



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

“Metaboloma de frutos de *Vanilla planifolia* durante el desarrollo en tres
localidades en la denominación de origen”

TESIS QUE PRESENTA:

JOSUÉ ESAÚ MACÍAS LÓPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA INTEGRATIVA

DIRECTOR DE TESIS:

JOSÉ JUAN ORDAZ ORTIZ

Irapuato, Guanajuato

Diciembre 2019

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-
Unidad Irapuato.

Bajo la dirección del Dr. José Juan Ordaz Ortiz

En el Laboratorio de Metabolómica y Espectrometría de Masas perteneciente a la Unidad
de Genómica Avanzada.

En colaboración con el Dr. Delfino Reyes López, de la Facultad de Ciencias Agro-
hidráulicas de la Benemérita Universidad en Teziutlán, Puebla.

Gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la
beca 463486

Este trabajo se realizó del 1 de septiembre de 2017 al 1 de agosto de 2019

Miembros del comité de asesores: Dr. Octavio Martínez de la Vega, Unidad de Genómica
Avanzada, CINVESTAV Irapuato Dr. Fabien Gerard Plisson, Unidad de Genómica
Avanzada, CINVESTAV Irapuato

Agradecimientos

Para mi asesor el Dr. José Ordaz, así como a los miembros del comité: Octavio Martínez y Fabien Plisson por sus valiosos comentarios, sugerencias y discusiones que fueron indispensable para mi formación también por su paciencia y ser los mejores guías durante este tiempo

Para el Dr. Delfino Reyes y al equipo de trabajo, por proporcionarnos todas las facilidades para generar los muestreos en las distintas zonas de producción vainillera en Totonacapan, además de pasar buenos tiempos durante las colectas.

Para mi familia por su apoyo y amor incondicional

Para todos mis amigos por los momentos que compartimos durante este tiempo

Para todos mis colegas de laboratorio por su apoyo y las interesantes discusiones

Para todos mis compañeros de la maestría por la convivencia y el buen humor que nos tocó compartir

Para los agricultores de la zona de Totonacapan porque a pesar de cargar con las heridas ancestrales de la desigualdad, no cesan en su labor de cultivar, cosechar y preservar la vainilla, emblema de la identidad nacional, que si no cuidamos quedará en el olvido

A CONACYT por el financiamiento.

Contenido

Lista de imágenes.....	6
Lista de tablas.....	9
Lista de abreviaturas.....	10
Lista de unidades.....	12
Resumen.....	14
Abstract.....	15
“Leyenda de la vainilla mexicana “.....	16
1 Introducción.....	18
1.1 Antecedentes.....	21
1.2 Generalidades de la planta de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>).....	21
1.3 Importancia socioeconómica.....	22
1.4 Origen y taxonomía.....	23
1.5 Partes de la planta.....	24
1.5.1 Hojas de <i>V. planifolia</i>	24
1.5.2 Flores de <i>V. planifolia</i>	25
1.5.3 Raíces.....	26
1.5.4 Frutos.....	27
1.5.5 Tiempo de floración y polinización.....	30
1.5.6 Beneficiado de las vainas.....	31
1.6 Plasticidad fenotípica en función del ambiente.....	32
1.7 Organelos frutales.....	33
1.8 Compuestos vainilloides en la calidad de las vainas curadas.....	34
1.9 Flavonoides.....	35
1.10 Ruta de los fenilpropanoides durante el desarrollo.....	35
1.11 Compuestos vainilloides.....	36
1.12 Redundancia metabólica.....	37
1.13 Propiedades Nutracéuticas.....	38
1.14 Metabolómica como herramienta para determinar abundancia metabólica en plantas.....	39
2.1 Hipótesis.....	41
3.1 Objetivo general.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4.1 Metodología.....	42

4.2 Etiquetado de plantas y diferencias ambientales entre las condiciones evaluadas	42
4.3 Muestreo	44
4.4 Metodología para pulverizar y almacenar las muestras	44
4.5 Metodología de extracción	45
4.6 Método cromatográfico	45
4.7 Método de espectrometría de masas (MS ^E)	47
4.8 Análisis de datos de UPLC-ESI- MS ^E	49
4.9 Análisis de datos	51
4.10 Análisis de componentes principales (PCA)	51
4.11 Análisis de ANOVA de 2 factores (Two way ANOVA)	52
4.12 Análisis de componentes principales simultáneo (ASCA)	52
4.13 Análisis de agrupamiento (HCA)	53
5.1 Resultados	54
5.2 Diferencias fenotípicas de peso y longitud en las vainas de tres condiciones ambientales ...	54
5.3 Método cromatográfico y de espectrometría de masas	57
5.4 Datos de LC-MS mediante ionización positiva y negativa	63
5.5 Comparación de iones pre-identificados mediante ambos modos de ionización	66
5.6 ANOVA de dos factores para las etapas de desarrollo y las condiciones ambientales	67
5.7 Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) en tres condiciones ambientales durante el día 215 (7 meses) dpp en ionización negativa	72
5.8 Heatmap de 3 condiciones ambientales durante el día 215 (7 meses) dpp en ionización negativa	73
5.9 Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) en tres condiciones ambientales durante el día 215 (7 meses) dpp en ionización positiva	74
5.10 Heatmaps en tres condiciones ambientales durante el día 215 (7 meses) dpp en ionización positiva	75
5.11 Iones con diferencias por análisis de varianza durante el día 215 post polinización en ionización negativa (mes 7 post polinización)	76
5.12 Iones con diferencias por análisis de varianza durante el día 215 post polinización en ionización positiva (mes 7 post polinización)	78
5.13 Metabolitos mapeados a rutas metabólicas dentro de <i>V. planifolia</i>	80
6.1 Discusión	82
6.2 Fenotipo de vainas durante el desarrollo	83
6.3 UPLC-ESI- MS ^E para vainas verdes durante el desarrollo de <i>V. planifolia</i>	84
6.4 Abundancia de compuestos vainilloides durante el desarrollo	85

6.5 Iones con influencia del ambiente y su interacción con el desarrollo	86
6.6 Diferencias significativas durante etapas específicas del desarrollo	88
6.7 Reagrupando datos en 2 conjuntos	90
7.1 Conclusiones.....	92
8.1 Perspectivas	94
9.1 Anexos	95
9.1.1 Anexo A	95
9.1.2 Anexo B	105
10.1 Trabajos citados	127
10.2 Páginas web.....	134

Lista de imágenes

Imagen 1.- Hojas de *V. planifolia* en Papantla, Veracruz, México durante la etapa de floración, (Macías, J. 2018) 24

Imagen 2.- Flor de *V. planifolia* en San Rafael, Veracruz a la izquierda, (Macías López, J. 2018), a la derecha se aprecian las estructuras florales de *V. planifolia* (Anuradha, Shyamala, & Naidu, 2013) 26

Imagen 3.- Raíz de *V. planifolia* anclada a un árbol de naranja (*Citrus X sinensis*) en San Rafael, Veracruz (Macías López, J. 2018) 27

Imagen 4.- Frutos de *V. planifolia* después del beneficiado. (SAGARPA 2017) 28

Imagen 5.- Proyección del consumo Internacional y de producción nacional de vainilla. (SAGARPA, 2017)28

Imagen 6.- Estructura interna del fruto de *V. planifolia* con 6 meses post polinización (Gallage et al., 2018) 29

Imagen 7.- Estructura química de la molécula de vainillina (4-metoxi-3-hidroxi-benzaldeído) a la izquierda y a la derecha (1-O-vainilloil)-(6-O-feruloil)-beta-D-glucopiranosido (Modificado de Shwarz & Hofmann, 2009)..... 30

Imagen 8.- Beneficiado de vainilla en tapetes. Tomado de: culturaenpapantla.blogspot.com 32

Imagen 9.- Rutas bioquímicas para biosintetizar vainillina, modificado de Gallage et al., 2014; Gu, Chen, Hong, Fang, & Tan, 2017. 37

Imagen 10.- Mapa de las localidades muestreadas en la región de Totonacapan en Veracruz (San Rafael) y Puebla (Tenampulco). Diseñado en ArcGIS 10.3 43

Imagen 11.- Método cromatográfico en forma de rampa, mediante el aumento paulatino de solvente a través del tiempo se pueden separar moléculas en función de sus grupos funcionales y su estructura. 47

Imagen 12.- Sistema acoplado en tándem de cromatografía de líquidos a una fuente de ionización por electrospray a un espectrómetro de masas (UPLC-ESI-MS)..... 48

Imagen 13 PROGENESIS Q1 4.3, software para análisis metabolómico. 50

Imagen 14.- Diagrama de flujo del análisis de datos metabolómicos modificado de Grace & Hudson 201651

Imagen 15.- Peso fresco de vainas de *V. planifolia* durante las 6 etapas de desarrollo evaluadas, con el error estándar para cada columna..... 54

Imagen 16.-Tamaño de las vainas de *V. planifolia* colectadas durante las 6 etapas de desarrollo frutal, el rango en cada columna es correspondiente al error estándar. 55

Imagen 17.- Correlación entre longitud y peso fresco en vainas del Banco de Germoplasma ajustados a un modelo de tendencia polinómica 56

Imagen 18.- Correlación entre longitud y peso fresco de vainas en rancho "Los Caracoles" ajustados a un modelo de tendencia polinómica 56

Imagen 19.- Correlación entre la longitud y el peso fresco de vainas en San Rafael, Ver. ajustados a un modelo de tendencia polinómica 57

Imagen 20.- Cromatograma de una réplica biológica durante el primer mes de desarrollo con una ionización positiva. 58

Imagen 21.- Cromatograma de una réplica biológica durante el primer mes de desarrollo con una ionización negativa 58

Imagen 22 Estándares de referencia en ionización positiva, el pico a 8.17min es correspondiente a la vainillina, a los 9.96 se muestra la étil vainillina. 59

Imagen 23.- Estándares de referencia en ionización negativa, los picos coinciden con los tiempos de retención para la ionización negativa. 59

Imagen 24.- Control de calidad (QC) en modo positivo para los datos de las extracciones durante el desarrollo frutal de *V. planifolia* 60

