



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMA REPRODUCTIVO DE *Vanilla planifolia* JACKS
Y *Vanilla pompona* SCHIEDE (ORCHIDACEAE)

T E S I S

QUE PARA OPTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Biología

PRESENTA:

Natalia Meztli Ochoa Manrique

DIRECTORA:

Dra. Mariana Hernández Apolinar

Ciudad de México, 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Ochoa

Manrique

Natalia Meztli

2288 10 44 94

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

411089755

2. Datos del tutor

Dra

Mariana

Hernández

Apolinar

3. Datos de sinodal 1

Dr

Eduardo Alberto

Pérez

García

4. Datos de sinodal 2

M. en C.

Juan Carlos

Flores

Vázquez

5. Datos de sinodal 3

Dra

Concepción

Martínez

Peralta

6. Datos de sinodal 4

Dr

Edgar Javier

González

Liceaga

7. Datos del trabajo escrito

Sistema reproductivo de *Vanilla planifolia* Jacks y *Vanilla pompona* Shiede (Orchidaceae)

59

2019

*A Rubén y Alba, los pilares de lo que estoy siendo.
Alethia, mi templanza.
A la familia.*

Reconocimientos

Gracias a la Dra. Mariana Hernández Apolinar por invitarme al proyecto “Estrategia de Investigación aplicada para el fortalecimiento, innovación y competitividad de la producción de vainilla en México”, el cual formó parte del Macroproyecto de investigación, desarrollo e innovación tecnológica. Asimismo, quiero agradecer al equipo de trabajo que formamos durante estos años, gracias a Claudia, Yared, Sergio, Giovanni y Ethel quiénes me ayudaron con la construcción de este proyecto durante los seminarios y prácticas de campo. Gracias también a Alba y Rubén, por su apoyo incondicional y económico para completar el trabajo en campo. Quiero agradecer también a Ricardo Wong y Mónica Pérez P. por apoyarme durante los análisis realizados en el laboratorio; a M. en C. Beatriz Zúñiga por su apoyo con materiales para laboratorio, así como también los procesos de esterilización; A Dra. Silvia Espinosa Matías por el apoyo en la toma de fotografías en el microscopio electrónico de barrido. gracias al Dr. Edgar J. González, Alejandro Cuevas y Bruno Barrales por sus aportaciones en la construcción de algunos análisis estadísticos; así como también en la interpretación y explicación al Dr. Jaime Zúñiga, Gerardo Cervantes y Paola Vázquez. Además quiero agradecer a Pedro Mendoza, Teresa Valverde, Consuelo Bonfil, Irene Pisanty, Claudia Olivera, Polenka Torres y a todo el Departamento de Ecología y Recursos Naturales. De igual manera quiero agradecer a Rosa Macilla, Iván Castellanos, Mónica Queijeiro y Yolanda Romero quienes me acompañaron y guiaron durante el taller de titulación Ecología terrestre y manejo de recursos bióticos, gracias a todos. Quiero agradecer especialmente a José Luis H. LQ., Ing. Raúl Degtau Morales, Juan Pérez. A., Don Selso, Misael Gallardo, José Luis H. P. por abrirnos las puertas y los caminos a sus vainillales, lo cual nos permitió el desarrollo de este proyecto; así como también agradezco la compañía de Marc Blackman y Maeleth durante las largas estancias en campo. Además me gustaría agradecer a Mariana S.S., Ketzalzin A., CeCe, Georgina, Yaeko, Guacamolito, Clary, LucíaRo, Anita A.M., Kar, Silvia, Juan L, María A., Paola V., Roberto V., Gustavo N., Majo, NOC, Valeria, Mariel, Ceci , JJ, Juan M., Mariano, Francisco, Jimena, Víctor, John, Bety star, Dra. Beatriz Novak, CJEC y a mi familia por su apoyo y guía en este largo camino, el cual fue de gran motivación. Para concluir, quiero agradecer especialmente a Juan Carlos Flores, Dra. María del Carmen Mandujano, Dra. Concepción Martínez P., Dra. Patricia G. F. y Lucy Vite por ayudarme a seguir adelante con este proyecto. Para ustedes esta tesis, porque la hemos esperado desde hace tiempo.

Disfrútenla.

Resumen

En *Vanilla planifolia* Jack ex Andrews y *Vanilla pompona* Shiede los procesos de polinización y fructificación autogámicos han sido de gran interés para la investigación, debido a la demanda comercial que existe por sus frutos. Los frutos presentan vainilla, una sustancia con propiedades organolépticas de importancia económica. En condiciones naturales los polinizadores realizan un flujo de polen por entrecruza; para lo cual desplazan el rostelo, la cual es una estructura floral en *Vanilla* spp. que limita una polinización autogámica y favorece la entrecruza. Sin embargo, la producción comercial de los frutos se basa en la autopolinización de las flores mediante una técnica de polinización manual, en la cual se remueve manualmente el rostelo; las investigaciones realizadas al respecto, buscan aumentar producción de vainilla mediante autopolinizaciones y propagación clonal de dichas plantas. Debido a que el conocimiento de los sistemas reproductivos es importante para el manejo y control de dicha especie, se pretende con la presente tesis describir y evaluar los sistemas de reproducción de *V. planifolia* y *V. pompona* en la región del Totonacapan, Veracruz.

Las actividades se realizaron en tres sitios de muestreo pertenecientes a ésta región. Con este fin se evaluó: (1) el comportamiento de la apertura floral de *V. planifolia* y *V. pompona*; (2) la receptividad polen-estigma, mediante las polinizaciones realizadas durante 24 horas en *V. planifolia*. Dicho experimento se realizó únicamente en *V. planifolia* debido a la escasa disponibilidad de flores de *V. pompona*; (3) el efecto del sistema de cruza autogámico y xenogámico en el desarrollo de frutos de *V. planifolia*, y por último, (4) el sistema de apareamiento, de las especies ya mencionadas, para lo cual se evaluó el arreglo floral, receptividad polen-estigma y la relación polen-óvulos; estos datos se analizaron según el índice de Dafni, la tasa de autoincompatibilidad y el coeficiente polen-óvulos.

Respecto a lo anteriormente mencionado, se observó que (1) las flores de *V. planifolia* y *V. pompona* presentan una apertura desde las primeras horas del día; además, (2) se identificó que durante toda apertura floral de *V. planifolia* hay una receptividad polen-estigma que favorece la fructificación. (3) Los frutos evaluados, en esta especie, indicaron que la retención de los frutos xenogámicos es mayor; no obstante, (4) la evaluación de los sistemas de apareamiento en *V. planifolia* y *V. pompona* mostraron un sistema autogámico facultativo.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Objetivos e hipótesis	8
1.1.1. Objetivo general	8
1.1.2. Objetivos particulares	8
2. Método	9
2.1. Especies de estudio	9
2.2. Sitio de estudio	10
2.3. Procedimiento	11
2.3.1. Comportamiento floral	11
2.3.2. Periodo de receptividad polen-estigma y experimentos de cruce en <i>V. planifolia</i>	13
2.3.3. Sistemas de apareamiento	15
2.3.4. Análisis de datos	18
3. Resultados	21
3.1. Comportamiento floral	21
3.1.1. Inicio de apertura	21
3.2. Periodo de receptividad polen-estigma en <i>V. planifolia</i>	29
3.3. Sistema de cruce en <i>V. planifolia</i>	29
3.3.1. Calidad comercial de los frutos de <i>V. planifolia</i>	30
3.4. Sistema de apareamiento	30
3.4.1. Índice de Cruden (OIC)	31
3.4.2. Proporción polen/óvulos	32
3.4.3. Tasa de autoincompatibilidad (ISI) en <i>V. planifolia</i>	33
4. Discusión	35
5. Conclusiones	43
Bibliografía	45
A. Apéndice	51

Capítulo 1

Introducción

La reproducción es una estrategia por la cual los organismos aseguran su permanencia en este mundo (Shivanna y Tandon, 2014). La reproducción de los organismos sésiles, como las plantas, depende del desplazamiento de sus gametos por medio de vectores abióticos (i.e. agua, viento) o bióticos (i.e. abejas, colibríes, murciélagos, entre otros), externos a ellos. Los polinizadores son organismos que facilitan la unión de gametos entre individuos de la misma especie (Muhammad, Muhammad y Muhammad, 2004). Cabe mencionar que la polinización biótica no depende únicamente de los polinizadores; éstos responden a las estrategias reproductivas que en su conjunto forman los sistemas de reproducción. La interacción mencionada define la extensa diversidad morfológica de las flores, así como también la estructura genética poblacional (Richard, 1997; Eguiarte, Nuñez, Domínguez y Cordero; 1999; Ollerton *et al.*, 2009; Torices, 2014).

La mayoría de estudios en sistemas reproductivos de plantas se abordan desde las complejas interacciones de planta-polinizador, considerando la relación de sus características, tal y como es el caso de los síndromes de polinización (Gómez, 2002). Cabe aclarar que el estudio de los rasgos morfológicos, fisiológicos o ecológicos de las plantas ayuda a definir los mecanismos de polinización (Van der Pijl y Faegri; 1979). Es por esto que, el estudio de la morfología floral es importante para comprender el apareamiento a partir de los tipos de arreglos florales; así como también, su parentesco (Figura 1.1; Eguiarte *et al.*, 1999; Ollerton *et al.* 2009; Márquez-Guzmán *et al.*, 2013; Torices, 2014). La relación genética entre los progenitores es relevante respecto a la adecuación de la progenie; las estrategias reproductivas definen las relaciones de parentesco entre los progenitores (Eguiarte *et al.*, 1999; Thain *et al.*, 2004). Antes de continuar es importante aclarar algunas estrategias reproductivas que se analizarán en el presente trabajo, las cuales se han estudiado a partir de flores hermafroditas. En estas estructuras reproductivas, existe la posibilidad de que ocurra una autopolinización debido a la maduración simultánea de los gametos femeninos y masculinos, proceso conocido como *homogamia*; de lo contrario, la *dicogamia* sucede cuando algunos los órganos sexuales se encuentra maduro y el otro no, si el estigma está receptivo pero el polen no es viable se le conoce por *protoginia*, de lo contrario será *protandria* (Dafni, 1992). Asimismo, se ha descrito en las mismas estructuras florales la *hercogamia*, que se refiere a la separación espacial de los órganos sexuales, y la *autoincompatibilidad*, que es la selectividad del estigma

1. INTRODUCCIÓN

hacia el polen respecto al parentesco entre dichas estructuras. Las estrategias reproductivas facilitan o limitan el sistema de apareamiento xenogámico o autogámico, como se muestra en la Tabla 1.1 (Barret, 2002); estas pueden interceptarse entre sí, lo que conforma los sistemas reproductivos de las especies (Figura A.1; Domínguez y Pérez, 2013).

Tabla 1.1: Estrategias reproductivas según faciliten (+) o limiten (-) al sistema de apareamiento xenogámico o autogámico (Dafni, 1992).

Estrategias reproductivas	Sistema de apareamiento	
	Xenogámico	Autogámico
Hercogamia	+	-
Homogamia	+	+
Dicogamia	+	-
Autoincompatibilidad	+/-	-

La gran mayoría de las angiospermas son individuos que producen simultáneamente gametos femeninos y masculinos; debido a que los sexos se encuentran en la misma estructura floral (flor hermafrodita), existe la posibilidad de que ocurra una autofecundación. El estudio de los procesos de autopolinización se evalúa mediante la estrategia reproductiva que facilite o limite dicho apareamiento (Barret, 2002). Las estrategias reproductivas son factores que se estudian según la interacción entre plantas y polinizadores, para inferir el apareamiento más exitoso. La diversidad en las formas de cruce se observa mediante el estudio de la morfología floral; es decir, por la variación en el arreglo floral dentro y entre los individuos (Figura 1.1; Márquez-Guzmán *et al.*, 2013). El parentesco genético está determinado por el sistema de reproducción; definido, a su vez, por la manera en la que se reproducen. Los sistemas reproductivos regulan el parentesco entre los gametos por medio del flujo de polen, favoreciendo una polinización autogámica o xenogámica (Eguiarte *et al.*, 1999); en la Tabla 1.1 se muestra como las estrategias reproductivas facilitan o limitan un sistema de apareamiento xenogámico o autogámico.

El sépalo y pétalo no se relacionan directamente con producción de frutos y semillas (Figura 1.1), pero su despliegue se relaciona con la probabilidad de polinización (Shivanna y Tandom, 2014). Al proceso de despliegue floral, desde la apertura de cada una de las flores hasta su senescencia, se define como *antesis*; este proceso facilita la polinización (Primack; 1985). No obstante, cabe mencionar que en algunas plantas ocurre una polinización en flores cerradas; dicho proceso se conoce como *cleistogamia* y está asociada a una reproducción autogámica (Crawley, 1997). Algunos ejemplos reportados de polinizaciones ceistógamas se han descrito dentro de los siguientes géneros *Viola* sp., *Vandellia* sp., *Ononis* sp., *Drosera* sp., por mencionar algunos (Darwin, tr. Pinar, 2009). Además, en las plantas existe una señalización química entre el polen y el estigma que regula la fecundación según el grado de parentesco; este proceso es conocido como *compatibilidad* o *autoincompatibilidad genética*, según sea el caso (Crawley, 1997).

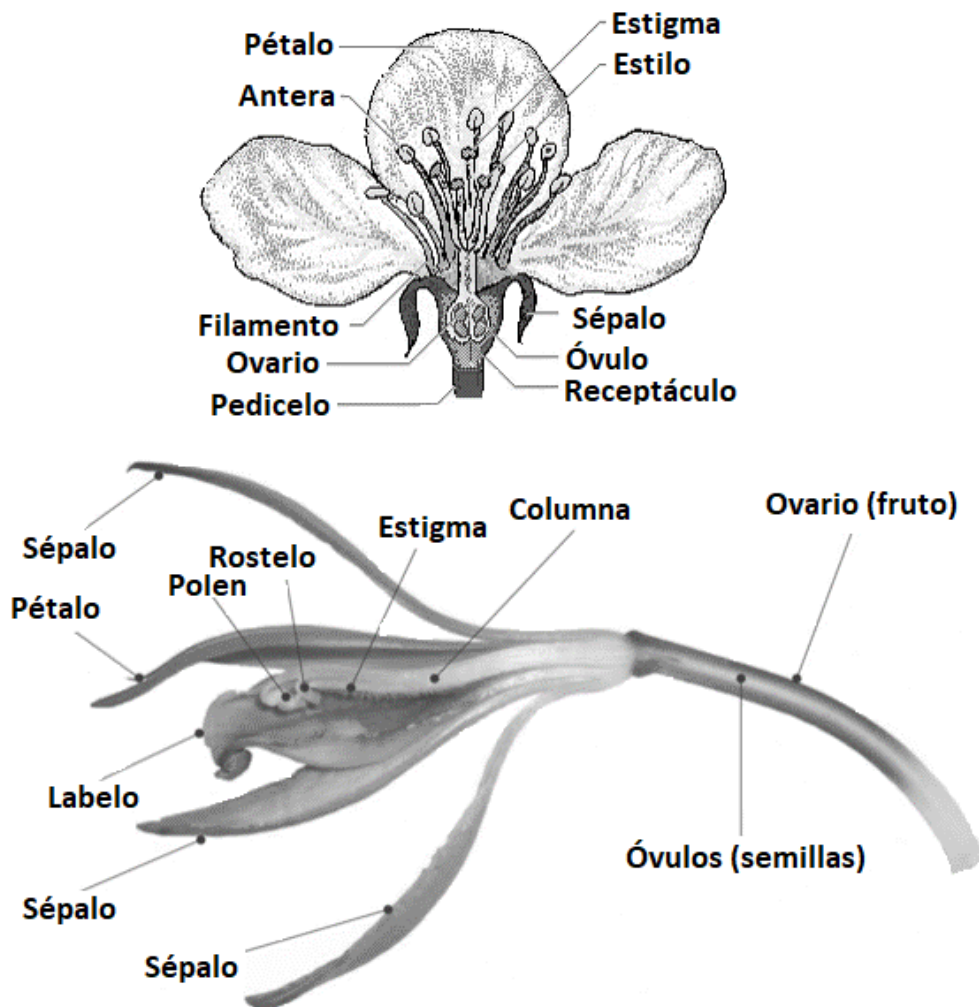


Figura 1.1: Existe una variación en el arreglo de los carpelos florales, como son el cáliz (sépalos), la corola (pétalos), androceo (anteras) y gineceo (estigma y ovario) (Márquez-Guzmán *et al.*, 2013). Arriba se observa una *flor perfecta* de *Prunus* sp. y abajo una flor que presenta la fusión de los carpelos de *Vanilla* sp.

La reproducción sexual en las angiospermas es más compleja que en otros grupos de plantas (Shivanna y Tandom, 2014); con la finalidad de comprender los sistemas reproductivos se han desarrollado distintos métodos de análisis para su aproximación. Las primeras descripciones anatómicas y funcionales de las estructuras florales vislumbraron una amplia diversidad de apareamientos en las plantas; además con las polinizaciones manuales se evaluó la cruce controlada entre individuos con distintos niveles de parentesco. Uno de los primeros trabajos descriptivos fue realizado por Darwin en 1877, en *Las distintas formas de las flores en plantas de la misma especie* Darwin profundiza

1. INTRODUCCIÓN

en las estrategias reproductivas desde un análisis anatómico (Darwin, 2009). En 1940, Baker (1979) menciona que el estudio de la polinización tuvo gran influencia de la Teoría Sintética de la Evolución; lo anterior se ve reflejado en los trabajos de Cruden, 1977, donde desarrolla un análisis respecto a al número de gametos en función a algunos factores ambientales (Apéndice A.2) y su relación con los sistemas reproductivos de las plantas. Posteriormente Dafni (1992) retoma los trabajos de Cruden (1977, 1985) y Faegri en colaboración con Van der Pijil (1979), para ajustar los análisis de fenología floral y sistemas de cruce a distintos niveles, como son: flor, individuo, población, comunidad, aspectos filogenéticos; además, menciona la importancia de relacionar dichos estudios con parámetros genéticos, físicos y los agentes biológicos, así como también las interacciones con estos. Dicho análisis se retoma en el presente trabajo de investigación.

