

## DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA EN HÍBRIDOS INTRAESPECÍFICOS DE CRUZA SIMPLE DE VAINILLA Y ACCESIONES PARENTALES

### DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE IN SINGLE-CROSS INTRASPECIFIC HYBRIDS OF VANILLA AND PARENTAL ACCESSIONS

Enrique Hernández-Leal<sup>1</sup>, Frank Solano-Campos<sup>2</sup>, José B. Azofeifa-Bolaños<sup>2,3</sup>, Amelia Paniagua-Vásquez<sup>3</sup>, Aurelio Hernández-Bautista<sup>4</sup>, Fernando López-Morales<sup>5</sup>, Fermin Pascual Ramirez<sup>6</sup> y Delfino Reyes-López<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Delicias, Delicias, Chihuahua, México. <sup>2</sup>Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Heredia, Costa Rica. <sup>3</sup>UNA, Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Heredia, Costa Rica. <sup>4</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>5</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias, San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. <sup>6</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Morelia, Michoacán, México.

\*Autor de correspondencia (delfino.reyes@correo.buap.mx)

#### RESUMEN

El conocimiento de la diversidad genética es de gran importancia en el diseño y conducción de un programa de mejoramiento genético, ya que de esto depende su éxito; en este sentido, el objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad genética de 21 híbridos intraespecíficos de cruce simple y sus parentales en *Vanilla planifolia* con datos moleculares obtenidos de la amplificación por PCR de cuatro marcadores inter secuencias simples repetidas (ISSR) a partir de ADN genómico aislado de hojas. Se estimaron los parámetros de contenido de información polimórfica (CIP), índice de marcador (IM) y poder de resolución (PR). Para evaluar la diferenciación genética dentro y entre poblaciones se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) y un análisis de componentes principales. Para identificar los genotipos con mayor similitud se realizó un análisis de conglomerados con las distancias genéticas de Jaccard y para conocer la estructura genética se realizó un análisis de agrupamiento bayesiano. El marcador ISSR-T06 fue el que presentó mayor CIP (0.31), mientras que el ISSR-C10 tuvo el IM (2.55) y PR (17.08) más altos. El AMOVA reveló el 97 % de varianza genética dentro de poblaciones y el 3 % entre poblaciones ( $P \leq 0.01$ ), estos resultados indican que se deben retener más individuos por población para la conservación de la especie. Las pruebas de GAP y Elbow y el análisis de agrupamiento bayesiano diferenciaron dos grupos, en tanto que el análisis de distancias genéticas de Jaccard detectó bajos niveles de asociación entre los genotipos, sugiriendo la existencia de un solo grupo. El primer grupo estuvo formado por accesiones parentales, las cuales presentaron pocas diferencias alélicas, mientras que el segundo se integró por los híbridos, que presentaron mayor porcentaje de loci polimórficos; así mismo, reveló un incremento del 3 % de la diversidad entre poblaciones. La hibridación entre individuos de diferente origen es una herramienta factible para incrementar la diversidad entre poblaciones.

**Palabras clave:** *Vanilla planifolia*, mejoramiento genético, híbridos, poblaciones.

#### SUMMARY

Knowledge of genetic diversity is of great importance in the design and execution of a breeding program, as its success depends on it; thus, the objective of this study was to estimate the genetic diversity of 21 intraspecific single-cross hybrids and their parents of *Vanilla planifolia* with molecular data obtained by PCR amplification of four inter-simple-sequence repeats (ISSR) markers from genomic DNA isolated from leaves. The parameters of polymor-

phic information content (PIC), marker index (MI) and resolving power (RP) were estimated. To evaluate genetic differentiation within and between populations, an analysis of molecular variance (AMOVA) and principal component analysis were performed. To identify the genotypes with higher similarity, a cluster analysis was performed with Jaccard genetic distances, and a Bayesian cluster analysis was carried out to determine the genetic structure. The ISSR-T06 marker had the highest PIC (0.31), while the ISSR-C10 had the highest MI (2.55) and RP (17.08). AMOVA revealed 97 % of genetic variance within populations and 3 % between populations ( $P \leq 0.01$ ), these results indicate that more individuals per population should be retained for the species conservation. GAP and Elbow tests and Bayesian clustering analysis differentiated two groups, while the Jaccard genetic distance analysis detected low levels of association between genotypes, suggesting the existence of a single group. The first group was made up of parental accessions which presented few allelic differences, whereas the second group was integrated by hybrids that presented a higher percentage of polymorphic loci; likewise, it revealed an increase of 3 % in diversity between populations. Hybridization between individuals of different origin is a feasible tool to increase diversity between populations.

**Index words:** *Vanilla planifolia*, genetic improvement, hybrids, populations.

#### INTRODUCCIÓN

El género *Vanilla* comprende alrededor de 130 especies distribuidas en las zonas tropicales del mundo, en su mayoría son originarias del continente americano (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2017). En México se reportan 10 especies del género *Vanilla*; sin embargo, algunos trabajos recientes de caracterización morfológica y genética indican que la diversidad genética de vainilla en México puede ser más amplia (Ramos-Castellá *et al.*, 2017; Villanueva-Viramontes *et al.*, 2017).

En plantaciones comerciales de vainilla la variabilidad genética se considera limitada (Hernández-Leal *et al.*, 2016), principalmente por la reproducción vegetativa

utilizada para establecer nuevos huertos, la polinización manual que se realiza para la obtención de frutos y la limitada germinación de las semillas; además, la falta de nuevos genotipos provenientes de la recombinación sexual ha acentuado aún más la erosión genética en las plantaciones de vainilla (Schlüter *et al.*, 2007); sin embargo, se ha observado en huertos de vainilla una variación morfológica, sobre todo en las hojas, aun en el mismo individuo, características distintivas presentes en las plantas hemiepífitas y algunas monocotiledóneas (Ray, 1990), variabilidad que puede ser usada como fuente de germoplasma en programas de mejoramiento genético de este cultivo (Soto y Dressler, 2010).