Imagen 25.- PCA de las muestras ionizadas en modo positivo, se aprecian los QC's con una tendencia central.....	61
Imagen 26.- Control de calidad (QC) en modo negativo para los datos de los extractos durante el desarrollo frutal de V. planifolia	61
Imagen 27.- PCA de las muestras ionizadas en modo negativo, también se observa una tendencia central para los QC's	62
Imagen 28.- Blanco en modo positivo a) BPI, b) TIC	62
Imagen 29.- Cromatograma de moléculas vainilloides de peso molecular 153.0534 Da, a) muestra con 215 dpp del Banco de Germoplasma (TIC) b) muestra con 215 dpp de Los Caracoles (TIC), usando ionización positiva.....	63
Imagen 30.- PCA de vainas verdes durante el 215 dpp (7° mes) usando UPLC-ESI+-MS.....	65
Imagen 31.- PCA de vainas verdes durante el 215 dpp (7° mes) usando UPLC-ESI--MS.....	66
Imagen 32.- ANOVA de 2 factores para las 3 localidades tomando 1881 features como variables de respuesta en ionización negativa usando una corrección de FDR al 5%	68
Imagen 33.- ASCA en las 3 localidades durante el desarrollo frutal de V. planifolia en ionización positiva	68
Imagen 34.- ANOVA de 2 factores para las 3 localidades tomando 995 features como variables de respuesta en ionización positiva usando una corrección por FDR al 5%.....	69
Imagen 35.- ASCA en las 3 localidades durante el desarrollo frutal de V. planifolia en ionización negativa	69
Imagen 36.- Dendograma del agrupamiento (distancia medida usando correlación de Pearson y un algoritmo de agrupamiento de promedio) para los iones en modo de ionización negativa.	72
Imagen 37.- Heatmap de 362 iones midiendo distancias por la correlación de Pearson y un algoritmo de agrupamiento por promedio en modo de ionización negativa	73
Imagen 38.-Dendograma resultante del agrupamiento (distancia medida usando la correlación y un método de agrupamiento por promedio) para los iones en modo de ionización positiva.....	74
Imagen 39.- Heatmap de 362 iones midiendo distancias por la correlación de Pearson y un algoritmo de agrupamiento por promedio en modo de ionización negativa	75
Imagen 40.- Heatmap de metabolitos pre-identificados, agrupados por distancias de correlación de Pearson y un algoritmo de agrupamiento por promedio en modo de ionización positivo.	75
Imagen 41.- Diferencias entre las abundancias de los iones detectados para las localidades del Banco de Germoplasma y San Rafael	76
Imagen 42.- Diferencias entre las abundancias de los iones detectados para las localidades de Los Caracoles y San Rafael.....	77
Imagen 43.- Diferencias entre las abundancias de los iones detectados para las localidades de Tenampulco y San Rafael en modo negativo	78
Imagen 44.- Diferencias entre las abundancias de los iones detectados para las localidades de Los Caracoles y San Rafael en modo positivo.....	79
Imagen 45.- Iones sobreproducidos y disminuidos entre Banco de Germoplasma y San Rafael en modo positivo durante 215 dpp	79
Imagen 46.- Resultado del análisis de rutas en modo positivo y negativo.....	81
Imagen 47.- PCA de vainas verdes durante el 27 dpp usando UPLC-ESI--MS	95
Imagen 48.- PCA de vainas verdes durante el 27 dpp usando UPLC-ESI+-MS.....	95
Imagen 49.- PCA de vainas verdes durante el 55 dpp usando UPLC-ESI--MS	96
Imagen 50.- PCA de vainas verdes durante el 55 dpp usando UPLC-ESI+-MS.....	97
Imagen 51.- PCA de vainas verdes durante el 118 dpp usando UPLC-ESI--MS	97
Imagen 52.- PCA de vainas verdes durante el 118 dpp usando UPLC-ESI+-MS.....	98
Imagen 53.- PCA de vainas verdes durante el 153 dpp usando UPLC-ESI--MS	99
Imagen 54.-PCA de vainas verdes durante el 153 dpp usando UPLC-ESI+-MS	99
Imagen 55.- PCA de vainas verdes durante el 180 dpp usando UPLC-ESI--MS	100
Imagen 56.- PCA de vainas verdes durante el 180 dpp usando UPLC-ESI+-MS.....	100

Imagen 57.- Abundancia normalizada de la vainillina en modo positivo para las 3 condiciones ambientales	102
Imagen 58.- Abundancia normalizada de glucovainillina en modo de ionización positiva durante el desarrollo frutal de V. planifolia.	102
Imagen 59.- Abundancia normalizada de o-vainillina en modo de ionización positiva durante el desarrollo frutal de V. planifolia.	103
Imagen 60.- Abundancia normalizada de 2-O-Benzoyl-D-glucose en modo de ionización negativa durante el desarrollo de V. planifolia	103
Imagen 61.- Abundancia normalizada de 2-O-p-Coumaroyl-D-glucose en modo de ionización negativa durante el desarrollo de V. planifolia	104

Lista de tablas

Tabla 1.- Método cromatográfico en gradiente	46
Tabla 2.- Esquema de la matriz de datos de las abundancias de los datos crudos para la intensidad de cada compuesto	65
Tabla 3.- Resumen de los iones pre-identificados para ambos modos de ionización, la tabla incluye los valores en modo negativo	66
Tabla 4.- Resumen del ANOVA de dos factores para la corrección por FDR al 5% en modo positivo del análisis de los iones con influencia ambiental y de la interacción	70
Tabla 5.- Resumen de los ANOVA de dos factores para la corrección por FDR en modo negativo del análisis de los iones con influencia ambiental y de la interacción	71
Tabla 6.- Detalles del análisis de rutas en ambos modos	82
Tabla 7.- Compuestos diferenciales pre-identificados entre los grupos de Tenampulco, Puebla y San Rafael, Veracruz en modo negativo.....	92
Tabla 8.- Compuestos pre-identificados mediante ionización negativa (145 compuestos).....	104
Tabla 9.- Iones pre-identificados mediante ionización en modo positivo (133 compuestos).....	111
Tabla 10.- Iones presentes en ambos modos de ionización (Nombre común o IUPAC en inglés), se muestra la m/z para iones [M-H]-.....	117
Tabla 11.- Iones afectados en el día 215 dpp mediante ionización negativa detectados mediante un análisis de varianza (FDR 5%) y un fold change de 1.5 entre Los Caracoles y San Rafael (Imagen 40).....	120
Tabla 12.- Iones afectados en el día 215 dpp mediante ionización negativa detectados mediante un análisis de varianza (FDR 5%) y un fold change de 1.5 entre Banco de Germoplasma y San Rafael (Imagen 41)	123
Tabla 13.- Iones afectados en el día 215 dpp mediante ionización negativa detectados mediante un análisis de varianza (FDR 5%) y un fold change de 1.5 entre Tenampulco y San Rafael (Imagen 42)	124

Lista de abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de varianza
BG	Localidad muestreada en Banco de Germoplasma, Tenampulco, Puebla
BPI	Intensidad de Pico Base (“Base Peak Intensity”)
CHEBI	Acrónimo de base de datos: Chemical Entities of Biological Interest (Entidades de químicas de interes biológico)
ChemSpider	Base de datos de estructuras moleculares
CSH	Charged Surface Hybrid (Acrónimo que significa “Superficie Híbrida Cargada”) De Kyoto de genes y genomas)
dpf	Días post fertilización (se usa indistintamente a días post polinización(dpp))
dpp	Días post polinización
EZ Info	Software para hacer análisis estadísticos multivarianza
FA	Ácido fórmico
FC	Acrónimo de Fold change (“Tasa de cambio”)
FDR	Acrónimo de Rango de Descubrimiento Falso (“False Discovery Rate”)
GC	Cromatografía de gases
H ₂ O	Agua
HDMS	Espectrometría de masas de alta definición
IUPAC	Acrónimo de International Union of Pure and Applied Chemistry (“Unión Internacional de Química Pura y Aplicada”)
Inf	Infinito
K	Potasio
KEGG	Acrónimo de base de datos: Kyoto Encycolpedia Genes and Genomes (“Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas”)
LC	Localidad muestreada en Los Caracoles, Tenampulco, Puebla
m	Pendiente
m/z	Relación masa / carga
M1	Muestra 1

M2	Muestra 2
M3	Muestra 3
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
N	Nitrógeno
Na	Sodio
p.val	Valor de p
p. corr	Valor de p corregido (sinónimo FDR)
PCA	Análisis de componentes principales
PF	Peso fresco
Pue.	Puebla, México
QC	Control de calidad
qTOF	Cuádruplo tiempo de vuelo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SMILES	Formato de archivo de arquitectura molecular (“Simplified Molecular Input Line Specification”)
SR	Localidad muestreada en San Rafael, Veracruz
TA	Temperatura ambiente
TIC	Cromatograma de iones totales (“Total ion chromatogram”)
UPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión
Ver.	Veracruz, Veracruz
VpPAL	Fénil-amoniaco liasa en <i>V. planifolia</i>
VpTAL	Tirosina-amoniaco liasa en <i>V. planifolia</i>
VpVAN	Sintasa de vainillina en <i>V. planifolia</i>

Lista de unidades

%	Por ciento
° C	Grados Celsius
μJ	Microjules ($1 \cdot 10^{-6}$ J)
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
cm	Centímetros
cm ³	Centímetros cúbicos
eV	Electronvoltio
g	Fuerza g
g/mol	Gramos por mol
g	Gramos
H	Hora
Hz	Hertz
J	Joules
kPa	Kilopascal
L	Litros
M	Moles
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
mb	Milibares
mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Min
mL	Mililitros
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimoles
Pa	Pascal (Unidad de presión)

ppm	Partes por millón
t	temperatura
T	Tiempo
v/v	Volumen/volumen

Resumen

El conocimiento de las plantas ancestrales se debe a experimentos de prueba y error, nuestros antepasados a través de las generaciones han probado que tipos de plantas pueden ser benéficas en distintos padecimientos y útiles para fines alimenticios.

Vanilla planifolia es una planta parasita, suculenta que sube como enredadera en su tutor (guía), tarda de tres a cuatro años para que se dé su floración en condiciones óptimas de desarrollo, cuando emerge y se abre la flor se procede a polinizar manualmente, teniendo un tiempo de maduración frutal de ocho a nueve meses, cumplido este lapso de tiempo, para obtener el producto final se tiene que dar un proceso de beneficiado que le permite al fruto obtener sus propiedades organolépticas características por las que es valorado en el mundo.

Se sabe que la calidad química del fruto beneficiado se mide principalmente con cuatro moléculas: vainillina, ácido vainillínico, ácido hidroxibenzoico y hidroxibenzaldehído. Asimismo, su aroma viene dado por al menos una combinación de 250 moléculas en las vainas curadas procedentes de México. La biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos (aromáticos) se da dentro de ciertos organelos llamados feniloplastos que son una clase de cloroplastos especializados dentro de la vaina de *V. planifolia* capaces de producir vainillina, vainillina glucosilada y otros fenólicos glucosilados.

En esta ocasión, para un ANOVA bifactorial tomamos vainas de *V. planifolia* en 3 distintas localidades en la denominación de origen durante 6 etapas del desarrollo frutal. Con una corrección por FDR al 5%, encontramos que la localidad afecta significativamente la abundancia de ciertos iones no pre-identificados, además en los ANOVA de un factor en la última etapa de desarrollo entre las localidades encontramos diferencias en iones pre-identificados como el ácido isovainillínico, por lo que la localización tiene una influencia más notable durante la última etapa del desarrollo en el metaboloma de frutos de *V. planifolia*.

