



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA EN BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
VAINILLAS EN LOTES DE PRODUCCIÓN DE LA PROVINCIA DE
NAPO CON MARCADORES MOLECULARES**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: Evelynng Lissette Vasquez Arriaga

TUTORA: PhD. CAROLINE NICOLE BACQUET PÉREZ

COTUTOR: PhD. LUIS EDUARDO MORILLO VELASTEGUI

Napo – Ecuador

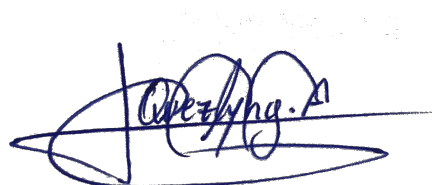
2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, EVELYNG LISSETTE VASQUEZ ARRIAGA con documento de identidad N° 0804001881, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en el presente documento son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 26 de febrero de 2024



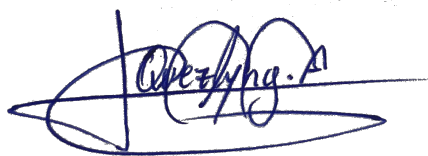
Evelynng Lissette Vasquez Arriaga
CI: 0804001881

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Evelyng Lissette Vasquez Arriaga, con documento de identidad N°0804001881, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE VAINILLAS EN LOTES DE PRODUCCIÓN DE LA PROVINCIA DE NAPO CON MARCADORES MOLECULARES de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 26 de febrero de 2024



Evelyng Lissette Vasquez Arriaga

CI: 0804001881

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE VAINILLAS EN LOTES DE PRODUCCIÓN DE LA PROVINCIA DE NAPO CON MARCADORES MOLECULARES, en la modalidad de: tesis, fue realizado por Evelyng Lissette Vasquez Arriaga, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 26 de febrero de 2024



Firmado electrónicamente por
CAROLINE NICOLE
BACQUET
PÉREZ

PhD. Caroline Nicole Bacquet Pérez

C.I: 1756516047



Firmado electrónicamente por
LUIS EDUARDO
MORILLO VELASTEGUI

PhD. Luis Eduardo Morillo Velastegui

C.I: 1708207632

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios por haberme concedido la bendición de tener a mis padres, Carlos Vasquez y Clara Arriaga, como pilares fundamentales en mi vida. Su apoyo incondicional ha sido la fuerza motriz que me ha permitido alcanzar mis metas. También quiero agradecer a mis hermanos Carlos, Jhonny y Darío, quienes de alguna manera contribuyeron en cada paso de mi carrera.

Asimismo, deseo expresar mi gratitud hacia todo el personal de la Universidad Regional Amazónica Ikiam, quienes jugaron un papel crucial durante mi etapa como estudiante. Cada uno de ellos contribuyó de manera significativa a mi formación profesional, y por eso les estoy profundamente agradecida.

Quiero extender mi agradecimiento al departamento de Biotecnología de la Estación Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP). Especialmente, mi más sincero agradecimiento al Dr. Eduardo Morillo por su dirección en esta tesis, a la Ing. Johanna Buitrón por su orientación y apoyo invaluable en el Laboratorio de Biología molecular, y a mi compañero de tesis, Jorge Rosado, por su colaboración y amistad durante este proceso.

A mi querida tía Lucía Arriaga, quiero expresarle mi más profundo agradecimiento por su apoyo constante a lo largo de mi trayectoria universitaria. Su positivismo y fortaleza han sido una fuente constante de inspiración para mí.

Un reconocimiento especial a mis amigas Johanna Claudio y Lisbeth Encalada por su motivación y aliento durante todo el proceso de investigación.

Por último, pero no menos importante, quiero expresar mi gratitud a todas las personas que, de una forma u otra, contribuyeron al desarrollo y conclusión de esta tesis. Su apoyo y colaboración fueron invaluable y siempre serán recordados con gratitud.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT..	xii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1. La vainilla	1
1.1.2. El género <i>Vanilla</i>	1
1.1.3. Descripción botánica del género <i>Vanilla</i>	3
1.1.4. <i>Vanilla odorata</i>	3
1.1.5. Importancia económica.....	4
1.1.6. Especies de vainilla presentes en la Amazonía ecuatoriana	5
1.1.7. Diversidad genética	6
1.1.8. Marcadores moleculares.....	7
1.1.8.1. SSRs (Microsatélites).....	8
1.1.8.2. ISSRs.....	8
1.2. Planteamiento del problema	9
1.3. Justificación de la investigación	9
1.4. Objetivos de la investigación	10
1.4.1. Objetivo general.....	10
1.4.2. Objetivos específicos	10
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	11
2.1. Sitio de experimentación	11
2.2. Material vegetal	11

2.3.	Unidad experimental y factores del estudio	12
2.4.	Metodología	13
2.4.1.	<i>Extracción de ADN</i>	13
2.4.2.	<i>Cuantificación y diluciones de muestra de ADN.....</i>	15
2.4.3.	<i>Validación de muestras</i>	16
2.4.4.	<i>Validación y estandarización de marcadores.....</i>	17
2.4.4.1.	<i>Marcadores moleculares SSRs</i>	17
2.4.4.2.	<i>Marcadores moleculares ISSRs</i>	17
2.4.5.	<i>Transferibilidad de marcadores moleculares SSRs</i>	18
2.4.6.	<i>Perfiles de amplificación y genotipaje.....</i>	19
2.4.6.1.	<i>Amplificación de SSRs con la tecnología M13-tailing</i>	19
2.4.7.	<i>Amplificación de los marcadores ISSRs en agarosa</i>	20
2.5.	Análisis multivariados	21
2.5.1.	<i>Generación de una matriz binaria y depuración de datos.....</i>	21
2.5.2.	<i>Análisis de asignación poblacional</i>	21
2.5.3.	<i>Análisis de agrupamiento</i>	22
2.5.4.	<i>Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)</i>	23
2.5.5.	<i>AMOVA (Análisis Molecular de Varianza).....</i>	24
	CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....	25
3.1.	Extracción y cuantificación de ADN	25
3.2.	Validación del ADN y estandarización de Marcadores SSRs e ISSRs	25
3.3.	Transferibilidad de marcadores moleculares SSRs	27
3.4.	Detección de perfiles de amplificación con los marcadores SSRs	33
3.5.	Identificación de marcadores polimórficos para el genotipo <i>V. odorata</i> ..	34
3.6.	Amplificación de marcadores ISSRs en las especies de vainilla	35
3.7.	Resultado de los análisis multivariados	36

3.7.1.	<i>Matriz de datos</i>	36
3.7.2.	<i>Análisis de estructura genética</i>	36
3.7.3.	<i>Análisis de agrupamiento</i>	37
3.7.4.	<i>Análisis de coordenadas principales (PCoA)</i>	39
3.7.5.	<i>Análisis Molecular de varianza (AMOVA)</i>	40
CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS		42
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		45
5.1.	Conclusiones	45
5.2.	Recomendaciones	45
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Datos del sitio de experimentación	11
Tabla 2.	Cantidad de muestras por especies especie de vainilla según el método de toma de muestra.	12
Tabla 3.	Reactivos y cantidades para preparar el tampón de sorbitol, calculado para 1 ml por muestra, utilizado en la extracción de ADN de vainillas.	14
Tabla 4.	Reactivo y cantidad para la preparación de buffer CTAB calculado para 1 ml por muestra, utilizado en la extracción de ADN de vainillas.	15
Tabla 5.	Máster mix para PCR en amplificación de ADN de vainilla con marcadores SSRs.	16
Tabla 6.	Programa térmico de PCR para amplificación de ADN de vainilla con marcadores SSRs.....	16
Tabla 7.	Máster mix de PCR para amplificación de ADN de vainilla con marcadores ISSR.....	18
Tabla 8.	Programa térmico para amplificar ADN de vainilla con marcadores ISSRs. .	18
Tabla 9.	Máster mix para amplificar en PCR en monoplex mediante la tecnología M13-tailing.....	19
Tabla 10.	Perfil térmico para amplificar en PCR monoplex mediante la tecnología M13-tailing.....	20
Tabla 11.	Transferibilidad de marcadores moleculares SSRs a las especies de vainilla de la Amazonía ecuatoriana.....	31
Tabla 12.	Resultado de la amplificación de los marcadores ISSRs en los 9 genotipos de vainillas provenientes de la Amazonía ecuatoriana.	32
Tabla 13.	Distribución de las muestras entre los grupos genéticos	39
Tabla 14.	Análisis AMOVA para las muestras de vainilla del genotipo <i>V. odorata</i>	41
Tabla 15.	Estadísticos PhiPT obtenidos del análisis de AMOVA.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras morfológicas de <i>Vanilla odorata</i>	4
Figura 2.	Determinación visual de la calidad de ADN de vainilla secadas con gel de sílice.....	25
Figura 3.	Determinación visual de la calidad de ADN de vainilla con nitrógeno líquido.	26
Figura 4.	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa de la amplificación en PCR para estandarización de marcadores moleculares ISSRs.	27
Figura 5.	Perfil de amplificación obtenidos de la amplificación de algunas especies de vainillas con la metodología M13-tailing en el sistema de detección LI-COR con marcaje IRDye de 800 nm.	33
Figura 6.	Visualización de la amplificación en monoplex con marcadores SSRs y la metodologíaM13 tailing en el sistema de detección LI-COR con marcaje IRDye de 800 nm.	34
Figura 7.	Amplificación de marcadores ISSRs con las especies de vainilla.	35
Figura 8.	Estructura genética poblacional de <i>V. odorata</i>	36
Figura 9.	Relaciones genéticas de los grupos a través de un dendrograma generado mediante el método del vecino más cercano UPGMA basado en distancias genéticas. Con una escala que va de 0 a 0.2 y representa la longitud de los nodos.....	38
Figura 10.	Análisis de coordenadas principales realizado vía covarianza con datos estandarizados.	40

RESUMEN

El cultivo de vainilla es económicamente uno de los más importantes en el sector de las especias debido a su alta demanda en diversas industrias. En la provincia de Napo, se cultiva *Vanilla odorata*. La falta de conocimiento sobre la diversidad genética en los lotes de producción de vainilla ha generado incertidumbre debido a la introducción de especies silvestres por parte de los productores. Esta investigación realizó un análisis preliminar de la diversidad genética en los cultivos de *V. odorata* mediante marcadores moleculares SSRs e ISSRs. Se establecieron las condiciones para el genotipaje, identificando 18 marcadores SSRs y 9 ISSRs que amplifican varios genotipos de vainilla. Se intentó generar perfiles de amplificación con los marcadores SSRs, estos marcadores no fueron concluyentes en esta investigación debido a problemas metodológicos, y se optó por realizar los análisis con los ISSRs. El análisis poblacional reveló tres grupos genéticos de *V. odorata*. El análisis de componentes principales capturó el 42.52% de la varianza total, mientras que el AMOVA mostró una varianza del 68% dentro de las poblaciones. El PhiPT, medida de la diferenciación genética entre poblaciones, fue 0.316 con un valor de significancia de 0.001, estos resultados indican variabilidad genética en los lotes de producción. Este estudio contribuye a la comprensión de la diversidad genética de la vainilla y sienta las bases para futuras investigaciones.

Palabras claves: Diversidad genética, *Vanilla odorata*, marcadores moleculares, SSR, ISSR

ABSTRACT

The cultivation of vanilla is economically one of the most important in the spice sector due to its high demand in various industries. In the province of Napo, *Vanilla odorata* is cultivated. The lack of knowledge about genetic diversity in vanilla production lots has generated uncertainty due to the introduction of wild species by producers. This research conducted a preliminary analysis of genetic diversity in *V. odorata* crops using SSRs and ISSRs molecular markers. Conditions for genotyping were established, identifying 18 SSR markers and 9 ISSRs that amplify various vanilla genotypes. Attempts were made to generate amplification profiles with SSR markers, but these markers were inconclusive in this investigation due to methodological issues, and analyses were conducted with ISSRs instead. Population analysis revealed three genetic groups of *V. odorata*. Principal component analysis captured 42.52% of the total variance, while AMOVA showed 68% variance within populations. The PhiPT, a measure of genetic differentiation between populations, was 0.316 with a significance value of 0.001, indicating genetic variability in production lots. This study contributes to the understanding of vanilla genetic diversity and lays the groundwork for future research.

Key words: Genetic diversity, *Vanilla odorata*, molecular markers, SSR, ISSR

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. La vainilla

El cultivo de vainilla representa un importante rubro en el sector de las especias [1,2], ya que es el segundo cultivo de especias más cotizado a nivel mundial [3], especialmente se cultiva *Vanilla planifolia* que representa un 95% de todo el mercado de vainilla natural, la otra especie que se explota comercialmente es *Vanilla tahitensis*. Ambas especies se emplea con frecuencia como agente aromatizante en diversos alimentos, bebidas, y como aditivo en las fragancias de productos farmacéuticos y cosméticos [4]. Siendo los grandes consumidores país como Estados Unidos, Francia y Canadá [4].

La obtención de vainilla natural implica la extracción de más de 250 compuestos presentes en las vainas de *Vanilla planifolia* y otras especies aromáticas [5]. Entre estos compuestos se encuentra la vainilina, responsable de conferir a esta especia su distintivo sabor y aroma [5]. La vainilina posee propiedades anticancerígenas, neuroprotectoras, antimicrobianas y tiene un potencial como agente antibiótico [6]. Estos hallazgos destacan las propiedades beneficiosas de la vainilla más allá de su papel tradicional como condimento.

Vanilla planifolia presenta parientes silvestres en el Neotrópico como *V. hartii*, *V. odorata*, *V. pompona*, *V. trigonocarpa*, entre otras [7]. Estas especies posiblemente poseen rasgos interesantes para la mejora del cultivo y la diversificación del mercado [2,7]. La investigación en este ámbito puede desempeñar un papel crucial en la sostenibilidad y el desarrollo de este valioso cultivo [2,8].

1.1.2. El género *Vanilla*

El género *Vanilla* se divide en dos subgéneros. En el subgénero *Vanilla* donde destaca el grupo de *Vanilla mexicana*, considerado como un grupo ancestral [9]. En cambio, el subgénero *Xanata* está compuesto por dos secciones: *Xanata* y *Tehyta* [10]. La sección *Xanata* incluye varios grupos, como el grupo de *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona*,

Vanilla trigonocarpa, entre otros [10], todos originarios del Continente Americano [9]. Por otro lado, la sección *Tehyta* alberga especies presentes en Asia, África, el Suroeste del Océano Índico y también en las Islas del Caribe [10]. En particular, en esta sección se encuentra el grupo de las *Vanilla aphylla*, conocidas como vainillas sin hojas [10].

El género *Vanilla* pertenece a uno de los linajes monofiléticos más antiguos de la familia Orchidaceae [11], esta familia surgió hace aproximadamente 112 millones de años [11]. Y según hallazgos basan en la datación de un polinario de orquídea de la especie *Meliorchis caribea*, encontrado fosilizado en ámbar del Mioceno en República Dominicana [10]. Se dató que la subfamilia Vanilloideae apareció hace 71 millones de años [12]. A partir de esta edad se estimó que el nodo *Vanilla* tiene alrededor de 34.6 millones de años y que tiene un origen americano [12].

La migración del género *Vanilla* hacia el Viejo Mundo se dio hace 25 millones de años en el Terciario [9], a través de dispersiones transoceánica por la proximidad de los continentes [10]. Hubo al menos tres migraciones transoceánicas: de América hacia África, de ahí hacia las Islas del océano Índico y también hacia el Caribe [9]. Estas migraciones explican el patrón biogeográfico del género *Vanilla*, por lo que se considera a este género como pantrópico [1].

La distribución del género *Vanilla* abarca el Trópico entre las latitudes entre 27°N y 27°S, con excepción de Australia [10]. *V. planifolia*, la especie que más se cultiva por su valor comercial, se propagó globalmente desde Mesoamérica a partir de finales del siglo XVI como parte del comercio de especias hacia muchas islas y continentes [13]. Se piensa que ésta especie comprende el acervo genético de la vainilla que se comercializa actualmente, debido al éxito de la propagación vegetativa durante la dispersión inicial con unos pocos clones [13,14].

Se reconocen aproximadamente 110 especies de *Vanilla* [15], siendo el Neotrópico la región con la mayor diversidad, con 75 especies descritas [10], de las cuales 35 especies son aromáticas [16]. Sin embargo, estas cifras pueden variar debido a una posible inflación taxonómica e incorrecta identificación de especies [17], ya que algunas fueron clasificadas mediante características morfológicas, lo que supone un problema, debido a la poca variación morfológica entre especies [18,19].

El género *Vanilla* se considera como un grupo taxonómicamente complejo debido a procesos como la reproducción sexual como uniparental, hibridación interespecífica y

poliploidía [20,21]. Estos factores dificultan la clasificación precisa de las especies dentro de este género. El Barcoding realizado en este género reafirma su complejidad taxonómica ya que, no logró resolver los problemas de clasificación existentes [20].

1.1.3. Descripción botánica del género *Vanilla*

El género es perenne y crece en simbiosis con diversas especies de árboles, los cuales le proporcionan sostén y sombra [7]. Se caracterizan por tener tallos gruesos, crecimiento monopodal, raíces subterráneas y aéreas [15]. Frutos carnosos en forma de vainas y semillas no aladas, dehiscente o ligeramente, y algunos frutos son fragantes [10].

