



Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Veracruz

**CARACTERIZACIÓN AROMÁTICA Y GENÉTICA DE CULTIVARES DE
VAINILLA (*Vanilla sp.*) DE MÉXICO**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

M.C. FABIOLA BERENICE TAVARES GONZÁLEZ

ASESORES:

Dra. GUADALUPE DEL CARMEN RODRÍGUEZ JIMENES

Dra. ARACELI PÉREZ SILVA

Dr. VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA

Dr. MICHEL GRISONI

**“Caracterización aromática y genética de cultivares de Vainilla (*Vanilla*
sp.) de México”**

Por:

M.C. Fabiola Berenice Tavares González

**Trabajo de tesis propuesto a la
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ**

Como requerimiento parcial para Obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

MAYO 2018

CONTENIDO

CONTENIDO	1
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE FIGURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	5
2.1 Taxonomía y Filogenia	6
2.2 El género <i>Vanilla</i>	7
2.2.1 <i>Vanilla planifolia</i>	8
2.2.2 <i>Vanilla xtahitensis</i>	19
2.2.3 <i>Vanilla odorata</i>	20
2.2.4 <i>Vanilla pompona</i>	20
2.3 Producción de vainilla	21
2.3.1 Producción mundial de vainilla	21
2.3.2 Producción nacional de vainilla	23
2.4 Análisis Genético	25
2.4.1 Marcadores moleculares utilizados para el estudio de las relaciones Filogenéticas del género <i>Vanilla</i>	25
2.4.2 Conservación del género <i>Vanilla</i>	28
2.5 Calidad aromática	30
2.5.1 Compuestos volátiles	30
2.5.2 Precursores aromáticos de la vainilla	33
2.5.3 Composición de compuestos volátiles en vainas de vainilla beneficiadas	35
2.6 Síntesis de Antecedentes	41
III. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo General	39
3.1.1 Objetivos específicos	39
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	40

4.1	Identificación de plantaciones, colecta de material genético y polinización manual de las flores de <i>V. planifolia</i>	40
4.2	Análisis Genético	40
4.2.1	Extracción de ADN de material colectado.....	40
4.2.2	Selección de marcadores moleculares.....	41
4.2.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	41
4.2.4	Secuenciación	42
4.2.5	Análisis de las secuencias.....	42
4.2.6	Construcción de árboles filogenéticos.....	42
4.3	Beneficiado de la vainilla en condiciones controladas.....	43
4.4	Determinación de humedad en vainas verdes y beneficiadas	43
4.5	Preparación de la muestra (polvo fino de vainilla)	43
4.6	Cuantificación de glucovainillina y principales fenoles volátiles por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	44
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1	Identificación de plantaciones a polinizar en Veracruz.....	45
5.2	Plantaciones de vainilla en el estado de Oaxaca	48
5.3	Polinización de flores marcadas de vainilla	49
5.4	Análisis de ADN.....	50
5.5	Amplificación por PCR de fragmentos ITS, PAL y rbcL.....	62
5.6	Análisis filogenético de las secuencias	65
5.8	Principales compuestos volátiles en vainas beneficiadas	80
5.8.1	Cuantificación de Vainillina	80
5.9	Evolución del potencial de vainillina durante el desarrollo de los frutos	84
VI.	CONCLUSIONES.....	88
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	89
	ANEXOS	95

LISTA DE TABLAS

	pag
TABLA 2.1 Principales Países Productores De Vainilla.....	22
TABLA 2.2 Compuestos aromáticos de origen glucósilado.....	28
TABLA 5.1 Localización y marcación de diferentes variedades de Vainilla en Veracruz.	48
TABLA 5.2 Localización y marcación de diferentes Variedades de Vainilla en Oaxaca...	49
TABLA 5.3 Localización y codificación de las muestras Localización y codificación de las muestras utilizadas en el análisis genético.....	52
TABLA 5.4 Muestras para amplificar por PCR utilizando el primer ITS.....	56
TABLA 5.5 Muestras para amplificar por PCR utilizando el primer PAL.....	57
TABLA 5.6 Muestras para amplificar por PCR utilizando el primer rbcL.....	58
TABLA 5.7 Potencial de vainillina a las 32 semanas de madurez del fruto.....	77
TABLA 5.8 Cuantificación de vainillina en vainas beneficiadas.....	81
TABLA 5.9 Cuantificación de los principales compuestos mayoritarios en vainas beneficiadas.....	82

LISTA DE FIGURAS

	pag
FIGURA 2.1 Distribución del género <i>Vanilla</i>	7
FIGURA 2.2 Inflorescencia <i>V. planifolia</i>	9
FIGURA 2.3 Corte longitudinal de una flor de <i>V. planifolia</i>	10
FIGURA 2.4 Polinización manual de <i>V. planifolia</i>	12
FIGURA 2.5 Producción Nacional De Vainilla.....	23
FIGURA 2.6 Hidrólisis de glucovainillina.....	26
FIGURA 2.7 Estructura química de algunos compuestos volátiles de diferente clase química identificados en vainas de vainilla beneficiadas.....	30
FIGURA 5.1 Localización de Plantaciones en el Estado de Veracruz.....	47
FIGURA 5.2 Sistemas de Producción de Vainilla en las plantaciones de estudio de Veracruz.....	47
FIGURA 5.3 <i>Vanilla sp</i>	49
FIGURA 5.4 <i>Vanilla pompona</i> var. Oreja de Burro.....	49
FIGURA 5.5 Polinización manual de las flores.....	50
FIGURA 5.6 Fragmentos de ITS amplificados.....	56
FIGURA 5.7 Fragmentos de PAL amplificados.....	57
FIGURA 5.8 Fragmentos de rbcL (33L-730R) amplificados.....	58
FIGURA 5.9 Fragmentos de rbcL (453L-1231R) amplificados.....	58
FIGURA 5.10 Relación filogenética entre las muestras determinadas, utilizando el primer ITS.....	60
FIGURA 5.11 Relación filogenética entre las muestras determinadas, utilizando el primer PAL.....	61
FIGURA 5.12 Relación filogenética entre las muestras determinadas, utilizando el primer rbcL.....	62
FIGURA 5.13 Imágenes de las plantaciones de Papantla y Tihuatlan 2.....	78
FIGURA 5.14 Contenido de glucovainillina durante la maduración de los frutos a partir del quinto mes después de la polinización de las flores.....	85

RESUMEN

Tavares-González, F. M.C. UNIDA-ITV. Abril 2018. “Caracterización aromática y genética de cultivares de Vainilla (*Vanilla* sp.) de México”. Asesores: Dra. Guadalupe del C. Rodríguez Jimenes, Dra. Araceli Pérez Silva, Dr. Víctor José Robles Olvera, Dr. Michel Grisoni.

La vainilla es una planta muy apreciada a nivel mundial por sus propiedades aromáticas. Aunque México es el origen ancestral y uno de los centros más importantes de la diversidad genética de esta orquídea, dejó de ser el principal productor de vainilla y las diferentes variedades están en peligro de desaparecer. Actualmente, no se tiene conocimiento de las características genéticas de las diferentes variedades de vainilla y de su potencial aromático, por ello, el objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización aromática y genética de frutos provenientes de diferentes variedades de vainilla (*Vanilla* sp.) de México. Para lo cual, se localizaron plantaciones de diferentes variedades de *V. planifolia*, en los estados de Oaxaca y Veracruz, para obtener frutos con una madurez conocida. A estos frutos se les determinó el contenido de humedad mediante el método gravimétrico y se evaluó el contenido de glucovainillina. Las vainas verdes fueron beneficiadas bajo condiciones controladas. La glucovainillina en las vainas verdes y los principales compuestos volátiles (vainillina, ácido vainílico, p-hidroxibenzaldehído y ácido-p-hidroxibenzoico) de las vainas beneficiadas fueron cuantificados por HPLC-DAD. El análisis genético se realizó mediante la extracción del ADN de las hojas siguiendo el protocolo DNeasy® Plant Mini Kit, el ADN extraído fue amplificado mediante la técnica de la PCR utilizando 3 iniciadores: *rbcl* (ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa), ITS (espaciador interno transcrito) y PAL (fenilalanina amonioliasa). Los productos de PCR fueron secuenciados por el método Sanger. Las secuencias obtenidas fueron revisadas y ensambladas, ya alineadas se compararon con las registradas en el Banco de Genes (NCBI) mediante el programa BLAST®. Los marcadores moleculares nucleares ITS y PAL resultaron específicos con altos niveles de confianza de diferenciación de

especies, siendo buenos marcadores moleculares para estudios filogenéticos del género *Vanilla*. De las 10 especies reportadas en México por Soto-Arenas (1999; 2009), se encontraron e identificaron 7: *V. planifolia*, *V. odorata*, *V. pompona*, *V. insignis*, *V. mexicana*, *V. hartii* y *V. chamissonis* en los estados de Veracruz, Oaxaca, Puebla, Chiapas, Quintana Roo y Nayarit, además de una especie no identificada en Oaxaca (*Vanilla sp.*). Mediante el uso de estos marcadores moleculares se logró esclarecer y mejorar la identificación de las accesiones que presentaban un fuerte parecido morfológico, destacando los clados de *V. odorata* y *V. insignis*.

El potencial de vainillina fue mayor en las vainas verdes del estado de Veracruz, particularmente las provenientes de plantaciones orgánicas. El contenido de vainillina en las vainas beneficiadas bajo condiciones controladas (7 - 8 g/100 g m.s.) fue mayor que el reportado en la literatura para las vainas beneficiadas por un proceso tradicional (1 - 5 g/100 g m.s.). El contenido de glucovainillina durante el desarrollo del fruto se vio influenciado por el estado de madurez, la localidad de procedencia, tipo de cultivo y año de cosecha.

ABSTRACT

Tavares-González, F. M.C. UNIDA-ITV. April 2018. "Aromatic and genetic characterization of *Vanilla* (*Vanilla* sp.) cultivars from Mexico". Advisors: Dra. Guadalupe del C. Rodríguez Jimenes, Dra. Araceli Pérez Silva, Dr. Víctor José Robles Olvera, Dr. Michel Grisoni.

The vainilla is a very appreciated plant to world-wide level by his aromatic properties. Although Mexico is the ancestral origen and one of the most important centres of the genetic diversity of this orchid, left to be the main producer of vainilla and the different varieties are in danger to disappear. At present, it does not have knowledge of the genetic characteristics of the different varieties of vainilla and of his aromatic potential, thus, the aim of this work was to realise the aromatic and genetic characterisation of fruits from different varieties of vainilla (*Vanilla* sp.) from Mexico. For which, located plantations of different varieties of *V. planifolia*, in the states of Oaxaca and Veracruz, to obtain fruits with a maturity known. To these fruits determined them the content of humidity by means of the method gravimétrico and evaluated the content of glucovainillina. The green pods were curing under conditions controlled. The glucovainillina in the green pods and the main composed volatiles (vainillina, acid vainílico, p-hidroxibenzaldehído and acid-p-hidroxibenzoico) of the pods curing were quantified by HPLC-DAD. The genetic analysis realised by means of the extraction of the DNA of the leaves following the protocol DNeasy® Plant Mini Kit, the DNA extracted was amplified by means of the technician of the PCR using 3 initiators: rbcL (ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa), ITS (internal spacer transcribed) and PAL (fenilalanina amonioliasa). The products of PCR were secuenciados by the method Sanger. The sequences obtained were reviewed and assembled, already ranged compared with the registered in the Bank of Genes (NCBI) by means of the program BLAST®. The nuclear molecular markers ITS and PAL resulted specific with high levels of confidence of differentiation of species, being good molecular markers for phylogenetic studies of the genus *Vanilla*. Of the 10 species reported in Mexico by Soto-Arenas (1999; 2009), they found and they identified 7: *V. planifolia*, *V. odorata*,

V. pompona, *V. insignis*, *V. Mexican*, *V. hartii* and *V. chamissonis* in the states of Veracruz, Oaxaca, Puebla, Chiapas, Quintana Roo and Nayarit, in addition to a no identified species in Oaxaca (*Vanilla sp.*). By means of the use of these molecular markers attained esclarecer and improve the identification of the accessions that presented a strong morphological resemblance, standing out the clados of *V. odorata* dnd *V. insignis*.

The potential of vainillina was elder in the green pods of the state of Veracruz, particularly the from organic plantations. The content of vainillina in the pods benefited under conditions controlled (7 - 8 g/100 g m.s.) It was elder that the reported in the literature for the pods benefited by a traditional process (1 - 5 g/100 g m.s.). The content of glucovainillina during the development of the fruit saw influenciado by the state of maturity, the place of origin, type of crop and year of harvest.

I. INTRODUCCIÓN

La vainilla, la cual es originaria de México tiene una larga historia. Fue llamada Tlixóchitl por los aztecas, “Xanath” por los totonacas, “Naxothon” por los mazatecos, “Kon li gm” por los chinantecos y “Zizbic” por los mayas. En la época de los aztecas, la vainilla era una señal de riqueza y poder. Después de la llegada de Hernán Cortes, México fue durante 300 años el único productor de vainilla. Los totonacas fueron los primeros productores mundiales. Sin embargo, a principios del siglo XIX, la vainilla fue llevada a las islas del Océano Índico y Pacífico, en donde el clima húmedo favoreció su reproducción aunado a la fecundación manual que se implementó, la producción de vainilla en esas regiones aumentó considerablemente.

La vainilla a nivel mundial es muy apreciada por su aroma, se utiliza principalmente en alimentos, bebidas y perfumería (Gallage y Moller, 2015). Los compuestos volátiles cuantitativamente más importantes son: la vainillina, el *p*- hidroxibenzaldehído, el ácido vainillínico y el ácido *p*- hidroxibenzoico. Siendo la vainillina el principal responsable del aroma de la vainilla. La vainillina puede sintetizarse químicamente a partir de la lignina. Sin embargo el aroma característico de la vainilla es debido a una mezcla compleja de diferentes compuestos volátiles. Se han identificado 250 compuestos volátiles en muestras de vainilla de diferente origen (Lamparsky y Klimes, 1976; Adedeji *et al.*, 1993, Pérez-Silva *et al.*, 2006).

Dentro del género *Vanilla* solamente existen tres especies de importancia económica: *V. planifolia*, *V. xtahitensis* y *V. pompona*, sin embargo el 95% de la producción mundial solamente se obtiene de los frutos beneficiados de *V. planifolia* (Bory *et al.*, 2008; Lubinsky *et al.*, 2008; Roux-Cuvelier y Grisoni, 2010). *V. tahitensis* y *V. pompona* son cultivadas en menor escala (Soto-Arenas, 2006; Soto-Arenas y Dressler, 2010). *Vanilla*

pompona es la especie más resistente a los principales patógenos, pero las vainas presentan una calidad inferior (Soto-Arenas, 1999).

V. xtahitensis la segunda especie aromática de vainilla más cultivada a nivel mundial, presenta un sabor único como resultado de la composición específica del aroma de las vainas tratadas con los métodos ancestrales polinésicos de curado (Brunschwig *et al.*, 2012). Diversas investigaciones respecto al origen de *V. xtahitensis* sugieren que esta especie es el resultado de la hibridación entre *Vanilla planifolia* y *Vanilla odorata* (Besse *et al.*, 2004; Duval *et al.*, 2006; Bory *et al.*, 2007,2008; Lubinsky *et al.*, 2008).

La especie *V. odorata* es después de *V. planifolia* la especie con frutos más fragantes, pero a diferencia de esta última, presenta mayor tolerancia a el cambio de condiciones que conlleva la sucesión, porque 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, sombra excesiva, así como un menor ataque de la chinche roja (*Tentecoris confusos*) y del gusano peludo (*P. aurifera*) (Soto-Arenas, 1999).

Bory *et al.* (2008) argumentaron la importancia de conservar el acervo genético secundario de *V. planifolia*, pues este constituye una importante fuente de caracteres de importancia en fitomejoramiento. A nivel biológico y comercial las especies silvestres y las especies cultivadas de *Vanilla* sp. de México, representan una fuente importante de diversidad genética a nivel mundial, sin embargo, la información disponible sobre las características fitoquímicas y genéticas que definen la calidad aromática de cada especie es escasa.

La situación es preocupante cuando muchos autores afirman que *V. planifolia* es originaria de México (Soto-Arenas, 1999; Castro, 2008; Bory *et al.*, 2008; Gigant *et al.*, 2011) y que a pesar de contar con gran diversidad genética para hacer

fitomejoramiento, el mercado de la vainilla mexicana representa menos de un 1% de la producción mundial (Soto-Arenas, 2006).

La fuerte presión de selección a nivel mundial sobre la especie *V. planifolia*, ha generado una disminución en la diversidad genética, reduciendo genes de importancia agroecológica. Por tal motivo, *V. planifolia* en la actualidad se encuentra en severo peligro de extinción en la naturaleza (Soto-Arenas, 2006), esto debido principalmente a la deforestación, la excesiva recolección para el establecimiento de nuevas plantaciones y a un pobre manejo del cultivo (Bory *et al.*, 2008). El establecimiento de un banco de germoplasma en campo o *in vitro* es esencial para perpetuar los genotipos existentes y ayudar los programas de mejoramiento y producción (Bory *et al.*, 2008). En el mundo se han establecido varias colecciones de germoplasma, aunque muy pocos programas de fitomejoramiento intensivos en *Vanilla* sp. Las razones principales de esta situación son: ausencia de una taxonomía confiable y de un marco de referencia filogenético, utilización de especies poco o distantemente relacionadas en los programas de entrecruzamiento, lo cual ha generado plantas híbridas con frutos sin cualidades aromáticas especiales para el mercado (Soto-Arenas, 2009).

En México hace falta una caracterización que perminta conocer los descriptores morfológicos, la diversidad inter-específica de cada zona de estudio, la base genética del género, nuevas especies silvestres, variaciones citogenéticas, mapa genético de la especie, su potencial aromático, entre otros (Soto-Arenas, 2009).

El presente documento comprende una revisión profunda de la taxonomía, filogenética características aromáticas hasta ahora reportadas del género *Vanilla*, describe la metodología utilizada para la generación del conocimiento científico referente a la caracterización genética de las accesiones en resguardo en el banco de germoplasma *in-vivo* de Tenampulco, Puebla, de las colectas realizadas en varios estados del país, así como de Guatemala y Costa Rica, además de muestras de ADN del género *Vanilla* que pertenecen a la colección de Soto-Arenas y de la AMO A.C. (Asociación Mexicana de Orquideología, A.C.). También se presentan los resultados de la caracterización aromática de frutos de *Vanilla planifolia* de los estados de Veracruz y Oaxaca.

para la generación del conocimiento científico referente a la caracterización genética y aromática de frutos provenientes de diferentes variedades de *Vainilla sp.* de Veracruz y Oaxaca.

II. ANTECEDENTES

La vainilla, la cual es originaria de México, es una orquídea tropical perteneciente a la familia de las Orchidaceae y al género *Vanilla*, dentro de este género se han identificado más de 100 especies (Bory *et al.*, 2008b), encontrándose principalmente en América tropical, en el sureste de Asia y África (Soto Arenas, 2003). Sin embargo solo 3 de estas son cultivadas con fines comerciales: *Vanilla fragans* (Salisbury) Ames, también conocida como *Vanilla planifolia* Andrews o G. Jackson, *Vanilla pompona* Schiede y *Vanilla xtahitensis* (Rao y Ravishankar, 2000). La principal fuente de vainilla natural utilizada en los alimentos, bebidas, cosméticos y tabaco proviene de vainas de *Vanilla planifolia* (Palama *et al.*, 2009) valorada por su calidad aromática (Rao y Ravishankar, 2000) esta especie provee el 95% de la producción mundial, siendo originaria principalmente de Madagascar, Indonesia, Comoros, Uganda y la India (Roux-Cuvelier y Grisoni, 2010). Respecto a su aroma y sabor se han reportado más de 200 compuestos en su extracto natural (Gallage y Moller, 2015), de los cuales la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es el componente más abundante, con una concentración de 1% - 2% (p/p) en vainas de vainilla beneficiada (Sinha *et al.*, 2008). Sin embargo su aroma característico no depende solo de la vainillina sino también de diversos compuestos volátiles responsables de las notas: dulce, balsámica, cremosa, amaderada, frutal, herbácea, fenólica y a canela (Werkhoff y Güntert, 1997, Pérez-Silva *et al.*, 2006). Respecto al extracto de vainilla obtenido de vainas beneficiadas Gallage y Moller (2015) mencionan que posee un puro y delicado flavor que es difícil duplicar por medios tecnológicos.

2.1 Taxonomía y Filogenia

La familia de las *Orchidaceae* es la más rica en las especies de las monocotiledóneas, con un estimado de más de 25 000 especies. Es una familia cosmopolita que alcanza su mayor diversidad en las regiones tropicales, siendo América tropical la región con mayor número de especies (Soto-Arenas y Salazar, 2004).

En los últimos años la familia de las *Orchidaceae* ha sido objeto de un número importante de trabajos que han contribuido a esclarecer sus relaciones filogenéticas y a proponer una nueva clasificación (Soto-Arenas y Salazar, 2004). La evidencia molecular apoya el carácter monofilético de la familia y ha mostrado la existencia de cinco linajes principales o subfamilias: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae* (Cameron *et al.* 1999). La subfamilia *Vanilloideae* ha sido muy estudiada por Cameron *et al.*, quienes han propuesto la división de esta subfamilia en dos sub-tribus: *Pogonieae* y *Vanillineae* (Cameron *et al.*, 1999; Cameron, 2004, Cameron y Molina, 2006).

Rolfe (1896) fue el primer autor en proponer una clasificación del género *Vanilla*, dicha clasificación se basó en observaciones morfológicas de flores, hojas y tallos, el reconoció dos secciones: *Foliosae* y *Aphyllae*, con hojas y sin hojas, respectivamente (Soto Arenas, 2003; Bouetard *et al.*, 2010). Portères, (1954) dividió la sección *Foliosae* en tres subsecciones: *Papillosae* (hojas gruesas y labelo con pelos más o menos voluminosos) *Lamellosae* (hojas gruesas y labelo con laminillas escamosas) y *Membranaceae* (membrana delgada para hojas sub-membranosas).

Estudios anteriores permiten ubicar al género *Vanilla* en la familia de las *Orchidaceae*, sub-familia *Vanilloidae*, tribu *Vanilleae* y sub-tribu *Vanillinae* (Cameron 2005; Bory *et al.*, 2008a; Soto-Arenas y Dressler 2010; Bouetard *et al.*, 2010).

2.2 El género *Vanilla*

En el género *Vanilla* se han reportado de 90 a más de 100 especies dependiendo del autor (Bory *et al.*, 2008a), la mayoría de estas se encuentran en estado silvestre, solo 3 son cultivadas con fines comerciales: *Vanilla fragans* (Salisbury) Ames, también conocida como *Vanilla planifolia* Andrews o G. Jackson, *Vanilla pompona* Schiede y *Vanilla xtahitensis* (Rao y Ravishankar, 2000). Las especies del género *Vanilla* se encuentran principalmente en hábitats naturales, en regiones tropicales y subtropicales de América, África y Asia, su distribución se puede observar en la Figura 2.1 encontrándose mayor diversidad en América tropical (54 especies), existiendo también en el sureste de Asia-Nueva Guinea (28 especies) así como en África-Madagascar (24 especies) (Soto Arenas, 2003).

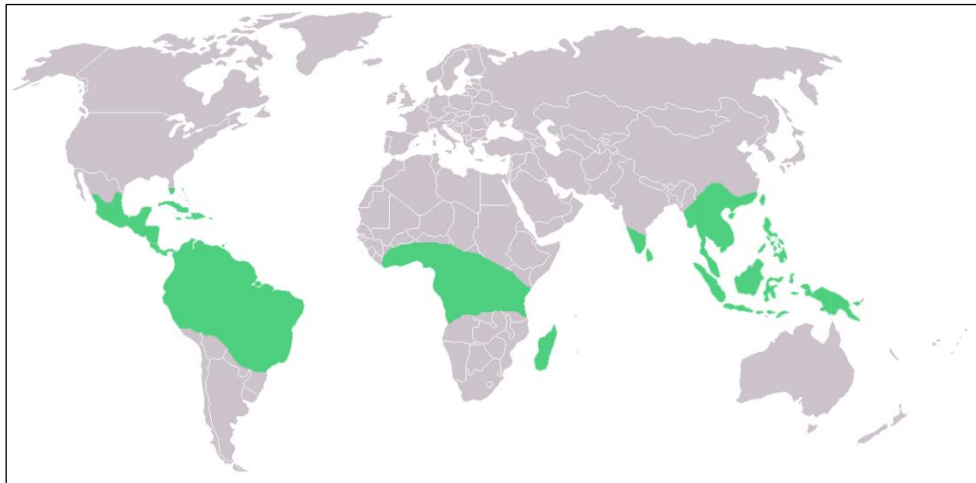


FIGURA 2.1 Distribución del género *Vanilla* (Soto-Arenas, 2003)

La especie *V. planifolia* es particularmente considerada como la principal reserva genética en su región de origen, sin embargo Soto Arenas (2010) mencionó que esta especie presenta severos problemas para la continuidad de su cultivo debido a la deforestación y la sobreexplotación de sus fuentes naturales.

En las zonas de diversificación secundarias, como las islas del Océano Índico, y en especial la Reunión (el punto de entrada para la especie en esta región en el siglo XIX) hay una considerable homogeneidad dentro de las especies, lo que indica que el cultivo puede depender de una base genética muy restringida, probablemente

desarrollado a partir de un solo individuo a través de la reproducción vegetativa. Los estudios moleculares han confirmado el bajo nivel de diversidad genética en las plantas de vainilla cultivadas en todo el mundo (*V. planifolia*) (Lubinsky *et al*, 2008a).

El proceso de reproducción vegetativa, podría ser responsable de la relativamente alta uniformidad genética observada en los cultivos de vainilla (Bory *et al.*, 2007). Sin embargo, se observa una diversidad fenotípica interesante, lo que puede explicarse por la acumulación de mutaciones somáticas, por la posibilidad de germinación de la semilla natural en el caso de la reproducción sexual ó también por cambios en el nivel de ploidía que puede ser encontrado en las especies de vainilla cultivadas. Sin embargo, debido a la homogeneidad de variedades, el cultivo de vainilla es particularmente vulnerable a los peligros ambientales, como la destrucción de sus hábitats naturales, el cambio climático y la aparición de plagas en las plantas (Roux-Cuvelier y Grisoni, 2010).

