

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FILOGENIA DEL GÉNERO *Vanilla*
EN EL DISTRITO DE BUENAVENTURA-VALLE DEL CAUCA (COLOMBIA)**

FRANCISCO HERNANDO MOLINEROS HURTADO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PALMIRA

2012

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FILOGENIA DEL GÉNERO *Vanilla*
EN EL DISTRITO DE BUENAVENTURA-VALLE DEL CAUCA (COLOMBIA)**

FRANCISCO HERNANDO MOLINEROS HURTADO

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de
Magister en Ciencias Biológicas**

Línea de investigación: Recursos Fitogenéticos Neotropicales

Director:

Joel Tupac Otero Ospina Ph. D.

Docente – Universidad Nacional de Colombia- sede Palmira

Asesor:

Nicola S. Flanagan

Bióloga Genetista Ph.D

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PALMIRA

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN RECURSOS FITOGENÉTICOS
NEOTROPICALES

En Palmira a los 07 días del mes de Junio de 2012, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores: JHON OCAMPO e INES SANCHEZ

Para calificar la Tesis de Grado de:

**FRANCISCO HERNANDO MOLINEROS
HURTADO**

Titulada:

“Caracterización morfológica y filogenia del genero *vanilla* en el distrito de Buenaventura-Valle del Cauca (Colombia)”, bajo la dirección de los doctores Joel Tupac Otero Ospina y Nicola Sian Flanagan.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores JHON OCAMPO e INES SANCHEZ, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADO

REPROBADO

JHON OCAMPO

INES SANCHEZ

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a DIOS todo poderoso quien cada día me dio las fuerzas para continuar a pesar de las dificultades.

A mi señora madre AMELIA HURTADO que con su guía, latigazos y consejos a lo largo de toda mi vida logro formar un hombre de bien y dispuesto a luchar por lo que realmente quiere.

A mi hijo el *AGRONOMITO* KEVIN ANDRES MOLINEROS DIAZ, quien ha sido la fuerza que me ha motivado a ser mejor cada día.

A mi compañera JESSY SULEIMA DIAZ HERNANDEZ, quien ha estado conmigo en todo momento.

A mi hermana NATHALY MOLINEROS HURTADO, quien contribuyó con su carretada de arena a la realización de este objetivo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

El Msc. ROBER TULIO GONZALES MINA, quien con su mentoría ha logrado contribuir a mi formación personal y profesional.

El agricultor LUIS ALVARO RIVAS, quien permitió el uso de su conocimiento, tiempo, dedicación y recursos logísticos para realizar mucho de esta investigación.

La Ph. D. NICOLA S. FLANAGAN, pontificia universidad javeriana, Cali quien se convirtió en un gran apoyo, académico y emocional, para la realización de este trabajo.

El Ph. D. JOEL TUPAC OTERO OSPINA, por su colaboración y apoyo académico y en el desarrollo de este trabajo.

La Ph. D. ANA TERESA MOSQUERA ESPINOSA, quien contribuyo con su colaboración emocional, académica y estratégica de manera significativa para que este trabajo se llevara a feliz término.

GUNTER GERLACH, quien contribuyo académicamente a la construcción del presente trabajo.

Al proyecto HERMES por el apoyo en la financiación de la investigación.

A la Pontificia Universidad Javeriana-Cali, por permitir el uso de sus instalaciones para la realización de los trabajos moleculares.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
INTRODUCCIÓN	1
1. EL CULTIVO DE VANILLA	7
1.1 Descripción botánica del género	8
1.2 Taxonomía y filogenia	10
1.3 Diversidad del género	13
1.4 Distribución del género	25
1.5 Distribución de <i>Vanilla planifolia</i>	25
1.6 Origen del cultivo	26
1.7 Diversidad genética de los cultivos	28
2 ESTUDIOS MOLECULARES	30
2.1 ADN barcoding (Mat K)	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 Material vegetal	34
3.2 Caracterización morfológica	36
3.3 Extracción de ADN	36
3.4 PCR Mat K	38

3.5 Secuenciación de ADN	40
3.6 Análisis filogenético	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 Caracterización morfológica... ..	42
4.1.2 Impresiones de epidermis	125
4.2 Análisis molecular de secuencias de ADN	137
5. CONCLUSIONES	144
6. RECOMENDACIONES	146
7. BIBLIOGRAFÍA	147
8. ANEXOS	157

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>V. bicolor</i> sobre árbol en descomposición expuesta a pleno sol con múltiples Inflorescencias.	46
Figura 2. Detalle de la inflorescencia de <i>V. bicolor</i>	46
Figura 3. Sistema de raíces asociado a reservorios de materia orgánica en parte aérea de palma de milpesos.	47
Figura 4. Estructura vegetativas de <i>V. bicolor</i>	47
Figura 5. Unión de la columna y el ovario. Ovario con inclusiones blancas en la epidermis.	48
Figura 6. Callo penicilado, con escamas ramificadas en el ápice.	48
Figura 7. Zona papilosa anexa al callo penicilado. Con papilas ramificadas en el ápice.	49
Figura 8. Zona pubescente con tricomas hacia la base del labelo.	49
Figura 9. Tercio medio de sépalo dorsal con presencia de venas.	50
Figura 10. Tercio medio de pétalo con presencia de vena central y venas auxiliares.	50
Figura 11. Ápice de la columna con estigma bilobulado.	51
Figura 12. Antera en el ápice de la columna.	51
Figura 13. <i>V. cribbiana</i> con inflorescencia.	58
Figura 14. Hoja de <i>V. cribbiana</i>	59
Figura 15. Flor de <i>V. cribbiana</i>	59

Figura 16. Fruto de <i>V. cribbiana</i>	60
Figura 17. <i>V. trigonocarpa</i> con inflorescencia.	66
Figura 18. Inflorescencias de <i>V. trigonocarpa</i>	66
Figura 19. Brácteas alargadas en <i>V. trigonocarpa</i>	67
Figura 20. Hormigas patrullando la inflorescencia.	67
Figura 21. Flora de <i>V. trigonocarpa</i>	68
Figura 22. Fruto de <i>V. trigonocarpa</i>	68
Figura 23. Callo penicilado en <i>V. trigonocarpa</i>	69
Figura 24. Antera (parte superior), aletas membranosas (parte media) y róstelo parte inferior.	69
Figura 25. Estigma bilobulado emergente.	70
Figura 26. Ápice del labelo en <i>V. trigonocarpa</i>	70
Figura 27. Margenes del labelo.	71
Figura 28. Tricomas hacia la base del labelo.	72
Figura 29. Herbivoría por insectos <i>Chrysomelidae</i>	72
Figura 30. <i>V. rivasii</i> con inflorescencia terminal y frutos.	78
Figura 31. Hojas de <i>V. rivasii</i>	78
Figura 32. Inflorescencia de <i>V. rivasii</i>	79
Figura 33. Brácteas florales y foliosas en <i>V. rivasii</i>	79
Figura 34. Flor de <i>V. rivasii</i>	80
Figura 35. Detalle de flor de <i>V. rivasii</i> . Interior: parte superior ápice de la columna, parte inferior callo penicilado.	80

Figura 36. Ovario de <i>V. rivasii</i>	81
Figura 37. Callo penicilado de <i>V. rivasii</i>	81
Figura 38. Tricomas hacia la base del labelo.	82
Figura 39. Antera (parte superior) y róstelo parte inferior.	82
Figura 40. Estigma (parte inferior).	83
Figura 41. Tricomas en tercio superior de la columna (parte ventral)	83
Figura 42. Labelo expandido.	84
Figura 43. Frutos de <i>V. rivasii</i>	84
Figura 44. <i>V. aff. Dressleri</i>	89
Figura 45. Tallo y raíz adventicia de <i>V. aff. dressleri</i>	90
Figura 46. Inflorescencia y brácteas.	90
Figura 47. Flor de <i>V. aff. dressleri</i>	91
Figura 48. Labelo trilobulado con ápice bilobulado.	92
Figura 49. Callo penicilado con escamas laceradas.	92
Figura 50. Calículos en la unión del ovario y la columna.	93
Figura 51. Fusión parcial de sépalos tercio proximal hacia la base.	93
Figura 52. Antera con aletas membranosas.	94
Figura 53. Estigma de <i>V. aff. Dressleri</i>	94
Figura 54. Frutos de <i>V. aff. dressleri</i>	95
Figura 55. <i>V. planifolia</i>	100
Figura 56. Hojas de <i>V. planifolia</i> en desarrollo.	100
Figura 57. Inflorescencia de <i>V. planifolia</i>	101

Figura 58. Brácteas membranosas.	101
Figura 59. Flor de <i>V. planifolia</i>	102
Figura 60. Fruto de <i>V. planifolia</i>	102
Figura 61. Antera (superior) y estigma (inferior).	103
Figura 62. Callo penicilado.	103
Figura 63. Ápice del labelo con zona papilosa	104
Figura 64. Zona pubescente hacia la base del labelo.	104
Figura 65. Planta de <i>V. odorata</i>	109
Figura 66. Hoja de <i>V. odorata</i>	110
Figura 67. Inflorescencia de <i>V. odorata</i>	110
Figura 68. Brácteas de <i>V. odorata</i>	111
Figura 69. Flor de <i>V. odorata</i>	111
Figura 70. Frutos de <i>V. odorata</i>	112
Figura 71. Ápice del labelo de <i>V. odorata</i>	112
Figura 72. Bordes del labelo de <i>V. odorata</i>	113
Figura 73. Base del labelo pubescente.	114
Figura 74. Callo penicilado.	114
Figura 75. Antera (superior) y róstelo (inferior)	115
Figura 76. Tricomas en la parte ventral de la columna.	115
Figura 77. Estigma de <i>V. odorata</i>	116
Figura 78. Labelo de <i>V. aff. dressleri</i>	121
Figura 79. Inflorescencia con brácteas foliosas en la base.	121

Figura 80. Fruto de <i>V. aff. dressleri</i>	122
Figura 81. Ápice del labelo.	122
Figura 82. Zona pubescente hacia la base del labelo.	123
Figura 83. Callo penicilado	123
Figura 84. Estigma de <i>V. aff. dressleri</i>	124
Figura 85. Flor disectada de <i>V. aff. dressleri</i>	124
Figura 86. Distribución de la densidad estomática.	126
Figura 87. Distribución del ancho estomático.	128
Figura 88. Distribución de la altura estomática.	129
Figura 89. Cutículas de <i>V. bicolor</i> . A. superficie adaxial (40x), B. superficie abaxial (40x), C y D. superficie abaxial, con detalle de aparato estomático (100x).	133
Figura 90. Superficie abaxial de <i>V. cribbiana</i>	134
Figura 91. Cutículas de <i>V. trigonocarpa</i> A. superficie adaxial (40x), B. superficie abaxial (40x), y C. superficie abaxial, con detalle de aparato estomático (100x).	134
Figura 92. Cutículas de <i>V. rivasii</i> . A. superficie adaxial (40x), B. superficie abaxial (40x), C y D. superficie abaxial, con detalle de aparato estomático (100x).	135
Figura 93. Superficie abaxial de <i>V. aff. cribbiana</i>	135
Figura 94. Cutículas de <i>V. planifolia</i> A. superficie adaxial (40x), B. superficie abaxial (40x), y C. superficie abaxial,	

con detalle de aparato estomático (100x).	136
Figura 95. Cutículas de <i>V. odorata</i> A. superficie adaxial (40x)	
B. superficie abaxial (40x).	136
Figura 96. Cutículas de <i>V. aff rivasii</i> A. superficie adaxial (40x)	
B. superficie abaxial (40x).	137
Figura 97. Cutículas de <i>V. aff. dressleri</i> A. superficie abaxial (40x)	
B. superficie abaxial (100x).	137
Figura 98. Análisis filogenético molecular por método de	
Máxima Verosimilitud.	143

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Material vegetal utilizado en la investigación.	35
Tabla 2. ANOVA para densidad de estomas por especie	126
Tabla 3. ANOVA para ancho de estomas por especie	128
Tabla 4. ANOVA para altura de estomas por especie	128
Tabla 5. Datos de cristales y células subsidiarias	130
Tabla 6. Datos complementarios a secuencias de ADN	139

RESUMEN

En la presente investigación se realizó la caracterización morfológica y molecular mediante el uso de secuencias de ADN de las especies del género *Vanilla* presentes en el distrito de Buenaventura. Mediante descriptores morfológicos se reconocieron 6 especies y 3 afiliaciones a especies en el Distrito de Buenaventura, Una especie *Vanilla rivasii* es propuesta como nueva especie y tres especies *V. bicolor*, *V. cribbiana* y *V. planifolia* como nuevos reportes para Colombia. Las demás especies corresponden a *V. trigonocarpa*, *V. aff. dressleri*, *V. odorata*, *V. aff. cribbiana* y *V. aff. rivasii*.

Se utilizaron datos de secuencias de ADN del gen de cloroplasto *MatK* para la evaluación de la diversidad genética de estas especies, y la construcción de la filogenia, en la cual se generaron seis grupos de acuerdo a la cercanía genética.

ABSTRACT

The present study characterized the morphological diversity, and molecular diversity using ADN sequences of species of the genus *Vanilla* occurring in the district of Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia.

Using morphological descriptors six species were recognized, as well as three additional morphotypes affiliated to species. One morphotype, *Vanilla rivasii* is proposed as a new species, and the three species *V. bicolor*, *V. cribbiana* and *V. planifolia* are new reports for Colombia.

INTRODUCCIÓN

Por "Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura" se entiende cualquier material genético de origen vegetal de valor real o potencial para la alimentación y la agricultura (FAO, 2012; Karp *et al.*, 1997).

