAGGTINIAATGATGGNNCGATCTGTCCAACACGTGGGAGIGCGACIGTAATCNACNTCGCGTTCTTTCGTANCGNGTGCTCTNGCNACCACGCGGAGCTCGACGNNAIGGCGGATAAACAAAAGCTTATCGGCGTGGNTAGGCCCCAAGGGGAGAACAAAAGCTTATCGGCGTGGNTAGGCCCCAAGGGGAGAACAAAAGCTTATCGGCGTGGGAATCGAACCAACGGAAATGCTAGAGACCACGATNAAGAACGCAGCGAAATGCCGATACGAGTCCTGGAATTGTAGAACTGAACCACATTTTAAACACAGGATNICTTGAACCAAGIINCAGCAAGCCNANGANGCAAGCCNGAGGGCNCGCCTGGCTGCATGCAATGTAATGNNANCCCGTCGCTCCIIGCNGAAGCCCGCAATTTTTTGTTTCTTTCNGCCCCCNTGCNGANGNGATIIGATGACCACCCCNTGCAAGAGCCCCAATGTCAACGACGACCACAATTTTTGTTTTTGGTTCCTCCACAAATTAAGGTGGAACCCCCCCC
лачна одочава	W 5010	8116 Sectional dello Q C	THACAMAGGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
			TTAAGAANACCTONNICAGGATCATTGACLAGAGGTTNTAATGATGGNNCGATCTGTCCAACACGTGGGAGTGCGACTG TNNATCNACNTCCCGTTCTTTCGTANCGNGTGCTCTNGCNACCACGCGGAGCTCGACCNNATGGGGGATAAACAAAAGC TTATGGGCGTGGNTAGGCGCCCAAGGGGAGACAAATCTTAAGCTGGCGAAGCGGGTATCCTGTGCGCTCGTCAGGNCCATG GAGTCCTGGCAATCGAACGACTTTCNACAACGGATNTCTTGGCTCTCCGATCGATNAAGAACGCAGCGAAATGCCGATA CGTGTTGTGAATTTGTAGAATNCCGTGGACCATCCATTTTTGAACGCAAGTTNCGCCCCNANGANGCAAGCCNGAGGGC NCGCCTGCNTTGGGCGTAATGNNANCCCGTCGCTCCTTGCNGAAGCCCGGAATNTTTTTTTTTT
Zan.lla ederata	M Soto	8356 Secuencia de ITS Q C	ANTTTEAAAGATAAAN
zasila odolota	IVI JUTO	5556 Secuencia de 113 - C	TIAAGAANACCTGNNNCAUGATCATTGACTAGAGCTTNTAATGATGGNNCGATCTGTCCAACACGTGGGACTGCGACTG TNNATCNACNTCGCGTTCTTTCGTANCGNGTGCTCTNGCNACCACGCGGGAGCTCGACGNNATGGGGGATAAACAAAAGC TIATGGGCGTGGNTAGCCGCCAAGGGGACAGCAATGTTAAGCTGCCAAGCGGTATGCTGTGCGTCGTCACACACA
/anilla odorata	M. Soto	8365 Secuencia de ITS Q C	
			GTAGGCGAAC FGCGGAAGGACATTGACGAAACGTTCGAATGATGAACGATCTGTCCAACACGTGGGAAGTGCGACGGT CGTTCGACCGTCGCGTTCTTTCGTAGCGCGTCCTTTGCGAACGCACGC
/anilla nemlexa	M. Soto	7955 Sequencia do ITS I O I C	a random model and doubt in their

			CTATGGGGGGATAAACAAAAGCTTATGGGCGTGGTCAGGCGCCAAGGGAGAGCAAATGTTAAGCTGGCAAAACGAGTAC GTTTGTGCCGTCAGGTCCATGGAGTCCTGGCAATTGCAACGACTNTCGACAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
			GAACGCACCGAAATGCGATACGTGTTGTAGAATTCCCGTGACCATTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAG
			GATGCAAGCCGAGGGCACGCCTGCATGGGGCGTAATGCGACCCGTCGCTCCTTGCGGAAGCNIGGGAICTITTCGTTTGGT
			TCCCCGGCCCCGTTGCCCAGGCGATCGATGGCACCCCGTGCAATGGCATGCCGTGTTGAAGCGTGGGAAAAAATCCACTG
			ICGACACGATCAGAGGIGGACGCCGCCGCTGTIGTGGTGTTGGCCCAGCAAGAATGCATGTTGTTGTGCGACAAGCAGAI
			GCCGCCCGCATAGATCCAGCTCCGTCCTCCATGGTGTGGAATCGTGACCCCATGTTNAGGNANGNTG
/anitla perplexa	M. Soto	8748 Secuencia de ITS Q G	
			TACCGCTGGTTNANCCTAACGGGANGATGGACAAGAGGTTACAANGACGNAACGATCTGTCCAACATGTGGGAGTGCGA
			CGGTCGTCCGACGTCGCGTTCTTTCGTAGCGCGCGCTCTTGCGATCCCGCGGAGGTCGACGTTATTGGGGGATAAACAAA
			TGCTTATGGGCGTGGTCAGGCNCCAAGGGAAAGCAAATGTTAAGCTGGCAAACGAGTATGCCGTGTGTGGTCACGTCCA
			TTGAGTCCTGGCAATCGAACGACTTTCGACAACGGATATNTTGGCTCTCGCATCGATNAAAAACGCAGCGAAATGCGAT
			ACG1GT1GTGAATTGTAAAA1CCCGTGAACCATCCATTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGATGCAAGCCGAGGGCAC
			CCC/GCATGGGCGTAATGCGACCCG/CGTTCCTTCCGGGAAGCCTGNAATCTCTTGGTTTGGTTCCTCGGCCCCGTTGCGGA
			GGCGATTGATGGCACCCCGTCAATGGCATGGCGTGTTGAAGTGTGGGGCGACGGTCGACGGTCNCACACAATATTAGGTG
			GATGCCACTCGCTGTTGTGGGGTTGGCCAGCAANAATCGATGTFGTCGTGCGACCANATGCCUNCATAGATCCAGCN
			CCCTCCTCCNTGGTGTGTAACCTGGAAGCACATGTTGNGCAG
/aniila phaeantna	G. Carnovati	4885 Secuencia de ITS Q C	
			GAGAGGTTCGAACGATGGAACGTTTTTCAANATGTGGGAGTGGACGTTCGTTNGAGTNGCTTTTTTTGAAGNGGGCGTT
			CCTNGGATCAAGGGGAGTTTGAAGTTATGGGGGATAAAGAAAGNTTATGGGCGTGGTCAGGCGCCAAGGGAGAGCAAAT
			GTTAAGCTGGCAAACGAGTATGCCGGGTGTCGTCAGGTCCCATGGAGTCCTGGCAATCGAACGANTNTNGACAACGGAT
			ATCTGGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTGTFGTGAATTGTAGAATCCCGTGAACCATCCATT
			TTTTGAACGCAAG1 FGCGCCCGAGGATGCAAGCCGAGGGCACCCCTGCATGGGCGTAATGNGACCCGTCGCTCCCTGCGG
			AAGOCTGGAATNYTTCGGTTTGGTTCCTCGGCCCCGTCGCGAGGCGATTCATGGCACCCCGTGCGACGGCATGGCGTGT
			NGAAGCGTGGGCCACCGTCGACCGTCGACACATATGAGGTGGACGCCACTGGCTGTTGTCGTCTTGCCACCACAAGAAT
			CGATGTTGTCGTGCGACCAGCAGACGCCCCNCATNGATCCANCTNCCGTCCTNCCACGGTGTGGGAATCGTGACCCCATGT
			TANGTANGGGG
/anilla planifolia	M. Soto	7684 Secuencia de ITS Q C	
			CATANIGN I I TINATCATINTI CCCTNCNICGCNANGNIGNIGA I INTGCGNIAANAGCCTCTCNCCNATINTGNGGGGTCN
			CGATCNGNCCCACATCAGGNCNNCNTTGTGGNTACTCGCGTGANAGATNTNATGNNTNAAAATNCNCNTATATTNTNNA
			TCNTTNCCACCTTNGNNGCTCGATGGANACGACCGCTNTCNNNNNATCNNNCGNATGNTATCCNTCGANATCATTCGNG
			GNATGNATCGNTATCATNNNNCGCACCGCTGNATCCATNNAGNNNATAGGTNGCNGNAATTNATGTATNTNATGGTAT
			TACTCGTCCACTCNCTCCGNNACNTGNGGAAATNNGNCNTTGTGNTCAANANCATCGATNNGGGGTGNGAGGTNTGAAT
			CNANNCCN1GCCTCANAACCATACGNTNAAATGTCGNGAGNGCNNTCCCNNCNCCTNTTTGTNNNNNNNTGCGATCATT
			CCCCAAANNCAANTCGNTNANTGTNCTNNTNCCCCNNAANAATNGCGCCTNNCNCCCCTGANCNTTGTCACTATNTCCN
			NCCNCTNACGACNNNGANANCNNTNNTTCCCCCNTNNNCNTGNTNTANAGGATGACCCCGCTNTCNCCTTNANNG
Zarvilla planifolia	M. Soto	8123 Secuencia de ITS Q C	
1			