2.2.1 *Vanilla planifolia*

V. planifolia también conocida como *Vanilla fragans*, *Vanilla planifolia* Andrews o G. Jackson en la actualidad es la principal especie aromática del género *Vanilla* la cual es cultivada con fines comerciales representando aproximadamente el 95% de la producción mundial. *Vanilla planifolia* es probablemente endémica de los bosques tropicales del este de México y su hábitat natural se encuentra en el estado de Oaxaca, extendiéndose hacia Guatemala y Belice (Bory *et al*, 2007).

2.2.1.1 Descripción botánica de *Vanilla planifolia*

Vanilla planifolia es una planta herbácea trepadora, de tallo cilíndrico poco ramificado, largo, flexible y verde; produce hojas opuestas alternas subsésiles, de forma oblonga elíptica lanceolada, ápice agudo acuminado, de 10 a 20 cm de longitud, 4 a 8 cm de ancho y 1 a 2 mm de espesor, de consistencia carnosa y superficie lustrosa cutinizada, principalmente en el haz. En los nudos, al lado opuesto de la hoja, desarrolla pares de raíces adventicias aéreas con las cuales se adhiere a los árboles u otros soportes (Rao

y Ravishankar, 2000). Sus flores están agrupadas en inflorescencias como se puede apreciar en la Figura 2.2. Las inflorescencias son racimos axilares con raquis cilíndrico, grueso y raramente ramificado; con cuatro o cinco brácteas dísticas, en pocas ocasiones tres o más de cinco, en la base de la misma. Las brácteas dísticas son persistentes, cóncavas, de 0.5 a 1.5 cm de longitud y 0.5 a 0.8 cm de ancho en la base. En algunos casos las inflorescencias son muy largas y las brácteas dísticas tienen casi el mismo tamaño y forma que las hojas normales, tales inflorescencias pueden considerarse terminales en tallos vegetativos cortos. Arriba de las brácteas dísticas, se encuentran otras de la misma forma que las ya descritas, pero más pequeñas y en posición helicoidal. De las axilas de éstas brácteas emergen las flores. El tamaño de las flores maduras disminuye ligeramente de la base de la inflorescencia hacia el ápice (Castillo-Martínez y Engleman, 1993).



FIGURA 2.2 Inflorescencia *V. planifolia*

La flor presenta tres sépalos, tres pétalos, y una estructura central conocida como columna o ginostemo, donde están fusionados los órganos masculino y femenino. Los

sépalos son oblongo-lanceolados, ligeramente cóncavos y de apariencia cerosa; el sépalo superior es un poco más largo y estrecho que los dos inferiores. Los dos pétalos superiores se diferencian poco de los sépalos, son menos cerosos, más estrechos, más delgados que estos últimos, y tienen una quilla en la superficie externa. El pétalo inferior está sumamente modificado; se denomina “labio” o “labelo”. El labelo es más corto y mucho más ancho que los dos pétalos superiores, está adherido a la columna casi hasta el ápice y junto con ésta forman una estructura semejante a una trompeta. El margen libre del labelo es revoluto, dentado y ligeramente trilobado. El labelo tiene en la superficie interna un disco con hileras longitudinales de papilas verrucosas y en el centro tiene un haz de membranas con márgenes fimbriados. La superficie de la columna que está orientada hacia el labelo es densamente vilosa. Tiene una antera apical que contiene los granos de polen agrupados en dos másulas más o menos compactas, denominadas polinios (Castillo-Martínez y Engleman, 1993; Soto-Arenas, 2003). En la zona ventral, abajo de la antera, está el estigma cóncavo y pegajoso. Una membrana denominada rostelo se interpone entre el órgano masculino (antera) y el femenino (estigma), impidiendo de esta manera la autopolinización (Soto Arenas 2006b), como se puede apreciar en la Figura 2.3

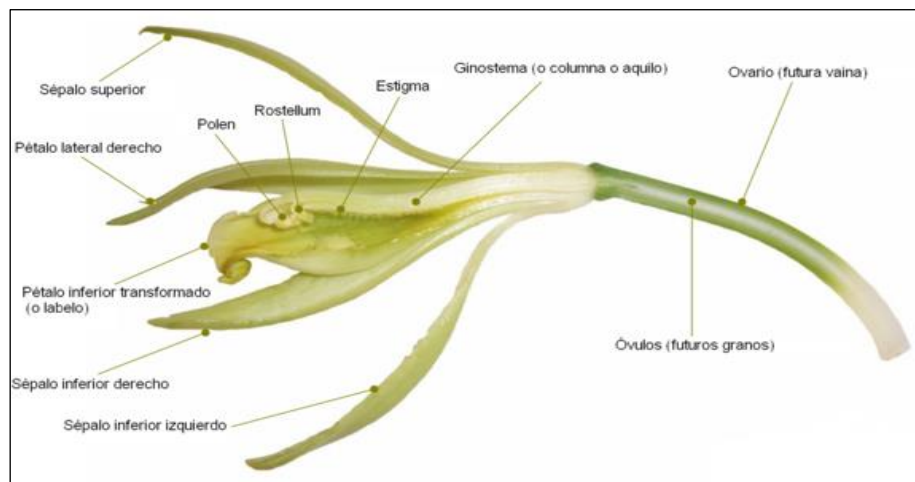


FIGURA 2.3 Corte longitudinal de una flor de *V. planifolia* (Anuradha *et al.*, 2013)

México es uno de los pocos países en los que actualmente es posible obtener las vainas de vainilla con la polinización natural, donde intervienen insectos polinizadores,

V. planifolia es polinizada por abejas del genero *Melipona* y por colibríes (Bory *et al.*, 2007). Sin embargo, con la polinización natural solo se obtiene aproximadamente 1% de vainas, por lo tanto los productores para incrementar sus producciones realizan dicho proceso de forma manual (Van Dyk *et al.*, 2014). La polinización manual se hace con un instrumento pequeño, delgado y con punta, en forma de estilete conocido como “palillo”, que puede ser fabricado de bambú, madera resistente, hueso, espina, etc.

La técnica de polinización manual descubierta en 1841 por Edmond Albius (Rao y Ravishankar, 2000) consiste en tomar la flor abierta y con la punta del “palillo” se rompe el labelo longitudinalmente para descubrir los órganos reproductivos de la flor, con la misma punta del palillo, se levanta el rostelo para que la antena haga contacto con el estigma e inmediatamente con el dedo pulgar e índice, se presiona ligeramente la antena para que su polen se adhiera al estigma y casi al mismo tiempo, se retira el “palillo” (Figura 2.4). La polinización manual se realiza, desde las siete de la mañana hasta las 12 del día o más tarde si el día está nublado, pero siempre y cuando las flores no estén marchitas o cerradas (Hernández-Hernández, 2011).

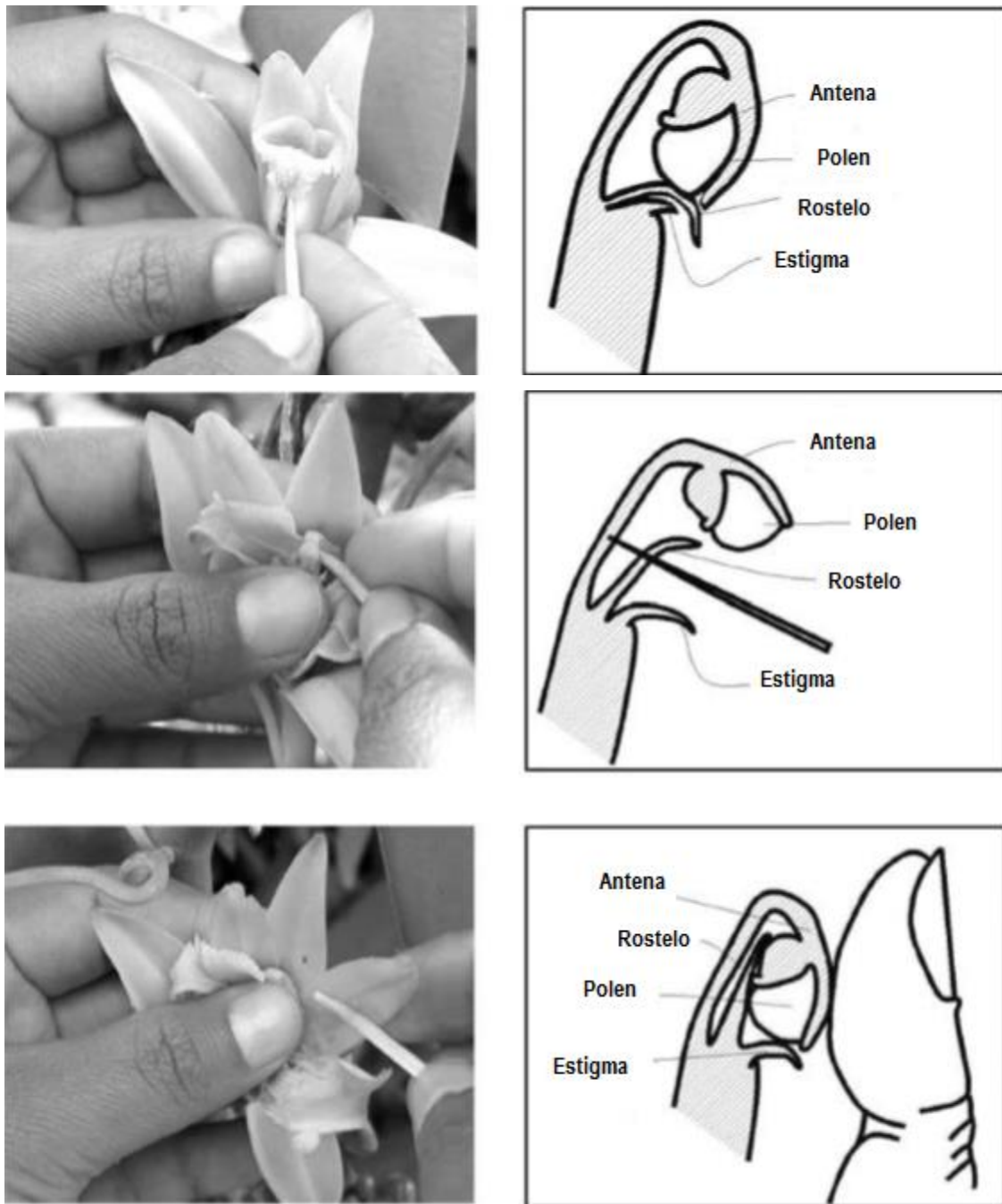


FIGURA 2.4 Polinización manual de *V. planifolia* (Hernández-Hernandez y Lubinsky, 2010)

Después de la polinización, los ovarios se desarrollan muy rápidamente, duplicándose en longitud en pocos días. La fecundación ocurre de 1.5 - 2 meses después. Cada

ovario fecundado produce una vaina. La vaina alcanza su tamaño y peso máximo entre las semanas 10 y 15 después de la polinización. Conforme la vaina madura, el contenido de humedad disminuye desde alrededor de 90 - 92% a 82 - 85% hacia el tiempo de cosecha, alrededor de 8 - 9 meses después de la polinización (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010). En estos meses las vainas deben ser cosechadas, debido que al continuar en la planta desarrollan un aroma similar a la resina, además puede llevarse a cabo la dehiscencia de la vaina. Las vainas tienen una sección transversal triangular, con una cavidad central que contiene miles de pequeñas semillas, siendo la parte carnosa, la que se utiliza para obtener el saborizante. Dichas vainas son de color amarillo verdoso, miden de 10 a 25 cm de largo y de 1 a 1.5 cm de ancho (Purseglove *et al.*, 1981).

2.2.1.2 Cosecha de vainas de vainilla

En México, específicamente en el Estado de Veracruz, la cosecha de vainilla se debe realizarse según la Ley de Fomento y Protección de la Vainilla, publicada el 13 de septiembre de 1941. Este decreto establece que el corte sólo podrá efectuarse a partir del 15 de noviembre de cada año. Sin embargo, la cosecha se realiza en algunas ocasiones cuando el fruto no se encuentra en condiciones de óptima madurez, debido a que la madurez depende del periodo de floración, la cual en cada año puede variar dependiendo de las condiciones climáticas. La cosecha de vainas inmaduras afecta la calidad aromática de la vainilla, que a su vez origina un bajo precio.

Actualmente, en algunas regiones de México la situación ha empeorado porque los “coyotes” o acopiadores no acatan ni siquiera el decreto; incitando a los productores a cosechar antes o inmediatamente después del 15 de noviembre. Aunque, por acuerdo de maestros beneficiadores y los fabricantes industriales, se estableció cosechar a partir del 10 de diciembre. Sin embargo, los productores realizan la cosecha en un solo día, cosechando las vainas con diferentes etapas de madurez. De tal manera que la heterogeneidad en las vainas cosechadas se observa durante la deshidratación en el

proceso de beneficiado, ya que las vainas tiernas pierden agua con mayor rapidez que las vainas maduras. Por lo tanto, lo ideal es que la cosecha se realice sólo cuando las vainas han alcanzado una etapa óptima para su comercialización, es decir, cuando la vaina cambia de color de verde a amarillo. Esta transición ocurre normalmente de 8 a 9 meses después de la polinización (Hernández-Hernández, 2004).

A nivel mundial la cosecha de las vainas varía respecto a la región; en Madagascar se realiza en Julio, en las Islas Comoras en Abril–Junio y la Isla Reunión en Junio–Agosto, destacando que en estas regiones la cosecha no se realiza solo en un día, sino que cada día van revisando y cortando las vainas que visualmente cumplen con las características para su corte.

2.2.1.3 Beneficiado de vainas de vainilla

Las vainas verdes maduras de *V. planifolia* no presentan el aroma característico de la vainilla, dicho aroma y sabor se logran después del proceso de beneficiado o curado. Diversos procedimientos han sido desarrollados para el beneficiado de la vainilla, los cuales se caracterizan principalmente por cuatro etapas con el fin de obtener un producto comercialmente viable (Balls y Arana, 1941; Odoux, 2000; Dignum *et al.*, 2002; Havkin-Frenkel *et al.*, 2004; Pérez-Silva *et al.*, 2006; Brillouet *et al.*, 2010). Estas cuatro etapas son conocidas como marchitamiento, sudando, secado y acondicionamiento (Brillouet *et al.*, 2010):

- I. Marchitamiento: consiste en detener la vida vegetativa de la vaina para evitar la dehiscencia de la vainilla, desarrollar una descompartimentalización celular (vacuola, citoplasma, etc.) para permitir el contacto entre enzimas y sustratos (Arana, 1943), además iniciar la hidrólisis de la glucovainillina por acción de la enzima β -glucosidasa, así como la oxidación con la producción de pigmentos de color negro chocolate. Los métodos más utilizados son la exposición al sol, horneado, inmersión en agua caliente (Ranadive, 1994), que consiste en la colocación de las vainas verdes en cestas de alambre y sumergir en agua caliente (60 a 70 °C) durante 3 minutos (Ansaldi *et al.*, 1990), otro método es por

congelamiento que representa una alternativa de marchitamiento más rápida que las mencionadas con anterioridad, Ansaldi *et al.* (1990) reportaron este método, que consistió en sumergir las vainas en nitrógeno líquido para posteriormente ser almacenadas en un congelador a -80 °C durante 12 h. Este método es recomendado para cantidades pequeñas de vainilla por el tipo de equipo que se utiliza. Dignum *et al.* (2001b) indicaron que el congelamiento de las vainas debe llevarse a cabo a -70 °C o menos, con el objetivo de conservar la viabilidad de las enzimas que son involucradas en el proceso de beneficio.

- II. Sudado: durante esta etapa, las vainas desarrollan el característico aroma, sabor y color de la vainilla. De tal manera que las vainas se llevan a condiciones de humedad y temperatura altas (45 a 65 °C) durante 7 a 10 días, con el objetivo de retener suficiente humedad para permitir que las enzimas catalicen diversos procesos hidrolíticos y oxidativos. Al mismo tiempo, se reduce el contenido de agua para prevenir el deterioro por microorganismos.
- III. Secado: al final del sudado, las vainas son de color negro chocolate, y han desarrollado la mayor parte del sabor y aroma característico de las vainas beneficiadas. Sin embargo, al final de esta etapa, las vainas contienen alrededor de 60 a 70% o más contenido de humedad, por lo tanto el secado se realiza para prevenir el deterioro microbiano y para detener cualquier actividad enzimática, es un proceso largo (varios meses), el secado es la etapa más difícil de controlar en el proceso del beneficiado, ya que depende de las condiciones variables de la temperatura y humedad relativa del ambiente. La etapa de secado es aparentemente esencial para la preservación de la calidad del sabor, pero el secado prolongado puede conducir a la pérdida en el sabor y el contenido de vainillina.
- IV. Acondicionamiento: En esta etapa del beneficio ocurren varias reacciones químicas y bioquímicas como son esterificación, eterificación y degradación oxidativa, lo que produce compuestos volátiles constituyentes del aroma, aumenta aún más el

contenido de materia seca de 50-60%, dependiendo del tiempo o periodo al que se someten (Havkin-Frenkel *et al.*, 2004).

2.2.1.3.1 Beneficiado tecnificado bajo condiciones controladas de humedad y temperatura

Los principales elementos que definen la calidad de la vainilla son; a) el perfil genético de los tejidos, b) el origen geográfico, localización, suelo, condiciones climáticas y crecimiento, c) el estado de madurez del tejido en la cosecha y d) el proceso de beneficio que genera el producto final. La combinación de estos elementos contribuye en el aroma final de las vainas beneficiadas. Sin embargo el proceso de beneficiado por si mismo puede contribuir significativamente en la calidad aromática final de las vainas de vainilla (Dunphy *et al.*, 2011). Las condiciones del beneficio tradicional de vainilla son difíciles de controlar porque dependen de las condiciones climáticas, debido a esto es importante considerar el beneficiado tecnificado controlando condiciones como la temperatura y la humedad relativa.

Dignum *et al.* (2002) evaluaron el desarrollo de la temperatura y humedad relativa en un beneficio tradicional en Bali, con el objetivo de conocer la variabilidad de las condiciones del proceso. Reportaron un amplio intervalo de humedad relativa y temperatura, de 60 a 95 % y de 40 a 60 °C respectivamente. Respecto a este intervalo obtenido propusieron un beneficio controlado bajo diferentes condiciones (escaldado, soleado, aereado y secado lento), con la finalidad de evaluar el desarrollo del aroma y actividad enzimática. En México Rosado-Zarrabal *et al.* (2007), evaluaron el efecto de las variables de proceso durante un beneficio tradicional proponiendo condiciones para un beneficio controlado sobre los parámetros de calidad de la vainilla (humedad, glucovainillina, principales compuestos volátiles, color y aw). Primero caracterizaron un beneficio tradicional para conocer la evolución de las variables del proceso y la calidad de las vainas en cada etapa del beneficio, posteriormente estudiaron el efecto de temperatura y humedad relativa sobre la evolución de los parámetros de calidad de la vainilla en condiciones controladas. Para el beneficio controlado Rosado-Zarrabal *et al.* (2007) utilizaron cámaras con soluciones salinas saturadas con actividades de agua

y temperaturas diferentes para cada etapa. Durante el sudado propusieron utilizar KCl a una humedad relativa de 85 % a 35 °C y para el secado NaCl a 75 % de humedad relativa a 30 °C hasta obtener una humedad en la vaina cercana al 25 % para posteriormente someterlas al acondicionamiento. Sus resultados mostraron que las vainas marchitadas en condiciones extremas de temperatura (congelación e inmersión) obtuvieron mayores concentraciones de vainillina (4 % b.s.) debido probablemente a una mayor ruptura de la pared celular por lo tanto un mejor contacto enzima - sustrato. La conversión del precursor principal (glucovainillina) fue mayor en estos tratamientos. Ellos concluyeron que la elección adecuada del tipo de marchitamiento es necesaria para maximizar la formación del compuesto principal: la vainillina.

2.2.1.4 Condiciones de cultivo

El cultivo de vainilla se lleva a cabo principalmente en un clima tropical cálido húmedo, donde la precipitación anual se distribuye uniformemente en un promedio de 2000-2500 mm y una humedad relativa del 80 %. Las temperaturas máximas y mínimas en las regiones donde se cultiva la vainilla tienen un promedio alrededor de 30 y 24 °C respectivamente (Ranadive, 1994). No tolera períodos extendidos de sequía o precipitación excesiva a menos que el suelo tenga la capacidad de sostener la humedad durante la sequía o se drene el agua excesiva en un período de lluvia (Rao y Ravishankar, 2000). Prospera bien hasta una altitud de 760 msnm (metros sobre el nivel del mar), sin embargo el área de producción más importante se encuentra a 400 msnm. Los suelos apropiados para el cultivo de la vainilla deben ser fértiles, bien drenados, con alto contenido en materia orgánica; la estructura granular del suelo debe proporcionar porosidad adecuada para el movimiento del agua, así como para el intercambio de oxígeno en el suelo con un pH de 6.5 a 7.5 (Curti, 1989).

2.2.1.5 Diferentes variedades de *Vanilla planifolia*

Cameron (2011) reportó que existe una considerable variabilidad entre los individuos cultivados de *V. planifolia* dentro de los cuales son conocidas cuatro variedades: Mansa, Mestiza (Oreja de Burro), Variegata o Acamaya y Albomarginata.

La *Vanilla planifolia* Mansa es la variedad típica y comúnmente cultivada, ha sido ampliamente propagada desde el siglo XIX y constituye la gran mayoría de las plantaciones en México, África y Asia. Las hojas son de color verde jade brillante.

La *Vanilla planifolia* Variegata o Acamaya se considera como un cultivo atractivo por sus hojas de colores, que muestran franjas alternas de color amarillo y verde. Hernández-Hernández *et al.* (2011) mencionan que probablemente, este tipo de planta se originó de una mutación natural; ya que en ocasiones, partes de la misma planta producen hojas y tallos sin el color rayado. También se ha observado que es más susceptible a la pudrición de raíz y tallo además de ser menos productiva.

Del mismo modo, *V. planifolia* Albo-marginata se cultiva por su follaje colorido, que es de color verde con un margen blanco. Dichas características abigarradas de estas plantas comúnmente surgen por mutaciones en células somáticas no sexuales, lo que probablemente explica el origen de estos cultivares.

En los estudio realizados por Castillo Martínez y Engleman, (1993) en base a las estructuras vegetativas y reproductivas de plantaciones de vainilla en la región de Papantla, Veracruz se logró la identificación de dos tipos de *Vanilla planifolia*: Mestiza (Oreja de Burro) y Mansa. La planta variedad Oreja de Burro puede distinguirse de la Mansa morfológicamente porque la superficie adaxial de las hojas es ligeramente acanalada; la zona amarillenta de la base del perianto es mayor; los sépalos y pétalos son ligeramente más anchos; el número de flores por inflorescencia es menor, el fruto es más largo y adelgazado en la base, presenta mayor resistencia a la infección por hongos que la Mansa, sin embargo aborta hasta 100% de los frutos y es más precoz en la floración y maduración del fruto, por lo que la existencia de esta variedad si representa un problema en México porque su uso ha obstaculizado fuertemente la producción de vainilla Soto Arenas (2003).

2.2.2 *Vanilla xtahitensis*

V. xtahitensis es la segunda especie aromática de vainilla más cultivada a nivel mundial, históricamente fue introducida a Tahití vía las Filipinas por Amiral Hamelin en 1848 (Bory *et al.*, 2007). Diversas investigaciones respecto al origen de *V. xtahitensis* sugieren que esta especie es el resultado de la hibridación entre *Vanilla planifolia* y *Vanilla odorata* (Besse *et al.*, 2004; Duval *et al.*, 2006; Bory *et al.*, 2007,2008; Lubinsky *et al.*, 2008). Se ha planteado la hipótesis de que el ancestro parental de *V. xtahitensis* debe provenir de una región al este o sur del Istmo de Tehuantepec, porque *V. odorata* muestra una estructura interna, ya que los especímenes del Istmo de Tehuantepec se agrupan en un clado fuertemente apoyado, mientras que las muestras de Chiapas, Surinam y *V. xtahitensis* forman otro linaje (Soto Arenas, 2009). Siendo la *V. xtahitensis* un ejemplo de cómo la hibridación juega un papel importante en la evolución de la vainilla y una alternativa para el desarrollo de investigación científica en México para el fitomejoramiento de ésta orquídea.

Vanilla xtahitensis es diferente a otras especies de vainilla ya que no se presenta dehiscencia (abertura) en la vaina, por consiguiente, no está sujeta a calentamiento en la etapa del marchitamiento durante el proceso del beneficiado (Odoux, 2006).

La vainilla tahitiana exhibe un aroma muy típico en comparación con otras vainillas, presenta principalmente notas florales y a anís. Como consecuencia de ello, el aroma de la vainilla tahitiana es único en el mercado, muy apreciado por la gastronomía y perfumería (Lepters-Andrzejewski *et al.*, 2011).

2.2.3 *Vanilla odorata*

La especie *V. odorata* se distingue por sus tallos delgados y las hojas estrechas, lanceoladas a ensiformes y acuminadas o largamente atenuadas, sin embargo la forma de las hojas es variable y especímenes con hojas angostamente elípticas, vegetativamente parecidos a *V. hartii* o *V. planifolia*, se ven con frecuencia en Mesoamérica, no ensiformes y largamente atenuadas en el ápice como muchas plantas locales y de Sudamérica. El labelo lacerado-fimbriado tiene 3-4 papilas cónicas, retrorsas. Es muy similar a *V. planifolia*, con flores menores, con el margen del labelo escasamente denticulado y sobre todo a *V. insignis*, más xeromórfica, con tallos sulcados, rugosos y apéndices retrorsos del labelo más numerosos, más desarrollados y anaranjados. La variación de *V. odorata* no se entiende del todo bien, aunque gran parte del material mexicano es muy similar a los especímenes típicos de Ecuador. Los especímenes de Oaxaca son genéticamente distintos de los de otros sitios, según algunos marcadores moleculares. Sin embargo el potencial de esta especie en programas de hibridación no ha sido evaluado formalmente y puede ser muy interesante. *Vanilla odorata* produce frutos muy aromáticos, con características similares, no idénticas a *V. planifolia*, y son muy apreciados en las regiones donde crece, principalmente para aromatizar ron (Soto Arenas, 2009; 2010).