En la familia Orchidaceae, los sistemas reproductivos se caracterizan esta altamente específicos. El setenta por ciento de las plantas pertenecientes a la familia están relacionadas con una polinización xenogámica (Tremblay *et al.*, 2005; Cozzolino y Widmer, 2005). En contraste con otras plantas con flor, la alta probabilidad de la reproducción cruzada en las orquídeas está relacionada con la morfología floral (Figura 1.1), la cual presenta: (a) la fusión parcial de las estructuras sexuales masculinas y femeninas en el centro de la flor (columna); (b) un lóbulo del estigma trilobado que pierde receptividad y se modifica como una pequeña proyección, además genera una barrera física entre las estructuras femenina y masculina (rostelo), mientras que los otros dos lóbulos se fusionan en el estigma; (c) los granos de polen aglutinados en másulas o polineos; y por último, (d) la modificación de un pétalo conocido como labelo. Con estas modificaciones la flor presenta un sólo eje de simetría, lo que se entiende por zigomorfía (Tremblay *et al.*, 2005; Sasikumar, 2010; Willmer, 2011). Esta morfología floral se mantiene en el género *Vanilla*, grupo de interés para la presente tesis.

El género *Vanilla* está constituido por 107 especies de distribución pantropical (Soto-Arenas, 2009). La información relacionada con los sistemas de reproducción es limitada y a la fecha se ha descrito que las vainillas pueden ser: (1) cleistogámicas, como *V. bicolor* Lindl. y *V. palmarum* (Salzm. ex Lindl.) Lindl., (2) autogámicas, como *V. savannarum* Britton, *V. griffithii* Rchb.f. y *V. planifolia* Jacks. ex Andrews y (3) xenogámicas, como *V. planifolia* Jacks. ex Andrews y *V. pompona* Shiede (Van Dam, Householder y Lubinsky, 2010; Pansarin, *et al.* 2014). En México se distribuyen: *V. cribbiana* Soto Arenas, *V. hartii* Rolfe, *V. helleri* A.D.Hawkes, *V. inodora* Schiede, *V. insignis* Ames, *V. odorata* C. Presl, *V. phaeantha* Rchb.f., *V. tahitensis* J.W. Moore, *V. planifolia* Jacks. ex Andrews y *V. pompona* Shiede (Soto, 2009). La información disponible sobre los sistemas reproductivos para estas especies es muy escasa, debido a que la mayor parte de los estudios se ha relacionado con la productividad de frutos y extracto de vainilla, particularmente de *V. planifolia*. La presente tesis se enfoca en la descripción del sistema de reproducción de *V. planifolia* y *V. pompona*.

La información disponible sobre el sistema de reproducción en *V. planifolia* y *V.*

pompona es indirecta y se basa en la morfología floral, a partir de la cual se infiere un apareamiento xenogámico en ambas especies (Rodolphe *et al.*, 2014). En las flores de ambas especies la presencia del rostelo funge como barrera hercogámica entre el estigma y la antera, limitando la autofecundación (Domínguez *et al.*, 2013). La forma en la cual se reproducen *V. planifolia* y *V. pompona* es por medio de la intervención de abejas. En *V. pompona* las abejas Euglossini son los polinizadores reportados, correspondientes a los géneros *Euglossa* y *Eulaema* (Soto-Arenas, 1999). En *V. planifolia* se han determinado como polinizadores específicos a *Euglossa viridissima* y hormigas (Hernández Apolinar, 1997; Soto-Arenas, 1999; Hernández, *et al.* 2016).

En cuanto a la receptividad polen-estigma se conoce que *V. planifolia* presenta una viabilidad de polen y receptibilidad estigmática previo a la antesis; no obstante, esta información fue obtenida a partir organismos cultivados en Karnataka, India (Shadakhari *et al.* 2003) . Los organismos analizados en estos estudios fueron evaluados fuera del área de distribución natural de la especie, por lo que podría existir variación en el sistema reproductivo reportado (Tremblay *et al.*, 2005).

Con relación a lo anterior, es importante hacer notar que tanto *V. planifolia* como *V. pompona* son abundantes fuera de su área de distribución natural (Lubinsky, Romero, Heredia y Zabel, 2010); lo anterior se debe a que ambas orquídeas son consideradas especies de gran importancia económica a nivel mundial (Hernández Apolinar, 2002; Soto-Arenas, 2003). Los frutos curados de *V. planifolia* presentan propiedades organolépticas; a partir de estos frutos se extrae la esencia y semillas, condimento muy usado por la industria de los alimentos (Hernández Apolinar, 1997; Soto-Arenas, 2003). El comercio de ésta especie genera millones de dólares a los países productores (Aust y Hachmann, 2016). Respecto a *V. pompona*, sus frutos maduros se usan en la perfumería, también generando altos dividendos (Hernández Hernández, 2010).

Históricamente, los frutos de vainilla, particularmente de *V. planifolia*, fueron uno de los productos que se exportaron después de la Conquista de México, tanto plantas como vainas de vainilla (Hágsater *et al.*, 2005). Diversos documentos señalan que en Mesoamérica la vainilla era recolectada de los bosques tropicales y era usada en actividades medicinales, religiosas y culinarias (Hernández Apolinar, 1997; Lubinsky *et al.*, 2010; Hágsater, *et al.*, 2005). La recolección de las vainas de vainilla era realizada por los totonacos, quienes habitaban las zonas de distribución natural de las *Vanilla* (Soto-Arenas, 1999; Hernández Apolinar, 2002; Hágsater *et al.*, 2005). Un aspecto relevante es que en la época Precolombina, la abundancia de frutos colectados dependía totalmente de las polinizaciones naturales (Soto-Arenas, 1999; Hernández Apolinar, 2002).

Después de la Conquista Española, la colecta de frutos en México continuó siendo de interés; incluso, la exportación de frutos de *V. planifolia* hacia el continente europeo incrementó. Las vainas fueron consideradas de gran importancia para la Corona Española y Europa, al ser un condimento de lujo (Correll, 1953). Con el objetivo de

1. INTRODUCCIÓN

incrementar la producción de frutos, en 1760 cambiaron las prácticas de recolección por el establecimiento de los primeros cultivos de vainilla, conocidos como vainillales, en la región del Totonacapan (Lubinsky *et al.*, 2010). Con el mismo objetivo de incrementar la producción, en 1760 se promovió el transporte y cultivo de plantas entre invernaderos europeos (Ecott, 2004). Posteriormente, éstos individuos de *V. planifolia* se introdujeron vegetativamente en las colonias europeas en el trópico, ubicadas en África y Asia, las cuales se establecieron exitosamente por las condiciones climáticas (Ecott, 2004, Hágsater *et al.*, 2005; Castro, 2008). No obstante, la producción de vainilla en los sitios anteriormente mencionados fue nula, debido a que la fecundación de las flores dependía de los polinizadores naturales (Hernández Apolinar, 2002). Por esta razón, en el siglo XVIII la producción de vainilla se limitó esencialmente a la región del Totonacapan (Ecott, 2004), por lo que México mantuvo el control comercial sobre el mercado internacional y nacional de la vainilla (Ecott, 2004; Hernández Hernández, 2011). El establecimiento vainillales fuera del área natural de distribución resultó en pérdidas económicas debido a la ausencia de polinizadores específicos, y por ende en la nula producción de frutos (Cozzolino y Widmer, 2005).

A inicios del siglo XIX se logró la producción de frutos independiente de los polinizadores naturales, lo anterior favoreció el cultivo de los frutos fuera del área de distribución natural de *V. planifolia*; fue así como la producción de vainilla se extendió y estableció en el comercio mundial actual (Hernández Apolinar, 2002; Ecott, 2004). La producción de vainilla se desarrolló por medio de la técnica de polinización manual, implementada por Edmond Albius en 1841 (Ecott, 2004); esta técnica consiste en realizar una polinización en la cual se trasladan manualmente los granos de polen de la antera al estigma de la misma flor (Com. pers. Pérez-Atzin Juan; Ecott, 2004; Hernández Hernández, 2011). La práctica de polinización manual fue un sistema reproductivo recurrente entre los científicos de la época y entre coleccionistas de plantas exóticas del Nuevo Mundo (Correll, 1953). El éxito productivo con la técnica de polinización autogámica fue indudable y su uso propició el aumento de la producción de vainilla en un 99 % respecto a una polinización natural (Soto-Arenas, 2003; Hernández Hernández, 2011).

En el establecimiento de la producción de vainilla a nivel mundial, ha sido relevante entender dos aspectos del sistema reproductivo: 1) la propagación vegetativa, y 2) la polinización autogámica asistida (Hernández Hernández, 2010). En condiciones naturales se observan polinizaciones xenogámicas y autogámicas reguladas por polinizadores (Soto-Arenas, 1999); sin embargo, en condiciones de cultivo intenso se observa polinizaciones manuales autogámicas. Lo anterior, sugiere la variación del sistema de cruce según las condiciones de su hábitat, así como también por el manejo en los cultivos; por lo que el estudio de los sistemas de apareamiento es importante debido a que la información relacionada con los sistemas de apareamiento y apertura floral en *V. planifolia* y *V. pompona* es escasa en su sitio de distribución natural. En este contexto, resulta fundamental conocer los sistemas de apareamiento a detalle, puesto que esta

información es de gran trascendencia para distintas áreas de estudio relacionadas con la propagación de éstas especies, e incluso para la producción comercial de vainilla.

1.1. Objetivos e hipótesis

1.1.1. Objetivo general

Describir e identificar los sistemas de reproducción de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona* en la región de Totonacapan, Veracruz, México.

1.1.2. Objetivos particulares

1. Conocer el comportamiento floral de *V. planifolia* y *V. pompona*.
2. Determinar el periodo de receptividad polen-estigma para analizar el periodo de polinización manual en *V. planifolia*.
3. Determinar las diferencias entre los experimentos de cruce autogámica y xenogámica mediante la producción de frutos de *V. planifolia*
4. Determinar el sistema de apareamiento en *V. planifolia* y *V. pompona*.

Hipótesis de trabajo

La apertura floral de *V. planifolia* se ha reportado de 7:00 a 13:00; sin embargo, los trabajos anteriores no justifican el periodo de observación, el cual pudo ser determinado a partir de los horarios de productividad en los cultivos. Por lo anterior, se espera observar un periodo de apertura floral mayor al ya descrito. En el caso de *V. pompona* se desconoce el comportamiento floral; no obstante, debido a la cercanía filogenética con *V. planifolia*, se espera un comportamiento floral similar.

Respecto al periodo de receptividad polen-estigma, se espera que sea igual al periodo de polinización manual realizada en la región de Totonacapan, el cual se realiza de 7:00 a 13:00 horas. Por lo anterior, se espera observar una incompatibilidad polen-estigma fuera del periodo de polinización manual.

A partir del análisis de las cruces autogámicas y xenogámicas, se espera que se presente una mayor frecuencia de frutos xenogámicos, además de un mayor tamaño. Los análisis de autoincompatibilidad y el efecto de los sistemas de cruce no se evaluaron en *V. pompona* debido a la falta de material biológico para desarrollarlos.

Con la descripción de los sistemas de apareamiento en *V. planifolia* y *V. pompona*, se espera observar un sistema de apareamiento mixto. Debido a que, la flor presenta estrategias reproductivas asociadas a la xenogamia; mientras que, en cultivo la producción de frutos ocurre frecuentemente por un sistema reproductivo autogámico.

2.1. Especies de estudio

Vanilla planifolia Jack ex Andrews y *Vanilla pompona* Shiede son especies de la familia Orchidaceae. El género *Vanilla* fue investigado por Soto-Arenas y colaboradores (1999; 2009; Soto2010), quienes describen a los individuos con hábitos hemiepífitos; es decir, estos organismos germinan en el suelo y se establecen sobre árboles que les brinden soporte sin perder el contacto con el suelo mediante tallos y raíces (Crawley, 1997). Los tallos en *Vanilla* spp. son suculentos y están conformados por entrenudos, en los cuales se presenta una yema axilar de la cual se forman hojas, raíces e inflorescencias (Hernández Apolinar, 1997). El género *Vanilla* incluye plantas perennes y presentan una floración sincrónica durante marzo a mayo (Hernández Apolinar, 1997; Soto-Arenas, 2009).

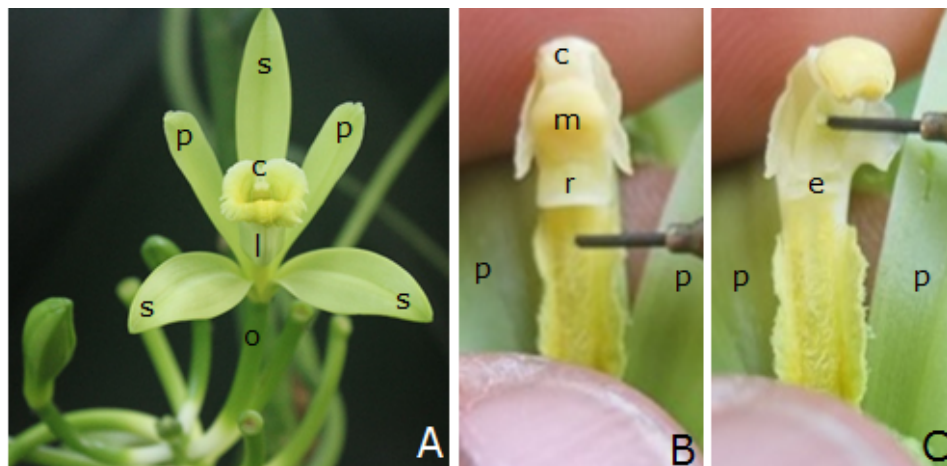


Figura 2.1: Flor de *V. planifolia* en la que se muestra la estructura floral del género *Vanilla*. (A) Se observan los sépalos (s), pétalos (p), el labelo (l), la columna(c) y el ovario (o). (B) Las estructuras sexuales de la flor son evidentes al retirar el labelo y exponer la columna. (C) En la columna se encuentra la antera (m), el rostelo (r) y, por debajo de este se localiza el estigma (e).

2. MÉTODO

Las inflorescencias de *V. planifolia* y *V. pompona* se presentan de manera axilar en los tallos, las cuales están constituidas por un raquis, una bráctea y flores (> 15 flores, Soto-Arenas, 2009). Las flores de *V. planifolia* presentan un color amarillo verde pálido, mientras que en *V. pompona* se observa un color amarillo intenso (Cameron, 2011). Ambas especies presentan flores con un sólo plano de simetría (zigomorfía), compuestas por tres sépalos, dos pétalos y un pétalo modificado (labelo) (Figura 2.1, imagen A). El labelo es un pétalo tubular que recubre las estructuras sexuales de la flor, las cuales se encuentran fusionados en la columna (Figura 2.1, B). De acuerdo con Tremblay *et al.* (2005), en dicha estructura se integran la antera, rostelo y estigma (Figura 2.1, C). Este arreglo floral aísla las estructuras reproductoras y limita el contacto entre ellas mediante el rostelo; esta estructura se presenta como una barrera física entre la antera y el estigma, lo que limita el contacto de los gametos de la misma flor.

Los botones florales abre uno por día, comenzando generalmente por la base de la inflorescencia (Soto-Arenas, 2009). Las flores de *V. planifolia* se mantienen abiertas durante seis a ocho horas, de 7:00 a 15:00 (Hernández-Apolinar, 1997; Soto-Arenas, 2009). Respecto a *V. pompona* no existen registros de la floración, sin embargo cuando *V. planifolia* y *V. pompona* se encuentran juntas se pueden confundir entre sí debido a que presentan un despliegue floral muy similar.

En el periodo de apertura floral suceden los eventos de polinización. En *V. pompona* se han reportado abejas como polinizadores correspondientes a *Euglossa* sp. y *Eulaema* sp. (Soto-Arenas, 1999; Hernández Apolinar *et al.*, 2016; Garcés, aún no publicado). En *V. planifolia* se han determinado como polinizadores potenciales a *Euglossa viridissima* y hormigas (Hernández Apolinar, 1997; Soto-Arenas, 1999; Cameron, 2011). Después de la polinización, los ovarios se engruesan y dentro de ellos crecen las semillas. Los frutos de *V. planifolia* son alargados, verdosos y miden de 10.2 a 25.0 cm de longitud; los frutos de *V. pompona* miden 15 cm de largo y 2.5 cm de ancho (Castillo y Engleman, 1993; Cameron, 2011). Se estima que los frutos de *V. planifolia* producen un aproximado de 70,000 a 90,000 semillas (Cameron, 2011); respecto a *V. pompona* se desconoce esta cifra.

2.2. Sitio de estudio

El trabajo de campo se abordó en tres sitios de la región del Totonacapan, durante abril y mayo, de 2014 a 2017, en los alrededores de la ciudad de Papantla de Olarte, Veracruz. Rancho 20 Soles y Larios están inmersos en una selva mediana subperennifolia con un clima cálido subhúmedo (Aw), con una temperatura media anual de 22°C y con temperaturas menores a 18 °C en invierno (Castro-Babadilla, 2008; Barrera-Rodríguez, 2009). La precipitación oscila entre 1300 y 1500 mm, con una temporada de secas durante los meses de febrero a mayo (Castro-Babadilla, 2008; Soto-Arenas, 2009).

Rancho 20 Soles está cubierto por un vainillal de una hectárea de *V. planifolia*. De acuerdo con la clasificación de Castro-Babadilla (2008), este vainillal presenta dos sistemas de manejo: tecnificado y semitecnificado. El sistema tecnificado abarca una quinta parte del área en producción del vainillal y presenta como tutores a *Erythrina* sp. y a estructuras de concreto. El resto del área del vainillal presenta un sistema de manejo semitecnificado, el cual cuenta con los géneros *Erythrina*, *Gliricidia* y *Litsea* como árboles tutores, conformando el acahual. Por su parte el Rancho Larios está ubicado en la localidad de Cazuelas, donde se cultiva *V. pompona* sobre ceibas (*Ceiba* sp.) y cedros (*Acrocarpus* sp.), algunas plantas de *V. planifolia* crecen sobre naranjales (*Citrus* sp.). El tercer sitio es un área de conservación privada, en donde crecen sin manejo alguno plantas de *V. planifolia* y *V. pompona*. La ubicación de este sitio se ha reservado debido a los altos niveles de extracción clandestina que hay en la región del Totonacapan.