 $\tt CCAACCTTGTGGGGGGGGGGGGGTGTTCGATGTTGGTTTCTTTGTNCCGCGTGTTTTCCATTGGNGTGGAGNTNGACGCTATGGGGGGGATAAACAAAAGCTTATGGGCGTGGTCAGGCGCCAAGGGAGAGAAATGTTAAGCTGGCAAAACGAGTAC$

reontinuacion del APENDICE, Li

			ACCITIVA STEAM CINTA INCIGEGA NOAT GAMBAGAGTTACAACGAMB BAACGATTI'GTOMCACH NEGGAGTGGACGI'NGCATGAMGAGAGAGTAGACGATTI'GTOMCACH NEGGAGTGGACGI'NGCATGAMGAGAAGAAGATTAGAGGAGTAGACGAGTAGAGAGAGAGTAGAGGAGAACGAGAGAGA
t aşata	Marine	86 Sartik - Janusa de (TS − O − C −)	ACCTTYNGTTAMMUNA INCOCGANCATTGACGAGAGGTTACAACGANGGAAGGATTTGTCAACACCITGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
Parkatartat⊾ A	camai SELBY	1979-116A Pollars and ITS O C	GANNGAGAGGTTCGAACGATGGAACGTTTTTNCAANATGNOGGAGTTGGANGTTCGTTNGAGTNGCTTTTNGAAGNSG GCGTTCCTNGGATCNAGGGGAGTTTGAACHATGGGGGGATAAAGAAAGNTTATGGGGGGTGGTCAGGCHACAAGCGAGAG CAAATGTTAAGCTGGCAAACGAGTATGCCGGGGTCGTCAGGTCCCATGGAGTCCTGGCAATCGAACGANTNTNGACAA CGGATATCTGGGCTCCCCATGGAAGAACNCAGCGAAATGCGATACGTTTTAGAATCCCCTGAACCA TCCATTTTTTGAACCCAAGTTGCGCCCGAGGTAGACCCCGAGGGGCACCCCTGCATGGGCGTATGNGACCCCGTCCCACGCTCCCA CTGCGGGAGCCTGGAATNTTCGGTTTTGGTTCCTCCACCCGTTCGAGGCACCCCCTTCCACCCCGTCCCACCCCATGCCAACGCAAGACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAC
7anilla parill⊹iä	G Saazat	5868 Servietria de ITS - Q — C	CGCCANCGNTTNNNGAAATNCAGTNGAAGAANAAGTNGTAACAAGGT LTCCGCTGGGTTTAAGCATAACGGGTNGAAG GACAACAGGTTTGAAGGACTGAACGATTCGACGAACATGTGGGAGTGCGACGGTTGATCGATGATCCCGTTCTTCGACGACGGTNGAAC GCGTGCTCTTGCTATCATGTGGAGCACGACGTTGTCTGCGCGATAAACAAAAACTTATGGGCGTGGTCAGGCXCCAAGCAC ACCAAATGTTAAGATGCCAGGAGCACTGTTGTCTGGTCAGGCGCTTTGACTCCTGGCAATCGTAGAACGACTCTCCACACG GATATCTTGGCTCTCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGACACGACGACGACTGTTGTGAACACTCCTAGACCATCC ALLTTTGGAACGCAAGTTCCCGCCGAGGATACAAGCCGACGACGCCTGCATGGGTGTAGTGGACTCCTTCCT
Zaniša pompona	M. Soto	7747 Seonendia de ITS Q C	