La diversidad genética se refiere a las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie en condiciones naturales más o menos estables (Rimieri, 2017). En este sentido, diversos trabajos se han realizado para conocer la diversidad genética del género *Vanilla* en diferentes niveles y con diferentes objetivos. Cameron (2018) y Ramos-Castellá *et al.* (2017) realizaron estudios genotípicos, fenotípicos y bioquímicos para obtener información sobre su evolución y características biológicas; Ferreira *et al.* (2020), Flanagan *et al.* (2018) y Parizaca (2019) han propuesto mediante caracterización genética y fenotípica nuevas especies del género *Vanilla*, mientras que Martínez-Castillo *et al.* (2007) han realizado trabajos sobre relaciones filogenéticas y Nagy *et al.* (2012) sobre determinaciones taxonómicas.

Los marcadores moleculares que hacen uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como las inter secuencias simples repetidas, o ISSR (Zietkiewicz *et al.*, 1994) presentan algunas ventajas al compararlos con los descriptores morfológicos y bioquímicos. Los ISSR discriminan entre individuos de especies genéticamente cercanas o entre variedades de la misma especie (Reyes-Alemán *et al.*, 2013); además, los ISSR generan información valiosa en especies que no han sido estudiadas desde el punto de vista genético y son una técnica simple y económica (Araújo *et al.*, 2016).

En un estudio realizado para determinar las relaciones genéticas de siete especies y dos híbridos de vainilla se utilizaron 10 marcadores tipo ISSR y determinaron que hubo una relación cercana entre individuos de *V. planifolia*, *V. tahitensis* y *V. aphylla*, asociada con bajos niveles de variación (Verma *et al.*, 2009); así mismo, determinaron la relación filogenética entre *V. planifolia* y otras tres especies de vainilla en México, corroborando que hay diferencias claras entre *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. insignis* y *V. odorata*. En tanto, Ramos-Castella *et al.* (2017) en un estudio relacionado utilizaron cinco cebadores ISSR.

Villanueva-Viramontes *et al.* (2017) utilizaron ISSRs para discriminar entre individuos silvestres de *V. planifolia* y otras especies que crecen naturalmente en la península mexicana de Yucatán (PMY). Estos investigadores encontraron que los ISSR pueden identificar especies de vainilla presentes en la PMY debido a los altos niveles de variación genética en las vainillas estudiadas.

El material biológico utilizado en las plantaciones comerciales de vainilla en México se basa en clones nativos de *V. planifolia*, ya que aún no se han generado variedades mejoradas en esta especie. Conocer la diversidad genética intra e interespecífica en cultivos útiles para el hombre es de gran importancia para consolidar un programa de mejoramiento genético en sus primeras etapas, como una estrategia para ayudar a resolver problemas de tipo técnico, biológico y climático, es por esto que el objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad genética en híbridos intraespecíficos de cruce simple de *V. planifolia*, así como en accesiones parentales con datos moleculares obtenidos de cuatro marcadores tipo ISSR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El material biológico utilizado estuvo compuesto por 38 genotipos de *Vanilla planifolia* del banco de germoplasma de vainilla de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) (Cuadro 1), ubicado en el municipio de Tenampulco, Puebla, México, en las coordenadas geográficas 20° 11' 52.23" Lat. N y 97° 22' 06.09" Long. O y altitud de 224 msnm. Se colectaron hojas de plantas de ocho años de edad de 16 accesiones provenientes de los estados de Chiapas, Puebla, Quintana Roo y Veracruz, México, cada procedencia constituyó una población; 21 híbridos intraespecíficos de cruce simple de dos años de edad conformaron la quinta población, el testigo fue un clon de *V. planifolia* comúnmente cultivado en huertos comerciales de vainilla.

Para la extracción de ADN se utilizó tejido vegetal (hojas sanas) de cada genotipo, el cual fue colectado en el material de campo del banco de germoplasma. Se desinfectó con alcohol etílico 96 % para eliminar polvo e impurezas, las muestras se colocaron en bolsas de papel y éstas se colocaron en hielo para su conservación y trasladadas a la BUAP. Posteriormente, las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Costa Rica para los análisis moleculares.

**Cuadro 1. Material biológico utilizado para el estudio de diversidad genética en híbridos de cruce simple y accesiones parentales de *V. planifolia* de México.**

Accesión	Origen	Cruza	Cruza
2	Ejido La Corona, Márquez de Comillas, Chiapas	21 × 41	124 × 21
16	San Javier, Ocosingo, Chiapas	21 × 124	193 × 20
20	Nuevo Becar, Othón P. Blanco, Quintana Roo	28 × 39	21 × 28
21	Nuevo Becar, Othón P. Blanco, Quintana Roo	35 × 2	124 × 35
28	Tenampulco El Viejo, Tenampulco, Puebla	27 × 22	124 × 111
35	La Palapa, Tenampulco, Puebla	36 × 69	Testigo
36	Primero de Mayo, Papantla, Veracruz	36 × 112	
39	Primero de Mayo, Papantla, Veracruz	71 × 2	
41	Segundo Cantón Fracción Villanueva, Tapachula, Chiapas	39 × 194	
69	Huatusco, Othón P. Blanco, Quintana Roo	111 × 2	
71	Huatusco, Othón P. Blanco, Quintana Roo	111 × 39	
89	Caracoles, Tenampulco, Puebla	112 × 21	
111	Miahuatlán, Tihuatlán, Veracruz	115 × 21	
112	Copales Arroyo Blanco, San José Acateno, Puebla	193 × 16	
115	San Rafael, Veracruz	124 × 27	
124	Tihuatlán, Veracruz	124 × 28	