La inflorescencia puede ser axilar o formar un racimo corto axilar, presentando flores grandes, vistosas y efímeras [22]. Tanto los sépalos como los pétalos son semejantes y pueden estar extendidos o reflexos [22]. El labelo puede ser simple o trilobulado, con bordes basales [23]. La antera es terminal, incumbente, de forma semiglobosa o algo cónica [19]. La cápsula es elongada y el polen se presenta en mónadas, sin formar polinios [22]. El ovario, es unilocular y ocasionalmente puede presentar un cálculo; además, puede ser sulcado y también liso o granuloso. Las hojas, presentes o ausentes, son coriáceas o carnosas, sésiles o atenuadas en un pseudopeciolo, articuladas y dispuestas de manera dística [15].

1.1.4. *Vanilla odorata*

Esta especie pertenece al género *Vanilla* Plum, ex Miller, a la familia Orchidaceae, la subfamilia Vanilloideae, la tribu Vanilleae y la subtribu Vanillinae [24]. Además, se ubica en la sección *Xanata* [10]. Se distribuye en estado silvestre desde el sur de México, Centro América y llega hasta Brasil [17]. En el Ecuador se han reportado avistamientos en la Región Costa y Amazónica [17], esta especie suele adaptarse de 500 hasta los 1.100 m.s.n.m y tolera temperaturas bajas [25]. Sus frutos son aromáticos con un alto contenido de vainilina [7].

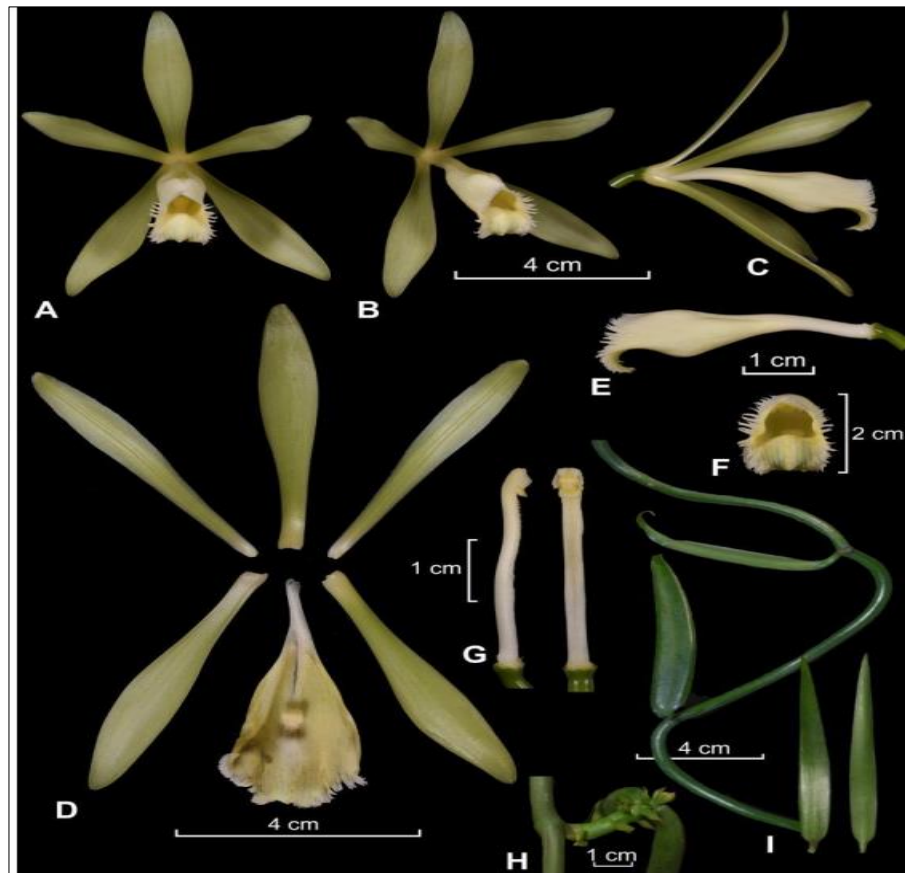


Figura 1. Estructuras morfológicas de *Vanilla odorata*

Realizado por: Landy Damian, 2020, p. 73

En la Figura 1, A-C. Flor en diferentes perspectivas, D. Perianto, E. Labelo y columna, F. Labelo, G. Columna en vista lateral y frontal, H. Panícula, I. Hojas [26].

La propagación se realiza mediante esquejes obtenidos de vides vigorosas con al menos 3 nodos, brotes axilares, y una longitud de 20 a 80 cm, y un diámetro de 1 cm [27], ya que la germinación de las semillas es nula [28]. En estado silvestre, las semillas deben ser consumidas por aves para germinar, ya que los ácidos digestivos de las aves suavizan las cubiertas, rompe la dormancia y estimula la germinación [29].

1.1.5. Importancia económica

La demanda global de vainilla en 2016 alcanzó 18.600 toneladas, proyectándose un crecimiento del 6,2% hasta 2025, con un valor estimado de \$724,5 millones USA [30]. El cultivo y producción de vainilla natural se encuentra en unos pocos países, siendo Madagascar el país que lidera la producción de vainilla, Indonesia, Uganda, India, Comoras y México contribuyen de manera significativa al suministro global [24].

Aunque *V. planifolia* es la principal fuente de vainilla que se comercializa, otras especies como *V. tahitensis* y *V. pompona* aportan en menor medida al mercado mundial. Sin embargo, solo pueden satisfacer el 1% de la demanda del mercado anual [5]. Esto da paso a la vainilla sintética, la cual se obtiene de subproductos de fábricas de papel y celulosa, así como mediante síntesis a base de petróleo [30], que por sus bajos costos de producción y el elevado volumen de producción lideran el mercado [31]. No obstante, la demanda por vainilla natural ha experimentado un aumento debido a las preferencias de los consumidores, quienes cada vez más optan por ingredientes más naturales [32].

En Ecuador, la vainilla de la especie *V. tahitensis* se cultiva bajo sistema de invernadero por las empresas Kintu Vainilla en la provincia de Esmeraldas, VAINUZ en Santo Domingo de los Tsáchilas y YÚRAEQUATOR en Manabí. Esta especie es la segunda más cultivada y comercializada después de *V. planifolia* a nivel mundial, destacándose por sus notas intensas de sabor a anís [24]. En sistemas agroforestales en la provincia de Napo se cultiva *V. odorata* para la Asociación Kichwa Kallari [33]. *V. odorata* se está abriendo paso en el mercado debido a su perfil aromático que al igual que la especie *V. planifolia* y el híbrido *V. tahitensis*, tiene altos niveles de vainilina, lo que contribuye a su sabor y fragancia distintivos [7].

En 2012, la Asociación KALLARI y las familias Kichwas identificaron vainilla silvestre de la especie *V. odorata* en las riberas del Río Jatun Yaku y Río Napo [25]. Iniciaron el rescate y domesticación de esta especie, con el apoyo de la Fundación GEO (Generación de Estudio y Opinión) y la GIZ (Sociedad Alemana para la Cooperación Internacional) para realizar trabajos de cultivo, manejo agronómico, curado y macerado [25].

A nivel comercial, las exportaciones ecuatorianas de vainilla mostraron un notable crecimiento, pasando de 20,000 dólares en 2015 a 350,000 dólares en 2019 [34]. En este periodo en promedio se exportó aproximadamente una tonelada de vainilla al año superando en más de tres veces el valor de la vainilla producida en Madagascar [34]. Este fenómeno se debe a la especialización de Ecuador en la variedad *V. tahitensis*, altamente valorada a nivel internacional debido a su calidad [34].

1.1.6. Especies de vainilla presentes en la Amazonía ecuatoriana

La rica diversidad de hábitats y microclimas en la Amazonía ecuatoriana, influida por factores como la altitud de la Cordillera de los Andes, crea un entorno propicio para la

diversidad y especiación de orquídeas [35]. Según se destaca en investigaciones previas, en el ecosistema Napo-Pastaza, se han identificado a *V. pompona*, *V. ododrata*, *V. cribbiana*, entre otras especies no identificadas [35]. Además, la guía de identificación de especies de vainilla con potencial económico en la Amazonía ecuatoriana menciona a *V. planifolia*, *V. tahitensis*, *V. inodora* y *V. ssp* [36].

Otras especies reportadas son *V. trigonocarpa* y *V. guianensis*, cuya distribución abarca desde México hasta Brasil [37]. Así también *V. dresseleri*, especie ha se ha documentado desde la cuenca del Río Magdalena hasta el Norte de Perú [2]. *V. hostmannii* y *V. karen-christianae*, especies ampliamente distribuidas en Centro América y la Amazonía [15]. También las especies *V. alba* y *V. pejorata* forman parte de esta investigación, especies que hasta la fecha de realización de esta tesis no se ha reportado en la literatura pero que, por comunicación personal del Ing. Wilfrido de la Cruz, quien está en proceso de catalogarlas, proporcionó información valiosa para esta investigación.

1.1.7. Diversidad genética

La diversidad genética es la medida de la variabilidad presente en los genes y alelos de una población [38]. Esta variabilidad se da debido a diversos procesos como mutaciones y recombinación genética, esto permite que algunos individuos poseen características que les otorgan ventajas adaptativas, contribuyendo así a su supervivencia y reproducción [8,38].

Lo contrario a diversidad genética es la erosión genética, ya que representa la pérdida de esta diversidad en las poblaciones a lo largo del tiempo, resultado de actividades antropogénicas que impactan en la pérdida de los hábitats, prácticas agrícolas inadecuadas y el cambio climático [39]. Adicionalmente, la domesticación de especies puede contribuir a la erosión genética al seleccionar y propagar solo ciertos genotipos [8,40].

La diversidad genética se puede abordar desde un enfoque intraespecífica, interespecífica o ambos. La primera engloba las variaciones genéticas que ocurren dentro de una misma especie, siendo crucial para la biodiversidad y el mejoramiento de las plantas [8,41]. La diversidad genética interespecífica, en cambio, se refiere a las

variaciones genéticas entre especies, lo que permite la comprensión de las relaciones evolutivas y la conservación [42].

En el análisis de diversidad poblacional intraespecífica se puede realizar basado en frecuencias o en distancias [43]. El análisis con frecuencias, se basan en estimaciones de las frecuencias alélicas para datos codominantes como los obtenidos por los marcadores SSRs [43]. Los análisis basados en frecuencias incluyen estadísticas F, la identidad genética y medidas de distancia de Nei, procedimientos de asignación de población, pruebas de dispersión sesgada por sexo, entre otros [43]. Por otro lado, los análisis basados en distancias genéticas [43], con estos datos se pueden realizar análisis genéticos extensos, que incluyen Análisis de Varianza Molecular (AMOVA); Análisis de Coordenadas Principales (PCoA); Construcción de árboles UPGMA, Neighbor Joining, entre otros [43] .

1.1.8. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son pequeños fragmentos específicos de ADN que permiten observar variaciones en la secuencia genética [44]. A diferencia de los marcadores ligados a características morfológicas, no reflejan directamente el fenotipo [45]. Están ubicados en lugares precisos del genoma, marcando la posición de genes y la herencia de características, proporcionando información clave sobre la diversidad genética [45]. Pueden identificar diferencias genotípicas, conocidas como polimorfismos, causadas por diversas mutaciones de ADN [44]. Un buen marcador de ADN debe ser ubicuo, fácil de ensayar, rentable, multiplexado y automatizable, altamente polimórfico, codominante, reproducible y compatible entre laboratorios [46].

Los marcadores moleculares que se fundamentan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa conocida como PCR. Requieren de marcadores que pueden ser de una secuencia arbitraria, semiarbitraria o específica. Algunos de estos marcadores son RAPDs (Polimorfismo Amplificado al Azar) ALFPs (Longitud de fragmentos amplificados), SNPs (Polimorfismo de nucleótido único), SSRs (Secuencias de Repetición Simple), también llamados microsatélites, y los ISSRs (Repeticiones de Secuencia Simple Interspecífica).

1.1.8.1. SSRs (Microsatélites)

Los microsatélites son fragmentos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten uno a uno en secuencia o en tándem aleatoriamente en el genoma de todos los seres vivos [47]. Esto se debe a que, pueden ocurrir deslizamiento en la replicación del ADN o por errores de recombinación, lo que resulta en la adición o eliminación de pares de bases o motivos repetidos, el número de repeticiones es único de cada individuo [48], generando para el mismo locus numerosos alelos, típicamente en el rango de 10 a 20 alelos [49]. Además, estos marcadores se caracterizan por su hipervariabilidad, abundancia, reproducibilidad, y codominancia [47]. Estos marcadores son ventajosos para estudios de diversidad genética [28].

La aplicación de marcadores microsatélites ha sido especialmente relevante en el estudio de *V. planifolia*, como reportaron Bory, *et al* (2008), en un estudio que desarrolló el primer conjunto de 14 marcadores microsatélites específicamente para esta especie. Estos resultaron monomórficos para cultivos clonales de *V. planifolia*, pero se evidenciaron polimorfismos en otras especies. Además, la transferencia fue exitosa a otras especies relacionadas en América, como *V. tahitensis* y *V. odorata*, y también se transfirieron a otras especies presentes en África [50]. En 2011, Gigant, *et al*. Desarrollaron otro set de 19 marcadores microsatélites polimórficos basados en dos especies africanas de vainilla sin hoja. Estos marcadores, fueron probados en siete especies de vainilla de diversas regiones geográficas, las especies nativas del continente americano incluyeron a *V. planifolia* y *V. pompona* de los cuales nueve microsatélites fueron polimórficos, con dos a ocho alelos por locus [51]. Los marcadores microsatélites son una herramienta para investigar la variabilidad genética y pueden aplicarse en varios genotipos de vainilla.

1.1.8.2. ISSRs

Se caracterizan por alta reproducibilidad y costo relativamente bajo [52]. Estos marcadores permiten amplificar múltiples regiones del genoma simultáneamente de las regiones variables entre microsatélites [53]. Son empleados con éxito en diferentes especies vegetales [54]. En vainilla, los marcadores ISSRs han servido para evaluar diversidad genética en *V. planifolia* en India [55], discriminar entre individuos silvestres y otras especies del género en la Península de Yucatán [14]. Estas investigaciones reportan la baja diversidad genética dentro de las poblaciones específicas en *V.*

planifolia, indicando uniformidad genética en algunos genotipos y la presencia de amenazas para las accesiones genéticamente diferenciadas. En este contexto, los marcadores ISSRs se han utilizado para la caracterización molecular de vainilla, generando información relevante para la mejora de cultivos y la conservación de la diversidad genética. Los resultados obtenidos al emplear los marcadores ISSRs e ISSRs, ya sea con un enfoque en análisis de frecuencias alélicas o distancias genéticas requieren previamente la realización del genotipado. Esta técnica es esencial para identificar las variaciones en el ADN de organismos de la misma especie [56,57].

1.2. Planteamiento del problema

Existe un conocimiento limitado sobre la identidad genética y la diversidad de especies que integran el género *Vanilla* en la Amazonía ecuatoriana [58]. En esta región, se encuentran especies silvestres poco exploradas, caracterizadas por una alta variabilidad genotípica debido a la variación vegetativa y plasticidad fenotípica asociada con el crecimiento y las características ecológicas de la Amazonía [12]. Además, ocurren eventos de hibridación interespecífica comunes en el género *Vanilla* [59,60]. Esta situación plantea un problema, ya que la diversidad genética en lotes de producción de *V. odorata* es desconocida. Ya que algunas especies del bosque han sido introducidas en los cultivos por los productores [25], esto ha generado incertidumbre sobre las especies que están propagando y cultivando. Esta investigación aportará información relevante sobre la diversidad genética que existe en los cultivos de vainilla en la provincia de Napo.

1.3. Justificación de la investigación

V. planifolia, clasificada como el segundo cultivo de especia más cultivado, destaca por su inmenso valor comercial [2]. Sin embargo, su pariente silvestre *V. odorata* [9], de relevancia socioeconómica [2,25], presenta una oportunidad para los productores de vainilla en la provincia de Napo. *V. odorata* presenta un alto contenido de vainilina [7], que es responsable de conferirle el sabor y aroma característicos a vainilla. Además, comparte un perfil aromático similar a *V. tahitensis* [7], que es la segunda especie de vainilla que más cultiva después de *V. planifolia* [24]. Esto subraya la necesidad de investigar *V. odorata* con fines comerciales.

Además, la investigación sobre la diversidad genética presente en los cultivos de vainilla de la provincia de Napo es crucial para identificar la variabilidad genética. Este

conocimiento es necesario para la trazabilidad en los sistemas de producción de vainilla, y permitirá a los productores diferenciar sus productos en el mercado al ofrecer vainilla de alta calidad con características únicas [8]. Además, contribuirá a la identificación de nuevos genotipos, fortalecerá la conservación de especies en peligro y mejorar las estrategias de cultivo [61].

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo general

Explorar la diversidad genética presente en los cultivos de vainilla mediante marcadores moleculares SSRs y ISSRs.

1.4.2. Objetivos específicos

- Identificar las condiciones para el genotipaje de vainilla con un set de marcadores SSRs e ISSRs.
- Determinar perfiles de amplificación de varias especies de vainilla presentes en los cultivos de vainilla con los marcadores SSRs
- Analizar la diversidad genética presente en cultivos de *Vanilla odorata* en la provincia de Napo.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Sitio de experimentación

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología, ubicado en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). A continuación, se presentan las condiciones del sitio de experimentación en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos del sitio de experimentación

Ubicación	Detalle
Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Sitio	Estación Experimental Santa Catalina
Altitud	3100 msnm
Latitud	0° 22' 8" S
Longitud	78° 33' 24" O

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

2.2. Material vegetal

El material vegetal utilizado en esta investigación fueron 153 muestras de hojas de vainilla de las especies *V. odorata*, *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. tahitensis*, *V. alba*, *V. cribbiana*, *V. trigonocarpa*, *V. dressleri*, *V. pejorata*, *V. guianensis* y *V. ssp.* Estas muestras fueron colectas por el INIAP, el cual cuenta con sus respectivos permisos de investigación de acceso al recurso genético proporcionado por el Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE), con el código MAATE-CMARG-2023-0068.