M. Soto

/aniila pempena

8614 Sequenda de l'ISI QIIIC

			TIGGANAAGAAGTCGAACCTTTGATTCCTTCGGTGAATCTCCGGGTAGGATCATCGACGAGAGAGTTTGAATGATTCGAACGATCCACCGAACATGTGGGAACTGTTGATCCATTGATCGATGATCATCTGACATCACCACCAACATGTGGGAATAACAAAANCTTATGGGCCTGGTCGGACCAACGAGCAAAAGATAAAAAAAA
/an⊎a pompona	M Soto	7878 Secuencia de ITS Q C	TTGGANAVAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGACGAGAGGGTTTGAATGATTGAAC GATCCGTGCAACATGTGGGAGTGCGACGGTTGATCGATGTCGCGTTCTTTCGTAGCGCGTGCTCTTGCTATCATGTGGAG CACGACGTTGTGGGGATAAACAAAAGCTTATTGGGCGTGCAGCGCCCAAGGCGAGCAAACGATTCTTAAGATTGCAACAG GCATGTTGTGCGCAGTCACTTGGCAATCCGAACCAACTCCACATTTTTTTT
Zanilla pompona	M Sato	8119 Secuencia de ITS Q C	CGCCANCGN I INNNGAAATNCAGTNGAAGAANAAGTNGTAACAAGGTTTCCGCTGGGTTTAAGCATAACGCG I NGAAG GACAAGAGGT I I CAAGGACTGAACGATTCGAGCAACATGTGGGATTGCGAGTTGATCGATTTTAAGCATAACGCG I NGAAG GCCAACGT I CAAGGACTGAACGACGACGACGATTGTGGGGATGCGAACAAGCATTTATGGGCGTGGTCTTTTGAGCGCTGCAAGCAGG GCCAAATGTTAAGATGGCAGACGAGCATGTTGTTGTCGTCGTCAGTCCTTTTGAGTCCTGGCAATCGAACGACTCTCGACAACG GATATCTTGGCTCTCGCA 1CGA 1GAAGAACGCAGCGAAAA TGCGA 1 TGT 1 GGAA 1 TGT AGAA 1 CCCG 1 GAACCATCC ATTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGATGCAAGCCGAGGCCACGCCTGCATGGGTG 1 AG 1 GG CGACTCGTCGCTCCTTG CGGAAGCCTGGAATCTTTGGTTTGG
/an≀la pompena	M Soto	8509 Secuencia de ITS Q C	TTGGANAAGAAGTCGAACCITTGATTCCTTCGGTGAATCTGCGGTAGGATCATCGACGAGAGAGTTTGAATGATTCGA ACGATCCACGCAACATGTGGGAGTCCGACTGTTCATCGTTGCGTGGACTGACGACGAGAGAGTTTGAATGATTCGA ACGATCCACGCAACATGTGGGAGTCCGACTGTTCATCGTTCGCGTGCTCTTTCGTATCGTGTGG AGCACGACGTTGTGGGGGATAAACAAAACCTTATGGGCGTGAACGACCGAACGCAAGGCAAAGGATTAAGATGACGAAC GAAGAACGCCAGGGAAATGCGATACGATCCTAGAATGTAAAATCCCGTGAACCATCCAT

TAUTGTAGGTGAACTGCGGAAGGTCATTGACGAGAGGTTTGAATGATTGAACGATCCGTGCAACATGTGGGGAGTGCGAC
GGTTGATCGATGTCGCGCTTCTTTCGTAGCGCGTGCTCTTGCTATCATGTGGAGCACGACGTTGTGCGGATAAACAAAAGC
TTATGGCCGTGGTCAGGCGCCAAGGCAGACCAAATGTTAAGATGGCAGACGAGCATGTTGTGTCGTCAGGTCCTTTGAGT
CC1GGCAATCGAACGAC1C1CGACAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTGT1
OTGAATTGTAGAATCCCCTGAACCATCCATTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGATGCAAGCCGAGGGCACGCCTGCA
TGGGTGTAGTGCGAC1CGTCCTTGCGGAAGCCTGGAATCTTTGGTTTCGTTCCTCGGCCCCGTTGTGGAGGCGATTG
ATGGCACCCCGTGCTGCCCCATGCCGTGTTGAAGTTTGGGGCCGACGGTCGACTGTCGACATGTTTGAGGTGGACGCCATC
GGTTGTTGTGGTGTIGCCCAGGAAGAATDGTGGTTGCTTTGCGACAAGCAGATGCCCCGCATAGATCCAGCTCCGTCCAC
CGTGGTGTGGAATCGTGACCCCATGTTAGTGAGCTACCCGCTGAGTTAAA

/andla pompona	M. Soto	7632 Secuencia de ITS	Q	C

Zarilla sp. M. Soto 8355 Secuencia de ITS Q C

APENDICE 2. Secuencias nucleotídicas de un intrón del gen ADH de distintos cultivares de *Vanilla planifolia*

Especie	Colector	Numero Caracter	tipo I	long/prec	Descripcion
					TGGATCGTCTTCTATAAAACGCCGATTTATCTCCTTGTATGTCGTCGTCGTTTCATAAGCTGCATGGTTTTTNAATCTGTGTA
Zanılla planitoplıa					TTGAAGTTGGATATGGAACATACAGGGCCAAACACCAATGTTCCCAAGGATATTTGGCCATGAAGCAGGAGGGTAAGG
tv. Oreja de burro	M. Soto	8536 Secuencia de ADH	Q (C	ATTCTAAAACAGTTGTTAGCTTTACTCTTCGACCCTTGTAATNTTTGTTTTT
					TGGATCGTCTTCTATAAAACGCCGATFTATCTCCTTGTATGTCGTCGTTTCATAAGCTGCATGGTTTTTNAATCTGTGTA
					TTGAAGTTGGATATGGAACATACAGGGCCAAACACCAATGTTCCCAAGGATATTTGGCCATGAAGCAGGAGGGTAAGG
Zanilla planifolra	M. Soto	8526 Secuencia de ADH	0 (С	ATTCTAAAACAGTTGTTAGCTTTACTCTTCGACCCTTGTAATNTTTGTTTTT
rama pamona	W. 0010	ODEO OCCACIONA DE ABIA	~ `	•	ATTENDED TO A STATE OF THE STAT
					TGGATCGTCTFCTATAAAACGCCGATTTATCTCCTTGTATGTCGTCGTTTCATAAGCTGCATGGFFTTTNAATCTGTGTT
Zanilla planifolia cv.					TGAAGTTGGNTATGGAACATACAGGGCCAAACACCAATGTTCCCAAGGATATTTGGCCATGAAGCAGGAGGGTAAGGA
Acamaya	M. Soto	8508 Secuencia de ADH	Q (С	TICTAAAACAGTTGTTAGCTTTACTCTTCGACCCTTGTAATNTTTGTTTTT
					TGGATCGTCTTCTATAAAACGCCGATTTATCTCCTTGTATGTCGTCGTTTCATAAGCTGCATGGTTTTTNAATCTGTGTA
Zanilta planifolia cv.					TTGAAGTTGGATATGGAACATACAGGGCCAAACACCAATGTTCCCAAGGATATTTGGCCATGAAGCAGGAGGGTAAGG
vanna plantona ov.	M. Soto	8538 Seguencia de ADH	0 0	r	ATTCTAAAACACTTCTTACCTCTTCCACCCCTTCTAATNITTCTTTT
				_	
					TGGATCGTCTTCTATAAAACGCCGATTTATCTCCTTGTATGTCGTCGTTTCATAAGCTGCATGGTTTTTNAATCTGTGTA
					TTGAAGTTGGATATGGAACATACAGGGCCAAACACCAATGTTCCCAAGGATATTTGGCCATGAAGCAGGAGGGTAAGG
/anilla planifolia	A.Cibrian	13 Secuencia de ADH	Q (C	ATTCTAAAACAGTTGTTAGCTTTACTCTTCGACCCTTGTAATNTTTGTTTTT