2.3. Procedimiento

Respecto a los objetivos anteriormente mostrados, se desarrollaron las siguientes observaciones y mediciones con el fin de abordar el estudio de los sistemas reproductivos de *V. planifolia* y *V. pompona*: (1) el comportamiento de la apertura floral, (2) la receptividad polen-estigma, (3) el efecto del sistema de cruce autogámico y xenogámico en el desarrollo de frutos y (4) el sistema de apareamiento. Cabe señalar que la descripción del sistema reproductivo de *V. planifolia* se basó en los cuatro puntos antes mencionados; mientras que en *V. pompona* sólo se estudió el comportamiento floral y el sistemas de apareamiento, debido a la limitada disponibilidad de las flores.

2.3.1. Comportamiento floral

Las flores de *V. planifolia* y *V. pompona* presentan una antesis corta (Hernández-Apolinar, 1997); por lo que la apertura floral se caracterizó a partir de observaciones realizadas durante 22 horas, desde las 17:00 a las 15:00 del día siguiente, en intervalos de dos horas. La antesis se caracterizó en: 1) apertura inicial, 2) apertura máxima y 3) cierre floral. Con este objetivo, se observaron 38 botones florales de *V. pompona* y 37 de *V. planifolia* en los cuales se midieron dos áreas de referencia para describir estos eventos: el área longitudinal y el área apical. Con el área longitudinal se evaluó el inicio de la apertura floral; la cual, inicia con la separación longitudinal de los sépalos (Figura 2.2). Dicha apertura se aproximó con un rectángulo (Figura 2.2 A), por lo que se estimó el área de este polígono a partir de los siguientes elementos: se midió con un vernier electrónico (mm) la longitud del botón (*long*) y se dividió en dos secciones: inferior y superior, debido a que la separación no es homogénea; a cada sección se estimó el porcentaje de apertura ($a = 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0$) y se midió la separación entre los sépalos (mm, *s*). Con la fórmula 2.1 se calculó el rectángulo mostrado en la imagen A de la Figura 2.2.

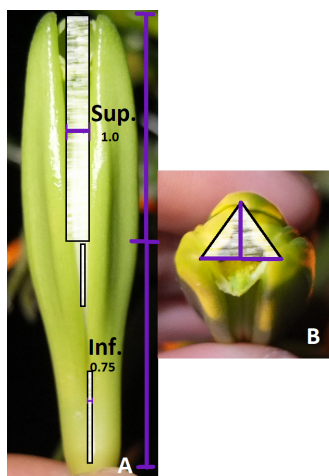


Figura 2.2: Las líneas rojas muestran las mediciones realizadas sobre los botones. La apertura longitudinal se evaluó a partir de la longitud total del botón, la cual se dividió en dos secciones: la superior e inferior. En la imagen se ejemplifican estas secciones, con un porcentaje de apertura 1.0, en la sección superior, y de 0.75 en la inferior. Respecto a la apertura apical se midió la separación entre los sépalos para evaluar respecto a un triángulo, para lo cual se midió la base y altura del polígono.

$$Apertura\ Longitudinal = (0.5 \cdot long_{inf})(a_{inf})(s_{inf}) + (0.5 \cdot long_{sup})(a_{sup})(s_{sup}) \quad (2.1)$$

La separación apical de los sépalos, en los botones, se midió con el área de un triángulo por su similitud a este polígono (Figura 2.2 B). En las flores de *V. planifolia* y *V. pompona* se indicó la base (b) y altura (a) del polígono de referencia (Figura B, 2.2). Las medidas fueron tomadas con un vernier electrónico (mm) para posteriormente calcular el área del triángulo con la fórmula 2.2.

$$Apertura\ apical = \frac{a \cdot b}{2} \quad (2.2)$$

En abril de 2015 se realizó un registro fotográfico del comportamiento floral con una cámara réflex (Canon EOS 70D (W) ®), la cual fue programada con un temporizador (RST-7001 Shoot ®) para capturar una flor cada 15 minutos durante 24 horas. En la captura de imágenes se instaló una cámara en un trípode para mantener una distancia constante entre la cámara y la flor; además, se utilizó una regla de 30 cm como escala. Las imágenes fueron manipuladas en el programa ImagenJ, con el se calcularon áreas de referencia apical, así como los componentes (base y altura); además las imágenes fueron utilizadas para ilustrar el comportamiento floral de ambas especies.

La apertura floral se relacionó con datos de temperatura (T , C°) y humedad relativa (HR , atm) registrados con Hobos U23-001 Pro V2 ®. Se colocaron sensores en sitios

estratégicos en las plantaciones, buscando abarcar la mayor parte de los vainillales. Los datos se extrajeron y condensaron con el programa de HOBOWare ¹. Cabe mencionar que con las variables anteriores se calculó el punto de rocío (Pr), a partir de la fórmula 2.3; dicha variable se consideró también en los análisis ya que considera la condensación del vapor de agua ambiental, según la temperatura y concentración de humedad. El punto de rocío es un coeficiente sin unidades, que se evalúa respecto a la temperatura; si es mayor o igual a la ésta, el agua que se encuentra en vapor de agua se condensará espontáneamente y aumentará su disponibilidad en estado líquido en el ambiente (Segovia, 2016). Se utilizó dicha variable debido a que en la exploración de datos se observó una relación estrecha entre la temperatura y humedad.

$$PR = \sqrt[8]{\frac{HR}{100}} \cdot (110 + T) - 110 \quad (2.3)$$

En la exploración de datos se determinó que en ambas especies se relacionaría la apertura floral longitudinal con la temperatura, humedad y punto de rocío para el modelo lineal mixto (LMM). Respecto a la apertura apical se consideraría únicamente el punto de rocío, ya que el modelo aditivo generalizado (GAMM), presentaba un mejor ajuste considerando dicha variable. Así mismo, se determinó que para evaluar la hora de apertura floral se analizarían las aperturas según la hora y especie en un análisis de varianza (ANOVA) y un modelo lineal generalizado (GLM) para evaluar los niveles de la hora y especie. En la sección de análisis de datos se profundizan los análisis estadísticos desarrollados.

2.3.2. Periodo de receptividad polen-estigma y experimentos de cruce en *V. planifolia*

Con la finalidad de conocer la receptividad polen-estigma y el sistema de cruce en el proceso de fructificación de *V. planifolia*, en abril de 2015 se seleccionaron aleatoriamente 288 botones en preantesis. Dichos botones se polinizaron manual en un horario de las 17:00 a 15:00 en 11 intervalos de dos horas (Apéndice, A.1). Las flores se marcaron con etiquetas de aluminio y se embolsaron con tul para evitar el contacto con polinizadores naturales, además de la aplicación de insecticida (Tangle-foot [®]) en el raquis de la inflorescencia para asegurar que ningún insecto visitara la flor. Sobre estos botones se realizaron los experimentos de cruce, en los cuales se polinizó manualmente estructuras en preantesis, antesis y postantesis de manera autogámica y exogámica. Las polinizaciones autogámicas se realizó de acuerdo con la técnica de polinización de la región del Totonacapan, en donde se depositan los granos polen en el estigma de la misma flor, $n = 144$. Respecto a las polinizaciones xenogámicas se utilizó el polen proveniente de otro sitio para asegurar que la procedencia de polen fuese de individuos genéticamente diferentes, $n = 144$ para flores y cargas de polen. Como los granos de

¹Información sobre el software consultar <https://www.onsetcomp.com/products/software/hoboware>

2. MÉTODO

polen de *V. planifolia* son viables antes de la apertura floral y mantienen su viabilidad por 48 horas a 4°C (Shadakshary *et al.*, 2003; Bello-Bello, García-García y Iglesias-Andreu, 2015), el polen se recogió a las 17:00, 24 horas antes de usarlos. Las anteras fueron colectadas a partir de flores en preantesis e individualmente se transportaron en tubos Eppendorf ® a 4°C. Esta metodología se desarrolló debido a que dentro de los vainillales se realiza intensa práctica de propagación vegetativa que dificulta diferenciar a los individuos genéticamente (Soto-Arenas 1999).

En el experimento, anteriormente mencionado, se evaluó el periodo de receptividad polen-estigma mediante la frecuencia de frutos retenidos al tercer día según la hora de polinización y el sistema de cruce. Se utilizó la frecuencia de los frutos retenidos al tercer día, debido a que los productores de la región totonaca consideran que posterior dicha fecha se puede determinar si la polinización fue efectiva o no (Juan Pérez Atzin, com. pers.). Además, a partir de este experimento se analizó el efecto en la retención de frutos del sistema de cruce empleado, autogámico y xenogámico, durante el periodo de desarrollo en los frutos. La retención de frutos se registró de manera binomial como en desarrollo (1) y abortado (0) a los 3, 97, 192 y 244 días posteriores de la polinización. Las fechas de observación se establecieron según la disponibilidad de tiempo y recursos que se tenían.

Cabe mencionar que en la última fecha de observación, a los 244 días, los frutos se cosecharon y evaluaron según su volumen, longitud y masa (mm³, mm, gr) respecto a los sistemas de cruce utilizados. El volumen se calculó a partir de la fórmula 2.4, en la que se consideró la longitud (a) y el grosor de los frutos (diámetros b y c) mostrados en la Figura 2.3. Cabe mencionar que los días de monitoreo

$$\text{Volumen del fruto} = \frac{4\pi}{3} \cdot abc \quad (2.4)$$

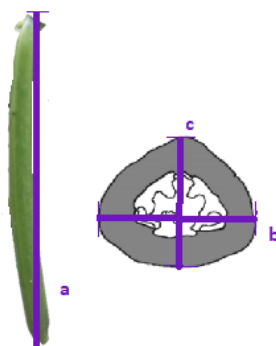


Figura 2.3: Variables medidas en los frutos cosechados de *V. planifolia*: a) largo y b) y c), dos diámetros de ancho de los frutos.

2.3.3. Sistemas de apareamiento

Los sistemas de apareamiento fueron evaluados con el índice de cruza de Cruden (Dafni, 1992), la proporción polen-óvulos y la tasa de autoincompatibilidad en *V. planifolia*, los cuales se describen a continuación.

Índice de cruza de Cruden. El índice de cruza (descrito por Cruden y retomado por Dafni, OIC por sus siglas en inglés) considera las siguientes características florales, Tabla 2.1.

1. **Diámetro de la flor.** Cruden definió cuatro categorías, cuyos valores están entre 1 mm y 6 mm (Tabla 2.1). En este trabajo se utilizó el promedio de la apertura floral de *V. planifolia* ($n = 37$) y *V. pompona* ($n = 38$). En ambos casos se utilizó diámetro promedio de las flores a las 9:00 horas; debido a que en este periodo se observó más frecuentemente la apertura máxima en el comportamiento floral explorado anteriormente (Figura 2.2; B).
2. **Separación temporal de las funciones sexuales.** La separación temporal de las funciones sexuales se refiere a la maduración de las estructuras reproductivas en diferentes periodos; dicha separación limita un sistema de cruza autogámico. Cruden diferenció en este análisis la protandria de la protoginia y homogamia. Para definir dicha separación, en este trabajo se utilizaron los resultados del experimento de receptividad polen-estigma en *V. planifolia*.
3. **Separación espacial de los órganos sexuales.** Se analizó la anatomía floral de *V. planifolia* y *V. pompona* con la finalidad de inferir un sistema de cruza. Cabe aclarar que la separación espacial de los órganos sexuales se relaciona con un sistema de cruza xenogámico debido a que reduce el flujo de los granos de polen; de lo contrario cuando las estructuras se encuentran cerca entre sí (Tremblay *et al.*, 2005).

Tabla 2.1: Parámetros del Índice de Cruza, OIC

Característica	Categoría	Valores
Diámetro de la flor	< 1 mm	0
	1-2 mm	1
	2-6 mm	2
	> 6 mm	3
Separación temporal en las funciones sexuales	Homogamia/Protoginia	0
	Protandria	1
Separación espacial de los órganos sexuales	Limitada o nula	0
	Hercogamia o Diocismo	1

$$OIC = \text{Diámetro floral} + \text{Separación temporal} + \text{Separación espacial} \quad (2.5)$$

2. MÉTODO

Las características mencionadas se evaluaron según la Tabla 2.1; se sumaron, fórmula 2.5, y se compararon los resultados con los valores de referencia definidos por Cruden (Tabla 2.2; 1977).

Tabla 2.2: Valores de referencia del OIC con los sistemas de apareamiento según Cruden (1977).

OIC	Sistemas de apareamiento
0	Cleistogamia
1	Autogamia obligada
2	Autogamia facultativa
3	Xenogamia facultativa
4	Xenogamia

Índice Polen-Óvulos. El índice polen-óvulos (P/O) se calculó para conocer el sistema de cruce en función de la producción proporcional entre dichas células sexuales (Cruden, 1977). Para lo cual, primero se realizaron estimaciones de producción de gametos y posteriormente, se calculó éste índice mediante el cociente entre las estimaciones obtenidas (fórmula 2.6).

$$P/O = \frac{\text{granos de polen}}{\text{óvulos}} \quad (2.6)$$

Las estimaciones realizadas de los gametos masculinos y femeninos se realizaron respecto a 14 flores de *V. planifolia* y *V. pompona*. Las flores fueron colectadas aleatoriamente y conservadas en FAA (formol, ácido acético, etanol y agua, 2:1:10:7); posteriormente fueron transportadas y procesadas en el laboratorio (Velázquez y Fonseca, 2009).

El conteo de polen se realizó a partir de las anteras, se diseccionaron y colocó cada una en un tubo Eppendorf ®. A cada recipiente se añadió agua destilada, 1 ml de agua en *V. planifolia* y 2 ml para *V. pompona*. A cada tubo se le adicionó un grano de jabón en polvo (Roma ®) para separar los granos de polen aglutinados debido a algunos azúcares (López, Márquez y Murguía, 2005). Posteriormente se agitó vigorosamente los tubos hasta obtener solución homogéneas, de las cuales se extrajeron 15 muestras de 12 μ l. Los conteos se realizaron con una cámara de Neubauer (Laboroptik ®) y con la ayuda de un microscopio óptico (Zeiss ®) se contabilizó los granos de polen. Respecto al conteo de óvulos, se diseccionaron longitudinalmente los 28 ovarios, 14 por especie. Con ayuda de un microscopio estereoscópico se contabilizaron dichas células en secciones de 1 cm^2 .

$$\text{Granos de polen producidos} = \left(\frac{\text{Conteo de granos}}{12 \mu\text{l}} \right) \left(\frac{\text{Volumen de muestra}}{1000 \mu\text{l}} \right) \quad (2.7)$$

$$\text{Granos de óvulos producidos} = \left(\frac{\text{Conteo de óvulos}}{\text{Superficie del corte}} \right) (\text{Superficie de la cámara ovárica}) \quad (2.8)$$

Posterior a los conteos de polen y óvulos, se realizó la estimación de la producción de gametos; para lo cual se definieron reglas de proporciones, considerando el número de células contabilizadas y el volumen conocido de la muestra (López *et al.*, 2005). Los granos de polen fueron estimados a partir de la fórmula 2.7 mientras que los óvulos se calcularon con la fórmula 2.8. Para el cálculo del índice P/O se utilizó el promedio de las estimaciones; cuando el índice P/O es cercano a cero se relaciona con un sistema de cruce autogámico mientras que cuando los valores son altos se relacionan con procesos xenogámicos (Tabla 2.3; Dafni, 1992).

Tabla 2.3: Valores de la proporción polen-óvulo respecto a los sistemas de cruce, según Dafni (1992).

Sistema de cruce	Rangos de Polen/Óvulos
Cleistogamia	2.7-5.4
Autogamia Obligada	18.1-39
Autogamia Facultativa	31.9-396
Xenogamia Facultativa	244.7-2588
Xenogamia Obligada	2108-195 525

Tasa de autoincompatibilidad en *V. planifolia*. La tasa de autoincompatibilidad (ISI) se calculó a partir de los datos obtenidos de los experimentos de cruce al momento de la cosecha, 244 días posteriores a las polinizaciones en *V. planifolia* (apéndice A.1). Para estimar la ISI se dividió la producción de frutos de origen autogámico entre la del xenogámico (*fruit set*; fórmula 2.9). Éste índice se relacionó con los valores de la Tabla 2.4 definidas por Dafni (1992).

Tabla 2.4: Valores de la tasa de autoincompatibilidad asociados a los sistemas de apareamiento, propuesto por Dafni (1992).

ISI	Posibilidades de apareamiento
0	Completamente auto-incompatible
<0.2	Generalmente auto-incompatible
>0.2 <1	Parcialmente auto-incompatible
1	Autoincompatibilidad

$$ISI = \frac{\frac{\text{Frutos autogámicos colectados}}{\text{Polinizaciones autogámicas realizadas}}}{\frac{\text{Frutos xenogámicos colectados}}{\text{Polinizaciones xenogámicas realizadas}}} \quad (2.9)$$

2.3.4. Análisis de datos

Comportamiento floral

El proceso de apertura floral se analizó con base en las áreas longitudinal y apical (Figura 2.2), se determinó el momento de despliegue floral en que inicio la apertura de los botones tanto apical como longitudinal. Los sistemas reproductivos en las angiospermas son sensibles a cambios ambientales, por lo cual se realizaron pruebas estadísticas en las que se relacionaron la apertura floral con variables ambientales (humedad, temperatura, punto de rocío) y la especie, con la finalidad de describir el comportamiento floral. A continuación se explican las pruebas aplicadas.

Inicio de apertura. Para conocer la hora de inicio de apertura floral que favorezca una polinización, en ambas especies se midió la superficie longitudinal y apical considerando la exposición de la columna floral. Con el programa ImageJ [®] se realizaron las mediciones sobre el registro fotográfico, a partir del cual se obtuvieron los referentes de aperturas longitudinales y apicales, en ambas especies (Tabla 2.5). El análisis anterior fue preciso desarrollarlo, debido a que se observó áreas reducidas que no favorecían el flujo polínico, como se muestra en la Figura 2.4. Con el análisis anterior, se determinaron las áreas consideradas como aperturas en ambas especies (Tabla 2.5); con dichos referentes se realizaron Tablas de frecuencias de los botones cerrados (0) o abiertos (1) durante las 22 horas. Con un análisis de varianza, ANOVA, se evaluó la separación de los sépalos respecto a la hora, además con un modelo lineal generalizado (GLM) se analizó los niveles de la variable hora y especie, para conocer la probabilidad de apertura. Este análisis se desarrolló con una distribución binomial y una función de enlace logit (Crawley, 2005).