### Extracción de ADN

El protocolo de extracción empleado fue una modificación del método basado en el detergente catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), incluyendo un tratamiento con RNasa, seguido de una extracción con cloroformo y una precipitación con isopropanol (Rasoamanalina *et al.*, 2023; Stewart, 1997.). En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se introdujo un segmento de hoja de 50-60 mg, se agregaron dos balines metálicos con diámetro de 3 mm y 400 µL de solución de homogenización (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 2 % p/v CTAB, 1.42 M NaCl, 2.4 µL β-mercaptoetanol, 0.1 mg mL<sup>-1</sup> proteinasa K). Los tubos se colocaron en el disruptor de tejidos (MM400 (Retsch GmbH, Haan, Alemania) por 3 min a 30 Hz para macerar la muestra hasta obtener una mezcla homogénea. Las muestras fueron incubadas a 60 °C durante 60 min, agitando los tubos por inversión cada 10 min. Se agregaron 3 µL de RNasa (20 mg mL<sup>-1</sup>) y se incubó por 15 min a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 500 µL de una mezcla de cloroformo:octanol (24:1 v/v) y se homogeneizó

por inversión del tubo durante 1 min; las muestras se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. El ADN se precipitó con 1 v de isopropanol, se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar a 15000 rpm por 10 min. El precipitado de ADN se lavó con 500 µL de etanol 70 % y se centrifugó nuevamente. Se removió el etanol con micropipeta y el precipitado de ADN se dejó secar a temperatura ambiente con el tubo invertido por 15 min. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µL de solución Tris 10 mM (pH 8.0), las trazas de etanol fueron evaporadas incubando los tubos a 45 °C durante 3 min; las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

La calidad del ADN se determinó por electroforesis horizontal en geles de agarosa 1 %. La electroforesis se realizó en una solución amortiguadora de corrido SB 1X (sodio-borato) con una fuente de poder ENDURO E0303 (Labnet, Edison, Nueva Jersey, EUA) a 120 V durante 40 min. Como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Carlsbad,

California, EUA). El gel se observó en un transiluminador con luz ultravioleta modelo ENDURO GDS (Labnet, Edison, Nueva Jersey, EUA). La concentración y pureza del ADN se estimaron en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Carlsbad, California, EUA) y se utilizaron las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 como indicadores de la pureza.

### Marcadores ISSR, amplificación de PCR y electroforesis

Para evaluar la diversidad de híbridos y accesiones parentales se evaluaron 10 marcadores ISSR (Verma *et al.*, 2009), de los cuales, cuatro presentaron alto nivel de polimorfismo. Se trabajaron reacciones de PCR con un volumen final de 20 µL con las siguientes concentraciones finales: 30 ng de ADN, solución amortiguadora 1X [10 mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25 °C), 50 mM KCl, 0.08 % (v/v) Nonidet P40], 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de cada iniciador, 1 U de Taq polimerasa y agua grado molecular.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador (modelo ProFlex PCR System, Applied Biosystems, Singapur) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 40 s a 94 °C para la desnaturalización, 45 s a la temperatura de hibridación específica para cada iniciador y 90 s a 72 °C para la extensión. La temperatura de hibridación fue: 50 °C para los iniciadores ISSR-C07 (5'-GAGAGAGAGAGAGAC-3') e ISSR-T06 (5'-AGAGAGAGAGAGAGT-3'), 57 y 61 °C para ISSR-C09 (5'-CAGATGGGAGTCAAGTCAAC-3') e ISSR-C10 (5'-ACCTCCTGCAGATTCGTGTC-3'), respectivamente. La reacción concluyó con una extensión final a 72 °C por 10 min. Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa 2 % a 100 V durante 2 h. La post-tinción del gel se realizó con Gel Red (Biotium, San Francisco, California, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, la observación de fragmentos se llevó a cabo en un transiluminador ENDURO GDS (Labnet, Edison, Nueva Jersey, EUA).

### Análisis estadístico

A partir de la información genotípica se generó una matriz binaria donde 1 indicaba presencia y 0 ausencia del fragmento, para medir la capacidad informativa de los marcadores ISSR y su utilidad. Para evaluar la diversidad genética, se estimaron tres parámetros: contenido de información polimórfica (CIP) (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000), índice de marcador (IM) (Varshney *et al.*, 2007) y poder de resolución (PR) (Prevost y Wilkinson, 1999). El valor CIP de cada locus se estimó usando la fórmula:

$$CIP_i = 2f_i(1 - f_i) \quad \text{Ec (1)}$$

Donde  $f_i$  es la frecuencia del locus o banda  $i$  en la población; por lo tanto, para conocer el CIP de cada marcador ISSR se calculó el promedio de todos los loci de cada marcador.

La relación múltiple efectiva (RME) se estimó usando la fórmula: (Varshney *et al.*, 2007)

$$RME = n \times \beta \quad \text{Ec (2)}$$

Donde  $n$  es el número promedio de fragmentos amplificados por cada accesión por marcador y  $\beta$  la proporción de loci polimórficos (LP) respecto al total de loci obtenidos por cada marcador, la cual se obtuvo con la relación LP/número total de loci. El IM se calculó como:

$$IM = RME \times CIP \quad \text{Ec (3)}$$

El PR de cada marcador se estimó de acuerdo con Prevost y Wilkinson (1999), usando la fórmula:

$$PR = \sum_i lb_i \quad \text{Ec (4)}$$

Donde  $lb = 1 - (2 \times |0.5 - p_i|)$ , y  $p_i$  es la proporción de accesiones que contienen la  $i$ -ésima banda.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) se realizó en el programa GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Dicho análisis se realizó primero considerando solamente las accesiones parentales y posteriormente progenitores e híbridos. El análisis de componentes principales se llevó a cabo con la matriz de datos binarios y usando el paquete factextra (Lemenkova, 2019), en el programa R versión 3.5.2. El agrupamiento de los genotipos se evaluó por medio de las pruebas Gap (Tibshirani *et al.*, 2009) y Elbow (Thorndike, 1953) utilizando el paquete factextra. Las relaciones de similitud entre los genotipos se establecieron a través del análisis de conglomerados con datos estandarizados. Las distancias genéticas de Jaccard y el criterio de medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) se usaron para generar un dendrograma en el programa PAST versión 2.17 (Hammer *et al.*, 2001). La asociación de cada agrupamiento se evaluó por el método de remuestreo multiescalar bootstrap con 10,000 repeticiones.