Para la realización de este trabajo, el INIAP proporcionó el material vegetal en dos grupos, el primer grupo de muestras fueron 70 muestras secadas en bolsas de plástico con gel de sílice, mientras que las 83 muestras restantes fueron entregadas en un tanque con nitrógeno líquido.

Tabla 2. Cantidad de muestras por especies especie de vainilla según el método de toma de muestra.

Especie	Método de toma de muestra		Total
	Gel de sílice	Nitrógeno líquido	
<i>V. odorata</i>	12	38	50
<i>V. planifolia</i>	19	-	19*
<i>V. pompona</i>	6	3	9
<i>V. tahitensis</i>	5	1	6
<i>V. alba</i>	5	1	6
<i>V. cribbiana</i>	5	1	6
<i>V. trigonocarp</i>	1	-	1
<i>V. dresseleri</i>	-	1	1
<i>V. pejorata</i>	-	1	1
<i>V. guianensis</i>	-	1	1
<i>V. ssp</i>	18	35	53
Total	71	82	153

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

(*) Dos muestras de *V. planifolia* son de origen mexicano y forman parte del control positivo para 14 marcadores SSRs que se utilizó en la validación y transferencia de marcadores.

Las muestras codificadas como "Mv" corresponden a aquellas que fueron colectadas y secadas con gel de sílice, mientras que las muestras codificadas como "Vo" son aquellas que se colectaron y almacenaron con nitrógeno líquido. Dichas muestras proceden de las provincias de Orellana, Napo, Pastaza y Morona Santiago (Anexo 1). Los dos métodos de toma de muestra fueron realizados en dos periodos distintos. Inicialmente la experimentación inicio con las muestras secas y por problemas en cuanto a la calidad de ADN que se obtuvo (sección 3.2) se realizó la colecta de con nitrógeno líquido.

2.3. Unidad experimental y factores del estudio

Cada una de las 150 muestras de ADN extraídas de los genotipos de vainilla analizados en esta investigación representa una unidad experimental. En este estudio, se consideraron factores como el número de bandas amplificadas por genotipo, expresado en peso en pares de bases, y los loci amplificados. Las variables analizadas en relación con los marcadores SSRs incluyeron las variaciones en los alelos y la presencia o ausencia de cada muestra en relación con los marcadores utilizados. En el caso de los marcadores ISSRs, se consideró el peso de cada alelo.

2.4. Metodología

2.4.1. Extracción de ADN

Las hojas de las muestras de vainilla, previamente secadas con gel de sílice, se cortaron en tiras sobre papel toalla industrial. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se introdujo una perla metálica, seguida de las tiras de las hojas con una pinza metálica y otra perla en la parte superior de las hojas, se trató de que el tubo contenga aproximadamente 20 g de material vegetal, se etiquetó el tubo con el nombre de la muestra. Se desecharon los restos que quedaron en el papel toalla y se desinfectó con alcohol la pinza y la tijera. Luego, se procedió a repetir el mismo proceso con la siguiente muestra. Posteriormente, las muestras fueron introducidas y sometidas a pulverización en el molino MM 400 Restsch, y se almacenaron en gradillas a temperatura ambiente.

Con las muestras frescas almacenadas en nitrógeno líquido, se retiraron del tanque y cada muestra se colocó en un mortero previamente autoclavado y enfriado a -20 °C. Se molió la muestra, y material vegetal molido se transfirió a un tubo aproximadamente 20 g de material vegetal, se etiquetó con el nombre correspondiente y se almacenó en refrigeración a -20 °C, hasta que se inició con el proceso de extracción.

La extracción de ADN se realizó mediante un protocolo convencional descrito por Souza, et al., (2012) [62], con algunas modificaciones para adaptarlo a las condiciones del laboratorio en la EESCA-INIAP. Este procedimiento fue aplicado, tanto a las muestras secas con gel de sílice en y las muestras frescas maceradas con nitrógeno líquido.

La preparación de los buffers se llevó a cabo dentro de la Sorbona, donde se introdujeron todos los reactivos necesarios, incluyendo los sólidos que se habían pesado previamente en una balanza analítica. Además, se utilizaron materiales y equipos como la plancha de calor, ya que la preparación de estos buffers requería agitación y calor para su solubilización. Una vez completada la preparación, el buffer CTAB se mantuvo a una temperatura de 60 °C en un baño María hasta que fueron requeridos en los siguientes procesos.

En el proceso de extracción, se tomaron las muestras maceradas y se les añadió 1 mL de buffer de sorbitol (Tabla 3). Luego, se homogeneizaron mediante agitación en un vórtex. Posteriormente, se centrifugaron a 5700 rpm durante 10 minutos, y se eliminó el

sobrenadante. Este proceso se repitió por dos ocasiones más. Después, se añadió 1 mL de buffer CTAB (Tabla 4) a las muestras y se homogeneizaron nuevamente. Posteriormente, se incubaron a 60°C durante 1 hora en un baño María. Consecutivamente, se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm.

Se retiró el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. A este tubo se le añadieron 700 µL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1 CIA). Las muestras se mezclaron durante 5 minutos en un vórtex y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm. La fase acuosa resultante se transfirió a otro tubo, al cual se le añadieron 70 µL de acetato de sodio y 460 µL de isopropanol previamente enfriado a -20°C. Se mezcló suavemente varias veces hasta lograr la homogeneización y se incubó a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugaron las muestras durante 30 minutos a 13.000 rpm. A continuación, se eliminó el contenido y se lavaron los pellets con 500 µL de etanol al 70% por tres veces y una vez con 500 µL de etanol absoluto. Después de lavar las muestras, se llevaron al evaporador para su secado durante 30 minutos. Finalmente, se añadieron 100 µL de TE 1X a las muestras y se les agregaron 2 µL de RNAsas (10 ng/µL). Se les dio un pequeño vórtex y un spin, y se colocaron en el termobloque por 20 minutos a 37°C.

Tabla 3. Reactivos y cantidades para preparar el tampón de sorbitol, calculado para 1 ml por muestra, utilizado en la extracción de ADN de vainillas.

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl pH 8 1M	0.10 ml
Sorbitol	0.01 g
EDTA pH 8 0.5 M	0.01 ml
PVP-40 1%	0.01 g
β – mercaptoetanol 1%	0.01 ml
Agua destilada	0.86 ml

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Para preparar el buffer sorbitol, se requiere tener en cuenta que, el cálculo descrito en la Tabla 3 está diseñado para 1 sola muestra, para realizar el protocolo se debe hacer el cálculo para tres muestras, y por el total de muestra que se va a extraer.

Tabla 4. Reactivo y cantidad para la preparación de buffer CTAB calculado para 1 ml por muestra, utilizado en la extracción de ADN de vainillas.

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl pH 8 1M	0.10 ml
NaCl 5M	0.60 g
CTAB	0.03 G
EDTA 0.5 M	0.04 ml
PVP-40 1%	0.01 g
β – mercaptoetanol 0.2 %	0.01 ml
Agua destilada	0.21 ml

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

En la preparación del CTAB, este se debe calcular solo para el número de muestras que se va a extraer ya que, solo se utiliza una única vez.

2.4.2. Cuantificación y diluciones de muestra de ADN

Para realizar la cuantificación del ADN, se trabajó con el espectrofotómetro de microplacas Epoch de BioTek Instruments© siguiendo el protocolo en [63]. El espectrofotómetro tiene una placa de 16 pocillos dispuesta en 2 columnas y 8 filas. Además, se empleó el software GEN5 para ácidos nucleicos a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

Antes de cuantificar el ADN, fue necesario calibrar el equipo. Para ello, se colocaron 2 μ L de TE 1X en la primera fila, utilizando TE 1X como blanco, ya que este reactivo se empleó para disolver el ADN. Una vez calibrado el equipo, se procedió a limpiar los pocillos con agua destilada y papel industrial. Luego, se cargaron todas las muestras. Debido a que la placa solo cuenta con 16 pocillos, el proceso se repitió varias veces para analizar todas las muestras.

Las condiciones óptimas para utilizar una muestra fueron de una pureza de 1.7 a 2 ng/ μ L, una relación de concentración cercana y superior a 100 ng/ μ L. El volumen con el que se trabajó en disoluciones en agua ultrapura con colorante con tartrazina fue de 10 ng/ μ L de ADN genómico en un volumen de 100 μ L. El colorante es una referencia para identificar el ADN, ya que este no presenta color cuando se disuelve el ADN en el buffer TE 1X.

2.4.3. Validación de muestras

Se tomaron cuatro marcadores al azar (mVroCIR001, mVroCIR005, mVroCIR006, mVroCIR009) de un set de 30 marcador SSRs proporcionado por la Estación Santa Catalina del INIAP (Anexo 2). También se tomaron al azar 11 muestras de ADN de vainillas y se procedió a hacer amplificaciones mediante la técnica de PCR y electroforesis según lo descrito en [44]. A continuación, en la Tabla 5 y 6 se especifica el máster mix PCR y el programa térmico utilizado.

Tabla 5. Máster mix para PCR en amplificación de ADN de vainilla con marcadores SSRs.

Reactivos PCR	Concentración inicial (ng/ μ L)	Concentración final (ng/ μ L)	VOL. 1 rx (μ L)
Agua ultrapura	-	-	2.18
GoTaq®flexi Buffer(x) PCR	5	1	1.50
MgCl ₂ (mM)	25	2	0.60
dNTP's(mM)	5	0.253	0.38
Primer F (μ M)	10	0.5	0.38
Primer R (μ M)	10	0.5	0.38
Taq polimerasa (U/ μ L)	5	0.067	0.10
ADN (ng/ μ L)	5	1.33	2.00
Volumen total			7.5

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

Las concentraciones de los reactivos en el máster mix de la Tabla 5 están calculadas para una sola reacción. Estos valores deben multiplicarse por el número de reacciones o muestras que se van a amplificar.

Tabla 6. Programa térmico de PCR para amplificación de ADN de vainilla con marcadores SSRs.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	45 s	29
Anillamiento	45-55	1 min	
Elongación	72	1.2 min	
Elongación final	72	7 min	1
Enfriamiento	10	5 min	1

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

El producto que se obtuvo de la PCR se cargó en un gel de agarosa al 2% de (v/v), se le añadió SYBR™ Safe DNA en una concentración de 0.5 X, y se añadió un marcador de peso molecular de 100pb. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis horizontal a 100 V, por 35 minutos.

El objetivo al utilizar los 4 marcadores fue encontrar al menos un marcador que amplificara todas las muestras. En este sentido, se seleccionó uno que amplificó todas las muestras de ADN seleccionadas y que presentó una buena resolución en la electroforesis. Este marcador posteriormente se utilizó para validar el resto de las muestras de ADN.

2.4.4. Validación y estandarización de marcadores

2.4.4.1. Marcadores moleculares SSRs

Se tomó el set de 30 marcadores y se amplificó con 5 muestras de vainilla cada uno, siguiendo el máster mix y programas de amplificación descritos en la Tabla 5 y 6. En casos donde algunos marcadores no amplificaron ninguna de las muestras de ADN, se realizó gradientes de temperatura, variando la temperatura de anillamiento en un rango de 45 °C a 60 °C en intervalos de 5°C.

El producto PCR se cargó en gel de agarosa siguiendo el proceso que se realizó en la validación de muestra. Luego de analizar los resultados en el gel de agarosa, se sacaron del estudio los marcadores que no amplificaron en ninguna de las temperaturas a las que fueron expuestos.

2.4.4.2. Marcadores moleculares ISSRs

Se seleccionaron 2 marcadores (UBC 840 y 836) previamente identificados en la literatura, los cuales habían sido utilizados en estudios de variabilidad genética en vainilla, de un conjunto de marcadores ISSR disponibles en el laboratorio de biología molecular de la EESC. Con estos marcadores, se procedió a amplificar por PCR y correr en gel de agarosa con las condiciones de estandarización en [64].

Para trabajar con muestras de ADN de vainillas, se realizaron algunos ajustes en la cantidad de ADN, la cantidad de cloruro de magnesio y la temperatura. Cuando se

estandarizaron los 2 marcadores, se aplicó el mismo máster mix a 26 marcadores en los que solo se varió la temperatura entre 37, 45 y 50 °C. En la Tabla 7 y 8, se describe el máster mix utilizado y el perfil térmico.

Tabla 7. Máster mix de PCR para amplificación de ADN de vainilla con marcadores ISSRs.

Reactivos PCR	Concentración inicial (ng/μL)	Concentración final (ng/μL)	VOL. 1 rx (μL)
Agua ultrapura	-	-	4.1
GoTaq®flexi	5.0	1.0	2.0
Buffer(X) PCR	25.0	2.0	0.8
MgCl ₂ (mM)	5.0	0.1	0.2
dNTP's(mM)	10.0	0.1	0.2
Marcador ISSR (μM)	5.0	0.1	0.2
Taq polimerasa (U/μL)	5.0	2.5	2.5
ADN (ng/ μL)			10
Volumen total			

.....Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Tabla 8. Programa térmico para amplificar ADN de vainilla con marcadores ISSRs.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	92	4 min	1
Desnaturalización	92	30 s	
Anillamiento	45-50	1 min	39
Elongación	72	1 min	
Elongación final	72	10 min	1
Enfriamiento	4	10 min	1

.....Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

El producto PCR resultante se cargó en un gel de agarosa al 2% en volumen/volumen (v/v), y se le añadió SYBR™ Safe DNA, a una concentración de 0.5X. Se utilizó una escalera molecular de 100 a 2.000 pb. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis horizontal a 100 V por 50 minutos.

2.4.5. Transferibilidad de marcadores moleculares SSRs

Con los marcadores moleculares SSRs y las muestras de ADN previamente validados se procedió a realizar la transferibilidad de los marcadores a los genotipos de vainilla *V. odorata*, *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. tahitensis*, *V. alba*, *V. cribbiana*, *V. trigonocarpa*,

V. dresseleri, *V. peyorata*, *V. guianensis*. Para ello, se colocó dos muestras de cada genotipo y se amplificó los marcadores SSRs siguiendo máster mix y el perfil de amplificación de la Tabla 4 y 5. Durante este proceso, se tuvieron en cuenta la temperatura de amplificación previamente obtenidos durante la validación y estandarización de los marcadores.

2.4.6. Perfiles de amplificación y genotipaje

2.4.6.1. Amplificación de SSRs con la tecnología M13-tailing

La amplificación con la tecnología M13-tailing, descrito en [44], requirió de pasos extras en el máster mix convencional de PCR.

Tabla 9. Máster mix para amplificar en PCR en monoplex mediante M13-tailing.

Reactivo Monoplex PCR	Concentración inicial (ng/μL)	Concentración final (ng/μL)	VOL. 1 rx (μL)
Agua Ultrapura	-	-	0.32
GoTaq®flexi sin color	5.00	1.00	1.00
Buffer(x) PCR			
MgCl ₂ (mM)	25.0	2.50	0.50
dNTP's(mM)	5.00	0.20	0.20
M13 700/800	1.00	0.16	0.80
Primer (μM) F- M13	1.00	0.01	0.05
Primer (μM) R	10.0	0.16	0.08
Taq polimerasa (U/μL)	5.00	0.05	0.05
ADN (ng/ μL)	5.00	2.00	2.00
Volumen total			5.00

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Tabla 10. Perfil térmico para amplificar en PCR en monoplex mediante la tecnología M13-tailing.

Fase	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	2min	1
Desnaturalización	95	4 min	1
Desnaturalización	95	1 min	
Anillamiento	55	2min	25
Elongación	72	2min	
Elongación final	72	10 min	1
Enfriamiento	4	10 in	1

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Se siguió el protocolo descrito en [44], se preparó el gel de poliacrilamida con una mezcla que incluyó 20 ml de Gel Matrix KB Plus al 6.5%, 150 µL de persulfato de amonio al 10%, y 15 µL de TEMED (NNNN-Tetramethylethylene-dianime) al 99%. Se vertió esta solución en placas de vidrio, insertamos el peine y dejamos polimerizar. Luego, se colocó el gel en el analizador junto con el buffer TBE 1x KB Plus LI-COR y realizamos una precorrida a 1500 V durante 25 minutos.

Para cargar las muestras amplificadas, se añadió 5 µL de Blue Stop Solution por cada producto y desnaturalizamos el ADN a 94 °C durante 3 minutos. Luego, se cargó las muestras diluidas en el gel utilizando una jeringa microliter multicanal y el marcador de tamaño apropiado (IRDye 700 o IRDye 800). Finalmente, se ejecutó la electroforesis a 1500 V durante 1 hora y 30 minutos, se obtuvo una imagen digital como resultado de la electroforesis capilar. Normalmente, con la imagen obtenida de la electroforesis se procede a realizar el genotipado con el software SAGA (SAGA GT software para análisis de microsatélites) [49]. En esta investigación no se llegó a realizar el genotipaje con este software.

2.4.7. Amplificación de los marcadores ISSRs en agarosa

Se amplificó por PCR 50 ADNs genómicos del genotipo *V. odorata* con 9 marcadores SSRs. El diseño de cada gel constaba generalmente de 13 muestras, el marcador de peso molecular en escalera de 100 a 2000 pb, un control negativo y una muestra de ADN que se replicaba en cada gel. Esto permitió conectar todos los geles y sirvió como indicador de la reproducibilidad del marcador. Dado que, los resultados pueden variar

entre geles al compararse con el marcador de peso molecular en escalera, la repetición de la muestra de ADN facilitó evaluar la consistencia.