APENDICE 3. Secuencias nucleotídicas del intron del gen CAM de distintos cultivares de *Vanilla planifolia*

	0.1.1				DECOMPOSITAL.
Especie	Colector	Numero Caracter	tipo	long-prec	DESCRIPCION
					TAAGCATCATGATATTGAAAAGTTATACGGGAACATATCTTGCCCTTTGTGAATCCCTTATTGAG
					GCTATGATCCTTCCACAAAGGGGCAATTGTTTTTCATGCTCCACATCTCTCGTACTACTTGTATC
					ATTATCATGGACCAATACATAGAAACCATTAGTGTGCCGCGGCAATGACTTCGTCTCTGCGCTGG
					CTCGTTFTGGCGCTGCGGTGTCGCAGCATATTGCCA
					CTGCTCTTCATGGCCTATGGGTGAACAGGAATGCCAGAAAACATGGACAACCTTATTTGAGCAA
					CGCCTCGTTATTACAAAGCATCAACATCAGCATTTTGTGTAGCACACAGCGTGATTCTGTGATGT
					CATTTCTGCCCACCGGGAACCTTCTCAACTCTGCTGAGTTGGGTGTTGCCCATAATTGGGTTCCCC
Zanilla planifolia (n M. Soto	8508 Secuencia de CAM alpha	0	С	CTCCCGCAAAATGGCTTATGGTGAACTGTGATGCGCTCACTATTA
zamila piamiolia s	VIVI. 3010	6506 Sectionicia de Chivi alpha	C.	_	T44004T04T04T4T04444400004104T4T00004T0T0004TT07040
					TAAGCATCATGATATTGAAAAGTTATACGGGAACATATCTTGCCATTTGTGAATCCCTTATTGAG
					GCTATGATCCTTCCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
					CATTATCATGGACCAATACATAGAAACCATTAGTGTGCCGCGGCAATGACTTCGTCTGTGCTG
					GCTCGTTTTGGCGCGCGTGTGGCTCTCGGAGTGGTGCTAATTATGTTCACTTGCAGCATATTGCC
					ACTGCTCTTCATGGCCTATGGGTGAACAGGAACAGGAAAACATGGACAACCTTATTTGAGCA
					ACCCCCCGTTATTACAAAGCATCAACATCAGCATTTTGTGTAGCACACAGCGTGATTCTGTGAGTT TCATTTCTGCCCACCGGGAACCTTCTCAACTCTGCTGAGTTGTGTGTTGCCCATAATGGGTTCCCC
					CTCCCGCAGGATGGCTTATGGTGAACTGTGATGCGCTCACTATTC
Zanilla planifolia d	ov M. Soto	8508 Secuencia de CAM beta	Q	C	O TOCCCOACION TO CONTAIN TO
•					TAGCCTGTTCGACAAGGATGGATCTTTATTTTATCTGATAAGCATCATGATATTGAAAAGGTATA
					CGGGAACATATCTTGCCGTGGGTGAATCCCTTATTGAGGCTATGATCCTCCCACAAAGGGGCAAT
					TGTTTTATTCATGCTCCACATCTTTCGTACTACTTGTTTCATTATCATGGACCAATACATAGAAA
					CCATTAGTGTGCCGTGGCAATGACTTCGTCTCTGCGCTGGCTCGATTTGGCGCTGCGTGTGGCTCT
					CGGAGTGGTGCTAATTATGTGCACTTGCAGCATATTGCCACTGCTCTTCATGCCCTATGGGTGAA
					CAGGAATGCCAGAAAACATGGACAACCTTATTTGAGCAACGCCTCGTATTACAAAGCATCAACA
					TCAGCATTTTGTGTAGCACACAGCGTGATTCTGTGATGTCATTTCTGCCCACCGGGAACCTTCTC
					AACTCTGCTGAGTTGCGTTGTTGCCCATAATTGGGTTCCCCCTCCCNCANNANGGNTTATGGTGA
					ACTGTGNTGCGCTCACNCANTTTNNACTAGCCATTCTGGGGGNAAGGNGGAACCCCATTTTGGG
Zanijla planifolia d	N M Soto	8536 Secuencia de CAM alpha	0	С	CAAAACACAANTNACANNNTTTGATNAACGGGCCCGGCGG
raining promising t	J. III. 9010	GOOD GEGGOTION OF CANADAM	·		ATCCTNNTTTATCTTATAAGCATCATGATATTGAAAAGTTATACGGGAACATATCTTGCCATTTG
					TGAATCCCTTATTGAGGCTATGATCCTTCCACAAAGGGGCAATTGTAGATTCATTC
					CTTGTACTACTTGTATCATTATCATGGACCAATACATAGAAACCATTAGTGTGCCGCGGCAATGA
					CTTCGTCTCTGCGCTGGTTTTGGCGCTGCGTGTGGCTCTCGGAGTGGTGCTAATTATGTTCA
					CTTGCAGCATATTGCCACTGCTCTTCATGGCCTATGGGTGAACAGGAATGCCAGAAAACATGGA
					CAACCTTATTTGAGCAACGCCTCATTATTACAAAGCATCAACATCAGCATTTTTGTGTAGCACACA
					GCGTGATTCTGTGATGTCATTTCTGCCCACCGGGAACCTTCTCAACTCTGCTGAGTTGTGTGTG
					CCATAATTGGGTTCCCCCTCCCGCAAGATGGCTTATGGT
Zanilla planifolia d	x M. Soto	8536 Secuencia de CAM beta	Q	C	55/1/Will add 1.55550100000/ManfodoTIATOQ1