Figura 2.4: Los botones cerrados registran una separación entre los sépalos aún se observa un bloqueo de la columna floral, limitando el flujo de los granos de polen.

Tabla 2.5: Áreas de referencia consideradas para considerar el cierre (0) y apertura (1) floral en *V. planifolia* y *V. pompona*.

Criterio de apertura floral	VARIABLES
Longitudinal, <i>V. planifolia</i>	Apertura > 158.9
Longitudinal <i>V. pompona</i>	Apertura > 91.11
Apical, <i>V. planifolia</i>	Apertura > 108.34
Apical <i>V. pompona</i>	Apertura > 139.96

Apertura longitudinal. El inicio de la apertura floral se analizó mediante la apertura longitudinal planteada. Se evaluó la relación del proceso de apertura longitudinal, transformada mediante la raíz cuadrada (y_i), con el tiempo (hora) y las variables ambientales (temperatura, humedad relativa y punto de rocío) como factores fijos; a su vez, se consideró con la respuesta de cada individuo con un efecto aleatorio. El análisis se desarrolló por medio de modelos lineales mixtos con efecto aleatorio (LMM). Para este trabajo se seleccionaron con ANOVA los modelos más significativos.

Los LMM son pruebas que permiten utilizar a distribuciones distintas a la gaussiana. Ésta fue la razón por la cual la apertura apical se analizó mediante modelo aditivo mixto generalizado (GAMM).

Apertura Apical. El comportamiento de la apertura floral se analizó a partir de la separación apical de los sépalos mediante un modelo aditivo mixto generalizado (GAMM), el cual utiliza una distribución gamma con una función de enlace logit. En este análisis se transformó la apertura apical, variable de respuesta, con $\log(y_i)$ y se analizó respecto a la especie y el efecto de la hora con el punto de rocío (con una categorización de cuatro niveles para el ajuste, $k = c(4,4)$); además se incluyó el efecto de cada individuo de manera aleatoria. Los análisis de la apertura floral, longitudinal y apical, se seleccionaron conforme al menor AIC y la dispersión de los datos (apéndice, Tabla A.2, A.4).

Periodo de receptividad polen-estigma en *V. planifolia*

Con la finalidad de evaluar la receptividad entre las estructuras reproductivas de *V. planifolia* se analizó la frecuencias de los ovarios retenidos al tercer día. Se realizó un GLM de distribución binomial con una función de enlace logit, en el cual se evaluó la presencia(1) o ausencia(0) de los frutos observados respecto al sistema de cruce empleado, autogámico o xenogámico, y de la hora de polinización; las variables explicativas fueron definidas como nominal y ordinal respectivamente.

Sistemas de cruce en *V. planifolia*

2. MÉTODO

Para conocer el efecto del sistema de cruce empleado (xenogámico o autogámico) en el proceso de fructificación, se evaluó la presencia de frutos en distintas fechas a lo largo del desarrollo: 3, 97, 192 y 244 días posterior a su polinización. La presencia (1) y ausencia (0) de los frutos fue analizada con GLM, de distribución binomial y una función de enlace logit. En éste análisis el sistema de cruce autogámico y xenogámico fue un factor nominal, mientras que el tiempo fue considerado como un factor de tipo ordinal.

Calidad comercial de los frutos en *V. planifolia*

Las diferencias entre los sistemas de cruce empleados en *V. planifolia* fueron evaluados a partir de la presencia de frutos a lo largo de su desarrollo, así como las diferencias entre éstos. Las diferencias fueron analizadas con una prueba estadística de T Student considerando la longitud (mm), volumen (mm³) y masa (gr) en función de los sistemas de cruce empleados, autogámico o xenogámico.

Sistemas de apareamiento

Los sistemas de apareamiento en *V. planifolia* y *V. pompona* se estudiaron mediante el índice de cruce de cruden (OIC), la proporción de polen-óvulos presente en las flores y el índice de autoincompatibilidad (ISI).

Número de granos de polen u óvulos por especie. Para determinar el índice polen-óvulos se analizó si las flores recolectadas producían la misma cantidad de polen y óvulos, esperando calcular un promedio. Se desarrollaron análisis de varianza en los que se evaluaron células sexuales para cada una de las especies. Posteriormente se realizaron pruebas de Tuckey a los análisis anteriores. Además, se realizó una prueba de varianzas, de arreglo anidado; en esta prueba se evaluó el efecto de la especie, como factor fijo, en la producción de los gametos al anidar la flor en la especie.

3.1. Comportamiento floral

3.1.1. Inicio de apertura

Apertura longitudinal Los modelos seleccionados nos indicaron que sí hay una relación entre la apertura observada con el tiempo transcurrido y la especie involucrada. La apertura floral comienza por la separación longitudinal de los sépalos, a las 19:00 horas en *V. pompona* y las 23:00 en *V. planifolia* (Tabla 3.1); lo anterior se consideró cuando la probabilidad de apertura fue de 0.1 para ambas especies (Figura 3.1, apéndice, Tabla A.3).

El modelo con que se comparó de apertura longitudinal entre ambas especies presentó una relación entre la separación longitudinal de los sépalos con las variables ambientales. Se observó que sí existe una diferencias entre las especies, además de que hay una relación positiva con la hora y la temperatura mientras que la relación es negativa respecto la humedad. El modelo presentó coeficiente de determinación de 0.797 mientras que al considerar el efecto aleatorio de los individuos dentro del modelo, el coeficiente de determinación fue de 0.834 (Tabla 3.2). En éste análisis se observó una diferencia entre la apertura longitudinal entre las especies, por lo que se decidió hacer un LMM por cada especie.

El modelo LMM en *V. planifolia* se observó que la apertura se relaciona de manera positiva respecto al tiempo y la humedad (Tabla 3.3); respecto a la humedad, esta variable se incrementó, con oscilaciones, durante las observaciones de apertura longitudinal (Tabla 3.2). El modelo anteriormente explica con un coeficiente de determinación de 0.85 de la variación con los efectos fijos, y de 0.87 considerando el efecto aleatorio de los individuos.

3. RESULTADOS

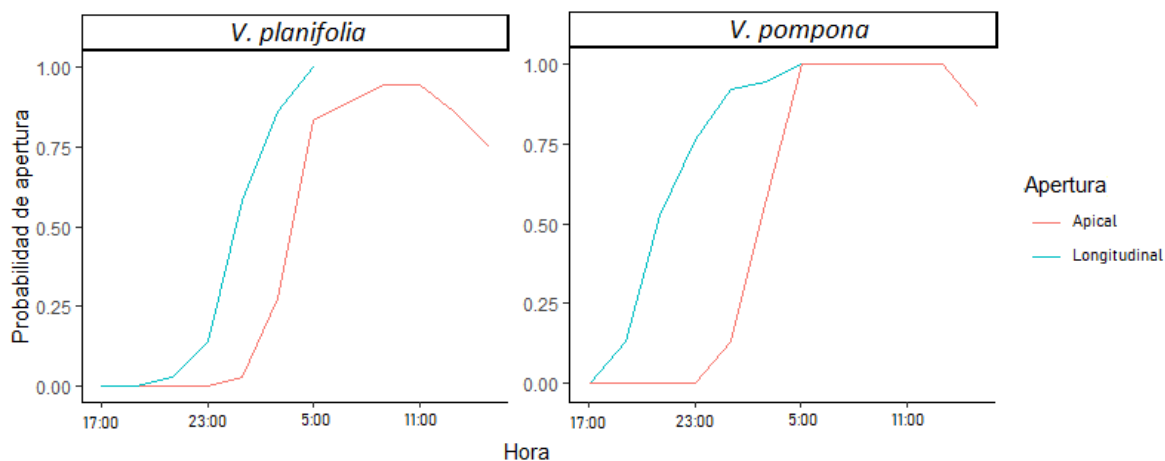


Figura 3.1: Se muestran las probabilidades de apertura longitudinal y apical obtenidas a partir de los análisis de GLM en *V. planifolia* y *V. pompona*.

En *V. pompona*, la separación longitudinal de los sépalos se relacionó respecto a la hora, el punto de rocío, así como por la interacción de estas variables (Tabla 3.4). El punto de rocío presenta una relación negativa con la apertura floral evaluada, es decir que mientras menor sea el punto de rocío mayor será la apertura floral. La hora presentó una relación negativa debido a la distribución logarítmica del ciclo de apertura floral. El incremento de la apertura longitudinal se observa desde las 23 horas, sin embargo la probabilidad de apertura longitudinal aumenta entre las 1:00 a las 5:00-7:00 horas (Figura 3.1). La interacción entre la hora y el punto de rocío indicó un incremento en la apertura, el coeficiente de determinación fue de 0.69 con los datos evaluados por las variables fijas y de un 0.88 considerando el efecto aleatorio de los individuos.

Cabe aclarar que la relación entre las variables ambientales y la apertura floral en los modelos lineales de *V. planifolia* y *V. pompona* son opuestas entre sí, debido a que el punto de rocío decrece mientras que la humedad incrementa a lo largo del día, como se muestra en la Figura 3.2. Lo anterior indica que las variables ambientales consideradas, en su conjunto, están muy relacionadas con la apertura floral; ya que el efecto de las variables ambientales, en su conjunto, podrían tener un efecto de algún detonante ambiental en la apertura floral. Lo anterior se observó en los LMM considerando ambas especies (Tabla 3.2), en los cuales se observó el modelo con mayor influencia en el proceso de apertura, indicando el efecto positivo de la temperatura y negativo de la humedad (estimados: 0.024 y -21.332).

Tabla 3.1: Análisis de Varianza y GLM, diferencias en la apertura floral longitudinal en las horas evaluadas.

ANOVA: Especie + Hora	Varianza	F	Pr(<F)
Especie	30.05	30.053	$4.203e - 8^{***}$
Hora	406.15	67.692	$<2.2e - 16^{***}$
GLM: Especie + Hora			
Variabes	Estimados	Intervalo de confianza	
<i>V. planifolia</i>	0.2206	-0.38	0.85
<i>V. pompona</i>	2.6818*	1.98	3.47
Hora 17	-26.05	-3518.52	378.88
Hora 19	-4.8704*	-6.21	-3.71
Hora 21	-2.9287*	-3.94	-2.02
Hora 23	-1.8556*	-2.77	-1.01
Hora 01	0.2206	-0.38	0.85
Hora 03	1.303	0.33	2.37
Hora 05	22.9216	-433.04	3356.33

AIC: 50.72.* **significativo < 0.05****Tabla 3.2:** Análisis LMM, comportamiento de la apertura longitudinal en ambas especies.

LMM: Hora*Especie+Temperatura*Especie+Humedad*Especie+(1 Muestra)			
Variabes	Estimados	Intervalo de confianza	
Efecto fijo			
Hora	2.924	2.74	3.11
Especie:Vpompona	0.61	-129.48	86.81
Temperatura	0.024	-0.16	1.38
Humedad	-21.332	-0.66	0.71
Hora:Especie	-2.285	-3.22	-1.35
Temperatura:Especie	-1.14	-2.98	0.70
Humedad:Especie	0.581	-0.23	1.40
Efecto aleatorio			
Individuos	-16.71569	-98.96	65.527
AIC:2559.10; loglike:-1269.60; R²m:0.797; R²c:0.834			

3. RESULTADOS

Tabla 3.3: Análisis LMM, comportamiento de la apertura longitudinal en *V. planifolia*.

LMM: Hora * Humedad + (1 Muestra)			
Variables	Estimados	Intervalo de confianza	
Efecto fijo			
Hora	4299.8	2050.974	6548.769
Humedad	42.12	19.874	64.361
Hora:Humedad	-42.97	-65.455	-20.48
Efecto aleatorio			
Individuos	-4213.76	-6438.873	-1988.627
AIC:1376.20; loglike:-682.08; R²m:0.856; R²c:0.87			

Tabla 3.4: Análisis LMM, comportamiento de la apertura longitudinal en *V. pompona*.

LMM: Hora * Pr + (1 Muestra)			
Variables	Estimados	Intervalo de confianza	
Efecto fijo			
Hora	-28.003	-36.743	-19.262
Punto de Rocío	-1.59	-2.998	-0.181
Hora:Punto de Rocío	1.624	1.162	2.086
Efecto aleatorio			
Individuos	29.302	0.831	57.773
AIC:1068.80; loglike:-528.38; R²m:0.695; R²c:0.886			

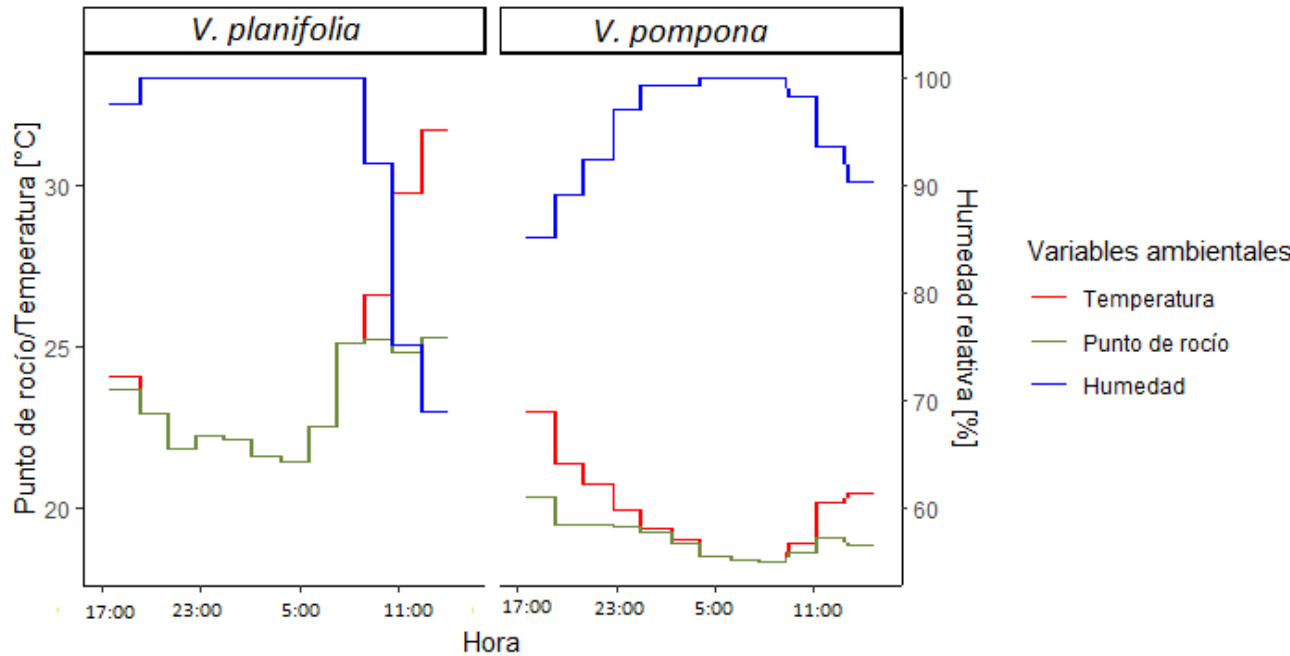


Figura 3.2: Las variables ambientales de los sitios de estudio se describe a partir de la temperatura, punto de rocío y humedad, 20 soles para *V. planifolia* y el rancho Larios para *V. pompona*. Cuando la humedad decrece, el punto de rocío se aleja de la temperatura, lo que indica que el agua en forma de vapor deja de estar disponible para las plantas.

Apertura Apical La apertura apical inició en la madrugada en ambas especies; el modelo lineal generalizado, GLM, mostró diferencias significativas por lo que se infirió que la hora en que inició el proceso de apertura floral fue a las 03:00. Cabe aclarar que la probabilidad de apertura observada a las 3:00 en *V. pompona* es mayor que en *V. planifolia* (Tabla 3.5; las probabilidades se muestran en el apéndice Tabla A.3).

3. RESULTADOS

Tabla 3.5: Análisis de Varianza y GLM, diferencias en la apertura apical en las horas evaluadas.

ANOVA: Especie + Hora		Varianza	F	Pr(<F)
Especie		6.82	6.81	0.009*
Hora		893.41	81.21	$<2.2e - 16^*$
GLM: Especie + Hora				
Variabes	Estimados	Intervalo de confianza		
<i>V. planifolia</i>	-3.5362	-4.63	-2.62	
<i>V. pompona</i>	1.6447*	1.03	2.32	
Hora 17	-20.6999	-2576.99	261.58	
Hora 19	-20.6999	-2576.99	261.58	
Hora 21	-20.6999	-2576.99	261.58	
Hora 23	-20.6999	-2576.99	261.58	
Hora 01	-3.5362	-4.63	-2.62	
Hora 03	2.3691*	1.43	3.45	
Hora 05	5.3882*	4.21	6.76	
Hora 07	5.8367*	4.56	7.36	
Hora 09	6.5715*	5.07	8.59	
Hora 11	6.5715*	5.07	8.59	
Hora 13	5.5922*	4.37	7.02	
Hora 15	4.3548*	3.32	5.54	
AIC:71.541.		* significativo < 0.05		



Figura 3.3: Se muestran la apertura apical observadas en *V. planifolia* y *V. pompona*.

Tabla 3.6: Análisis de GAMM, comportamiento de la apertura apical respecto a las condiciones ambientales y al a la especie.