Para estudiar la estructura genética de vainilla se realizó un análisis de agrupamiento bayesiano en el programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Previo al análisis, se fijaron los parámetros de modelo mezclado y frecuencia de alelos correlacionados. El número óptimo de agrupaciones se evaluó de 1 a 10, con 10 simulaciones independientes por cada valor de  $K$ , 100,000 cadenas de Markov Monte

Carlo y 10,000 cadenas iniciales excluidas. El número de agrupaciones poblacionales se determinó con el método de Evanno *et al.* (2005) usando el programa Structure Harvester v. 0.6.93 (Earl y vonHoldt, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Polimorfismo y capacidad resolutive de marcadores ISSR en vainilla

El marcador ISSR-C10 generó el mayor número de bandas polimórficas, con un total de 42; por otra parte, ISSR-T06 y ISSR-C07 fueron los que generaron el número de bandas más bajo, 18 y 25, respectivamente. En estudios previos donde se usaron marcadores RAPD y AFLP en vainilla se ha reportado el uso eficiente de tales marcadores para el estudio de la diversidad genética (Besse *et al.*, 2004; Divakaran *et al.*, 2006). En este estudio se observó que ISSR-C10 y ISSR-C09 tuvieron el poder resolutive más alto (Cuadro 2), lo cual indica que ambos marcadores son eficientes para el estudio de la diversidad de vainilla, ya que pueden detectar diferencias entre una cantidad grande de genotipos (Prevost y Wilkinson, 1999).

El contenido de información polimórfica (CIP) mide la capacidad discriminativa de un marcador, la cual depende del número de alelos conocidos (establecidos) y su frecuencia de distribución (Botstein *et al.*, 1980). En este estudio, el ISSR-T06 fue el marcador con el valor más alto (0.31); por el contrario, el ISSR-C07 generó menos información polimórfica (CIP = 0.28) (Cuadro 2). Estos valores fueron similares a los obtenidos por Verma *et al.* (2009), quienes reportaron valores de CIP cercanos a 0.30 para los mismos marcadores ISSR.

Por otro lado, gran parte de la población estuvo compuesta por genotipos clasificados como *V. planifolia*, por lo que

el marcador ISSR-T06 detectó un alto polimorfismo entre individuos de la misma especie. En este sentido, Verma *et al.* (2009) reportaron que el ISSR-T06 fue el más polimórfico entre ocho especies de vainilla, lo que sugiere que el ISSR-T06 puede proveer información importante de similitud genética entre y dentro de especies de vainilla.

El índice de marcador corresponde al producto del CPI y el número de loci polimórficos, y puede ser utilizado como una aproximación para determinar la utilidad de un marcador (Varshney *et al.*, 2007). En este estudio se observó que ISSR-C10 y ISSR-C09 presentaron el mayor índice de marcador (2.55 y 1.84, respectivamente), lo que refuerza su aplicación en el estudio de diversidad de la vainilla.

### Diversidad genética en vainilla

El AMOVA reveló alta varianza genética (97 %) dentro de las poblaciones y poca varianza (3 %) entre las poblaciones (Cuadro 3) considerando genotipos parentales de diferente origen geográfico e híbridos de cruce simple, los cuales constituyeron las poblaciones. Estos resultados indicaron que existe una mayor diferenciación genética dentro de poblaciones de vainilla que entre poblaciones, debido a que las accesiones parentales fueron de diferente origen geográfico y los híbridos crean nuevas combinaciones genéticas al realizar las cruces. Un resultado similar fue reportado por Schlüter *et al.* (2007), quienes encontraron mayor variación genética en *V. planifolia* dentro de poblaciones que entre poblaciones. Conocer la diversidad genética entre y dentro de poblaciones es importante para el diseño de un programa de mejoramiento genético por selección e hibridación.

Se obtuvo un índice poblacional promedio informativo de Shannon de 0.28 (Cuadro 4). Considerando sólo las

**Cuadro 2. Capacidad de cuatro marcadores ISSR para estimar la diversidad genética de *V. planifolia*.**

Iniciadores	Secuencia	NB	BP	BNP	PR	CIP	IM
ISSR-C07	5'GAGAGAGAGA GAGAGAC3'	25	24	1	9.87	0.28	1.29
ISSR-T06	5'AGAGAGAGA GAGAGAGT3'	18	18	0	9.08	0.31	1.51
ISSR-C09	5'CAGATGGGA GTCAAGTCAAC3'	33	33	0	12.92	0.29	1.84
ISSR-C10	5'ACCTCCTGCA GATTCGTGTC3'	42	42	0	17.08	0.30	2.55

NB: número de bandas generadas, BP: bandas polimórficas, BNP: bandas no polimórficas, PR: poder de resolución, CIP: contenido de Información polimórfica, IM: índice de marcador.