Se obtuvieron los resultados de los geles tras la amplificación por PCR y la corrida electroforética. Estos geles fueron analizados con el software GelAnalyzer 19.1, el cual proporcionó información sobre el peso de las bandas de cada muestra.

2.5. Análisis multivariados

2.5.1. Generación de una matriz binaria y depuración de datos

Con los datos de las bandas de cada ADN genómico con todos los marcadores se generó una matriz, la cual incluía todas los ADN de las muestras de vainilla como filas y el peso de las bandas como columnas. Posteriormente, esta matriz se convirtió en una matriz binaria de presencia y ausencia de banda, donde la presencia se representó con 1 y la ausencia con 0. Luego, se llevó a cabo una depuración de los datos, para lo cual se aplicaron los siguientes criterios:

- Si en la columna de un locus solo había un dato de presencia y los demás eran ausentes, este dato se consideró atípico y se eliminó la columna. Lo mismo se realizó si en la columna solo había un dato de ausencia.
- Si en la fila se encontraba con más del 10% de ausencia de datos (gaps) por marcador, se procedió a eliminar la muestra.

2.5.2. Análisis de asignación poblacional

El programa STRUCTURE 2.3.4 se utilizó para analizar datos genéticos con el objetivo de agrupar individuos en poblaciones. Su método basado en el muestreo bayesiano de Monte Carlo mediante cadenas de Markov (MCMC) [65], permitió estimar la probabilidad de un número específico de poblaciones (K), considerando el equilibrio de Hardy-Weinberg [66]. Por otro lado, el software Structure Harvester Web v0.6.94, disponible (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) complementa este análisis al determinar el número óptimo de grupos genéticos mediante el método de Evanno [67].

Para ello, con la matriz depurada de las muestras de la especie *V. odorata*, se convirtió a texto delimitado por tabulaciones y se empleó el programa STRUCTURE 2.3.4 en el cual se digitó número de individuos: 28, el número de loci: 40, y los datos perdidos

representados por: -9. Además, se seleccionó que la información contenía etiquetas individuales y casilleros con el nombre del marcador, y que cada individuo se encontraba en una sola línea. La matriz utilizada en este análisis reposa en Anexo 4.

Para realizar el cálculo de las poblaciones, se procedió a crear con modelo en el "Admixture Model", este tuvo un periodo de "Burning" de 1 000, y el número de repeticiones MCMC (Markov chain Monte Carlo) fue de 10 000 iteraciones. Se realizaron 10 simulaciones para cada valor de k poblaciones, variando de 1 a 10. Los resultados obtenidos se comprimieron en formato "zip" y se cargaron en Structure Harvester Web v0.6.94. Los resultados determinaron el mayor valor de Δk , que corresponde al número de posibles poblaciones presentes en los datos analizados.

2.5.3. Análisis de agrupamiento

Se generó un dendrograma a partir de la matriz de datos alojada en el Anexo 3, compuesta por 28 muestras, utilizando el software DARWIN 6.0.21. Antes de utilizar el software, se convirtió la hoja de Excel que contenía la matriz binaria de los datos a un archivo en formato de texto Unicode. Este archivo se guardó en una carpeta previamente creada, que sirvió como directorio de trabajo y dónde se guardó los archivos que fueron generados por el software.

Luego, se abrió el software y en la barra de opciones se seleccionó "archivo" y después "importar matriz de datos". Se buscó y seleccionó la carpeta que contenía la matriz, se cargó la matriz y se seleccionó el tipo de datos, que en este caso fue de datos simples. También se especificó el código que representa los datos faltantes, que en la matriz estaban representados con el valor -9.

Una vez cargada la matriz de datos, se procedió a seleccionar la opción de disimilaridad, donde se eligió calcular a partir de los datos únicos. Se seleccionó el archivo que contiene la matriz de datos y se indicó eliminar completamente las variables con datos faltantes, utilizando el código -9. Además, se estableció el valor de arranque para el Bootstrap en 30.000. En cuanto al índice de similitud, se seleccionó el coeficiente de Dice para la presencia y ausencia de datos. En la codificación, se especificó que 0=abs/1=pres. Se seleccionó la carpeta donde se guardará el archivo que se generará. Terminado este proceso, se accedió a la barra de opciones y se seleccionó "construcción de árboles". Se eligió la opción del vecino más cercano y se abrió la

ventana para seleccionar el archivo que contiene la matriz de disimilaridad. Se optó por la opción de vecinos ponderados y se seleccionó el Bootstrap en 30.000. Además, se marcó la opción de dibujar el árbol al finalizar.

Se abrió una ventana con el diseño radial, pero este se cambió a jerárquico horizontal. En la pestaña de identificación, se seleccionó "abrir identificadores". Se escogió el archivo ".don" y se volvió a seleccionar "abrir identificador". Se eligió la opción "Ident_1", lo que permitió mostrar los códigos de las muestras en el dendrograma. Para añadir la escala, simplemente se seleccionó la opción mostrar escala. Este dendrograma se utilizó para visualizar las poblaciones identificadas mediante el método bayesiano, siguiendo la metodología propuesta por [68]. La matriz completa y depurada de los datos con los que se trabajó en estos análisis se encuentra en el Anexo 3.

2.5.4. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

Es una técnica que facilita la identificación y representación en conjuntos de datos multivariantes en un espacio tridimensional [69]. Y proporciona La suma de todos los ejes Cada eje explica la variación total [69]. Y proporciona información sobre la cantidad de varianza en los datos de cada eje. La suma de los tres ejes proporciona información sobre cómo se agrupan o separan los datos [69].

Antes de realizar el PCoA, se organizó la matriz por poblaciones según los valores K obtenidos del Structure Harvester. Para ello, se asignó a cada muestra la población a la que tenía mayor probabilidad de pertenecer. La realización del PCoA se llevó a cabo utilizando GenAlEx, un complemento de Excel. Primero, se abrió la hoja de Excel que contenía la matriz de datos. Luego, se descargó el complemento desde el sitio web (<http://biology.anu.edu.au/GenAlEx/>).

Se abrió el archivo GenAlEx 6.503.xlam y al ejecutarlo, se abrió Excel en la hoja que contenía la matriz de datos. Se otorgaron los permisos necesarios para habilitar macros de Excel, y en la barra de menú apareció GenAlEx. Antes de acceder, fue necesario configurar los parámetros para que la matriz pudiera ser leída.

Los parámetros insertados fueron los siguientes: en la celda A1, el número de loci de la matriz (40); en la celda B2, el número de loci (40); en C2, el número de poblaciones (3); en D2, nuevamente el número de poblaciones (3); en la celda E2, el número de muestras

que componen la población 1; en la celda F2, la cantidad de muestras que componen la población 2; en G2, la cantidad de muestras que componen el grupo 3; y en H1, el valor de codominancia (1) y en I2, se colocó el número de muestras (28). La matriz debe tener una disposición como se muestra en Anexo 4. Una vez preparada la matriz, se procedió a hacer clic en GenAlEx en la barra de menú y se seleccionó la opción "Distancias genéticas". Esto generó la matriz de distancias. Sin salir de la hoja de la matriz de distancias, se volvió a seleccionar "Basado en distancia" y se eligió la opción de PCoA. Se abrió una ventana en la que se seleccionaron tres matrices de distancias, el método de covarianza estandarizado y la opción de etiquetar los datos. Después de hacer clic en "Aceptar", se abrió otra ventana en la que se seleccionó el tipo de matriz, que en este caso fue binaria diploide, y la opción de salida de distancias. Al hacer clic en "Aceptar", se generó el gráfico.

2.5.5. AMOVA (*Análisis Molecular de Varianza*)

Se empleó el programa GenAlex V6.5 de acuerdo con [69], en este caso se trabajó con una matriz binaria depurada de 28 muestras de *V. odorata*, y 40 locus. En la matriz se estructuraron las muestras excluyendo aquellas que no presentaban una definición clara de la población, con el propósito de reducir al mínimo el error. Para llevar a cabo este análisis, se utilizó la estructura de la matriz previamente realizada en el PCoA. Se seleccionó la opción de AMOVA en la base de distancias y se completaron los datos de manera similar a como se hizo con el PCoA. El cálculo se llevó a cabo mediante 999 permutaciones, y se consideraron las opciones de "pairwise population".

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN de vainilla mediante el método convencional descrito por Souza et al. (2012) resultó adecuada para muestras recolectadas y maceradas con nitrógeno, obteniendo una relación de pureza de 1.7 a 2 en una relación de 260/280 nm, valores idóneos para las reacciones de PCR, las cuales requieren ADN de alta calidad [70]. Sin embargo, en el caso de las muestras secadas con gel de sílice, la mayoría no mostraron niveles satisfactorios de pureza presentaron valores 0,46 y 1,8 en una relación de 260/280 nm.

3.2. Validación del ADN y estandarización de Marcadores SSRs e ISSRs

Se validaron las muestras de ADN utilizando el marcador mVpICIR010, el cual fue el primer marcador estandarizado y se empleó para validar la mayoría de las muestras de ADN. Durante el proceso de estandarización de los marcadores, se logró estandarizar 18 marcadores moleculares SSR utilizando el máster mix descrito en la Tabla 5 y el perfil de amplificación de la Tabla 6. En la Figura 2, se aprecia la validación de un grupo de muestras de vainilla con el marcador molecular a una temperatura de annealing de 55°C.

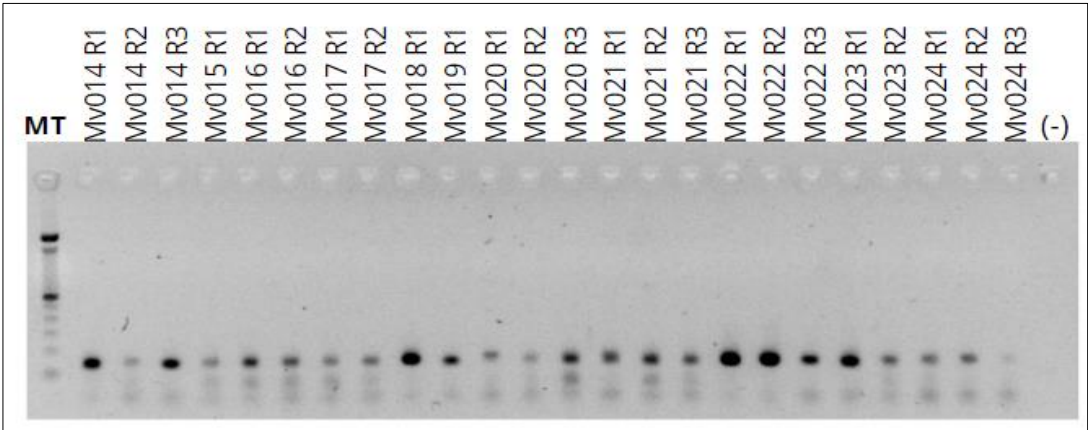


Figura 2. Determinación visual de la calidad de ADN de vainilla secadas con gel de sílice.
Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

En la Figura 2, algunas muestras de vainilla amplificadas con el marcador molecular microsatélite mVpICIR010 presentan una baja intensidad de amplificación y otras

presentan una alta intensidad. Por otro lado, se presenta en la Figura 3, la validación de las muestras que fueron colectadas y maceradas con nitrógeno líquido.

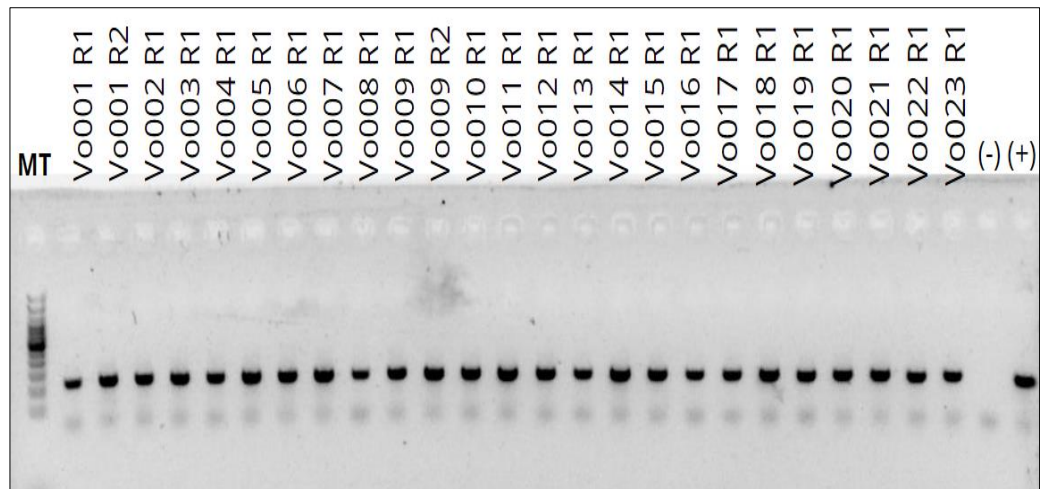


Figura 3. Determinación visual de la calidad de ADN de vainilla con nitrógeno líquido.
Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

En la Figura 3, se observa una amplificación exitosa de un grupo de muestras de vainilla, las bandas (amplicones) presentan una alta intensidad, clara, bien definidas y se encuentran dentro del rango del marcador de talla que va de 100 a 2.000 pb.

Independientemente de las diferencias que existen en las amplificaciones entre las muestras tratadas con gel de sílice y las muestras tratadas con nitrógeno líquido, se logró estandarizar 18 marcadores del conjunto de 30 disponibles para esta investigación. En cuanto a los marcadores ISSRs, se contó con un conjunto de 28 marcadores, de los cuales se estandarizaron 14, sin embargo, solo se utilizaron 9 de ellos.

Las condiciones para la preparación del máster mix y el perfil de amplificación se presentan en las Tablas 6 y 7. Además, la Figura 4 muestra una imagen de una amplificación con un 2 marcador ISSRs.

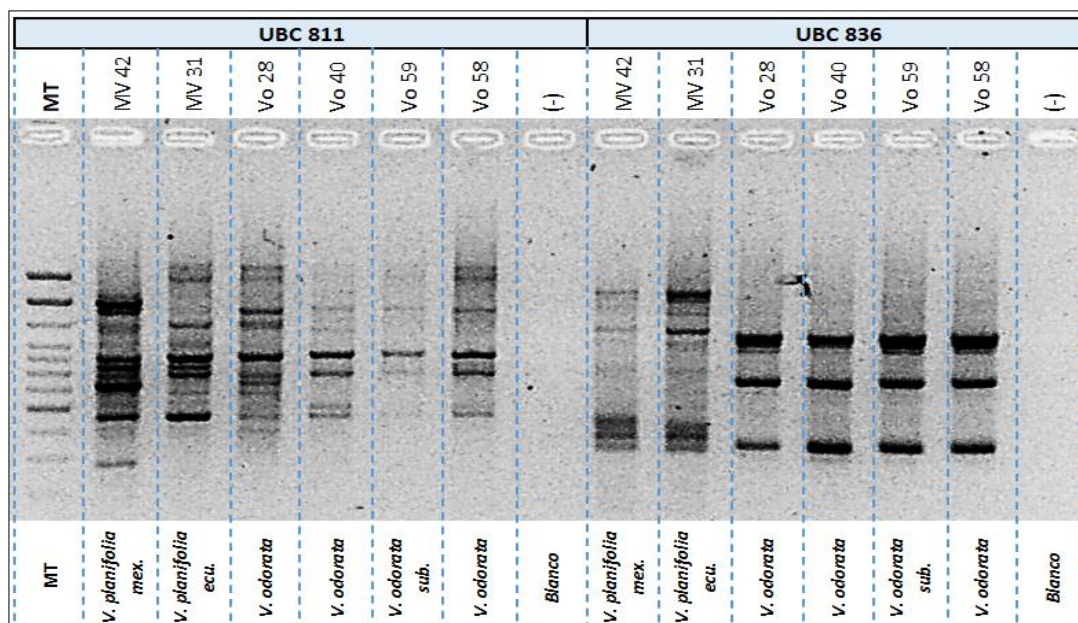


Figura 4. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa de la amplificación en PCR para estandarización de marcadores moleculares ISSRs.

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

En la Figura 4, se observa la amplificación del marcador UBC 834 y UBC 834 en algunos individuos del genotipo *V. planifolia* y *V. odorata*. Las bandas presentan una alta intensidad y bien definidas. Se aprecian unas pocas bandas con baja intensidad. Además, se observa que, el marcador UBC 834 con el genotipo *V. odorata* presenta un patrón de amplificación definido.

3.3. Transferibilidad de marcadores moleculares SSRs

La transferibilidad de marcadores forma parte de la identificación de los sets de marcadores para el genotipaje de vainilla. A continuación, se aprecian en la Tabla 10 los resultados de la amplificación de los marcadores SSRs con 13 genotipos de vainillas. De un conjunto de 30 marcadores SSRs conformado por dos grupos de desarrolladores de marcadores SSRs, como se describe en Anexos 2A. El primero está compuesto por 14 marcadores desarrollados por Bory y otros (2008), correspondiente a la nomenclatura mVpICIR. La segunda parte del conjunto consta de 16 marcadores con la nomenclatura mVroCIR y mVhuCIR que corresponden a los marcadores desarrollados por Gigant y otros en (2011). Bajo las condiciones de laboratorio de la EESC del INIAP y con la estandarización de los marcadores descrita en la Sección 3.2, los resultados se presentan en la Tabla 11.