Con el propósito de ofrecer posibilidades para ser utilizados en programas de mejoramiento, estos materiales se agrupan en un "genepool" o acervo genético, el cual está constituido por toda la información genética de una población de organismos, que normalmente se aplica al conjunto de especies filogenéticamente relacionadas, que estructuran un género. Los acervos genéticos se encuentran clasificados en tres niveles, acervo genético primario, el cual incluye todas las poblaciones o razas que constituyen la especie de interés formado híbridos fértiles, con segregación normal y apareamiento de cromosomas; acervo genético secundario, integrado por todas las especies biológicas parientes que pueden cruzarse con la especie de interés, pero con flujo genético restringido; y acervo genético terciario, que incluye todas las especies que pueden cruzarse con la especie de interés generando progenies anómalas, con altos niveles de letalidad o completamente estériles incapaces de manifestar los efectos de los intercambios génicos, a través del uso de procedimientos tradicionales (Harlan y De Wet, 1971).

Los Recursos Fitogenéticos (RFG's) constituyen la materia prima que los agricultores y los científicos necesitan para desarrollar nuevas variedades que permitirán a la humanidad hacer frente a potenciales desafíos como plagas en las plantas, cambios del clima, y también para enriquecer la dieta alimentaria, y de esta manera su adecuado manejo y conservación contribuirán al alcance de los Objetivos de Desarrollo del Milenio, en particular el 1, la erradicación del hambre y la pobreza extrema, y el 7, que se refiere a garantizar la sostenibilidad del medio ambiente (FAO, 2012), además, este acervo es la más valiosa fuente de materias primas para la industria de alimentos, químicos, fibras, medicamentos, herbicidas, e insecticidas (Abalos-Romero, 2001).

La conservación y uso de los Recursos Fitogenéticos (RFG's) es esencial para que continúe el mantenimiento y mejoramiento de la producción agrícola y forestal y, de esta manera, sostener el desarrollo y aliviar la pobreza. Los RFG's para la agricultura incluyen materiales propagados reproductiva y vegetativamente de 1) cultivos actualmente usados y nuevas variedades desarrolladas, 2) cultivos obsoletos, 3) razas y cultivos tradicionales de agricultores, 4) parientes silvestres de especies cultivadas y 5) estirpes genéticas incluyendo elites y líneas corrientes de mejoramiento, aneuploides y mutantes (Frankel *et al.*, 1995, citado por Karp *et al.*, 1997).

Los RFG's pueden conservarse *in situ* o *ex situ*, la primera se refiere a la conservación, mantenimiento y recuperación de los ecosistemas y hábitats

naturales donde se encuentran las poblaciones de especies de interés, y en el caso de las especies domesticadas y cultivadas, los entornos donde han desarrollado sus propiedades específicas. La segunda se refiere al almacenamiento de material vegetal fuera de su hábitat natural, siendo los bancos de germoplasma las principales instalaciones para tal fin, donde se almacenan a bajas temperaturas y humedad las semillas (Frankel *et al.*, 1995). Los sistemas de conservación *ex situ* surgen como una medida complementaria a los mecanismos de conservación *in situ*, orientados principalmente a resguardar el material genético de las especies de importancia para el mejoramiento genético, la industria alimenticia, farmacéutica, maderera, etc, permitiendo la conservación de especies vulnerables a procesos de erosión genética (Seguel, 2001).

El objetivo de la conservación de los RFG's es preservar la más amplia muestra de la diversidad genética existente de las especies objeto científica y económicamente viables, incluso genes, rasgos y genotipos reconocidos en la actualidad. El primer paso para la conservación de los recursos genéticos requiere de la caracterización de la diversidad presente en los diferentes acervos genéticos y en el banco de genes. En la primera instancia, esta usualmente involucra la descripción de la variación para caracteres morfológicos, particularmente caracteres agromorfológicos de interés directo para el usuario. La información genética proporcionada por caracteres morfológicos es también frecuentemente limitada. La caracterización por

caracteres morfológicos no puede, sin embargo, ser remplazada por ninguna técnica molecular. Los resultados de estudios moleculares o bioquímicos deberían ser considerados como complementarios a la caracterización morfológica (Karp *et al.*, 1997).

La caracterización morfológica se basa en el uso de descriptores definidos como atributos cuya expresión es fácil de medir de la forma, estructura o comportamiento de una accesión, y sirve para discriminar entre fenotipos. Los descriptores deben ser altamente heredables, pueden ser detectados a simple vista y se expresan de igual forma en todos los ambientes. (Hidalgo, 2003). Los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente; los más importantes son; la flor y el fruto en este orden de menor importancia se tienen las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares (Enríquez, 1991). Unido a lo anterior, los descriptores morfológicos permiten medir diversas variables principalmente aquellas de interés agronómico, que vayan de acuerdo con las características deseables por los agricultores y mejorados y/o que permitan la identificación de los materiales tratados, por tal motivo, la descripción y adecuada caracterización de las plantas, permiten la generación de conocimiento entorno a las especies lo cual se traduce en su entendimiento y posible incorporación en programas de mejoramiento que logren potenciar sus caracteres de interés (FAO, 2012).

Complementario a los estudios de tipo morfológico, se presentan los estudios moleculares los cuales se basan en las técnicas de biología molecular y particularmente el uso de marcadores moleculares, los cuales han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. Los marcadores moleculares han aportado información relevante en áreas clave de la conservación *in situ* y *ex situ* (Karp *et al.*, 1997).

Según el IPGRI y Cornell University, (2003), la mayoría de los marcadores moleculares se basan en la técnica de reacción en cadena de polimerasa ó PCR (Polymerase Chain Reaction), una técnica que permite la ampliación de regiones específicas del ADN dependiendo de los iniciadores (o primers) empleados. Existen varios tipos de marcadores de ADN.

Por otro lado se encuentran las secuencias de ADN, las cuales constituyen la información genética heredable del núcleo celular, plásmidos, mitocondrias y cloroplastos (en plantas) que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos. Así pues, determinar la secuencia de ADN es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así como en campos aplicados, como la investigación forense (López, 1999). En plantas las bajas tasas de sustitución del ADN ha mitocondrial conducido a la búsqueda de alternativas para regiones para código de barras (**barcoding**) (CBOL, 2009).

Se utilizan comúnmente las regiones de plástido de genes codificantes (*matK*, *rbcL*, *rpoB*, and *rpoC1*), y espaciadores no codificantes (*atpF-atpH*, *trnH-psbA*, y *psbK-psbI*). Sin embargo, la utilización de *matK* e ITS (Espaciadores Transcritos Internos) en estudios intragenéricos son más útiles debido a que presentan alta tasa de mutación en comparación a *rbcL*, lo que resulta muy útil en estudios genéticos de tipo interespecífico (Cameron, 2004).

La selección del tipo de marcador a usar depende de los objetivos del estudio, de la especie de interés y de la disponibilidad de recursos técnicos y financieros con que se cuente (López, 1999).

Teniendo en cuenta lo anterior, las investigaciones para el uso de los RFG's involucran ambos métodos de caracterización (morfológico y molecular) para generar la mayor cantidad de información sobre la especie en cuestión. Por tal motivo, la presente investigación pretende realizar la caracterización e identificación de las especies de *Vanilla* del Distrito de Buenaventura basándose en caracteres morfológicos y los moleculares mediante el uso de secuencias de ADN del gen de cloroplasto *matK*, debido a que se trata de material de diferentes especies del acervo genético secundario. Resaltando la importancia de este género (perteneciente a la familia Orchidaceae) en sus frutos que contienen compuestos aromáticos aprovechables por la industria culinaria, cosmética, medicinal, perfumería, entre otras (Pridgeon, *et al.*, 2003), y del cual muchas de las especies de *Vanilla*, incluyendo *V. planifolia* en la

naturaleza están bajo peligro debido a la explotación indiscriminada de sus hábitats naturales unido por pocos esfuerzos de conservación (Verma, *et al.*, 2009).

1. EL CULTIVO DE VANILLA

Vainilla es una de las especias más importantes a nivel mundial ya que sus frutos contienen compuestos aromáticos aprovechables por la industria culinaria, cosmética, medicinal, perfumería, entre otras. La fuente de vainilla natural solamente proviene de los frutos curados de dos orquídeas propagadas clonalmente y polinizadas a mano: *Vanilla planifolia* G. Jackson y *V. tahitensis* J. W. Moore El 95% de todo la producción vainillera mundial se deriva de la especie más cultivada *V. planifolia* (Loeillet, 2003).

Otras especies aromáticas son cultivadas o cosechadas en estado silvestres, pero no tienen importancia económica, por ejemplo, *V. pompona* Schiede, y *V. odorata* C. Presl, en América (Soto-Arenas, 2003). La vainilla natural ha tenido un competidor desde hace muchas décadas: la vainillina sintética. Ésta se sintetiza a partir de la lignina de algunas coníferas, del eugenol y de otras sustancias y es mucho más barata que la vainilla natural (Soto-Arenas, 2003).

El cultivo de la vainilla se encuentra disminuyendo su área plantada y países productores se han visto en serios inconvenientes por el consumo de *Vanilla* sintética, enfermedades en las plantaciones y algunos desastres naturales. Según FAOSTAT (2012) para el año 2008 se cultivaron 76815 ha de las cuales se obtuvo una producción promedio de 9803 toneladas (ton), disminuyendo a 73480 ha para el año 2009 (9815 ton), y 72412 ha para el año 2010 (6680 ton).

Su alto valor económico representa para las comunidades cultivadoras una gran fuente de ingresos, sin embargo el mercado mundial de vainilla es muy inestable por diversas causas, en las que se pueden mencionar desastres naturales, cambio climático y conflictos sociales en los países productores, lo que ocasiona que las compañías consumidoras empiecen a sustituir fuentes naturales de vainillina por sintéticas que presentan un costo más bajo (Soto-Arenas, 2006).

1.1 Descripción botánica del género

Vanilla Plumier ex Miller, su nombre es derivado de la forma latinizada del español *vainilla*, pequeña vaina, en alusión a los frutos parecidos a vainas de la *V. planifolia* cultivada.

Es una orquídea perenne, terrestre, trepadora, de *tallo* flexible, herbáceo, cilíndrico o cuadrangular, simple o ramificado, de color verde brillante,

constituido por entre nudos. *Las hojas* son no articuladas, alternas con arreglo dístico o espiral subsésiles, membranosos, coriáceas o carnosas, de forma oblonga-elíptica lanceolada, ápice agudo acuminado. En los nudos, al lado opuesto de la hoja, desarrolla pares de raíces advertencias aéreas con las cuales se adhiere a los árboles u otros soportes. La hoja es una estructura importante, dado que su morfología es útil para la identificación de la especie y la variedad de la planta de vainilla. *Las inflorescencias* se producen en racimos axilares de diez a veinte flores colocadas en espiral, teniendo hojas parecidas a brácteas y flores a distancia, o diferente de los ejes vegetativo y congestionada, con una escala similar a las brácteas del denso raquis, a veces, intermedia entre ambos extremos, a veces las brácteas deciduas. *La flor* usualmente es vistosa, de corta vida, resupinada, perianto deciduo una vez la flor es fertilizada; algunas veces fragancia fuerte. *Sépalos*, libres, planos a contorsionados y ondulado, liso, raramente granulado o verrugoso. *Pétalos* libres, extenso y reflexo o contorsionado u ondulado frecuentemente con quilla dorsal. *Labelo* totalmente libres (raro) a totalmente fusionado a los márgenes de la columna, formando una apertura, en forma de embudo; sencillo a lobulado de diversas maneras por lo general largos como garras, disco con quillas longitudinales, tricomas, las verrugas o las venas engrosadas-rugosas, a menudo con un callo penicilado formado por un grupo de, escamas retrorsas fimbriadas. *Columna* semi cilíndrica o triangular, directamente en forma de arco, frecuentemente pubescente en la superficie ventral, y algunas veces con quillas basales;

estigma variable, formando una cavidad transversa engrosada, márgenes pegajosos, frecuentemente lóbulos laterales emergentes; algunas veces el lóbulo medio del estigma con una estrecha banda pegajosa a lo largo del margen (con una especie primitiva de rostelo), pero el material viscoso ausente en otros; anteras versátiles terminales, semierectas, a menudo sostenida por un filamento diferente; algunas veces con proyecciones parecidas a cuernos; el apice de la columna con aletas. Polen en mónadas, no forma polinios distintos y crecen en unidad. *Ovario* articulado al perianto, unilocular, raramente con un cálculo poco visible; sulcado, liso raramente granuloso. *Fruto* es una baya dehiscente o ligeramente dehiscente, usualmente abre a lo largo de dos líneas y forma dos válvulas desiguales; a veces fuertemente fragante; con semillas relativamente grandes y con cubierta esclerótica, superficie lisa a ligeramente verrugosa. (Damirón, 2004; Pridgeon, *et al.*, 2003; Asociación Naturland, 2000).

1.2 Taxonomía y filogenia

La familia *Orchidaceae* Juss, la cual contiene más de 800 géneros (incluyendo *Vanilla*) con más de 25.000 especies (Govaerts *et al.* 2006; Mabberley, 1993), distribuidas en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Constituye una de las familias más numerosas entre las angiospermas, siendo uno de los componentes de la biodiversidad más significativo en los trópicos y subtrópicos (Hammel, 1990).

La clasificación y filogenia dentro de las Orchidaceae es una de las más problemáticas en el grupo de angiospermas y que probablemente ningún otro grupo presenta un grado de variación tan grande (Rasmussen, 1982).

Estudios filogenéticos moleculares realizados por Fay y Krauss (2003) y Cameron (2004), usando ADN plástido dentro de la familia Orchidaceae, han cambiado sustancialmente la manera como *Vainilla* y sus aliados están ahora tratados por orquideólogos. Debido a que los estudios previos a los moleculares implementaban solo caracteres morfológicos y bioquímicos.