2.2.4 *Vanilla pompona*

Es nativa de México y Centroamérica; generalmente crece de manera silvestre y es de menor interés por las industrias, debido a su bajo contenido de vainillina. Se caracteriza por su rusticidad para adaptarse a condiciones de humedad y de suelo adverso (Soto-Arenas, 2003). Los grandes frutos de las poblaciones silvestres de *Vanilla pompona* ssp. *grandiflora* exhiben fuertes propiedades aromáticas. Esta especie de vainilla representa una nueva fuente potencial de vainilla, ya que es un buen candidato como donador genético para la mejora de cultivares existentes de vainilla.

2.3 Producción de vainilla

La vainilla es originaria de México y de algunos países de Centroamérica como Guatemala. Los indios totonacos de Papantla región localizada en el norte de Veracruz, fueron los primeros en cultivar la vainilla y el uso más antiguo de las vainas de vainilla se relaciona con los mayas del sureste de México (Lim, 2012). Sin embargo, la vainilla se cultiva hoy en día en diversas áreas del mundo.

A principios del año 1980 la tendencia en los mercados internacionales para los productos naturales aumentó. Estos productos se consideraban seguros y no representaban una amenaza para la salud humana. Esta tendencia inducida produce cambios importantes en alimentos procesados, así como en las leyes de seguridad alimentaria, reglamentos y procedimientos de los países importadores con el objetivo de proteger la salud de los consumidores y reducir el costo del cuidado de la salud. En este contexto, el mercado mundial aumentó la demanda de vainilla natural para hacer frente a la competencia en los sabores sintéticos como vainillina, cumarina y etil vainillina.

2.3.1 Producción mundial de vainilla

Como ha ocurrido con otros productos, los principales países productores de vainilla no son necesariamente aquellos en los que se originó la planta (Musalem, 2002). De acuerdo con la producción mundial reportada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) en el año 2013 la producción en México le permitió ubicarse en el cuarto lugar entre los principales países productores de vainilla verde, aportando el 6% de producción por debajo de Indonesia, Madagascar y China, como se aprecia en la Tabla 2.1.

Sin embargo para el 2016 según lo reportado por SAGARPA (2017) Madagascar fue el país con la mayor producción aportando el 35%, seguido de Indonesia con el 14%

como se presenta en la Figura 2.5 y se puede observar que México ya no figura a nivel mundial entre los principales países productores.

TABLA 2.1 Principales Países Productores De Vainilla (FAOSTAST 2013)

País	Producción Mundial (%)
Indonesia	36
Madagascar	28
China	19
México	6
Tonga	3
Comoras	1
Resto del mundo	7

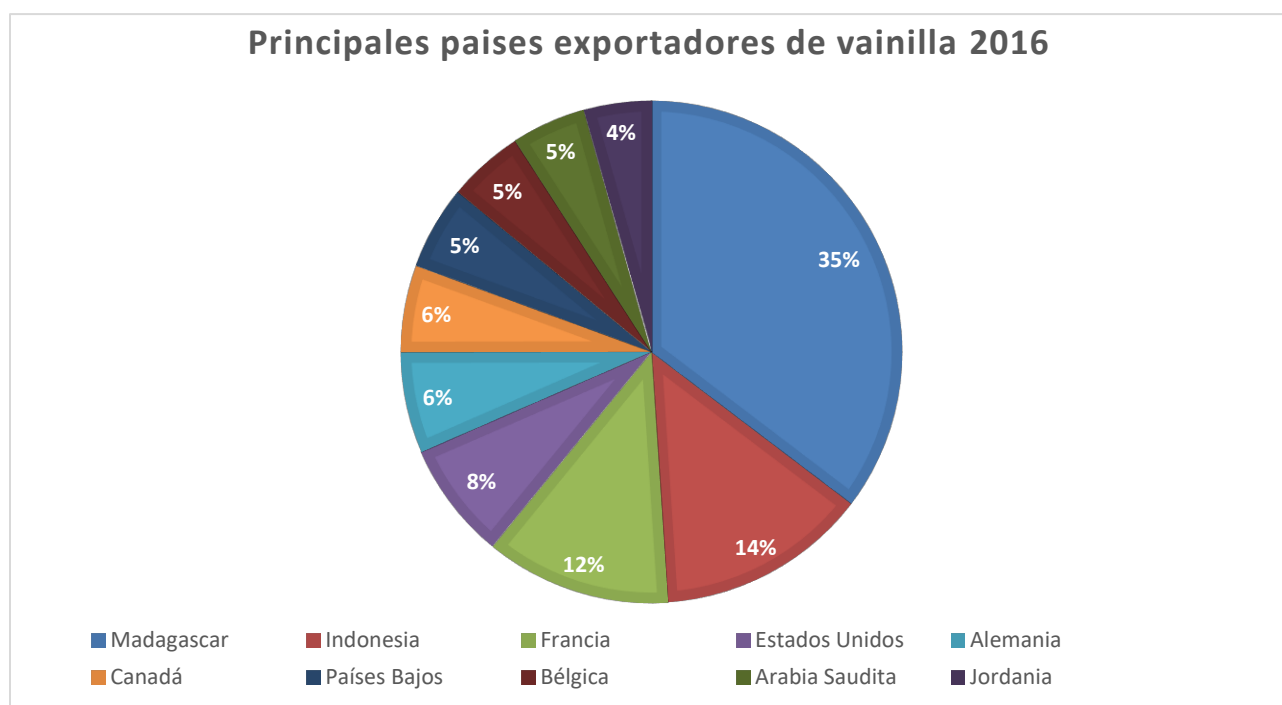


Figura 2.5 Principales países exportadores de vainilla en el 2016 (SAGARPA, 2017)

2.3.2 Producción nacional de vainilla

En México, los rendimientos de producción promedio de vainilla son bajos, Havkin-Frenkel *et al.*, (2011) reportaron que en este país los principales factores que limitan la producción de vainilla son: la sequía y altas temperaturas que se producen durante la floración y desarrollo de los frutos, el hongo *Fusarium oxysporum*, que causa mortalidad y reduce la vida productiva de las áreas cultivadas, los altos costos de producción y los bajos precios de la vainilla verde.

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó que en el año 2013 los principales estados productores de vainilla en México fueron: Veracruz (332.56 t), Puebla (56.55 t), Oaxaca (51.56 t) y San Luis Potosí (22.2 t).

Resultando ser Veracruz el estado con mayor producción de vainilla, aportando el 72% de la producción nacional; le siguen Oaxaca y Puebla, que en conjunto aportan alrededor del 23% de la producción total como se puede apreciar en la Figura 2.6 además en pequeñas cantidades se produce también en San Luis Potosí, Hidalgo, Chiapas y Quintana Roo.

Para el 2017 SAGARPA reportó que la vainilla de México tiene un alto potencial en el mercado debido a que las exportaciones del país no tienen una elevada presencia en el comercio internacional. En cuanto a su última producción reportada por SAGARPA para el 2016 de las 1, 059 ha sembradas el 38.55% de la superficie se encuentra mecanizada, el 57.82% cuenta con tecnología aplicada a la sanidad vegetal y se obtuvo una producción nacional de 512.78 t.

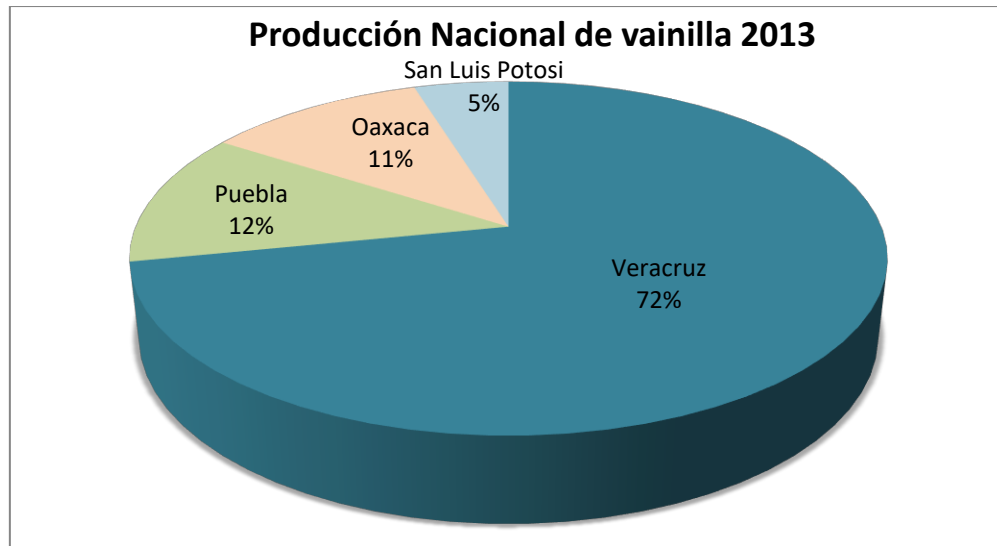


Figura 2.6 Producción Nacional De Vainilla 2014 (SIAP, 2014)

2.4 Análisis Genético

Actualmente no se han reportado trabajos concluyentes sobre descriptores que permitan una identificación clara y correcta de las especies de vainilla dentro del género en México. De hecho, *Vanilla* sp. es considerado un grupo taxonómico complejo al mostrar un modo de reproducción uniparental (crecimiento vegetativo), hibridación interespecífica en áreas simpátricas y poliploidía. Estos mecanismos tienen profundos efectos sobre la organización de la diversidad biológica y se han descrito como responsables de la dificultad para definir taxones discretos, estables y coherentes (Gigant *et al.*, 2011). La falta de incompatibilidad genética entre la mayoría de las especies de vainilla y la ocurrencia comprobada de hibridaciones interespecíficas en el género, requerirá obligatoriamente el estudio de regiones nucleares, además de marcadores de ADN cloroplástico para resolver los patrones de introgresión e identificar correctamente las especies de vainilla (Gigant *et al.*, 2011).

2.4.1 Marcadores moleculares utilizados para el estudio de las relaciones Filogenéticas del género *Vanilla*

El origen y dispersión del cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) fue estudiado por Lubinsky *et al.* (2008) quienes mencionaron que la vainilla es un cultivo propagado a partir de clones originarios de Mesoamérica y que la información respecto a las circunstancias sobre el comienzo del cultivo de vainilla es incompleta. Ellos utilizaron marcadores de polimorfismo de longitud del fragmento amplificado (AFLP) para inferir el origen y las relaciones entre la vainilla cultivada y no cultivada en Mesoamérica y en las islas en el Océano Índico. Probablemente, el pueblo Totonaca de Papantla fue el primero en cultivar vainilla; sin embargo, informes más antiguos del uso de la vainilla se refieren a los mayas precolombinos del sureste de México y América Central como los primeros en utilizar la vainilla como especie aromatizante para el cacao.

Sus resultados sugieren que, genéticamente, la vainilla cultivada fuera de Mesoamérica está más estrechamente relacionada con los cultivos de Papantla, esto es consistente con un origen único de la vainilla cultivada fuera de México.

Estudios realizados por Besse *et al.* (2004) y Schlüter *et al.* (2007) en los cuales utilizaron marcadores RAPD para determinar la variabilidad genética en vainillas cultivadas, detectaron bajos niveles de diversidad genética en *V. planifolia* en áreas de cultivo tales como Isla Reunión, Polinesia Francesa (Océano Pacífico) y Centro América, esto de acuerdo con el modo vegetativo de dispersión de *Vanilla* y la reciente historia de la introducción en esas regiones.

Sin embargo, en México se encontraron los niveles más altos de diversidad genética para los especímenes silvestres en comparación con los cultivados. Del mismo modo, Bory *et al.* (2008) realizaron estudios con marcadores AFLPs para determinar los patrones de introducción y diversificación en *V. planifolia* en la Isla Reunión, donde encontraron que la mayoría de las accesiones evaluadas (284 de 303) de *V. planifolia* se agruparon con bajos niveles de diversidad genética. Los grupos evaluados incluían diferentes fenotipos: tipos mexicanos (Mansa, Mestiza, Acamaya, y Colibrí), tipos de Isla Reunión (Classique, Mexique, Grosse Vanille, Variegata) y 30 accesiones de otro origen y áreas cultivadas (Madagascar, Polinesia Francesa e India Occidental). Solamente los clones cultivados en Veracruz-México mostraron poca variabilidad con los cultivados en Isla Reunión. Concluyendo que mucha de la *V. planifolia* cultivada en Isla Reunión, Madagascar y otras áreas de introducción como La Polinesia Francesa e India Occidental, han evolucionado de una estrecha base genética de una sola accesión introducida.

Los bajos niveles de diversidad genética revelados en las investigaciones realizadas por Bory *et al.* (2008), se asumen debido al modo de propagación vegetativo del cultivo de *V. planifolia* a pesar del alto nivel de información generada de los marcadores usados, la poca diversidad genética revelada por los marcadores AFLPs, es similar a los resultados de los RAPD. Además sugieren que *V. planifolia* ha evolucionado a través de acumulaciones de mutaciones durante dos siglos de propagación vegetativa después de la introducción de una sola accesión.

La posición filogenética de vainilla entre la familia *Orchidaceae* es ahora más clara gracias sobre todo a los estudios filogenéticos moleculares basados en combinaciones o matrices individuales de plásmidos *rbcL* (Cameron *et al.*, 1999; Soto Arenas, 2003),

psaB (Cameron, 2004), psbB y psbC (Cameron y Molina, 2006), psbB, psbC, psaB y rbcL (Bouetard *et al.*, 2010) siendo buenos marcadores moleculares para estudios en la subfamilia *Vanilloideae*. Los genes de plástidos presentan un interés real en la filogenética debido a la herencia unilateral, numerosas copias por célula, la facilidad de amplificación y secuenciación, además minimizan el riesgo de contaminación por hongos (Bouetard *et al.*, 2010).

Varias especies del acervo genético mexicano y centroamericano están cercanamente emparentadas con las dos especies de mayor cultivo en la zona: *V. planifolia* y *V. pompona*; lo cual representa un importante germoplasma para el cultivo (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

Soto-Arenas (1999) realizó una propuesta inicial de las relaciones filogenéticas de 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, el cual resultó ser específico para cada taxón reconocido

Soto-Arenas y Dressler (2010) realizaron un estudio de 15 especies de *Vanilla* originarias de México y América central, presentando un análisis cladístico de secuencias nucleotídicas de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) de los genes nucleares ribosomales, donde se muestra que las secuencias de este marcador molecular ampliamente utilizado son específicas, lo que permite, el reconocimiento de muestras estériles y además lo hacen un buen marcador molecular para estudios filogenéticos de este género, las especies identificadas fueron: *Vanilla costaricensis*, *V. cribbiana*, *V. dressleri*, *V. martinezii* y *V. sarapiquensis* las cuales fueron propuestas como nuevo taxa, además fueron reconocidas también: *Vanilla calyculata*, *V. hartii*, *V. helleri*, *V. inodora*, *V. insignis*, *V. odorata*, *V. phaeantha*, *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. trigonocarpa*.

2.4.2 Conservación del género *Vanilla*

La conservación de los recursos fitogenéticos de cultivos tropicales en bancos de germoplasma es fundamental para reducir la pérdida de diversidad genética y para conservar especies silvestres, cultivares locales tradicionales y variedades mejoradas (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). En el mundo se han establecido varias colecciones de germoplasma, aunque muy pocos programas de fitomejoramiento intensivos en *Vanilla* sp. Las razones principales de esta situación son: ausencia de una taxonomía confiable y de un marco de referencia filogenético, utilización de especies poco o distantemente relacionadas en los programas de entrecruzamiento, lo cual ha generado plantas híbridas con frutos sin cualidades aromáticas especiales para el mercado (Soto-Arenas, 2009).

Para solucionar los problemas de erosión genética de las especies de vainilla, la implementación de estrategias de conservación ex situ (colecciones in vitro y jardines botánicos) se convierten en las alternativas más viables para preservar genotipos existentes de aquellas plantas propagadas principalmente de forma vegetativa y de las cuales no es tan fácil la obtención de semillas sexuales. Uno de los bancos de germoplasma con mayor número de ejemplares bajo resguardo es el CRB VATEL (CIRAD) en la Isla Réunion, Francia.

En México se cuenta ya con un Banco Nacional de Germoplasma de Vainilla, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ubicado en el municipio de Tenampulco, localizado en la parte noroeste del estado de Puebla. Sus coordenadas son el paralelo 20° 11' 49,9" de latitud norte y el meridiano 97° 22' 4,8" de longitud oeste, a una altura de 224 msnm, en el cual se encuentran bajo resguardo in vivo cinco especies correspondientes a *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. inodora*, *V. insignis* y *V. odorata*, para conservar la variabilidad genética del género *Vanilla* (Reyes-Lopez et al., 2015).

Flores *et al* (2017), realizaron un estudio de la diversidad del género *Vanilla* en México y su relación con algunas variables climáticas, con el fin de caracterizar parte del perfil bioclimático de las especies de vainilla encontradas con la finalidad de contribuir en la toma de decisiones en lo relacionado con su ecología, conservación y fitomejoramiento, al considerar los nuevos escenarios de cambio climático.

Sus resultados indicaron que en México se tienen registros de *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. insignis*, *V. inodora*, *V. odorata* distribuidas en nueve estados. Presentando *V. planifolia* intervalos amplios de temperatura y precipitación; *V. pompona*, *V. odorata*, *V. insignis* y *V. inodora* tuvieron intervalos intermedios. La amplitud de los datos extremos de cada especie puede considerarse para ubicar los sitios donde se puedan llevar a cabo estrategias regionales de conservación *ex situ* y el establecimiento de cultivos. El perfil bioclimático reportado permite inferir de manera indirecta la condición genética de cada especie que podría ser utilizada en programas de mejoramiento genético como: la elevada altitud y tolerancia a bajas temperaturas (*V. odorata*), la tolerancia a altas temperaturas (*V. inodora*) y tolerancia a baja precipitación (*V. odorata*, *V. pompona* y *V. planifolia*).

2.5 Calidad aromática

La calidad, en su sentido más general, es la capacidad de cumplir con ciertos requisitos específicos. En la producción y control de calidad de los alimentos es muy importante asegurar la salud y la vida de los consumidores mediante la adopción de las medidas adecuadas en cada etapa de producción y distribución de los alimentos. Para los consumidores, la calidad organoléptica es igualmente importante y generalmente decisiva en la compra. Entre las características sensoriales de calidad tales como el color, las propiedades reológicas o embalaje, el flavor representa un lugar determinado, que implica las sensaciones de olor y sabor recibidos al comer (Plutowska y Wardencki, 2007).

Aunque el estímulo del sabor es importante, la parte del flavor que aprecia diferencias entre alimentos puede atribuirse ampliamente a moléculas volátiles aromáticas detectadas a nivel retronasal, cuando el alimento es introducido en la boca.

El aroma en los alimentos es una propiedad sensorial compleja, derivada del efecto integrado de numerosos componentes de diferente naturaleza química y a muy baja concentración (Jordán, 1999). Es así como la presencia, el contenido y la composición de los compuestos volátiles de los alimentos tienen una influencia sustancial en su calidad. Lo que implica que cada alimento tiene una composición característica y única de compuestos volátiles (Plutowska y Wardencki, 2007).

2.5.1 Compuestos volátiles

En los alimentos se detectan un gran número de compuestos aromáticos volátiles, pero no todos ellos contribuyen en el aroma de los mismos. Diferentes técnicas han sido descritas para determinar que moléculas son activas a nivel aromático (Jordán, 1999). Las moléculas consideradas como activas del aroma en un alimento presentan

características dispares con relación a sus propiedades físicas, comportamiento y niveles de umbrales de percepción.

La mayoría de ellas son activas a concentraciones de partes por millón e incluso de partes por billón, y sus niveles umbrales de percepción pueden variar de unas a otras en un factor de hasta un billón de veces (Jordán, 1999). Una molécula para ser considerada activa sensorialmente debe cumplir una serie de requisitos, debe presentar una cierta presión de vapor para poder alcanzar el epitelio olfativo de la nariz humana. Debe tener una mínima solubilidad en agua para penetrar en la capa acuosa de la membrana, así como baja polaridad (superficie activa, compuestos de elevada polaridad son menos olorosos). Presenta un comportamiento lipofílico para penetrar en las capas grasas de las células neuronales y su peso molecular no debe ser excesivamente alto. El papel de estos compuestos volátiles primarios está influenciado por la naturaleza del alimento, la presencia o no de componentes no volátiles como azúcares y sustancias pécticas, ya que afectan sensiblemente y de manera compleja a la volatilidad de numerosos componentes.

El análisis de los compuestos volátiles así como su identificación y evaluación cuantitativa puede constituir una valiosa fuente de información sobre la calidad sanitaria de los alimentos, que incluye la calidad organoléptica y garantiza la salud del consumidor. En los perfiles aromáticos de los alimentos se muestran los compuestos volátiles que son el resultado de un gran número de reacciones que se producen entre sus componentes. El aroma resultante depende de un número de factores: la disponibilidad y la estructura de los compuestos, la participación de grasas, aminoácidos y azúcares así como también las condiciones de reacción (temperatura, duración, actividad del agua, pH, nivel de oxígeno, etc) (Plutowska y Wardencki, 2007).

Respecto a la vainilla ésta se caracteriza por ser muy apreciada por su aroma. El aroma "vainilla" es el más utilizado en la industria agroalimentaria (Perez-Silva *et al.*, 2016). Los compuestos volátiles cuantitativamente más importantes son: la vainillina, el *p*- hidroxibenzaldehído, el ácido vainillínico y el ácido *p*- hidroxibenzoico. Siendo la vainillina el principal responsable del aroma de la vainilla. La vainillina puede

sintetizarse químicamente a partir de la lignina. Sin embargo el aroma característico de la vainilla es debido a una mezcla compleja de diferentes compuestos volátiles. 250 compuestos volátiles han sido identificados en muestras de vainilla de diferente origen (Lamparsky y Klimes, 1976; Adedeji *et al.*, 1993, Pérez-Silva *et al.*, 2006).

Perez Silva *et al.*, (2016) mencionaron que el aroma vainilla se ve influenciado por diversos factores como:

- La especie: en *V. planifolia* el compuesto que esta presente en mayor concentración es la vainillina, mientras que para *V. xtahitensis* y *V. pompona* el anisaldehído y los compuestos anísicos son los mayoritarios.
- La madurez de la vaina: vainas maduras con extremos amarillos contienen una mayor concentración de glucovainillina, las vainas cosechadas entre los cuatro y cinco meses después de la polinización contienen pequeñas cantidades de los precursores aromáticos.
- Lugar de producción: las condiciones de crecimiento y nutrición del suelo influyen en el desarrollo de los frutos. Mediante el análisis sensorial se han determinado descriptores o atributos (balsámico, afrutado, resinosa, fenólico, ahumado, madera, floral, cremoso, dulce, perfume, graso y anísico, entre otros) que describen las características aromáticas de la vainilla y permiten diferenciar los extractos de vainilla procedentes de diferente origen geográfico.
- Beneficiado: este proceso implica las siguientes etapas que fueron descritas anteriormente: marchitamiento, sudoración, secado y acondicionamiento, con ligeras variaciones dependiendo de la ubicación geográfica. Durante las etapas del beneficiado tradicional hay fluctuaciones de temperatura-tiempo que pueden conducir a variaciones en la calidad del producto. Es durante este proceso que los glucósidos fenólicos, como la glucovainillina, son hidrolizados enzimáticamente por las β -glucosidasas a las formas libres, que son

responsables del aroma de la vainilla (Odoux et al., 2006; Brillouet y Odoux, 2010; Pérez-Silva et al., 2011).

2.5.2 Precursores aromáticos de la vainilla

Dentro los vegetales, un cierto número de compuestos aromáticos están presentes en forma de glucósidos, los cuales están constituidos por una parte glucídica la cual está unida por un enlace β -glucosídico a una aglicona. La molécula puede ser una glucosa o varias unidades glucosídicas. Más de 200 agliconas pertenecientes a la familia de los alcoholes alifáticos, terpénicos y sesquiterpénicos, derivados norisoprenoides, ácidos, hidroxiácidos, derivados fenil propanoides, aldehídos y fenoles han sido identificados en diversas frutas y plantas. Pocos trabajos han sido realizados sobre la composición en glicósidos de la vainilla.

La glucovainillina es el glucósido más abundante presente en *Vanilla planifolia*, la hidrólisis enzimática de la glucovainillina permite la liberación de la vainillina durante el beneficiado de la vainilla (Odoux, 2000) como se puede apreciar en la Figura 2.7.

La hidrólisis de la glucovainillina no ocurre espontáneamente en la fruta verde, a pesar del hecho de que la actividad inicial de la β -glucosidasa es muy alta. La hidrólisis de la glucovainillina ocurre en la última etapa de maduración de la fruta (durante la senescencia), y durante los tratamientos de calor iniciales del proceso tradicional del beneficiado de la vainilla durante las etapas de marchitamiento y sudado, originando una descompartimentalización celular, poniendo en contacto las enzimas endógenas de la vaina (β -glucosidasas) con la glucovainillina, obteniendo de esta manera glucosa y vainillina (Odoux et al., 2006).

Hasta ahora los estudios realizados en la evaluación de los precursores aromáticos han sido enfocados principalmente a *Vanilla planifolia*. Entre los trabajos existentes se pueden mencionar los de Leong et al., (1989), Kanisawa et al., (1994), Negishi y Osawa, (1996), Dignum et al., (2002, 2004), Odoux et al., (2006).