Del conjunto de 14 marcadores desarrollados por Bory, et., al. (2008) disponible para esta investigación (Anexo2-A), amplificaron de la siguiente manera: 10 marcadores en *V. planifolia*, 6 en *V. tahitensis*, 8 en *V. odorata*, 5 en *V. pompona*, 5 en *V. trigonogarpa*, 4 en *V. cribbiana*, 4 en *V. alba*, 3 en *V. dressleri*, 5 en *V. guianensis*, y ninguno en *V. peiorata*. Los marcadores que no amplificaron fueron mVpICIR016, 019, 028, 050, esto representa el 30% del total de marcadores sin amplificar.

Los marcadores desarrollados por Gigant, et., al. (2011), que conforman 16 marcadores del conjunto de 30 con los que se trabajó y que tienen la nomenclatura mVroCIR y mVhuCIR, amplificaron de la siguiente manera: 8 marcadores en *V. planifolia*, 6 en *V. tahitensis*, 8 en *V. odorata*, 5 en *V. pompona*, 5 en *V. trigonocarpa*, 6 en *V. cribbiana*, 4 en *V. alba*, 8 en *V. dressleri*, 6 en *V. guianensis*, y 6 en *V. peiorata*. Los marcadores que no amplificaron fueron mVroCIR004, 008, 009, 010, 011, 006, mVhuCIR006 y 009, estos marcadores representan el 50% de los marcadores que no amplificaron. En este sentido, del set de marcador el set de 30 marcadores ISSRs fueron trasferidos el 60% de los marcadores y 40% no se pudieron transferir. También hay que señalar que los 30 marcadores SSRs mostraron ser monomórficos en gel de agarosa.

Tabla 11. Transferibilidad de marcadores moleculares SSRs a las especies de vainilla

N°	Nombre del marcador	Secuencia 5'-3'	Secuencia motif	Anniling T (°C)	Tamaño en pb aprox.	Amplificación en vainilla									
						<i>V. planifolia</i>	<i>V. tahitensis</i>	<i>V. odorata</i>	<i>V. pompona</i>	<i>V. trigonocarpa</i>	<i>V. cribbiana</i>	<i>V. alba</i>	<i>V. dressleri</i>	<i>V. guianensis</i>	<i>V. peiorata</i>
1	mVpICIR002	F: TGGATGTGCATTTGTG; R: CGCATTCAATTCACCTTGT	(TG) ₈	45	300-200	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	mVpICIR003	F: TATAGATGCACACGAGC; R: TCACATCCCTACATGC	(CA) ₇	45	400-500	X									
3	mVpICIR005	F: TTTGCTTGAACGTATGTC; R: GCAAACATAGAAATGCAC	(TG) ₆ Nx (TG) ₇ Nx (TG) ₆	45	300-400	X	X		X	X	X			X	
4	mVpICIR010	F: GCACATAAATACCTTACACC; R: GTTCACGTCAGTGTGCT	(CA) ₇ Nx (CA) ₆ Nx (CA) ₁₀	55	300-500	X	X								
5	mVpICIR015	F: AGTGTCTTTGTGTGCCT; R: TAGATAGTAAACCCATACTCAC	(TG) ₉	55	200-500	X	X							X	
6	mVpICIR022	F: CAAAACACAAGGAAATGC; R: TGCAAGCCCACAAGT	(CA) ₉	55	200-300	X									
7	mVpICIR025	F: GTGTAGCGGTTTCATACAA; R: CATTTCATGGAAGTGGAG	(TG) ₈	45	200-300	X	X	X	X	X	X			X	
8	mVpICIR026	F: GCACATACATGCTTATTG; R: CATGTTCTTATTTGAGTGG	(CA) ₉	60	200-300	X	X	X							
9	mVpICIR031	F: ATTTCTCCCTCACTGTA; R: AATCTCAGGTGCTATTGG	(TG) ₉	55	300-400	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
10	mVpICIR047	F: CATGCTTACATCTTTGTGTT; R: TAATGGACATGCACACTC	(GT) ₆ Nx (TG) ₇	45	300-400	X	X	X	X			X	X		
11	mVroCIR001	F: GCTTGCAAAGACGAGAAAGG R: CTCGATCCTCACACCTGCTT	(GA) ₁₃	55	100-300	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	mVroCIR003	F: AAGAAGGCTTAGAGATTGACAACAA R: TCCAGTTCAAAGGAGGTTGA	(GA) ₁₆	45	100-400	X		X					X		
13	mVroCIR005	F: GCTATTTCCACGAACCCTA R: AACCATTGCCAGAAGCCTAA	(GA) ₁₅	45	100-400	X	X	X	X		X		X	X	X
14	mVhuCIR003	F: GTCGCATTACATAGCTTCG R: TCTTCCTACCGCTGTCGTCT	(AG) ₂₄	55	100-300	X		X					X	X	
15	mVhuCIR004	F: GGATACTTCCGGTGACTCCA R: GCTCTGGCTCTGTGGTTAGG	(AG) ₁₃	45	100-300	X	X	X		X	X		X		X
16	mVhuCIR007	F: CCACGTAGATCAAACACAGCA R: AAGAACTGTTAGAAATCCCAAGC	(GA) ₂₄	45	100-400	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17	mVhuCIR008	F: TTAACCTCTTCGCCCATTAAGC R: CCTTCGAGCTTTCGGTTC	(GA) ₁₅	45	100-300	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
18	mVhuCIR010	F: AGCTCTCCGAATCTCCATCC R: GGGAACATGAAACAGGAAGC	(CA) ₅	50	100-500	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

Tabla 12. Resultado de la amplificación de los marcadores ISSRs en los 9 genotipos de vainillas provenientes de la Amazonia ecuatoriana (Y = C ó T)

N°	Nombre del marcador	Secuencia 5'-3'	Secuencia motif	T (°C)	pb aprox.	Amplificación en vainillas									
						<i>V. planifolia</i>	<i>V. tahitensis</i>	<i>V. odorata</i>	<i>V. pompona</i>	<i>V. trigonocarpa</i>	<i>V. cribbiana</i>	<i>V. alba</i>	<i>V. dressleri</i>	<i>V. guianensis</i>	<i>V. peiorata</i>
1	17898 A	F:CACACACACAAC R:GTGTGTGTGTGTTG	(CA) ₆ AC	45	300-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	17899 A	F:CACACACACAAG R:GTGTGTGTGTGTTT	(CA) ₆ AG	45	300-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	UBC 810	F:GAGAGAGAGAGAGAT R:CTCTCTCTCTCTCTA	(GA) ₈ T	50	400-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	UBC 811	F:GAGAGAGAGAGAGAC R:CTCTCTCTCTCTCTG	(GA) ₈ C	50	500-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	UBC 815	F:CTCTCTCTCTCTCTG R:GAGAGAGAGAGAGAA	(CT) ₈ G	50	400-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	UBC 834	F:AGAGAGAGAGAGAGYT R:TCTCTCTCTCTCTCYA	(AG) ₈ YT	50	400-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	UBC 836	F:AGAGAGAGAGAGAGYA R:TCTCTCTCTCTCTCYT	(AG) ₈ YA	50	400-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	HB 14	F:CTCCTCCTCGC R:GAGGAGGAGCG	(CTC) ₃ GC	45	300-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	HB 12	F:CACCACCACGC R:GTGGTGGTGCG	(CAC) ₃ GC	45	400-2000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Los 9 marcadores ISSRs con los que se trabajó, amplificaron todas las 10 especies de vainilla, a temperaturas de 45 y 50° C y con un rango de 200 a 2.000 pb (Tabla 12).

3.4. Detección de perfiles de amplificación con los marcadores SSRs

Para realizar los ensayos de detección de los perfiles de amplificación mediante la tecnología M13-tiling, se utilizaron 12 muestras y un blanco por cada marcador. El orden de las muestras, de izquierda a derecha, es el siguiente: las dos primeras muestras corresponden a Mv-42 (*V. planifolia* de origen mexicano), seguido de Mv-03R2 y Mv-22R1 (*V. odorata*), Mv-13R2 y Mv-21R3 (*V. planifolia*), Mv-35R1 (*V. spp*), Mv-25R3 y Mv-26R1 (*V. pompona*), Mv-30R1 (*V. alba*) y un blanco. Los marcadores utilizados fueron mVroCIR001, mVplCIR003, mVplCIR005, mVplCIR026 y mVhuCIR010. En la Figura 5 se presenta los resultados.

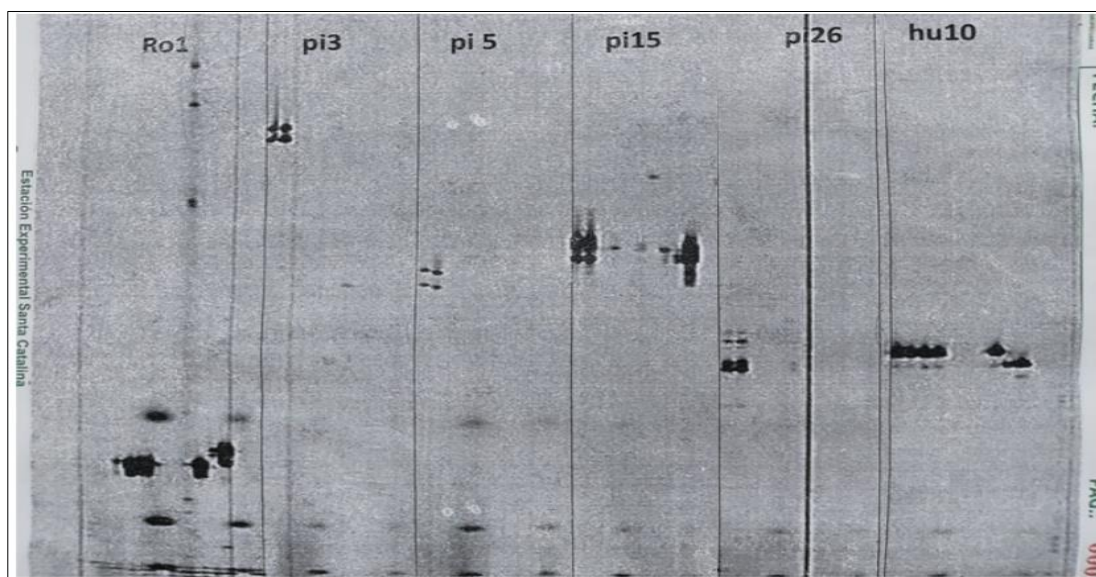


Figura 5. Perfil de amplificación obtenidos de la amplificación de algunas especies de vainillas con la metodología M13-tailing en el sistema de detección LI-COR con marcaje IRDye de 800 nm.

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

En la Figura 5, se observa que no todas las muestras amplificaron, y las muestras que sí amplificaron muestran polimorfismo para la especie *V. planifolia* de origen mexicano con los marcadores mVplCIR003, mVplCIR005 y mVplCIR026. La amplificación no es clara para las especies de vainilla amazónicas incluidas en este ensayo. Posterior a este ensayo, se realizaron otros, pero los resultados no fueron concluyentes debido a inconvenientes en la metodología y problemas de amplificación del ADN.

3.5. Identificación de marcadores polimórficos para el genotipo *V. odorata*

Con 7 marcadores que amplificaron *V. odorata* en los ensayos para determinar los perfiles de amplificación, se amplificaron nuevamente para verificar los polimorfismos, información importante para llevar a cabo los análisis de diversidad. Para este ensayo, se utilizaron 14 muestras del grupo de muestras tratadas con nitrógeno líquido, las cuales fueron amplificadas en el siguiente orden: Vo 28-27, seguido de una muestra de control, luego las muestras Vo 11, 40 y 12, y finalmente el blanco. A continuación, se presenta los resultados la identificación de marcadores polimórficos en *V. odorata*.

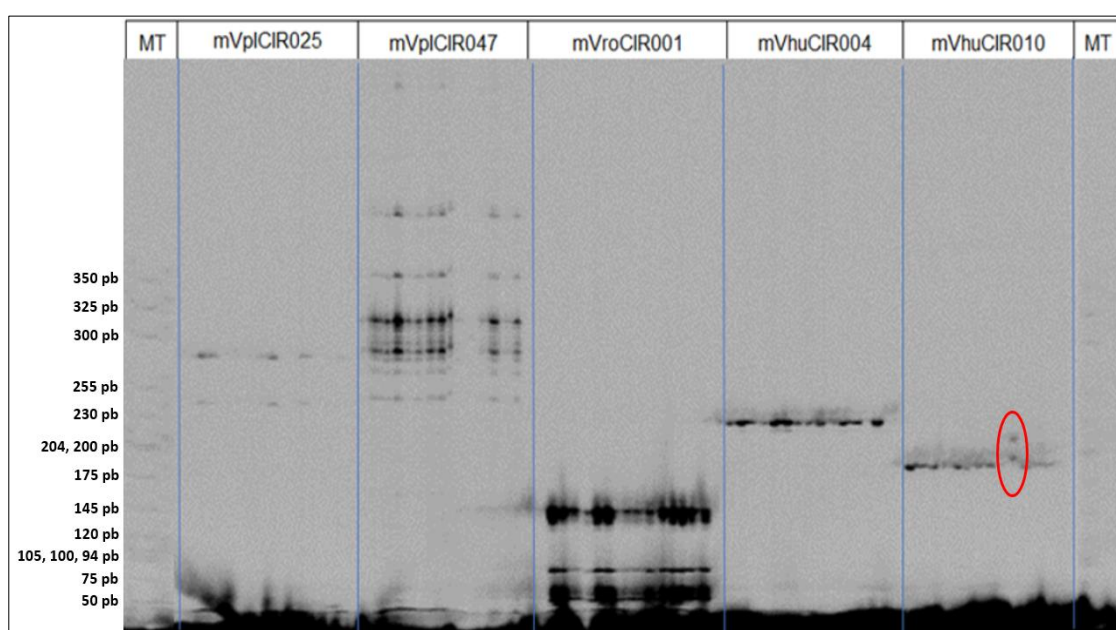


Figura 6. Visualización de la amplificación en monoplex con marcadores SSRs y la metodología M13 tailing en el sistema de detección LI-COR con marcaje IRDye de 800 nm.

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Los resultados de la Figura 5, muestran la amplificación de 5 marcadores SSRs. El marcador mVpICIR025 no presentó una buena amplificación. El marcador mVpICIR047 presentó polimorfismo, el marcador mVroCIR002 aparentemente presenta polimorfismo, pero no lo es, previas amplificaciones y posteriores los resultados de la Figura 5 no presentaba polimorfismo y se determinó que el marcador fue contaminado. El marcador mVhuCIR004, no presentó diferencia con relación a los alelos aplicados en las muestras analizadas. El marcador mVhuCIR010, presentó polimorfismo en una sola muestra que se encuentra dentro del ovalo de color rojo, esta muestra se la consideró como una muestra atípica dentro del ensayo. Dando como resultado que solo se obtuvo 1 solo marcador polimórfico.

3.6. Amplificación de marcadores ISSRs en las especies de vainilla

Ya que no se contó con la cantidad suficiente de marcadores SSRs y que estos no fueron informativos en los ensayos realizados, se utilizó los marcadores ISSRs para visualizar la variabilidad genética. Los marcadores ISSRs mostraron ser más informativos y se optó por utilizarlos para el análisis de diversidad genética, A continuación, se muestra la amplificación de 2 marcadores ISSRs.

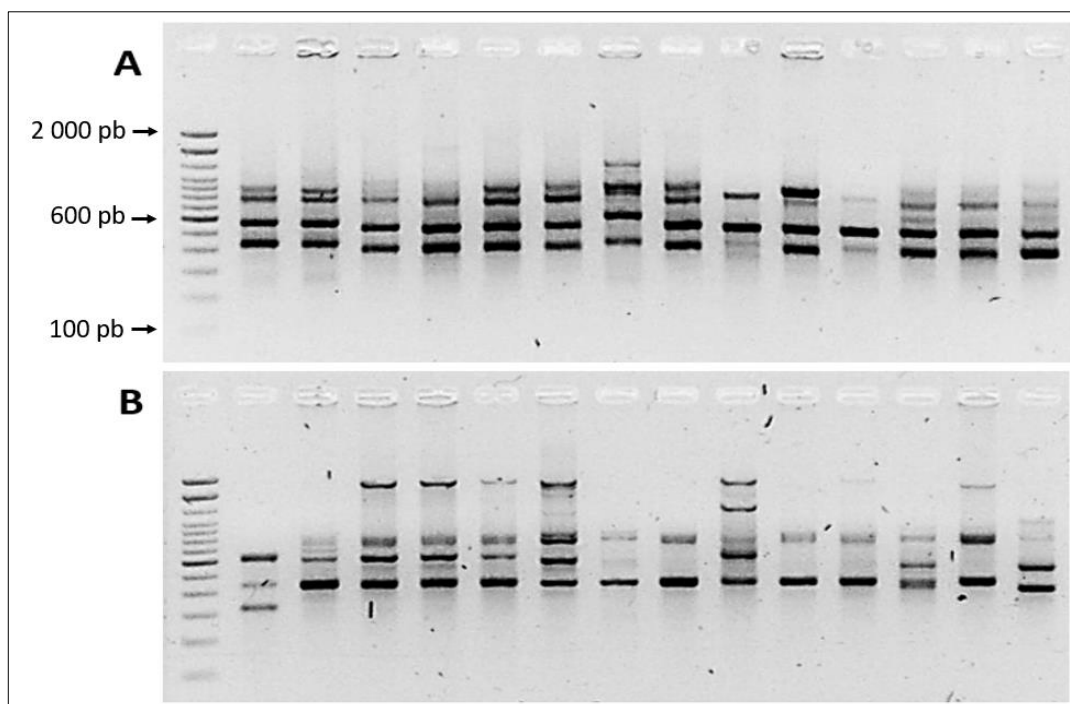


Figura 7. Amplificación de marcadores ISSRs con las especies de vainilla.
Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

En la Figura 6, se presenta la amplificación de marcadores ISSRs utilizando un marcador de peso molecular que abarca desde 100 hasta 2.000 pb. En la parte A, se observa la amplificación de los genotipos de *V. odorata* con el marcador ISSR UBC 834, donde se aprecia un patrón bien definido. En la parte B, se muestran las amplificaciones de los genotipos de *V. planifolia* con el mismo marcador, donde también se pueden observar patrones de amplificación. Aunque se amplificó todas las 153 muestras de vainilla con los 9 marcadores ISSRs, en este trabajo solo se reporta los análisis de la especie *V. odorata*.