Abstract

The knowledge of the ancestral plants is due to experiments of trial and error, our ancestors through the generations have proven different types of plants which can be beneficial in different conditions and useful for food purposes.

V. planifolia is a parasitic, succulent plant that climbs as a vine up its tutor (guide), it takes three to four years for its flowering to take place under optimum conditions of development, after which the flower is pollinated manually, taking a time of fruit maturation of eight to ten months, once completed this time, and in order to obtain the final product, a process of curing must be given that allows the fruit to obtain its characteristic organoleptic properties, for which it is valued in the world.

It is known that the chemical quality of the cured pod (fruit) is given by four main molecules: vanillin, vanillic acid, hydroxybenzoic acid and hydroxybenzaldehyde. Also, its aroma is given by at least a combination of 250 molecules in the cured pods from Mexico. The biosynthesis and accumulation of phenolic (aromatic) compounds occurs within certain organelles called phenyloplasts that are a class of specialized chloroplasts inside the vanilla bean capable to produce vanillin, gluco-vanillin and another glycosylated phenolics.

On this occasion, for a two-way ANOVA we took *V. planifolia* pods in three different locations in the designation of origin during six stages of fruit development. With an FDR from 5% we found that location affects the abundance of certain not pre-identified ions, further for a one-way ANOVA in the last developmental stage between the three locations clearly showed that there are differences in pre-identified ions, such as isovanillic acid, and in other ions yet to be identified. We concluded that the location effectively influences the metabolome of *V. planifolia* fruits which is more noticeable during the last developmental stage.

“Leyenda de la vainilla mexicana “

El conocimiento de las plantas medicinales se encuentra registrado en distintos códices y pinturas arqueológicas que ha sido transmitido a través de las generaciones mediante leyendas o historias fantásticas de la tradición Mexicana, un ejemplo es la compilación de J. Nuñez Domínguez, acerca de la vainilla (Caxixanath): “Durante el reinado del rey Teniztli III, una de sus esposas dio a luz a una hija cuya belleza era tan grande que la nombraron Tzacopontziza (“Estrella brillante al amanecer”) y fue consagrada al culto de Tonacayohua. A medida que pasaba el tiempo, un joven príncipe llamado Zkatán-Oxga (“Joven venado”) y Tzacopontziza se enamoró, sabiendo que podía ser condenada a muerte. Un día la bella joven salió del templo a buscar tortillas para la ofrenda para Tonacayohua, pero nunca volvería, ya que huyó con el “Joven venado” a las montañas en la distancia. Pero no mucho tiempo después, un monstruo apareció y los rodeó con un muro de fuego, ordenándole regresar. Cuando la pareja regresó al templo estaba siendo esperada por un grupo de sacerdotes furiosos que los recibieron con disparos de dardos para posteriormente sacrificados, sacándoles el corazón y arrojando sus cadáveres a un barranco. El lugar donde aterrizaron los cuerpos había una hierba que se comenzó a marchitar como si la sangre de los enamorados llevase una maldición. Tiempo después, un nuevo árbol comenzó a crecer, y junto a su tronco comenzó a ser invadido por una orquídea que lo trepaba y era increíblemente vigorosa. En poco tiempo había ramificado y cubierto el árbol con sus hojas frágiles y elegantes y protegida por el árbol, la orquídea creció hasta que tomó la forma de una mujer tendida en los brazos de su amante. Un día, la orquídea se cubrió con pequeñas flores y toda el área se llenó con un exquisito aroma. Atraídos por el agradable olor, los sacerdotes y los pobladores fueron a observar, y nadie dudó que la sangre de los jóvenes amantes se había transformado en el árbol y la orquídea trepadora. Para su sorpresa, las pequeñas flores hermosas también se transformaron en frutos grandes y delgados. Cuando los frutos maduraron, lanzaron una fragancia dulce y sutil cuya esencia invocó el alma inocente de Tzacopontziza y las más exóticas fragancias. Así nació la vainilla, la que se llama Caxixanath (“Flor Recóndita”), que es una planta sagrada y una ofrenda divina en los templos Totonacos” (Hernández-Hernández, 2011)

En las antiguas culturas Totonacas se consideraba una flor de alto valor, inclusive era restringida, y sólo los sacerdotes y los gobernantes de esos tiempos podían consumir una bebida llamada xocolatl que consistía en cacao, vainilla, anís y agua, su flor era llamada Xanat (Caxixanath) que significa flor recóndita en Totonaco (Hernández-Hernández, 2011).



Fragmento del mural "Papantla" resaltando la representación gráfica de la vainilla mexicana (Cano, 1950).

1 Introducción

La vainilla (*V. planifolia*) es una planta trepadora parásita que se da principalmente en regiones tropicales, es originaria de México, donde presuntamente fue utilizada principalmente por los Aztecas y los Totonacas, se aumentó su producción durante la expansión del cultivo a todo el mundo, al ver que solamente se daban los frutos en México, adquirió valor importante en el mercado mundial, a pesar de ser frutos difíciles de producir, su valor monetario es volátil y es una de las especias más caras mundialmente (O'Reilly, 2018; Pagano & Echeverría, 2018).

El cultivo de esta planta ha generado un particular interés en los últimos tiempos ya que se ha descubierto que tiene propiedades como nutracéutico generando beneficios a largo plazo (Anuradha, Shyamala, & Naidu, 2013). Además, se ha comprobado que estos beneficios vienen dados por el potencial antibiótico que presentan los compuestos químicos dentro de los extractos etanólicos principalmente (Kim et al., 2014). De igual manera los extractos presentan actividad anticancerígena contra cáncer de colon inhibiendo el proteosoma y reduciendo la proliferación celular (Li et al., 2018; Marton et al., 2016; Yusof et al., 2019). Pero a pesar de existir tantos beneficios al consumir esta planta existe una baja en el abastecimiento de frutos beneficiados de *V. planifolia*, a causa de que la mayor cantidad de extracto natural que se consume en todo el mundo se obtiene mediante procesos biotecnológicos y es más barato (Gallage & Møller, 2015).

Existe una serie de problemas sociales respecto esta planta a nivel mundial debido a su alto valor actual dentro de los mercados internacionales, genera vandalismo y una serie de actos ilícitos que resultan involucradas grandes empresas que se dedican a la recolección de frutos beneficiados y existen casos que las grandes empresas llegan a comprar producto robado (O'Reilly, 2018). Esto genera un gran problema económico porque es un cultivo que necesita mucho cuidado desde el momento de la polinización manual hasta el beneficiado, entonces se afecta a los productores que a pesar de ganar poco además se tienen que cuidar de los fieros ladrones (Kancungira, 2019; O'Reilly, 2018).

| El valor de los frutos beneficiados viene dado por sus propiedades organolépticas, la vainilla mexicana (*V. planifolia*) es reconocida mundialmente como la que presenta una mejor calidad por su aroma (Hassan et al., 2016; Schwarz & Hofmann, 2009). Se sabe que el microbioma tiene una fuerte influencia en el carácter organoléptico final de los frutos durante el proceso de beneficiado (Gu, Chen, Fang, Wu, & Tan, 2015). El aroma se consigue por los compuestos que se obtienen en el proceso final de beneficiado y el tiempo de cosecha (Sánchez-Galindo, 2019), los procesos de beneficiado se han modificado en los cultivos orientales para aumentar la producción (Sreedhar et al., 2007; Zhang et al., 2014) reduciendo los tiempos de beneficiado pero también la cantidad de vainillina y distintos compuestos aromáticos, así como la calidad en general.

Nuestro método analítico permitió identificar y preidentificar moléculas vainilloides, así como iones durante el desarrollo con influencia discreta de la localidad dentro de las tres localidades, esto para ambos modos de ionización (positiva y negativa).

Se encontraron iones diferenciales en los ANOVA de dos factores, se detectaron iones por ionización positiva y negativa, para estos análisis de varianza se usó un ajuste por FDR al 5% en el que 4 de 965 iones detectados presentaron cambios para la ionización positiva por efecto de la localidad únicamente, tanto que en modo negativo 9 de 1881 iones presentaron cambios significativos por efecto de la localidad. Durante la última etapa de desarrollo evaluada en este experimento realizamos un ANOVA de un factor entre las 3 localidades encontrando 50 iones afectados por la localidad, comparando la localidad de Los Caracoles y San Rafael, cuando comparamos el Banco de Germoplasma y San Rafael hubo 9 iones sin pre-identificar con variaciones significativas entre estas localidades. Por último, en esta parte del análisis sumamos la localidad de Los Caracoles y el Banco de Germoplasma en una sola, ya que no encontramos diferencias significativas entre ellas, tomando estas localidades como Tenampulco, que es el municipio donde se encuentran estas dos localidades y lo comparamos contra San Rafael, encontramos iones pre-identificados con diferencias significativas, como el ácido isovainillínico, entre otros

compuestos putativos, así como iones sin pre-identificar durante la última etapa del desarrollo.

Se realizaron análisis de componentes principales que revelan que existe una influencia de la localidad en los metabolitos que se producen en las vainas de distintas localidades, además en los distintos ANOVA se compararon los metabolitos obtenidos en las vainas de distintas localidades y durante la última etapa del desarrollo, se encontraron diferencias significativas en algunos iones sin pre-identificar, presentes en la localidad de Los Caracoles y no en Banco de Germoplasma y San Rafael por lo que los iones encontrados pueden ser únicos de la localidad.

Es de suma importancia conocer qué metabolitos se producen y cómo se da la acumulación dentro de los frutos de *V. planifolia*. La biosíntesis de sus principales productos naturales es lenta. Por lo tanto, entender que rutas bioquímicas se encienden y se apagan durante el desarrollo frutal es necesario para generar estrategias de mejora en la producción de frutos de *V. planifolia* de manera sustentable y de mejor calidad, para que en caso de que en distintas localidades existan condiciones ambientales idóneas para el desarrollo de los frutos de este cultivo, tratar de implementarlas y llevarlas a la práctica, para evitar el rezagotecnológico en la producción de este valioso fruto.

1.1 Antecedentes

1.2 Generalidades de la planta de vainilla (*Vanilla planifolia*)

V. planifolia presenta un desarrollo ideal bajo los siguientes parámetros climáticos: 20 y 30 °C tanto de día como de noche, abundantes precipitaciones, humedad relativa inferior al 80%, sombra ligera del 50%, precipitación anual de al menos 2000 mm, altitud sobre el nivel del mar inferior a los 600 msnm y suelos con abundante hojarasca (SAGARPA,2017).