				GTTATACGGGAACATATCTTGCCATTTGTGAAATCCCTTTTGAGGGCTATGAGCCCTCCCACAAAGG GGCAATTGTAGATTCATGCTCCACCATTCTTTGTACTACTTTATCATGACCCATACAT AGAAACCATTAGGTGCCGCGGCAATGACTTCGTCTCTTGCAGCTGCTGTTTTGGCGCTGCTGT GGCTCTCGGAGTGGTGCTAATTATGTTCACTTGCAGCAATTGCCACTGCTCTTCATGGCCTATG GGTGAACAGGAATGCCATAAACATGGACAACCTTATTTGAGCAACGCCTCATTATTACAAAGC ATCAACATCAGCATTTTGTGAGCACACCAGCGTGATCTGATGTCATTCTGCCCACCGGGAA CCTTCTCAACTCTGGTGTGTGTGTTGCCCATAATTGGGTTNCCCCTCCCGCAGGATGGCTTAT GGTGAACTGTGATTGCGCTCNTCTTTTNNGAAANNGCCATTCCTGNGGGAGGGGGAACCCNAATT NTGGGCAACACACACACACACACACACAGAGTTNNGAAGGTTNCCCGGTGGGCAAGAANTNACTTTANA GAATCACGCTGTGTGCT
Zanilla planifotia cv l	M. Soto	8538 Secuencia de CAM alpha Q	С	
	M. Cata		•	TAGCCTGTTCGACAAGGATGGATCTACCCTTTAATCTATCAGCATTATGATATTGAAAAGTTATA CGGGAACATATCTTGCCATTTGTGAATCCCTTATTGAGGCTATGATCCTTCCACAAAGGGGCAAT TGTAGATTCATGCTCCACACCTCCGTACTACTTGTATCATTATCATGACCCAATACATAGAAAC CATTAGTGTGCCGCGGGCAATGACTTCGTCTCTGCGCTGGCTCGTTTTTGGCGCTGCGTGTGGCTCTC GGAGTGCTCAATTATCTTCACTTCCACCATATTCCCACTGCTCTTCATCCCCTATGCGTGAAC AGGAATGCCAGAAAACATGGACAACCTTATTTGAGCAACGCCTCATTATTACGAAGCATCAACA TCAGCATTTTGTGTAGCACACAGCGTGATTCTGTGATGTCATTTCTGCCCACCGGGAACCTTCTC AACTCTGCTGAGTTGTGTGTGTGCCCATAATTGGGTTCCCCCTCCCGCACCATCCCTTATCGTCAAC CTGTGATGCCGCTCAC
∕anilla pfanifolia cv t		8538 Secuencia de CAM beta Q	С	GTTATACGGGAACATATCTTGCCTTTGTGAATCCCTTATTGAGGCTATGATCCTTCCACAAAGGG GCAATTGTATATTCATGCTCCACATCTCTCGTACTACTTGTATCATTATCATGACCCAATACATA GAAACCATTAGTGTGCCGCGGGCAATGACTTCGTCTCTGCGCTGGCTCGTTTTTGGCGCTGCGTGTG GCTCTCGGAGTGGTGCTAATTATGGTCACTTGCAGCATATTGCCACTGCTCTTCATGGCCTATGG GTGAACAGGAATGCCAGAAAACATGGACAACCTTATTTGAGCAACGCCTCATTATTACAAAGCA TCAACATCAGCATTTTGTGTAGCACACAGCGTGATTCTGTGATGTCATTTCTGCCCACCGGGAAC CTACTCAACTCTGCTGAGTTGTGTGTGCCCATAATTGGGTTCCCCCCTCCCGCAGAATGGCTTAT GGTGAACTGTGATGCCTCAGTNCTNTGNATTAGCCATNCTGCGGGAGGGGGAACCCCAATTATG GGCAACACACACACTT
/anilla planifolia M	И. Soto	8520 Secuencia de CAM alpha Q	С	ACTOTTTTAATCCTATAAGCATCATGATATTGAAAAGTTATACGGGAACATATCTTGCCATTTG TGAATCCCTTATTGAGGCTATGATCCTTCCACAAAGGGGCAATTGTAGATTCATGCTCCACACCT CTCGTACTACTTGTATCATTATCATGGACCAATACATAGAAACCATTAGTGTGCCGCGGGCAATGA CTTCGTCTCTGCGCTGGCTCGTTTTGGCGCTGCGTGTGGCTCTCGGAGTGGTGCTAATTATGTTCA CTTGCAGCATATTGCCACTGCTCTTCATGGCCTATGGGTGAACAGGAATGCCAGAAAACATGGA CAACCTTATTTGAGCAACGCCTCATTATTACAAAGCATCAACATCAGCATTTTGTGTAGCACACA GCCGTGATTCTGTGATGCATTTCTGCCCACCGGGAACCTTCTCAACTCTGCTGAGTTGTGTGTC CCCATAATTGGGTTCCCCCTCCCGCAGGATGGCTTATGGTGAACTGTGATGCCCTACTAT
Zanilla planifolia - M	M. Soto	8520 Secuencia de CAM beta Q	С	

GTTATACGGGAACATATCTTGCCATTTGTGAATCCCTTATTGAGGCTATGATCCTTCCACAAAGG

Zanilla planifolia	A. Cibrran	13 Secuencia de CAM alpha Q	С
/anilla planifolia	A. Cibrian	13 Secuencia de CAM beta Q	С

GCCTGTTCGACAAGGATGGATCTTTATTTTATCTGATAAGCATCATGATATTGAAAAGTTATACG GGAACATATCTTGCCATTTGTGAATCCCTTATTGAGGCTATGATCCTTCCACAAAGGGGCAATTG TTTTATTCATGCTCCACATCTCTTGTACTACTTGTATCATTATCATGGACCAATACATAGAAACC ATTAGTGTGCCGCGCAATGACTTCGTCTCTGCGCTGGCTCGTTTTTGGCGCTGCGTGTGGCTCTCG GCGTGGTGCTAATTATGTTCACTTGCAGCATATTGCCACTGCTCTTCATGGCCTATGGGTGAACA GGAATGCCAGAAAACATGGACAACCTTATTTGAGCAACGCCTCGTTATTACAAAGCATCAACAT CAGCATTITGTGTAGCACACAGCGCGATTCTGTGATGTCATTTCTGCCCACCGGGAACCTTCTCA ACTCTGCTGAGTTGTGTTGCCCATAATTGGGTTCCCCCTCCCGCAAATGGATTATGGTGAACT GTGATGCGCTCCCTTTTTTNAGTAGGCCATTCTGCGGGAGGGGGAACCCAATTTCTGGGCAACAC ACAACTCAANAGA

GAGCAAAAANCNGTNANTTANAGAAAANTAGATNAANGACAACGGGCNGCCTTANNNAANNG NANNANAGGGTGNCGNCGAGATTGANNAANCNCCTCCCNCCAGNNNGNCANANAATAAAAGA TAGCCTGTTCGACAAGGATGGATCTTTATTTTATCTTATAAGCATCATGATATTGAAAAGTTAGA CGGGAACATATCTTGCCATTTGTGAATCCGTTATTGAGGCCTATGATCCTTCCACAAAGGGGCAA TTGTAGATTCATGCTCCACACCTCTCGAACTACTTGNATCATTATCATGGACCAATACATAGAAA CCATTAGTGTGCGGCGCAATGACTTTGTCTCTGCAGCTGGCTCGTTTTGGCGCTGCGTGTGGCTC TCGGAGTGGTGCTAATTATGTTCACTTGCAGCATAAAGCCAATGCTCTTCATGGCCTATGGGTGA ACAGGAATGCCAGAAAACATGGACAACCTTATTTGAGCAACGGCCTCGTTATTACAGAGCATCA ACATCAGCATTTTGAAAAAGCACACAGCGTGATTCTGTGATGTCATTTCTGCCCACCGGGAACCT TCTCAACTCTGNTGAGTTGTGTGTTGC