3.7. Resultado de los análisis multivariados

3.7.1. Matriz de datos

Después de la amplificación y el genotipaje de 49 muestras de vainilla (una muestra se excluyó del estudio) con los 9 marcadores ISSRs, se obtuvo una matriz de 49 muestras con 225 loci. Posteriormente, tras la depuración con los criterios descritos en la sección 2.5.1, se obtuvo una nueva matriz de 28 muestras y 40 loci (Anexo 5).

3.7.2. Análisis de estructura genética

El análisis de la estructura genética en las especies *V. odorata* se llevó a cabo utilizando la matriz de datos (Anexo 3), que consta de 28 muestras y 40 loci. Los resultados obtenidos mediante el programa STRUCTURE 2.3.4 y analizados con el software Structure Harvester Wev v0.6.94 indican que, de las 10 posibles estructuras poblacionales, el valor óptimo de grupos es K=3. Esto sugiere la presencia de tres grupos poblacionales del genotipo *V. odorata* en los cultivos de vainilla. La representación visual de esta estructura poblacional se puede apreciar en la Figura 7.

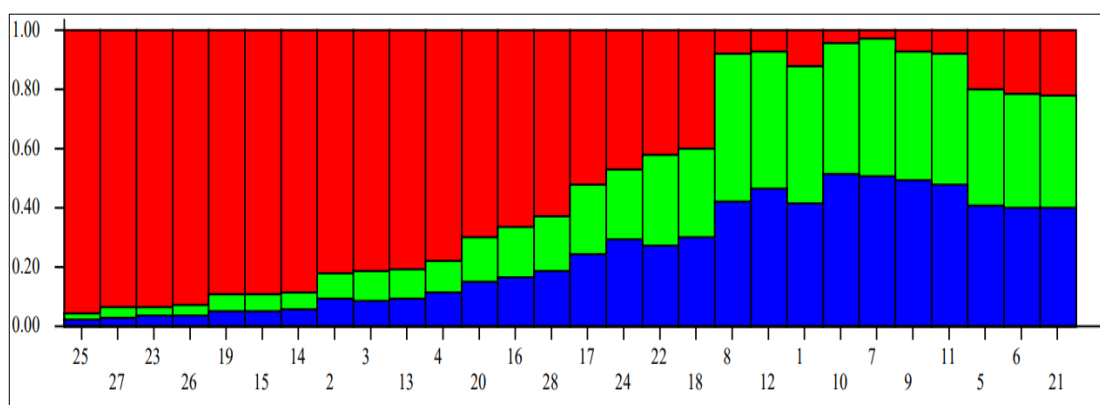


Figura 8. Estructura genética poblacional de *V. odorata*.

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

En la Figura 7, se aprecia visualmente como se distribuye la diversidad genética en cada muestra de los tres grupos identificados. El eje x representa cada una de las 28 muestras analizadas, y el eje y la probabilidad de pertenencia a una estructura poblacional (grupo rojo, grupo verde y el grupo azul). Lo que ayuda a comprender la estructura genética de las poblaciones de *V. odorata*. Esto sugiere la presencia de tres grupos poblacionales del genotipo *V. odorata* en los cultivos de vainilla.

3.7.3. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento se llevó a cabo utilizando el método del vecino más cercano (Neighbor Joining) a partir del coeficiente de Dice, con 30.000 iteraciones, que dio como resultado que la disimilariada mínima entre las muestras es de 0.04, y la máxima disimilitud entre las muestras es de 0.09 unidades, estos valores fueron óptimos para la agrupación de las muestras en el dendrograma, donde visualmente se puede apreciar las muestras más similares están agrupadas juntas y las más diferentes estén separadas en grupos distintos. La matriz de distancia se encuentra alojada en (Anexo 4).

En cada rama se encuentra un valor (número de color azul), éste es el valor de confianza que se evalúa en un rango de 0 a 100% de robustez que asigna el Bootstrap a cada rama en relación con la estructura del dendrograma [68]. Este valor de confianza en las ramas va 3 a 85 %, se ha obtenido valores no robustos lo que sugiere que la agrupación de los datos no es confiable.

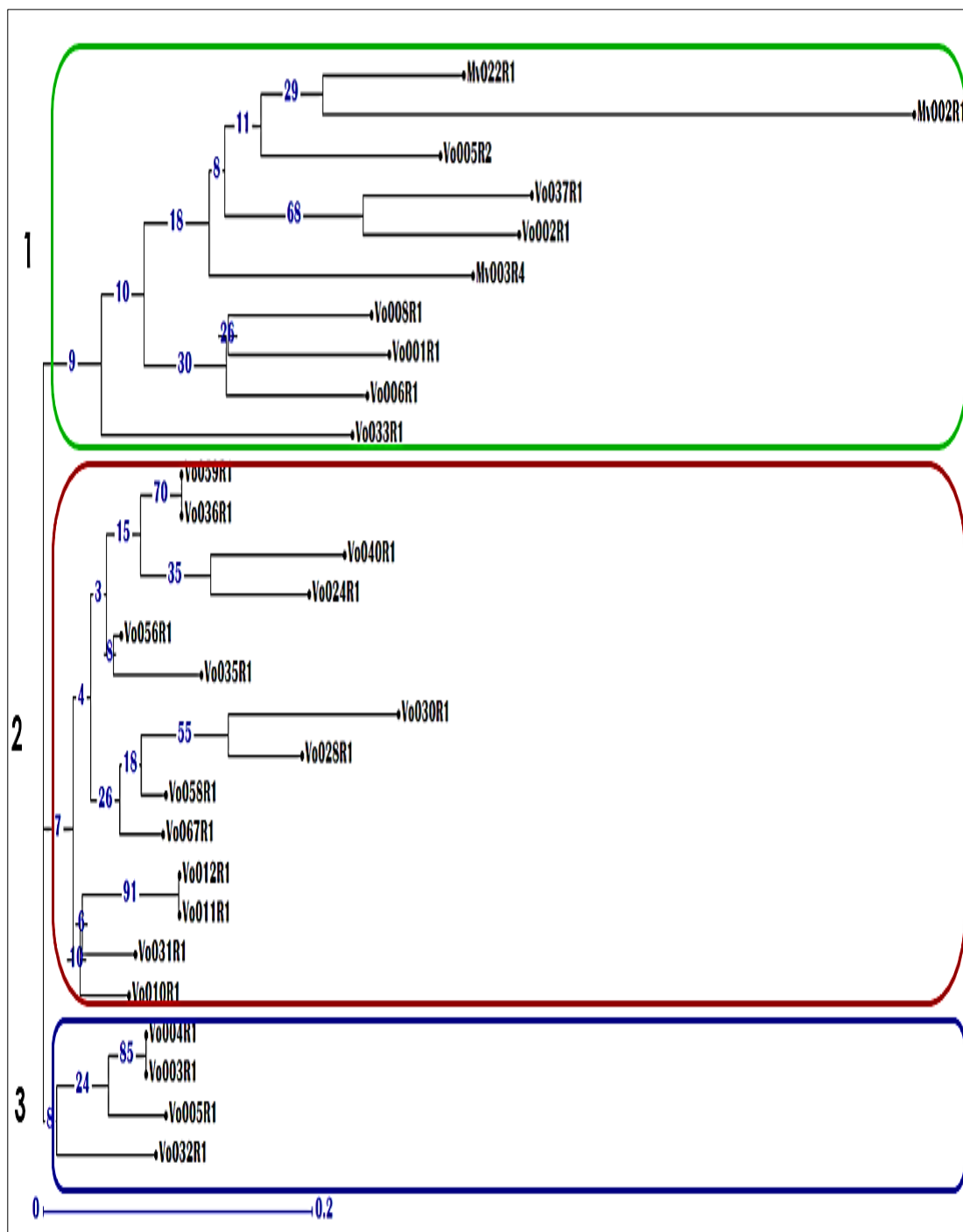


Figura 9. Relaciones genéticas de los grupos a través de un dendrograma generado mediante el método del vecino más cercano UPGMA basado en distancias genéticas. Con una escala que va de 0 a 0.2 y representa la longitud de los nodos.

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

En cuanto a la conformación de los grupos, la mayoría de las muestras se encuentran distribuidas en algunas de las localidades de las provincias de Napo, Pastaza y Morona Santiago. A continuación, se presenta una tabla que representa la distribución de las muestras entre los grupos genéticos que se encuentran distribuidos en las provincias de Napo, Pastaza y Morona Santiago.

Tabla 13. Distribución de las muestras entre los grupos genéticos

Provincia	Grupo genético			Muestra
	1	2	3	
Localidad				
Napo	9	9	4	22
Tena	-	1	-	1
Arosemana Tola	-	2	-	2
Serena	3	-	1	4
5 de enero	1	-	2	3
La Isla	2	5	1	8
Las antenas	2	-	-	2
Santa Rosa	1	1	-	1
Pastaza	1	2	-	3
Puyo	1	1	-	1
Chiriyaku	-	1	-	1
Morona Santiago	-	3	-	3
Macas	-	3	-	2
Total	10	14	4	28

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Aunque, el estudio se centra en los lotes de producción de vainilla en la provincia de Napo, se tomó con referencia muestras de otras provincias, ya que los cultivadores de vainilla introducen vainillas de otros lugares.

De un total de 28 muestras de vainilla del genotipo V. odorata analizadas en la provincia de Napo, se ha observado la presencia de los 3 grupos genéticos. En particular, se destaca que La Isla presenta la presencia de los tres grupos genéticos, mientras que el grupo genético 3 solo se encuentra en La Isla y no está presente en las provincias de Pastaza ni Morona Santiago. En Antenas y Santa Rosa, predominan exclusivamente el grupo genético 1, mientras que en Tena, junto con Aroseman Tola, se encuentra presente el grupo 2. Por otro lado, en Serena y 5 de enero se presentan los grupos 1 y 2.

3.7.4. Análisis de coordenadas principales (PCoA)

Los resultados del PCoA realizado sobre las tres coordenadas principales muestran que la coordenada 1D representa el 20.59%, la coordenada 2D un 12.27%, y la tercera coordenada 3D representa el 9.66% de varianza de los datos analizados. El porcentaje de varianza total acumulado es del 42.52% (la suma de las 3 coordenadas) Estos resultados se obtuvieron con la matriz de datos (Anexo 5) compuesta por 28 muestras y 40 loci.

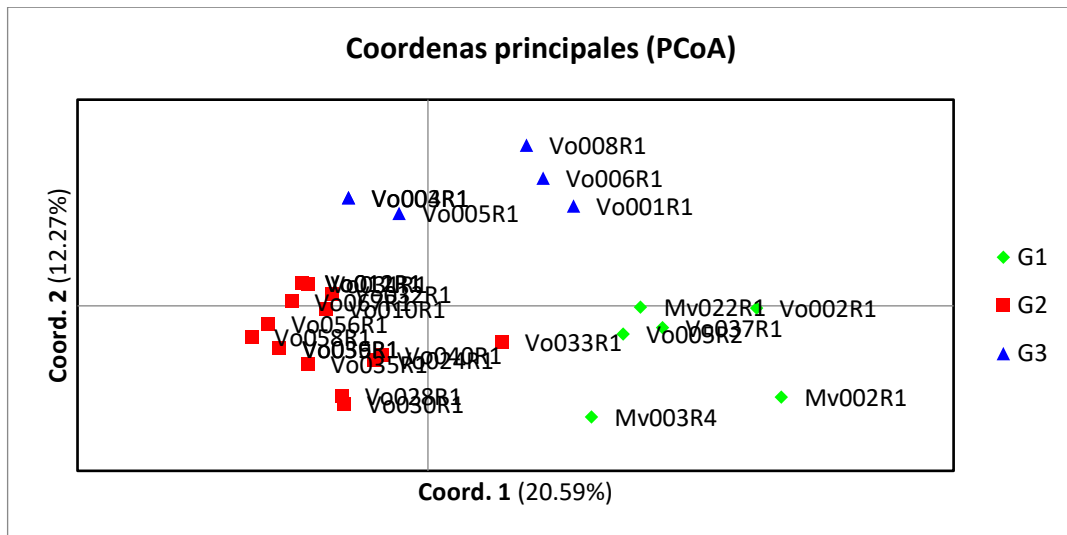


Figura 10. Análisis de coordenadas principales realizado vía covarianza con datos estandarizados.

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

En la Figura 9 se representa la conformación de grupos basada en la disimilitud y proximidad genética entre las muestras analizadas. El grupo 1 (G1) está compuesto por todas las muestras con forma de rombo de color verde, el grupo 2 (G2) está representado por las muestras con forma de cuadrado rojo, y el grupo 3 (G3) está conformado por las muestras con forma de triángulo de color azul.

La proximidad observada entre las muestras que conforman el grupo G2 sugiere que este grupo posee una mayor similitud entre las muestras que integran su población, a excepción de una muestra, Vo0033R1, que está visiblemente separada del resto y representa la mayor cantidad de muestras que lo componen en comparación con los grupos G1 y G2. Por otro lado, en los grupos G1 y G2, las muestras que conforman la población están más dispersas, lo que sugiere que, aunque están agrupadas, existe una disimilitud entre ellas. Por ejemplo, en G3, las muestras Vo004R1 y Vo005R1 están visiblemente alejadas del resto de las muestras que conforman ese grupo. Lo mismo ocurre con las muestras Mv03R4 y Mv002R1, agrupadas en el G1, que se encuentran distantes del resto de las muestras que conforman estos grupos.

3.7.5. Análisis Molecular de varianza (AMOVA)

El análisis de varianza molecular se realizó con la matriz de 28 muestras del genotipo *V. odorata* (Anexo 5). Los resultados mostraron una mayor variación genética en entre poblaciones con un 68%, y una menor variación genética dentro de las poblaciones con un 32%.

Tabla 14. Análisis AMOVA para las muestras de vainilla del genotipo *V. odorata*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Variación estándar	%
Entre poblaciones	2	54.642	27.321	2.066	32%
Dentro de poblaciones	32	145.272	4.540	4.540	68%
Total	34	199.914		6.605	100%

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Tabla 15. Estadísticos PhiPT obtenidos del análisis de AMOVA.

Estadística	Valor	P
PhiPT	0.316	0.001
PhiPT max	0.830	

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

El valor de PhiPT, que es una medida de la diferenciación genética entre poblaciones [43], es de 0.316, con un valor de significancia de (0.001), y el valor máximo posible es de 0.830 de PhiPTmax. Esto sugiere una diferenciación genética observada. Estos resultados indican que hay una diferenciación genética entre las poblaciones analizadas.

CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La baja calidad de extracción de ADN que se presentaron con las muestras secadas con gel de sílice, se pude deber a que, la estructura morfológica de las hojas de vainilla tiene un carácter carnosos [15], lo que prolonga tiempo de secado con el gel de sílice, que en algunos casos superó una semana. Idealmente, las muestras deberían secarse por completo en un plazo de 12 a 48 horas posteriores a su recolección, ya que cuanto más rápido se sequen, mejor será la calidad del ADN que se puede extraer [71]. Mientras que, las hojas colectadas con mitógeno líquido presentaron una mejor calidad de ADN, ya conserva mejor la integridad del ADN [71]

Se logró estandarizar y transferir 18 de los 30 marcadores moleculares SSRs, lo que representa una efectividad del 60%. Este porcentaje podría aumentar ajustando las cantidades de los reactivos que conforman el máster mix de la reacción de PCR [72], ya que solo se realizaron gradientes de temperatura para estandarizar los marcadores.

La transferibilidad mostró que los marcadores SSRs elaborados por Bory, et al., (2008), que fueron desarrollados a partir *V. planifolia*, mostraron en este estudio que fueron trasferibles *V. trogonocarpa*, *V. cribbiana*, *V. alba*, *V. guianensis*, *V. dresseleri*, especies silvestres y que al parecer conservan regiones genéticas relacionadas con *V. planifolia*. Esto se confirma con los análisis de filogenia basados en el origen americano de estas especies que conforma la sección Xanta del género *Vanilla* [10].

Los marcadores elaborados por Gigant, et.al., (2011), que fueron desarrollados a partir de la especie *V. roscheri* y *V. humblottii*, las cuales son especies sin hojas, de origen africano y pertenecientes la sección Thetya. En esta investigación mostraron que los marcadores mVroCIR001, mVhuCIR007, 008 y 009 amplificaron todas las especies analizadas, hubo una muy buena transferibilidad, a pesar de que pertenecen a otra sección del género *Vanilla*, pero es común en los marcadores SSRs, ya que sus secuencias de ADN son altamente variables, y a menudo tienen regiones conservadas entre especies relacionadas [49].

La estandarización y la transferibilidad de marcadores SSRs eran pasos necesarios para generar las condiciones del genotipaje, sin embargo, debido a que la calidad de ADN de las muestras secadas con gel de sílice en su mayoría no tuvo una buena calidad

de ADN, lo que desencadenó problemas en las amplificaciones. Esto derivó que los ensayo no fueran concluyentes y puedo determinar los perfiles de amplificación de los 10 genotipos estudiados. Se intentó identificar que marcadores SSRs eran polimórficos en *V. odorata*, se obtuvo solo un marcador que tenía las condiciones aptas para el genotipaje, pero con este marcador no se puede realizar estudios de diversidad ya que generalmente se hace análisis con en *V. planifolia* con 14 marcadores SSRs [73].