La vainilla es una planta y lo que se comercializa son sus vainas curadas con el proceso de beneficiado tradicional mexicano o bourbon (Islas Reunión) que tarda alrededor de 6 meses para obtener el producto final. En el mercado además existen extractos de sus frutos beneficiados. Los extractos comerciales del supermercado solamente presentan una o un conjunto de las moléculas aromáticas como: vainillina, ácido vainillínico y étil vainillina. Aunque algunos extractos comerciales del supermercado son obtenidos por procesos biotecnológicos, es decir, contiene derivados artificiales obtenidos a través de procesos biotecnológicos (Converti, Aliakbarian, Domínguez, Vázquez, & Perego, 2010; Gallage & Møller, 2015; Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, 2017).

La esencia obtenida mediante procesos biotecnológicos no es comparable con el dulce aroma del extracto de frutos beneficiados de la vainilla natural, que contienen compuestos vainilloides mencionados previamente, y un conjunto de aproximadamente 250 compuestos que se agrupan en distintas familias de compuestos químicos como: flavonoides, alcaloides, ácidos grasos, cresoles, fenólicos, alcaloides, entre otros (Gallage & Møller, 2015; Hassan et al., 2016; Schwarz & Hofmann, 2009)

En general los frutos de *V. planifolia* presentan una fuente de ingresos no tan importante para los productores, en cambio las empresas sacan provecho de estos productos, beneficiando las vainas y comercializando el producto beneficiado a altos precios (Pagano & Echeverría, 2018).

1.3 Importancia socioeconómica

La vainilla es un cultivo que demanda mucha atención, dado que su polinización es manual, lo cual requiere al menos 150 jornales capacitados para poder polinizar una hectárea de cultivo, es una fuente de trabajo rentable en México, Indonesia, Madagascar, Papúa Nueva Guinea, entre otros países productores, desgraciadamente esta actividad ha sido monopolizada por China, quiénes, sin tener las condiciones ambientales óptimas en su territorio, compran vainas verdes en las regiones de Indonesia y Madagascar, así como territorio en dichos países, y en esos mismos terrenos generan plantas de beneficiado y lo exportan principalmente a Europa (FAO, 2018).

El cultivo de la vainilla puede generar ganancias por alrededor de \$15,000,000,000 pesos anualmente (FAO, 2018) siendo comercializado como extracto y en vainas completas, el aroma de los frutos beneficiados es altamente valorado en la cocina gourmet. Un kilo de este fruto puede llegar a obtener un precio de \$15,000 pesos (Pagano & Echeverría, 2018), cuando cumple todas las características necesarias para ser considerada como vainilla de Papantla grado gourmet (tamaño, componentes químicos, humedad, consistencia y color) acorde a la NOM que también se basa en normativa ISO (SAGARPA, 2017).

Existe un interés genuino por parte de la industria en este cultivo. Las principales regiones productoras tienen una gran derrama económica gracias a este cultivo, por otro lado, se sufre una crisis económica en esos países lo cual lleva a pobladores a usurpar estos valiosos frutos (Kancungira, 2019). A pesar de las pérdidas, Madagascar, Indonesia y China, y permanecen como los principales productores de este fruto, seguidos de Papúa Nueva Guinea y México. En México se tiene una problemática distinta ya que el aumento de la temperatura durante la primavera y el verano asciende a más de 40 °C, lo que puede propiciar que las vainas de vainilla aborten (que se caiga el fruto), incluso hay registros de que hubo una sequía tan grande que acabó con el 90% de los cultivos de vainilla en distintas regiones productoras (FAO, 2018; SAGARPA, 2017).

Un reto al que se enfrentan los productores, más que ambiental y social, no sólo en México sino alrededor del mundo es el robo de las vainas en los sembradíos, e inclusive casos de secuestro por tan codiciado producto, el valor en el mercado en los últimos años ha tenido un aumento en su valor, incluso mayor que la plata (O'Reilly, 2018; Pagano & Echeverría, 2018; Kancungira, 2019)

1.4 Origen y taxonomía

V. planifolia es una especie del género *Vanilla* que a su vez pertenece a la familia Orchidaceae, existen datos de estimación del tiempo de divergencia del género de *Vainilla* con el método del reloj molecular, tomando muestras de hojas de *V. planifolia* se estimó que aproximadamente este género tuvo una aparición hace aproximadamente 71 millones de años (Bouetard et al., 2010; Donini et al., 2008; Godwin, Aitken, & Smith, 1997; Ramos-Castellá et al., 2016).

Pertenece al dominio Eukarya, al reino Plantae, subreino Viridiplantae, infrareino Stereophyta, al filo Magnoliophyta, a la clase Liliopsida, al orden de los Orchidales, a la familia Orchidaceae que es una familia de plantas tropicales principalmente, al género *Vanilla*, a la especie *V. planifolia* (ITIS, 2019)

1.5 Partes de la planta

1.5.1 Hojas de *V. planifolia*

Las hojas de *V. planifolia* son gruesas, firmes y succulentas. En México existe una mezcla de subespecies de esta orquídea, conociéndose las más comunes como: Vainilla Fina (sinonimia “Mansa”, con diversos tipos como “Verde”, “Amarilla”, “Cazones”, “Zozocolco”, “Rica Palacio”, “Venezuela”, etc.) Vainilla Rayada (sinonimia “Tarro” o “Acamaya”), Vainilla Oreja de Burro y Vainilla Mestiza. Las hojas de estas subespecies presentan diferencias en la morfología, el tipo de hoja presenta un tamaño promedio de 20 cm de largo por 8 cm de ancho con un espesor de 0.2 cm de la variedad “Mansa” (Díaz-Bautista et al., 2018; NOM-182-SCFI, 2011; Parra, 2017; Schlichting, 1986; Villanueva-Viramontes, 2017; Weckwerth, 2011 Imagen 1).



Imagen 1.- Hojas de *V. planifolia* en Papantla, Veracruz, México durante la etapa de floración, (Macías, J. 2018)

1.5.2 Flores de *V. planifolia*

La flor de esta planta tiene un tamaño aproximado de 8 cm de diámetro, su polinización tiene que darse manualmente en las plantaciones comerciales para producir vainas curadas, en su ambiente natural las poblaciones de abejas (*Euglossa*) tienen un bajo porcentaje de polinización (~1%). Se descubrió que las flores podían polinizarse manualmente, cuando los colonizadores en el siglo XIX llevaron de México la planta de vainilla a la isla de La Reunión (propiedad de Francia), donde crecía perfectamente, pero las flores no presentaban frutos después del desarrollo floral. Hasta que en 1841 Edmond Albius, un esclavo, sugirió que las flores se tenían que polinizar manualmente, lo que revolucionó su producción alrededor de todo el mundo (Herandéz-Herandéz, 2011; Villanueva-Viramontes et al., 2017; Anuradha, Shyamala, & Naidu, 2013).

La floración de esta planta se restringe desde inicios de la primavera durante los últimos días de marzo hasta los primeros días de mayo, en México, tiene un color amarillo canario, aunque existen reportes de que puede tener tonalidades verduzcas, así como un color amarillo más fuerte dependiendo de las condiciones climáticas y la subespecie.

La flor cuenta con 3 sépalos, 3 pétalos, así como un lobelo que es la estructura donde se encuentran los órganos sexuales (antera, róstelo, estigma, tubo polínico y ovarios), el lobelo se conecta con los ovarios a donde llegan los granos de polen, después de polinizar que se puede apreciar en la imagen2 (Anuradha et al., 2013) se observa una flor recién polinizada (una potencial vaina) , debajo del pétalo a la izquierda se aprecia una flor polinizada exitosamente y arriba a la izquierda un botón floral (Imagen 2).

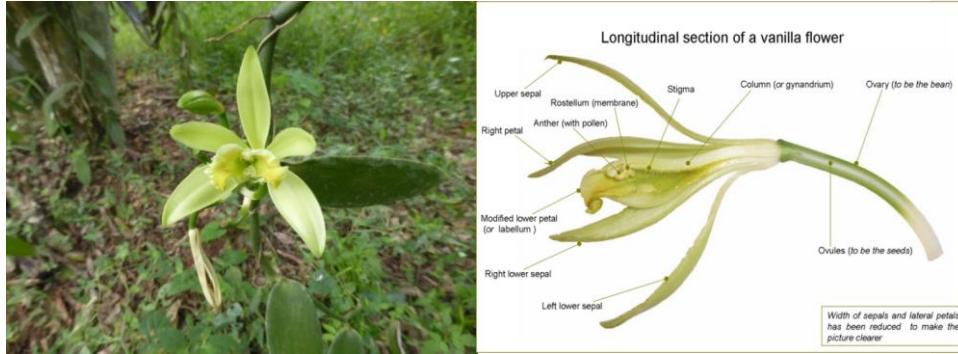


Imagen 2.- Flor de *V. planifolia* en San Rafael, Veracruz a la izquierda, (Macías López, J. 2018), a la derecha se aprecian las estructuras florales de *V. planifolia* (Anuradha, Shyamala, & Naidu, 2013)

1.5.3 Raíces

Las raíces que generan las plantas de *V. planifolia* son de anclaje (Imagen 3) y de absorción de nutrientes, son superficiales porque se anclan en su mayoría, pueden llegar a tener una profundidad incluso de 20 a 30 cm y la extensión depende más del tutor al que éste anclada y del tamaño de la planta (Hernández-Hernández, 2011) (Figura 3).

Para su adecuado crecimiento se usa un sustrato con alto contenido de Potasio, Nitrógeno, Fosfatos y Calcio al utilizar tallos y hojas de árboles de plátano, junto con hojarasca de la vegetación cercana y una cantidad equivalente de tierra y humedad para que toda la materia orgánica sufra procesos de fermentación y descomposición a través de los microbios presentes en el suelo, este sustrato es llamado “bokashi” que significa materia orgánica fermentada, es ideal para que se dé el crecimiento de esta orquídea (Hernández-Hernández, 2011; Parra, 2017; SAGARPA, 2018).



Imagen 3.- Raíz de *V. planifolia* anclada a un árbol de naranja (*Citrus X sinensis*) en San Rafael, Veracruz (Macías López, J. 2018).

1.5.4 Frutos

Los frutos son los órganos más estudiados de esta valiosa planta que ha recobrado interés, desafortunadamente el cambio climático y diversos eventos climáticos, (e.g. huracanes, tormentas tropicales y ciclones) impactan negativamente en las principales regiones productoras (i.e. Indonesia y Madagascar) y presentan pérdidas en la producción, con esto se han generado buenas proyecciones de mercado para que los productores mexicanos se posicionen mejor como un importante proveedor en un futuro no lejano, pues las estimaciones predicen que habrá un aumento de producción al menos por 3,000 toneladas netas para el 2030 según estudios de la SAGARPA del 2017 en México (Imagen 5).