Estudios realizados utilizando secuencias de ADN para el gen plástido *rbcL* dividió la familia Orchidaceae en cinco grandes clados monofiléticos: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae. Correspondiendo estos clados a las sub-familias clásicamente reconocidas a excepción de la Vanilloideae, la cual se considera ahora una nueva subfamilia (Cameron *et al.* 1999). Otras secuencia de datos para el gen *psaB* mostraron la misma división de la familia en cinco clados monofiléticos, pero no resolvió la organización de las sub-familias Cyripedioideae y Vanilloideae (Cameron 2004).

La subfamilia Vanilloideae se compone de dos sub-tribus: Pogonieae y Vanillineae (Cameron 1996; Cameron y Chase 1999). Del mismo modo, secuencias de otros genes se utilizaron para completar las relaciones filogenéticas de este grupo filogenético: *atpB* (Cameron, 2005), *psbB* / *psbC* especialmente para *Vanilla* (Cameron y Molina 2006).

Vanilla es un grupo antiguo, y muchos grupos morfológicos dentro de él son monofiléticos. Recientes análisis filogenéticos han mostrado que el género *Vanilla* está estrechamente relacionado con el género suramericano *Dictyophyllaria* Garay y *Epistephium* Kunth y el género aclorófilo *Lecanorchis* Blume (Cameron, 1996; Cameron *et al.*, 1999).

El número de especies para el género *Vanilla* varía dependiendo de los autores. En la lista mundial de orquídeas compilada por Govaerts (2006) de diferentes autores revisados, 110 nombres de especies son aceptados mientras 71 no lo son.

Rolfe en 1896 primero propuso una clasificación taxonómica para especies de *Vanilla* con dos secciones: Foliosae, donde los bejucos tienen hojas desarrolladas y Aphyllae, donde las plantas tienen brácteas parecidas a hojas (Porte`res 1954, citado por Bory *et al.*, 2007). Más adelante dividió la sección Foliosae dentro de tres sub-secciones: Papilloseae tiene hojas densas y labelo con más o menos pelos suculentos, Lamellosae tiene también hojas densas

pero el labelo tiene unas lamelas escamosas y Membranaceae tiene hojas delgadas membranosas a sub-membranosas. Soto Arenas (2003) invalidó esta clasificación enfatizando que las sub-secciones son heterogéneas e incompletas, proponiendo una nueva clasificación de acuerdo a grupos morfológicamente fácil distinguibles (Soto Arenas y Cribb, 2010). Describe la nueva clasificación.

1.3 Diversidad del género

Las plantas de este grupo presentan muchos problemas en su clasificación taxonómica (Soto Arenas y Cribb, 2010), las primeras taxas fueron nombradas antes del establecimiento de la nomenclatura binomial (Linnaeus, 1753, citado por Soto Arenas y Cribb, 2010). Muchas fueron descritas a partir de material estéril, y los caracteres vegetativos varían haciéndolos difícil de usar para la determinación. Otra situación son las descripciones realizadas a partir de brotes inmaduros, lo que hace diferentes las mediciones de los caracteres morfológicos de las flores, por lo que la identificación es incierta (Soto Arenas y Cribb, 2010).

Vanilla ha sido revisado en tres distintas ocasiones (Soto-Arenas y Cribb, 2010; Rolfe, 1896; Portéres, 1954, citados por Soto Arenas, 1999), pero las dos primeras revisiones son incompletas, difíciles de utilizar y frecuentemente erróneas. Las personas interesadas en este género, enfrentan un problema

práctico como es la identificación de las especies y cultivares. A menudo es imposible conseguir material fértil para realizar una determinación y la semejanza de las especies y la variación interna entre ellas no permite hacer identificaciones confiables con base en material vegetativo (Soto Arenas, 1999).

Estudios recientes realizados por Soto Arenas y Cribb (2010), propusieron una clasificación para el género *Vanilla* teniendo en cuenta su fácil reconocimiento a partir de caracteres morfológicos (principalmente basados en estructuras reproductivas), pero con poca evidencia de su monofilia teniendo en cuenta que en algunos casos pueden ser paraliféticos. La clasificación propuesta fue la siguiente:

A. ***Vanilla*** subgénero ***Vanilla***

Vanilla subsect. *Membranacea* Portères in Bouriquet, Le Vanillier et La Vanille: 159 (1959). *nom. illeg.*

Plantas con hojas membranosas. Las inflorescencias escasamente o nada se encuentran diferenciadas del eje vegetativo. El labelo carece de callo penicilado. La columna se encuentra unida al labelo solo en la base. La columna con una antera subperpendicular que sobresale, estigma cóncavo y superficie ventral lisa. Especie tipo: *V. mexicana* Mill.

Distribución: 15 especies en los neotrópicos, más diverso al sur de Brazil. Subgénero *Vanilla* nunca se ha usado como nombre para este taxon, pero es automáticamente aplicable al grupo de *V. mexicana* Mill., la especie tipo del género.

1. grupo *V. mexicana*: Pétalos ondulados; sépalos usualmente enrollados; labelo muy amplio, 3 a 5 lobulos, con un amplio y obtuso lóbulo apical y numerosas y altas quillas, un callo muy suculento o elevado; y la columna carece de una quilla basal triangular en la superficie abaxial.

Incluye las siguientes especies: *Vanilla costaricensis*, *V. guianensis*, *V. inodora*, *V. martinezii*, *V. methonica*, *V. mexicana*, *V. oroana* and *V. ovata*.

2. grupo *V. parviflora*: Pétalos no ondulados; sépalos no enrollados, labelo con 3 lóbulos, con un lóbulo apical redondeado-cuadrado, una lámina (blade) con filas longitudinales con verrugas; y la columna con una quilla basal triangular sobre la superficie abaxial.

Incluye las siguiente especies *V. angustipetala*, *V. parvifolia* and *V. verrucosa*. Similar a estos, pero con flores más grandes con quillas lisas, y un lóbulo medial acuminado del labelo esta en *V. bertonensis*, *V. bradei*, *V. edwallii* and *V. organensis*.

B. *Vanilla* subgénero ***Xanata*** Soto Arenas & Cribb **subgen. nov.** Plantas con flores, hojas o foliosas; inflorescencia alargada; callo penicilado, labelo deficiente; columna unida al labelo, antera unida a la columna ventralmente; lóbulos del estigma emergentes.

Especie tipo: *Vanilla planifolia* G. Jackson.

Plantas con o pocas hojas. Hojas coriáceas suculentas. Inflorescencia axial, muy diferentes de las partes vegetativas. Labelo con o carente de callo penicilado. Columna unida al labelo usualmente más de la mitad de su longitud. Columna con antera ventral algo paralela, lóbulos estigmáticos emergentes, y con una superficie ventral liso o frecuentemente vellosa.

Distribución: pantropical.

Derivación del nombre: los Indios Mexicanos Totonaco le dieron el nombre de *Vanilla*, “xanat” or “shanat

a. *Vanilla* subgénero. ***Xanata*** sección. ***Xanata***

3. Grupo ***Vanilla palmarum***: Ovario caliculado; flores sin callo penicilado; el labelo unido solamente cerca de la mitad de la longitud de la columna, con líneas pubescentes longitudinales hacia la parte media distal del labelo.

Distribución: Las Indias Occidentales y América del Sur.

Las especies incluidas aquí son *V. bicolor*, *V. palmarum* y *V. savannarum*.

4. Grupo *V. trigonocarpa*: labelo muy inflado con márgenes crenuladas; habito vegetativo mesofítico; racimos con pocas flores; muy fragantes, pequeñas a grandes; frutos trígonos, muy largos y carnosos.

Distribución: América Tropical, de Costa Rica a Amazonia.

Las especies incluidas aquí son *V. espondae*, *V. hartii*, *V. sprucei* y *V. trigonocarpa*.

5. Grupo *V. planifolia*: flores verdosas; labelo cóncavo y con pequeñas papilas en la región apical. Las especies de América de Sur tienen un callo apical conectado con el callo penicilado en el medio del labelo por hileras de papilas y con el ápice del labelo generalmente recurvado.

Distribución: extendido en América Tropical, incluyendo la India Occidental

Incluye las siguientes especies *V. appendiculata*, *V. bahiana*, *V. cristagalli*, *V. denticulata*, *V. dubia*, *V. dungsii*, *V. fimbriata*, *V. helleri*, *V. insignis*, *V. odorata*, *V. phaeantha*, *V. planifolia*, *V. ribeiroi*, *V. schwackeana*, *V. tahitiensis* and *V. uncinata*.

6. Grupo *V. penicillata*: Plantas sin hojas, pero relacionadas con las foliosas especies peniciladas americanas. Pétalos subunguiculados, labelo largo-unguiculado con callo penicilados, y ápice vellosos. Fruto caliculado. Similar a la foliosa *V. ribeiroi* y excepto por la condición de hojas, que pertenece al grupo de *V. planifolia*.

Distribución: Guyana-Amazonia.

La única especie incluida es *V. penicillata*.

7. Grupo *V. hostmannii*: Flores grandes, usualmente blancas con un labelo amarillo-naranja; labelo con venas engrosadas, que irradian desde la mitad distal que puede ser algo verrugosa (las verrugas redondeadas y aplanadas); inflorescencia con brácteas dísticas; ovario, sépalos, y pétalos con gránulos, muy vistosos en algunas especies; superficie del labelo puberulenta-papilosa en algunas especies; los segmentos del perianto a veces con drusas de cristal incluidos.

Distribución: extendido en América Tropical, excepto para la India Occidental.

Las especies incluidas aquí son *V. cribbiana*, *V. dressleri*, *V. gardneri*, *V. hostmannii* and *V. ruiziana*.

8. Grupo *V. pompona*: Hojas muy suculentas; tallo grueso, xerofítica; labelo más liso, excepto por el callo penicilado, y con un cojín ligeramente engrosado que sale desde al callo penicilado hasta el ápice; flores fuertemente fragantes, amarillas con labelo naranja; frutos gruesos trígono, parecidos a un banano.

Distribución: Extendida en América Tropical excepto para la India Occidental.

Las especies incluidas aquí son *V. calyculata*, *V. chamissonis*, *V. columbiana*, *V. grandiflora*, *V. pompona*, *V. pseudopompona* and *V. vellozii*.

b. *Vanilla* subgen ***Xanata*** sect. ***Tethya*** Soto Arenas & Cribb, **sect. nov.** Una sección *Xanata*, hojas suculentas coriáceas; ovario no caliculado; flores a menudo adornadas con callo penicilado; labelo claramente o ligeramente trilobado, adherido a la columna columna, líneas pubescentes en la parte apical.

9. Grupo *V. kinabaluensis*: Hojas generalmente muy anchas, elípticas; tallos redondeados; inflorescencias multi-florales, en algunas especies con hasta 150 flores (*V. abundiflora* and *V. kinabaluensis*); ovario grueso, especialmente en las especies de Nueva Guinea; frutos gruesos y relativamente cortos; tépalos del mismo color, verde-amarillentos, generalmente obtusos; labelo cuneado o cuenado-flavelado en las especies de Nueva Guinea, en forma de trompeta, no unguiculado, más o menos trilobado, con el lóbulo medio frecuentemente recurvado y con hileras de papilas subuladas rojizas largas o aplanadas en *V.*

kinabaluensis, o banquesinas y largas en *V. siamensis*. Muchas especies de este grupo son raramente colectadas y muchas son imperfectamente conocidas, pero varias de ellas parecen estar relacionadas. El grupo está mucho más desarrollado en el archipiélago Malayo y Nueva Guinea.

Distribución: Desde China a Nueva Guinea, más abundante en Indonesia.

Las especies incluidas aquí son *V. abundiflora*, *V. giullianetii*, *V. kaniensis*, *V. kempteriana*, *V. kinabaluensis*, *V. klabatiensis*, *V. ovalis*, *V. platyphylla*, *V. ramificans*, *V. siamensis*, *V. seranica*, *V. sumatrana*, *V. utteridgei* and *V. variensis*.

10. Grupo *V. albida*: Un grupo Asiático con flores y plantas similares en apariencia a las americanas del grupo *V. planifolia*; flores blancas verdosas; labelo largamente unguiculado; tépalos largos; y labelo con papilas apicales cortas. Algunas especies, tales como *V. moonii* y *V. yersiniana*, y tal vez otras tienen tallos sulcados en la forma de *V. insignis*. *V. albida*, *V. andamanica*, *V. montana* y *V. yersiniana* y están estrechamente relacionadas, difiriendo en detalles morfológicos y distribución.

V. havilandii parece pertenecer a este grupo, pero tiene inflorescencia muy diferente, con flores muy pequeñas. *V. moonii* tiene tépalos color ocre y el labelo de color amarillo con papilas apicales dispuestas en dos filas, lo que representa quizá un carácter compartido con *V. annamica* y *V. somai*.

Distribución: Sri Lanka al Sur Este de Asia y el Archipiélago Malayo a través de Borneo.

Las especies incluidas aquí son *V. albida*, *V. andamanica*, *V. havilandii*, *V. montana*, *V. moonii*, *V. sanjappae* y *V. yersiniana*.

11. Grupo *V. annamica*: Inflorescencias muy diferentes, panicula, teniendo cimas vellosas; flores con forma de trompeta; y el labelo tiene dos filas paralelas de papilas apicales.

Distribución: Sur de China, Taiwan e Indochina.

Las especies incluidas aquí son *V. annamica* y *V. somai*.

12. Grupo *V. griffithii*: *V. palembanica* está muy imperfectamente conocida, pero parece asociarse a *V. griffithii*. Hojas generalmente elípticas; flores con tépalos muy obtusos, un labelo con lóbulo medio profundamente retuso, lana en lugar escamas en el callo penicilado.

Distribución: Sumatra, Borneo y la península de Malasia

Las especies incluidas aquí son *V. griffithii* y *V. palembanica*.

13. Grupo *V. borneensis*: Callo penicilado, continuo con el ápice del labelo papiloso; plantas con hojas pequeñas y estrechas, e inflorescencias cortas; labelo con un par de corpúsculos en la base. Ellas parecen ser versiones foliosas del grupo de las *V. aphylla-V. calopogon-V. wightii*.