Se esperaba que los marcadores SSRs fueran monomórficos para *V. planifolia*, pero polimórficos con otras especies y en *V. odorata* como se ha reportado en [50]. La capacidad que tienen los SSRs para detectar la variabilidad genética en diferentes especies puede variar incluso dentro del mismo género [50]. Este mismo problema se ha reportado en un estudio similar, pero con el género *Rubus* y señalan la idea de que los SSRs no son marcadores genéticos muy informativos en diferentes especies, aunque sean del mismo género [74]. Esto puede ocurrir en ocasiones en que no resulta perfecta la repetición de los motivos o el caso de que se genere homoplasia, ya que se puede presentar alelos con el mismo tamaño pero con diferentes secuencias, aunque esto suele ocurrir en casos donde los ISSRs están compuesto por dos motivos [74].

La amplificación y genotipaje se realizaron mediante los marcadores ISSRs, los cuales presentaron alta variabilidad, y amplificó en las especies analizadas en este estudio. Es importante señalar, dado que estos marcadores fueron genotipado a partir de los resultados de la electroforesis en gel de agarosa, no se calculó el porcentaje polimorfismos (%P), el contenido de información polimórfico (PIC), el índice de heterogeneidad de Nei, ni otros parámetros que se evalúan la diversidad alélica de una población. Esto se debe a que los resultados obtenidos gel de agarosa no posee una alta resolución como los geles de poliacrilamida ya que los poros permiten una mayor separación de los alelos [75].

Los resultados obtenidos en el análisis de la estructura de la población del genotipo *V. odorata* sugieren la presencia de tres poblaciones de este genotipo principalmente en la provincia de Napo. Esto se confirma con los grupos formados en el dendrograma. Sin embargo, es importante destacar que los valores de soporte con Bootstrap para cada rama son bajos, ya que no hay un alto nivel de confianza. Esta baja confianza puede deberse a la variabilidad de los datos que presenta los marcadores ISSRs [55,76]. El análisis de PCoA acumuló un total del 42% de varianza acumulada de las tres coordenadas, este valor es bajo y se pudo deber a la estructura de los datos y la

cantidad de información contenida en ellos [77]. Sin embargo, visualmente se corroboró los tres agrupamientos observados en el dendrograma.

Aunque los grupos de poblaciones se mantienen, la correspondencia de algunos individuos cambia de grupos, lo que puede deberse a los métodos utilizados para realizar los agrupamientos. Mientras que el dendrograma se genera a partir de una matriz de distancias genéticas entre los individuos analizados en orden jerárquico, el Análisis de Coordenadas Principales proporciona una representación en un espacio tridimensional de las distancias genéticas [76]. Por otro lado, el AMOVA indicó que existe una mayor diferenciación dentro de las poblaciones, y estima una alta variabilidad en las especies del genotipo *V. odorata*. Estos resultados concuerdan, ya que los cultivadores de vainilla en Napo constante están introduciendo vainilla en estado silvestre a sus cultivos. Todo lo contrario, ocurre en los cultivos de *V. planifolia* donde esta especie presenta una limitada diversidad, asociada a la forma de propagación que mediante esquejes [78] y debido a la domesticación de esta especie [7], lo que conduce a una menor resistencia a los cambios ambientales y a las enfermedades [18].

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se establecieron las condiciones para generar el genotipaje con la estandarización, validación y la transferibilidad de marcadores, en el cual se identificaron de 18 marcadores SSRs y 9 marcadores ISSRs que amplifican para las especies analizadas en esta investigación.

No se pudieron determinar los perfiles de amplificación ni el genotipado con los marcadores SSRs los ADN de vainilla colectadas debido a la baja calidad de los ADN que se extrajeron con las muestras que pasaron por el proceso de secado con gel de sílice, lo que generó problemas en las amplificaciones. Por lo tanto, se utilizaron los marcadores ISSRs, los cuales fueron informativos para conocer la estructura genética del genotipo *V. odorata*.

Basando en los análisis de estructura y asignación de población, se identificó la presencia de tres grupos genéticos del genotipo *V. odorata* que se encuentra cultivando y propagando en los lotes de cultivo de vainilla en la provincia de Napo. Además, se observó una mayor variación entre los individuos de las tres poblaciones, lo que sugiere una alta variabilidad genética entre los tres grupos.

5.2. Recomendaciones

Es altamente recomendable realizar colectas de hojas de vainilla con nitrógeno líquido, ya que asegurará la obtención de ADN de alta calidad con el método de extracción utilizado en esta investigación. El uso de nitrógeno líquido durante la recolección de las hojas contribuirá significativamente a preservar la integridad del material genético, minimizando así la oxidación del ADN

Se recomienda mantener la cadena de frío a lo largo de todo el proceso, desde la colecta de las muestras en nitrógeno líquido hasta la experimentación, ya que el ADN de vainilla es susceptible a la degradación muy fácilmente.

Se recomienda realizar el análisis de diversidad con el estudio de la estructura genética espacial. Este enfoque permitiría entender cómo las variaciones genéticas se distribuyen geográficamente, identificar patrones de flujo genético y analizar posibles barreras que afecten la conectividad genética entre poblaciones. Lo que contribuirá a una perspectiva más completa de la diversidad genética considerando tanto las variaciones genéticas dentro de las poblaciones como las interacciones entre ellas y el espacio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hu Y, Resende MFR, Bombarely A, Brym M, Bassil E, Chambers AH. Genomics-based diversity analysis of *Vanilla* species using a *Vanilla planifolia* draft genome and Genotyping-By-Sequencing. *Sci Rep*. 2019;9. doi:10.1038/s41598-019-40144-1
2. Flanagan NS, Navia-Samboni A, González-Pérez EN, Mendieta-Matallana H. Distribution and conservation of vanilla crop wild relatives: the value of local community engagement for biodiversity research. *Neotropical Biology and Conservation*. 2022;17: 205–227. doi:10.3897/NEOTROPICAL.17. E86792
3. Clement CR, de Cristo-Araújo M, d'Eeckenbrugge GC, Pereira AA, Picanço-Rodrigues D. Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity*. 2010. pp. 72–106. doi:10.3390/d2010072
4. Wilde AS, Hansen AMS, Fromberg A, Lauritz Frandsen H, Smedsgaard J. Determination of $\delta^{13}\text{C}$ of vanillin in complex food matrices by HS-SPME-GC-C-IRMS. *Flavour Fragr J*. 2020;35: 387–393. doi:10.1002/ffj.3573
5. de Oliveira RT, da Silva Oliveira JP, Macedo AF. *Vanilla* beyond *Vanilla planifolia* and *Vanilla × tahitensis*: Taxonomy and Historical Notes, Reproductive Biology, and Metabolites. *Plants*. MDPI; 2022. doi:10.3390/plants11233311
6. Arya SS, Rookes JE, Cahill DM, Lenka SK. Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *Advances in Traditional Medicine*. Springer; 2021. doi:10.1007/s13596-020-00531-w
7. Watteyn C, Reubens B, Bolaños JBA, Campos FS, Silva AP, Karremans AP, et al. Cultivation potential of *Vanilla* crop wild relatives in two contrasting land use systems. *European Journal of Agronomy*. 2023;149. doi:10.1016/j.eja.2023.126890
8. Begna T, Gichile H, Yali W. Genetic Diversity and Its Impact in Enhancement of Crop Plants. *Global Journal of Agricultural Research*. 2022. Available: <https://www.eajournals.org/>
9. Bouetard A, Lefeuvre P, Gigant R, Bory S, Pignal M, Besse P, et al. Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. *Mol Phylogenet Evol*. 2010;55: 621–630. doi:10.1016/j.ympev.2010.01.021
10. Andriamihaja CF, Ramarosandratana A V., Grisoni M, Jeannoda V, Besse P. The leafless vanilla species-complex from the south-west indian ocean region: A taxonomic puzzle and a model for orchid evolution and conservation research. *Diversity*. MDPI AG; 2020. pp. 1–25. doi:10.3390/d12120443

11. Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, et al. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015;282. doi:10.1098/rspb.2015.1553
12. Ramírez SR, Gravendeel B, Singer RB, Marshall CR, Pierce NE. Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*. 2007;448: 1042–1045. doi:10.1038/nature06039
13. Lubinsky P, Bory S, Hernández Hernández J, Kim SC, Gómez-Pompa A. Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Econ Bot*. 2008;62: 127–138. doi:10.1007/s12231-008-9014-y
14. Villanueva-Viramontes S, Hernández-Apolinar M, Carnevali Fernández-Concha G, Dorantes-Euán A, Dzib GR, Martínez-Castillo J. Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic analyses with ISSR and ITS. *Bot Sci*. 2017;95: 169–187. doi:10.17129/botsci.668
15. Soto Arenas MA, Cribb P. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). 2010. Available: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/12071>
16. Favre F, Jourda C, Grisoni M, Piet Q, Rivallan R, Dijoux JB, et al. A genome-wide assessment of the genetic diversity, evolution and relationships with allied species of the clonally propagated crop *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Genet Resour Crop Evol*. 2022;69: 2125–2139. doi:10.1007/s10722-022-01362-1
17. Chiron GR, Sambin A, Krah AH. Taxonomic notes on *Vanilla odorata*, *Vanilla fimbriata* and related species (Orchidaceae). *Ricardiana*. 2021:76–115. Available: <https://richardiana.jardinbotaniquedeguyane.com/wp-content/uploads/2021/04/61-Vanilla-Alphataxonomy.pdf>
18. Chiron GR, Sambin A, Krah AH. Taxonomic notes on *Vanilla odorata*, *Vanilla fimbriata* and related species (Orchidaceae). 2021.
19. Karremans AP, Chinchilla IF, Rojas-Alvarado G, Cedeño-Fonseca M, Damián A, Léotard G. A Reappraisal of Neotropical *Vanilla*. With A Note On Taxonomic Inflation and The Importance of Alpha Taxonomy in Biological Studies. *Lankesteriana*. 2020;20: 395–497. doi:10.15517/lanke.v20i3.45203
20. Besse P, Da Silva D, Grisoni M. Plant DNA Barcoding Principles and Limits: A Case Study in the Genus *Vanilla*. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2021. pp. 131–148. doi:10.1007/978-1-0716-0997-2_8
21. Li J, Demesyeux L, Brym M, Chambers AH. Development of species-specific molecular markers in *Vanilla* for seedling selection of hybrids. *Mol Biol Rep*. 2020;47: 1905–1920. doi:10.1007/s11033-020-05287-9

22. Grisoni M. Utilisation de marqueurs moléculaires pour une avancée dans la résolution de la phylogénie du genre. 2012.
23. Tanguila RE. Servicios Ecosistémicos del Sistema Tradicional “Chakra” Basadas en el Cultivo Vanilla sp. de la Asociación Kallari, Cantón Tena, de la Amazonía Ecuatoriana. 2020.
24. Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson D V. Advances in plant breeding strategies: Industrial and food crops. *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops*. Springer International Publishing; 2019. pp. 707–744. doi:10.1007/978-3-030-23265-8
25. Cayapa R, Balarezo P, Jaramillo D, Ramirez P. GUÍA PARA EL CULTIVO DE VAINILLA EN SISTEMA CHAKRA AMAZONICA. Fundación Pachamama y GIZ. Quito-Ecuador; 2021.
26. Landy D. Taxonomía del género Vanilla Plum. ex Mill.(Orchidaceae: vanilleae) en el Perú. Posgrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2020.
27. Bermeo J. Optimización del proceso de micropropagación micropropagación de Vanilla odorata C. presl en sistemas de inmersión temporal (sits) tipo Rita ®. 2023.
28. Bory S, Grisoni M, Duval MF, Besse P. Biodiversity and preservation of vanilla: Present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2008. pp. 551–571. doi:10.1007/s10722-007-9260-3
29. Pansarin ER. Unravelling the enigma of seed dispersal in Vanilla. *Plant Biol*. 2021;23: 974–980. doi:10.1111/plb.13331
30. Martău GA, Călinoiu LF, Vodnar DC. Bio-vanillin: Towards a sustainable industrial production. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2021. pp. 579–592. doi:10.1016/j.tifs.2021.01.059
31. Banerjee G, Chattopadhyay P. Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. John Wiley and Sons Ltd; 2019. pp. 499–506. doi:10.1002/jsfa.9303
32. Wahyudi A, Ermianti E, Sujianto S. Analysis of sustainability ranking of vanilla cultivation systems in West Java, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Institute of Physics; 2023. doi:10.1088/1755-1315/1133/1/012062
33. Romero G. Desarrollo y validación de una tecnología para la micropropagación de Vanilla odorata. 2022.
34. Pacheco M, Pazmiño S. Potencial exportable de vainilla de la subpartida arancelaria 09051000 hacia la Unión Europea en el periodo 2015-2019. Tesis de pregrado, Escuela Politécnica del Ejército. 2021.

35. Mites M, García-Mozo H, Galán C, Oña E. Analysis of the Orchidaceae Diversity in the Pululahua Reserve, Ecuador: Opportunities and Constraints as Regards the Biodiversity Conservation of the Cloud Mountain Forest. *Plants*. 2022;11. doi:10.3390/plants11050698
36. De la Cruz W, Zúñiga S, Soria S. Guía de identificación de especies de vainilla con potencial económico en la Amazonía ecuatoriana. Pastaza: Gobierno Autónomo Descentralizado de la provincia de Pastaza; 2020.
37. Soto Arenas † MA, Dressler RL, Cameron K, Cribb P, Hágsater E, Salazar G, et al. A revision of the mexican and Central American species of *Vanilla plumier ex miller* with a characterization of their its region of the nuclear. *LANKESTERIANA*. 2010;9: 285–350.
38. Chung MY, Merilä J, Li J, Mao K, López-Pujol J, Tsumura Y, et al. Neutral and adaptive genetic diversity in plants: An overview. *Frontiers in Ecology and Evolution*. Frontiers Media S.A.; 2023. doi:10.3389/fevo.2023.1116814
39. Nirmal Babu K, Sastry EVD, Saji K V., Divakaran M, Akshitha HJ, Aarthi S, et al. Diversity and Erosion in Genetic Resources of Spices. Springer. Springer. 2015. pp. 225–261. doi:10.1007/978-3-319-25637-5_9
40. Gepts P. Domestication of Plants. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Elsevier; 2014. pp. 474–486. doi:10.1016/B978-0-444-52512-3.00231-X
41. Wan NF, Fu L, Dainese M, Hu YQ, Pødenphant Kiær L, Isbell F, et al. Plant genetic diversity affects multiple trophic levels and trophic interactions. *Nat Commun*. 2022;13. doi:10.1038/s41467-022-35087-7
42. Kelvin Lee KW, Hoong Yam JK, Mukherjee M, Periasamy S, Steinberg PD, Kjelleberg S, et al. Interspecific diversity reduces and functionally substitutes for intraspecific variation in biofilm communities. *ISME Journal*. 2016;10: 846–857. doi:10.1038/ismej.2015.159
43. Peakall R. GenAIEx Tutorial 1 Introduction to Population Genetic Analysis.
44. Morillo E, Miño G. Marcadores moleculares en Biotecnología agrícola: Manual de técnicas y procedimientos en INIAP-Estación Experimental Santa Catalina. 2011.
45. Velasco R. MARCADORES MOLECULARES Y EXTRACCIÓN DE ADN. 2005.
46. Amiteye S. Basic Concepts And Methodologies Of Dna Marker Systems In Plant Molecular Breeding. *Heliyon*. 2021;7. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08093
47. Ponciano K, Villatoro J, Molina L. Caracterización preliminar con microsatélites de la colección guatemalteca de frijol común trepador. *Agronomía Mesoamericana*. 2009;20. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43713059005>

48. Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz C de F. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology. Brazilian Journal of Genetics*; 2016. pp. 312–328. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027
49. Herrera MDR, Ghislain M. Robust and inexpensive SSR markers analyses using LI-COR DNA analyzer. *Methods in Molecular Biology*. 2013;1006: 197–205. doi:10.1007/978-1-62703-389-3_14
50. Bory S, Da Silva D, Risterucci AM, Grisoni M, Besse P, Duval MF. Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: Polymorphism and transferability to other vanilla species. *Sci Hortic*. 2008;115: 420–425. doi:10.1016/j.scienta.2007.10.020
51. Gigant R, Brugel A, de Bruyn A, Risterucci AM, Guiot V, Viscardi G, et al. Nineteen polymorphic microsatellite markers from two African Vanilla species: Across-species transferability and diversity in a wild population of *V. humblotii* from Mayotte. *Conserv Genet Resour*. 2012;4: 121–125. doi:10.1007/s12686-011-9489-1
52. Verma PC, Chakrabarty D, Jena SN, Mishra DK, Singh PK, Sawant S V., et al. The extent of genetic diversity among Vanilla species: Comparative results for RAPD and ISSR. *Ind Crops Prod*. 2009;29: 581–589. doi:10.1016/j.indcrop.2008.11.006
53. Gemmil C, Grierson E. Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR), Microsatellite-Primed Genomic Profiling Using Universal Primers. 2021. Available: <http://www.springer.com/series/7651>
54. González-arnao MT, Cruz-cruz CA, Hernández-ramírez F, Alejandre-rosas JA, Hernández-romero AC. Assessment of Vegetative Growth and Genetic Integrity of Vanilla planifolia Regenerants after Cryopreservation. *Plants*. 2022;11. doi:10.3390/plants11131630
55. Sreedhar R, Venkatachalam K, Roohie K, Bhagyalakshmi N. Molecular Analyses of Vanilla planifolia Cultivated in India using RAPD and ISSR Markers. *Orchid Science and Biotechnology*. 2007. Available: <http://www.foodindianews.com>
56. Shail S, Rastogi N, Chandrakar P, Saxena RR. Genotyping of rice accessions using SSR markers. *Int J Chem Stud*. 2020;8: 151–156. doi:10.22271/chemi.2020.v8.i4c.9882
57. Onyśk A, Boczkowska M. M13-tailed simple sequence repeat (SSR) markers in studies of genetic diversity and population structure of common oat germplasm. *Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.*; 2017. pp. 159–168. doi:10.1007/978-1-4939-6682-0_12
58. de la Cruz W, Samaniego E, Soria S, Domínguez J, Zúñiga S, Rojas L. Morphological characterization of the genus Vanilla in the Napo Pastaza ecosystem of the Ecuadorian Amazon. *Revista Ecológica*. 2022;12.
59. Bory S, Sarl V, Brown SC. Evolutionary Processes and Diversification in the Genus Vanilla. *Vanilla*. 2010. p. 20. Available: <https://doi.org/10.1201/EBK1420083378>