**Cuadro 3. Análisis molecular de varianza en la subpoblación parental y población total de *V. planifolia* de México.**

AMOVA considerando genotipos parentales e híbridos					
Fuente	GL	SC	CM	Estimación de varianza	% de varianza
Entre poblaciones	4	87.24	21.81	0.59	3
Dentro de poblaciones	33	610.18	18.49	18.49	97
Total	37	697.42		19.08	100
AMOVA considerando genotipos parentales					
Entre poblaciones	3	49.08	16.36	0.00	0
Dentro de poblaciones	11	189.05	17.19	17.19	100
Total	14	238.13		17.19	100

**Cuadro 4. Índices de diversidad de las cinco poblaciones de *V. planifolia*, fijadas de acuerdo con el origen geográfico y origen genético.**

Población	% LP	NAD	EE	NAE	EE	IIS	EE	HE	EE	HEI	EE
Chiapas	38.26	0.78	± 0.09	1.23	± 0.03	0.21	± 0.03	0.14	± 0.02	0.17	± 0.02
Quintana Roo	56.52	1.14	± 0.09	1.25	± 0.03	0.26	± 0.02	0.16	± 0.02	0.19	± 0.02
Puebla	55.65	1.15	± 0.09	1.32	± 0.03	0.30	± 0.03	0.20	± 0.02	0.24	± 0.02
Veracruz	55.65	1.12	± 0.09	1.25	± 0.03	0.26	± 0.02	0.17	± 0.02	0.18	± 0.02
Híbridos	92.17	1.84	± 0.05	1.33	± 0.02	0.36	± 0.02	0.22	± 0.01	0.23	± 0.01

% LP: porcentaje de loci polimórficos, NAD: número de alelos diferentes, EE: error estándar, NAE: número de alelos efectivos, IIS: índice informativo de Shannon, HE: heterocigocidad esperada, HEI: heterocigocidad esperada insesgada.

accesiones parentales, en la mayoría de las variables de los índices de diversidad se observó que las poblaciones de Puebla y Veracruz, México registraron valores altos, debido a que la región del Totonacapan (Puebla y Veracruz) es considerada como la zona donde se comenzó a cultivar *V. planifolia* (Bory *et al.*, 2008; Lubinsky *et al.*, 2008) y en la actualidad son los principales estados productores de México (Luis-Rojas *et al.*, 2020). Estos resultados indican que el material biológico de Puebla y Veracruz tiene potencial para iniciar un programa de mejoramiento genético por selección. Por otro lado, el grupo de híbridos superó los índices de diversidad genética de las poblaciones parentales, lo que sugiere que la hibridación es una estrategia que genera buenos resultados en la creación de material biológico con nuevas combinaciones genéticas con características agronómicas deseables. Los valores del índice de Shannon variaron de 0.21 a 0.30, menores que los reportados por Verma *et al.* (2009), quienes obtuvieron valores superiores a 0.5 con RFLPs e ISSR.

En el análisis de componentes principales se observó que los dos primeros componentes explicaron el 15.7 % de la diversidad, lo cual se considera bajo, ya que fueron necesarios al menos 10 componentes para poder explicar

más de 50 % de la diversidad genética presente en la población de vainilla estudiada (Figura 1). No obstante, de acuerdo con las pruebas Gap (Tibshirani *et al.*, 2009) y Elbow (Thorndike, 1953), se observaron dos grupos dentro de la población. El primer grupo estuvo conformado primordialmente por genotipos parentales, mientras que el segundo grupo estuvo integrado por los híbridos. En el primer grupo los genotipos parentales no formaron subgrupos con base en su origen geográfico, lo cual indicó que los genotipos de Veracruz, Puebla, Quintana Roo y Chiapas, México presentan alta similitud genética, debido a que la reproducción comercial para el establecimiento de nuevos huertos de vainilla se realiza por esquejes, y generalmente los productores de Quintana Roo y Chiapas adquieren material biológico de Veracruz y Puebla. Estas interrelaciones genéticas entre poblaciones de *V. planifolia* originarias de los estados de Veracruz y Quintana Roo también han sido reportadas por Ramos-Castellá *et al.* (2017).

De acuerdo con las distancias genéticas de Jaccard, los genotipos con mayor similitud fueron las cruces 111 × 2 y 111 × 39, con un valor de 0.54, mientras que el más alejado genéticamente fue el progenitor 111. En el análisis de agrupamiento, la prueba de remuestreo bootstrap