Imagen 4.- Frutos de *V. planifolia* después del beneficiado. (SAGARPA 2017)

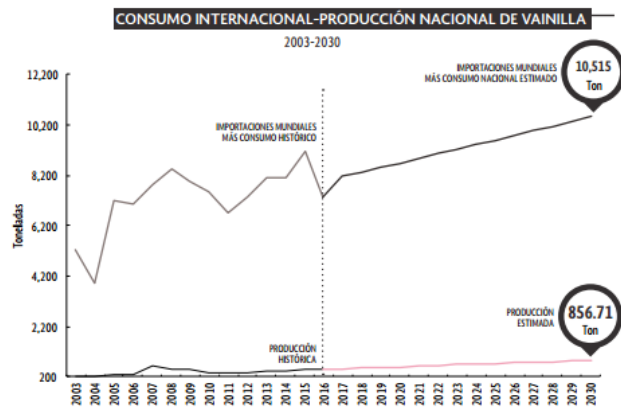


Imagen 5.- Proyección del consumo Internacional y de producción nacional de vainilla. (SAGARPA, 2017)

Por cada flor polinizada manualmente se obtiene una vaina, se tarda aproximadamente de 8 a 9 meses en madurar y obtener su peso máximo, aspecto importante a considerar porque los productores en su mayoría venden las vainas verdes (Palama et al., 2009).

Para que estos frutos tengan un considerable aroma a vainilla deben sufrir un proceso de beneficiado que consiste en un tratamiento postcosecha, en el cual, mediante una serie de pasos, se deshidrata la vaina y se dan procesos enzimáticos dentro de la vaina, proceso que se describe posteriormente, se tiene que tener cuidado de que no se sequen demasiado y que no queden demasiado húmedas (25-38%) ya que al perder flexibilidad pierde la denominación de calidad según la NOM-182-SCFI, aunque se puede dar un proceso de acondicionamiento para rehumedecer las vainas. Además la NOM-182-SCFI establece que cada vaina debe medir al menos 15 cm, para poderse considerar como

“Vainilla de Papantla” de calidad gourmet (entre otros factores organolépticos), esa denominación integra la región del norte de Veracruz y Puebla en la región de Totonacapan (Hernández-Herandéz, 2011).

Los frutos constan de pericarpio, mesocarpio, placenta, tricomas internos y semillas, la principal actividad de biosíntesis de compuestos aromáticos se da dentro del mesocarpio y la placenta. La presencia de cloroplastos y feniloplastos dentro de la vaina verde produce reacciones de síntesis y almacenamiento de compuestos aromáticos como vainillina, vainillina glucosilada, benzaldehídos, entre otros, después de los 3 meses de desarrollo frutal que pueden estar presentes en las zonas distales del mesocarpio (Brillouet et al., 2014; Gallage et al., 2014, 2018; Palama et al., 2009).

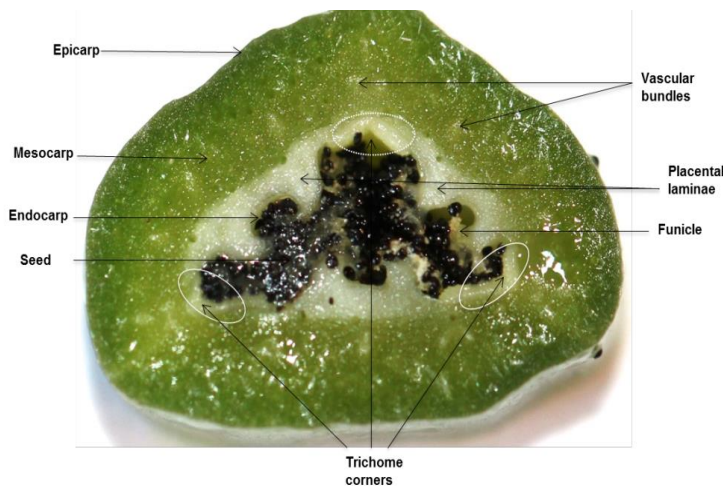


Imagen 6.- Estructura interna del fruto de *V. planifolia* con 6 meses post polinización (Gallage et al., 2018)

A pesar de que aún no se conoce de manera exacta cómo se da la biosíntesis de la vainillina y distintos precursores del aroma del fruto beneficiado de *V. planifolia*, existen moléculas que continúan siendo descubiertas por distintos métodos cuantitativos y cualitativos (LC-MS, GC-MS, NMR, HPLC-PDA, TLC, HPTLC por sus siglas en inglés). Existen estructuras moleculares que a pesar de su estructura no se sabe si tienen una

influencia directa en el aroma de la vainilla y sus extractos. Un ejemplo de ellas son: (1-O-vainilloil)-(6-O-feruloil)- β -D-glucopiranososa, entre otros compuestos con estructuras unidas por un enlaces carbono - carbono (Dignum, Van Der Heijden, Kerler, Winkel, & Verpoorte, 2004; Pérez-Silva et al., 2006; Schwarz & Hofmann, 2009).

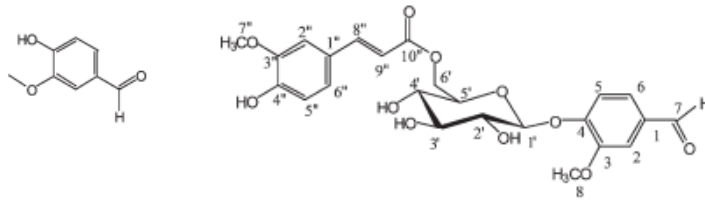


Imagen 7.- Estructura química de la molécula de vainillina (4-metoxi-3-hidroxibenzaldeído) a la izquierda y a la derecha (1-O-vainilloil)-(6-O-feruloil)-beta-D-glucopiranosido (Modificado de Shwarz & Hofmann, 2009).

1.5.5 Tiempo de floración y polinización

V. planifolia tiene un periodo de floración restringido de finales de marzo a los principios de mayo en la región de Totonacapan, cuando una flor está abierta sólo puede ser polinizada durante el par de días que permanece abierta, pero en un racimo es raro ver muchas flores listas para polinizarse simultáneamente.

Para que pueda darse la polinización el polen tiene que insertarse dentro del róstelo para que difunda por el tubo polínico hacia los ovarios, por cada flor polinizada se obtiene un fruto (Hernández-Hernández, 2011).

1.5.6 Beneficiado de las vainas

Después de cosechar las vainas, para obtener el aroma característico de la vainilla se da un proceso postcosecha, que consiste en deshidratar parcialmente las vainas, en el que la molécula de vainillina se encuentra unida a una glucosa, para liberar la vainillina se tiene que liberar de la glucosa mediante una hidrólisis. En las distintas regiones del mundo se han considerado distintos procesos para el beneficiado (Sreedhar, Roohie, Venkatachalam, Narayan, y Bhagyalakshmi, 2007) lo que proporciona un aroma característico en cada región, además se sabe que los endófitos presentes en una vaina pueden tener influencia directa en el aroma de las vainas (Gu et al., 2015; Zhang et al., 2014).

A pesar de existir distintos métodos de beneficiado se consideran 4 pasos generales para obtener vainas beneficiadas: matado, sudado, secado y acondicionamiento.

Existen varias formas de matado (al sol, en horno, en una vasija y agregándole agua caliente por algunos minutos), el objetivo del matado, es provocar una disrupción a nivel celular y permitir que las enzimas (β -glucosidasas) entren en contacto con su sustrato (vainillina glucosilada) (Anuradha et al., 2013). Posterior a esto se da el sudado, aquí se desarrolla el aroma y el color negro de la vainilla, en este paso las vainas deben estar en condiciones de alta humedad y temperatura (45-65 °C) por 7-10 días, esto para aumentar la actividad enzimática, aunque se sabe que las β -glucosidasas tienen una mayor eficiencia a 38 °C y a un pH de 6.5 (Dignum, 2004). En este paso se dan procesos bioquímicos en los que interactúan los microbios que sobreviven el proceso de matado. El proceso de secado consiste en deshidratar las vainas sin que pierdan demasiada agua para que conserven su flexibilidad, el método más comúnmente usado para secar es el tradicional: al sol y al aire, extendiendo las vainas en tapetes cuidándolas de la lluvia siempre. Se puede propiciar el crecimiento de hongos por exceso de humedad y se pierda la cosecha (Zhang et al., 2014). Al pasar el día las vainas deben ser almacenadas durante la noche en telas para evitar el enmielado que también puede propiciar la aparición de hongos indeseables. Algunas veces este proceso se puede considerar como el paso final, en caso de existir una deshidratación excesiva, surge el paso del acondicionamiento, en el que se “acondicionan” las vainas para

no generar una pérdida total del producto, las vainas se ponen en cajas de madera por algunos meses para rehidratarlas (Anuradha et al., 2013; Schwarz & Hofmann, 2009).



Imagen 8.- Beneficiado de vainilla en tapetes. Tomado de: culturaenpapantla.blogspot.com

1.6 Plasticidad fenotípica en función del ambiente

La plasticidad fenotípica se describe como la capacidad de un organismo individual cambie su fisiología o morfología en respuesta a los cambios dentro de las condiciones ambientales en las que se desarrolla (Schlichting, 1986), por ejemplo si se priva de luz una planta puede que presente cambios en el tamaño de la hoja y eso es una respuesta al ambiente lo cual le exige una optimización de nutrientes para lo cual disminuir el tamaño le ayudaría a transportar una menor cantidad de nutrientes de manera más eficiente. (Tohge, Watanabe, Hoefgen, & Fernie, 2013; Weckwerth, 2011).

Las características fenotípicas pueden ser evaluadas en experimentos para analizar cómo varían en distintos ambientes, buscando cambios fisiológicos o en la morfología, este tipo de cambios permite que una planta tenga un mejor *fitness* que otra, por lo tanto, este tipo de fenómenos son importantes desde un punto de vista ecológico y evolutivo, la relación Genotipo-Ambiente (G x E) varía entre especies y en los caracteres que puedan resultar afectados en función del ambiente (Weckwerth, 2011).

Se sabe que existe una muy leve variación genética en las plantas de *V. planifolia* alrededor del mundo (Bory et al., 2008). No obstante hay evidencia de que el fenotipo de las hojas, las flores y los frutos no se comparte entre las distintas regiones donde existe esta planta (Donini et al., 2008; Godwin et al., 1997; Ramos-Castellá et al., 2016).