ANOVA	g.l.	F	Pr(<F)
Especie	2	4773.00	< 2.2e-16*
t2(Hora, Pr)	estimado: 14.04	537.80	< 2.2e-16*
GAMM: Especie - 1 + t2(Hora, Pr, k = c(4, 4))			
Variables	Estimados	Desviación estándar	
Efecto fijo			
Especie(<i>V. planifolia</i>)	6.3		
Especie(<i>V. pompona</i>)	3.24		
Xt2 (hora, Pr)Fx1	1.1		
Xt2(Hora,Pr)Fx2	1.54		
Xt2(Hora,Pr)Fx3	-0.16		
Efecto aleatorio			
Muestra		0.45	
Xr.1: t2(Hora,Pr)		13.31	
Xr.0: t2(Hora,Pr)		13.51	
Xr: t2(Hora,Pr)		18.14	
REML: 980.2404; g.l. estimados: 16.04			
* significativo < 0.05			

La apertura apical en *V. planifolia* y *V. pompona* incrementó desde las 3:00 hasta lograr su apertura máxima (Figura 3.3). A las 9:00 horas se obtuvo el mayor promedio de apertura apical, $\bar{x} = 1199.04 \text{ mm}^2$ en *V. planifolia* y $\bar{x} = 1650.98 \text{ mm}^2$ para *V. pompona*. Para el medio día, la humedad decrece y la temperatura aumenta mientras que la apertura se reduce, a partir de ese momento las flores pierden turgencia y continúan cerrándose hasta las 15:00 horas (Figura 3.2). El análisis aditivo generalizado con efecto mixto (GAMM) indicó que la apertura floral presenta una relación con el punto de rocío, el tiempo y la expresión de cada uno de los individuos al medio ambiente, *V. planifolia* o *V. pompona* (Tabla 3.6). Sin embargo las condiciones ambientales

3. RESULTADOS

de los sitios evaluados difieren entre sí, esto se observa en el comportamiento del punto de rocío, ya que en el sitio de muestreo de *V. planifolia* tiene valores mayores a 20, mientras que en el sitio de *V. pompona* los valores son menores a 20. Las oscilaciones se pueden observar en la Figura 3.4, donde la apertura floral en *V. planifolia* está relacionada a valores altos del punto de rocío, mientras que en *V. pompona* los datos de apertura se relacionan a un punto de rocío bajo (Figura 3.2). No obstante en *V. pompona* se aprecia que la variación del punto de rocío también tiene un efecto negativo en la apertura; lo anterior también se observa en el análisis LMM de la apertura longitudinal, donde los estimados indican una relación negativa de esta variable (Tabla 3.4). El efecto ambivalente del punto del rocío en el análisis de GAMM se observa positivamente y negativamente en los tres segmentos definidos en el efecto fijo ($k = c(4, 4)$; Tabla 3.6); lo anterior es una respuesta de cada especie al punto de rocío, es decir que la apertura floral, de cada especie, está determinada por la humedad y temperatura. El efecto de la humedad en los análisis LMM de la apertura longitudinal en ambas especies se observa una relación negativa con la humedad, sin embargo en la interacción con la especie se observa una relación positiva debido al efecto que generó la variación entre las especies estudiadas.

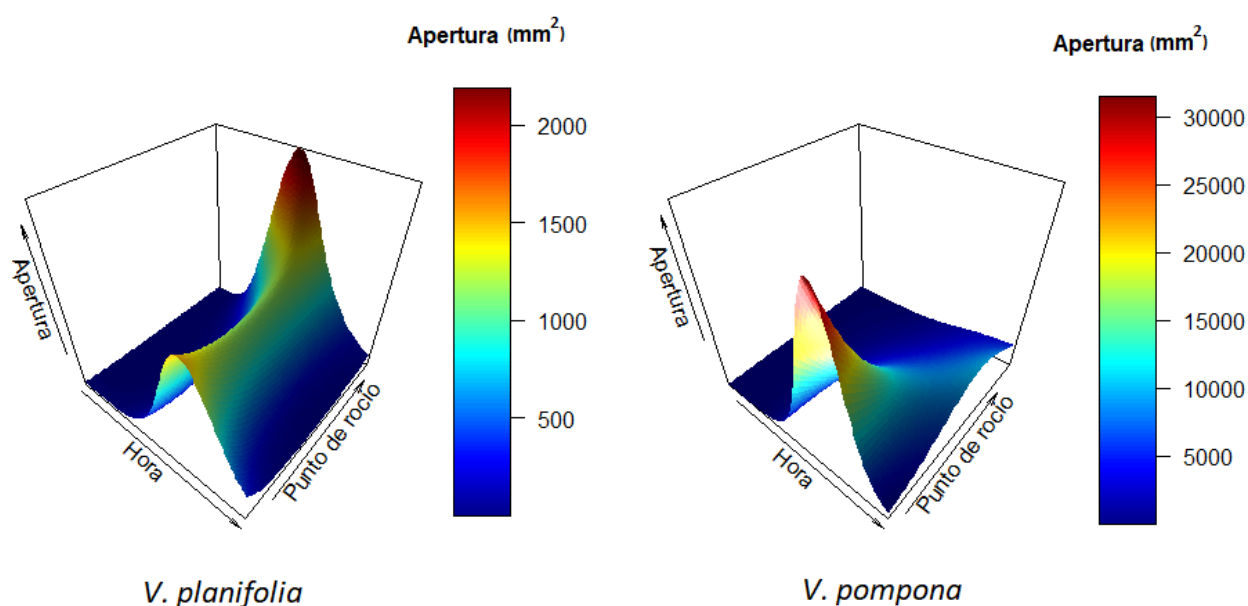


Figura 3.4: Apertura apical de las flores según la relación entre la apertura apical, el tiempo y el punto de rocío, evaluados a partir del análisis GAMM en *V. planifolia* y *V. pompona*.

3.2. Periodo de receptividad polen-estigma en *V. planifolia*

Al tercer día de las polinizaciones realizadas en *V. planifolia*, se observó que la retención de los frutos no presentó diferencias estadísticas respecto a la hora de polinización (GLM: $X^2= 12.761023$, g.l.=11, $P= 0.3092$). Esto significa que la receptividad polen-estigma no se encuentra restringida a un periodo determinado (Figura 3.5), ya que se obtuvieron frutos a partir de flores cerradas y abiertas. Respecto al análisis de la retención de frutos sí se observaron diferencias significativas respecto a del sistema de cruce empleado (GLM: $X^2= 16.664827$, g.l.=1, $P= 0.0001$); determinándose una mayor frecuencia de frutos iniciados en las polinizaciones xenogámicas ($\bar{x} = 10.66$) que en las autogámicas ($\bar{x} = 8.41$).

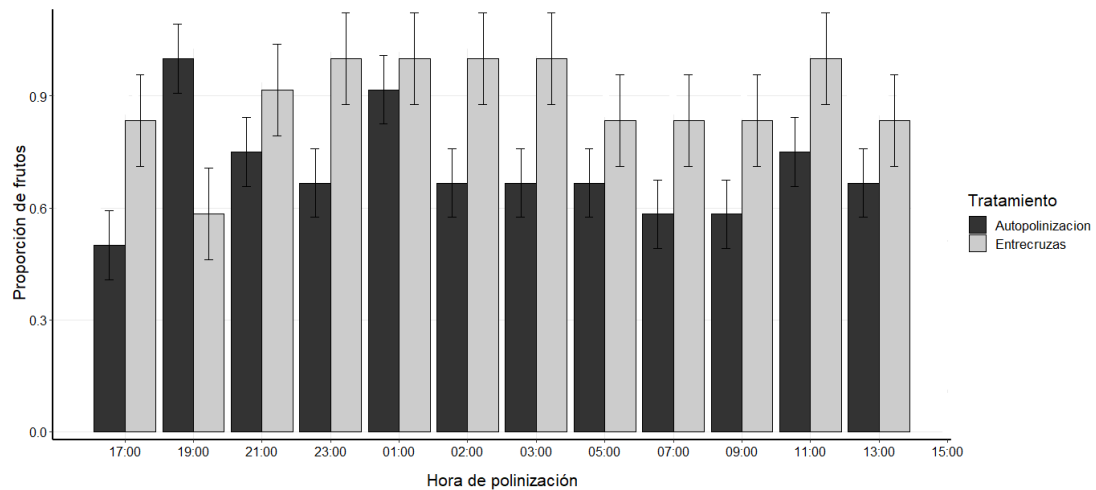


Figura 3.5: Receptividad polen-estigma en *V. planifolia*, al tercer día de la polinización según el horario de polinización manual y el sistema de cruce empleado. Las barras corresponden a los intervalos de confianza.

3.3. Sistema de cruce en *V. planifolia*

La retención de frutos observada a los 3, 97, 192 y 244 días mostró diferencias según el sistema de cruce empleado (GLM: $X^2= 256.00$; g.l.=3; $P < 0.0001$), el sistema de cruce xenogámico presentó una mayor retención de frutos ($\bar{x} = 0.42$) que el autogámico ($\bar{x} = 0.32$). Durante los 244 días de observación el sistema autogámico presentó una menor proporción de retención de frutos, al tercer día de las polinizaciones el sistema autogámico presentó 19 puntos porcentuales menos respecto al xenogámico; a los 97 días la diferencia porcentual fue de 3 puntos; a los 192 días se observa un 13%; mientras que a los 244 días la diferencia fue de 8 puntos porcentuales. La retención de los fru-

3. RESULTADOS

tos evidenció también diferencias respecto al tiempo transcurrido (GLM: $X^2= 8.4104$; g.l.=3; $P= 0.0382$); se observa que la cantidad de frutos retenidos disminuye mientras transcurre el tiempo, es decir dichas variables se relacionan de forma negativa (Figura 3.6). El modelo mostró una interacción significativa entre el tiempo y el sistema de cruce, lo cual sugiere que existe una interacción entre dichas variables sobre la pérdida de frutos en ambos sistemas de cruce (GLM: g.l.=1; $X^2= 21.0750$; $P= 0.0001$). Dicha interacción se observó a los 97 días, ya que la diferencia entre ambos sistemas de cruce disminuyó a 3%, Figura 3.6.

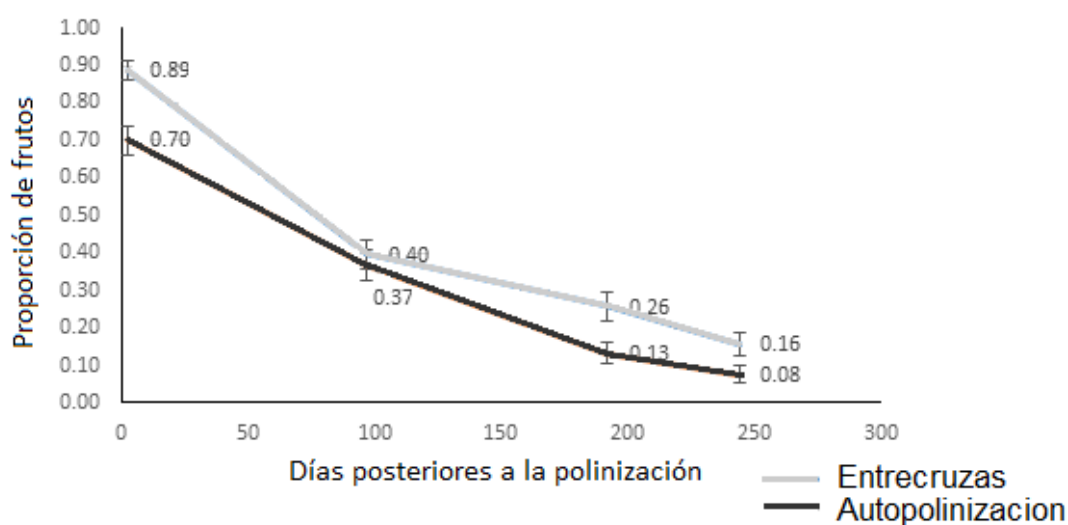


Figura 3.6: Proporción de frutos en *V. planifolia*. según los sistemas de cruce de acuerdo a los días posteriores a su polinización (3, 97, 192 y 244).

3.3.1. Calidad comercial de los frutos de *V. planifolia*

En los frutos cosechados a los 244 días no se observaron diferencias en la masa ($t= 0.922$, $P= 0.3651$) ni en el volumen ($t= 1.191661$, $P= 0.2437$) entre los sistemas de cruce empleados. Sin embargo, sí se identificaron diferencias marginales en la longitud de los frutos ($t= 2.014679$, $P= 0.0583$), Figura 3.7.

3.4. Sistema de apareamiento

La evaluación de los sistemas de apareamiento de *V. planifolia* y *V. pompona* se realizó a partir del índice de cruce de Cruden (OIC), la relación polen-óvulos (P/O) y la tasa de autoincompatibilidad (ISI).

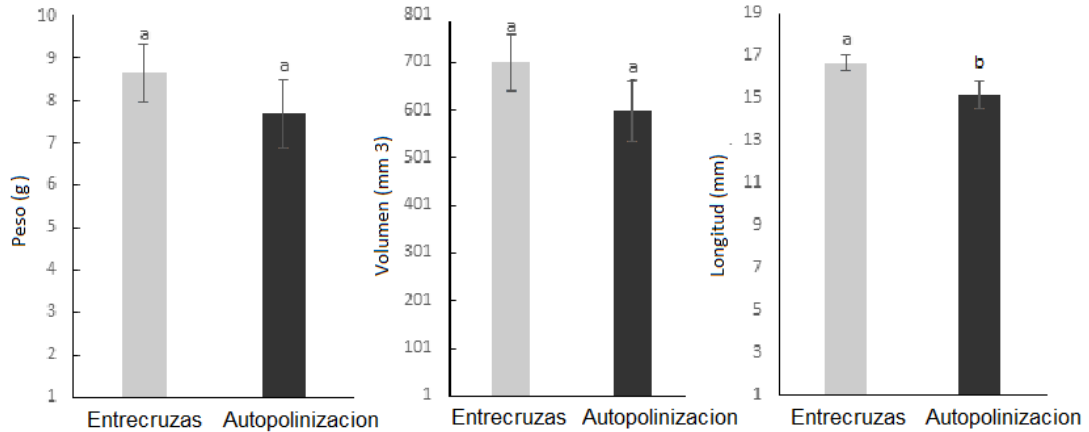


Figura 3.7: Características de los frutos cosechados, como son: valores promedio de la masa, volumen y longitud de los frutos cosechados de polinizaciones xenogámicas ($n = 19$) y autogámicas ($n = 14$). Las barras indica el error estándar.

3.4.1. Índice de Cruden (OIC)

El índice de Cruden de *V. planifolia* y *V. pompona* fue de cuatro, el cual se calculó a partir de la siguiente información:

Diámetro floral. De acuerdo con el análisis de apertura floral, la apertura floral máxima se observó con mayor frecuencia a las 9:00 h, con un promedio de 44.20 ± 16.33 mm para *V. planifolia* y de 46.52 ± 17.69 mm en *V. pompona*. Ambas especies presentan un diámetro mayor a 6 mm, por lo que se les asignó un valor de 3 en este análisis.

Separación temporal en las funciones sexuales. Con las polinizaciones realizadas por 24 horas se observó que no existe una restricción temporal en la receptividad polen-estigma en *V. planifolia*. Correspondiéndole un valor de cero dada la cercanía filogenética entre *V. planifolia* y *V. pompona* se supone que no presentan una separación de sus funciones sexuales.

Separación espacial de los órganos sexuales. En las disecciones realizadas para la extracción de material de polen y óvulos ($n = 14$), se observó en *V. planifolia* y *V. pompona* la presencia del rostelo. Dicha estructura genera una barrera hercogámica en las flores, por lo que se le asignó el valor de uno.

Al realizar la suma de todos los valores estimados, se determinó un OIC de cuatro. Este índice sugiere que el sistema de apareamiento de *V. planifolia* y *V. pompona* es de tipo xenogámico (Tabla 2.2).

3. RESULTADOS

3.4.2. Proporción polen/óvulos

Polen En las anteras evaluadas se observaron diferencias en la producción de granos de polen por individuo de *V. planifolia* (ANOVA; $F_{13;P} = 0.0041=2.4556$) y *V. pompona* (ANOVA; $F_{13;P}< 0.0001=5.0723$), lo anterior nos indica que no existe una producción homogénea de estas células. *V. planifolia* produce $\bar{x} \pm \sigma = 510\ 238 \pm 180\ 447$ granos de polen; mientras que en *V. pompona* se estimaron $\bar{x} \pm \sigma = 859\ 214 \pm 291\ 816$ granos (Figura 3.8). Las estimaciones de los granos de polen en ambas especies nos indicaron que la producción de granos de polen en *V. pompona* tuvo una variación significativa en la producción de granos de polen entre las flores evaluadas (ANOVA; $F_{1;P}= 0.0205=963.3$).

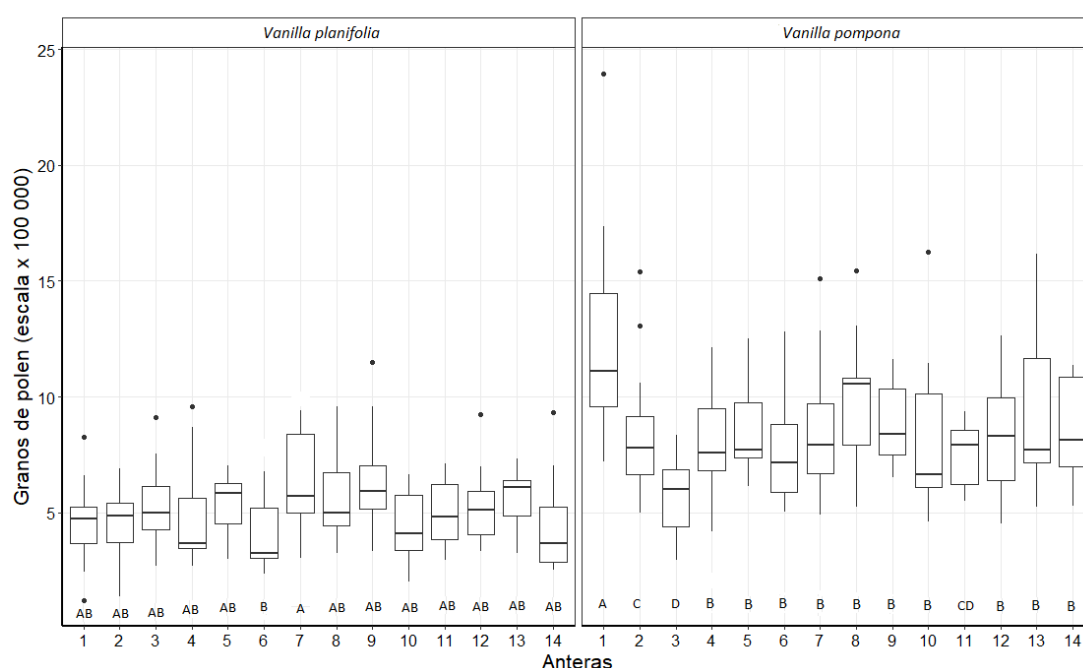


Figura 3.8: Estimación del polen producido en las flores seleccionadas. Sobre el eje se muestran los grupos obtenidos a partir de la prueba de Tukey; donde se calculó un promedio, con error estándar, *V. planifolia* $510\ 238 \pm 180\ 447$ granos de polen, mientras que *V. pompona* $859\ 214 \pm 291\ 816$ granos.