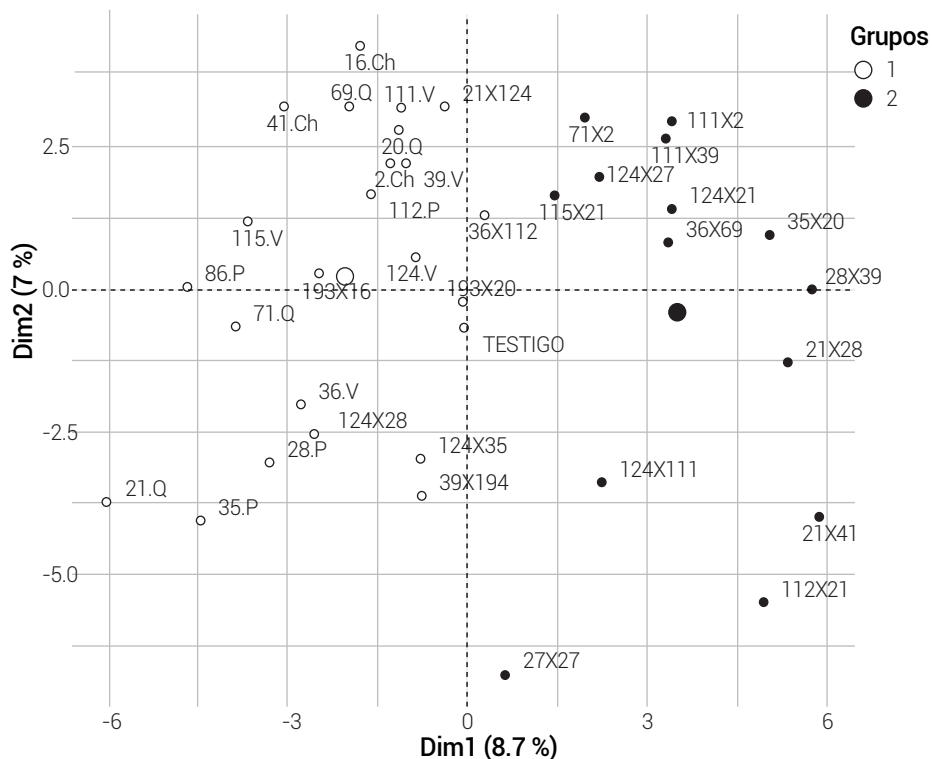


Figura 1. Dispersión de los 38 genotipos de *V. planifolia* agrupados de acuerdo con los dos primeros componentes principales (Dim). Las agrupaciones se realizaron en función de las pruebas de Gap (Tibshirani et al., 2009) y Elbow (Thorndike, 1953). Q: Quintana Roo, V: Veracruz, P: Puebla, Ch: Chiapas.

detectó bajos niveles de asociación entre los genotipos para la formación de grupos (Figura 2), estos resultados indican la presencia de una alta similitud genética entre los genotipos evaluados.

**Estructura genética en vainilla**

Con base en el estadístico  $\Delta K$ , el número de grupos más probable fue  $K = 2$ ; dicho resultado fue consistente con el valor encontrado por las pruebas de Gap (Tibshirani et al., 2009) y Elbow (Thorndike, 1953) del análisis de componentes principales. El primer grupo se conformó por los 16 progenitores y 11 híbridos. Cuando se usó un valor de ancestría al primer grupo mayor de 0.95, el subgrupo se conformó exclusivamente por las accesiones parentales de los estados de Quintana Roo, Puebla, Veracruz y Chiapas, México (Figura 3), lo que evidencia la existencia de un flujo genético en tales poblaciones, debido al intercambio de material biológico para el establecimiento de huertos comerciales de vainilla entre los estados de Veracruz, Puebla, Quintana Roo y Chiapas, causando que las poblaciones compartan una alta cantidad de alelos y que existan pocas diferencias alélicas entre las accesiones parentales.

El clon comercial utilizado como testigo en este estudio, y que es el más usado por los productores de vainilla en México, tuvo un grado de ancestría al grupo 1 de 0.75, lo cual denota un alto grado de similitud con los progenitores de vainilla. El segundo grupo se constituyó por 13 híbridos, de los cuales nueve tuvieron un grado de ancestría al grupo 2 mayor de 0.9. Tales híbridos fueron 21 x 28, 112 x 21, 124 x 21, 21 x 41, 36 x 69, 111 x 39, 111 x 2, 28 x 39 y 35 x 20, resultados que sugieren que dichos híbridos pueden contener combinaciones genéticas favorables para la producción de vainilla.

Aun cuando la variabilidad de *V. planifolia* pudiera ser baja en las poblaciones estudiadas, un arreglo similar fue reportado por Ramos-Castellá et al. (2017), quienes a pesar de estudiar cuatro especies de vainilla (*V. odorata*, *V. pompona*, *V. insignis* y *V. planifolia*) reportaron que el análisis bayesiano detectó dos grupos, el primero formado por *V. odorata*, *V. pompona* y *V. insignis*, y el segundo por todas las accesiones pertenecientes a *V. planifolia*, lo que confirma que existe un parecido genético entre los individuos, y por ende, una reducida variabilidad genética en *V. planifolia*.