NANNNGNGAGANNAAGAAAANTNTATTNNAGAAANAACNNCNCNCCGGAAACAANAAGCN NCACNAAAAANATGGTTATTNATANCNNGCNCGNCACGAAANAAAAAAAAACACANANAANNC GNTTTTNNAAAAACNNNNNNTCGNAAACAGCCCATNAGATAAANNTNTTTTTTNAANNANANA NANAACACACNNNANTNNATNTGANTGGANGCNNTNTNTCGCCACCCNAAGGGGNNANNNTTN TAATGNANGNANAGTNACAAATAAAACGNNTCGACACAACCTGGGTTGGCGCGCACCANNCNT NCCNAAATNCANANNNTNGNGTGGGNGGGNGGNGCCCNTAAAAANAACACACACAANCG ACANCTCTGANGACATANNTGNGCGNNGNGCGNTAGNGTTCGCGCGCGCCCTTCCGTNAAAACAA NTGCNGCTATAGTTNGAATGCGCGCNGGCNAANACTTAGTCTNNGCNCGGGCATCGNTTTGCNN TONNTONYSTRSYTAYNOWNRSNNKGTGONNAANTNNKYYNNMTKGNAGATYAGGMMAMTKNO WCTNGCKNNTMRWGKCNTRTKGRTKANTTNNGKNMNKCYWGNCATACCAWGCCAYGWCYTTGC NNNTNGNNYKAYNCCTANGKKRGTWTNWRRCNYNNWYNWCNGMANYNTGCYGYAGTYCMYNYR GYGTGGGACTTCNGATRAYCAKTCTATTYATTRCAYCAAGYSGGCGACNGTCACTATSNCNAGAS WYYTGSKGRGCYTNKGWRTTCACGANCYACNMWTATGGNAGYNCMCNYTSCNATKYARNCNCTG SAGGAGAATTATTGNTAGGGANAATAGTCTTTGGACNNGTGTCATGATTACCAAGTATTTCGGT GCACTGCAACACCTTGTGCGCCCCACCGGGGCTTNGCATGCTTGNCNCCTTATGATGAATTCTCT TCATGCCGCACTNTCTTTGCTTGACTTGNAGAANGTTGGATGGGTCTTCTACCTTATNTCTTNGA NGATNATTGGTTCGGGGAGCTCTNCCCTCGGAGANGGNGGNCANCCTTTATTAAATATGGATT TCAANTTTGGCCCCATFATGTTNCCTGANNTGNATGAANCAAGCCTGGCGTTTTGGNGANACCFT

TANANAANANNNTNNAAAACNGNCCCTCTGTCAANNAGTFTTNTNNNNAAGGNGAANNNANA NCACNONNATAATATANAAGNOATNOCTGNGGONCANCCAGGGGGGGNNTNTTTNAGAGNGAN NNACAANANGAGNNNCCCCCCANACANGNNNGGNGANNGCCNCNTNNNNATAANAAACANTT GNGGNGNGGAGNGCGCCANNTATTNAANCTCNCACCCACACNCTNNNTNATNACTNNNGCGNN CGNTTNGGTCGCGCGCCTTCCGTGAGNCNGNTGCGGCTTNTGTATGCNNGCNCCNCGGCGAAT NAATTNGTNTCTAGCNCNGGCTCGNTTNGGCANCNGCGTGTGGCTCNCNGCGTGGTGCNAATTA TGTTCGCTTGCAGCATANNGCCACTGCTNTTCATGGCNTANGGGTGNACAGGAATGCNAGANAA CATGNACNACCTTATTTNAGCAACNCNTCGTTANTMNWWNCATGTCNTACATNATACRCANG WTTGTGYAGCAAATNTCCNAATGGCAGATTASGYSACTTTCTCKTGNGGGTAGAGTCATKTTKRY YMATYCGGTGMWYCTTGCCATAYCAAGCYMTGTCTYTGMGYWKTGTGTTRYCCMTAAKKGGGTT YTTGACMCYNYYGRCCGANTCTTGCNGSRGTTCCTWTGGTGTGGGACTTCGGATANCCATTCTAT TCATTACATCAAGTGGCCGACNGTCACTATGCCGAGAGATTTGGGGGGGCCTTGGAATTCACGATC TACNOTTATGGCAGCGCACGTTNCAATTTAAACACTGCAGGAGAATTATTGCTAGGGAGAATAG NUTTIGGACTAGTATCATGATTACCAAGTATTTCGGTGCACGCAACACCTTGTGCGCCCCACGCG GNGCTTCACATGCTTGCCGNCTTANGATGAATTCTCTTCATGCCGCACTTTCTTGCTTGACTNGG AGAANGTTNTGATGGGNCTNCTACCTTATTTCFTT'GAGGATANTTGGGTGGGGATCTNCCCTTGG

TGNATNCNCTACATCATACANAGATTGTGCAGCAAATTTCCAAATGGCAGATTAGGCCACTTTC TCTTGCGGGTAGAGTCATGTTGATTAATTCGGTGCTTCTTNCCATACCAAGCCATGTCTT1GCGC ATTGTGTTATCCCTAAGGGGGTTTTTGACACTATTGACCGAATCTTGCGGCAGTTCCTTTGGTGTG GGACTTCGGATANCCATTCTATTCATTACATCAAGTGGGCGACNGTCACTATGCCGAGAGATTTG GGGGCCTTGGAATTCACGATCTACACTTATGGNAGCGCACGTTNCAATTTAAACACTNCAGGA GAATTATTGCTAGGGAGAATAGTCTTTGGACTAGTATCATGATTACCAAGTATTTCGGTGCACGC AACACCTTGTGGGCCCCACGCGGTGCTTCGCATGCTTGTCGCCTTACGATGAATTCTCTTCATGCC GCACTNTCTTGCTTGACTTGGAGAATGTTTGATGGGTCTTCTACCTTATTTCTTGAGGATANTTGG GNTGGGGATTCTCCCCTTGAGATGGNGGGCCAACCTTCATTAATATGGATACNACTTGGCCCCAT TATGTTNCTGACTNCATGATTGAGCCTGGCNTTTGGGACACCTNNAAGCTNSNNCYGKGNGSMN NWGAANNTANNTTNTTYNNWAMAAGANNWCATSCMCNTNKNCKTGGGAAWNAAANSRNNCCN TGTAAAAANCYANCNGYKTNGNAANCAGGCNTTNNATGAGANAAGGNTTTNTANGNGNGANGN ANNAAAGACTGCTTGNATGNATAGGAGCCTTTNTGNNCNNNCAAGGGGTGTATTTTTGNNAGGA ANANNNANNNCAANTGGCCNGCCCCACTCCAGGNTTGGGCGCGCGACNCACTNNCTTAANTAN GCCNCTATGNNTGNGCGGGNGCGCGCCCAANAAATACACACTCNCANCCACACTCANATGNATT NINGOGOGOGOGOGOTOGNICHITANGOGOGOCOCTTOOGTGANACACHANIGOTTANAIGTITGONI