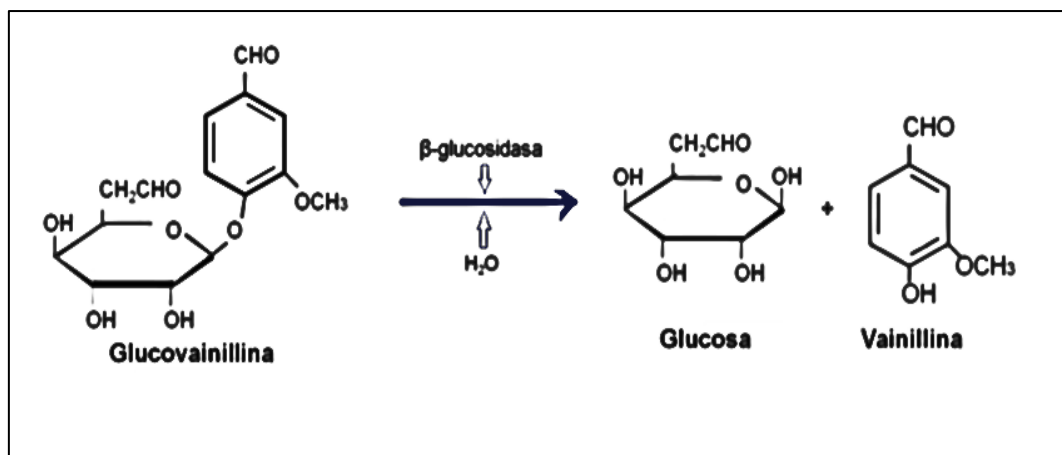


FIGURA 2.7 Hidrólisis de glucovanillina (Odoux, 2000)

Leong *et al.* (1989) en su estudio confirmaron la presencia de los glucósidos de vainillina, ácido vainillínico, p-hidroxibenzaldehído y ácido p-hidroxibenzoico en vainas verdes.

Kanisawa *et al.* (1994) reportaron la presencia de otros glucósidos minoritarios dentro de los cuales fueron identificados después de la hidrólisis enzimática los glucósidos del ácido vainillínico, vainillil alcohol, p-vinil-guayacol, acetovainillon, ácido cafeico, ácido ferulico, 3- metil, ácido 4-dihydroxicinámico, 2-metoxi-4-cresol, homovainillil alcohol, ácido 3,4-dihydroxibenzoico, etil-4-hidroxi-3-metoxifenilacetato, p-cresol, p-vinil fenol, metilsalicilato, p-hidroxibenzil-etil-éter, p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxicinámico, alcohol cinámico, ácido cinámico, 3-fenilpropanol.

Negishi y Ozawa (1996) sintetizaron 12 glucósidos diferentes, provenientes de extractos de vainas verdes que se analizaron por HPLC, identificando solamente glucovanillina y p-hidroxibenzaldehído glucósido. Los otros glucósidos probablemente no se habían formado aún ya que las vainas verdes estudiadas tenían seis meses de madurez.

Dignum *et al.* (2004) estudiaron los glucósidos presentes en vainas verdes de *Vanilla planifolia* cosechadas en Indonesia, identificando 9 glucósidos por HPLC. De los cuales solo cuatro se presentaron en concentraciones altas destacando la

glucovainillina. Asimismo reportaron que algunos compuestos que se encuentran en bajas concentraciones tienen un alto impacto en el aroma de la vainilla.

En relación a los estudios realizados en *Vanilla planifolia* originaria de México, Pérez Silva *et al.* (2011), utilizando un método indirecto, reportaron la identificación y cuantificación de 17 agliconas en las vainas verdes, las agliconas identificadas se presentan en la Tabla 2.2.

TABLA 2.2 Compuestos aromáticos de origen glucósilado (Pérez-Silva *et al.*, 2011)

Agliconas	
vainillina	4-cresol
4-hidroxibenzaldehído	vainillil alcohol
ácido vainillínico	4-hidroxibenzil alcohol
ácido 4-hidroxibenzoico	anisil alcohol
4-creosol	bencil alcohol
4-vinilguaiacol	4-vinilfenol
2-fenil etanol	3-fenilpropanol
acetovainillona	cinamil alcohol
ácido salicílico metil éster	

2.5.3 Composición de compuestos volátiles en vainas de vainilla beneficiadas

Desde el punto de vista químico, los diferentes compuestos volátiles que se han reportado en las vainas de vainilla beneficiadas se encuentran dentro de los siguientes grupos: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, lactonas, ácidos, terpenoides, heterocíclicos y fenoles.

Respecto a los hidrocarburos, un gran número de alcanos han sido identificados (n-pentacosano), metilados y etilados derivados de esos alcanos, alquenos (1-hentriaconteno), terpenoides (α -pineno o limoneno), con anillo aromático (como el benceno y algunos de sus derivados). Los ácidos alifáticos (como el ácido acético y

ácido linoleico) son también representados por un número de moléculas, así como ácidos aromáticos (ácido benzoico y ácido cinámico) (Odoux, 2010).

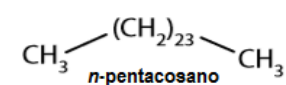
También fueron identificados esteres alifáticos y esteres aromáticos (ácido linoleico etil éster, ácido cinámico metil éster), además esteres terpenos (ácido acético α -terpenil éster). Alcoholes alifáticos (2,3-butanediol), alcoholes aromáticos (benzil alcohol), así como terpenoides (linalol) han sido identificados.

Aldehídos alifáticos (2-heptenal), aldehídos terpenos (β -ciclocitral), cetonas alifáticas (3-hidroxi-2-butanona) y cetonas aromáticas (acetofenona) también están presentes. Varias lactonas han sido reportadas como parte de la fracción volátil de la vainilla (γ -butirolactona), así como también heterocíclicos (furfural ó *cis*-vitispirano) (Odoux, 2010).

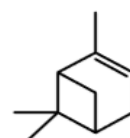
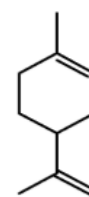
El grupo representativo tanto cualitativamente como cuantitativamente de la fracción volátil de la vainilla beneficiada son los fenoles, los cuales pueden estar presentes en forma de aldehídos (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído o vainillina), ácidos (ácido 4-hidroxibenzoico), alcoholes (4-hidroxibenzil alcohol) e incluso cetonas (acetovainillona), así como numerosos esteres (ácido salicílico metil éster) y éteres (4-hidroxi bencil metil éter) (Odoux, 2010).

En la Figura 2.8 se puede apreciar la estructura química de algunos compuestos volátiles de diferente clase química presentes en las vainas beneficiadas de vainilla.

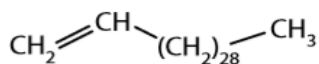
Hidrocarburos



benceno

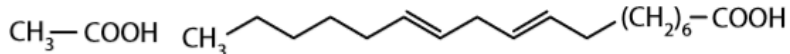
 α -pineno

limoneno



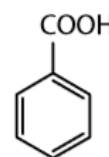
1-hentriaconteno

Ácidos

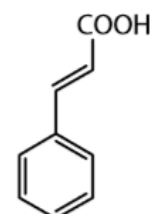


ácido acético

ácido linoleico

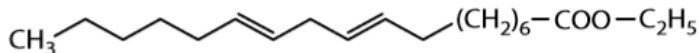


ácido benzoico

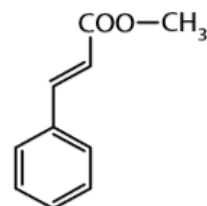


ácido cinámico

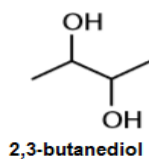
Esteres



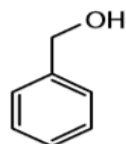
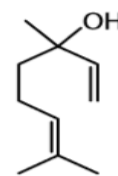
ácido linoleico etil éster

ácido cinámico
metil ésterácido acético
 α -terpenil éster

Alcoholes

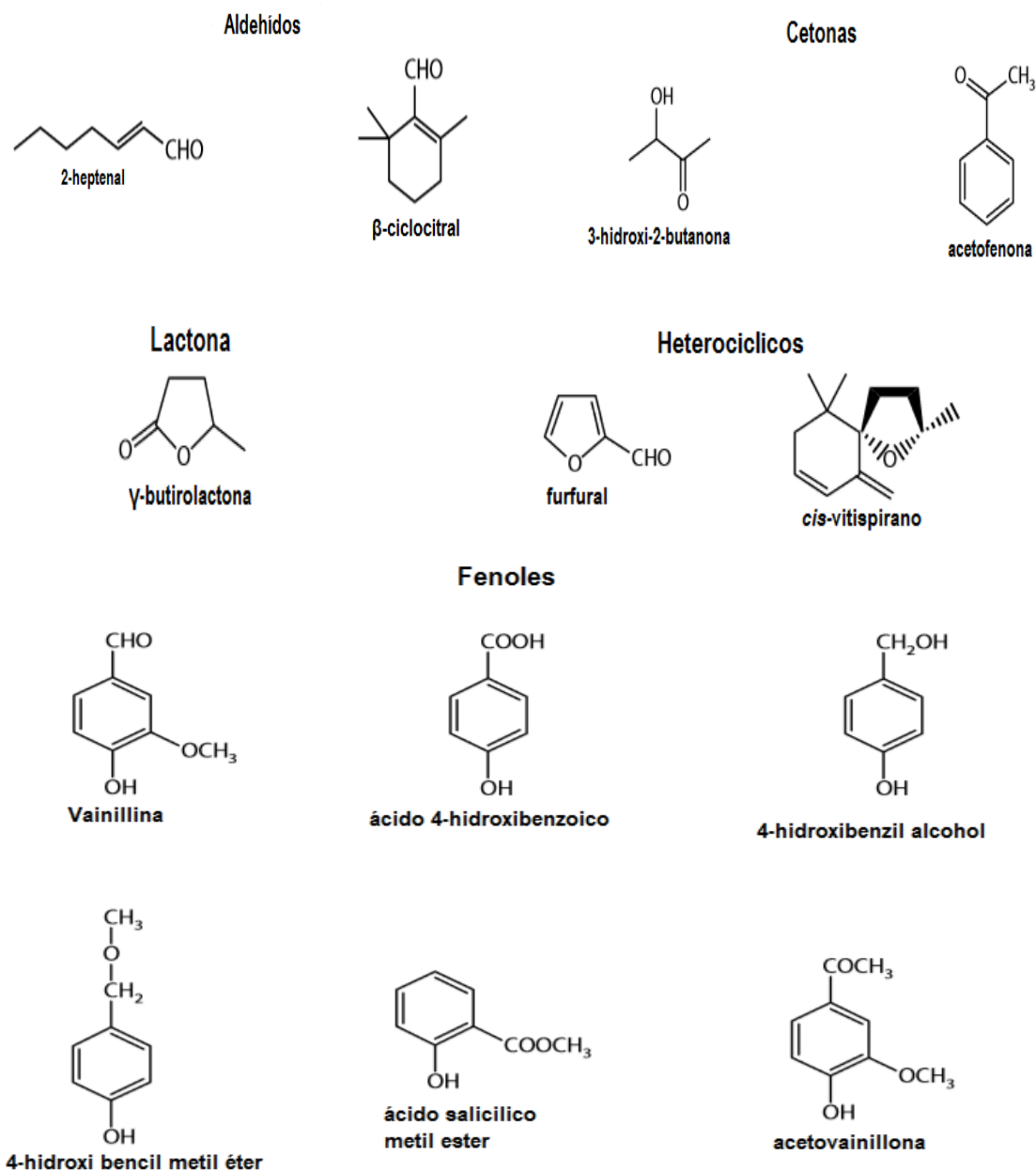


2,3-butanediol

bencil alcohol
(fenil metanol)

linalol

FIGURA 2.8 Estructura química de algunos compuestos volátiles de diferente clase química identificados en vainas de vainilla beneficiadas (Odox, 2010).



Continuación:

FIGURA 2.8 Estructura química de algunos compuestos volátiles de diferente clase química identificados en vainas de vainilla beneficiadas (Odox, 2010).

Pérez- Silva *et al.* (2006) identificaron 65 compuestos volátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) a partir de un extracto orgánico de vainilla (*V. planifolia* G. Jackson) producida y beneficiada en la región del Papaloapan, México. Este trabajo permitió por primera vez identificar los compuestos de impacto aromático de la vainilla natural mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a un olfactómetro (GC-O). Los compuestos de impacto aromático identificados fueron: 25 ácidos, 15 fenoles volátiles, 10 alcoholes, 4 aldehídos, 4 heterocíclicos, 4 ésteres, 2 hidrocarburos y una cetona. Siendo los fenoles los compuestos predominantes y los principales responsables del poder aromático. Las notas de madera, dulce, balsámico, fueron generados por los fenoles volátiles. Las notas herbal, floral con intensidad media fueron atribuidas a los aldehídos: 2 heptenal y (*E*)-2- decenal, identificados por primera vez en la vainilla. Los ácidos alifáticos como el ácido butírico, isobutírico, isopentanoico, y pentanoico fueron percibidos por los panelistas con notas a mantequilla y queso, principalmente. Este estudio permitió poner en evidencia que el aroma complejo de la vainilla no es solo debido a la presencia de la vainillina, sino también a la presencia de otros compuestos que aunque se encuentran en menor concentración tienen un impacto aromático en la vainilla. Es por lo anterior que el aroma característico de la vainilla no será jamás igualado solo por la presencia de la vainillina, compuesto que es usado en más de un 90 % de los productos aromatizados artificialmente con vainillina de síntesis.

Zhang y Mueller (2012) utilizaron las técnicas de extracción líquida y destilación para extraer y separar los compuestos volátiles de vainas de vainilla Bourbon y de Uganda, analizando la diferencia en la composición total y los compuestos odor-activos de los dos extractos usando CG-MS y GC-O. Identificaron 246 compuestos volátiles de los cuales 78 fueron identificados como compuestos odorantes, de los cuales los más abundantes en las vainas de ambos orígenes fueron vainillina y guayacol, sin embargo 9 compuestos volátiles fueron solo identificados en vainas de vainilla Bourbon, y 2 (carvacrol y β -damascenona) solo en vainas de Uganda.

Brunschwig *et al.* (2012) evaluaron los compuestos odorantes en *Vanilla xtahitensis* determinando que los principales compuestos volátiles característicos de esta especie son el anisaldehído y el guayacol, caracterizándose por sus notas florales y a anís. Maruenda *et al.* (2013) analizaron la especie *Vanilla pompona* spp. Grandiflora de Perú y reportaron que los principales compuestos aromáticos son: vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, alcohol vainíllico, ácido vainillínico, ácido *p*-hidroxibenzoico, anisil alcohol, anisaldehído y ácido anísico.

2.6 Síntesis de Antecedentes

La vainilla se caracteriza por ser muy apreciada por su aroma. Los compuestos volátiles cuantitativamente más importantes son: la vainillina, el *p*-hidroxibenzaldehído, el ácido vainillínico y el ácido *p*-hidroxibenzoico. Siendo la vainillina el principal responsable del aroma de la vainilla. Sin embargo su aroma característico no depende solo de la vainillina sino también de diversos compuestos volátiles responsables de las notas: dulce, balsámica, cremosa, amaderada, frutal, herbácea, fenólica y a canela (Werkhoff y Güntert, 1997, Pérez-Silva *et al.*, 2006). Los estudios respecto a la composición aromática de la vainilla se han enfocado principalmente a las especies comerciales: *Vanilla planifolia* (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Odoux, 2010; Pérez-Silva *et al.*, 2011; Zhang y Mueller, 2012), *Vanilla xtahitensis* (Brunschwig *et al.*, 2012), *Vanilla pompona* (Maruenda *et al.*, 2013).

México es considerado como la cuna ancestral y uno de los centros más importantes de la diversidad genética de esta apreciada orquídea, (Soto-Arenas, 2003, 2006, 2009; Bory *et al.* 2008; Lubinsky *et al.*, 2008; Soto-Arenas y Dressler, 2010; Hernández-Hernández, 2011). Por lo que resulta importante rescatar las especies silvestres de las cuales se desconocen sus características genéticas y potencial aromático. Esto permitirá además identificar plantas productoras de frutos con potencial aromático que puedan ser utilizadas para el mejoramiento genético de la variedad comercial (*Vanilla planifolia* var *G. Jackson*), asimismo preservar las especies de vainilla endémicas de México.

La posición filogenética de vainilla entre la familia *Orchidaceae* es ahora más clara gracias a los estudios filogenéticos moleculares basados en el uso de primers cloroplásticos (Cameron *et al.*, 1999; Soto Arenas, 2003; Cameron, 2004; Cameron y Molina, 2006; Bouetard *et al.*, 2010) y nucleares (Soto-Arenas; 2009,2010) siendo buenos marcadores moleculares para estudios en la subfamilia *Vanilloideae*. Sin embargo actualmente no se han reportado trabajos concluyentes sobre descriptores que permitan una identificación clara y correcta de las especies de vainilla dentro del género en México.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Realizar la caracterización aromática y genética de diferentes variedades de vainilla (*Vanilla sp*) de México.

3.1.1 Objetivos específicos

- Estudiar la distribución de los diferentes cultivares de vainilla en los estados de Oaxaca y Veracruz.
- Evaluar la relación filogenética de las diferentes especies y variedades de vainilla identificadas y colectadas en México.
- Evaluar el potencial aromático de los frutos maduros a las 32 semanas después de la polinización de *V. planifolia* de cultivares de Oaxaca y Veracruz.
- Evaluar el perfil aromático de vainas de *V. planifolia* cosechadas a las 32 semanas y beneficiadas en condiciones controladas de cultivares de Oaxaca y Veracruz.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Identificación de plantaciones, colecta de material genético y polinización manual de las flores de *V. planifolia*

Se realizaron recorridos en las zonas con la mayor diversidad genética del género *Vanilla*, (Oaxaca y Veracruz). Se identificaron las plantas de interés, las cuales debieron ser plantas sanas, libres de plaga y tallo vigoroso. En las plantas de especies diferentes a *V. planifolia* solo se colectó material genético para su estudio. Además de los frutos se recolectaron esquejes para ser depositados en el banco de germoplasma *in-vivo* de Tenampulco, Puebla, perteneciente a la *Red Vainilla*. En donde se encuentran en resguardo, En las plantas con flores *V. planifolia* se realizó la polinización manual de las flores, con ayuda de los productores quienes también apoyaron a monitorear el periodo de floración.

Los frutos de *V. planifolia* fueron recolectados a las 36 semanas después de su polinización. Los frutos fueron posteriormente transportados al laboratorio, donde se les realizó la caracterización de potencial aromático en base a la determinación del contenido de glucovainillina y humedad. Posteriormente, el resto de las vainas colectadas fueron sometidas a un beneficiado en condiciones controladas.

4.2 Análisis Genético

4.2.1 Extracción de ADN de material colectado

El ADN fue extraído de hojas de vainilla recolectadas y preservadas en silica gel siguiendo el protocolo QiagenDNeasy® Plant Mini Kit. La concentración y la pureza de los extractos de ADN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (ThermoScientific).

Estos análisis fueron realizados en su mayoría durante el desarrollo de la estancia en el CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), de la Isla La Reunión, Francia, durante dicha estancia se recibieron muestras de hojas de vainilla de Guatemala y Costa Rica que se incluyeron en los análisis.

Además, debido al interés por continuar con los trabajos realizados por Soto-Arenas (Soto-Arenas, 1999, 2006, 2009; Soto-Arenas y Dressler, 2010) se analizaron muestras de ADN del género *Vanilla* que pertenecen a la colección de Soto-Arenas y de la AMO A.C. (Asociación Mexicana de Orquideología, A.C.), durante una estancia en el Instituto de Biología de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México). Particularmente, con el objetivo de clarificar la identificación de las especies de los clados de *V. planifolia*, *V. odorata* y *V. insignis* de ciertas muestras colectadas durante el desarrollo de este trabajo.

4.2.2 Selección de marcadores moleculares

Se utilizaron 3 iniciadores: 1 cloroplastico *rbcL* (ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) y 2 nucleares ITS (espaciador interno transcrito) y PAL (fenilalanina amonioliasa).

4.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los fragmentos de ADN se amplificaron por la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando un termociclador GeneAmp PCR System 9700. La enzima utilizada fue la polimerasa GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Los programas utilizados para la PCR dependieron de la duración de las fases de hibridación y elongación según el tipo de iniciador empleado y sus temperaturas de alineamiento.

La amplificación de fragmentos de interés se verificó mediante electroforesis después de la migración de los fragmentos de ADN en gel de agarosa al 2%, seguido por la tinción con bromuro de etidio (BET) y una revelación bajo luz ultravioleta.

4.2.4 Secuenciación

Las reacciones de secuenciación de los productos de la PCR fueron realizadas por la empresa Beckman Coulter Genomics en Reino Unido, siguiendo el método de Seiger.

4.2.5 Análisis de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos fueron verificadas mediante la comparación de los electroforegramas obtenidos a partir de cada marcador, utilizando el software Bioedit. Cada base ambigua se comprobó y corrigió manualmente para garantizar la coherencia entre las dos cadenas. Las secuencias resultantes se alinearon inicialmente con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), incorporado en el software Bioedit, y se ajustaron manualmente en caso necesario.

4.2.6 Construcción de árboles filogenéticos

Se utilizó el método de reconstrucción filogenética: Neighbor-Joining, el cual utilizó una matriz de distancias para hacer combinaciones entre taxones. Para el cálculo de estas distancias, se considera el número de sitios variables sobre el número total de sitios. En este método se asocia una prueba de robustez, el bootstrap, que mide si los grupos obtenidos a partir del método Neighbor-Joining, son sólidos o no.

4.3 Beneficiado de la vainilla en condiciones controladas

El marchitamiento de las vainas se realizó mediante congelamiento sumergiendo las vainas verdes en Nitrógeno Líquido durante 1 min. Para el sudado de las vainas estas se colocaron en cámaras controladas de temperatura y humedad relativa (40 °C y 75 % HR) durante 7 días. Posteriormente las vainas se deshidrataron manteniéndose a 30 °C y 75 % HR hasta que alcanzaron humedades de 35 - 40 % aproximadamente un mes (Rosado-Zarrabal *et al.*, 2007). Esta última condición correspondió a la etapa del secado al sol a la cual las vainas son sometidas en el beneficiado tradicional, pero a mayores temperaturas. Finalmente, las vainas permanecieron a temperatura ambiente durante 1 mes (afinado). El curado de la vainilla tuvo una duración de 3 meses incluyendo el afinado.

4.4 Determinación de humedad en vainas verdes y beneficiadas

La determinación del contenido de humedad se realizó en las vainas verdes y durante el beneficiado, cada muestra se analizó por triplicado mediante el método gravimétrico, según Odoux, 2000. Se pesaron 5 g de vainilla en una balanza analítica, posteriormente las muestras se colocaron en una estufa de secado a 110 °C durante 24 h o hasta peso constante.

4.5 Preparación de la muestra (polvo fino de vainilla)

Las vainas verdes y beneficiadas para su análisis por HPLC se congelaron con nitrógeno líquido para posteriormente ser trituradas en un molino (Krupps inoxidable), hasta obtener un polvo con un tamaño de partícula de aproximadamente 0.5 mm.

4.6 Cuantificación de glucovainillina y principales fenoles volátiles por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La determinación de la glucovainillina y de los principales fenoles volátiles (vainillina, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico, ácido *p*-hidroxibenzaldehído, vainillil alcohol y *p*-hidroxibencil alcohol), se realizó iniciando con 300 mg de polvo de vainilla, adicionando 10 mL de una mezcla de solventes metanol-agua 1-1 (v/v) grado HPLC, la mezcla se sometió a efectos ultrasónicos en el equipo Elmasonic P, modelo D78224 a temperatura ambiente con una frecuencia de 37 Khz durante 10 minutos, posteriormente los extractos se pasaron a través de un filtro de 120 mm y 0.45 μ m de diámetro (Palama *et al.*, 2009; Pérez-Silva *et al.*, 2011). Cada extracción se realizó por triplicado, posteriormente se analizaron en un HPLC Waters Serie G15VTC055N con Detector de Arreglo de Diodos (DAD) 2998PDA.

El volumen de inyección fue de 10 μ L, se utilizó una columna Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 X 250 mm) con una temperatura de 30 °C.

Se utilizaron tres fases móviles: A) Buffer PO₄ (KH₂PO₄ 1mM) pH 3.2, B) Metanol y C) Agua ambos grado HPLC. Los compuestos analizados fueron los siguientes: **vainillina**, **glucovainillina**, **p-hidroxibencil alcohol** y **vainillil alcohol** a 230nm, **ácido p-hidroxibenzoico** y **ácido vainilínico** a 254 nm y **p-hidroxibenzaldehído** a 280nm. La cuantificación se realizó mediante una curva estándar de cada compuesto analizado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de plantaciones a polinizar en Veracruz

En base a la localización de las diferentes especies de *Vanilla* reportadas por Soto-Arenas (1999; 2009) y en colaboración con personal de la empresa Desarrollo Agroindustrial Gaya S.A de C.V. localizada en Gutiérrez Zamora, Veracruz. En Febrero del 2014, se visitaron 17 plantaciones de vainilla de los productores de la región del Totonacapan con el objetivo de identificar plantaciones de diferentes variedades de *Vanilla planifolia* (G. Jackson, Amarilla, Verde, Rayada, Oreja de Burro) y *Vanilla pompona*. Las plantaciones visitadas se encuentran en un rango de altitud de 10 a 620 m.

Con la aprobación de los productores se marcaron las plantas que presentaban mejores características físicas (tallo grueso, libre de plagas, probabilidad de floración) para posteriormente realizar su polinización y recolección de frutos con un periodo de madurez controlado.

Los municipios visitados fueron: Gutiérrez Zamora, Tihuatlán, Cazones, Papantla y Tuxpan (Figura 5.1). A cada productor se le aplicó una encuesta para conocer las características de sus plantaciones, parte de la información obtenida se presenta en la Tabla 5.1.

Respecto al sistema de producción de vainilla en las plantaciones de estudio en Veracruz, se puede observar en la Figura 5.2 que el principal sistema de producción es a cielo abierto con un 59%, teniendo como tutores cítricos de; árboles de naranjo, mandarina y limón principalmente. Le sigue el sistema tecnificado con malla sombra en un 23%, ya que los productores comentan que así se puede disminuir el espacio del cultivo y aumentar producción, tener como tutor palos secos e incluso concreto, siendo indispensable considerar el tamaño de la malla y la altura a la que será colocada, para que no se vea afectada la plantación por altas temperaturas al quedar la malla muy cerca de las plantas.

Por último, el sistema agroforestal diversificado conocido como acahual cada vez va disminuyendo por la deforestación y por la implementación de la malla sombra la cual se observó en un 18% en los cultivos visitados

Es importante mencionar que 8 de las 17 plantaciones identificadas podrían considerarse como plantaciones orgánicas ya que no utilizan ningun tipo de insecticida o fungicida para combatir plagas y enfermedades.