Distribución: desde la India y el Sur Este de Asia a Indonesia.

Las especies incluidas aquí son *V. borneensis* y *V. diabolica*.

14. Grupo *V. imperialis*: Flores grandes; labelo en forma de trompeta, similar a las del grupo *V. planifolia* pero más cortas; callo ausente; ápice del labelo papilado.

Distribución: África Continental.

Las especies incluidas aquí son *V. grandifolia*, *V. imperialis*, *V. ochyrae* y *V. polylepis*.

15. Grupo *V. françoisii*: Flores muy pequeñas, verde blanquecino con el labelo de color rosa en la base y las márgenes purpura; todo el labelo o seis lóbulos, densamente cubierto con pelos suculentos o papilas en la mitad y al frente.

Distribución: Madagascar.

Las especies incluidas aquí son *V. françoisii* y *V. coursii*.

16. Grupo *V. chalotii*: Labelo en forma de saco; lóbulo medio reducido, recurvado, los lóbulos laterales bien desarrollados.

Distribución: África Occidental y Ecuatorial.

Las especies incluidas aquí son *V. chalotii*, *V. nigerica* y *V. seretii*.

17. Grupo *V. africana*: labelo sin forma de saco; lóbulos laterales del labelo unidos a la base a 1/2-2/3 de la columna formando senos profundos con el lóbulo medio; callo formado por escamas o verrugas; columna expuesta en el ápice.

Distribución: África Occidental y Ecuatorial, con una solo especies al este de África

Las especies incluidas aquí son *V. acuminata*, *V. africana*, *V. crenulata*, *V. cucullata*, *V. hallei*, *V. heterolopha*, *V. ramosa* y *V. zanzibarica*.

18. Grupo *V. barbellata*: Flores verdes a verdosas con un labelo de rojizo a violáceo; callo penicilado incipiente.

Distribución: Caribe

Las especies incluidas aquí son *V. bakeri*, *V. barbellata*, *V. claviculata*, *V. dilloniana* y *V. poitaei*.

19. Grupo *V. aphylla*: Labelo con tricomas muy largas y en algunas ocasiones un callo penicilado incipiente. Escasamente diferente del grupo *V. borneensis*, excepto por la falta de hojas.

Distribución: India a las Filipinas.

Las especies incluidas aquí son *V. aphylla*, *V. calopogon* y *V. wightii*.

20. Grupo *V. phalaenopsis*: Labelo flabelado con dos hileras de pelos además de la línea axial; pétalos obtusos, muy amplios.

Distribución: Cuenca del Océano Índico (África del Este, Comores, Islas Mascareñas, Madagascar, con una sola especie en Sri Lanka y la India).

Las especies incluidas aquí son *Vanilla decaryana*, *V. humblotii*, *V. madagascariensis*, *V. phalaenopsis*, *V. perrieri*, *V. roscheri* y *V. walkeriae*.

1.4 Distribución del género

Vanilla es un género pantropical distribuido por todos los continentes, excepto Australia, entre los paralelos 27 norte y sur. Más de 52 de las especies se encuentran en América tropical, 31 especies se encuentran al sureste de Asia y Nueva Guinea, 17 en África, 7 en las Islas del Océano Índico y 3 en el área Pacífico (Porteres 1954, citado por Soto-Arenas y Cribb, 2010). Sin embargo, Pridgeon, *et al.*, (2003) afirman que el género es muy diverso en América

tropical con 54 especies y tan diversos en el sudeste de Asia-Nueva Guinea (28 especies) como en África-Madagascar (24 especies). *Vanilla* comprende unas 106 especies, la mitad de todas las especies de la subfamilia Vanillioideae.

1.5 Distribución de *Vanilla planifolia*

Según Soto-Arenas (1999), es difícil determinar cuáles especímenes son silvestres y cuales son escapadas. En distintas publicaciones se afirma que ocurre en de amplias zonas de América tropical, lo cual es incompatible con la variación observada y sus requerimientos ambientales.

Se afirma que en México sólo han sido localizados individuos silvestres en Oaxaca y zonas limítrofes de Veracruz y Chiapas. Hasta años recientes, sólo existía un reporte de *V. planifolia silvestre* (R.E. Schultes y P. Reko 727, AMES), del norte de Oaxaca. Ahora se han localizado especímenes aislados en la región cárstica del norte de Oaxaca. Más escasa cerca de Santa Marta Chimalapa, existiendo el registro de una población, probablemente ahora extinta, de la Selva del Ocote, en Chiapas. La especie nunca ha sido colectada silvestre en el norte de Veracruz o Puebla, donde supuestamente fue domesticada. Especímenes del norte de Yucatán (A. Schott 215 F, G.F. Gaumer & Sons 23352 AMES, 23909 F), se encuentran asociados a cenotes y áreas habitadas en la zona de selvas bajas del norte del estado, en un hábitat muy contrastante con el pie de monte del norte de Oaxaca. También se han

localizado especímenes aparentemente silvestres en el sur de Quintana Roo, cerca de la frontera con Belice (Soto-Arenas, 1999).

En Guatemala un ejemplar colectado por el Cónsul F.C. Lehmann (*Lehmann 1436 G*), sobre el Río Polochic en 1882 y los reportes de que los frutos eran recolectados de plantas silvestres (Malloiy et. al., 1942) en esa misma área, sugieren que existe o existió una población ahí. Del sur de Belice existen varias colecciones de *V. planifolia*, anteriores a 1955, especialmente del área cercana a Punta Gorda y San Antonio, en Toledo. Sin embargo, el área tiene principalmente sustratos graníticos y *V. planifolia* y sus aliados son francamente calcícolas. Existe una colecta de *V. planifolia* dudosamente silvestre de la costa Atlántica de Costa Rica. El resto de los reportes de *V. planifolia* de Honduras, Nicaragua, El Salvador, Panamá, Florida y Ecuador están basados en especímenes evidentemente escapados o cultivados, o en identificaciones erróneas de otras especies, principalmente *V. hostmanii* Lindl., *V. insignis* y *V. perplexa*. *Vanilla planifolia* introducida no florece en climas ecuatoriales, como en Singapur, Papúa, la Amazonia Brasileña, lo que también sugiere que es originaria de latitudes más altas en los trópicos.

1.6 Origen del cultivo

La vainilla era bien conocida desde tiempos prehispánicos. Fue Fray Bernardino de Sahagún, quien mencionó que el "tlilxóchitl" como la llamaban los aztecas,

era comercializada por indígenas y utilizada en una de las preparaciones del chocolate. Esta planta se utilizaba como remedio para la fatiga y para aromatizar el chocolate según se menciona en el Códice Barberini (Cruz-Badianus) de 1552. Utilizada en la elaboración de chocolate en España, hacia la segunda mitad del siglo XVI (Correll, 1944, citado por Soto Arenas, 1999).

No se sabe con exactitud desde cuándo se ha cultivado, sin embargo, aparentemente crecía en el Jardín de Oaxtepec, durante los tiempos de Moctezuma II. La vainilla fue exportada a España en pequeñas cantidades hasta el siglo XVIII, siendo este país quien poseía el monopolio de su comercio. Hacia los años 1676 William Dampier observó algunas plantas de vainilla en la Bahía de Campeche y en Bocas del Toro, Panamá, lo cual permitió obtener información sobre la forma de crecimiento y curado de frutos (Tezozomoc, 1847; Nuttal, 1922, citados por Soto Arenas, 1999).

En el año 1739 Robert Miller logró llevar esquejes a Inglaterra, procedentes de la Bahía de Campeche, los cuales no tuvieron éxito en su desarrollo. La vainilla comercial fue introducida de las Antillas a Europa por el Marqués de Blanford, floreciendo un año después en la colección de Charles Greville, en 1807. Un año después fue descrita como *Vanilla planifolia* por G. Jackson con base en el mismo ejemplar de Greville.

La migración de *Vanilla planifolia* hacia los trópicos del Viejo Mundo parece haber seguido sólo dos o tres rutas distintas, vía Filipinas, vía Inglaterra y tal vez vía Francia. Blanco (1845), citado por Soto-Arenas (1999) describió una vainilla con frutos aromáticos del Monte de Majaijai, Filipinas, como *V. majaijensis*; ya que no existen vainillas con frutos aromáticos en el sureste asiático, Blanco debe haber tenido un ejemplar escapado de *V. planifolia*. Hamelin llevó plantas de vainilla (*V. tahitiensis*, *V. planifolia*, o ambas) a Tahití en 1848, procedentes de Manila, donde posteriormente se estableció como un cultivo importante de la Polinesia Francesa.

El auge en la producción de vainilla ha ocurrido en dos ocasiones, antes de la aparición de la vainilla sintética y durante la década de 1980. En Madagascar se produjeron 875 toneladas en 1929-1930, para después decrecer y nuevamente aumentar hasta 1,200 toneladas en años recientes. La producción actual de vainilla natural se en 6680 ton, de las cuales Indonesia suministra 2400 ton, Madagascar 1900 ton y China 1300 ton, siendo estos países los mayores productores (Faostat, 2012).

1.7 Diversidad genética de los cultivos

Varios estudios han mostrado que los cultivos de *Vanilla* presentan una baja variabilidad genética debido a los sistemas de propagación a los que han sido sometidos durante siglos. Los métodos de propagación vegetativa y la

domesticación de especies sobresalientes han llevado a una reducción en la diversidad genética, la cual limita la oportunidad de tener un banco de material genéticamente diversa que puedan ser utilizados en programas de mejoramiento genético de los cultivos y de esta manera contrarrestar los problemas fitosanitarios y de producción de las plantas (Soto-Arenas, 2010).

Estudios realizados por Besse *et al.* (2004) y Schlüter *et al.* (2007) en los cuales utilizaron marcadores RAPD para determinar la variabilidad genética en Vanillas cultivadas, detectaron bajos niveles de diversidad genética en *V. planifolia* en aéreas de cultivo tales como Isla Reunión y Polinesia (Océano Pacífico) y Centro America – schluter. , 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 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, Vainilla, una accesión de Colibri), tipos de Isla Reunión (Classique, Mexique, Grosse Vanille, estéril, Variegata) y accesiones

de otras introducciones y áreas cultivadas (Madagascar, Polinesia Francesa e India Occidental). Solamente los clones cultivados en Veracruz-México mostraron poca variabilidad que los cultivados en Isla Reunión. Concluyendo que mucha de la *V. planifolia* cultivada en Isla Reunión y Madagascar y otras áreas de introducción como 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* y que 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.

2. ESTUDIOS MOLECULARES.

2.1 ADN barcoding

MatK

Los avances tecnológicos en la implementación de técnicas moleculares ofrece la oportunidad de la identificación precisa de casi cualquier especie de organismo. Existen muchas técnicas que permiten resolver situaciones

taxonómicas entre individuos. Dentro de estas técnicas surge una herramienta de identificación de organismos (Janzen, 2009), la cual puede ser implementada en plantas que no se encuentran en floración lo cual es un factor muy común en algunas especies de la familia de las orquídeas como son aquellas pertenecientes le genero *Vanilla* (Soto Arenas, 1999).

La herramienta conocida como código de barra de ADN (ADN barcoding) emplea la variabilidad nucleotídica existente en regiones cortas y estandarizadas del genoma, como auxiliar en la identificación y descubrimiento de especies. (Ratnasingham *et al* 2007; Hebert *et al* 2005). El propósito del ADN barcode es la identificación de especies a partir de la secuencia de ADN, específicamente contribuyendo al descubrimiento de la diversidad de organismos no detectados a nivel de especies (Hebert *et al*, 2005).

La técnica se puede aplicar a todo tipo de material fragmentario de plantas y ser utilizado además como auxiliar para determinar la diversidad de especies para estudios de demografía, ecología y análisis forense (Hebert *et al* 2005).

La selección del código de barra genético para las plantas es difícil debido a la tendencia evolutiva que presentan los tres genomas de las plantas. En el caso del ADN nuclear los poliploides con frecuencia resultan de copias múltiples y heterogéneas de los marcadores potenciales, El ADN mitocondrial es propenso a rearrreglos, tiene una sustitución muy baja y es muy susceptible a migrar al

núcleo, el genoma de los cloroplastos es haploide como el mitocondrial, pero presenta una tasa elevada de sustitución y poca recombinación, lo cual lo hace más adecuado como fuente de carácter para rastrear eventos de interés (Salazar, 2007).

Existen varias regiones del ADN que se utilizan para barcoding, y según Chase *et al.* (2007) *MatK* (maturase K), en la sistemática de plantas, es el gen *matK* se ha surgido recientemente como un gen valioso debido a su signo filogenético alto comparado con otros genes usados en este campo.

Cameron (2007) y Hilu *et al.* (2003), afirman que los 1500bp del gen *matK* se encuentran entre dos intrones que son interrumpidos por los exones 5' y 3' del gen *trnK* en la genoma de cloroplastos de la mayoría de las plantas verdes. La región 3' es relativamente conservada y la región 5' menos conservada ofreciendo dos conjuntos de caracteres que se pueden utilizar en diferentes niveles taxonómicos; proporcionando información molecular para resolverse las relaciones filogenéticas a los niveles más profundos.

matK es una de las regiones codificantes del ADN plástido que evoluciona rápidamente y su consistencia muestra altos niveles de discriminación entre especies de angiospermas. En actuales estudios, el 90% de las angiospermas

evaluadas fueron exitosamente amplificadas y secuenciadas usando un solo par de primers (Fazekas *et al.* 2008; Lahaye *et al.* 2008)

Las filogenias realizadas con secuencias de matK para angiospermas basales demuestra que matK contribuye a mas características de parsimonia informativo y ofrece mayor estructura filogenética, que el conservado gen rbcL. Las Inserciones y deleciones (indels) son frecuentes en el matK, aunque estos indels ocurren principalmente en los múltiplos de tres, manteniendo el marco de lectura, codificando Maturases (enzimas, no autocataliticos, que catalizan intrones suprimidos por RNAs prematuros); además de ser requeridos para la función normal de la fotosíntesis y para la postranscripción como factor de empalme en los cloroplastos. (Barthet *et al.*, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Un total de 35 muestras (Tabla 1) del Distrito Especial de Buenaventura (Valle del Cauca) en Colombia pertenecientes a la colección de Vanillas de la Universidad del Pacífico, fueron seleccionadas para el desarrollo de la presente investigación. El material utilizado en la caracterización morfológica y la caracterización genética corresponde a diferentes localidades de Buenaventura (Corregimiento de Córdoba, Zacarías, La Barra y Triana).