Durante los conteos se observó la presencia de polen germinado en las soluciones realizadas a partir de las anteras; sin embargo, estas células son una proporción mínima de los granos de polen estimados en las anteras: 0.71 % en *V. planifolia* y 4.11 % en *V. pompona*. Cabe mencionar que los granos de polen germinados se observaron en mayor cantidad en *V. pompona* (*V. planifolia* ANOVA; $F_{13;<0.0001}=7.2939$; ANOVA; *V. pompona*: $F_{13;<0.0001}=8.6635$; Figura 3.9 y 3.10).

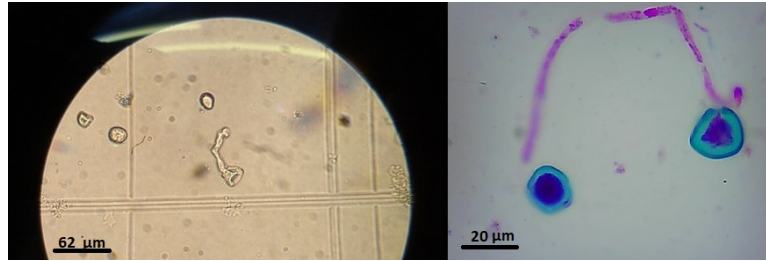


Figura 3.9: Germinación de los granos de *V. planifolia*, a la derecha se observa durante los conteos en la cámara de Neubauer mientras que en la izquierda se observa su viabilidad mediante la tinción de Alexander (López, *et al.*, 2005).

Óvulos Al realizar la disección de los ovarios no se logró diferenciar los óvulos contenidos en el interior de las cámaras ováricas. Con la finalidad de observar a detalle el interior de las cámaras ováricas y contabilizar dichas células se visualizaron fragmentos de ovario de *V. planifolia* y *V. pompona* al microscopio electrónico de barrido (MEB). No obstante, en ambas especies no se observaron óvulos en las cámaras ováricas durante la apertura floral. Las células sexuales observadas en su lugar se encontraban en un estado indiferenciado conocido como folículo. Dichos folículos se agregaban formando una placentación parietal, mostrada en la Figura 3.11.

La proporción de granos de polen respecto a los óvulos de *V. planifolia* y *V. pompona* no se logró obtener. Lo anterior se debe a la poca homogeneidad en la producción de los granos de polen en la muestra de flores colectadas en *V. planifolia* (ANOVA; $F_{13;0.0041}=2.4556$) y *V. pompona* (ANOVA; $F_{13;0.0001}=5.0723$), además de que no se logró contabilizar los óvulos de ambas especies.

3.4.3. Tasa de autoincompatibilidad (ISI) en *V. planifolia*

La tasa de autoincompatibilidad es de 0.5 en *V. planifolia*, valor que se interpreta como parcialmente auto-incompatible respecto a la Tabla 2.4. Esto quiere decir que la producción de los frutos puede ser exitosa tanto por una cruce xenogámica o autogámica.

3. RESULTADOS

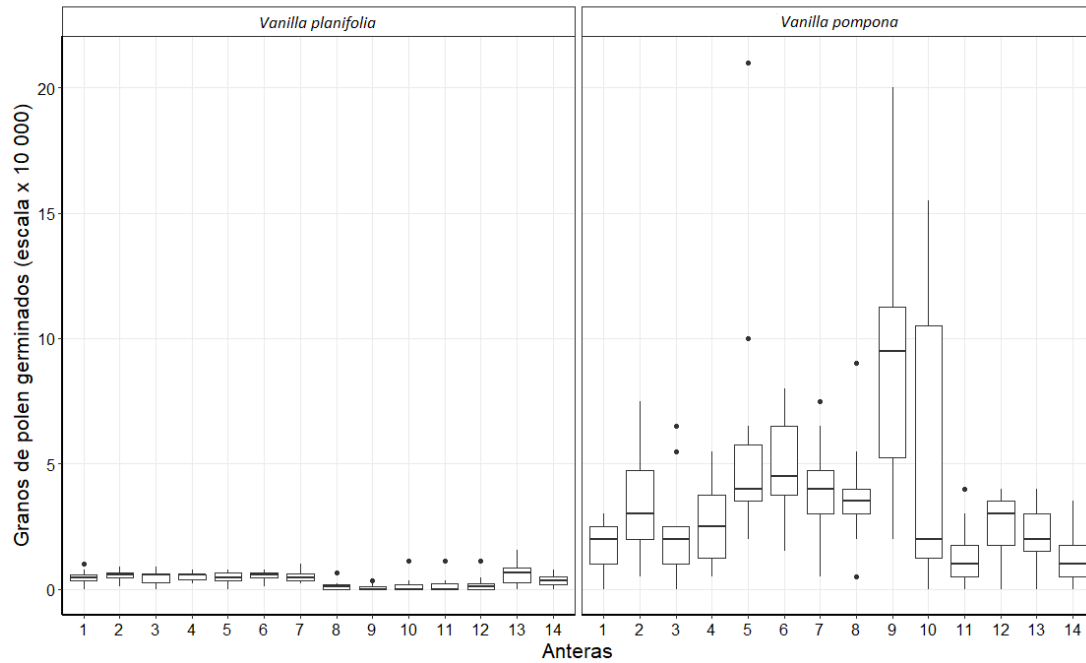


Figura 3.10: Estimaciones de granos de polen germinados en las anteras de *V. planifolia* y *V. pompona*.

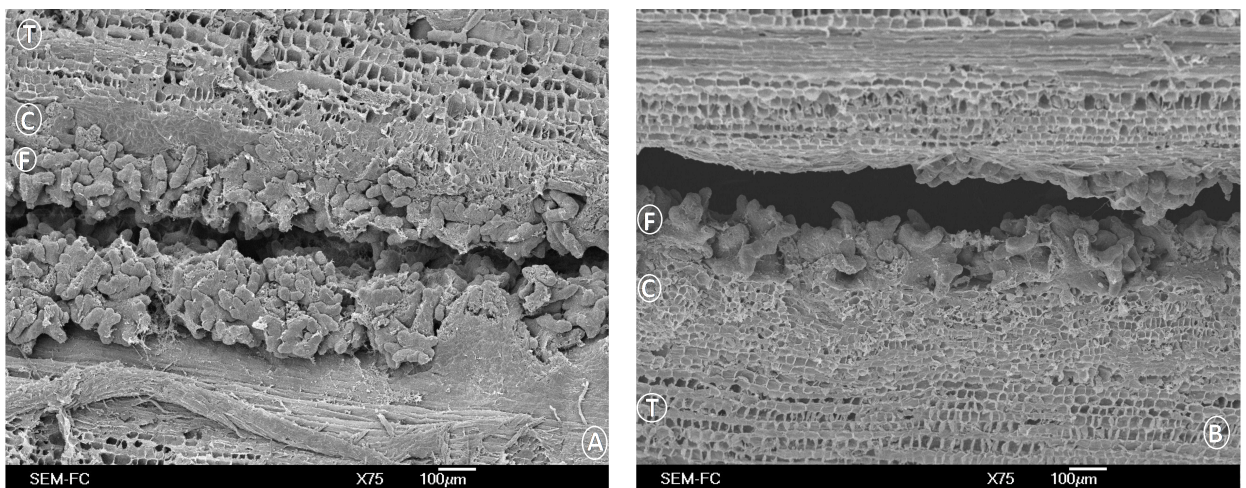


Figura 3.11: Cámara ovárica de flores en antesis de *V. planifolia* (A) y *V. pompona* (B) presenta un apilamiento de los folículos (F), los cuales al madurarse darán lugar a los óvulos. En las imágenes se indican los folículos (F), el tegumento interno (C) y el tegumento externo (T) del ovario.

Capítulo 4

Discusión

En *V. planifolia* y *V. pompona* el flujo de los granos de polen depende de la apertura floral y de agentes de polinización externos a la especie, debido a que la presencia del rostelo.

Comportamiento floral *V. planifolia* se ha adaptado a diferentes condiciones ambientales (Tabla 4.1); sin embargo, no se ha descrito a detalle la apertura floral en el lugar de origen de la especie (Sultan, 1987). El estudio de la apertura floral en *V. planifolia* y *V. pompona*, así como la maduración de sus estructuras reproductivas en su sitio de origen y diversificación es de gran relevancia puesto que sugiere el flujo de los granos de polen realizado por los polinizadores y su relación con las estrategias adaptativas de los sistemas reproductivos (Van der Pijil y Faegri, 1979; Shivanna y Tandon, 2014).

Las flores evaluadas de *V. planifolia* y *V. pompona* presentaron una longevidad de un día: abren en la madrugada, mientras que por la tarde los sépalos pierden turgencia y se cierran. Lo anterior sugiere considerar una polinización nocturna para ambas especies (Apéndice Tabla A.3). En la familia Orchidaceae se ha reportado anteriormente una especie con apertura floral nocturna, *Bulbophyllum nocturnum* J.J.Verm., de Vogel, Schuit. y A.Vogel, cuyas flores presentan una longevidad de un día, con una apertura floral de 22:00 a 10:00 (Schuiteman *et al.*, 2011). Esta especie se ha asociado a una polinización por engaño, debido a que no presenta recompensas (Schuiteman *et al.*, 2011). La polinización natural de *V. planifolia* la realiza *Euglossa viridissima* mientras que para *V. pompona* se han descrito *Eulaema* sp. y *Euglossa* sp., las tres especies presentan hábitos de vida diurnos (Lubinsky *et al.*, 2010; Hernández Hernández, 2010). Sin embargo, a partir de este trabajo se plantea una apertura floral en la madrugada, la cual corresponde a un periodo fuera del forrajeo de los polinizadores mencionados. El periodo de polinización nocturna en *V. planifolia* podría comenzar desde la 1:00, y en *V. pompona* a partir de las 23:00 (Figura 3.1). Lo anterior coincide con el síndrome de polinización conocido como falenofilia, en el cual se describen flores penduladas de colores pálidos, una corola tubular y la presencia de atrayentes florales (Schemske, 1980; Shivanna y Tandon, 2014); además la fanelofilia se ha descrito en *Brassavola nodosa*, una orquídea ubicada en la península de Yucatán (Van der Pijil y Faegri, 1979).

4. DISCUSIÓN

Tabla 4.1: Periodos de floración de *V. planifolia* en diferentes sitios de cultivo (Fouché y Jouve, 1999).

Lugar	Periodo de floración
Antillas Francesas	Febrero-marzo
Comoras	Octubre-diciembre
Indonesia	Junio-septiembre
Madagascar	Noviembre-enero
Puerto Rico	Enero-abril
Islas Reunión	Octubre-noviembre
Tahití	Octubre-enero
México	Abril-mayo

Cabe aclarar que se trabajó con una muestra reducida, desde el punto de vista genético y ecológico. En los escenarios evaluados, y a partir de los modelos estadísticos realizados, no se consideró el efectos de la heterocigosidad de las poblaciones seleccionadas. La heterocigosidad es la medida para comparara la variación genética entre diferentes poblaciones (Allendorf y Luikart, 2006), lo anterior puede repercutir al considerar la muestra de este trabajo como representativa o no.

El efecto de la humedad y el punto de rocío con la apertura longitudinal, para *V. planifolia* y *V. pompona* respectivamente, mientras que el punto de rocío se asoció con la apertura apical. El punto de rocío es una variable compuesta por la temperatura y humedad, por lo que su comportamiento dependerá del efecto de la temperatura y la humedad. Cabe aclarar, que el punto de rocío es un variable indirecta; su interpretación está relacionada a los valores de la temperatura, no obstante se utilizó en los modelos por contener el efecto de la temperatura y humedad en un solo valor. No obstante relación entre las variables ambientales y el despliegue floral fue alta, según el coeficiente de determinación de los modelos lineales mixtos; los cuales, tuvieron un coeficiente de determinación de 0.79 (Tabla 3.2). Respecto a lo anterior, se espera que la apertura floral esté relacionada con algún detonante ambiental, como podría ser las oscilaciones ambientales descritas en este trabajo; También, podría estudiarse la vernalización de estas especies, es decir si las bajas temperaturas son un detonante para la floración, ya que en la Tabla 4.1 se observa una distribución en el hemisferio sur con una variación estacional amplia. La luminosidad ha sido descrita anteriormente en isla Reunión como detonante de floración ya que presentó una relación alta con la producción de frutos ($R^2 = 0.93$; Fouché y Jouve, 1999). Cabe mencionar que los experimentos realizados por Fouché y Jouve contrastan dos microambientes, entre plantaciones de caña y bosque; los cuales fueron evaluados respecto a la luminosidad. Sin embargo la luminosidad solar está relacionada con la radiación, la cual puede ser evaluada respecto a la temperatura. Además los experimentos mencionados evalúan un periodo reproductivo mayor al del presente trabajo, ya que relacionan la fructificación con la luminosidad.

Periodo de receptividad polen-estigma en *V. planifolia* La apertura floral no determina que las estructuras reproductivas se encuentren listas para la fecundación de los óvulos. La interacción favorable entre las estructuras reproductivas se obtendrá cuando estas se encuentren maduras y sean compatibles lo cual favorecerá la fecundación de los óvulos y posteriormente el desarrollo de los frutos (Márquez-Guzmán *et.al.*, 2013). La receptividad entre las estructuras reproductivas de *V. planifolia* se observó en un intervalo de tiempo mayor al que se esperaba con el método de polinización manual, de 7:00 a 13:00 horas; ya que al tercer día se observó la retención de ovarios polinizados en un horario en el cual usualmente no se poliniza. Lo anterior indica que el periodo de polinización manual realizado en la región del Totonacapan no presenta ningún fundamento biológico y que el periodo pudo ser definido por una práctica agrícola. Además, estos resultados sugieren que no existe ningún proceso de autoautoincompatibilidad en esta especie, como lo había ya mencionado Hernández Apolinar (1997). Cabe mencionar que, la retención de ovarios observada al tercer día si presentó diferencias significativas respecto al sistema de cruce empleado; lo cual podría estar ocasionado por algún mecanismo bioquímico en el que cual se favorece la retención de ovarios provenientes de una cruce xenogámica.

Sistema de cruce en *V. planifolia* El éxito reproductivo de las angiospermas está relacionado con los procesos de fecundación y formación de frutos; no obstante, los polinizadores no son el único factor involucrado. En los experimentos de polinizaciones suplementarias difícilmente se obtiene frutos en el 100 % de las flores polinizadas; esta condición se presenta también en las orquídeas puesto a que la maduración de frutos corresponde a una reducida porción de las flores producidas y polinizadas (Stephenson, 1981; Tremblay, 2005). En los experimentos realizados, se observó que la retención de los frutos de *V. planifolia* se reduce mientras transcurre el tiempo (Figura 3.6). El primer periodo de pérdida de frutos sucedió entre los 3 y los 97 días; este evento abortivo podría estar relacionado con la selección del tamaño de carga de frutos, considerando el desarrollo de los ovarios postpolinización identificado en *Phalaenopsis* spp., en las cuales se menciona una cascada de reacciones químicas conocidas como la señalización post-polinización, que incita el desarrollo de los óvulos posterior a los 42 días. Si no hubo una polinización efectiva, entonces no habrá desarrollo de los ovarios o si tampoco hay condiciones ambientales favorables para el desarrollo de los frutos estos se abortarán (O'Neill *et al.*, 1993).

Los análisis de la pérdida de frutos en este trabajo indicaron que también existe una diferencia en la proporción de frutos perdidos respecto al sistema de cruce del que provengan. Los frutos retenidos dependerán del sistema de cruce y del parentesco genético que exista entre la planta y los embriones en desarrollo, su descendencia (Crawley, 1997). Este fenómeno podría estar relacionado con la asignación de los recursos durante el desarrollo de los frutos, así como una preferencia por asignar los recursos a frutos provenientes del sistema xenogámico. Lo anterior corresponde con los supuestos plateados por Eguiarte *et al.*, (1999), en los que menciona la preferencia por

4. DISCUSIÓN

incrementar la variación genética. Cabe mencionar que no se consideraron las variables ambientales (Crawley, 2005; Tremblay, 2005).

Calidad comercial de los frutos La calidad comercial de los frutos está definida principalmente por su tamaño, así como también por el brillo, flexibilidad, aroma, entre otras características. En este trabajo se analizó el tamaño de los frutos ya que dicha característica esta relacionada positivamente con el número, tamaño y calidad de la semilla. Por lo cual, se evaluó el tamaño de los frutos cosechados a los 244 días, sin embargo el análisis del peso y volumen de los frutos no mostró diferencias respecto al origen del polen empleado para su crusa. En la longitud de los frutos sí se identificaron diferencias marginales, respecto al sistema de crusa empleado ($P = 0.0583$, xenogámicos: $n = 19$ y autogámicos $n = 14$). En el sistema xenogámico se obtuvieron frutos de las categorías I y II, mientras que en el sistema autogámico se obtuvieron frutos de la categoría II (Tabla 4.2), de acuerdo con al Comité Estatal Sistema Producto Vainilla de Puebla, A.C (SAGARPA, 2012). Lo anterior, podría podrían tener implicaciones favorables en el comercio de vainilla, ya que las categorías establecidas respecto a su longitud presentan un valor comercial diferente. Cabe mencionar que el tamaño de la muestra para estos análisis es poco representativo, por lo cual es importante considerar un muestreo más grande antes de implementar técnicas de manejo en los vainillales.

Tabla 4.2: Calidades de los frutos de *V. planifolia* respecto a las categorías establecidas por el Comité Estatal Sistema Producto Vainilla de Puebla, A.C. (SAGARPA, 2012).