FIGURA 5.1 Localización de los municipios con plantaciones de vainilla en el Estado de Veracruz

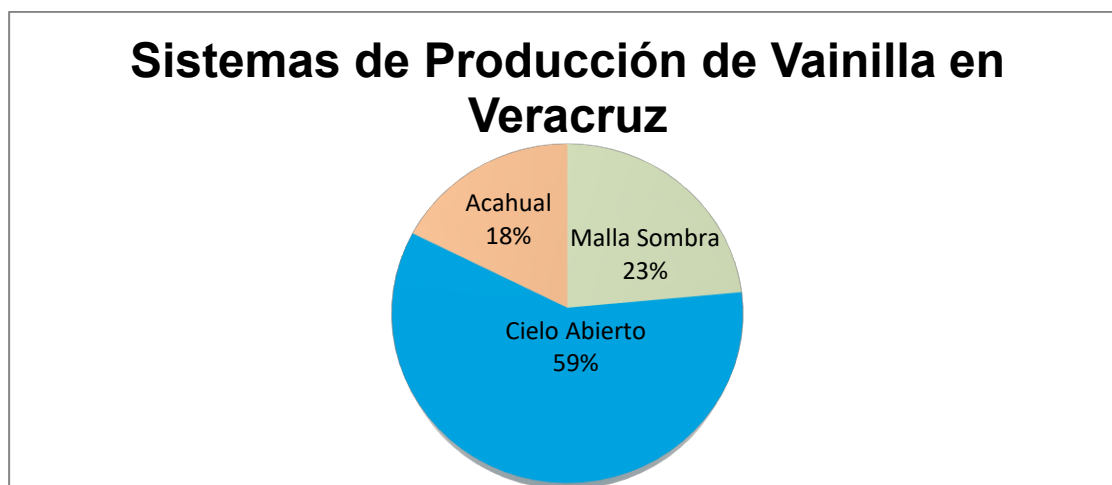


FIGURA 5.2 Sistemas de Producción de Vainilla en el Estado de Veracruz

TABLA 5.1 Localización y marcación de diferentes Variedades de Vainilla en Veracruz

MUNICIPIO	LOCALIDAD	PRODUCTOR	GENERO ESPECIE Y VARIEDAD PROBABLE
Gutiérrez Zamora	El Ojite (Tabla 5)	Norma Gaya Goldaracena	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Gutiérrez Zamora	El Ojite (Malla 1)	Norma Gaya Goldaracena	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Gutiérrez Zamora	El Ojite (Malla 2)	Norma Gaya Goldaracena	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Gutiérrez Zamora	El Ojite (Toronjo)	Norma Gaya Goldaracena	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Gutiérrez Zamora	Mario Hernández Posadas	Alfredo Rivera Rentería	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson y var. rayada, <i>Vanilla pompona</i>
Gutiérrez Zamora	Mario Hernández Posadas	Marcos Gómez Guerra	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson, <i>Vanilla pompona</i>
Tihuatlan	Chichimantla 2	Herlinda Pacheco Juárez	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson y var. Oreja de burro
Tihuatlan	Chichimantla 2	Hilario Ramirez Santes	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson y var. Oreja de burro
Tihuatlan	Chichimantla 2	Jacobo Ramírez Pacheco	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Tihuatlan	Paso La Uno	Gonzálo Gallardo Bermudez	<i>V. planifolia</i> var. Amarilla
Tihuatlan	La Loma	Prisciliano Bartoldo Acuña	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson y var. rayada
Tihuatlan	Chapolhuac	Isidora García Bartolo	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Cazones	Torno	Eugenia Guerra Reyes	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Papantla	Islas de Juan Rosas	Pedro Maya Monroy	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Papantla	Francisco I. Madero	Cirilo Santiago Vásquez	<i>V. planifolia</i> var. Amarilla y var. Verde
Papantla	Pueblillo	Melquiadez Escudillo Campos	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Tuxpan	Francisco I. Madero	Aurelio Maldonado Hernández	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson
Tuxpan	Francisco I. Madero	Bernardino Maldonado González	<i>V. planifolia</i> var. G. Jackson

En las plantaciones visitadas se observó que *Vanilla planifolia* var. G. Jackson, es la principalmente cultivada. Aunque también, se localizaron las siguientes variedades de *Vanilla planifolia*: Amarilla, Verde, Rayada, Oreja de Burro y la especie *Vanilla pompona*.

5.2 Plantaciones de vainilla en el estado de Oaxaca

En este estado, la zona recorrida en el año 2015 fue en la Región de la Chinantla. En la Tabla 5.2 se pueden apreciar los datos de las plantaciones identificadas en la región de la Chinantla, para la obtención de dichos datos se realizó la misma encuesta aplicada en el estado de Veracruz. Respecto al sistema de producción en Oaxaca todas las plantaciones a estudiar son de sistema Acahual y orgánicas, pudiéndose identificar una planta silvestre como la *Vanilla sp* (Figura 5.3) que presenta características particulares como surco en tallo, hoja y la *Vanilla pompona* var. Oreja de burro (Figura 5.4) ambas localizadas en Mazin Grande.

TABLA 5.2 Localización y marcación de diferentes Variedades de Vainilla en Oaxaca

MUNICIPIO	LOCALIDAD	GENERO ESPECIE Y VARIEDAD PROBABLE
Ojitlan	Mazin Grande	<i>Vanilla colibrí</i> , <i>Vanilla pompona</i> var. Oreja de burro, <i>Vanilla sp</i>
San Pedro Ixcatlán	Emiliano Zapata	<i>Vanilla planifolia</i> var. colibrí, var. G. Jackson
San Pedro Ixcatlán	Arroyo murciélago	<i>Vanilla planifolia</i> var. colibrí



FIGURA 5.3 *Vanilla sp.*



FIGURA 5.4 *Vanilla pompona* var. Oreja de Burro

Según Bautista-Santiago (2009) los sistemas tradicionales o acahuales del cultivo de la vainilla pueden ofrecer beneficios ecológicos como los servicios ambientales de biodiversidad y captura de aguacarbono, dichos sistemas agroforestales también pueden ser una alternativa viable para hacer más eficiente el sistema productivo de la vainilla, permitiendo mejorar su producción y calidad, favoreciendo su valor comercial. Esto constituye un incentivo para que los productores rurales recuperen áreas para el cultivo de la vainilla.

5.3 Polinización de flores marcadas de vainilla

La polinización de las flores en las plantas marcadas de Veracruz se llevó a cabo en el mes de Marzo del 2014 y en Oaxaca en Abril del 2015. Es importante mencionar que la floración durante este año en Oaxaca fue más tardía, que en años anteriores. En la Figura 5.5 se puede observar la polinización de las flores en las diversas plantas muestreadas.



FIGURA 5.5 Polinización manual de las flores

5.4 Análisis de ADN

Debido a la importancia del reconocimiento de la diversidad genética de la vainilla en México, para el análisis filogenético se estudiaron las hojas de los esquejes colectados en los estados de Veracruz y Oaxaca, también las hojas de 59 muestras pertenecientes al Banco Nacional de Germoplasma de Vainilla de la Red vainilla. Las muestras analizadas del banco de germoplasma corresponden a colectas realizadas en los estados de Chiapas, Puebla, Quintana Roo y Tabasco. También se analizaron 3 muestras de *Vanilla sp.* resguardadas en el CITRO (Centro de Investigaciones Tropicales) de la Universidad Veracruzana, ubicado en Xalapa, Ver.

En la Tabla 5.3, se presenta los datos del origen de las muestras estudiadas en el análisis genético para la resolución filogenética del género *Vanilla*. Siendo en total 136 muestras analizadas. Incluyendo material colectado, en resguardo en diferentes instituciones y bancos de conservación nacional e internacional. Las cuales provienen de 5 estados de México (Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Puebla, Quintana Roo), y 2 países (Costa Rica y Guatemala).

TABLA 5.3 Localización y codificación de las muestras utilizadas en el análisis genético

No.	Codigo	Especie probable	Condición	País de origen	Estado	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Depositada	Locus	Code in collection voucher
1	CR2522	<i>Sp</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 17' 48.99''	96° 57' 57.99''	10	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 28
2	CR2531	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 30' 23''	97° 4' 53''	20	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 02
3	CR2533	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 44' 826''	97° 24' 982''	145	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 09
4	CR2534	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 43' 734''	97° 27' 634''	125	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 10
5	CR2535	<i>planifolia</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 47' 58''	96° 23' 40''	760	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 11
6	CR2536	<i>Sp</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 8' 45.99''	96° 33' 51''	90	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 12
7	CR2539	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 53'	96° 31'	128	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 17
8	CR2540	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	17° 52' 58''	96° 18' 31''	608	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 18
9	CR2541	<i>insignis</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 48' 16.99''	96° 21' 1''	160	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 19
10	CR2542	<i>odorata</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 49' 31''	96° 31' 37''	280	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 20
11	CR2543	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 49' 31''	96° 31' 37''	280	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 21
12	CR2545	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 48' 16.99''	96° 21' 1''	160	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 23
13	CR2547	<i>ilatepusco</i> (tallo más grueso)	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 25

Resultados y discusión

14	CR2548	<i>ilatepusco</i> (tallo más delgado)	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 26
15	CR2549	<i>Sp</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 17' 48.99''	96° 57' 57.99''	10	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 28
16	CR2551	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 5'	96° 8'	20	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 30
17	CR2552	<i>planifolia</i>	silvestre	Costa Rica	Siquirres (Limón)	10.294	83.338		UNA	rbcL, PAL, ITS	UNA-VAN-00126
18	CR2553	<i>Sp</i>	silvestre	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	UNA	rbcL, PAL, ITS	UNA-VAN-00002
19	CR2554	<i>Sp</i>	silvestre	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	UNA	rbcL, PAL, ITS	UNA-VAN-00047
20	CR2555	<i>Sp</i>	silvestre	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	UNA	rbcL, PAL, ITS	UNA-VAN-00198
21	CR2556	<i>Sp</i>		Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	UNA	rbcL, PAL, ITS	-
22	CR2557	<i>Sp</i>	cultivada	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	UNA	rbcL, PAL, ITS	UNA-VAN-00216
23	CR2581	<i>pompona</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 31
24	CR2582	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 32
25	CR2586	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	SD	SD	SD	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 36
26	CR2587	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 8' 45.99''	96° 33' 51''	90	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 37
27	CR2588	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 27' 37''	97° 6' 30''	21	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 38

Resultados y discusión

28	CR2589	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 27' 37''	97° 6' 30''	21	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 39
29	CR2590	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 27' 37''	97° 6' 30''	21	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 40
30	CR2591	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 27' 37''	97° 6' 30''	21	ITTUX	rbcL, PAL, ITS	ITTUX 41
31	CR2592	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Chiapas	16° 18' 26.3''	90° 41' 59.4''	172	BUAP	rbcL, PAL, ITS	RedVan_001
32	CR2601	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 11' 13.9''	97° 23' 8.2''	213	BUAP	rbcL, PAL, ITS	RedVan_036
33	CR2616	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 28' 30.7''	96° 34' 32.9''	397	BUAP	rbcL, PAL, ITS	RedVan_081
34	CR2652	<i>mexicana</i>	silvestre	México	Veracruz	SD	SD	SD	CITRO	rbcL, PAL, ITS	CITRO_Misantla_M
35	CR2664	<i>planifolia</i>	plantas in vitro	México	Veracruz	plantas in vitro	plantas in vitro	plantas in vitro	in CITRO	rbcL, PAL, ITS	-
36	CR2666	<i>planifolia</i>	plantas in vitro	México	Veracruz	plantas in vitro	plantas in vitro	plantas in vitro	in CITRO	rbcL, PAL, ITS	-
37	CR2667	<i>planifolia</i>	plantas in vitro	México	Veracruz	plantas in vitro	plantas in vitro	plantas in vitro	in CITRO	rbcL, PAL, ITS	-
38	CR2668	<i>planifolia</i>	plantas in vitro	México	Veracruz	plantas in vitro	plantas in vitro	plantas in vitro	in CITRO	rbcL, PAL, ITS	-
39	CR2675	<i>Vanilla</i> sp (inodora complex)	SD	Guatemala	SD	SD	SD	SD	Orquideario_Archila	rbcL, PAL, ITS	VG-005
40	CR2677	<i>V. esquipulensis</i>	SD	Guatemala	SD	SD	SD	SD	Orquideario_Archila	rbcL, PAL, ITS	VG-007
41	CR2498	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 27' 37''	97° 6' 30''	21	ITTUX	rbcL	ITTUX 04

Resultados y discusión

42	CR2508	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 44' 954''	97° 31' 527''	98	ITTUX	rbcL	ITTUX 14
43	CR2518	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	ITS	ITTUX 24
44	CR2519	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	ITS	ITTUX 25
45	CR2520	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	ITS	ITTUX 26
46	CR2521	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	ITS	ITTUX 27
47	CR2523	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 8' 45.99''	96° 33' 51''	90	ITTUX	rbcL, ITS	ITTUX 29
48	CR2530	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 20' 288''	97° 12' 871''	42	ITTUX	rbcL, PAL	ITTUX 01
49	CR2532	<i>pompona</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 30' 23''	97° 4' 53''	20	ITTUX	ITS	ITTUX 08
50	CR2537	<i>pompona</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 51' 53''	96° 18' 46''	620	ITTUX	PAL, ITS	ITTUX 15
51	CR2538	<i>pompona</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	ITS	ITTUX 16
52	CR2544	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca				ITTUX	PAL, ITS	ITTUX 22
53	CR2546	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	PAL, ITS	ITTUX 24
54	CR2550	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Oaxaca	18° 8' 45.99''	96° 33' 51''	90	ITTUX	PAL, ITS	ITTUX 29d
55	CR2558	<i>Sp</i>	SD	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	UNA	PAL	-
56	CR2559	<i>Sp</i>	cultivada	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	Costa Rica	UNA	rbcL, ITS	-
57	CR2583	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	ITS	ITTUX 33
58	CR2584	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	58	ITTUX	ITS	ITTUX 34
59	CR2585	<i>Sp</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 53'	96° 31'	128	ITTUX	ITS	ITTUX 35
60	CR2593	<i>odorata</i>	cultivada	México	Quintana Roo	21° 10.31'	87° 23.28'	17	BUAP	ITS	RedVan_003
61	CR2594	<i>odorata</i>	cultivada	México	Quintana Roo	21° 11.51'	87° 23.1'	22	BUAP	ITS	RedVan_005

Resultados y discusión

62	CR2595	<i>odorata</i>	cultivada	México	Quintana Roo	21° 10.11'	87° 23.21'	16.7	BUAP	rbcL, PAL	RedVan_011
63	CR2597	<i>planifolia</i>	silvestre	México	Chiapas	16° 38' 45.3''	90° 66' 84.7''	139	BUAP	rbcL	RedVan_014
64	CR2599	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Puebla	20° 12' 5.3''	97° 21' 58.9''	125	BUAP	rbcL	RedVan_027
65	CR2600	<i>inodora</i>	cultivada	México	Puebla	20° 11' 52''	97° 22' 3.1''	204	BUAP	ITS	RedVan_031
66	CR2602	<i>insignis</i>	cultivada	México	Puebla	20° 11' 52''	97° 22' 3.1''	125	BUAP	rbcL, ITS	RedVan_038
67	CR2603	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Puebla	14° 52' 20.65''	92° 16' 10.97''		BUAP	rbcL, PAL	RedVan_041
68	CR2604	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Chiapas	16° 38' 45.3''	90° 66' 84.7''	139	BUAP	rbcL	RedVan_042
69	CR2605	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Chiapas	16° 44' 20.1''	90° 71' 36''	155	BUAP	rbcL, ITS	RedVan_044
70	CR2606	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Chiapas	16° 44' 20.1''	90° 80' 46.6''	155	BUAP	rbcL	RedVan_046
71	CR2607	<i>insignis</i>	cultivada	México	Chiapas	18° 53' 6.24''	88° 51' 42.07''	107	BUAP	rbcL	RedVan_051
72	CR2608	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Chiapas	18° 44' 26.05''	89° 9' 3.55''	144	BUAP	rbcL, ITS	RedVan_056
73	CR2609	<i>insignis</i>	cultivada	México	Quintana Roo	21° 4' 49.75''	87° 5' 34.01''	13	BUAP	rbcL	RedVan_062
74	CR2610	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Quintana Roo	18° 52' 12''	88° 50' 43.39''	81	BUAP	rbcL	RedVan_065
75	CR2611	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Quintana Roo	18° 52' 12.2''	88° 50' 42.88''	71	BUAP	rbcL	RedVan_071
76	CR2613	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Puebla	20° 11' 52''	97° 22' 3.1''	213	BUAP	rbcL	RedVan_074
77	CR2615	<i>insignis</i>	cultivada	México	Puebla	17° 49' 52.7''	96° 19' 7.6''	850	BUAP	rbcL	RedVan_077
78	CR2617	<i>insignis</i>	cultivada	México	Puebla	20° 11' 52''	97° 22' 3.1''	213	BUAP	rbcL	RedVan_087
79	CR2618	<i>insignis</i>	cultivada	México	Quintana Roo	21° 4' 49.72''	87° 5' 34.46''	15	BUAP	rbcL	RedVan_089

Resultados y discusión

80	CR2619	<i>odorata</i>	cultivada	México	Quintana Roo	21° 9.14'	87° 23.29'	15.5	BUAP	rbcL	RedVan_095
81	CR2620	<i>odorata</i>	cultivada	México	Chiapas	16° 18' 40.6''	90° 45' 54.3''	134	BUAP	rbcL	RedVan_096
82	CR2621	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Chiapas	16° 19' 56.2''	90° 45' 56.5''	146	BUAP	rbcL	RedVan_098
83	CR2622	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Chiapas	17° 28' 34.4''	93° 3' 30.6''	190	BUAP	rbcL	RedVan_099
84	CR2623	<i>odorata</i>	cultivada	México	Quintana Roo	21° 10.14'	87° 23.35'	36	BUAP	rbcL	RedVan_106
85	CR2625	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 36' 52.1''	97° 36' 43.3''	72	BUAP	rbcL, ITS	RedVan_111
86	CR2627	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Puebla	20° 5' 48.7''	97° 23' 13.2''	211	BUAP	rbcL	RedVan_116
87	CR2630	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 36' 52.1''	97° 36' 43.3''	72	BUAP	rbcL	RedVan_124
88	CR2632	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	8° 47' 5.43''	5° 42' 59.76''	62.5	BUAP	rbcL, ITS	RedVan_128
89	CR2633	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	SD	SD	SD	BUAP	rbcL	RedVan_128-1
90	CR2634	<i>pompona</i>	silvestre	México	Veracruz	21° 2' 4.06''	1° 30' 35.95''	62	BUAP	rbcL	RedVan_129
91	CR2635	<i>pompona</i>	silvestre	México	Veracruz	21° 1' 58.9''	1° 30' 37.6''	68	BUAP	rbcL, PAL	RedVan_134
92	CR2636	<i>planifolia</i>	cultivada	México	Veracruz	20° 12' 55.9''	51' 45.78''	6	BUAP	rbcL	RedVan_137
93	CR2637	<i>insignis</i>	cultivada	México	Quintana Roo	18° 0' 24.98''	88° 50' 51.93''	21	BUAP	rbcL	RedVan_139
94	CR2638	<i>odorata</i>	cultivada	México	Quintana Roo	18° 0' 18.28''	88° 50' 45.81''	21	BUAP	rbcL	RedVan_141
95	CR2639	<i>insignis</i>	cultivada	México	Puebla	8° 46' 35.44''	89° 43' 21.52''	210	BUAP	rbcL	RedVan_144
96	CR2640	<i>odorata</i>	SD	México	SD	SD	SD	SD	BUAP	rbcL	RedVan_154
97	CR2641	<i>planifolia</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 25' 25.36''	96° 13' 30.09''	722	BUAP	rbcL	RedVan_171

Resultados y discusión

98	CR2642	<i>planifolia</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 26' 13.75''	96° 14' 47.25''	764	BUAP	rbcL	RedVan_172
99	CR2643	<i>planifolia</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 25' 35.24''	96° 14' 26.24''	598	BUAP	rbcL	RedVan_174
100	CR2644	<i>planifolia</i>	semidomesti cada	México	Veracruz	19° 58' 24.25''	96° 52' 43.18''	102	BUAP	rbcL	RedVan_176
101	CR2645	<i>planifolia</i>	silvestre	México	Oaxaca	17° 25' 40.26''	96° 14' 47.4''	919	BUAP	rbcL, ITS	RedVan_180
102	CR2647	<i>odorata</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	56	BUAP	rbcL	RedVanA-2
103	CR2648	<i>planifolia</i>	silvestre	México	Oaxaca	18° 5' 54.96''	96° 15' 12.5''	56	BUAP	rbcL	RedVanA-3
104	CR2650	<i>planifolia</i>	-	México	SD	SD	SD	SD	BUAP	rbcL, ITS	RedVan_MUT
105	CR2663	<i>planifolia</i>	plantas in vitro	México	Veracruz	plantas in vitro	plantas in vitro	plantas in vitro	in CITRO	ITS	-
106	CR2665	<i>planifolia</i>	plantas in vitro	México	Veracruz	plantas in vitro	plantas in vitro	plantas in vitro	in CITRO	ITS	-
107	CR2669	<i>planifolia</i>	plantas in vitro	México	Veracruz	plantas in vitro	plantas in vitro	plantas in vitro	in CITRO	PAL, ITS	-
108	CR2670	<i>planifolia</i>	plantas in vitro	México	Veracruz	plantas in vitro	plantas in vitro	plantas in vitro	in CITRO	PAL, ITS	-
109	CR2671	<i>V. odorata</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario_Archila	rbcL, PAL	VG-001
110	CR2672	<i>V. insignis</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario_Archila	PAL, ITS	VG-002
111	CR2673	<i>V. pompona</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario_Archila	PAL, ITS	VG-003
112	CR2674	<i>Vanilla</i> sp. nov.	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario_Archila	PAL, ITS	VG-004

Resultados y discusión

113	CR2676	<i>Vanilla sp. nov.</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario Archila	PAL, ITS	VG-006
114	CR2678	<i>V. aff. planifolia</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario Archila	PAL	VG-008
115	CR2679	<i>Vanilla sp.</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario Archila	PAL, ITS	VG-009
116	CR2680	<i>V. aff. planifolia</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario Archila	PAL, ITS	VG-010
117	CR2681	<i>V. aff. planifolia</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario Archila	PAL, ITS	VG-011
118	CR2682	<i>Vanilla sp. nov.</i>	-	Guatemala	-	SD	SD	SD	Orquideario Archila	PAL, ITS	VG-012
119	Inodora	<i>V. sp.</i>	-	SD	-	SD	SD	SD	UNAM: Instituto De Biología	ITS	Ibarra_PI_922
120	Palmarum	<i>palmarum</i>	-	SD	-	SD	SD	SD	UNAM: Instituto De Biología	ITS	palmarum
121	Dilloniana	<i>dilloniana</i>	-	SD	-	SD	SD	SD	UNAM: Instituto De Biología	ITS	dilloniana
122	azul_byrdIA5	<i>sp.</i>	-	SD	-	SD	SD	SD	UNAM: Instituto	ITS	azul_byrdIA5

Resultados y discusión

123	bicolor_Ackermansn	<i>sp.</i>	-	SD	-	SD	SD	SD	De Biología	UNAM: Instituto	ITS	bicolor_Ackermansn
124	cribbiana_MAS7940	<i>cribbiana</i>	-	México	Chiapas	16°08'	90°53'	200	De Biología	UNAM: Instituto	ITS	cribbiana_MAS7940
125	dressleri_byrdD3	<i>V. dressleri</i>	-	Costa Rica	Punta Arenas, Cañaza, F. Don Andrés	SD	SD	SD	De Biología (AMO)	UNAM: Instituto de Biología	ITS	dressleri_byrdD3
126	dressleri_byrdIC2	<i>V. dressleri</i>	-	Costa Rica	San José, Rio Blanco, Pie de la Tijerilla	SD	SD	SD	De Biología	UNAM: Instituto de Biología	ITS	dressleri_byrdIC2
127	hartii_GASC8713	<i>V. hartii</i>	-	México	Chiapas	16.113	-90.94501	164m	De Biología	UNAM: Instituto		hartii_GASC8713
128	cf.hartii_MAS_SalasSavejre	<i>cf. hartii</i>	-	SD	SD	SD	SD	SD	De Biología	UNAM: Instituto		cf.hartii_MAS_SalasSavejre

Resultados y discusión

									De Biología	
129	hartii_G ASC8347	<i>hartii</i>	-	SD	SD	SD	SD	SD	UNAM: Instituto	hartii_GASC834 7
									De Biología	
130	insignis_ GASC861 7	<i>insignis</i>	-	México	Chiapas	SD	SD	SD	UNAM: Instituto	insignis_GASC8 617
									De Biología	
131	insignis_ GASC873 6	<i>insignis</i>	-	México	Chiapas	16.12352	-90.94368	159m	UNAM: Instituto	insignis_GASC8 736
									De Biología	
132	odorata_ GASC877 7	<i>odorata</i>	-	México	Chiapas	16.30871	-90.87566	146m	UNAM: Instituto	odorata_GASC8 777
									De Biología	
133	odorata_ MAS8501	<i>odorata</i>	-	México	Oaxaca	SD	SD	250m	UNAM: Instituto	odorata_MAS85 01
									De Biología	
134	aff._phae antha_E HII883	<i>phaeantha</i>	-	SD	SD	SD	SD	SD	UNAM: Instituto	aff._phaeantha_ EHII883
									De Biología	

Resultados y discusión

135	phaeantha_ByrdA1	<i>phaeantha</i>	-	SD	SD	SD	SD	SD	UNAM: Instituto De Biología	phaeantha_ByrdA1
135	cf._planifolia	<i>cf. planifolia</i>	-	SD	SD	SD	SD	SD	UNAM: Instituto De Biología	cf._planifolia
136	planifolia_cv_Acamaya_MAS	<i>planifolia</i>	-	SD	SD	SD	SD	SD	UNAM: Instituto De Biología	planifolia_cv_Acamaya_MAS

5.5 Amplificación por PCR de fragmentos ITS, PAL y rbcL

Utilizando los marcadores nucleares ITS y PAL se obtuvieron fragmentos amplificados por PCR para las muestras analizadas, sus tamaños varían de 800 a 900 pb para ITS y de 700 a 800 pb para PAL, en las figuras 5.6 y 5.7 se pueden observar algunos de los fragmentos amplificados, los cuales corresponden a las accesiones que se presentan en las tablas 5.4 y 5.5.