60. Rostgaard L. Natural hybridization between *Kniphofia claviculata* (Wright) Sw. and *K. barbellata* Rchb.f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. *Botanical Journal of the Linnean Society* . 2000;133: 285–302. doi:10.1006/boj1.2000.0336
61. Ramos-Castellá AL, Iglesias-Andreu LG, Martínez-Castillo J, Ortiz-García M, Andueza-Noh RH, Octavio-Aguilar P, et al. Evaluation of molecular variability in germplasm of vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in Southeast Mexico: Implications for genetic improvement and conservation. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*. 2017;15: 310–320. doi:10.1017/S1479262115000660
62. Souza HA, Muller LA, Brandão RL, Lovato MB. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genet Mol Res*. 2012;11: 756–764. doi:10.4238/2012.March.22.6
63. BioTek Instruments. Epoch™ Microplate Spectrophotometer Instructions for Use. 2012. Available: www.biotek.de
64. Tafur D. Estudios de la diversidad genética de la colección de melina (*Gmelina arborea* roxb) del INIAP, mediante el uso de marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). *Biocología*, Universidad de las Fuerzas Armadas . 2015.
65. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14: 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
66. Pritchard JK, Wen X, Falush D. Documentation for structure software: Version 2.3. In: https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/structure_doc.pdf [Internet]. 2010. Available: <http://pritch.berkeley.edu/structure.html>
67. Chhatre VE, Emerson KJ. StrAuto: Automation and parallelization of STRUCTURE analysis. *BMC Bioinformatics*. 2017;18. doi:10.1186/s12859-017-1593-0
68. Perrier X, Collet J. DARwin software version 6. 2014. Available: <https://darwin.cirad.fr/index.php>
69. Peakall R, Smouse PE. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012;28: 2537–2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460
70. Khairunisa SQ, Masyeni S, Witaningrum AM, Nasronudin N. Comparison of low and high DNA Purity for quantitative detection of ratio Mitochondrial and Nucleus DNA among Drug-treated HIV Patients by Real-time PCR. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Institute of Physics Publishing; 2018. doi:10.1088/1757-899X/434/1/012338
71. Funk VA, Gostel M, Devine A, Kelloff CL, Wurdack K, Tuccinardi C, et al. Guidelines for collecting vouchers and tissues intended for genomic work (Smithsonian Institution): Botany Best Practices. *Biodivers Data J*. 2017;5. doi:10.3897/BDJ.5.e11625

72. Bolivar AM, Rojas A, Gracia P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina del Instituto de Inmunología Clínica*. 2014;3: 25–33.
73. Leah NS, Joseph NW, Maurice EO. Diversity assessment of vanilla (*Vanilla species*) accessions in selected counties of Kenya using simple sequence repeats (SSRs) markers. *Afr J Biotechnol*. 2020;19: 736–746. doi:10.5897/ajb2020.17216
74. Alarcón P. Evaluación de marcadores microsatélites (SSRs) heterólogos en *Rubus niveus* para estudios de diversidad genética en las Islas Galápagos. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*. 2021;13: 20. doi:10.18272/aci.v13i2.2293
75. González D, Núñez CA, Villordo E, Medina G, González MM. Variabilidad genética del membrillo cimarrón (*Malacomeles denticulata* [Kunth] Jones) obtenida mediante marcadores Inter Secuencias Simples Repetidas o Intermicrosatélites (ISSR). *Acta Univ*. 2015;25: 26–34. doi:10.15174/au.2015.773
76. Rohlf FJ. Análisis multivariado para datos biológicos Teoría y su aplicación utilizando el lenguaje R. 2020.
77. Crisci JV, Fernanda M, Armengol L. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. 1983.
78. Molineros FH. Caracterización morfológica y filogenia del género *Vanilla* en el distrito de Buenaventura-valle del cauca (Colombia). 2012.
79. Al-Naggar A, El-Salam R, Badran A, El-Moghazi M. Molecular Differentiation of Five Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Genotypes Using Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Biotechnology Journal International*. 2017;20: 1–12. doi:10.9734/bji/2017/37053
80. Villafuerte A. Micropropagación y caracterización molecular de dos poblaciones silvestres de *Laelia gouldiana* Rchb. 2022.
81. Sreedhar R V, Venkatachalam • L, Roohie • K, Bhagyalakshmi • N. Molecular Analyses of *Vanilla planifolia* Cultivated in India using RAPD and ISSR Markers. 2007. Available: <http://www.foodindianews.com>
82. Zebarjadi A, Ahmadvandi HR, Kahrizi D, Cheghamirza K. Assessment of Genetic Diversity by Application of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Primers on Iranian Harmal (*Peganum harmala* L.) Germplasm as an Important Medicinal Plant. *Journal of Applied Biotechnology Reports Original Article Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2016.
83. Serrano M. Inducción de variación somaclonal en Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) mediante irradiación gamma. Tesis de posgrado, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas . 2021. Available: <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/4626>

ANEXOS

Anexo 1. Lista de 153 muestras de vainillas colectadas.

MUESTRA	REPETICIÓN	VARIEDAD	PROVINCIA	LOCALIDAD
Mv-001	R1,R2	<i>V. cribbiana</i>	Napo	Canoayaku
Mv-002	R1,R2	<i>V. odorata</i>	Napo	Las Antenas, via Shinkipino
Mv-003	R1,R2,R3,R4,R5	<i>V. odorata</i>	Napo	Las Antenas, via Shinkipino
Mv-004	R1,R2	<i>V. odorata</i>	Morona Santiago	Palora
Mv-005	R1,R2	<i>V. tahitensis</i>	Napo	Las Antenas, via Shinkipino
Mv-006	R1	<i>V. planifolia</i>	Napo	Las Antenas, via Shinkipino
Mv-007	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Las Antenas, via Shinkipino
Mv-008	R1,R2	<i>V. spp</i>	Napo	Ahuano, Ñukanchi Kawsay
Mv-009	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Ahuano, Ñukanchi Kawsay
Mv-010	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Ahuano, Ñukanchi Kawsay
Mv-011	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Ahuano, Ñukanchi Kawsay
Mv-012	R1	<i>V. pompona</i>	Napo	Chalupas
Mv-013	R1,R2,R3	<i>V. planifolia</i>	Napo	Ahuano, Colonia Bolívar
Mv-014	R1,R2,R3	<i>V. alba</i>	Napo	Ahuano, Ñukanchi Kawsay
Mv-015	R1	<i>V. pompona</i>	Napo	Parque Yasuni
Mv-016	R1,R2	<i>V. spp</i>	N/D	Ahuano, Ñukanchi Kawsay
Mv-017	R1,R2	<i>V. spp</i>	N/D	N/D
Mv-018	R1	<i>V. tahitensis</i>	N/D	N/D
Mv-019	R1	<i>V. cribbiana</i>	Orellana	Del Coca, Isla Patria
Mv-020	R1,R2,R3	<i>V. planifolia</i>	Pastaza	Kapawi
Mv-021	R1,R2,R3	<i>V. planifolia</i>	Napo	Ahuano, Colonia Bolívar
Mv-022	R1,R2,R3	<i>V. odorata</i>	Pastaza	Puyo
Mv-023	R1,R2	<i>V. spp</i>	Pastaza	N/D
Mv-024	R1,R2,R3	<i>V. tahitensis</i>	Pastaza	Puyo/Santo Domingo (Uscategui)
Mv-025	R1,R2,R3	<i>V. pompona</i>	Pastaza	Puyo / Vía Curaray Sr. Muñoz
Mv-026	R1	<i>V. pompona</i>	Pastaza	Camunidad Kapawi
Mv-027	R1,R2	<i>V. cribbiana</i>	Pastaza	Puyo, Santa Clara
Mv-028	R1	<i>V. spp</i>	Pastaza	Canelos
Mv-029	R1,R2	<i>V. spp</i>	Pastaza	Canelos
Mv-030	R1	<i>V. alba</i>	Pastaza	Arajuno
Mv-031	R1,R2	<i>V. planifolia</i>	Pastaza	Orellana
Mv-032	R1,R2,R3	<i>V. planifolia</i>	Napo	Ahuano, Colonia Bolívar
Mv-033	R1,R2	<i>V. planifolia</i>	Puebla, Mexico	Mexico, Ayotoxco de Guerrero

Mv-034	R1	<i>V. trigonocarpa</i>	Pastaza	Santa Clara-Pastaza
Mv-035	R1	<i>V. spp</i>	N/D	N/D
Mv-040	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Serena
Mv-041	R1	<i>V. planifolia</i>	Napo	N/D
Mv-042	R1	<i>V. planifolia</i>	Napo	N/D
Mv-043	R1	<i>V. alba</i>	Napo	N/D
Vo-001	R1,R2	<i>V. odorata</i>	Napo	5 de enero
Vo-002	R1,R2	<i>V. odorata</i>	Napo	5 de enero
Vo-003	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	5 de enero
Vo-004	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	5 de enero
Vo-005	R1,R2	<i>V. odorata</i>	Napo	Serena
Vo-006	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	Serena
Vo-007	R1,R2	<i>V. odorata</i>	Napo	Serena
Vo-008	R1, R2	<i>V. odorata</i>	Napo	Serena
Vo-009	R1, R2,R3	<i>V. odorata</i>	Napo	Tena
Vo-010	R1,R2	<i>V. odorata</i>	Napo	Tena
Vo-011	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-012	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-013	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-014	R1	<i>V. alba</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-015	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-016	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-017	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-018	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-019	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-020	R1	<i>V. pompona</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-021	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-022	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Arosemena Tola
Vo-023	R1	<i>V. spp</i>	Napo	N/D
Vo-024	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	Santa Rosa
Vo-025	R1	<i>V. spp</i>	Napo	N/D
Vo-026	R1	<i>V. spp</i>	Napo	N/D
Vo-027	R1	<i>V. spp</i>	Napo	N/D
Vo-028	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-029	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-030	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-031	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-032	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-033	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-034	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-035	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-036	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-037	R1	<i>V. odorata</i>	Napo	La Isla
Vo-038	R1	<i>V. spp</i>	Napo	Libertad
Vo-039	R1	<i>V. spp</i>	Napo	N/D
Vo-040	R1	<i>V. odorata</i>	Pastaza	Puyo
Vo-041	R1	<i>V. pompona</i>	Pastaza	Puyo
Vo-042	R1	<i>V. cribbiana</i>	Pastaza	Puyo
Vo-043	R1	<i>V. odorata</i>	Pastaza	Puyo
Vo-044	R1	<i>V. spp</i>	Pastaza	Simón Bolívar

Vo-046	R1	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-047	R1,R2,R3,R4,R5	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-048	R1	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-049	R1	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-050	R1	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-051	R1	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-052	R1	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-053	R1	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-054	R1	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-055	R1,R2	V. spp	Pastaza	Simón Bolívar
Vo-056	R1	<i>V. odorata</i>	Pastaza	Comunidad Churiyaku
Vo-057	R1	<i>V. tahitensis</i>	Pastaza	Comunidad Churiyaku
Vo-058	R1	<i>V. odorata</i>	Morona Santiago	Macas
Vo-059	R1	<i>V. odorata</i>	Morona Santiago	Macas
Vo-060	R1	<i>V. dresseleri</i>	Morona Santiago	Macas
Vo-061	R1	<i>V. pejorata</i>	Morona Santiago	Macas
Vo-062	R1	<i>V. pompona</i>	Morona Santiago	Macas
Vo-063	R1	<i>V. guianensis</i>	Morona Santiago	Macas
Vo-064	R1	V. spp	Morona Santiago	N/D
Vo-065	R1	V. spp	Morona Santiago	N/D
Vo-066	R1	V. spp	Morona Santiago	N/D
Vo-067	R1	<i>V. odorata</i>	Morona Santiago	Macas
Vo-068	R1	V. spp	Morona Santiago	N/D
Vo-069	R1	V. spp	Morona Santiago	N/D
Vo-070	R1	<i>V. odorata</i>	Morona Santiago	Macas

Anexo 2 A-Set de 30 marcadores SSR que forman parte de esta investigación

Nº	Nombre del marcador	Referencia bibliográfica	Nº	Nombre del marcador	Referencia bibliográfica
1	mVpICIR002	[50]	16	mVroCIR003	[51]
2	mVpICIR003	[50]	17	mVroCIR004	[51]
3	mVpICIR005	[50]	18	mVroCIR005	[51]
4	mVpICIR010	[50]	19	mVroCIR006	[51]
5	mVpICIR015	[50]	20	mVroCIR008	[51]
6	mVpICIR016	[50]	21	mVroCIR009	[51]
7	mVpICIR019	[50]	22	mVroCIR010	[51]
8	mVpICIR022	[50]	23	mVroCIR011	[51]
9	mVpICIR025	[50]	24	mVhuCIR003	[51]
10	mVpICIR026	[50]	25	mVhuCIR004	[51]
11	mVpICIR028	[50]	26	mVhuCIR006	[51]
12	mVpICIR031	[50]	27	mVhuCIR007	[51]
13	mVpICIR047	[50]	28	mVhuCIR008	[51]
14	mVpICIR050	[50]	29	mVhuCIR009	[51]
15	mVroCIR001	[51]	30	mVhuCIR010	[51]

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Anexo 2-B marcadores ISSRs que forman parte de esta investigación.

Nº	Nombre del marcador	Secuencia motif	Referencia bibliográfica
1	17898 A	(CA)6 AC	[79]
2	17899 A	(CA)6 AG	[80]
3	UBC 810	(GA)8T	[81]
4	UBC 811	(GA)8C	[81]
5	UBC 815	(CT)8G	[82]
6	UBC 834	(AG)8YT	[81]
7	UBC 836	(AG)8YA	[83]
8	HB 14	(CTC)3GC	[79]
9	HB 12	(CAC)3GC	[79]

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Anexo 3. Matriz binaria utilizada en los diferentes programas utilizados en esta investigación, compuesta por 28 muestras y 40 loci

	98A_450	98A_700	98A_800	98A_1100	98A_1800	99A_1500	811_570	811_700	811_900	811_1100	811_1200	811_1440	811_1620	811_2000	811_2100	815_500	815_700	815_800	815_900	834_420	834_800	834_900	836_450	836_750	836_1100	HB14_600	HB14_700	HB14_800	HB14_900	HB14_1000	HB14_1200	HB14_1350	HB14_1500	HB14_1750	HB14_2000	HB12_440	HB12_650	HB12_750	HB12_800	HB12_900		
Vo001R1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0		
Vo003R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0		
Vo004R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	
Vo005R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Vo006R1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	
Vo008R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	-9	-9	-9	-9	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
Mv002R1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mv003R4	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
Mv022R1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Vo002R1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	-9	-9	-9	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Vo005R2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Vo037R1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Vo010R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Vo011R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
Vo012R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
Vo024R1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Vo028R1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Vo030R1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
Vo031R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Vo032R1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
Vo033R1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vo035R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
Vo036R1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Vo040R1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	
Vo056R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Vo058R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Vo059R1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Vo067R1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Realizado por: Vasquez Evelyn, 2024

@DARwin 5.0 - DIS

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024

Anexo 5. Matriz binaria utilizada en GenAlex para los análisis de AMOVA y PCoA.

		40	28	3	6	16	6	1	28																																					
ODORATA		P1			P2	P3																																								
	POP	98A_450	98A_700	98A_800	98A_1100	98A_1800	99A_1500	811_570	811_700	811_900	811_1100	811_1200	811_1440	811_1620	811_2000	811_2100	815_500	815_700	815_800	815_900	834_420	834_800	834_900	836_450	836_750	836_1100	HB14_600	HB14_700	HB14_800	HB14_900	HB14_1000	HB14_1200	HB14_1350	HB14_1500	HB14_1750	HB14_2000	HB12_440	HB12_650	HB12_750	HB12_800	HB12_900					
Mv002R1	P1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Mv003R4	P1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0		
Mv022R1	P1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Vo002R1	P1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	-9	-9	-9	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Vo005R2	P1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
Vo037R1	P1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Vo010R1	P2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Vo011R1	P2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
Vo012R1	P2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
Vo024R1	P2	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Vo028R1	P2	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Vo030R1	P2	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
Vo031R1	P2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Vo032R1	P2	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
Vo033R1	P2	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Vo035R1	P2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
Vo036R1	P2	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Vo040R1	P2	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	
Vo056R1	P2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Vo058R1	P2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Vo059R1	P2	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Vo067R1	P2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Vo001R1	P3	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Vo003R1	P3	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
Vo004R1	P3	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
Vo005R1	P3	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vo006R1	P3	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Vo008R1	P3	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	-9	-9	-9	-9	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0

Realizado por: Vasquez Evelyng, 2024