Tabla 1. Material vegetal utilizado en la investigación.

Código	Nombre botánico	Localidad
VP001	<i>V. planifolia</i>	Córdoba
VP002	<i>V. planifolia</i>	Córdoba
VP003	<i>V. planifolia</i>	Córdoba
VP004	<i>V. planifolia</i>	Córdoba
VP005	<i>V. planifolia</i>	Córdoba
VP006	<i>V. planifolia</i>	Córdoba
VP007	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP008	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP009	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP010	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP011	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus

VP012	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP013	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP014	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP015	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP016	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP017	<i>V. trigonocarpa</i>	Campus
VP018	<i>V. trigonocarpa</i>	La Barra
VP019	<i>V. trigonocarpa</i>	La Barra
VP020	<i>V. trigonocarpa</i>	Zacarías
VP021	<i>No identificada</i>	Campus
VP022	<i>V. sp. nov. (rivasii)</i>	Zacarías
VP023	<i>V. aff. cribbiana</i>	Zacarías
VP024	<i>V. aff. cribbiana</i>	Zacarías
VP025	<i>No identificada</i>	Zacarías
VP026	<i>V. aff. dressleri</i>	Triana
VP027	<i>V. aff. dressleri</i>	Triana
VP028	<i>V. aff. dressleri</i>	Triana
VP029	<i>V. odorata</i>	Zacarías
VP030	<i>V. odorata</i>	Zacarías
VP031	<i>V. odorata</i>	Zacarías
VP032	<i>V. odorata</i>	Zacarías
VP036	<i>V. sp. nov. (rivasii)</i>	Juan de Dios
VP037	<i>V. bicolor</i>	Juan de Dios
VP039	<i>V. bicolor</i>	La Barra

VP041	<i>V. bicolor</i>	Campus
VP042	<i>V. aff. rivasii</i>	Zacarías
VP043	<i>V. sp.. (rivasii)</i>	Zacarías
VP044	<i>V. planifolia</i>	Zacarías
VP045	<i>V. planifolia</i>	Zacarías
VP046	<i>V. planifolia</i>	Zacarías
VP047	<i>V. cribbiana</i>	Zacarías
VP048	<i>V. trigonocarpa</i>	Zacarías
VP049	<i>V. trigonocarpa</i>	Zacarías
VP050	<i>No identificada</i>	Zacarías
VP051	<i>V. aff. rivasii</i>	Zacarías

3.2 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las plantas se realizó con base en los descriptores propuestos por Soto-Arenas y Dressler (2010), los cuales incluyen caracteres vegetativos y florales como: tallo, hojas, peciolo, inflorescencia (forma, color, longitud, grosor) y flores (color, forma, longitud de todas sus partes), además se incluyeron las impresiones de epidermis de las hojas.

3.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Mahuku, G.S. (2004), con modificaciones de acuerdo a Milligan, B. (1998); Dellaporta *et*

al. (1983) en: Ribeiro & Lovato (2007); Gen and Mol Res. 6: 173-187 y Puchooa (2004), el cual consistió en:

1. El tejido vegetal liofilizado se depositó en tubos con tapa rosca de 2.0 ml, con un contenido de tres balines y perlas de vidrio.
2. Se colocaron en un macerador MINI-BEADBEATER por 30 segundos (hasta que la muestra se pulverizara).
3. Antes de utilizar el buffer de extracción (Tris-HCl) [pH 8.0] 200mM, EDTA [pH 8.0]20mM, NaCl 500mM y SDS 2%), se le adicionó B-mercaptoetanol 5% v/v y PVP-40 2% p/v.
4. A cada uno de los tubos se les adicionó 500µl del buffer de extracción y se pasó al vortex para homogenizar el contenido.
5. Se incubaron las muestras en baño maría a 65°C, realizando de 3-4 inversiones de los tubos durante la incubación.
6. Se centrifugó para precipitar el contenido, y se adicionó un volumen igual de ACETATO DE AMONIO 7.5M, se homogenizo en el vortex y se incubo a 5°C por 20 minutos.
7. Se centrifugo por 15 min. a 14000 rpm y se transfirió el sobrenadante (750µl) a un nuevo tubo marcado.
8. Se adiciono un volumen igual de ISOPROPANOL, se mezcló y se incubo a por 1 hora a 4°C.
9. Se centrifugó por 20 min. a 14000rpm, y se decantó el sobrenadante.

10. El precipitado se diluyó en 200µl de agua estéril desionizada y se incubó por 1 hora a 37°C.
11. Se adiciono la mitad del volumen 5M de NaCl se mezcló en el vortex.
12. Se adicionó el doble del volumen de etanol absoluto frío, y se incubo por 1 hora a -20°C.
13. Se centrifugó por 20 min. a 14000rpm y se decantó el sobrenadante.
14. Se lavó el precipitado de ADN con 800µl de etanol al 70% y se centrifugó a 4000rpm por 5 min.
15. Se decantó el sobrenadante y se colocaron los tubos destapados hacia abajo sobre una toalla de papel por 10-15 min. para eliminar el exceso de etanol mediante secado al aire.
16. Se diluyó el precipitado de ADN en 200µl de buffer TE 1x (10mM Tris-HCl [pH 8.0], 1mM EDTA).
17. Se adicionó 5µl de RNasa a (20 mg/ml), y se incubó a 37°C por 1 hora.

3.4 PCR matK

Las amplificaciones por PCR se realizaron en volúmenes de 20 µl que contenía buffer Taq 10X con KCl (100 mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C), 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40) 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 unidades de polimerasa (Fermentas), oligonucleótidos mat K 2.1 F (5'-CCTATCCATCTGGAAATCTTA-3'), mat K 5 R (5'-GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3'). Que amplificaron el locus de cloroplasto mat K. El perfil de amplificación con 30 ciclos fue: 2' a 94°C

(desnaturalización), 30" a 94°C, 40" a 53°C (reasociación, "annealing"), y 40' a 72 °C (polimerización), 5' a 72°C en un termociclador Eppendorf Vapo.protect.

3.5 Secuenciación de ADN

Los productos de PCR que se observaron cómo bandas claras fueron purificados usando el método de precipitación por Acetato de amonio 2.5 M y 50% de Isopropanol. Los productos de ADN fueron secuenciados en la empresa MacroGen (Seoul, Korea).

Las secuencias fueron editadas utilizando Geneious versión 5.5.7 cortando los puntos extremos y se verificaron los diferentes sitios polimórficos.

3.6 Análisis filogenético

Con la secuencia de *V. planifolia* se realizó una búsqueda BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) usando la base de datos Nucleotide collection (nr/nt) optimizada para secuencias altamente similares (megablast), dando como resultado 8 accesiones para el género *Vanilla* con score entre 1358-1031 y cobertura entre 99-94% e identidad entre 100-94%, cuatro de las accesiones fueron para *V. planifolia* (AF263687, AJ310079, JN004635 y AJ581443), la secuencia correspondiente al código AJ581443 tiene respaldo de un voucher (Chase 0-199 (K)) en el herbario Kew. Las 4 otras accesiones

correspondieron a *V. pilífera* (FJ816099), *V. siamensis* (FJ816097), *V. aphylla* (FJ816096) y *V. albida* (FJ816098).

Las accesiones más cercanas fueron *Sobralia* spp. (Neubig, *et al.*, 2009) (Orchidaceae) con un max score de 935 y identidad máxima de 89%. Se escogió esta accesión como outgroup, por que las 4 para especies de *Vanilla* no tenían de respaldo de una publicación, y en ensayos preliminares de alineamiento mostraron múltiples sitios polimórficos de INDELS, lo cual corresponderían a cambios en el marco de lectura del gen de matK, siendo muy improbable.

El software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.1) (Taruma, K. *et al.*, 2011) fue utilizado para la construcción del árbol filogenético utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado sobre el modelo de datos específicos y el test filogenético Bootstrap. (Nei, M. and Kumar, S. 2000).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se reconocieron seis especies y tres afiliaciones a especies en el Distrito de Buenaventura, Región del Pacífico colombiano, las cuales son descritas de acuerdo al tratamiento taxonómico utilizado por Soto-Arenas y Dressler (2010) y Soto-Arenas y Cribb (2010).

Una especie *Vanilla rivasii* es propuesta como nueva especie y tres especies *V. bicolor*, *V. cribbiana* y *V. planifolia* como nuevos reportes para Colombia. Las demás especies corresponden a *V. trigonocarpa*, *V. aff. dressleri*, *V. odorata*, *V. aff. cribbiana* y *V. aff. rivasii*.

a) *Vanilla bicolor* Lindl

Ejemplar: (1313 RTG) Colombia: Distrito de Buenaventura: Universidad del Pacífico, en bosque secundario húmedo tropical; a 53 m.s.n.m., colectada en palma de mil pesos (*Oenocarpus bataua* Mart.) a aproximadamente 8 m de altura del suelo. Inflorescencias axilares, con brácteas membranosas y foliosas

(en algunos casos), alternas, flores, abriendo una flor por vez. Frutos cilíndricos, suculentos y caliculados, dehiscentes longitudinalmente, poco fragantes y muy oleosos.

Flores con pétalos y sépalos de color naranja en la superficie externa, labelo tubular amarillo en la parte interna con el ápice blanco, una vez extendido muestra papilas no es deflexo en el ápice. Fragancia a tenue a ureidos que le confieren un olor a orina. Ovario cilíndrico verde oscuro a marrón.

Nombres comunes: "Vainilla".

Planta casi exclusivamente epífita, asociada con jardines de hormigas cartoneras (*Crematogaster* spp.), ramificada extendida en forma de red sobre la copa de las palmas de milpesos (*Oenocarpus bataua*) y eventualmente se la observa en tocones de palmas y árboles en descomposición.

Tallos: redondeados de color verde a marrón, de 4 mm de grosor; entrenudos de 86 mm de longitud. Raíces aéreas de color marrón oscuro sub-teretes de aproximadamente 1,5 mm de grosor (Figura 4).

Hojas: oblongas, subsésiles, peciolo 5 mm de longitud ligeramente acuminadas rígidas y quebradizas de 65-70 mm x 23-30 mm.

Inflorescencia: lateral, marrón, hasta 5 flores por racimo, de 30-80 mm de longitud (en zig-zag) y 3,5 mm de grosor. **Brácteas** alargadas-lanceoladas, alternas dísticas, cóncavas de color naranja a marrón progresivamente pequeñas hacia el ápice de 8,4 mm de longitud (Figura 1 y 2).

Flores: sucesivamente abre de 1 a 2 al tiempo, efímeras, vistosas, con pétalos y sépalos de color naranja en la superficie externa, labelo tubular amarillo en la parte interna con el ápice blanco, extendido con papilas no deflexo en el ápice. Fragancia a tenue a ureidos.

Ovario: redondeado, curvado ventralmente, liso, ligeramente engrosado hacia la base, verde-marrón a naranja (de acuerdo a la exposición de los rayos del sol), con inclusiones granulares blancas en la epidermis. De 42,6 mm de longitud y 3,2 mm de grosor (Figura 5).

Sépalo dorsal: lanceolado, ápice subacuminado, naranja, con inclusiones granulares blancas, 10 venas longitudinales, 53,7 mm de longitud y 7 mm de ancho (Figura 9).

Sépalos laterales: oblongo lanceolados, subacuminados, subcaliptrados, naranja, con inclusiones granulares blancas, 6 venas longitudinales. 54-56 mm de longitud, y 8,3 - 8,4 mm de ancho.

Pétalos: lanceolado, ápice sudagudo, naranja, con una vena central en la parte externa engrosada, 4 venas; 52,2 - 54,2 mm de longitud y 6,2 mm de ancho (Figura 10).

Labelo: unido a la columna a lo largo de la margen desde la base hasta los 25 mm de longitud, tubular, ápice agudo, con papilas que inician a 10 mm de la base hacia el ápice del labelo; completo al abrir, 50,7 mm x 24,4 mm. Amarillo con el ápice blanco suavemente flabelado en las márgenes laterales, labelo con inclusiones similares a las encontradas en las demás estructuras florales.

Callo penicilado: formado por 3 escamas laceradas (peines), trapezoidales, las escamas se encuentran unidas entre sí (Figura 6), miden aproximadamente 3,7 mm x 3,8 mm; toda la región anterior y posterior al callo penicilado se encuentra cubierta por papilas ramificadas, más grandes hacia el ápice (Figura 7) y de menor tamaño hacia la base, con un apariencia de tricomas (Figura 8).

Columna: semicilíndrica elongada de 35,2 mm de longitud y 1,5 mm de ancho, con papilas marrón en el primer tercio (10 mm del ápice); aletas laterales presentes de 2,8 mm x 1,1 mm.

Estigma: bilobado, los lóbulos emergentes de 2,4 mm x 1,14 mm, róstelo de 2,0 mm de ancho y 1,1 mm de alto (Figura 11).

Antera: versátil hexagonal de 2,4 mm x 2,1 mm (Figura 12).

Frutos: alargados verde marrón, cilíndricos, de 120-136 mm x 5-5,9 mm; no presenta fragancia a vainilla; dehiscentes al madurar (Figura 2).



Figura 1. *V. bicolor* sobre árbol en descomposición expuesta a pleno sol con múltiples Inflorescencias.