TABLA 5.4 Muestras amplificadas por PCR utilizando el primer ITS

Columnas			
1	2	3	4
CR2646	CR2532	CR2542	CR2550
CR2518	CR2533	CR2543	CR2551
CR2519	CR2534	CR2544	CR2552
CR2520	CR2536	CR2545	CR2553
CR2521	CR2537	CR2546	
CR2522	CR2538	CR2547	
CR2523	CR2539	CR2548	
CR2531	CR2540	CR2549	

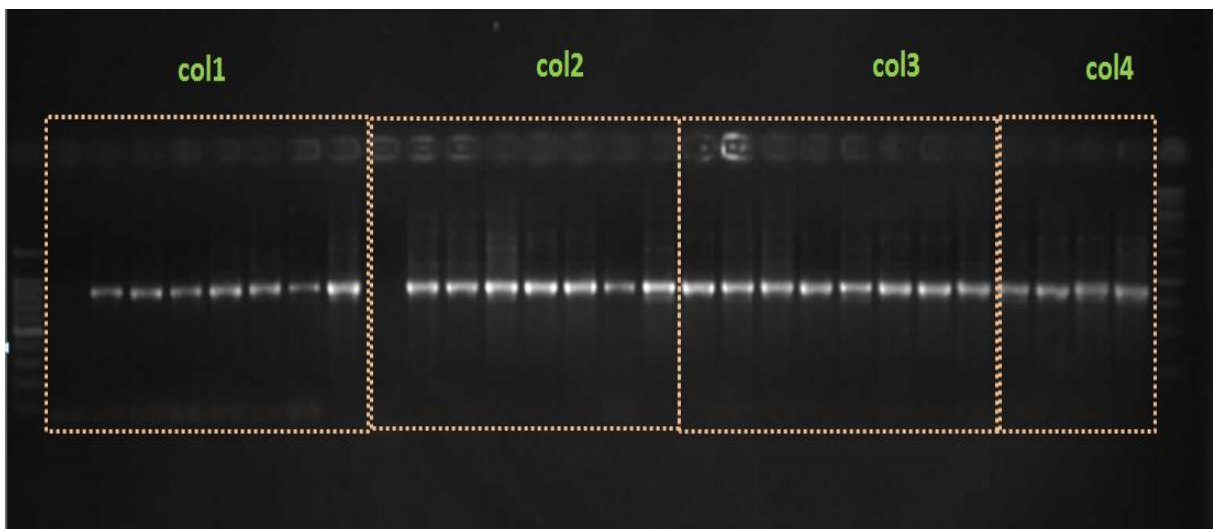
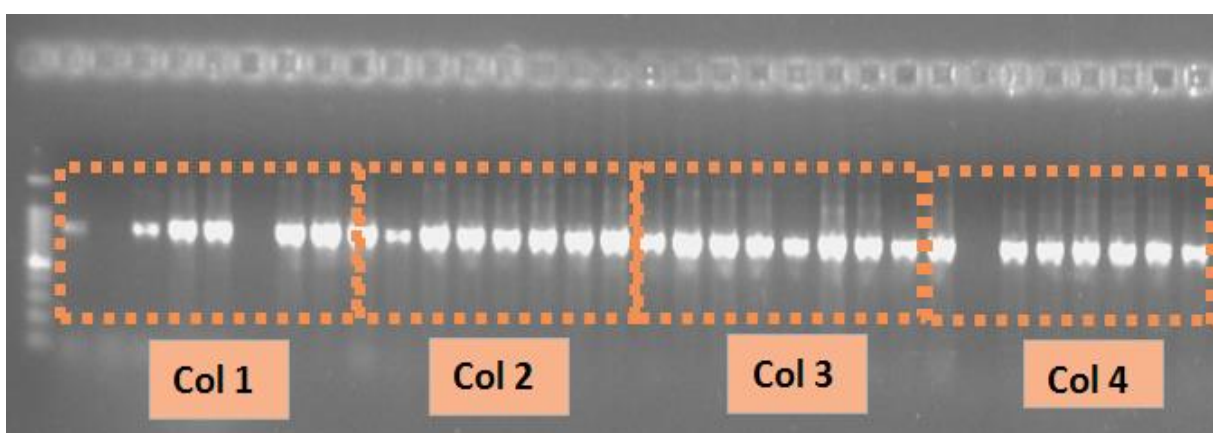


FIGURA 5.6 Fragmentos de ITS amplificados

TABLA 5.5 Muestras amplificadas por PCR utilizando el primer PAL

Columnas			
1	2	3	4
CR2498	CR2538	CR2551	CR2582
CR2508	CR2539	CR2552	CR2585
CR2522	CR2542	CR2553	CR2586
CR2530	CR2543	CR2554	CR2587
CR2531	CR2544	CR2555	CR2588
CR2532	CR2546	CR2556	CR2589
CR2535	CR2548	CR2559	CR2590
CR2537	CR2550	CR2581	CR2591

**FIGURA 5.7** Fragmentos de PAL amplificados

Mediante el uso de dos fragmentos de marcadores cloroplásticos (*rbcL*), éstos fueron amplificados por PCR. Los tamaños varían de 700 a 800 pb como se puede apreciar en las figuras 5.8 y 5.9, estos tamaños se encuentran dentro de lo reportado por Bouetard *et al.*, 2010. Los fragmentos amplificados corresponden a las accesiones que se presentan en la tabla 5.6.

TABLA 5.6 Muestras amplificadas por PCR utilizando el primer *rbcl*

Columnas				
1	2	3	4	5
CR2498	CR2542	CR2556	CR2589	CR2597
CR2508	CR2543	CR2559	CR2590	CR2598
CR2522	CR2548	CR2581	CR2591	CR2599
CR2530	CR2551	CR2582	CR2592	CR2600
CR2531	CR2552	CR2585	CR2593	CR2601
CR2532	CR2553	CR2586	CR2594	CR2603
CR2535	CR2554	CR2587	CR2595	CR2604
CR2539	CR2555	CR2588	CR2596	CR2605

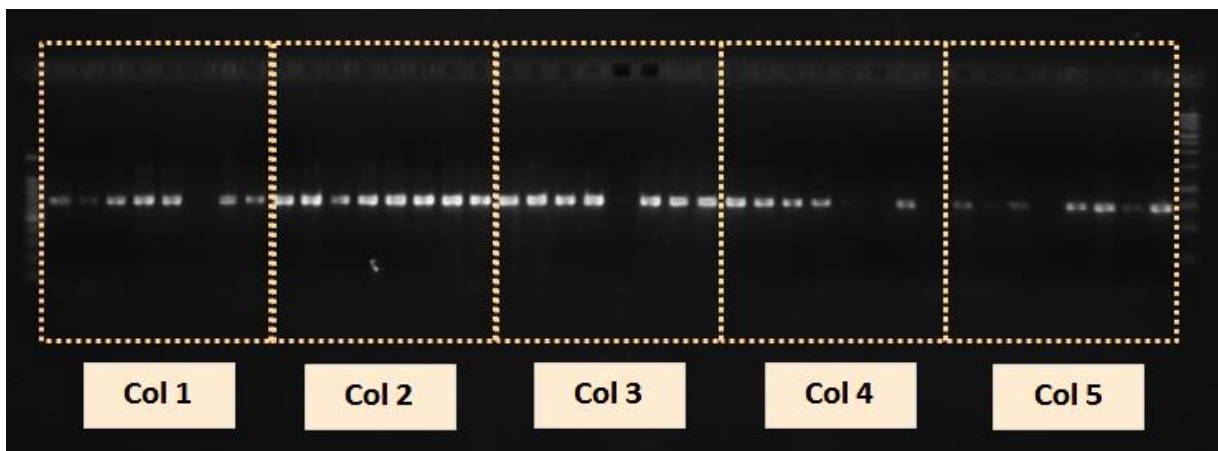


FIGURA 5.8 Fragmentos de *rbcl* (33L-730R) amplificados

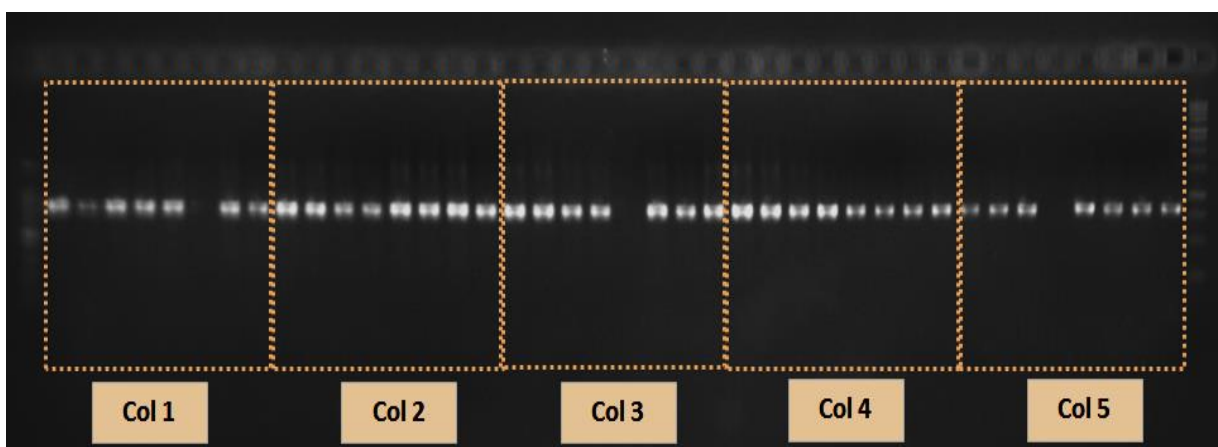


FIGURA 5.9 Fragmentos de *rbcl* (453L-1231R) amplificados

5.6 Análisis filogenético de las secuencias

Con la finalidad de identificar la especie a la que probablemente pertenecen las muestras analizadas, se realizó un análisis filogenético alineando las secuencias obtenidas para ITS, PAL y rbcL, para cada alineamiento se consideraron secuencias reportadas en Genbank y secuencias del banco de germoplasma de vainilla de la Isla Réunion, Francia, con una identidad bien establecida y confirmada.

Las secuencias de nucleótidos fueron verificadas mediante la comparación de los electroforegramas obtenidos a partir de cada marcador, utilizando el software Bioedit. Cada base ambigua fue comprobada y corregida manualmente para garantizar la coherencia entre las dos cadenas. Las secuencias resultantes se alinearon inicialmente con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), incorporado en el software Bioedit, y se ajustaron manualmente en caso necesario. La reconstrucción filogenética fue realizada usando el software MEGA6, el método utilizado fue Neighbor-Joining con Bootstrapping de 500 réplicas.

En las figuras 5.10, 5.11 y 5.12 se presentan los árboles y los detalles de la reconstrucción filogenética, para cada uno de los primers utilizados.

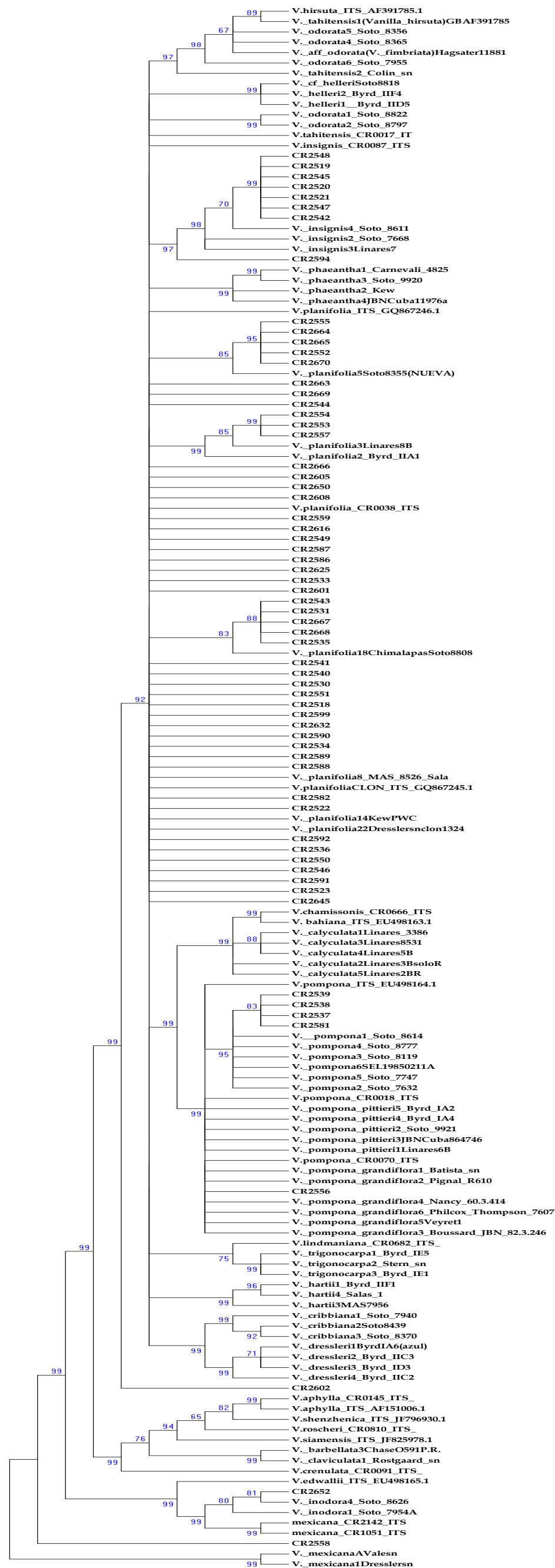


FIGURA 5.10 Relación filogenética entre las muestras determinadas, utilizando el primer ITS, con la reconstrucción Neighbor-Joining, usando p-distance con 500 réplicas para obtener valores de Bootstrap. Los árboles mostrados corresponden al árbol consenso cuyas ramas aparecen al menos en 65% de las réplicas.

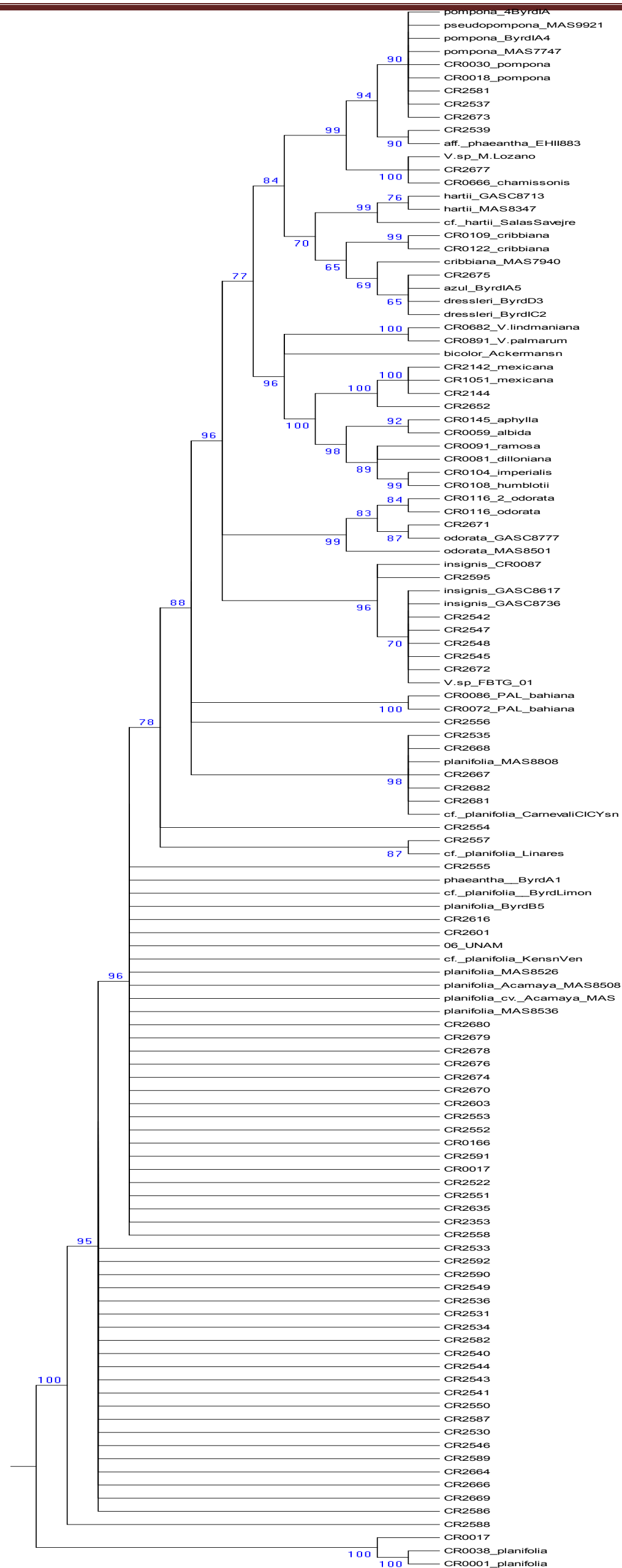


FIGURA 5.11 Relación filogenética entre las muestras determinadas, utilizando el primer **PAL**, con la reconstrucción Neighbor-Joining, usando p-distance con 500 réplicas para obtener valores de Bootstrap. Los árboles mostrados corresponden al árbol consenso cuyas ramas aparecen al menos en 65% de las réplicas.

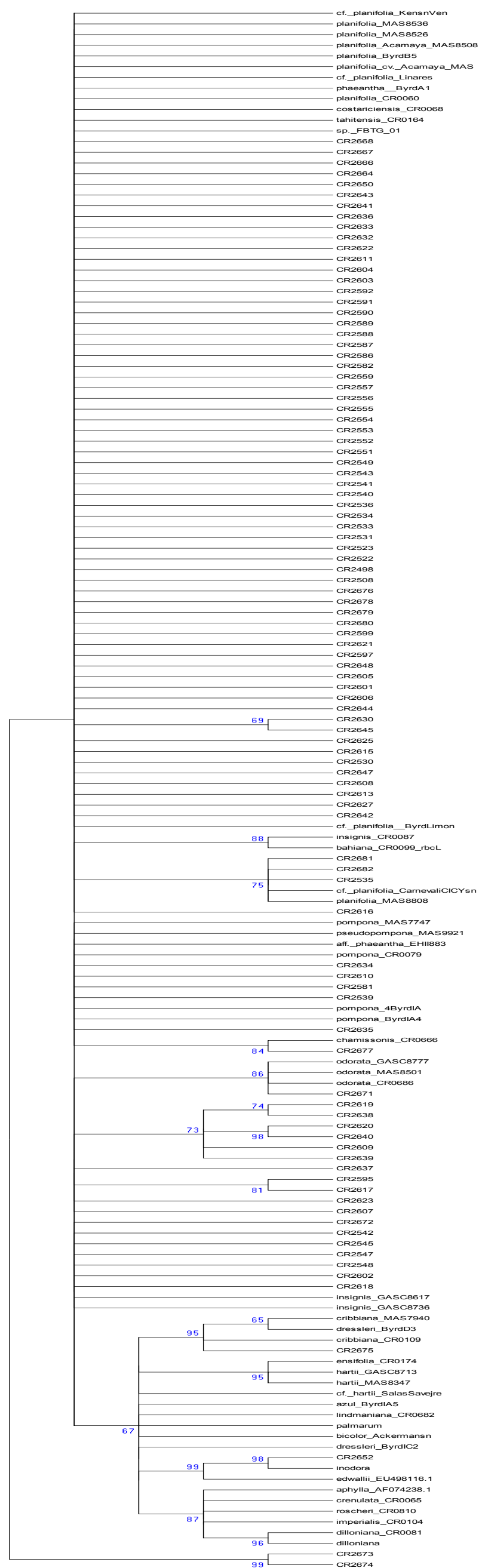


FIGURA 5.12 Relación filogenética entre las muestras determinadas, utilizando el primer *rbcL*, con la reconstrucción Neighbor-Joining, usando p-distance con 500 réplicas para obtener valores de Bootstrap. Los árboles mostrados corresponden al árbol consenso cuyas ramas aparecen al menos en 65% de las réplicas.

Gracias a los resultados obtenidos mediante el uso de los tres marcadores moleculares se identificó en México, en el estado de Oaxaca una mayor diversidad de especies, como ha sido reportado en la literatura (Soto-Arenas 1999, 2003; Schlüter et al., 2007; Bory et al, 2007). Soto-Arenas (1999) mencionó que la mayor parte de la variación genética se encontraba en las comunidades indígenas, especialmente en la zona Mazateca y Chinanteca de Oaxaca y en segundo lugar entre las plantaciones del norte de Veracruz.

En el árbol filogenético por ITS (Figura 5.10) se puede apreciar la existencia de clados bien soportados que permiten identificar las siguientes especies: *V. odorata*, *V. helleri*, *V. insignis*, *V. phaeantha*, *V. planifolia*, *V. calyculata*, *V. pompona*, *V. hartii*, *V. cribbiana* y *V. mexicana*. Sin embargo, en la actualidad en México de *V. phaeantha*, *V. helleri*, *V. calyculata* y *V. cribbiana* no se han encontrado especímenes silvestres en las últimas colectas realizadas y en las zonas donde previamente Soto-Arenas había reportado su existencia.

Resulta interesante la información obtenida en el grupo de *V. odorata* por ITS, donde se puede apreciar que la *V. xtahitensis* se encuentra dentro del mismo clado coincidiendo con lo reportado por Lubinsky et al. (2008b). Con ella también se encuentran agrupados algunos especímenes de Chiapas, Guatemala y Francia. Presentando una marcada separación entre el clado, fuertemente apoyado por su porcentaje de bootstrap de los especímenes procedentes de Oaxaca (Figura 5.10). Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por Soto-Arenas (2009) y soportando su hipótesis de que el ancestro parental de *V. xtahitensis* proviene de una región del este o sur del Istmo de Tehuantepec.

Resultados similares se observaron en el árbol filogenético para PAL (Figura 5.11) en el clado de *V. odorata*, en donde también se presentó una separación interna dependiendo del origen de la muestra. Observándose como origen del grupo a la accesión *odorataMAS_8501* proveniente de Oaxaca y en los clados internos: uno con las accesiones de Guatemala y Chiapas y en el otro las de la Guyana Francesa. Por lo que es importante resaltar la diferencia que existe entre las accesiones de *V. odorata* procedentes de esta región de Oaxaca y la proveniente de otros sitios. Diversas

investigaciones respecto al origen de *V. xtahitensis* sugieren que esta especie es el resultado de la hibridación entre *V. planifolia* y *V. odorata* (Besse et al., 2004; Duval et al., 2006; Bory et al., 2007,2008; Lubinsky et al., 2008). Los resultados obtenidos en este estudio pueden confirmarlo. El aroma único que presenta *V. xtahitensis* es consecuencia de la composición de los precursores glucosídicos presentes (Brunschwig et al., 2012), los cuales pueden ser resultado de la expresión de sus genes (Fock-Bastide et al., 2014).

La especie *V. odorata* es después de *V. planifolia* la especie con frutos más fragantes, pero a diferencia de esta última, presenta mayor tolerancia a el cambio de condiciones que conlleva la sucesión. Soto Arenas (1999) mencionó que visitó plantaciones tradicionales a partir de acahuales jóvenes en sus recorridos por la zona norte de Oaxaca, que incluían individuos de *V. odorata* y *V. planifolia*. En estas plantaciones *V. odorata* mostró una mayor resistencia a condiciones adversas de sequía, alta insolación, sombra excesiva, así como un menor ataque de la chinche roja (*Tentecoris confusus*) y del gusano peludo (*P. aurífera*) (Soto-Arenas, 1999). Soto-Arenas (2009) reportó que los nombres comunes de esta especie son: 'vainilla', 'vainilla de Teutila', 'lombricera' y 'vainilla Tlatepusco'. En base a esta referencia se realizó una excursión en Tlatepusco, Oaxaca, lográndose la colecta de hojas (CR2542), esquejes y flores que presentaron características morfológicas similares a la *V. odorata* reportada por Soto-Arenas y Dressler (2010). Sin embargo, después de obtener los resultados moleculares por ITS y PAL de la muestra recolectada en este sitio (CR2542), se observó en el árbol filogenético por ITS que ésta se encuentra en un clado fuertemente apoyado por porcentajes de bootstrap dentro del grupo de *V. insignis* (Figura 5.10). Con accesiones de especímenes silvestres provenientes de la zona norte del estado de Oaxaca, separada claramente de los especímenes de *V. odorata* recolectados por Soto-Arenas en Guatemala y Campeche.

Otra accesión que se encuentra dentro de este grupo *V. insignis* es la CR2594 (Red_Van_005) perteneciente al Banco Nacional de Germoplasma de México recolectada en Quintana Roo. La cual se consideraba por sus características morfológicas como *V. odorata*. Diferentes especímenes pertenecientes también a este banco de germoplasma

se pueden observar en el árbol filogenético para *rbcl* (Figura 5.12) formando un clado que incluye muestras consideradas morfológicamente como *V. odorata* (CR2619, CR2638, CR2620 Y CR2640) de Quintana Roo y Chiapas, y de *V. insignis* (CR2609, CR2639) de Puebla. Uno de los argumentos de Soto-Arenas (2009) es que la gran variación morfológica y genética de *V. odorata* podría deberse a la hibridación espontánea entre las especies debido a la polinización natural de las flores.

Aunque no de todas las accesiones estudiadas se pudo cotar con frutos, si se obtuvieron algunos, como es el caso de la accesión de origen silvestre (CR2542). Sus frutos no presentan acanaladuras características en los frutos de *V. insignis* (CR2584), accesión también de origen silvestre (Figura 5.3). Otra de las diferencias identificadas en los frutos recolectados y beneficiados de la esta accesión (CR2542), fue su perfil aromático. Pérez-Silva (2015) reportó altas concentraciones de vainillina (7%) y notas frutales y florales en los frutos beneficiados. Por otro lado, Soto-Arenas (2009) y Lubinsky (2008) los describen a sus frutos de *V. insignis* como fragantes, sin dar más especificaciones.