Zanilla planifolia cv M. Soto 8538 Secuencia de CAM lambo Q C

Janilla planifolia A. Cibrian 13 Secuencia de CAM lambo Q C

CE 4 Secuencias nucleotídicas del gen GAPC4 en distintos cultivares de Vanilla

	Numers Caracter		long prec	Descripcion ATTI FITGNAATTGTTGAGGGGGCTTATGACGACTGTTCATGCAACCACAGGTTTATTTA
∕anilla planifolia - A. Cibrian	1.3 Secuencia de G3PDH	ŭ		TGACGACTGTTCATGCAACCACAGGTTTCTTTACTCCCTTTTGGCAAAACGAGGAGGCTTTCATAGCTGNGAATGGGCNNCTGAAAATTGA ACATTCTGTCCAGCCCACAGAGAACCACAGGTTC ACCTGGTGCCTCAAAAGGTGGGACCNACCCTATGGTTCCTTAAAATTTAACGTTGAAATTTCAAATCTAAGTAGGGAATTTTTTTT
7anılla planitofia ৫ M. Soto	8536 Secuencia de G3PDH	٥	С	CITATGACGACTGTTCATGCAACCACAGGTTTTTTTACTCCTTTTTTGGCAAAAACGAGGTAGGT
/anilla planifolia M. Soto	8526 Secuencia de G3PDH	Q	С	AAAATTTGGANTGCTTATGACGACTGTTCTCCAACCACAGGTTTTTTTTACTCCTTTTTTGGCAAAACGAGGTAGGT
/amilla planifotia cv M. Soto /amilla planifotia cv M. Soto	8508 Secuencia de G3PDH 8538 Secuencia de G3PDH		c	CTTATGACGACTGTTCTGCAACCACAGGTTTNFFTACTNCCTTTTTGGCAAAAACGAGGTAGTATTTAATAGCTGTAGATTGTTGTCTGAAA ATTGATTTATTCTGTCCAGCAACACAGAAGACCGTTGATGCTCCTTCGAAAAAAAGACTGGAGAGGGCGAGGTCGAGGTCAAAACATCA TTCCAAGTTCAACTGGTGCCGCAAAAGGTGGGACTAACTCATATGTTTATTTTTAACGCTTGAAATTTTCAAATCTAAGTAGTGATCTTT ATTTAGGCTGTTGGAAAAAGTTCTTCCTGAACTTAATGGAAAGCTCACTGGCATGGCTTTTCGTGTCCCAACACCAAACGTTTCTGTTGTGGA CTTAACTTGCAGACTCGAAAAAGATTGCGTCATATGAGAACGTTAAGGCGGCCATTTAGTATGTTTTTGACCTGCTTCTATATTTTTTATTT 11AGTGCCTCTAATTGTGGATAATCATCGTTTCTTCATNTTTGATGTACAATTTGGTTAATGTCFTTTAGGTTTGCATCTGANAGCACCTGA ANGGCATNC11GGCTACACTGATGAAGACGTTGTTTCTAACCACTTTGTCCCGCCGACTNCAGGTCGAGCATATTTGATGCCCANGCTGGA

APENDICE 5. Frecuencias alélicas observadas para Vanila planifolia en todas las localidades

Localidades

(N) 2 2 GDH-1 (N) 1	(N) 2 1 .55 2 .5 6PGD-1 (N) 2 2 .5 5DH-1	(N) 1 1DH- (N) 1 2 G6PD	(N) 1 2 3 4	(N) 2 2 2 4 1 (N) 2 2 2 2 3 3	Locus ACPH-1 (N) 2 1 1.00 2 .00 ACPH-2 (N) 1 1.00 2 .00 DIA-1
1.000 1.000 1.000 1.000		2 1.900 2 2 1.000	.500 .000 .000	1.000 .000 .000 .000 .000 .000	1.000 1.000 1.000 1.000
1.000 .000 1.000	.667 .333 .667 .333	1.000 3 1.000	1.000 .000 .000	1.000 .000 .000 .000	1.000 1.000 1.000
. 667 . 333	1.000 .000 3 1.000	3 1.000 3 1.000	1.000	.000 .000 .000 .000 .000 .333	. 3 1.000 .000 .667
1.000	1.000 .000 .000	1.000 5 1.000	.833 .000 .000	.917 .083 .000 .000 .000	. 167 . 167 . 917
.000 .000 .667	. 667 . 333 . 667	1.000 1.000 1.000	. 667 . 900 . 333	1.000 .000 .000 .000	5 1.000 .000 .833
1.000 .000 .000	1.000 .000 5 1.000	1.000 1.000 1.000	1.000 .000 .000	1.300 .300 .300 .300 .300	1.000 .000 .600
. 667 . 333 . 400	6 1.030 .030	1.000 6 1.000	.500 .167 .333	.000 .000 .000 .000 .083 .083	7 1.000 .000 1.000
3 .667 1.000		1.000 3 .667	1.000 .000 .000	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	8 1.000 .000 3 1.000
1.000 .000 .000 .333 .667	3 1.000 .000 3 .667	3 1.000 3 1.000	1.000 .000 .000	1.000 .000 .000 .000 .000	9 .667 .333 1.000

MDH-		r	c	Ų	٢	u	Ų	n	n
(<u>x</u>) -	_	ر ا ا	2 COO	უ უ ე	567	000.1	33 33 30 60 70	1.000	1.000
4 72	000.	000.	000.	.167		000.	.167	0000.	000.
MOM-	٠.								
(x)		m	т	9	۲3	ĸÜ	9	ო	m
_		1.000	.667	.833	.000	.400	.667	.667	J.00C
0		000.	.333	.167	1.000	.600	.333	.333	000.
m		000.	000.	000.	000.	000.	000.	000.	000.
4	.500	000.	.000	.000	.000	000.	. 000	000.	000.
ME-1									
(N)		m	т	vo	m	ц)	ঘ	2	3
٦	,	000.	1.000	.833	.667	.400	.750	.500	1.000
2		.667	000.	.167	.333	.606	.250	.500	000.
m		.333	000.	000.	000.	.000	000.	.000	.000
4	000.	000.	.000	000.	000.	000.	000.	.000	.000
FE-1									
(N)		m	m	9	2	וח	s)	ო	<>
1		1.000	1.000	.667	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7		000.	000.	.167	000.	000.	.000	000.	000.
m		000.	000.	.167	.300	000.	.000	000.	000.
4	000.	000.	000.	000.	000.	000.	000.	000.	000.
LAP-	_								
(X)		т	m	9	m	ιŊ	9	ന	m
,1	_	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.300	1.000	1.000
7		000.	000.	.000	000.	000.	000.	000.	000.
e		000.	000.	000.	.000	000.	.000	000.	.000
4	000.	000.	000.	000.	.000	003.	000.	000.	000.
LAP	N								
(N)	П	m	ന	છ	m	n)	9	ς.	m
ᅱ		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