Categoría	Longitud (cm)
Extra	>20
I	>17.5
II	>15
III	<15

Sistema de apareamiento La diversidad de estrategias asociadas a la reproducción sexual en las angiospermas es observada a partir de la variedad de características morfológicas expresadas en las flores (Álvarez *et al.*, 2007). Con el Índice de crusa (OIC) se analizaron características florales que se han asociado a los patrones de flujo de polen, como son: la atracción de los polinizadores en función del diámetro floral, el periodo de maduración de estructuras reproductivas y la limitación de una autopolinización por la separación de los órganos sexuales (Cruden, 1977). En este trabajo se obtuvo un OIC de 4 para *V. planifolia* y *V. pompona*; este valor está asociado al sistema de apareamiento xenogámico (Tabla 2.2). En el análisis realizado, el carácter que fue determinante para este resultado es el rostelo. Esta estructura es una barrera física que limita el desplazamiento de los granos de polen desde la antera al estigma de la misma flor; característica morfológica asociada a un sistema de apareamiento xenogámico (Tremblay *et al.*, 2005). No obstante, la presencia del rostelo no condiciona un sistema de apareamiento estrictamente xenogámico ya que el tamaño del rostelo está relacionado con el grado de bloqueo del flujo autogámico de los granos de polen. Incluso se han

descrito orquídeas con eventos de polinización autogámicos que presentan rostelo, tal es el caso de *Isotria medeoloides* (Mehrhoff, 1983), y de las suposiciones en *V. planifolia* (Hernández Apolinar, 1997).

La proporción de polen-óvulos en las plantas es una característica muy importante para los análisis de este tipo; sin embargo, su interpretación resulta compleja debido a las características interdependientes del fenómeno (Figura A.2; Cruden, 2000). El índice P/O en *V. planifolia* y *V. pompona* no se logró estimar, puesto que no se contabilizaron los óvulos. Las células observadas se encontraron en desarrollo, en un estado de primordios seminales, lo que sugiere que los óvulos de *V. planifolia* y *V. pompona* observados se encontraron en desarrollo, mientras que el resto de las estructuras florales se encuentran maduras; tal y como lo menciona O'Neill y colaboradores (1993) en *Phalaenopsis* spp.

El desarrollo de los óvulos posterior a una polinización se ha descrito en otras orquídeas, a partir de estímulos hormonales desencadenados por la polinización misma (Zhang y O'Neill, 1993). En *Phalaenopsis* spp. se observa una relación entre el engrosamiento del ovario con el desarrollo y maduración de los óvulos; los ovarios crecen hasta los 42 días posteriores a la polinización y la fecundación de los óvulos sucede hasta los 85 días posteriores a la polinización (Zhang y O'Neill, 1993). En *V. planifolia* se ha descrito que el desarrollo máximo de los ovarios ocurre hasta los 45 días posteriores a la polinización; por lo que se puede suponer que los óvulos podrían encontrarse maduros hasta ese momento de su fecundación, en *V. planifolia* y *V. pompona* (Hernández-Hernández, 2011).

Cameron (2011) estimó que los frutos de *V. planifolia* producen un aproximado de 70,000 a 90,000 semillas, mientras que para *V. pompona* se desconoce. Si consideramos que la toda semilla proviene de un óvulo, podríamos considerar a cada embrión como un óvulo en *V. planifolia*. Con esta información se estimó un P/O de 6.37:1 (Polen \bar{x} = 510 238, Óvulos \bar{x} = 80 000), lo cual correspondería a una *autogamia obligada* (Dafni, 1992; Tabla 2.3). No obstante, la estimación de los óvulos a partir del conteo de semillas podría ser una subestimación de dichas células; ya que el desarrollo de los óvulos ocurre mediante las señales de post-polinización y se encuentra regulada por el número de células que se requieren respecto a la carga polínica. En la familia Orchidaceae se han descrito varias especies con una mayor producción de granos de polen respecto a los óvulos, por lo que se esperaría que los valores obtenidos hubieran sido mayores a uno (Nazarov y Gerlach, 1977). Mehrhoff (1983) y Neiland y Wilcock (1995) han descrito en algunas orquídeas el índice P/O, Tabla 4.3; sin embargo, su análisis de los índices P/O no coincide con los rangos de referencia propuestos por Dafni (1992). Al analizar las especies mostradas en la Tabla 4.3 respecto a Dafni, estas se relacionan con los siguientes sistemas de cruce: *Isotria medeoloides* e *Isotria verticillata* se identificaron como clestogámicas, mientras que *Dactylorhiza maculata*, *Dactylorhiza Fuchssi* y *Platanthera chlorantha* se relacionan con un sistema de apareamiento *autogámico facultativo*.

4. DISCUSIÓN

Tabla 4.3: Índices de polen-óvulos en otras orquídeas de Mehrhoff ¹, 1983; Neiland y Wilcock ²; 1995.

Especie	Granos de polen	Óvulos	Polen:Óvulos	Sis. de apareamiento
<i>Isotria medeoloides</i> ¹	48 300	12 900	3.8:1	Autogámica
<i>Isotria verticillata</i> ¹	170 000	43 800	3.9:1	Xenogámica facultativa
<i>Dactylorhiza maculata</i> ²	*	*	17:1	Xenogámica
<i>Dactylorhiza fuchssi</i> ²	*	*	21:1	Xenogámica
<i>Platanthera chlorantha</i> ²	*	*	24:1	Xenogámica

El análisis de Dafni, no tienen relación biológica con las descripciones realizadas por Mehrhoff (1983) y Neiland y Wilcock(1995), debido a que las orquídeas presentan dos características a las cuales el índice P/O es sensible. *Isotria medeoloides*, *Isotria verticillata*, *Dactylorhiza maculata*, *Dactylorhiza Fuchssi* y *Platanthera chlorantha* presentan empaquetamiento de granos de polen, en *Isotria medeoloides* e *Isotria verticillata* másulas y el resto de las especies presenta polinios; y el desarrollo post-polinización de los óvulos, fenómeno desconocido para las especies anteriores. Por lo anterior, Neiland y Wilcock (1995) definen que un P/O de 3.8 a 3.9 sugiere un sistema de cruce eficiente para las especies analizadas, es decir, que no se pierde polen en su traslado (v.g. los polinios). Reescalar el índice para analizar estos sistemas biológicos facilita el estudio del gradiente de autoautoincompatibilidad y autocompatibilidad que existe entre las orquídeas, y clasificarlas respecto a los sistemas de cruce.

En este trabajo, el P/O estimado para *V. planifolia*, a partir del número de semillas, es de 6.37:1; este valor se acerca al P/O de *Isotria verticillata* (Tabla 4.3). *Isotria* pertenece a Pogonieae; familia relacionada filogenéticamente con la familia Vanilloideae, a la cual pertenece *V. planifolia* (Chase *et al.*, 2015). Dichos géneros comparten características morfológicas específicas, como es el empaquetamiento de granos de polen por glucósidos, formando la másula (Tremblay *et al.*, 2005; Domínguez, 2013). Con estas características, se intuye que *V. planifolia* se acerca a un sistema de cruce de xenogamia facultativa; el cual se asocia a la tasa de autoincompatibilidad (ISI). En este trabajo el coeficiente ISI indicó que *V. planifolia* presenta un apareamiento parcialmente autoincompatible, es decir que *V. planifolia* presenta autocompatibilidad, pero en los experimentos se observó una mayor retención de polinizaciones cruzadas.

La variación de óvulos y polen se encuentra relacionada con la disponibilidad de los recursos; sin embargo, la variación en el número de óvulos es poco frecuente ya que existe una producción de óvulos constante (Götzenberger *et al.*, 2006). La variación en el número de granos de polen se ha reportado como respuesta a los cambios ambientales; no obstante, a pesar de las variaciones en las muestras analizadas, el índice P/O refleja una proporción conservada entre los gametos (Cruden, 2000). Al identificar una variación en la producción de granos de polen entre las flores evaluadas en *V. planifolia*

y *V. pompona* fue necesario conocer cómo esta variación se relaciona con el índice P/O que se propuso realizar. Sucede también, que el índice P/O es sensible a la variación de algunas características (Apéndice, Figura A.2), además de los siguientes supuestos: el empaquetamiento de los granos de polen, las recompensas florales y la competencia polínica, reduce el P/O; mientras que los cambios ambientales aumentan el P/O (e.i. el efecto de la humedad ambiental en la receptibilidad y despliegue floral, Cruden, 1985). *V. planifolia* y *V. pompona* presentan características morfológicas que se asocian con las variaciones que pudiese presentar el índice, como son: el empaquetamiento de los granos de polen, en másulas; recompensas florales aromáticas y la competencia polínica. Esta última interacción le da una ventaja a los granos de polen germinados durante la elongación del tubo polínico, saturando la capacidad de carga de los óvulos a fecundar; ésta interacción se asocia a la falta de polinizadores en la especie (Barret, 2002; Tremblay, 2005). Lo anterior coincide con lo observado en *V. planifolia* y *V. pompona* (Figura 3.9; Soto-Arenas, 2010).

Cabe aclarar que las alteraciones ambientales de los sitios pudiera influenciar también el índice P/O, por lo que es importante considerar que en este estudio se trabajó en tres sitios con distintos niveles de perturbación ambiental. Respecto a lo anterior, se sugiere considerar un análisis entre sitios de cultivo y poblaciones silvestres, cuya información es importante para conocer y contrastar las condiciones aquí abordadas. Los granos de polen estimados en este trabajo indicaron que *V. pompona* presentó una mayor número de granos polen, y de granos de polen germinados; estos resultados, podrían estar relacionados con la estructura poblacional y de comunidades en los que habitan estas plantas. Además, a pesar de la reducida variabilidad genética estimada a partir de la intensa propagación vegetativa, se observó que las estimaciones variaron a su vez entre las flores evaluadas (Figura 3.8); esto podría ser un reflejo de la limitación por polen que presentan las plantas y/o una competencia intraespecífica.

Capítulo 5

Conclusiones

El periodo de apertura floral observado en *Vanilla planifolia* es mayor al reportado anteriormente, 7:00 a 15:00 (Soto-Arenas, 2010). Las flores de *V. planifolia* presentan una apertura floral de 1:00 a 15:00 horas, mientras que las flores de *V. pompona* presentan una apertura de 23:00 a 15:00 horas. Ambos procesos de apertura se relacionaron con las oscilaciones entre la temperatura y humedad ambiental de cada uno de los sitios. La relación entre las variables ambientales y la apertura es muy estrecha, por lo que la diferencia podría estar explicada por la variación ambiental.

El periodo de apertura floral y la forma de las flores en *V. planifolia* y *V. pompona* sugiere una polinización asociada a la falenofilia; este, es un síndrome de polinización realizada por esfíngidos a primeras horas del día, debido al periodo en el que forrajean estos insectos.

En el caso de *V. planifolia*, la receptibilidad del estigma y la viabilidad del polen no ocurre únicamente durante la apertura floral. La polen-estigma se observa en estructuras florales en estado de preantesis, antesis y post-antesis. Respecto a lo anterior, se sugiere extender el periodo de polinización manual practicado en la Región del Totonacapan.

A partir de las polinizaciones realizadas en *V. planifolia*, se observó una proporción de frutos de 1:2 respecto a las polinizaciones autogámicas respecto a las xenogámicas. Además, estos frutos presentaron una longitud mayor, lo que significa mayor calidad comercial ante SAGARPA. Los frutos colectados al final del experimento corresponden a un 10% de las polinizaciones realizadas, factor que se recomienda considerar en experimentos similares. Cabe mencionar, que se observaron dos periodos abortivos en el desarrollo de los frutos; los cuales están fundamentados por el sistema de cruce empleado y el transcurso del tiempo.

En *Vanilla planifolia* y *V. pompona* se determinó un sistema de cruce xenogámico, mediante el índice de cruce de Cruden. Respecto a la tasa de autoincompatibilidad, *V. planifolia* se relaciona con un apareamiento parcialmente autoincompatible; lo que significa que puede reproducirse mediante un sistema de cruce xenogámico o au-

5. CONCLUSIONES

togámico (v.g. autopolinizaciones efectuadas por hormigas, en *V. planifolia*; Hernández-Apolinar, 1997).

Lo anterior, coincide con un sistema de cruce tipo xenogamia facultativa interpretado a partir de la cercanía filogenéticamente entre la subfamilia Vanilloideae y Pogonieae (Chase *et al.*, 2015). A esta última familia pertenece el género *Isotria*, el cual presenta un empaquetamiento de los granos de polen en másula, al igual que *V. planifolia* y *V. pompona*. Mehrhoff (1983) describe a *Isotria verticillata* como xenógama facultativa.

Vanilla pompona podría presentar las características ya descritas en *V. planifolia*, debido a la cercanía filogenética entre dichas especies, ya que en este trabajo se observó que sus estrategias reproductivas se asemejan. Ejemplo de lo anterior es el desarrollo post-polinización de los óvulos en ambas especies de estudio.

Bibliografía

- [1] Allendorf W. y Luikart G. *Conservation and the Genetics of Populations*. Publicaciones Blackwell, 2006.
- [2] Aust y Hachmann. *Interim vanilla report no.49*. s.f., 02 septiembre 2016: <http://www.austhachcanada.com/interim-report-2016-english>, 2016.
- [3] Baker, H. G. Anthecology: Old Testament, New Testament, Apocrypha (Banquet Address, 8 February 1979). *New Zealand Journal of Botany*, 17:431–40, 1979.
- [4] Barrera-Rodríguez A. I, et al. Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* A.) bajo naranjo y en malla sombra en el Totonacapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, 2009.
- [5] Barrett Spencer, C. H. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, 3:274, 2002.
- [6] Bello J. J., García G. G. y Iglesias-Andreu L. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38:165–171, 2015.
- [7] Cameron K. *Vanilla Orchids, Natural History and Cultivation*. Timber Press, 2011.
- [8] Castillo M. R. y Engleman E. M. Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*. *Acta Botanica Mexicana*, 25:49–59, 1993. Colegio de postgraduados.
- [9] Castro-Babadilla G. *Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz*. Tesis de doctorado. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz., 2008.
- [10] Chase M. W., Cameron K. M., Freudenstein J. V., Pridgeon A. M., Salazar G., van den Berg C. y Schuiteman A. An updated classification of orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177:299–306, 1985.
- [11] Correll D. S. *Economic Botany*. Springer, El Jardín Botánico de Nueva York, 1953. <http://es.scribd.com/doc/118412891/Vanilla-Its-Botany-History-Cultivation-and-Economic-Import-1953>. Fecha de consulta 26 de marzo del 2014.

BIBLIOGRAFÍA

- [12] Cozzolino S. y Widmer A. . Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Ecology and Evolution*, 20:487–494, 2005.
- [13] Crawley M. J. *Sex*. En *Plant Ecology*, Blackwell Science, 1997.
- [14] Crawley M. J. *Statistics: an introduction using R*. Chichester: Wiley, 2005.
- [15] Cruden R. W. Pollen-ovule Ratios: A Constervative Indicator of Breeding Systems in Flowering Plants. *Evolution*, 31:32–46, 1977.
- [16] Cruden R. W. Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution*, 222:143–165, 2000.
- [17] Cruden R.W. y Lyon D. L. Patterns of biomass allocation to male and female functions in plants with different mating systems. *Oecologia*, 66:299–306, 1985.
- [18] Dafni A. *Pollination Ecology*. Oxford University Press, 1992.
- [19] Darwin C. *Las distintas formas de las flores en plantas de la misma especie*. Susana Pinar, trad. UNAM, Academia Mexicana de Ciencias, Catarata. (Obra original publicada en 1877), 2009.
- [20] Domínguez P. T. C. y Pérez I. J. R. *Biología de la polinización*. En Márquez-Guzmán, J., Collazo, M., Martínez, M., Orozco, A., y Vázquez, S., *Biología de Angiospermas*. Facultad de Ciencias, UNAM, 2013.
- [21] Ecott T. *Vanilla: travels in search of the luscious substance*. Grove Press Paperback, 2004.
- [22] Eguiarte L. E., Nuñez Farfán J. C., Domínguez y Cordero C. Biología evolutiva de la reproducción en plantas. *Ciencias*, 6:69–86, 1999.
- [23] Fouché J. G. y Jouve L. . *Vanilla planifolia*: history, botany and culture in Reunion Island. *Agronomic*, 19:689–703, 1999.
- [24] Gómez, J.M. Generalizations in the interactions between plants and pollinators. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75:105–115, 2002.
- [25] Gotzenberger L., Durka W., Kuhn I. y Klotz S. The relationship between the pollen–ovule ratio and seed size: a comparative test of a sex allocation hypothesis. *Evolutionary Ecology Research*, 8:1101–1116, 2006.
- [26] Hernández-Apolinar M. *Crecimiento y reproducción de Vanilla planifolia (ORCHIDACEAE) en Usila, Oaxaca*. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM, México, D.F., 1997.
- [27] Hernández-Apolinar M. History and ecology of *Vanilla*. *Voices of México*, 1, 2002.