En el género *Vanilla* se han reportado frutos aromáticos de 35 especies, incluyendo: *V. appendiculata* Rolfe, *V. bicolor*, *V. calyculata*, Schltr., *V. chamissonis* Klotzsch, *V. cribbiana* Soto Arenas, *V. dressleri* Soto Arenas, *V. fimbriata* Rolfe, *V. gardneri* Rolfe, *V. hostmannii* Rolfe, *V. insignis*, *V. odorata* Presl, *V. palmarum*, *V. phaeantha* Rchb.f., *V. ruiziana* Klotzsch, *V. trigonocarpa* and *V. vellozii* Rolfe (Soto-Arenas, 2003). Dentro de las cuales, las especies más interesantes para programas de cruza son: *V. phaeantha*, *V. insignis*, *V. odorata* y *V. pompona* (Soto Arenas, 2009).

V. phaeantha es más resistente al ataque de *Fusarium oxysporum* que *V. planifolia* y ambas están cercanamente relacionadas, puede desarrollarse en sitios más secos y en suelos estacionalmente inundados (Soto Arenas, 1999). Analizando los árboles filogenéticos se puede observar que para ITS ninguno de los especímenes recolectados recientemente se encuentra dentro del clado de *V. phaeantha*, este grupo está conformado solo por las muestras recolectadas por Soto-Arenas. Sin embargo, en el árbol

filogenético para PAL se puede observar que una accesión la CR2539 quedó en un clado bien soportado con altos niveles de bootstrap con una secuencia de referencia aff. *V. phaeantha_EH1883* (Figura 5.11). Pero para ITS, la accesión CR2539 este clado está más cercano al grupo de *V. pompona*, proveniente de especímenes silvestres del norte de Oaxaca. *V. pompona* es la especie más resistente a los principales patógenos, pero las vainas presentan una calidad inferior por el contenido de vainillina (Soto-Arenas, 1999). Sin embargo, Maruenda *et al.*, (2013) mencionaron que frutos de parientes silvestres de *V. pompona var. grandiflora* de Perú, presentan altos contenidos de vainillina (5.7/100 g) y otros compuestos de importancia química, lo cual evidencia la importancia de ese germoplasma para el mejoramiento de cultivares de *Vanilla* en el mundo. Estas diferencias en los contenidos de vainillina entre las especies de *V. pompona* es debido a la diferencia de variedades.

Otro de los clados que se presentan en los árboles filogenéticos para ITS y PAL fue el formado por *V. hartii* de especímenes recolectados en Costa Rica y Chiapas, en ITS se consideraron las secuencias de los especímenes reportados por Soto-Arenas (2009) y para PAL se consideraron muestras recientemente recolectadas por la UNAM en Chiapas (MAS8347; GASC8713). Soto-Arenas (2009) describió que *Vanilla hartii* crece en la selva alta perennifolia y sabanas arboladas, hemiepipíta, generalmente creciendo en sombra densa en arbolitos del sotobosque, a una altura de 100-200 m en México y de 20-1000 m en otros países, su floración es entre los meses de Enero a Abril. Sin embargo, en México se reportó que ha sido vista muy esporádicamente y sólo se han localizado flores en dos ocasiones, en las primaveras de 2000 y 2002. Ha sido muy confundida con *V. planifolia* y *V. odorata*, ambas especies con el ápice del labelo conspicuamente papiloso y flores verdosas, más grandes. Las hojas elípticas, más cortas que los entrenudos y los tallos muy delgados recuerdan a *V. bicolor* Lindl. Sin embargo, *V. bicolor* tiene flores mayores con tépalos bronceados y labelo amarillo, agudo a subacuminado e inflorescencias más gruesas y alargadas. Las plantas del N y W de Costa Rica tienen hojas y flores mayores de lo común (Soto-Arenas, 2009).

Se continúa observando una diversidad fenotípica interesante, lo que puede explicarse por la acumulación de mutaciones somáticas, por la posibilidad de germinación de la semilla natural en el caso de la reproducción sexual ó también por cambios en el nivel de ploidía que puede ser encontrado en las especies de vainilla cultivadas. Sin embargo, debido a la homogeneidad de variedades, el cultivo de vainilla es particularmente vulnerable a los peligros ambientales, como la destrucción de sus hábitats naturales, el cambio climático y la aparición de plagas en las plantas (Roux-Cuvelier y Grisoni, 2010).

Varias especies del acervo genético mexicano y centroamericano están cercanamente emparentadas con las dos especies de mayor cultivo en la zona: *V. planifolia* y *V. pompona*; lo cual representa un importante germoplasma para el cultivo (Soto-Arenas y Dressler, 2010).

Actualmente se puede constatar que las poblaciones silvestres de *V. planifolia* han disminuido o incluso desaparecido a lo largo de gran parte de su área de distribución, principalmente en aquellos estados de nuestro país donde se intensificó su cultivo y/o en donde el hábitat está afectado o ha desaparecido por la producción de cultivos como los cañaverales o el establecimiento de pozos petroleros tal como ocurre en la zona del Totonacapan, por lo que es fundamental llevar a cabo planes de manejo y conservación que promuevan su diversidad genética.

Ramos-Castella *et al.* (2016) y Villanueva-Viramontes *et al.* (2017) utilizaron los marcadores moleculares de Inter-Secuencias Simples Repetitivas (ISSR) para la discriminación de individuos silvestres de *Vanilla planifolia* en Veracruz y la Península de Yucatán respectivamente. Estos autores detectaron una estructura genética al interior de la especie permitiendo la diferenciación de las otras especies silvestres consideradas en sus estudios como *V. pompona*, *V. insignis*, *V. odorata*. En las colectas que realizaron Villanueva-Viramontes *et al.*, (2017) encontraron al parecer una nueva especie de *Vanilla* en la Península de Yucatán, México con características morfológicas similares a *V. phaeantha*.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo para el grupo de *V. planifolia* y a los dos mencionados anteriormente en México, coinciden con lo mencionado por Bory *et al.*

(2008) en la importancia de conservar el acervo genético secundario de *V. planifolia*, pues este constituye una importante fuente de caracteres de importancia para el fitomejoramiento.

Soto-Arenas (2009), en sus recorridos en las plantaciones de vainillas oaxaqueñas silvestres reportó que los productores cultivaban una mezcla de *V. cribbiana* Soto Arenas, *V. insignis* Ames, *V. odorata* C. Presl. y *V. pompona*, junto con *V. planifolia*. Esto lo hacía por desconocimiento, solo reproducían lo que encontraban en su entorno. Esta situación ha cambiado ya que actualmente es difícil encontrar en las plantaciones con diversas especies, debido a que solo se han dedicado al cultivo de la *V. planifolia* comercial, a la que ellos nombran *V. colibrí*. Por lo que es crucial crear en ellos conciencia de la importancia que tiene el conservar su acervo genético, para contribuir con el resguardo, conservación y aprovechamiento de las especies silvestres del género *Vanilla*.

5.7 ANÁLISIS DEL POTENCIAL AROMÁTICO EN VAINAS VERDES

Investigaciones anteriores en vainas verdes se han enfocado al estudio del potencial aromático durante el desarrollo del fruto, solo mencionando que se cosecharon maduras en función de sus características físicas como el color o se compraron en el mercado de alguna localidad (Ranadive *et al.*, 1983; Sagrero-Nieves y Schwartz, 1988; Kanisawa *et al.*, 1994; Brodelius, 1994; Palama *et al.*, 2009) pero hasta el momento no se han encontrado reportes donde se mencione el potencial aromático de las vainas de vainilla donde incluyan diferentes sistemas de cultivos, de diferentes localidades y con un periodo de madurez conocido, como en este trabajo.

En estudios realizados en la vainilla se ha reportado que después de la semana 30 la vaina alcanza una concentración de glucovainillina que representa aproximadamente el 15% de su masa seca, es por eso que se le considera como el glucósido más importante en términos de cantidad y calidad (Odoux *et al.*, 2006). Por su parte, Palama *et al.*, (2009) reportaron que además de la glucovainillina, otros glucósidos también aumentan su concentración de acuerdo a la madurez de las vainas, alcanzando su mayor concentración después de los 8 meses de la polinización de las flores. En el presente estudio, las vainas verdes analizadas fueron cosechadas a las 32 semanas después de su polinización y cultivadas en diversos sistemas de producción.

5.7.1 Cuantificación de vainillina libre y ligada

Es importante mencionar que hubo plantaciones en las que se realizó la polinización manual de las flores y finalmente no se pudo obtener el fruto a las 32 semanas de madurez debido a su robo semanas antes o a que el productor decidió vender sus vainas, sin tener en cuenta el acuerdo previo con el desarrollo de esta investigación. Las plantaciones estudiadas en el Estado de Veracruz de las cuales se logró recuperar el fruto corresponden a los Municipios de: Gutiérrez Zamora (6 plantaciones), Tihuatlán (3 plantaciones), Cazonas (1 plantación), Papantla (1 plantación) y Tuxpan (1 plantación)

como se describen la Tabla 5.7, con diferentes tipos y condiciones de de cultivo como son Malla Sombra o Cielo abierto y 3 de ellas se caracterizan por ser orgánicas.

En la Tabla 5.7 se puede apreciar la localización y tipo de cultivo sobre el potencial de vainillina a las 32 semanas de madurez del fruto en Veracruz de la cosecha 2014 y en Oaxaca de la cosecha 2015, respectivamente. El potencial de vainillina en la vaina verde representa la suma de la concentración de la vainillina libre y la vainillina ligada (glucosilada).

TABLA 5.7 Potencial de vainillina a las 32 semanas de madurez del fruto

		Plantación	Vainillina g/100 g m.s.			Sistema de cultivo
			Libre	Ligada	Potencial	
Veracruz						
Gutierrez Zamora	El Ojite (Malla 1)	GZ 1	0.537 ± 0.199 ^d	4.806 ± 0.245 ^{efg}	5.343 ± 0.287 ^f	Malla sombra
Gutierrez Zamora	Mario Hernández Posadas 1	GZ 2	0.754 ± 0.025 ^{cd}	7.261 ± 0.503 ^{bc}	8.015 ± 0.527 ^c	Cielo abierto
Gutierrez Zamora	Mario Hernández Posadas 2	GZ 3	2.113 ± 0.216 ^a	4.062 ± 0.071 ^g	6.175 ± 0.286 ^e	Cielo abierto
Gutierrez Zamora	El Ojite (Tabla 5)	GZ 4	0.580 ± 0.035 ^d	4.811 ± 0.307 ^{efg}	5.391 ± 0.317 ^f	Cielo abierto
Gutierrez Zamora	El Ojite (Toronjo)	GZ 5	2.227 ± 0.263 ^a	8.736 ± 0.389 ^a	10.963 ± 0.323 ^a	Cielo abierto
Gutierrez Zamora	El Ojite (Malla 2)	GZ 6	0.769 ± 0.095 ^{cd}	5.507 ± 0.283 ^{def}	6.275 ± 0.211 ^e	Malla sombra
Tihuatlán	Paso La Uno	T 1	1.052 ± 0.037 ^{bc}	6.627 ± 0.104 ^{cd}	7.679 ± 0.138 ^d	Cielo abierto
Tihuatlán	Chapolhuac	T 2	0.822 ± 0.058 ^{bcd}	8.464 ± 0.815 ^{ab}	9.286 ± 0.865 ^b	Cielo abierto
Tihuatlán	La Loma	T 3	1.109 ± 0.082 ^{bc}	4.809 ± 0.632 ^{efg}	5.918 ± 0.552 ^e	Cielo abierto
Cazones	Torno	C	0.568 ± 0.031 ^d	5.078 ± 0.345 ^{efg}	5.646 ± 0.375 ^{ef}	Malla sombra
Papantla	Pueblillo	P	0.870 ± 0.154 ^{bcd}	8.137 ± 0.456 ^{ab}	9.007 ± 0.610 ^b	Cielo abierto
Tuxpan	Francisco I. Madero	Tx	1.179 ± 0.138 ^b	5.919 ± 0.486 ^{de}	7.098 ± 0.353 ^d	Cielo abierto
Oaxaca						
Ojitlán	Mazin Grande	MG	1.103 ± 0.160 ^{bc}	6.096 ± 1.004 ^{cd}	7.198 ± 1.165 ^d	Acahual
San Pedro Ixcatlan	Emiliano Zapata	EZ	0.777 ± 0.103 ^{cd}	6.356 ± 0.817 ^{cd}	7.133 ± 0.919 ^d	Acahual

Promedio de tres determinaciones, ± desviación estándar. Letras diferentes minúsculas por fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras.

En la Tabla 5.7 se puede observar que la cantidad de vainillina ligada fue mayor en las plantaciones de GZ 5 (8.736 g/100g m.s.), T 2 (8.464 g/100g m.s.) y P (8.137 g/100g m.s.), con un potencial de vainillina de (10.963 g/100g m.s.), (9.286 g/100g m.s.) y (9.007 g/100g m.s.) respectivamente, las cuales tienen como característica en común que son plantaciones orgánicas en cielo abierto, con cítricos como tutores, las dos últimas con cuidado continuo y supervisión del productor con buen manejo agronómico, para poder combatir de manera natural, sin el uso de ningún producto químico la presencia de plagas en sus plantas, además de promover los medios para poder abastecer de agua en periodos de sequía (Figura 5.13), otra característica que presentaron en común estas plantaciones fue de que en temporada de lluvias no se vieron afectadas por inundaciones ni por hongos ya que se encuentran en colinas y esto permite que el agua fluya y no se quede estancada.



Figura 5.13 Imágenes de las plantaciones de Papantla y Tihuatlan 2, respectivamente.

Las plantaciones que le siguen en la concentración de glucovainillina fueron dos de Veracruz a cielo abierto GZ 2 (7.261) y T 1 (6.627) y las dos plantaciones de Oaxaca EZ (6.36 g/100 g m.s.) y MG (6.10 g/100 g m.s.) estas últimas que se encuentran cultivadas bajo el sistema acahual, en su hábitat natural bajo condiciones propias del entorno y sin ningún cuidado en especial, presentaron mayor contenido de vainillina ligada que cinco plantaciones de Veracruz, dos de ellas tecnificadas GZ 6 (5.507 g/100 g m.s.) y GZ 1 (4.806 g/100 g m.s.).

Los valores de vainillina ligada de los frutos provenientes de las plantaciones de Veracruz y Oaxaca fueron mayores a los obtenidos por Palama *et al.*, (2009) que reportaron 3.94 g/100 g m.s. en vainas verdes de *V. planifolia* cultivada en la Isla Reunión y cosechada a los 8 meses de madurez. Ellos argumentaron que la variación del contenido de vainillina en forma ligada (glucovainillina) o en su forma libre esta en función de factores ambientales, que influyen el metabolismo de las vainas verdes de *V. planifolia*. Estos factores podrían ser el sol, aire, temperatura, fotoperiodos y pluviometría.

Dichos factores pueden influenciar que se lleven a cabo diferentes reacciones en las plantas de *V. planifolia* para la biosíntesis de vainillina y que se presenten esas variaciones en su contenido final en las vainas, dichas reacciones son síntesis de vainillina vía ácido ferúlico, glucosilación de vainillina para obtener el glucósido de vainillina (glucovainillina) y finalmente la hidrólisis de la glucovainillina para la liberación de la vainillina. Gallage *et al.*, (2018) evidenciaron que la biosíntesis de la vainillina se lleva a cabo en los cloroplastos y que interviene la enzima vainillin sintetasa de *V. planifolia* (VpVAN) catalizando la conversión de ácido ferúlico y glucósido del ácido ferúlico en vainillina y glucósido de vainillina, respectivamente.

5.8 PRINCIPALES COMPUESTOS VOLÁTILES EN VAINAS BENEFICIADAS

5.8.1 CUANTIFICACIÓN DE VAINILLINA

Las vainas en estudio fueron sometidas a un proceso de beneficiado tecnificado con el método de marchitamiento por inmersión en nitrógeno líquido. Se obtuvieron vainas beneficiadas con un contenido de vainillina que osciló entre 4.718 - 7.834 g/100 g m.s. (Tabla 5.8). El contenido de vainillina en las vainas provenientes del estado de Veracruz y Oaxaca fue mayor al reportado por Ranadive (1992), Perez-Silva *et al.* (2011), Pérez-Silva *et al.*, (2006) y Rosado-Zarrabal (2007) para vainas de *Vanilla planifolia* beneficiadas de manera tradicional y provenientes de México.

Esto podría deberse a dos factores principalmente: a la madurez de las vainas al momento de ser cosechadas y al beneficiado. En este caso el proceso de congelación y descongelación logró una descompartmentalización celular que favoreció el aumento de la capacidad de extracción de la vainillina como lo reportado por Odoux *et al.* (2006) y Ansaldi *et al.* (1990), estos últimos propusieron en una patente el método de sumergir las vainas en nitrógeno líquido para posteriormente ser almacenadas en un congelador a -80 °C durante 12 h. Rosado-Zarrabal *et al.* (2007) evaluaron el efecto de diferentes tipos de marchitamiento (horneado, inmersión en agua caliente y congelación) durante un beneficiado controlado de vainilla (*V. planifolia*) y la máxima concentración que obtuvieron de vainillina fue de 5.534 % m.s. por el método de congelación con nitrógeno líquido, esta concentración se encuentra dentro del intervalo de vainillina obtenida de las vainas analizadas en este trabajo. Sin embargo, este método es recomendado para cantidades pequeñas de vainilla por el tipo de equipo que se utiliza y sus costos.

Tabla 5.8 Cuantificación de vainillina en vainas beneficiadas

Plantación	Vainillina g/100 g m.s.
Veracruz	
GZ 1	5.464 ± 0.321 ^{cde}
GZ 2	5.464 ± 0.235 ^{cde}
GZ 3	5.303 ± 0.067 ^{cde}
GZ 4	5.610 ± 0.553 ^{cd}
GZ 5	7.291 ± 0.199 ^a
GZ 6	5.545 ± 0.258 ^{cd}
T 1	5.817 ± 0.257 ^{bc}
T 2	4.971 ± 0.259 ^{de}
T 3	5.110 ± 0.100 ^{cde}
C	4.718 ± 0.212 ^e
P	7.834 ± 0.210 ^a
Tx	6.403 ± 0.168 ^b
Oaxaca	
MG	5.040 ± 0.157 ^{de}
EZ	5.078 ± 0.212 ^{de}

Promedio de tres determinaciones, ± desviación estándar. Letras diferentes minúsculas por fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras.

En comparación con otras vainas de *V. planifolia* de diferentes partes del mundo, las vainas analizadas en este trabajo presentaron mayor concentración de vainillina que la reportada por Gassenmeier *et al.*, (2008) para vainas de Indonesia (1.1 g/100 g m.s), Papua Nueva Guinea (1.34 g/100 g m.s.), India (1.48 g/100 g m.s.), Madagascar (1.76 g/100 g m.s.) y Uganda (2 g/100 g m.s.), lo cual podría atribuirse al lugar de origen y principalmente por el grado de madures de los frutos y métodos de beneficiado.

5.8.2 CUANTIFICACIÓN DE OTROS COMPUESTOS MAYORITARIOS EN VAINAS BENEFICIADAS

Entre los principales constituyentes aromáticos presentes en la vaina beneficiada, están además de la vainillina, el p-hidroxibenzaldehído, el ácido vainílico, el ácido p-hidroxibenzoico y el p-hidroxibencil alcohol (Ranadive, 1992).

En la Tabla 5.9 se presentan la concentración de los compuestos mayoritarios en las vainas beneficiadas, los cuales se utilizan como un indicador de la calidad para fines comerciales (Pérez-Silva *et al.*, 2006).

Tabla 5.9 Cuantificación de los principales compuestos mayoritarios en vainas beneficiadas

Plantación	g/100 g m.s.				
	Ac. vainílico	Vainillil alcohol	p-hidroxi benzaldehído	p-hidroxi benzoico	p-hidroxi bencil alcohol
Veracruz					
GZ 1	0.386 ± 0.022 ^b	0.215 ± 0.012 ^c	0.263 ± 0.011 ^d	0.158 ± 0.006 ^b	0.146 ± 0.009 ^c
GZ 2	0.317 ± 0.017 ^{cd}	0.167 ± 0.009 ^{efg}	0.249 ± 0.012 ^d	0.106 ± 0.007 ^{cd}	0.113 ± 0.007 ^d
GZ 3	0.276 ± 0.004 ^{de}	0.155 ± 0.003 ^{fg}	0.209 ± 0.004 ^{ef}	0.08 ± 0.002 ^{ef}	0
GZ 4	0.404 ± 0.045 ^b	0.105 ± 0.012 ^h	0.169 ± 0.018 ^g	0.091 ± 0.011 ^{de}	0.026 ± 0.003 ^g
GZ 5	0.299 ± 0.008 ^{cde}	0.272 ± 0.009 ^b	0.456 ± 0.013 ^a	0.161 ± 0.007 ^{ab}	0
GZ 6	0.288 ± 0.011 ^{de}	0	0.254 ± 0.016 ^d	0.108 ± 0.007 ^c	0.101 ± 0.005 ^{de}
T 1	0.259 ± 0.014 ^{ef}	0.105 ± 0.006 ^h	0.241 ± 0.013 ^{de}	0.051 ± 0.003 ^g	0.141 ± 0.007 ^c
T 2	0.288 ± 0.015 ^{de}	0.251 ± 0.012 ^b	0.313 ± 0.014 ^c	0.099 ± 0.005 ^{cd}	0.177 ± 0.009 ^b
T 3	0.217 ± 0.001 ^f	0.183 ± 0.002 ^{de}	0.242 ± 0.004 ^{de}	0.075 ± 0.002 ^f	0.087 ± 0.002 ^e
C	0.288 ± 0.011 ^{de}	0.317 ± 0.007 ^a	0.210 ± 0.007 ^{fg}	0.080 ± 0.002 ^{ef}	0.210 ± 0.009 ^a
P	0.344 ± 0.014 ^{bc}	0.147 ± 0.005 ^g	0.339 ± 0.015 ^c	0.074 ± 0.004 ^f	0.170 ± 0.006 ^b
Tx	0.310 ± 0.009 ^{cde}	0.195 ± 0.007 ^{cd}	0.405 ± 0.015 ^b	0.128 ± 0.006 ^c	0.007 ± 0.013 ^{gh}
Oaxaca					
MG	0.514 ± 0.026 ^a	0.186 ± 0.010 ^{de}	0.407 ± 0.020 ^a	0.168 ± 0.008 ^a	0.113 ± 0.007 ^d
EZ	0.588 ± 0.044 ^a	0.209 ± 0.014 ^c	0.301 ± 0.017 ^c	0.163 ± 0.013 ^a	0.166 ± 0.014 ^b

Promedio de tres determinaciones, ± desviación estándar. Letras diferentes minúsculas por fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras.

El segundo compuesto más abundante en las vainas beneficiadas es el ácido vainílico como se puede apreciar en la Tabla 5.9 las concentraciones van desde 0.217 g/100 g ms hasta 0.588 g/100 g ms, siendo las vainas de Oaxaca donde se observa el mayor contenido del ácido vainílico sin existir diferencia estadística significativa entre ambas pero si diferentes estadísticamente con las vainas de Veracruz.

Los resultados obtenidos para el ácido vainílico de todas las vainas beneficiadas de Veracruz y Oaxaca fueron mayores a lo reportado por Gassenmeier *et al.*, (2008) para las vainas de Indonesia (0.097 g/100g m.s.), Uganda (0.10 g/100g m.s.), India (0.143 g/100g m.s.), México (0.149 g/100g m.s.) y Papua Nueva Guinea (0.28 g/100g m.s.). Pérez Silva *et al.*, en el 2006 y 2011 reportaron contenidos de ácido vainílico de 0.13 g/100g m.s. y

0.348 g/100g m.s. respectivamente, en vainas de México beneficiadas de manera tradicional y mencionaron que el ácido vainillínico aumentó en las vainas al final del beneficiado. Esto podría atribuirse por la oxidación que puede sufrir la vainillina durante el beneficiado de la vainilla produciendo ácido vainílico, el cual puede disminuir si se lleva a cabo una descarboxilación para producir guayacol por vía enzimática o por una oxidación química (Gatfield, 2006; Hernández-Ramos, 2009).

Respecto al p-hidroxibenzaldehído las vainas de las plantaciones con mayor concentración fueron GZ 5(0.456 g/100g m.s.), Tx (0.405 g/100g m.s.) y MG (0.407 g/100g m.s.), siendo superiores a lo reportado por Perez-Silva *et al.*, (2011) (0.225 g/100 g m.s.) y Gassenmeier *et al.*, (2008) (0.113 g/100 g m.s.) para vainas también de México.

Además las concentraciones de p-hidroxibenzaldehído de todas las vainas analizadas resultaron ser mayores que las reportadas por Gassenmeier *et al.*, (2008) para las vainas de Indonesia (0.065 g/100 g m.s.), India (0.071 g/100 g m.s.), Papua Nueva Guinea (0.088 g/100 g m.s.) y Uganda (0.12 g/100 g m.s.).

Sin embargo también se presentaron valores menores que lo reportado por Perez-Silva *et al.*, (2011) (0.225 g/100 g m.s.), como los obtenidos para GZ 3 (0.209 g/100g m.s.), GZ 4 (0.169 g/100g m.s.) y C (0.210 g/100g m.s.), la disminución de su concentración puede deberse a una oxidación para formar el ácido p-hidroxibenzoico (John y Jasmin, 2004).

El ácido p-hidroxibenzoico presentó mayor concentración en las vainas de cinco plantaciones: MG (0.168 g/100 g m.s.), EZ (0.163 g/100 g m.s.), GZ 5 (0.161 g/100 g m.s.), GZ 1 (0.158 g/100 g m.s.) y Tx (0.128 g/100 g m.s.), que lo reportado por Perez-Silva *et al.*, (2011) (0.113 g/100 g m.s.), las demás plantaciones presentaron valores menores. Sin embargo al igual que en los demás compuestos mayoritarios todas las plantaciones presentaron mayor contenido del ácido p-hidroxibenzoico que lo reportado por Gassenmeier *et al.*, (2008) para las vainas de Papua Nueva Guinea (0.031 g/100 g m.s.), Uganda (0.031 g/100 g m.s.), India (0.021 g/100 g m.s.) e Indonesia (0.014 g/100 g m.s.).