Dentro del fruto verde de *V. planifolia* existe una gran cantidad de compuestos fenólicos que están presentes para cumplir distintas funciones como la antibiosis, señalización, entre otras que se encuentran en el endocarpio (Imagen 6), en la placenta crecen y se almacenan las semillas por lo que se cree que los compuestos que se producen tienen la finalidad de combatir todos los posibles microbios que puedan atentar contra la integridad de la semilla (Gallage et al., 2014; Kim et al., 2014; Mehdi, Rohani, Mahmoudi, Kaboudari, & Kazeminia, 2018).

1.7 Organelos frutales

Dentro del citoplasma de células del mesocarpio y el endocarpio, se encuentran organelos llamados feniloplastos que sirven en la producción y almacenamiento de vainillina dentro de las vainas de *V. planifolia*, los feniloplastos son cloroplastos modificados que tienen la capacidad de convertir ácido ferúlico y ácido ferúlico glucosilado en distintos productos como: vainillina o vainillina glucosilada respectivamente (Gallage et al., 2014).

En un experimento mediante isótopos radiactivos marcados, viendo el rendimiento de las reacciones al poner estos sustratos marcados a interactuar con los cloroplastos y los feniloplastos aislados de vainas verdes con 3 y 6 meses de desarrollo frutal, se comprobó dicha biosíntesis (Brillouet et al., 2014; Gallage et al., 2014; Joel et al., 2003), comprobando que existe una enzima que sintetizaba altas cantidades de vainillina, corroborado por técnicas de biología molecular, microscopía de fluorescencia y espectrometría de masas (Gallage et al., 2018) en la que se demuestra la ubicación en tiempo real de la enzima VpVAN después del tercer mes post polinización y en su etapa madura, como ya se sugería previamente (Brillouet et al., 2014; Gallage et al., 2014), cabe resaltar que se descubrió que la enzima VpVAN forma dímeros trímeros y tetrameros en etapas tempranas del desarrollo frutal pero estas cambian a monómeros conforme madura el fruto.

1.8 Compuestos vainilloides en la calidad de las vainas curadas

Existe una gran abundancia de compuestos fenólicos reportados para esta planta, a ciencia cierta no se sabe qué tan abundante es la diversidad metabólica que presentan los frutos se reportan entre 200 y 250 compuestos químicos en el producto final después del beneficiado (Anuradha et al., 2013; Hassan et al., 2016; Pérez-Silva et al., 2006).

Dentro de los compuestos químicos importantes se conocen 4 indicadores del aroma y el sabor de las vainas, se requiere una concentración mínima en ppm para considerar las vainas como originarias de Papantla según la NOM-182-SCFI, estas 4 moléculas y sus rangos de concentración son: hidroxibenzaldehído (219-498 ppm), ácido vainillínico (411-861 ppm), ácido hidroxibenzoico (58-100 ppm) y vainillina (2 ppm), estas moléculas no pueden faltar en un extracto natural de vainas de vainilla natural, según la NOM-182-SCFI (2011) y deben estar en estas proporciones o se considera que puede ser un producto falsificado (Busconi et al., 2017; Hansen, Fromberg, & Frandsen, 2014).

Además de estudiar la dinámica de estas moléculas (Lionel et al., 2012; Palama et al., 2009), se han realizado análisis de los compuestos involucrados en el aroma de las vainas después del proceso de beneficiado, en el cual se han identificado una gran cantidad de compuestos volátiles con GC-MS principalmente (Hassan et al., 2016; Pérez-Silva et al., 2006).

Las principales moléculas involucradas en el sabor y el aroma del producto final de la vainilla tienen una alta concentración, así como una gran diversidad de compuestos, de los cuales aún queda mucho por saber, una de las funciones que se les atribuye comúnmente a éste tipo de compuestos son de defensa contra microbios, parásitos, o de atracción de dispersores de semilla, pero en el caso de *V. planifolia* queda mucho por aclarar respecto a cada molécula y su función puntual (Dubery, 2013; Hong, Yang, Zhang, & Shi, 2016; Widhalm & Dudareva, 2015).

Se tienen identificados hasta el día de hoy 21 compuestos derivados del ácido shikímico y la ruta de los fenilpropanoides dentro de las vainas curadas (Hassan et al., 2016; Pérez-Silva et al., 2006) que son moléculas que presentan anillos aromáticos

sencillos, pero queda un gran camino por develar, por ejemplo, qué tipos de mecanismos están involucrados en la biosíntesis de esta gamma tan diversa de compuestos estructuralmente similares, ya que sus estructuras químicas pueden variar en distintos sustituyentes en el anillo aromático lo que permite que las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas presenten variaciones para identificarlas puntualmente por su estructura química y su posible función individual o en sinergia.

1.9 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que tienen actividad biológica, son usados en la defensa contra herbivoría. Además sirven para el transporte de auxinas durante el crecimiento del meristemo apical, en muchas plantas por lo que es una molécula imprescindible durante el desarrollo vegetativo tanto de la planta como de los frutos (Podstolski, 2011; Widhalm & Dudareva, 2015).

En estudios recientes respecto a este tipo de compuestos se comprobó que distintos flavonoides como la quercetina, el kaempferol, la quercetina-3-O-glucosido, el kaempferol-3-O-galactósido están presentes en el desarrollo vegetativo (Guo et al., 2019)

1.10 Ruta de los fenilpropanoides durante el desarrollo

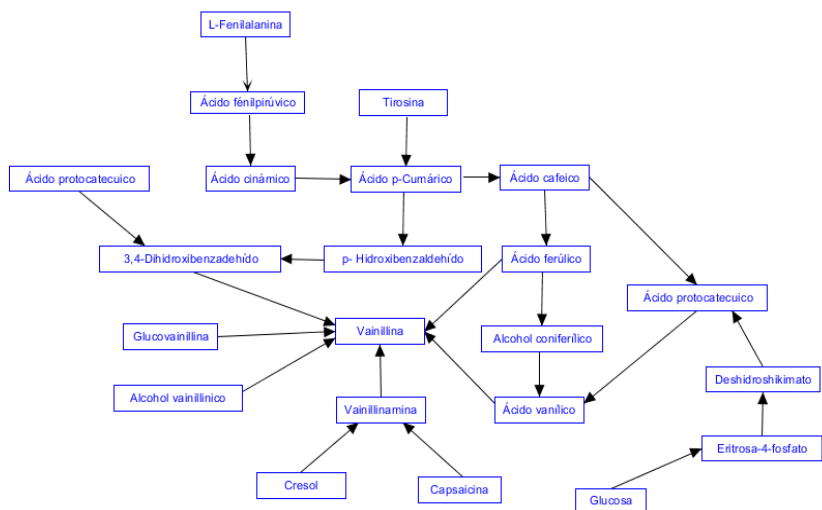
Una de las principales rutas para la producción de compuestos fenólicos aromáticos es la ruta de los fenilpropanoides, las moléculas vainilloides surgen como extensión de dicha ruta metabólica, aquí el ácido ferúlico es convertido a vainillina por la enzima VpVAN, una sintasa de vainillina que tiene la capacidad de generar una β - oxidación en la cadena principal del ácido ferúlico, recortando el único sustituyente C3 y también tiene la capacidad de reconocer el sustrato glucosilado generando una vainillina glucosilada partiendo del ácido ferúlico glucosilado (Gallage et al., 2014).

La ruta de los fenilpropanoides esta conservada en una gran variedad de plantas teniendo distintos roles en las interacciones con microorganismos, insectos y dispersores de semilla, en el caso de *V. planifolia* es de gran importancia ya que presenta una gran cantidad de moléculas aromáticas, además puede producir una gran cantidad de isoformas de estos compuestos.(Hassan et al., 2016; Widhalm & Dudareva, 2015).

Distintas moléculas de esta ruta pueden ser precursores de la formación de compuestos vainilloides aromáticos durante las etapas finales del desarrollo de la vainilla, lo que genera dudas de acerca como se da la biosíntesis de compuestos en las últimas etapas del desarrollo. Existen enzimas promiscuas que tienen la capacidad de reconocer varios sustratos como VpVAN, generando distintos compuestos. Enzimas que se sabe que tienen repercusión en esta clase de metabolitos como la VpPAL y la VpTALson enzimas de la ruta de los fenilpropanoides, la fenilalanina y la tirosina son sus sustratos para la formación de ácido trans cinámico y ácido 4- cumárico respectivamente, son moléculas que contienen el esqueleto precursor de moléculas aromáticas como la vainillina (Hassan et al., 2016).

1.11 Compuestos vainilloides

Los compuestos vainilloides son una familia en la que se incluyen moléculas como la vainillina, ácido vanílico, alcohol vanílico, acetovainillina, vanilnamina, entre otros, sus respectivos isómeros estructurales son los isovainilloides, este grupo de moléculas



comparten el esqueleto de la vainillina que es un anillo aromático con 3 sustituyentes, un benzaldehído con un grupo metoxi y un alcohol en la posición 3 y 4 respectivamente, llamado en la nomenclatura IUPAC, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Imagen 7).

Se conserva este esqueleto molecular para la biosíntesis de más moléculas similares, cambiando ciertos grupos funcionales con distintas reacciones que acortan o agrandan las cadenas de estas moléculas. Por ejemplo, la étil vainillina presenta un grupo etoxi en el carbono 3 del anillo aromático, aquí normalmente se encuentra el grupo metoxi en la vainillina, se presentan las posibles rutas bioquímicas que pueden seguir los precursores de vainillina en la imagen 9, cabe agregar que en este caso no se consideró la estructura de la étil vainillina.

1.12 Redundancia metabólica

La vainillina puede ser producida mediante distintas rutas metabólicas, las cuales están reportadas en el trabajo de Feng Xu, et al 2017, ahí se incluyen varios precursores con

Imagen 9.- Rutas bioquímicas para biosintetizar vainillina, modificado de Gallage et al., 2014; Gu, Chen, Hong, Fang, & Tan, 2017.

distintos orígenes para la biosíntesis de vainillina (Imagen 9). Es bien sabido que existen enzimas promiscuas que pueden actuar sobre distintos tipos de sustratos similares para la síntesis de una gran variedad de moléculas, gracias a enzimas como las VpVAN, VpTAL, VpPAL, entre otras que permiten tener una gran variedad de productos, el tejido de plantas como *V. planifolia* tiene proyección de ser usado en cultivo celular para la biosíntesis de compuestos estructuralmente sencillos pero difíciles de biosintetizar de manera sintética. Este tipo de estrategias biotecnológicas están por tener un alto impacto tanto en la propagación de tejidos, así como la obtención de ciertos metabolitos a gran escala (Cannes & Fett-neto, 2010; Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, 2017).

1.13 Propiedades Nutracéuticas

Algunos efectos importantes de los extractos de vainilla en mamíferos son sobre los canales iónicos de tipo TRPV1 (receptores vainillínicos o receptores de voltaje de potencial transitorio) estos canales no selectivos, al tener un ligando vainillínico, genera un cambio conformacional que permite el aumento de calcio en la célula, y percibir el dolor, cambios en la permeabilidad de un canal influye en la percepción del dolor (Masamoto, Kawabata, & Fushiki, 2009).