Figura 2. Detalle de la inflorescencia de *V. bicolor*



Figura 3. Sistema de raíces asociado a reservorios de materia orgánica en parte aérea de palma de milpesos.



Figura 4. Estructura vegetativas de *V. bicolor*.



Figura 5. Unión de la columna y el ovario con inclusiones blancas en la epidermis.



Figura 6. Callo penicilado, con escamas ramificadas en el ápice.



Figura 7. Zona papilosa anexa al callo penicilado.

Con papilas ramificadas en el ápice.

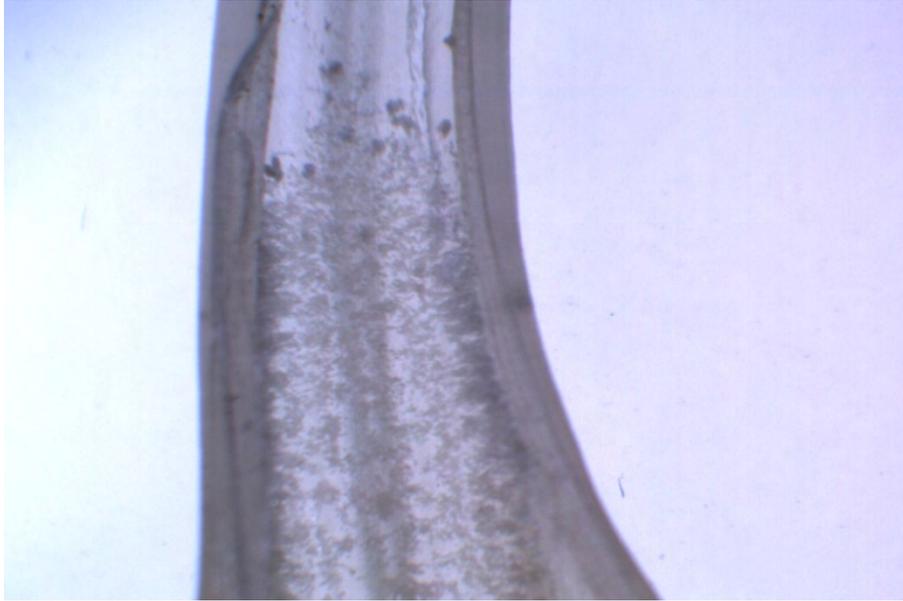


Figura 8. Zona pubescente con tricomas hacia la base del labelo.

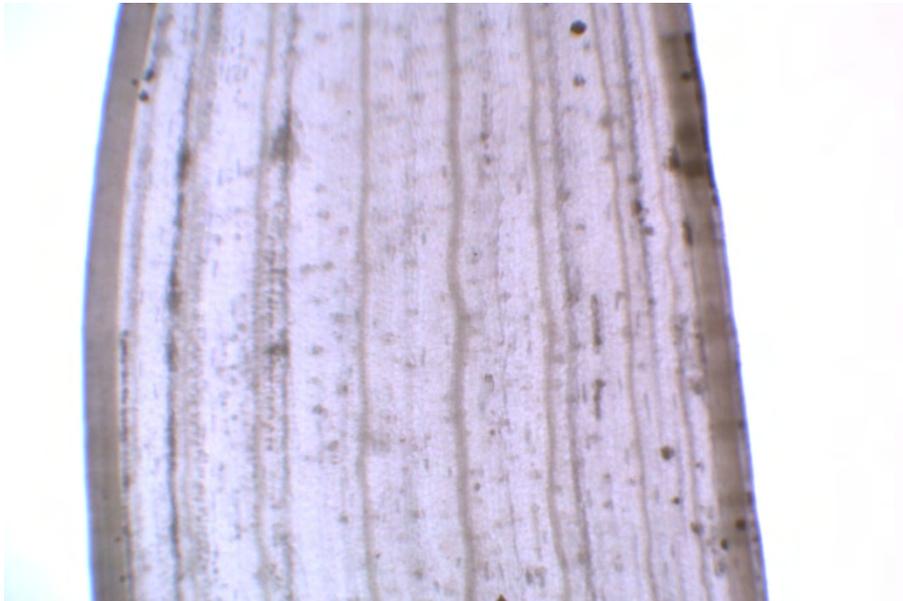


Figura 9. Tercio medio de sépalo dorsal con presencia de venas.

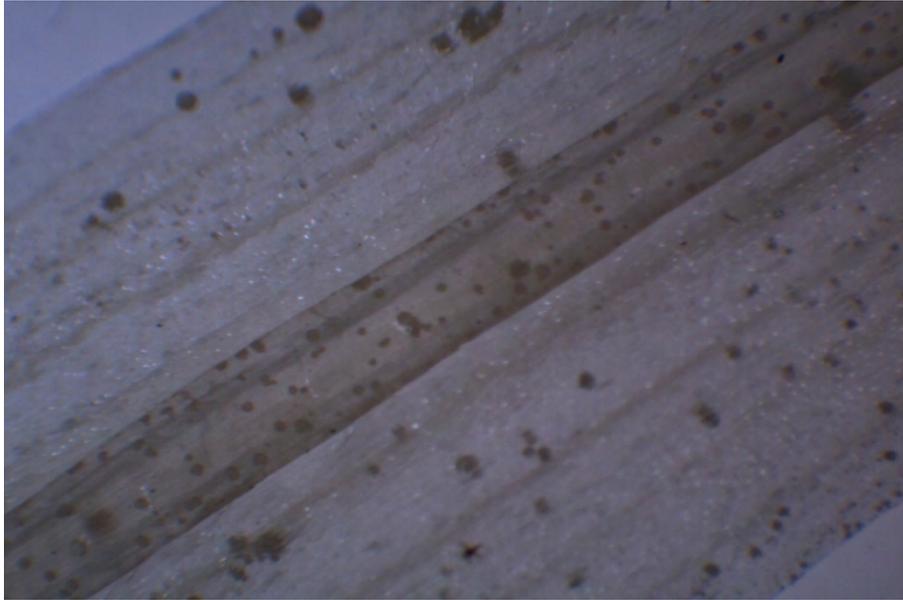


Figura 10. Tercio medio de pétalo con presencia de vena central y venas auxiliares.



Figura 11. Ápice de la columna con estigma bilobulado.



Figura 12. Antera en el ápice de la columna.

Anotaciones: esta especie conocida como *Vanilla bicolor* ubicada en el subgenera *Xanata* sección *Xanata*, ha sido conocida por su sinónimo, *V. wrightii* Rchb. F. (Christenson 1995). Difiere de todas las otras *Vanilla* americanas (excepto por el grupo de las membranosas [*V. guianensis*]), en que el callo penicilado no es compacto, pero más bien difuso (Soto-Arenas and Cribb, 2010). Sin embargo, se observa en la presente descripción morfológica la presencia evidente del callo penicilado con sus escamas laceradas.

Distribución y Hábitat: Esta especie tiene una amplia distribución, inicialmente se colectó en Cuba, Ecuador, Guyana Británica, y Venezuela (Soto-Arenas & Cribb 2010). Existen reportes documentados de *V. bicolor* en Perú

(Householder, *et al.*, 2010), se reporta por primera vez para Colombia en la presente investigación. En la región del Pacífico colombiano, principalmente en Buenaventura, es muy común encontrarla con un hábito de crecimiento epífita asociada a palmas de mil pesos (*Oenocarpus bataua*) y Don Pedrito (*Oenocarpus mapora*). Extendiendo sus raíces hacia los reservorios de materia orgánica almacenada en la base de los peciolos de las hojas (Figura 3), las cueles forma un embudo donde se concentra todo el material del cual se nutre esta especie de *Vanilla*. En la mayoría de los casos se encuentra expuesta a pleno sol en la parte más alta de estas palmas. Cuando se encuentra en lugares más bajos, preferiblemente sobre tocones de árboles o palmas en descomposición.

Historia Natural: las flores de *V. bicolor* presentan una fragancia suave a ureidos que le confieren un olor a orina, lo cual no es muy común en las plantas de este género. Abren solitariamente en intervalos semanales aproximadamente, las cuales tardan menos de 12 horas abiertas. La fenología de la floración prefiere periodos secos. Normalmente se ha observado floración en los primeros dos meses del año hacia enero y febrero durante el inicio de la estación seca. Los niveles de polinización observados en campo corresponden al 40-50% observándose hasta 3 frutos por inflorescencia, las cuales producen hasta 6 flores y se han encontrado hasta 3 inflorescencias consecutivas en el mismo tallo. Esta especie es de difícil manejo para su propagación debido

posiblemente a su hábito epífita. Ocasionalmente se pueden encontrar individuos juveniles creciendo sobre tocones de árboles secos, en aéreas iluminadas lo cual les confiere un color naranja a rojizo en sus partes vegetativas (Figura 1).

En 1838 Lindley describió la especie de *V. bicolor*, pero no mencionó en la presencia o ausencia de callo penicilado, siendo esta estructura importante en la separaciones de especies de este género (Soto-Arenas y Cribb, 2010, Rolfe, 1896). En 1896 Rolfe en su clave de especie dividió a *V. wrightii* y *V. bicolor* en dos grupos teniendo en cuenta el labelo membranoso sin callo penicilado (*V. wrightii*) y con callo (*V. bicolor*). Porterés (1954) incluyó a *V. wrightii* (= *V. bicolor*). Finalmente Soto-Arenas y Cribb (2010) en su clave taxonómica VII, definen para *V. bicolor* ausencia de callo penicilado, ovario caliculado y hojas más cortas que los internudos del tallo. En la presente investigación se encontró que *V. bicolor* presenta un callo penicilado evidente (Figura 6) precedido de una zona con papilas ramificadas desde el ápice del labelo (Figura 7), lo cual coincide con lo descrito por Rolfe (1896), sin embargo, teniendo en cuenta lo anterior se asume que la taxonomía de esta especie aun es confusa y requiere revisión detallada a nivel morfológico y molecular, mediante la comparación de secuencias de ADN provenientes de las áreas donde se encuentran las poblaciones de *V. bicolor*, para determinar finalmente la clasificación de esta especie.

b) *V. cribbiana* Soto Arenas

Ejemplar: (1316 RTG) Colombia: Distrito de Buenaventura: Universidad del Pacífico, en bosque secundario húmedo tropical; a 49 m.s.n.m., colectada en árbol de *Pouteria stipularis*. Planta de 4 m de altura. Flores con pétalos y sépalos de color verde pálido muy claro en la superficie externa, labelo tubular crema en la superficie externa y en la parte interna y el ápice de color amarillo, márgenes del labelo curvadas hacia adentro. Fragancia fuerte a rosas. Ovario subredondeado verde pálido y blanco en la base.

Nombres comunes: "Vainilla".

Planta hemiepífita, poco ramificada con hojas suculentas, rígidas de color verde. Tallo redondeado verde. Inflorescencia lateral.

Tallos: redondeados de color verde, de 6 mm de grosor; Entrenudos de 60-85 mm de longitud ligeramente rectos. Raíces aéreas verde-oliva a grisáceo subredondeadas a aplanadas de 3-4 mm de grosor (Figura 13).

Hojas: oblongolanceoladas, rígidas y quebradizas, acuminadas de 150-160 mm de longitud y 48-50 mm de ancho. Subpeciadas, 12-15 mm de longitud y 5-6 mm de ancho canalado (Figura 14).

Inflorescencia: lateral 50 mm de longitud 6 mm de ancho, verde pálido con inclusiones blancas en la epidermis, hasta 6 flores por racimo. **Brácteas** alargadas-acuminadas cóncavas, membranosas, cóncavas verde pálido, progresivamente pequeñas hacia el ápice de 8-10 mm de longitud y 5 mm de ancho.

Flores: sucesivamente abren de 1 a 2 a la vez, efímera, vistosa, con pétalos y sépalos de color verde muy claro a crema en la superficie externa, labelo tubular amarillo en la parte interna con el ápice amarillo, no deflexo en el ápice. Fragancia fuerte a rosas (Figura 15).

Ovario: subcilíndrico, curvado ventralmente, con inclusiones granulares blancas en la epidermis, verde pálido, blanco en la base. De 41mm de longitud y 4,6 mm de grosor.

Sépalo dorsal: elíptico a oblongo lanceolado, estrecho hacia la base, ápice subacuminado, subcaliptrado. 12 venas longitudinales, ligeramente cóncavo. 70,2 mm de longitud y 10,3 mm de ancho.

Sépalos laterales: elíptico a oblongo lanceolado, fusionados a 12,6 mm de la base, ápice subacuminado, subcaliptrado. 10 venas longitudinales, ligeramente cóncavo. 65 mm de longitud y 11,1 mm de ancho.

Pétalos: oblongo-lanceolados, direccionados hacia adelante, ápice redondeado. 9,8 mm de ancho y 66,7 mm de longitud.

Labelo: unido a la columna a lo largo de la margen, desde la base hasta los 44 mm de longitud, tubular, muy cóncavo, ligeramente flabelado, curvado hacia adentro; ranura longitudinal bien definida y profunda en la superficie abaxial. Cuando se expande 30,2 mm x 59,6 mm, ligeramente pubescente hacia la base, con tricomas cortos amarillo oscuro a marrón; lamina obovada trilobulada con 36 venas ramificadas distalmente; margen ligeramente ondulado, lóbulos laterales redondeados de 9,1 mm de ancho.

Callo penicilado: a 36,2 mm de la base, de 5mm longitud y 4 mm de ancho. Formado por 4 escamas laceradas (peines) amarillas, retrorsos, engrosados hacia la parte distal.

Columna: subcilíndrica, elongada de 46 mm de longitud y 2 mm de ancho, con papilas marrón en el primer tercio; aletas laterales membranosas presentes de 5,5 mm x 3 mm.

Estigma: bilobado, los lóbulos emergentes de 2 mm x 1,8 mm.

Antera: versátil, ovada-cordiforme de 3 mm x 3 mm.

Frutos: alargados verde con inclusiones blancas en la epidermis, subtrigonos, de 115 mm x 10 mm; fragantes y dehiscentes al madurar (Figura 16).