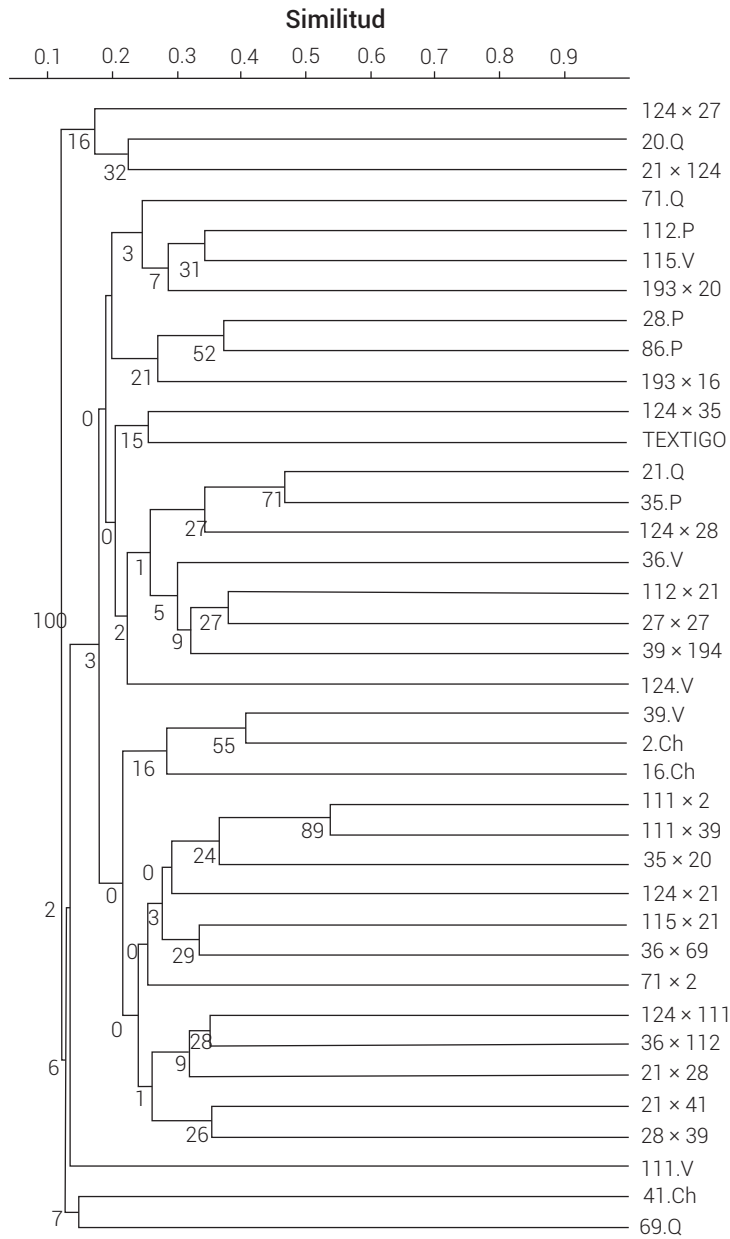


Figura 2. Dendrograma de los 21 híbridos de *V. planifolia*, 16 genotipos parentales y un testigo con base en las distancias genéticas de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. La evaluación de cada agrupamiento está basada en 1000 repeticiones con la técnica de remuestreo bootstrap. Q: Quintana Roo, V: Veracruz, P: Puebla, Ch: Chiapas.

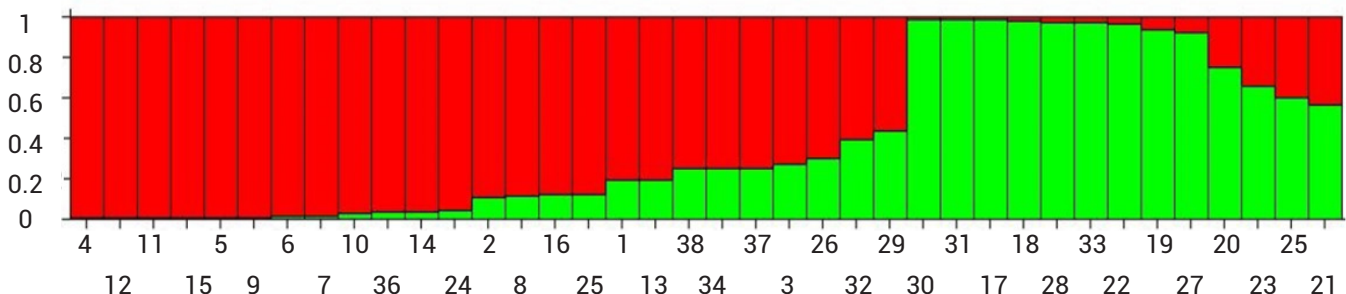


Figura 3. Estructura genética de los 38 genotipos de *V. planifolia* obtenidos por el análisis de agrupamiento bayesiano. Cada color representa la proporción de la probabilidad de pertenecer a cada grupo. 1-16: parentales, 17-38: híbridos.



### Incremento de la diversidad en vainilla

Cuando el AMOVA se llevó a cabo considerando sólo los genotipos parentales, el 100 % de la varianza genética se encontró dentro de las poblaciones, lo que sugiere que la variación entre las poblaciones de los estados de Veracruz, Puebla, Quintana Roo y Chiapas, México fue muy baja (Cuadro 3); además, las pruebas de Gap (Tibshirani et al., 2009) y Elbow (Thorndike, 1953) también lo confirmaron, al mostrar que existía un solo grupo; sin embargo, la inclusión de los híbridos en el análisis genético incrementó la diversidad poblacional, ya que las dos pruebas anteriores detectaron dos grupos; igualmente, hubo un 3 % en la diversidad entre poblaciones. Adicionalmente, se observó que el grupo con el mayor porcentaje de loci polimórficos estuvo compuesto por los híbridos. Todos estos datos demuestran que la hibridación entre individuos dentro y entre poblaciones de diferente origen geográfico es un mecanismo eficiente para incrementar la diversidad genética en el cultivo de vainilla, por lo que es conveniente seguir practicando hibridación intraespecífica, y de ser posible, interespecífica, considerando que plantas de diferente origen presentan características genéticas diferentes que pueden ser aprovechadas para la obtención de materiales con mayor potencial agronómico.

### CONCLUSIONES

La variación molecular dentro de poblaciones es mayor que entre poblaciones, lo cual implica la necesidad de conservar más individuos de cada población. La hibridación entre individuos de diferente origen es una herramienta factible para incrementar la diversidad entre poblaciones, misma que puede ser usada en un programa de mejoramiento genético.