El p-hidroxibencil alcohol presentó menor concentración en las vainas de las plantaciones: Tx (0.007 g/100 g m.s), GZ 4 (0.026 g/100 g m.s), GZ 3 (trazas) y GZ 5 (trazas) que lo reportado por Pérez-Silva *et al.*, (2011) (0.041 g/100 g m.s.) para las otras 10 plantaciones su concentración fue mayor.

En el caso del vainillil alcohol los valores obtenidos fueron superiores a lo reportado por Pérez-Silva *et al.*, (2011) (0.028 g/100 g m.s.) en la mayoría de las plantaciones excepto para GZ 6 (trazas).

La presencia de estos dos alcoholes tiende a ser menor que los demás compuestos en la mayoría de las plantaciones, esto podría deberse a una posible oxidación a su aldehído correspondiente, lo cual podría explicar los valores bajos (Perez-Silva *et al.*, 2011).

Las diferencias en las concentraciones de los compuestos en las vainas estudiadas y las reportadas en otras investigaciones puede deberse principalmente por el tipo de beneficiado al cual fueron sometidas las vainas.

5.9 EVOLUCIÓN DEL POTENCIAL DE VAINILLINA DURANTE EL DESARROLLO DE LOS FRUTOS

Con la finalidad de comprender y evaluar la importancia de la madurez de las vainas al momento de ser cosechadas. Se evaluó el contenido de glucovainillina durante la maduración de los frutos a partir del quinto mes después de la polinización de las flores. Palama *et al.* (2009) reportaron que en el cuarto mes del desarrollo de los frutos de vainilla, la concentración de glucósidos aumentó progresivamente.

El presente estudio se hizo en plantaciones del estado de Oaxaca (Mazin Grande, Emiliano Zapata y Loma San Rafael) y Veracruz (Loma Linda y Gutierrez Zamora) en diferentes años de cosecha. En la Figura 5.13 se presentan las comunidades evaluadas y los valores de glucovainillina en g/100 g m.s. de las vainas verdes durante cada mes analizado.

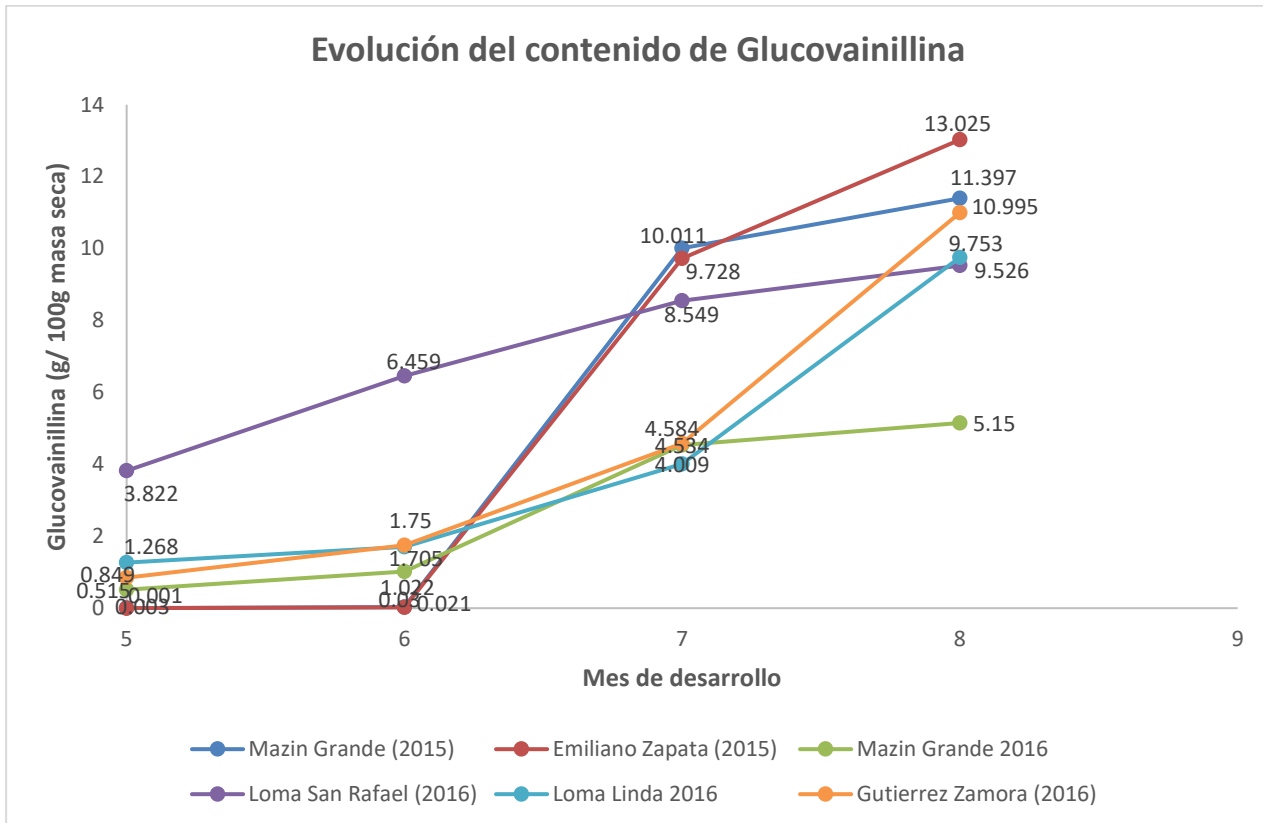


Fig. 5.14 Contenido de glucovainillina durante la maduración de los frutos a partir del quinto mes después de la polinización de las flores.

En la gráfica 5.14 se puede observar que el contenido de glucovainillina fue aumentando conforme aumentaba el mes de desarrollo, el mayor aumento se logró del sexto al séptimo mes en las vainas de todas las comunidades analizadas, siendo más notorio en las comunidades de Oaxaca de Mazin Grande y Emiliano Zapata de la cosecha 2015, con un aumento de diez veces más. En el caso de las plantaciones de Veracruz de la cosecha 2016 se puede observar que ambas presentaron la misma tendencia en el aumento del contenido de glucovainillina de 2.6 veces más del sexto al séptimo mes, respecto del séptimo al octavo mes fue de 2.4 veces. Por lo cual se puede apreciar que el contenido de glucovainillina en estas plantaciones siguió la misma tendencia para cada estado durante el mismo año de cosecha.

Se aprecia que si existe diferencia entre las plantaciones de Oaxaca y Veracruz de las cosechas 2015 y 2016 lo cual podría deberse a factores ambientales como la lluvia, temperatura y período de cosecha, por ejemplo para Oaxaca en el 2015 se presentó una precipitación de 1002.4 mm y para el 2016 disminuyó a 993.2 mm. Para Veracruz la precipitación en el 2016 fue de 1533.8 mm.

Respecto a la temperatura, la máxima alcanzada en el estado de Oaxaca en el 2015 fue de 34.5°C en el mes de Abril y en el 2016 fue 35.1°C en Mayo. A pesar de que la temperatura máxima promedio en Oaxaca en el 2015 y 2016 fue de 31.2 °C, según lo reportado por la Comisión Nacional del Agua, de manera general las temperaturas en el 2015 en Oaxaca de Enero-Junio fueron menores que las presentadas en el 2016 durante este período. En Veracruz se presentó una temperatura máxima promedio de 28.9 °C en el 2016. Por lo que las variaciones en estos factores pueden influir en los cambios de las concentraciones de glucovainillina. Como lo reportado por Palama *et al.* (2009) quienes mencionan que el contenido de glucovainillina puede variar respecto a factores ambientales, que influyen el metabolismo de las vainas verdes de *V. planifolia*. Estos factores podrían ser el sol, aire, temperatura, fotoperiodos y pluviometría. La concentración de glucovainillina en el octavo mes de madurez fue mayor en 5 de las plantaciones analizadas (9.526-13.025 g/100 g m.s.) que lo mencionado por Pérez-Silva *et al.* (2006), quienes reportaron un contenido de glucovainillina de 8.79 g/100 g m.s. en vainas de vainilla del estado de Veracruz, solo las vainas procedentes de Mazin Grande de la cosecha 2016 presentaron una concentración menor (5.15 g/100 g m.s.) a lo reportado por Pérez-Silva *et al.* (2006) y por Odoux *et al.* (2006), quienes en vainas verdes provenientes de Madagascar encontraron concentraciones de glucovainillina de 5.3 g/100 g ms. Por lo que se puede observar la influencia que también presentan el año de la cosecha, el lugar de origen y la madurez del fruto.

Vásquez-Hernández (2017) presentó por primera vez valores del contenido de glucovainillina de 19.5 g/100 g m.s. en vainas de *V. planifolia* cosechadas en Oaxaca a los diez meses de madurez, además hace referencia al trabajo realizado por Alonso-Palacios (2014) quien analizó vainas verdes polinizadas de manera natural, de las cuales

desconocía su estado de madurez y que presentaron un contenido de glucovainillina de 19.8 g/100 g m.s., por lo que en base a los resultados obtenidos por Vásquez-Hernández (2017) se puede inferir que las vainas analizadas por Alonso-Palacios (2014) fueron cosechadas a los diez meses de madurez.

De acuerdo también a los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que considerar el estado de madurez de las vainas al momento de ser cosechadas es fundamental para una adecuada calidad aromática en la vainilla debido al aumento del contenido de glucovainillina y actividad enzimática de la β -glucosidasa durante la maduración de los frutos.

Estas son las condiciones con las que deben contar las vainas al momento de someterse al proceso de beneficiado, para poner en contacto a los precursores glucosilados particularmente la glucovainillina y las β -glucosidasas, que aunque se encuentran en el mismo tejido celular, éstas están localizadas en dos compartimentos celulares diferentes, la enzima β -glucosidasa se encuentra en el citoplasma y la glucovainillina en el tejido vacuolar (Odoux et al., 2006).

VI. CONCLUSIONES

Después de implementarse por primera vez el marcador PAL para estudios filogenéticos del género *Vanilla* se observó que resultó ser específico con altos niveles de confianza de diferenciación de especies dentro de este género.

De las 10 especies reportadas en México por Soto-Arenas (1999; 2009), se encontraron e identificaron 6: *V. planifolia*, *V. odorata*, *V. pompona*, *V. insignis*, *V. mexicana*, *V. hartii* en los estados de Veracruz, Oaxaca, Puebla, Chiapas, Quintana Roo y Nayarit, además de una especie no identificada en Oaxaca (*Vanilla sp.*).

El potencial de vainillina fue mayor en las vainas verdes del estado de Veracruz, particularmente las provenientes de una plantación orgánica de cielo abierto, el cual es influenciado por el estado de madurez, la localidad de procedencia y el tipo de cultivo.

El contenido de vainillina determinado en vainas beneficiadas en el mismo estado de madurez bajo condiciones controladas (7-8 g/100 g m.s.) fue mayor que el reportado en la literatura para las vainas beneficiadas por un proceso tradicional (1-5 g/100 g m.s.).

El contenido de glucovainillina durante el desarrollo del fruto está influenciado por el estado de madurez, la localidad de procedencia y el tipo de cultivo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Adedeji J., Hartman y Ho Tang. 1993. Flavor characterization of different Varieties of *Vanilla* beans. *Perfumer & Flavorist*, 18:25-32.

Ansaldi, G., Marseille G. y Aubagne J. 1990. Process for obtaining natural *vanilla* flavor by treatment of green vanilla beans, and the flavor obtained. US Patent No. 495692.

Anuradha, K., Shyamala, B.N. y Naidu, M.M. 2013. Vanilla-Its Science of Cultivation, Curing, Chemistry, and Nutraceutical Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53: 1250-1276.

Arana F. 1943. Action of β -glucosidase in the curing of *vanilla*. *Food Res.* 8: 343351.

Balls A. y Arana, F. 1941. The curing of *vanilla*. *Ind. Eng. Chem.* 33, 1073-1075.

Besse, P., Da Silva, D., Bory, S., Grisoni, M., Le Bellec, F., Duval. M.F. 2004. RAPD genetic diversity in cultivated *vanilla*: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science.* 167: 379-385.

Bory, S. Grisoni, M. Duval, M. F. and Besse, P. 2007. Biodiversity and preservation of *Vanilla*: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 55: 551-571.

Bory, S. Catrice, O. Brown, S. Leitch, I. J Gigant, R. Chiroleu, F. Grisoni, M. Duval, M.F. Y Besse, P. 2008. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (*Orchidaceae*). *Genome.* 51: 816-826.

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

Bouetard, A. Lefeuvre, P. Gigant, R. Bory, S. Pignal, M. Besse, P. Grisoni, M. 2010. Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 55: 621-630.

Brunschwig, C., Senger-Emonnot, P., Aubanel, M.-L., Pierrat, A., Rochard, S., Raharivelomanana, P. 2012. Odor-active compounds of Tahitian vanilla flavor. *Food Research International*, 46, 148-157.

- Cameron, K. M. y Chase, M. W. 1999. Phylogenetic relationships of *Pogoniinae* (*Vanilloideae*, *Orchidaceae*): an herbaceous example of the eastern north American-eastern Asia phylogeographic disjunction. *Journal of Plant Research*. 112: 317-329.
- Cameron, K. M. 2004. Utility of plastid *psaB* gene sequences for investigating intrafamilial relationships within *Orchidaceae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31(3): 1157-1180.
- Cameron, K. M. 2005. Recent Advances in the Systematic Biology of *Vanilla* and Related Orchids (*Orchidaceae*: subfamily *Vanilloideae*). In First International Congress. 89-93, Princeton, NJ, USA.
- Cameron, K. M. y Molina, M. C. 2006. Photosystem II gene sequences of *psbB* and *psbC* clarify the phylogenetic position of *Vanilla* (*Vanilloideae*, *Orchidaceae*). *Cladistics*. 22: 239-248.
- Cameron, K. M. 2011. *Vanilla* Orchids, Natural History and Cultivation. Timber Press, USA.
- Castillo Martínez, R; Engleman, E.M. 1993. *Acta Botánica Mexicana*, 25:49:49.
- Castro, G. 2008. Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México. Tesis Dr. Sc., Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México.
- Curti, D. E. 1989. Manual para el cultivo de vainilla en la región de Papantla, Veracruz. Comisión Nacional de la Fruticultura, México.
- Dignum J., Kerler J. y Verpoorte R. 2001b. β -glucosidase and peroxidase stability in crude enzyme extracts from green beans of *Vanilla planifolia* Andrews. *Phytochemistry Anal.* 12, 174-179.
- Dignum, M.J.W., Kerler, J. y Verpoorte, R. 2002. Vanilla curing under laboratory conditions. *Food Chemistry*. 79, 165-171. 10.
- Dignum J., Heijden R, Kerler J, Winkel C, Verpoorte R. 2004. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β glucosidase. *Food Chem.* 85,199-205.
- Duval, M-F. Bory, S. Andrzejewski, S. Grisoni, M. Besse, P. Causse, S. Charon, C. Dron, M. Odoux, E. and Wong, M. 2006. Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. *Les Actes du BRG*. 6:181-196.
- Gallage N.J. y Moller B.L. 2015. Vanillin-Bioconversion and Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its De Novo Biosynthesis in the Vanilla Orch. *Mol. Plant*. 8, 40-57.

- Gigant, R., S. Bory, M. Grisoni, y P. Besse. 2011. Biodiversity and evolution in the *Vanilla* genus. En: O. Grillo, y G. Venora, editores, The dynamical processes of biodiversity - case studies of evolution and spatial distribution. InTech, FR. 1-26.
- Havkin-Frenkel, D., French, J., Pak, F., y Frenkel C. 2004. Interrelation of Curing and Botany in *Vanilla planifolia* Bean. Future for Medicinal and Aromatic Plants. Acta Hort. 629, 93-102.
- Havkin-Frenkel D., Belanger F. 2011. Handbook of *vanilla* science and technology. pp. 183–218. Blackwell Publishing Ltd.
- Hernández-Hernández, J. 2004. Tecnología para producir vainilla. Memoria técnica no. 12. Día del Productor Agropecuario y Forestal. Campo Experimental Iztacalco. pp. 1–21.
- Hernández-Hernández, J. 2011. Production of Vanilla – agricultural systems and curing. En: D. Havkin-Frenkel, y F.C. Belanger, editores, Handbook of Vanilla Science and Technology. Wiley-Blackwell. p. 1-25.
- Hernández-Hernandez y Lubinsky, 2010. Cultivation Systems. In: *Vanilla*. (eds) Odoux, E. y Grisoni, M. CRC Press, Taylor y Francis Group.
- Jordán Bueso M. 1999. Constituyentes aromáticos del zumo de naranja. Efecto del procesado industrial.
- Kanisawa, T., Tokoro K., Kawahara S. 1994. Flavor development in the beans of *Vanilla planifolia*. Olfaction Taste XI, Proc. Int. Symp. Springer, Tokyo. 268-270.
- Lamparsky, D.y Klimes I. 1976. Vanilla volatiles – a comprehensive analysis. International Flavours and Food Additives, 7, 272,-291.
- Lapeyre-Montes, Conéjéro G., Jean-Luc V., and Eric Odoux 2010. Anatomy and Biochemistry of Vanilla Bean Development (*Vanilla planifolia* G. Jackson) En: *Vanilla*. (eds) Odoux, E. y Grisoni, M. CRC Press, Taylor y Francis Group.
- Leong G., Archavlis A., Derbesy M. 1989a. Research on the glucosides fraction of vanilla bean, Journal of Essential Oil Research, 1: 33 - 41
- Lepters-Andrzejewski S., Brunschwing C., Collard F., Dron M. 2011. *Vanilla*. Eds Odoux E. and Grisoni M. CRC Press, Boca Raton. 205-228.
- Lim, T.K., 2012. *Vanilla planifolia*. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants, Fruits, 4:106-114.
- Lubinsky, P., Cameron, K.M., Molina, M.V., Wong, M., Lepers-Andrzejewski, S., Gómez-Pompa, A., Kim, S-M. 2008. Neotropical roots of a polynesian spice: the hybrid Origin of tahitian vanilla, *vanilla tahitensis* (orchidaceae). American Journal of Botany 95(8): 1040–1047.

- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández-Hernández, J., KIM, S. C. y Gómez-Pompa, A., 2008. Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62(2): 127–138.
- Maruenda H., Lujan Vico M., Householder J. E., Janovec J. P., Naka A., Gonzalez A. E., Cañari C. 2013. Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by HPLC-DAD. *Food Chemistry* 138: 161–167.
- Musalem López, O. 2002. La vainilla en México una alta tradición con un alto potencial. Apoyos y servicios a la comercialización agropecuaria. ASERCA.
- Negishi, O y Ozawa T. 1996. Determination of hydroxycinnamic acids, hydroxybenzyl alcohols and their glucosides by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 756: 129-136. 30.
- Odoux, E. 2000. Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing *Vanilla fragrans* beans in Réunion. *Fruits*. 55, 119-125.
- Odoux, E., Escoute, J y Verdeil, J.L. 2006. The relation between glucovanillin, β -D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans. *Annals. Of Applied Biology*. 149, 43-52.
- Odoux, E., 2010. *Vanilla* Curing. En *Vanilla*. (eds) Odoux, E. y Grisoni, M. CRC Press, Taylor y Francis Group.
- Palama, T. L., Khatib, A., Choi, Y. H., Payet, B., Fock, I., Verpoorte, R., et al. 2009. Metabolic changes in different developmental stages of *Vanilla planifolia* pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7651–7658.
- Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., Garcia-Alvarado, M., Günata, Z. 2006. GC – MS and GC – Olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, 99, 728-735.
- Pérez-Silva, A., Gunata, Z., Lepoutre, J. P., Odoux, E. 2011. New insight on the genesis of odor active compounds in vanilla beans (*Vanilla planifolia* G. Jackson) during traditional curing. *Food Research International*. 44: 2930-2937.
- Plutowska B., Wardencki W. 2007. Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry* 101: 845–872.
- Portères, R. 1954. Le genre *Vanilla* et ses espèces. Le vanillier et la vanille dans le monde (ed. P. Lechevalier) 94-290, Paris.
- Purseglove J.W., Brown, E.G., Green C.L. y Robbins, S.R.J. 1981. Tropical and Agriculture. Ed. Rhind y Wringley, G. Longman. Volumen 2, Londres. 664-735.

- Ranadive A.S. 1994. Vanilla-Cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. Spices, Herbs and Edible Fungi. Ed Charalambous, G. Elsevier Sci. B.V. 517-576.
- Rao, S. R., Ravishankar, G. A. 2000. *Vanilla* Flavor: Production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the science of food and Agriculture*. 80: 289-304.
- Rolfe, R.A. 1896. A revision of the genus *Vanilla*. *Journal of the Linnean Society* 32: 439-478.
- Rosado Zarrabal, T., Salgado Cervantes, M.A., Robles Olvera, V. J., Garcia Alvarado, M.A., Rodriguez Jimenez, G. C. 2007. Efecto del tipo de marchitamiento en la evolución de los compuestos aromáticos en un beneficio controlado de vainilla (*Vanilla planifolia*). V congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones.1072-1080.
- Roux-Cuvelier, M. y Grisoni, M. 2010. Conservation and Movement of *Vanilla* Germplasm. en: *Vanilla*. (eds) Odoux, E. y Grisoni, M. CRC Press, Taylor y Francis Group.
- Sánchez-Chiang, N., y V. Jiménez. 2010. Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agron. Mesoam*. 21(1):193-205.
- Schlüter, P., M. Soto, y S. Harris. 2007. Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Econ. Bot.* 61:328-336.
- Sinha, A. K., Sharma, U.K., y Sharma, N. 2008. A comprehensive review on *vanilla* flavour: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 59: 299-326.
- Soto-Arenas, M.A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J101. Instituto Chinoín, A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. México, DF.
- Soto-Arenas M.A. 2003. Vanilla, in: Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W., Ramunsen F.N. (Eds.), *Genera Orchidacearum*, Oxford Univ. Press, UK, pp. 321–334.
- Soto-Arenas, M.A. y Salazar G.A. 2004. Orquídeas. En García-Mendoza, M.J. Ordoñez y Briones-Salas M. *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología. UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Natulaleza-World Wildlife Fund. México, pp 271-293.
- Soto, M. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. *Biodiversitas* 66:1-9.
- Soto-Arenas, M.A. 2009. Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla*. Reporte. Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología, A.C., Instituto Chinoín, A.C. México, DF.

Soto-Arenas, M. A., Dressler, L. R. 2010. A revision of the Mexican and central American species of *Vanilla plumier ex miller* with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9(3): 285-354.

Thompson, J. D. Higgins, D. G. Gibson, T. J. 1994. Clustal-W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Van Dyk S., Holford P., Subedi P., Walsh K., Williams M., McGlasson W.B. 2014. Determining the harvest maturity of Vanilla beans. *Scientia Horticulturae* 168, 249-257.

Werkhoff, P. y Güntert, M. 1997. Identification of some esters compounds in Bourbon vanilla beans. *Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie* 30:429-431.

Zhang, S. y Mueller, C., 2012. Comparative Analysis of Volatiles in Traditionally Cured Bourbon and Ugandan Vanilla Bean (*Vanilla planifolia*) Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10433-10444.

Bautista-Santiago J. 2009. La vainilla y sus beneficios en el sistema de acahual. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*, 21, 1.

ANEXOS

Encuesta aplicada a los productores de Veracruz y Oaxaca

Gaya
ENCUESTA A PRODUCTORES DE VAINILLA EN LA REGIÓN DEL TONACAPAN

FECHA 15/Feb/2014

1. LOCALIDAD (UBICACIÓN EXACTA DEL CULTIVO)
Chapolhuac, Tihuatlan, Ver. Long. 20° 41min 42s
Lat. 097° 31min 28s
Altura 135 m

2. NOMBRE DEL PRODUCTOR
Isidora Garcia Bartolo




3. VARIEDAD DE VAINILLA CULTIVADA
planifolia Jackson

4. AÑO QUE SE REALIZÓ EL PRIMER CULTIVO
En Enero de 2013 su primer cultivo con asesoría del Biólogo Francisco

5. CUANTAS COSECHAS HA REALIZADO
una cosecha

6. AÑO DE MÁXIMA PRODUCTIVIDAD
400 gr su primer cosecha

7. NÚMERO DE PLANTAS
1,200 plantas

 ENCUESTA A PRODUCTORES DE VAINILLA EN LA REGIÓN DEL TONACAPAN  

8. TUTOR

naranja 280 tubores

9. SUPERFICIE DE LA PLANTACIÓN

1 ha

10. TIPO DE RIEGO

con manguera

11. QUIEN REALIZA LA POLINIZACIÓN DE LAS FLORES Y EN QUE FECHA LA REALIZA

1 sola persona (15 de Marzo en el 2013)

12. EN QUE FECHA REALIZA LA COSECHA

En Diciembre

13. HA OBSERVADO CAIDA DE FRUTO EN LOS ULTIMOS AÑOS

14. A PARTIR DE QUE AÑO, MES Y EN QUE PORCENTAJE

Gaya

ENCUESTA A PRODUCTORES DE VAINILLA EN LA REGIÓN DEL TONACAPAN



15. CUAL ES LA COSECHA PROMEDIO QUE OBTIENE EN SU PARCELA

16. CUALES HAN SIDO LOS VOLUMENES MAS ALTOS Y MAS BAJOS COSECHADOS Y EN QUE AÑO

17. PLANO DEL TERRENO CULTIVADO

18. Plantación Orgánica



* Lleva Bitacora de todo lo relacionado con su plantación desde la siembra, preparación de abono, etc.

FOTOS DE LA VISITA A LAS PLANTACIONES DE LA REGIÓN DEL TONACAPAN



FIGURA 1. Empresa Gaya S.A de C.V.



FIGURA 2. Plantación de investigación CICY



FIGURA 3. Plantación de Cirilo Santiago



FIGURA 4. Plantación de Hilario Ramírez



FIGURA 5. Planta marcada de Hilario Ramírez



FIGURA 6. Plantación de Isidora García



FIGURA 7. Plantación de Eugenia Guerra



FIGURA 8. *Vanilla planifolia* var. Rayada



FIGURA 8. *Vanilla pompona*



FIGURA 9. Aplicación de encuesta