				Loca	lidades				
	10	11	12	13	14	ம்) எ	16	11	18
Locus									
ACPH-	7					•			
(N)							4		8
Н							.750	1.000	1.000
8							.250		.000
ACPH-									
(N							ጥ	4	တ
							1.000	.875	.750
2							000.	.125	.250
DIA-1									
$\widehat{\mathbf{z}}$							4	4	ထ
m							1.000	1.000	857
2							.000	000.	.000
m							.000	000.	000.
4	4 .000						.000	000.	.125
DIA-2									
(N)	т	ო	æ	寸		7	4	414	∞
н (1.000	1.000	1.000	1.000	.750	1.000	1.000	.875	1.000
.71	000.	000.	000.	000.		000.	000.	· 173	000.

(N) (N) 2 3	(R) (R) (R)	(N) 12 20 44	(N) 1 :	(N)	(N) 1 2 2 3	(N) 1 2 3	(N) 1 1 2 2 3 3	1 2 2 3 4 4 (N) (N) 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	3 GOT -:
1.000 .000 .000	. 667 . 333 . 000		1.000	1.000	.667 .333 .000	1.000	1.000 1.000 1.000	.667 .000 .333 .000 1	
1.000 .000 .000	. 333 . 667 . 000		3 1.000 .000 .000	3 1.000 .000	.667 .333 .000	3 1.000 .000 .000	1.000 .000 .000	1.000	.000
1.000 .000 .000	. 667 . 333 . 000	.667 .333 .000	3 1.000 .000	3 . 667 . 333	3 .333 .667 .000	3 . 667 . 333 . 000	1.000 .000	1.000 .000 .000 .000	.000
.500 .250 .000	.750 .250 .000	.500 .500 .000	1.000	.750 .250	.500 .500 .000	1.000 .000 .000	1.000 .000 .000	.500 .250 .250 .000	. 000
1.000 .000 .000	.500 .500 .000	.500	1.000 .000 .000	1.000 .000	1.000 .000 .000	4 1.000 .000 .000	1.000 .000 .000	.750 .000 .250 .000	.125
.300	. 1000	.200	1.000 .000 .000	.750 .250	. 800 . 200 . 1000	.800 .200 .000	1.000 .000 .000	1.000 .000 .000 1.000	. (100
.500	1.000 000 .000	1.000 .000 .000	.750 .250 .000	. 250 . 750	1.000 1.000 .000	1.000 .000 .000	1.000 .000 .000	.750 .000 .250 .000	.000
1.000 .000 .000	.750 .250 .000	1.000 .000 .000	.750 .250 .000	.750 .250	.250 .750 .000	1.000 .000 .000	1.000 .000 .000	.750 .000 .250 .900	.000
1.000	.625 .375 .000	.500 .500 .500	7 .571 .429 .000	. 625 . 375	.250 .750 .000	.750 .000 .000	.500 .375 .000	1.000	.000

हैं न ल छ स	(N)	'N) 1 2 2 RUB-1	(M) 1 2 3 3 4	D1 4 3 2 2 4 3 4 4 3 4 4 3 4 4 4 4 4 4 4 4	-	1 1	Locus		N)	<u> </u>
	3 1.000	 ⊢ a ⊙ ω ω <> ω	1.630 .600 .000	.000	 	. :	19	1.000	0000	0000
	1.000	1.000	1.000 .000 .000	1.000 .000	.750 .250	1.000 .000	20	1.000	0000	. 667 . 000
	1.000		. 933 . 167 . 000	. 833 . 000 . 167	.750 .250	1.000	21	1.000		1.000
.833 .000 .000	000.1	;. 000 . 000			. 200		Localidades 22	1.000	1.000 .000 .000	
 	1.000	1.000 0000.	.753 .250 .000	 	.750 .250	1.000 000	ades 23	1.000	1.300	1.000 .000
	1.000	 1 - (1 4, n) n) 4 - O O	.000		1.000 .000	1.000	24	1.000	000 000 .000	
	1.0	1. 00P	P		1,50	1.001	N 5	1.600	.750 .000 .000	1.000 .000
	· -	83 	0000	0000	00 1.0	· #4	8	1.000 A	4 1.000 1 .000 .000	.000
	000	0 0 0 0		00000	500		6	000	0000. 0000. 0000.	. 143 000 143

(N) 1	(N)	(N)	(N) 1 2 3	(N) 1 2 3	(N) 2 2 2 4 3	(N) 1 2 3	(N) 1 2	(N) 1 2 2 3	G6PD-1 (N) 1 2 3
3 1.000	1.000 .000	3 1.000 .000	.333 .667 .000	.000 .667 .333	3 .333 .667 .000	.667 .333 .000	3 .667 .333	3 .667 .333 .000	3 .667 .333 .000
1.000	1.000 .000	1.000 .000	.250 .250 .000	.667 .333 .000	.667 .333 .000	.750 .250 .000	.500 .500	.500 .500 .000	.750 .000 .000
1.000	1.000 1.000	6 1.000 .000	.000	.500	6 .333 .500 .000	.833 .000 .000	6 . 333 . 667	6 .333 .500 .000	.667 .333 .000
1.000	5 1.000 .000	1.000 000	1.000 1.000	. 167 . 833 . 000	.167 .833 .000	.500 .333 .000	6 .833 .167	.333 .667 .000	6 .167 .500 .000
1.000	2 1.000 .000	1.000 .000	.500 .500 .000	.500	.500 .500 .000	1.000 .000 .000	2 1.000 .000	.500	1.000
1.000	1.000	4 1.000 .000	1.000 .000 .000	.750 .250 .000	.750 .250 .000	.500 .500 .000	1.000 .000	.250 .500 .000	1.000 .000 .000
1.000	1 1,000 ,000	1 .000 1.000	1.000 .000 .000	1.000	1.000	.000	1.000	1 .000 .000	1.000
1.000	1 1.000 .000	1 1.000 .800	1.000	1.000	1.000	1.000 .000 .000	1 .000	1.000 .000 .000	