### BIBLIOGRAFÍA

- Araújo F. S., M. V. Pacheco, F. A. Vieira, C. S. Ferrari and K. P. T. das Chagas (2016) ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. *Idesia* 34:47-52, <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000300007>
- Azofeifa-Bolaños J. B., L. R. Gigant, M. Nicolás-García, M. Pignal, F. B. Tavares-González, E. Hågsater, ... and M. Grisoni (2017) A new vanilla species from Costa Rica closely related to *V. planifolia* (Orchidaceae). *European Journal of Taxonomy* 284:1-26, <https://doi.org/10.5852/ejt.2017.284>
- Besse P., D. Da Silva, S. Bory, M. Grisoni, F. Le Bellec and M. F. Duval (2004) RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science* 167:379-385, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.007>
- Bory S., M. Grisoni, M.-F. Duval and P. Besse (2008) Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55:551-571, <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9260-3>
- Botstein D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Cameron K. M. (2018) *Vanilla* phylogeny and classification. In: Handbook of Vanilla Science and Technology, 2nd edition. D. Havkin-Frenkel and F. C. Belanger (eds.). Wiley-Blackwell. Oxford, UK. pp:375-390, <https://doi.org/10.1002/9781119377320.ch20>
- Divakaran M., K. N. Babu, P. N., Ravindran and K. V. Peter (2006) Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae* 108:414-422, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.02.018>
- Earl D. A. and B. M. vonHoldt (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359-361, <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno G., S. Regnaut and J. Goudet (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Ferreira A. W. C., E. P. Franken and E. R. Pansarin (2020) Confirmation of the presence of *Vanilla hartii* Rolfe (Orchidaceae, Vanilloideae) in Brazil. *Check List. The Journal of Biodiversity Data* 16:951-956, <https://doi.org/10.15560/16.4.951>
- Flanagan N. S., N. H. Ospina-Calderón, L. T. García A., M. Mendoza and H. A. Mateus (2018) A new species of *Vanilla* (Orchidaceae) from the North West Amazon in Colombia. *Phytotaxa* 364:250-258, <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.364.3.4>
- Hammer Ø., D. A. T. Harper and P. D. Ryan (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:1-9.
- Hernández-Leal E., C. R. Castillo-Martínez, D. Reyes-López, T. Corona-Torres, C. H. Avendaño-Arrazate, O. J. J. García-Zavala, ... y O. Bonilla-Barrientos (2016) Acimatación de híbridos intraespecíficos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, obtenidos *in vitro*. *Agro Productividad* 9:72-77.
- Lemenkova P. (2019) K-means clustering in R libraries cluster and factoextra for grouping oceanographic data. *International Journal of Informatics and Applied Mathematics* 2:1-26, <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.9891203>
- Lubinsky P., S. Bory, J. Hernández H., S. C. Kim and A. Gómez-Pompa (2008) Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany* 62:27-138, <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>
- Luis-Rojas S., B. Ramírez-Valverde, M. Díaz-Bautista, J. Pizano-Calderón y C. Rodríguez-López (2020) La producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) en México: análisis y pronóstico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11:175-187, <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i1.2065>
- Martínez-Castillo J., D. Zizumbo-Villareal, P. Gepts and P. Colunga-GarcíaMarín (2007) Gene flow and genetic structure in the wild-weedy-domesticated complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican center of domestication and diversity. *Crop Science* 47:58-66, <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.04.0241>
- Nagy S., P. Poczaí, I. Cernák, G. A. Mousapour, G. Hegedús and J. Tallér (2012) PICcal: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics* 50:670-672, <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>
- Parizaca A. D. (2019) *Vanilla yanesha* (Orchidaceae), a new species of the membranaceous-leaved group from the central rainforest of Peru. *Willdenowia* 49:5-9, <https://doi.org/10.3372/wi.49.49101>
- Peakall R. and P. E. Smouse (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Prevost A. and M. J. Wilkinson (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98:107-112, <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
- Pritchard J. K., M. Stephens and P. Donnelly (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959, <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Ramos-Castellá A. L., L. G. Iglesias-Andreu, J. Martínez-Castillo, M. Ortíz-García, R. H. Andueza-Noh, P. Octavio-Aguilar and M. Luna-Rodríguez

- (2017) Evaluation of molecular variability in germplasm of vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in Southeast Mexico: implications for genetic improvement and conservation. *Plant Genetic Resources* 15:310-320, <https://doi.org/10.1017/S1479262115000660>
- Rasoamanalina R. O. L., K. Mirzaei, M. El Jaziri, A. R. Ramírez R. and P. Bertin (2023) Diversity and structure assessment of the genetic resources in a germplasm collection from a vanilla breeding programme in Madagascar. *Plant Genetic Resources* 21:548-557, <https://doi.org/10.1017/S1479262123000631>
- Ray T. S. (1990) Metamorphosis in the Araceae. *American Journal of Botany* 77:1599-1609, <https://doi.org/10.2307/2444492>
- Reyes-Alemán J. C., E. Valadez-Moctezuma, L. Simuta-Velázquez, A. F. Barrientos-Priego and C. Gallegos-Vázquez (2013) Distinction of species of the genus *Persea* by RAPD and ISSR DNA markers. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4:517-529, <https://doi.org/10.29312/remexca.v4i4.1185>
- Rimieri P. (2017) Genetic diversity and genetic variability: two different concepts associated to plant germplasm and breeding. *BAG. Journal of Basic and Applied Genetics* 28:7-13.
- Roldan-Ruiz I. J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker and M. De Loose (2000) AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding* 6:125-134, <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>
- Schlüter P. M., M. A. Soto A. and S. A. Harris (2007) Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Economic Botany* 61:328-336, [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2007\)61\[328:GVIVPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2007)61[328:GVIVPO]2.0.CO;2)
- Soto A. M. A. and R. L. Dressler (2010) A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana* 9:285-354, <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.12065>
- Stewart C. N. (1997) Rapid DNA extraction from plants. In: *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*. Springer Lab Manuals. M. R. Micheli and R. Bova (eds.). Springer, Berlin, Germany. pp:25-28, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60441-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60441-6_4)
- Thorndike R. L. (1953) Who belongs in the family? *Psychometrika* 18:267-276, <https://doi.org/10.1007/BF02289263>
- Tibshirani R., G. Walther and T. Hastie (2001) Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B Statistical Methodology* 63:411-423, <https://doi.org/10.1111/1467-9868.00293>
- Varshney R. K., K. Chabane, P. S. Hendre, R. K. Aggarwal and A. Graner (2007) Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science* 173:638-649, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.08.010>
- Verma P. C., D. Chakrabarty, S. N. Jena, D. K. Mishra, P. K. Singh, S. V. Sawant and R. Tuli (2009) The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: comparative results for RAPD and ISSR. *Industrial Crops and Products* 29:581-589, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.11.006>
- Villanueva-Viramontes S., M. Hernández-Apolinar, G. C. Fernández-Concha, A. Dorantes-Euán, G. R. Dzib and J. Martínez-Castillo (2017) Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: systematic analyses with ISSR and ITS. *Botanical Sciences* 95:169-187, <https://doi.org/10.17129/botsci.668>
- Zietkiewicz E., A. Rafalski and D. Labuda (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183, <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>