-
- [28] Hernández-Apolinar M., Garcés de la Rosa Y., Yáñez-Ordóñez O. y Hinojosa-Díaz I. Identificación de Polinizadores Naturales de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Agro Productividad*, 9:21–22, 2016.
- [29] Hernández Hernández J. Tecnología integral para la producción de vainilla en México. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 2010.
- [30] Hernández Hernández J. *Mexican Vanilla Production*. En: Havkin-Frenkel D. y Belanger F.C. (eds). *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Wiley-Blackwell, Oxford, 2011.
- [31] Hágsater E., Soto M. A., Salazar G. A., Jiménez R., López M. A. y Dressler R. L. *Las Orquídeas de México*. Reporte de investigación. Instituto Chinoín, México, 2005.
- [32] López Curto M. L., Márquez Guzmán J., y Murguía Sánchez G. *Técnicas para el Estudio del Desarrollo en Angiospermas: Libro de Laboratorio*. Las Prensas de Ciencias Editores, 2005.
- [33] Lubinsky P., Romero-González G. A., Heredia S. M. y Zabel S. *Origins and patterns of vanilla cultivation in tropical America (1500–1900): no support for an independent domestication of vanilla in South America*. En: Havkin-Frenkel D. y Belanger F.C. (eds). *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Wiley-Blackwell, Oxford, 2010.
- [34] Álvarez-Buylla E. R., Benítez M., Balleza Dávila E., Chaos A., Espinosa Soto C. y Padilla Longoria P. Gene regulatory network models for plant development. *Plant Biology*, 10:83–91, 2007.
- [35] Mehrhoff A. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 70:1444–1453, 2002.
- [36] Márquez-Guzmán J., Collazo M., Martínez M., Orozco A. y Vázquez S. *Biología de Angiospermas*. Las Prensas de Ciencias Editores, 2013.
- [37] Muhammad F., Muhammad A., y Muhammad R. Pollination Ecology with Special Reference to Insects. A review. *Journal of Research (Science)*, 15:395–409, 2004.
- [38] Nazarov V. V. y Gerlach G. The potential seed productivity of orchid flowers and peculiarities of their pollination systems. *Lindleyana-West Palm Beach*, 12:188–204, 1977.
- [39] Neiland M. R. M. y Wilcock C. C. Maximisation of reproductive success by european orchidaceae under conditions of infrequent pollination. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 187:39–48, 1995.
-

BIBLIOGRAFÍA

- [40] Ollerton J., Alarcón R., Waser N. M., Price M. V., Watts S., Cranmer L., Hingston A., Peter C. I. y Rotenberry J. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany*, 103:1471–1480, 2009.
- [41] O'Neill S. D., Nadeau J. A., Zhang X. S., Bui A. Q. y Halevy A. H. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *The Plant Cell*, 5:419, 1993.
- [42] Pansarin E. R., Aguiar J. M. y Pansarin L. M. Floral biology and histochemical analysis of *Vanilla edwallii* Hoehne (Orchidaceae: Vanilloideae): an orchid pollinated by *Epicharis* (Apidae: Centridini). *Plant Species Biology*, 29:242–252, 2014.
- [43] Primack R. B. Longevity of individual flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16:15–37, 1985.
- [44] Richards A. J. *Plant Breeding Systems*. Garland Science, 1997.
- [45] Rodolphe L. G., De Bruyn A., Church B., Humeau L., Gauvin B. A., Paillet T., Grisoni M. y Besse P. Active sexual reproduction but no sign of genetic diversity in range-edge populations of *Vanilla roscheri* Rchb. f. (Orchidaceae) in South Africa. *Conservation Genetics*, 15:1403–1415, 2014.
- [46] SAGARPA. *Plan Rector del Comité Estatal Sistema Productor Vainilla de Puebla*, A.C. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA, 2012.
- [47] Salazar G. A., Chase M. W., Soto-Arenas M. A. y Ingrouille M. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany*, 90:777–795, 2003.
- [48] Sasikumar B. *Vanilla* breeding, a review. *Agricultural Reviews*, 31, 2010.
- [49] Schemske D. W. Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution, Society of the Study of Evolution*, 34:489–493, 1980.
- [50] Segovia A. C. *Condiciones microambientales y preferencia de forofitos en individuos reintroducidos y silvestres de *Barkeria whartonia* (C. Schweinf.) Soto Arenas, en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México*. Tesis de licenciatura. UNAM, México, D.F., 2016.
- [51] Shadakshary Y. G., Madaiah D., Dinesh Kumar M., Shivakumar K. V., y Bhagavantha K. H. Pollen viability and stigma receptivity in *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Andrews). *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 12:194–196, 2003.
- [52] Shivanna K. R. y Tandon R. *Reproductive Ecology of Flowering Plants: a Manual*. Springer, 2014.

-
- [53] Shuiteman A., Vermuelen J. J., De Vogel E. y Vogel A. Nocturne for an unknown pollinator: first description of a night-flowering orchid (*Bulbophyllum nocturnum*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 167:344–350, 2011.
- [54] Soto-Arenas M. A. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. *Instituto Chinoin AC.*, 1999. Informe final SNIB-Conabio, Proyecto 101.
- [55] Soto-Arenas M. A. Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género *Vanilla*. *Informe final SNIB-Conabio, Proyecto 101*, 1, 2009. Instituto Chinoin AC., Herbario AMO.
- [56] Soto-Arenas M.A. y Dressler R. L. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* plumier ex Miller with a characterization of their region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 9:285–354, 2010.
- [57] Stephenson A. G. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 12:253–279, 1981.
- [58] Sultan S. E. *Evolutionary Implications of Phenotypic Plasticity in Plants*. Springer, 1987.
- [59] Thain M., Hickman M., Abercrombie M., Hickman C. J. J., Johnson N. I. y Turvey N. I. *Dictionary of Biology*. Penguin Reference, 2004.
- [60] Torices R. La ecología reproductiva de las plantas: estrategias reproductivas, fuerzas ecológicas y evolutivas. *Ecosistemas*, 23:1–5, 2014.
- [61] Tremblay R. L., Ackerman J.D., Zimmerman J. K., y Calvo R. N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84:1–54, 2005.
- [62] Van Dam A. R., Householder J. E. y Lubinsky P. *Vanilla bicolor* lindl.(Orchidaceae) from the Peruvian Amazon: auto-fertilization in *Vanilla* and notes on floral phenology. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57:473–480, 2010.
- [63] Van der Pijl y Faegri K. *Principles of Pollination Ecology*. Oxford, 1979.
- [64] Velázquez E. y Fonseca R. *Manual de prácticas de laboratorio. Briofitas, pteridofitas y gimnospermas*. Las Prensas de Ciencias Editores, 2009.
- [65] Willmer P. *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press, 2011.

Apéndice A

Apéndice

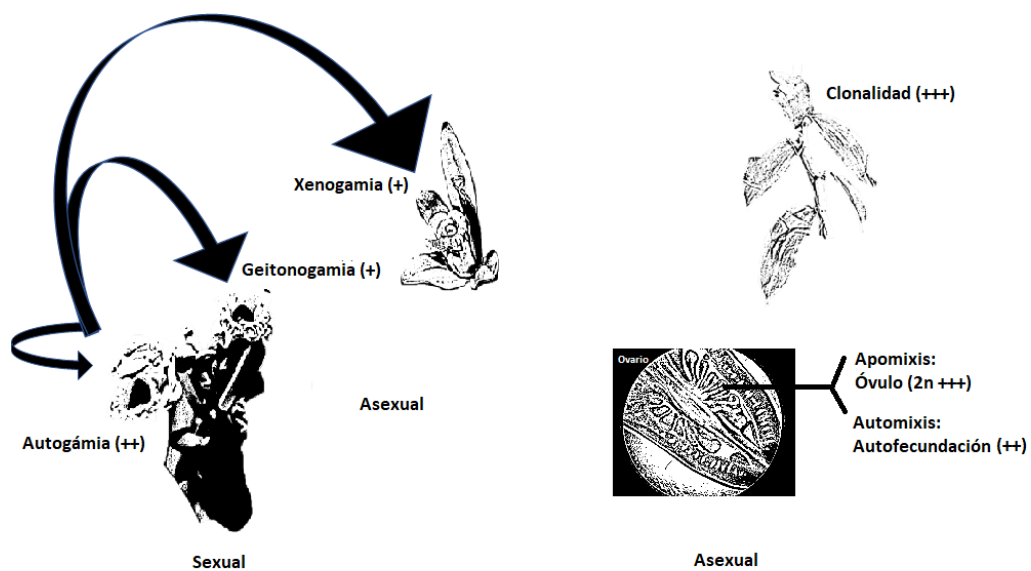


Figura A.1: Formas de reproducción en plantas a partir del grado de parentesco que tendrán las semillas con sus progenitores: idénticos (+++), con reducida variación genética (++) y con variación genética (+).

Código R A continuación se muestra el código utilizado para desarrollar los modelos lineales mixtos con efecto aleatorio (LMM) y el modelo aditivo mixto generalizado (GAMM).

```
###LMM###  
library(lme4)  
#Datos  
datos <-read.csv("apertura.csv")
```

A. APÉNDICE

```
aperinferior <- list()
aperinferior[[1]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ 1 + (1|Muestra),
  data=datos.pla)
aperinferior[[2]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ Hora + (1|Muestra),
  data=datos.pla)
aperinferior[[3]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ Pr + (1|Muestra),
  data=datos.pla)
aperinferior[[4]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ Hora + Temperatura + (1|Muestra),
  data=datos.pla)
aperinferior[[5]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ Hora + Pr + (1|Muestra),
  data=datos.pla)
aperinferior[[6]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ Hora * Temperatura + (1|Muestra),
  data=datos.pla)
aperinferior[[7]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ Hora * Humedad + (1|Muestra),
  data=datos.pla)
aperinferior[[8]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ Hora + Temperatura + Humedad +(1|Muestra),
  data=datos.pla)
aperinferior[[9]] <- lmer(sqrt(Inferior)~ Hora + Temperatura * Humedad +(1|Muestra),
  data=datos.pla)

do.call(anova, aperinferior)

##Coeficiente de determinacion

mF<-aperinferior[[7]]
Fixed <- fixef(mF)[2] * mF@pp$X[, 2] + fixef(mF)[3] * mF@pp$X[, 3]
+ fixef(mF)[4] * mF@pp$X[, 4]
VarF <- var(Fixed)
VarF <- var(as.vector(fixef(mF) %*% t(mF@pp$X)))

#marginal
VarF/(VarF + VarCorr(mF)$Muestra[1] + attr(VarCorr(mF), "sc")^2)

#central
(VarF + VarCorr(mF)$Muestra[1])/(VarF + VarCorr(mF)$Muestra[1] +
  (attr(VarCorr(mF), "sc")^2))

##GAMM##
library(gamm4)
#Datos
vplanifolia.a <-read.csv("apertura.csv")

m2 <- gamm4(log(Apical)~ Especie -1 + t2(Hora, Pr, k = c(4,4)),
```

random = ~ (1|Muestra), data=vplanifolia.a)

Tabla A.1: Flores polinizadas manualmente en *V. planifolia* ($n = 288$), según el tipo de polinización: autogámica o xenogámica.

Hora	Autogámica	Xenogámica
17:00	12	12
19:00	12	12
21:00	12	12
23:00	12	12
1:00	12	12
3:00	12	12
5:00	12	12
7:00	12	12
9:00	12	12
11:00	12	12
13:00	12	12
15:00	12	12

Tabla A.2: Modelos propuestos para analizar la apertura, apical y longitudinal, respecto al tiempo y especie con GLM.

Modelos de apertura apical	AIC	Devianza residual/ g.l
Especie * Hora	83.401	$4.7447e - 10/0 = \text{infinito}$
Especie + Hora	71.541	$10.14/11 = \mathbf{0.921}$
Especie	99.67	$40.27/1 = 40.27$
Hora	942.95	$903.55/11 = 82.140$
Modelos de apertura apical	AIC	Devianza residual/ g.l
Especie * Hora	57.351	$4.7447e - 10/0 = \text{infinito}$
Especie + Hora	50.72	$5.36/6 = \mathbf{0.894}$
Especie	122.27	$78.92/1 = 78.92$
Hora	444.87	$411.52/6 = 68.586$

Tabla A.3: Probabilidades de apertura en ambas especies, obtenidas a partir de los GLM.

Hora	<i>V. planifolia</i>		<i>V. pompona</i>	
	Longitudinal	Apical	Longitudinal	Apical
17	0.000	0.000	0.00	0.00
19	0.009	0.000	0.122	0.00
21	0.062	0.000	0.493	0.00
23	0.163	0.000	0.740	0.00
1	0.554	0.028	0.947	0.131
3	0.821	0.237	0.985	0.617
5	1	0.864	1	0.970
7		0.908		0.981
9		0.954		0.990
11		0.954		0.990
13		0.886		0.975
15		0.693		0.921

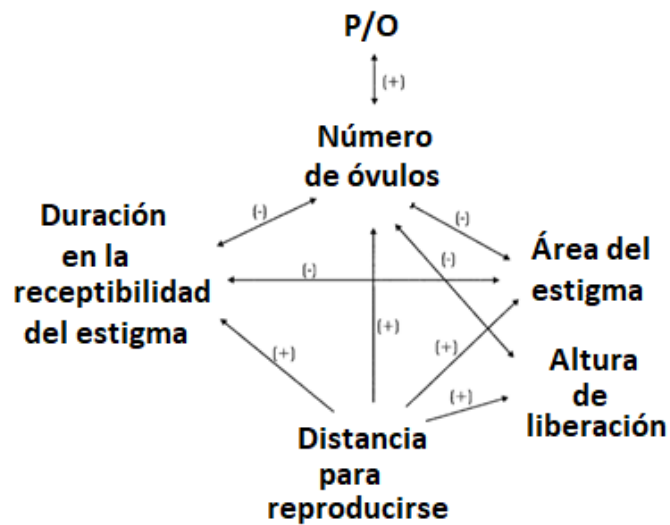
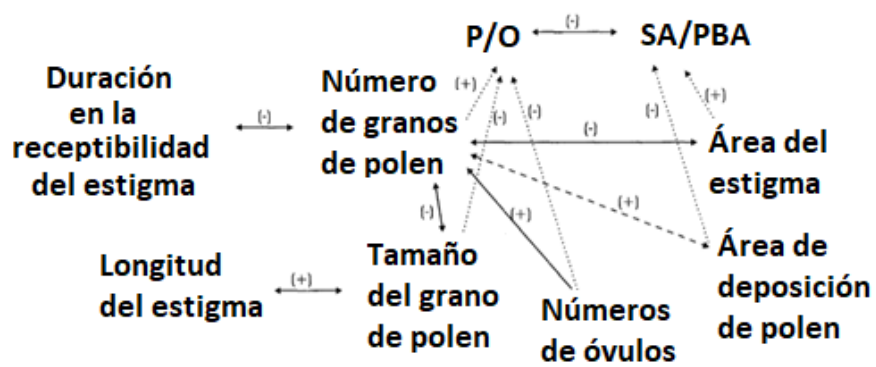


Figura A.2: Se muestran los factores descritos que afectan al índice polen-óvulos (Cruden, 2000).

Tabla A.4: Relación de la apertura longitudinal con las variables ambientales según el LMM realizado, ambas especies.

Variables	M1	M2*	M3	M4	M5*	M6	M7*	M8	M9*
Efecto fijo									
Hora		2.796	2.76	1.544	13.142	2.723	2.733	2.835	2.924
Temperatura			-0.131	-0.359		-0.143		0.577	0.61
Humedad					0.178	0.024	0.076	0.193	0.024
Especie: <i>V. pompona</i>				0.054			0.727	2.55	-21.332
Hora:Temperatura									
Hora:Humedad					0.103				
Hora:Especie									-2.285
Temperatura:Especie									-1.14
Humedad:Especie									0.581
Efecto aleatorio									
Individuos	11.442	0.123	3.096	8.25	-17.58	1.097	-7.392	-32.425	-16.716
AIC	3423.7	2578.4	2578.6	2579.5	2568.7	2580.1	2577.3	2575.7	2559.1
R2m		0.788	0.789	0.789	0.793	0.789	0.79	0.791	0.797
R2c		0.824	0.825	0.825	0.829	0.825	0.826	0.827	0.834

Tabla A.5: Relación de la apertura longitudinal con las variables ambientales según el LMM realizado, en *Vanilla planifolia*.

Variables	M1	M2	M3*	M4	M5	M6	M7*	M8	M9*
Efecto fijo									
Hora		2.788		2.925	2.92	6.872	4299.8	2.924	3.10
Temperatura				0.59		1.097		0.61	-4357.00
Humedad							42.12	0.024	-1051.00
Punto de Rocío			-5.723		0.673				
Hora:Temperatura						-0.176			
Hora:Humedad							-42.97		
Temperatura:Humedad									43.57
Efecto aleatorio									
Individuos	12.509	-0.0406	140.195	-13.853	-15.653	-25.451	-4213.76	-16.766	105100
AIC	1938.50	1388.60	1829.7*	1385.20	1385.30	1383.90	1376.2*	1387.20	1377.5*
R2m		0.849	0.318	0.851	0.851	0.852	0.856	0.851	0.856
R2c		0.862	0.318	0.865	0.864	0.866	0.87	0.864	0.87

Tabla A.6: Relación de la apertura longitudinal con las variables ambientales según el LMM realizado, en *Vanilla pompona*.

Variables	M1	M2*	M3*	M4*	M5	M6*	M7*	M8*	M9
Efecto fijo									
Hora		2.877			1.12		6.177	-28.003	-7.412
Temperatura			-3.703		-2.313	-0.883			0.785
Humedad				0.937		0.718	0.683		0.614
Punto de Rocío								-1.59	
Hora:Temperatura									0.496
Hora:Humedad							-0.051		
Hora:Punto de Rocío								1.624	
Efecto aleatorio									
Individuos	10.095	0.024	86.327	-77.739	53.798	-39.012	-58.12	29.302	-72.439
AIC	1467.5	1108.6	1092.7	1074.6	1084.2	1074.5	1070.4	1068.8	1070.5
R2m		0.671	0.681	0.691	0.686	0.691	0.694	0.695	0.695
R2c	0.052	0.858	0.869	0.881	0.875	0.882	0.885	0.886	0.885

Tabla A.7: Comportamiento de la apertura apical respecto a las veribles ambientales, según el análisis de GAMM considerados para *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*.

GAMM: Especie - 1 + t2(Hora, Pr, k = c(4, 4))			
Variabes	Estimados	Intervalo de confianza (0.05)	
EspecieV. planifolia	7.1800149	6.60601638	7.75401334
EspecieV. pompona	4.1287916	3.70806008	4.54952313
t2(Hora,Pr).1	-0.7904063	-1.04478466	-0.53602797
t2(Hora,Pr).2	-0.4075644	-0.80287562	-0.0122532
t2(Hora,Pr).3	-0.9627927	-1.29206248	-0.63352301
t2(Hora,Pr).4	1.2283419	0.74278634	1.71389748
t2(Hora,Pr).5	-0.3052118	-0.50678575	-0.10363782
t2(Hora,Pr).6	0.2641187	-0.50845972	1.0366972
t2(Hora,Pr).7	0.3038666	0.05652776	0.55120544
t2(Hora,Pr).8	-0.5460648	-0.90807115	-0.18405844
t2(Hora,Pr).9	-0.7056406	-1.32975487	-0.0815263
t2(Hora,Pr).10	0.2675758	0.03248957	0.50266207
t2(Hora,Pr).11	-0.5698742	-1.15384798	0.01409964
t2(Hora,Pr).12	-1.8070718	-2.24063162	-1.37351195
t2(Hora,Pr).13	1.111358	0.40190882	1.82080719
t2(Hora,Pr).14	1.6418148	1.32852859	1.95510097
t2(Hora,Pr).15	0.1100586	-0.8665803	1.0866976