Anotaciones: *Vanilla cribbiana* pertenece al grupo de *V. hostmanii*, en el cual se encuentra el complejo de este tipo de especies afines.

Distribución y hábitat: se conoce para México (Veracruz, Oaxaca, Chiapas), Guatemala, Belice, y Honduras (Soto Arenas y Cribb, 2010), en Colombia se reporta por primera vez para Buenaventura en el Pacífico colombiano. Bajo las condiciones de Buenaventura se ha encontrado a 25 m.s.n.m. en bosque discontinuo parcialmente abierto con influencia de helechos, milpesos (*Oenocarpus bataua*), Chanul (*Humiriastrum procerum*), *Myconia cuadrada*, *Goupia glabra*, *Ormosia* sp., *Strychnos* sp., *Pouteria estipularis* y *Cualea lineata*, plantas de las cuales algunas son indicadoras de Aluminio y Sílice.

Historia Natural: las flores de esta especie presentan una fuerte fragancia a rosas, común en el complejo de de este grupo de flores amarillas. Las flores abren hacia las 6-7 a.m. en pares o solitariamente en intervalos de 3 a 4 días y en el transcurso de la tarde se marchitan. La fenología de la floración no es estacional. Se ha observado florecer en los meses de mayo a junio, con porcentajes de fertilización natural del 10-30%, observándose de 1 a 3 frutos formados por cada 10 flores abiertas.



Figura 13. *V. cribbiana* con inflorescencia.



Figura 14. Hoja de *V. cribbiana*.



Figura 15. Flor de *V. cribbiana*.



Figura 16. Fruto de *V. cribbiana*.

c) *V. trigonocarpa* Hoehne

Ejemplar: (1310 RTG) Colombia: Distrito de Buenaventura: Universidad del Pacífico, en bosque secundario húmedo tropical; a 53 m.s.n.m., colectada en árbol de otopo (*Dialyanthera otopa*). Planta de 6 m de altura. Flores con pétalos y sépalos de color blanco crema, labelo tubular blanco crema en la superficie externa y en la parte interna y el ápice con líneas de color marrón a lo largo del labelo, márgenes del ápice del labelo curvadas hacia afuera. Fragancia a hongo. Ovario subtriangular verde pálido claro y blanco crema en la base.

Nombres comunes: "Vainilla".

Planta hemiepífita, muy ramificada con hojas intermedias entre membranosas y suculentas, flexibles de color verde pálido. Tallo redondeado verde. Inflorescencia lateral (Figura 17).

Tallos: cilíndricos de color verde, de 6-8mm de grosor; entrenudos con 70-110 mm de longitud ligeramente rectos, levemente flexados en la base para esbozar una forma de "J". los entrenudos de las secciones péndulas presentan tallos claramente rectos y hojas dísticas. Raíces aéreas amarillo crema sub-redondeadas (libres) verde marón aplanadas (adheridas al tutor) de 2.4-3 mm de grosor.

Hojas: oblongo-lanceoladas, flexibles, ápice muy acuminadas de 145-160 mm de longitud y 48-55 mm de ancho. Subsésiles, 20 mm de longitud y 5-6 mm de ancho canalado.

Inflorescencia: lateral 20 mm de longitud y 6.6-8.5 mm de ancho, verde pálido claro, hasta 2 flores por racimo (Figura 18). **Brácteas** alargadas-agudas cóncavas, membranosas, 25 mm de longitud y 4.5 mm de ancho, progresivamente grandes hacia el ápice (Figura 19).

Flores: sucesivamente abren de 1 a 2 a la vez, efímeras, vistosas, con pétalos y sépalos de color blanco crema en la superficie externa, labelo tubular del mismo color de los pétalos, en la parte interna del ápice presenta líneas de color marrón que se distribuyen longitudinalmente a lo largo del labelo. Fragancia fungosa con leve olor a indol (Figura 21).

Ovario: subtriangular, curvado en la base, verde pálido claro, blanco crema en la base. De 45 mm de longitud y 6,2 mm de grosor.

Sépalo dorsal: elíptico a oblongo lanceolado, estrecho hacia la base, ápice agudo, subcaliptrado. 11 venas longitudinales, ligeramente cóncavo. 115 mm de longitud y 16 mm de ancho, de color blanco-verdoso crema.

Sépalos laterales: elíptico a oblongo lanceolado, estrecho en la base, ápice agudo, subcaliptrado. 13 venas longitudinales, ligeramente cóncavo. 107 mm de longitud y 18 mm de ancho, de color blanco-verdoso crema.

Pétalos: elíptico a lanceolado, direccionados hacia adelante, 102-113 mm de longitud y 17-18 mm de ancho, 12 venas, nervadura central presente ápice agudo y base estrecha.

Labelo: unido a la columna a lo largo de la margen, desde la base hasta los 72 mm de longitud, tubular, cóncavo, de 16,2 mm de ancho cerrado, quilla ventral bien definida, ápice y márgenes suavemente ligeramente onduladas (Figura 26-27), recurvo; líneas marrón longitudinales hasta la base. Cuando se expande, lámina entera de 100mm x 30mm, ligeramente pubescente hacia la base (Figura 28), con tricomas cortos marrón; presenta 16 venas ramificadas distalmente.

Callo penicilado: redondeado blanco a 69 mm de la base y 25 mm del ápice, de 6mm x 4,8mm. Formado por 4 escamas laceradas (peines) blancas (Figura 23).

Columna: subcilíndrico, elongada y curvada de 80 mm de longitud y 2,6 mm de ancho, con papilas blancas en el primer tercio; aletas laterales membranosas presentes de 5 mm.

Estigma: bilobado rectangular, fusionados en la base, los lóbulos emergentes de 3,25 mm x 1,7 mm (Figura 25).

Antera: versátil, ovada de 4 mm x 3,9 mm (Figura 24).

Frutos: engrosados triangulares de color verde oscuro, canalado, de 145 mm de longitud x 25mm de ancho (Figura 22).

Anotaciones: *Vanilla trigonocarpa* pertenece al grupo de *V. trigonocarpa*, en el cual se encuentran *V. espondae*, *V. hartii* y *V. sprucei*.

Distribución y hábitat: se distribuye en América Tropical desde Costa Rica a Amazonía (Soto Arenas y Cribb, 2010), en Colombia se reporta para el Pacífico colombiano en Chocó, Bahía Málaga, Guapi y Buenaventura. Bajo las condiciones de Buenaventura se ha encontrado en bosque secundario muy húmedo parcialmente cerrado (luminosidad del 30% aproximadamente). No presenta preferencia por forófito alguno, se observa normalmente a orillas de caminos en arboles delgados (máximo 40 cm de circunferencia a la altura del

pecho) con presencia de suelos arcillosos con abundante acumulación de material vegetal.

Historia Natural: Esta especie es morfológicamente muy variable. Los brotes apicales una vez alcanzada una altura entre 5.-10 m sobre el forófito, pueden desarrollarse sin adherir las raíces y descolgarse, hasta alcanzar el suelo. Estos segmentos péndulos presentan hojas claramente suculentas y rígidas diferentes de las adheridas al forófito. Los segmentos que alcanzan el suelo pueden desarrollar hábitos exploratorios reptantes y hojas rígidas más cortas. Las secciones péndulas o reptantes no han sido vistas en floración.

En su periodo reproductivo presenta máximo tres flores por inflorescencia y hasta tres inflorescencias por planta se han observado en campo, con el patrullaje de hormigas *Ectatomma* spp. (Figura 20) Las flores presentan fragancia a hongo. Inician su apertura hacia las 3 a.m. y la completan entre las 7 y 8 a.m. solitariamente en intervalos de 3 a 4 días y en el transcurso de la tarde se marchitan. Se ha observado herbivoría en las horas de la mañana por insectos de la familia *Chrysomelidae* (Figura 29). La fenología de la floración no es estacional. Esta especie florece en los meses de febrero, mayo, junio, septiembre y diciembre, con porcentajes de fertilización natural del 0-50%, observándose hasta 1 fruto en formación por cada inflorescencia.



Figura 17. *V. trigonocarpa* con inflorescencia.



Figura 18. Inflorescencias de *V. trigonocarpa*.



Figura 19. Brácteas alargadas en *V. trigonocarpa*



Figura 20. Hormigas patrullando la inflorescencia.



Figura 21. Flora de *V. trigonocarpa*



Figura 22. Fruto de *V. trigonocarpa*

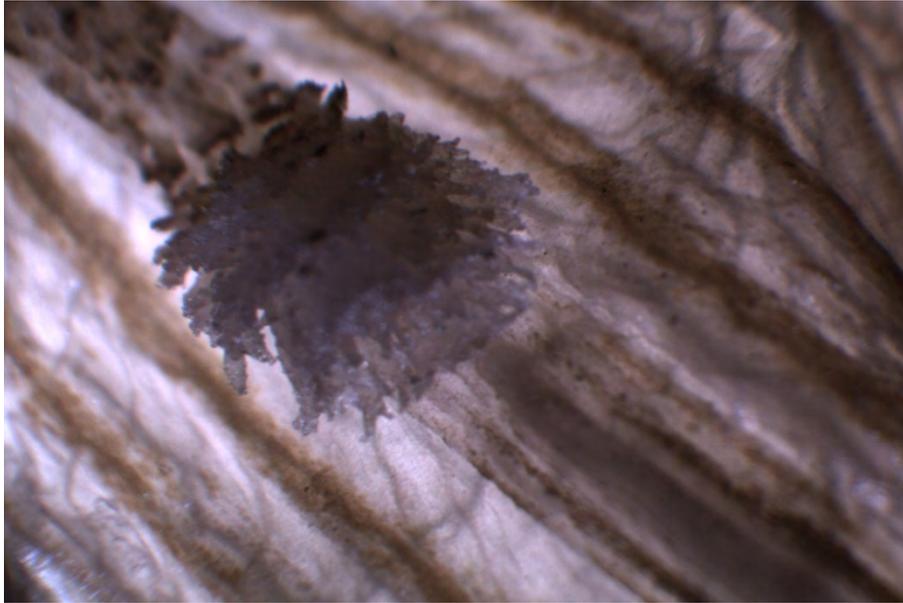


Figura 23. Callo penicilado en *V. trigonocarpa*.

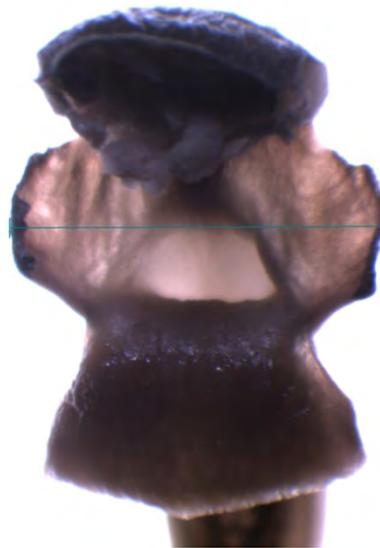


Figura 24. Antera (parte superior), aletas membranasas (parte media)
y róstelo parte inferior.

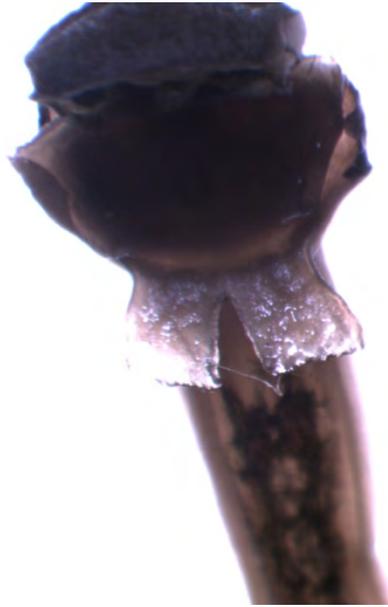


Figura 25. Estigma bilobulado emergente.

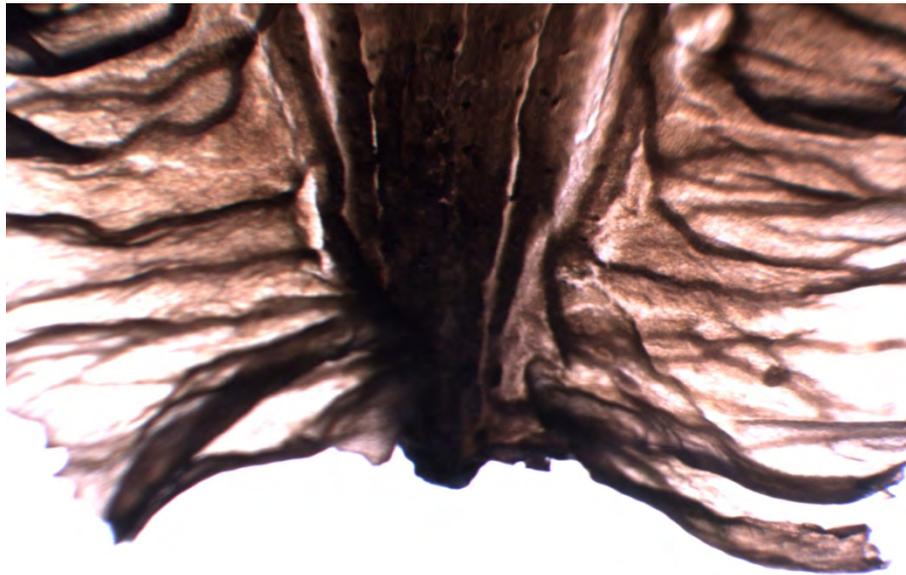


Figura 26. Ápice del labelo en *V. trigonocarpa*.