Un ejemplo sencillo de las reacciones fisiológicas a estímulos con moléculas de esta naturaleza es cuando se activan los receptores con la capsaicina y cuando el ligando de vainillina actúa sobre el mismo canal, que son un par de estímulos sobre los mismos canales iónicos, pero de forma antagonista. considerando las estructuras moleculares de bajo peso molecular. Cambios en la estructura química del ligando produce una distinta reacción sobre el canal iónico, lo que permite desarrollar novedosos analgésicos usando este canal como blanco (Masamoto, Kawabata, & Fushiki, 2009; Yang & Zheng, 2017)

Se le atribuyen efectos antimicóticos a distintos compuestos vainilloides contra un amplio espectro de hongos que pueden infectar al humano, pero con una baja efectividad, por otro lado se sabe que un par de compuestos vainilloides (o-vainillina y o-étil vainillina) tienen actividad antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* que es el patógeno responsable de la meningitis criptocócica en pacientes con inmunosupresión (Anuradha et al., 2013).

El extracto de vainilla natural tiene un amplio espectro de inhibición contra patógenos involucrados en problemas de salud pública como *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* teniendo una mayor eficiencia en la inhibición del crecimiento de éstos bichos comparándolo con la canela (*Cinnamomum ceylanicum*) y otras plantas medicinales que son comúnmente usadas en la medicina tradicional mexicana (Seyed, 2018).

1.14 Metabolómica como herramienta para determinar abundancia metabólica en plantas

La metabolómica es una herramienta que provee de información acerca del estado bioquímico de las células, tejidos, órganos, respecto a una condición determinada, ya que los estados celulares pueden verse afectados por la etapa de desarrollo en la que se encuentran o inclusive por distintos estímulos (Fiehn, 2002), dentro de los análisis metabolómicos se engloban las moléculas que tienen un peso molecular entre 50 – 1500 Da. A pesar de que existen bases de datos con millones de moléculas anotadas y conocer la existencia de aproximadamente 200,000 metabolitos identificables en plantas (Creydt & Fischer, 2017; Dubery, 2013), todavía queda un largo camino por recorrer para poder develar todas las moléculas y funciones celulares asociadas a nuevas moléculas, además de conocer las estructuras químicas. De igual forma es importante encontrar si se pueden asociar a un fenotipo determinado, para establecer esto debemos de buscar estrategias que nos permitan hacer relaciones entre genes, transcritos, proteínas y metabolitos (Creydt & Fischer, 2017; Dubery, 2013; Fiehn, 2002; Goodacre, Vaidyanathan, Dunn, Harrigan, & Kell, 2004; Guijas, Montenegro-Burke, Warth, Spilker, & Siuzdak, 2018; Hong et al., 2016).

Se han realizado análisis metabólicos de *V. planifolia* desde el 2009, Palama et. al, y se dieron a la tarea de identificar cambios metabólicos en distintas etapas del desarrollo (3 - 8 meses post polinización en cada mes) en vainas verdes, particularmente descubrieron que en sus extractos de vainas maduras desarrolladas se encontraba una mayor cantidad de glucovainillina, vainillina, p-hidroxibenzaldehído, gluco-p-hidroxibenzaldehído y sacarosa, mientras que en las vainas verdes inmaduras presentan el glucósido A (bis[4-(beta-D-glucopiranosiloxi)-bencil]-2-isopropil tartrato, glucósido B (bis[4-(beta-D-glucopiranosiloxi)-bencil]-2-(2-butyl)tartrato, glucosa, ácido málico y el ácido homocítrico estaban aumentados cuantificados mediante LC-MS y NMR (Palama et al., 2009).

Durante el 2012 se llevó a cabo un análisis de *V. planifolia* y algunas especies relacionadas filogenéticamente (*V. tahitensis* y *V. pompona*) infectadas por el virus del mosaico de “la orquídea barco” *Cymbidium*(CymMV), aquí se pudieron dar cuenta de que los efectos de este virus no son significativos en cultivos dentro de invernaderos, se apreciaron cambios en los experimentos in vitro con las plantas infectadas con CymMV teniendo niveles disminuidos de compuestos fenólicos y ácido málico, lo que refleja una leve respuesta inmune por parte de la planta in vitro, teniendo una mejor inmunidad *V. pompona* ante este virus (Palama et al., 2012).

Además se llevó a cabo un análisis metabolómico de las vainas verdes contra vainas beneficiadas que reveló que existe una gran cantidad de compuestos que varían cuando la vaina es verde o beneficiada, los principales cambios fueron atribuidos a la actividad microbiana (Gu et al., 2015), ya que la presencia de moléculas como la vainillina, alcohol vainillínico, cresol, entre otros pueden ser provenientes de enzimas presentes en microbios involucrados en el proceso de beneficiado así como la maquinaria enzimática del fruto de la planta (Gu, Chen, Hong, Fang, & Tan, 2017).

Sigue existiendo investigación acerca de más aspectos metabólicos y genéticos sobre esta planta, principalmente respecto sus frutos, como las etapas ideales para cosechar el fruto (Sánchez-Galindo et al, 2019) donde evidentemente las últimas etapas del desarrollo son idóneas por su peso y contenido metabólico, darle una clasificación entre las mismas variedades y algunas especies cercanas (Díaz-Bautista et al., 2018), además recientemente se generó el primer draft del genoma para esta planta (Hu et al., 2019). Esta información puede usarse para la conservación de la planta buscando cruces viables y variedades resistentes a sequía y a patógenos agresivos como *Fusarium*, por lo que la metabolómica y las demás ciencias ómicas son fundamentales para el entendimiento de la dinámica celular, molecular y química que existe dentro de los distintos sistemas biológicos y sus interacciones con el ambiente.

2.1 Hipótesis

En distintas localidades dentro de la denominación de origen de Vainilla (*V. planifolia*) de “Papantla” existen diferencias en la composición metabólica de vainas durante el desarrollo.

3.1 Objetivo general

Obtener el metaboloma de vainas verdes de *V. planifolia* durante el desarrollo frutal en distintas localidades dentro de la denominación de origen.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Evaluar las diferencias en el perfil metabólico en las distintas localidades usando un método de metabolómica no dirigido.
- 2.- Pre-identificar los metabolitos para construir el metaboloma de vainas verdes de *V. planifolia* durante el desarrollo.
- 3.- Mapear los metabolitos pre-identificados del metaboloma de *V. planifolia* a rutas metabólicas conocidas.

4.1 Metodología

4.2 Etiquetado de plantas y diferencias ambientales entre las localidades

Se colectaron vainas verdes de tres plantas distintas de *V. planifolia* en cada localidad dentro de la denominación de origen “Vainilla de Papantla”, tomando 3 vainas de cada planta para así constituir una réplica biológica por planta. La denominación de origen se encuentra en la zona de Totonacapan que comprende los estados de Veracruz y Puebla, dichos muestreos se realizaron en San Rafael, Veracruz (18 m.s.n.m.); “Rancho los Caracoles” en Tenampulco, Puebla (175 m.s.n.m.) y Banco de Germoplasma en Tenampulco, Puebla (231 m.s.n.m.).

La región con menor altitud sobre el nivel del mar es San Rafael, Veracruz, se encuentra a 18 m.s.n.m. y colinda con los municipios de Tecolutla, Martínez de la Torre, Misantla, Nautla y el Golfo de México, aquí se presenta un clima con altas temperaturas y precipitaciones constantes durante todo el año regularmente, el ejido donde se nos permitió etiquetar para muestrear se encuentra en una ubicación geográfica a: 20°12'31.85"N 96°51'46.52"W. Para este cultivo se utiliza el árbol de naranja *Citrus × aurantium* como tutor, y se utiliza un sistema de riego por goteo durante tiempos de sequía, la planta se desarrolla en temperaturas de 24 a 38°C.

Dentro del municipio de Tenampulco, Puebla, donde se tienen plantas de *V. planifolia* en cultivos agroecológicos (en el bosque con tutores nativos) en “Chaca” como tutor (*Bursera simaruba*), dentro de un rancho llamado “Los Caracoles” ubicado a: 20°11'52.77"N 97°22'05.28"W con una elevación de 175 m.s.n.m. El cultivo depende de la lluvia temporal principalmente, ya que no tiene riego, ni administración de fertilizantes que no sean orgánicos, con una temperatura entre los 22 y 33 °C durante el desarrollo del fruto.

La última localidad muestreada se encuentra dentro del mismo municipio (Tenampulco, Puebla), denominada “Banco de Germoplasma” que es un área de conservación de recursos vegetales perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de

Puebla (BUAP). Aquí las plantas se encuentran en un sistema de cultivos con maya sombra con un 50% de luminosidad lo cual esta reportado como el filtro de luz idóneo para este tipo de plantas. Se depende principalmente de la lluvia de temporal. Ubicado a: 20° 11' 52.77" N 97° 22' 05.78" O a 231 m.s.n.m., con una temperatura de 22 a 33 °C, aquí tomamos muestras de las accesiones 1, 30, 39, 42, 47, 75 y 85. Las ubicaciones de las localidades se aprecian en la Imagen 10.

Por cada punto en el desarrollo (6 etapas), en las tres localidades descritas se tomaron 3 vainas por planta; en 3 plantas tomadas al azar por localidad, teniendo un total de 54 vainas por cada localidad en total, considerando las 3 vainas de cada planta como una réplica biológica.