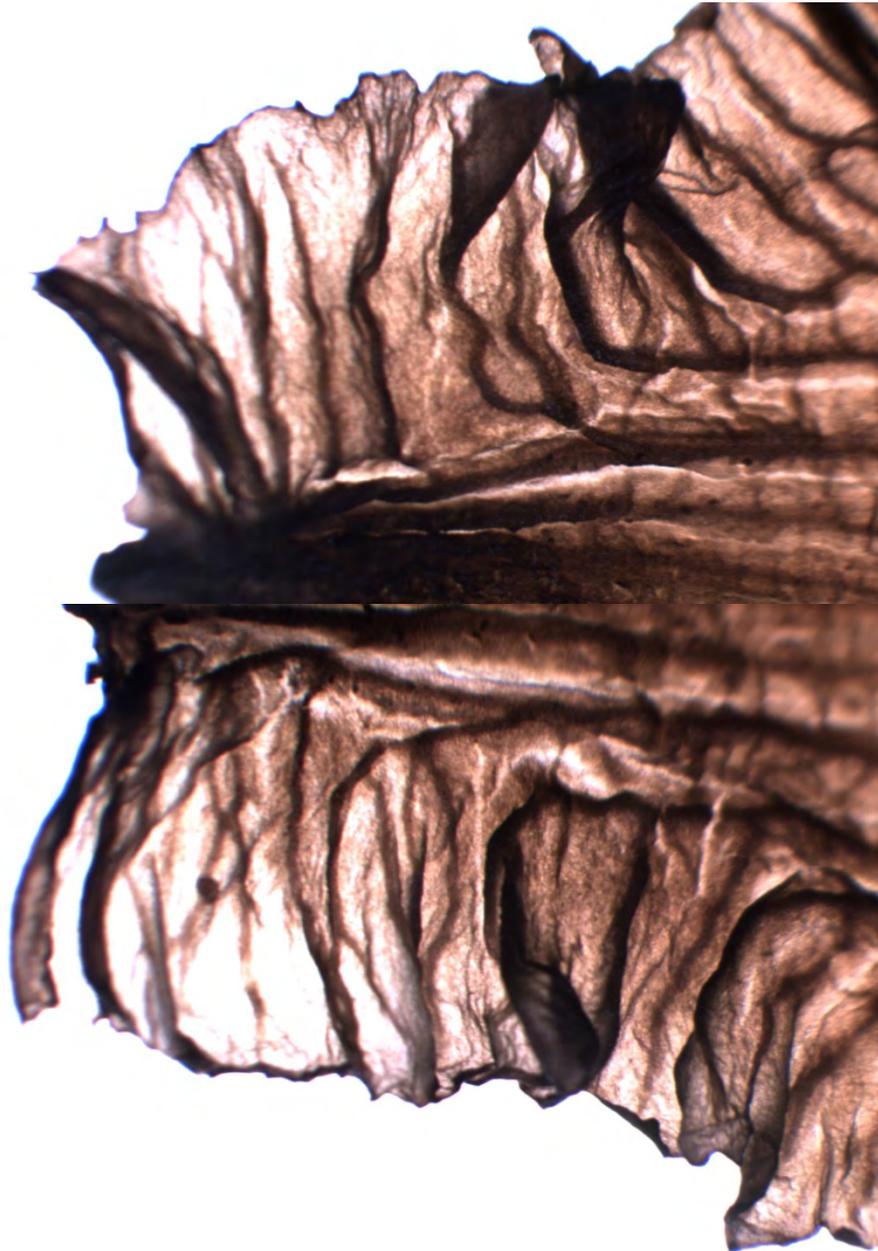


Figura 27. Margenes del labelo.

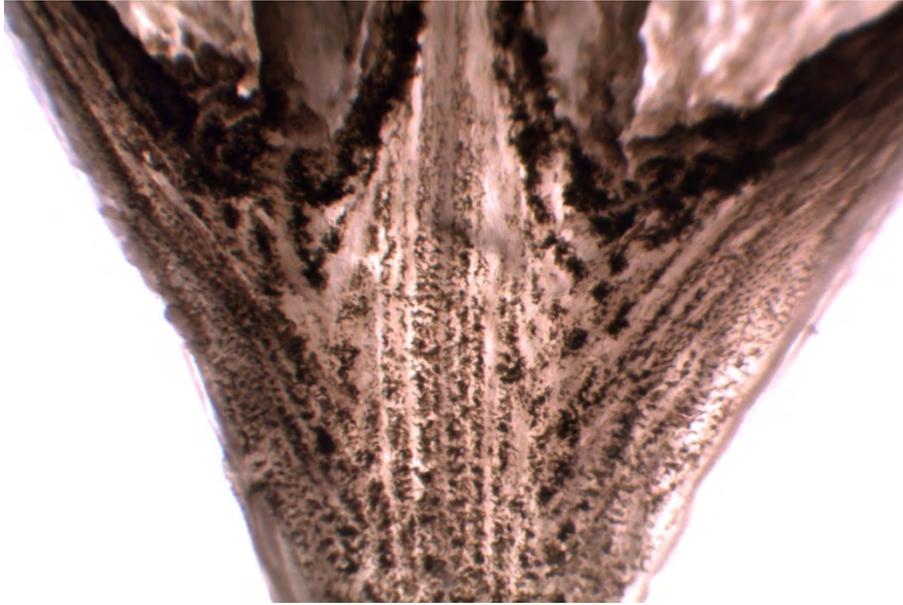


Figura 28. Tricomos hacia la base del labelo.



Figura 29. Herbivoría por insectos *Chrysomelidae*.

d) *V. rivasii* (nov. Especie)

Tipo: (1308 RTG) Colombia: Distrito de Buenaventura: Universidad del Pacífico, en bosque secundario húmedo tropical; a 41 m.s.n.m., colectada en árbol de *Gustavia superba* Kunth Berg. Planta de 3 m de altura. Flores con pétalos y sépalos de color amarillo verdoso muy claro en la superficie externa, labelo tubular amarillo crema en la superficie externa, en la parte interna y el ápice de color amarillo más oscuro, márgenes del labelo suavemente fimbriadas y rectas. Fragancia fuerte a rosas. Ovario subredondeado verde pálido y blanco en la base.

Nombres comunes: "Vainilla".

Planta hemiepífita, con pocas ramificaciones, hojas suculentas, nítidas, ligeramente tiesas de color verde. Tallo redondeado verde. Inflorescencia terminal (Figura 30).

Tallos: redondeados de color verde, de 7,4 mm de grosor; entrenudos 92 mm de longitud en zig-zag. Raíces aéreas verde-opaco (jóvenes) a grisáceo (viejas) sub-redondeadas a aplanadas de 4,2 mm de grosor (Figura 30).

Hojas: oblongolanceoladas a lanceoladas, de 165-225 mm de longitud y 40-55 mm de ancho, ligeramente rígidas, acuminadas, subsésiles con peciolo de 20-25 mm de longitud y 6-8 mm de ancho canalado y curvado (Figura 31).

Inflorescencia: terminal de 120-400 mm de longitud, 7 mm de ancho, verde pálido con inclusiones blancas en la epidermis, hasta 109 flores por racimo (Figura 32). **Brácteas** redondeadas-cóncavas membranosas verde pálido, progresivamente pequeñas hacia el ápice de 5 mm de longitud y 3 mm de ancho (Figura 33).

Flores: sucesivamente abren de 2 a 4 a la vez, efímera, vistosa, con pétalos y sépalos de color amarillo-verdoso muy claro a crema en la superficie externa (Figura 34-35), labelo tubular amarillo en la parte interna con el ápice amarillo recto (Figura 35). Fragancia fuerte a rosas.

Ovario: subcilíndrico a ligeramente triangular, curvado ventralmente, con inclusiones granulares blancas en la epidermis, verde pálido, blanco en la base. De 55 mm de longitud y 4,5 mm de grosor (Figura 36).

Sépalo dorsal: amarillo-verdoso muy claro a crema, elíptico a oblongo lanceolado, recurvo, estrecho hacia la base, ápice subagudo, subcaliptrado. 13

venas longitudinales, ligeramente cóncavo. 68 mm de longitud y 8-10 mm de ancho.

Sépalos laterales: amarillo-verdoso muy claro a crema, elíptico a oblongo lanceolado, recurvos, independientes o fisionados en el primer tercio desde la base, ápice subagudo, subcaliptrado. 13-14 venas longitudinales, ligeramente cóncavo. 67 mm de longitud y 8-11 mm de ancho.

Pétalos: amarillo pálido crema, nervadura central presente, lanceolados, recurvos, ápice redondeado. 9 mm de ancho y 68 mm de longitud.

Labelo: unido a la columna a lo largo de la margen, desde la base hasta los 42,6 mm de longitud, tubular, cóncavo, bordes del ápice ligeramente fimbriado y ligeramente curvo hacia abajo, quilla ventral longitudinal bien definida y profunda en la superficie abaxial. Cuando se expande 35,5 mm x 66 mm, ligeramente pubescente hacia la base, con tricomas cortos marrón (Figura 38); lámina trilobulada con lóbulo central bilobulado, 30 venas ramificadas distalmente; margen ligeramente ondulado (Figura 42).

Callo penicilado: a 44 mm de la base, de 6mm longitud y 4,5 mm de ancho. Formado por 4 escamas laceradas (peines) amarillas, engrosados hacia la parte distal (Figura 37).

Columna: subcilíndrico, elongada de 45-49 mm de longitud y 2,6 mm de ancho, con papilas marrón en el primer tercio (Figura 41); aletas laterales membranosas presentes de 5,3 mm de ancho

Estigma: bilobulado, los lóbulos emergentes rectangulares (Figura 40) de 1,2 mm x 1,1 mm.

Antera: versátil, ovada (Figura 39) de 3 mm x 2,6 mm.

Frutos: alargados verde pálido con inclusiones blancas en la epidermis, subtriangular trilobulado, de 155 mm x 11 mm; fibroso; muy fragante a vanillina y dehiscente al madurar (Figura 43).

Anotaciones: *V. rivasii* se presenta en el presente trabajo como una nueva especie teniendo en cuenta, que está presente en diferentes localidades del Pacífico colombiano, y de acuerdo a sus caracteres morfológicos se encuentra afiliada al grupo de *V. hostmannii*, en el cual se encuentra especies como *V. cribbiana*, *V. dressleri* , *V. gardneri*, *V. hostmannii* y *V. ruiziana*. (Soto-Arenas and Cribb (2010).

El nombre de *V. rivasii* se le asigna a este tipo en honor a un agricultor de nombre *Luis Álvaro Rivas*, quien fue la persona que la descubrió y abrió un

camino amplio en el conocimiento de esta especie, pues con las observaciones realizadas en campo por muchos años se llegó a comprender mucho de la fenología de esta especie.

Distribución y Hábitat: hasta el momento se conocen tres poblaciones de esta especie en el Pacífico colombiano: Buenaventura, Bahía Malaga y Chocó (obs. Per.). Se le ha encontrado en bosque secundario con perturbaciones antropogénicas y/o naturales, con suelos arcillosos pesados y de color oscuro en la superficie con presencia de hojarasca de baja degradación (lignificada). De su grupo de especies es la más heliófita.

Historia Natural: esta especie presenta flores muy fragantes a rosas, común en el complejo de este grupo de flores amarillas. La apertura floral se presenta abren hacia las 6-7 a.m. solitariamente o en racimos de hasta seis flores en intervalos de 2 a 3 días y en el transcurso de la tarde se marchitan. La fenología de la floración no es estacional. Se ha observado el inicio de su floración en el mes de enero hasta abril, junio, julio y septiembre con inflorescencia de hasta 109 flores y porcentajes de fertilización natural del 6-10%.

Se ha observado el patrullaje de hormigas (sin identificar) sobre la inflorescencia, lo cual sugiere que tal vez haya una actividad nectárea en los cálculos del ovario.



Figura 30. *V. rivasii* con inflorescencia terminal y frutos.



Figura 31. Hojas de *V. rivasii*



Figura 32. Inflorescencia de *V. rivasii*



Figura 33. Brácteas florales y foliosas en *V. rivasii*.



Figura 34. Flor de *V. rivasii*.



Figura 35. Detalle de flor de *V. rivasii*. Interior: parte superior ápice de la columna, parte inferior callo penicilado.



Figura 36. Ovario de *V. rivasii*.

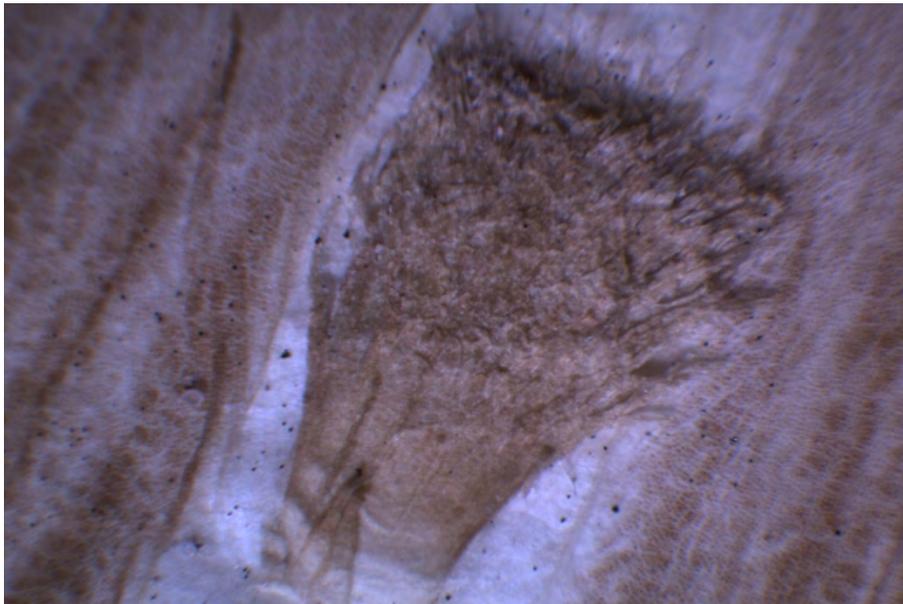


Figura 37. Callo penicilado de *V. rivasii*.