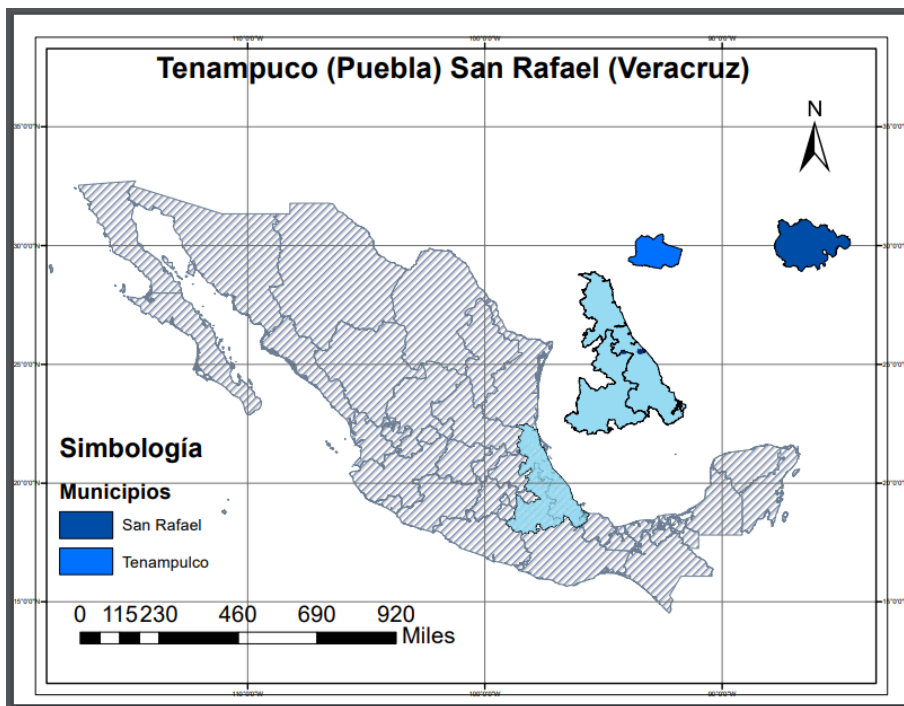


Imagen 10.- Mapa de las localidades muestreadas en la región de Totonacapan en Veracruz (San Rafael) y Puebla (Tenampulco). Diseñado en ArcGIS 10.3

4.3 Muestreo

Al cortar la vaina del bejuco (planta guía) se tomaron mediciones del peso y longitud de cada vaina, se depositaban las vainas dentro de un tanque con nitrógeno líquido de 10 L adsorbido a -196 °C evitando así la degradación de compuestos por reacciones enzimáticas dentro de las vainas de *V. planifolia*. Posteriormente se almacenan las vainas dentro de un ultracongelador a -80 °C para conservar el tejido biológico sin degradar.

Se utilizó un sistema de marcado para identificar las muestras según el día de polinización para saber precisamente en que día después de la polinización se obtuvieron las muestras de vainas verdes, dichos días fueron: 27 (1° mes), 55 (2° mes), 118 (4° mes), 153 (5 mes), 180 (6 mes) y 215 (7 mes) días post polinización (dpp) o fertilización (dpf).

4.4 Metodología para pulverizar y almacenar las muestras

Se tomaron tres vainas por réplica biológica de las cuales se tomó una cantidad equivalente de vaina para obtener 1~2 gramos de pulverizado de vaina, triturando en el homogeneizador de balines, para obtener polvo de la vaina, se mantuvieron las vainas a -80°C durante el proceso de pulverizado añadiendo Nitrógeno líquido constantemente, se almacenó el tejido sobrante en tubos falcon de 50 ml para preservar en el ultracongelador a -80°C.

4.5 Metodología de extracción

Se pesó 1 gr del pulverizado de vaina verde de vainilla (*V. planifolia*) en un tubo falcon de 15 ml, se agregan 5 ml de hexano y se agitó en un vortex durante 5 min, se centrifugó por 10 min a 1,000 g y se recuperó el hexano. El pulverizado remanente se puso en baño maría a 25 °C hasta que desapareció todo el hexano durante aproximadamente 2 h, se agregaron 5 ml de metanol al remanente del pulverizado seco y se agitó en un vortex durante 5 min, después se centrifugó por 10 min a 1000 x g y se recuperó el metanol, se añadieron 5 ml de metanol al pulverizado remanente nuevamente y se agitó en un vortex durante 5 min, se centrifugó 10 min a 1000 x g y se recuperó el metanol, se juntaron las dos fracciones de metanol extraído en un tubo falcón de 15ml, el extracto de 10 ml se secó en el concentrador de muestras miVac® en condiciones de vacío a 15 – 30 psi a una temperatura de 35°C para evitar la degradación de compuestos por pirolisis, se seca totalmente hasta obtener un pellet que se reconstituyó en 2 ml de una solución de Metanol: Agua (1:1), se filtró con filtros Agilent de 0.22 µm para los análisis de LC-MS.

4.6 Método cromatográfico

Se tomaron en cuenta distintas metodologías basados en los resultados de nuestras pruebas de concepto y en la bibliografía más actual (Busconi et al., 2017; Creydt & Fischer, 2017; Gu et al., 2017; Martin et al., 2014; Palama et al., 2009). Además para tener un control de calidad de la dispersión de los muestras analizadas se tomaron 20 µl de cada muestra (en cada localidad y en cada etapa del desarrollo) para preparar un control de calidad que fuera representativo de todo el lote de muestras analizadas en ambos modos de ionización.

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna Acquity® CSH C18 (2.1 x 150 mm id., 1.7 µm Waters®, México) usando un sistema UPLC Acquity® (Waters®, México).

La columna se mantuvo a 40 °C, la fase móvil, con un flujo de 0.3 mL/min, en isocrático durante 1 minuto con 99% de fase A. el gradiente consistió en una mezcla de solventes (A: H₂O + 0.1% ácido fórmico; y B: ACN + 0.1% ácido fórmico), posteriormente se subió de 1 a 100% de fase B durante 27 min con 3.5 min de lavado y 2.5 min de equilibrado para después volver a la fase inicial con 1% ACN y 99% H₂O en isocrático. Se optimizó el método en función de la mayor cantidad de iones detectados durante los 34 min de análisis (Tabla 1).

Tabla 1.- Método cromatográfico en gradiente

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	99	1
1	99	1
27	0	100
30.5	0	100
30.6	99	1
34	99	1

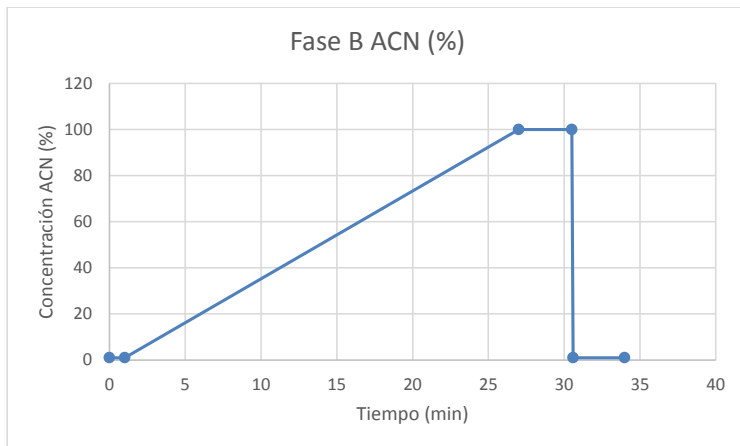


Imagen 11.- Método cromatográfico en forma de rampa, mediante el aumento paulatino de solvente a través del tiempo se pueden separar moléculas en función de sus grupos funcionales y su estructura.

4.7 Método de espectrometría de masas (MS^E)

Para analizar el eluyente de la cromatografía usamos un espectrómetro de masas Q-TOF (SYNAPTTMG1, Waters Corps. México) de alta resolución, operando dentro de un rango de masas de 50 a 1500 Da, un voltaje de 50 V en el cono, con una resolución de 18,000 en modo positivo y de 14,000 en modo negativo en modo W para ambos casos, el voltaje del capilar se usó a 3 kV, el cono de muestreo a 40kV, el cono de extracción a 4 kV, la temperatura de la fuente de ionización se mantuvo a 150°C mientras que la temperatura de desolvatación se mantuvo en 350 °C, el flujo del gas del cono fue de 10 L/h, en cuanto el flujo del gas de desolvatación fue de 700 L/h.

En la Imagen 12 se puede apreciar del lado izquierdo el cromatógrafo de líquidos con los solventes de las fases A y B en su interior se encuentra un sistema de válvulas y tuberías que permitieron generar el gradiente de fases para que pase por la columna y sufra

la separación cromatográfica en base a las propiedades estructurales de las moléculas analizadas.

La muestra que fue inyectada a un volumen de 5µL para posteriormente ser ionizada en la parte del ESI en modo de ionización positivo y negativo, la tecnología de MS^E sirve para generar una exploración de muestras complejas, generando datos de masa exacta para cada compuesto detectable, así como información de los fragmentos generados para cada compuesto ionizado, por lo que es considerado un método exploratorio de MS (Imagen 12) (Wallace, 2011).

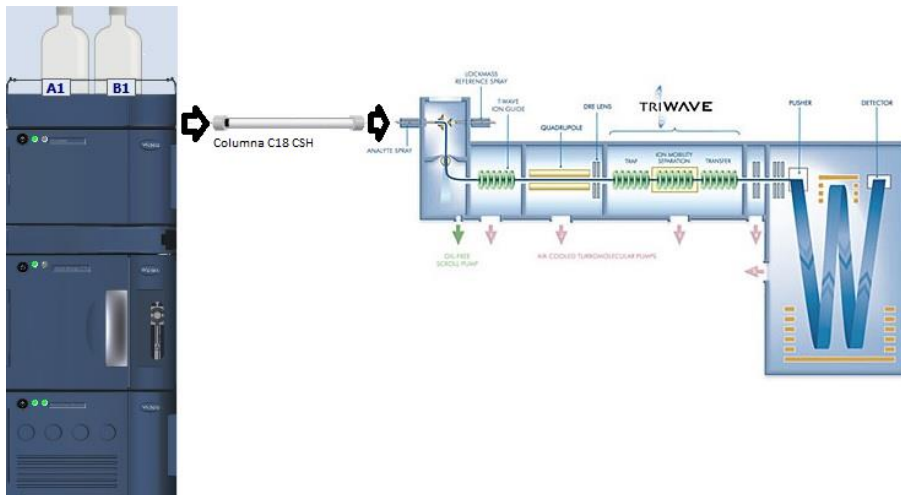


Imagen 12.- Sistema acoplado en tándem de cromatografía de líquidos a una fuente de ionización por electrospray a un espectrómetro de masas (UPLC-ESI-MS)

4.8 Análisis de datos de UPLC-ESI- MS^E

Se obtuvieron las matrices de datos correspondientes a las tres condiciones ambientales durante las 6 etapas de desarrollo frutal muestreadas con tres réplicas biológicas para el modo de ionización positiva y negativa, de cada muestra se obtiene un archivo en formato “.raw” en nuestro caso utilizamos los archivos “.raw” de HDMS directamente en el software Progenesis QI Non Linear Dynamics ®. Aquí comparamos los cromatogramas que nos muestran los iones en las muestras de extracto de vainilla verde encontrados y los comparamos con las bases de datos como ChEBI, HMDB y ChemSpider para la pre-identificación de metabolitos, cada metabolito pre-identificado seselecciona manualmente en función a su m/z, patrón de relación isotópica. Su *puntajetotal* se calcula considerando los valores antes mencionados con una mayor coincidencia dada en porcentajes.

Para realizar un análisis en este programa se importaron los archivos obtenidos en el instrumento, se seleccionaron los archivos en formato “.raw” que correspondieron a las tres réplicas biológicas de las tres localidades durante los seis puntos del desarrollo. Posteriormente se “revisa el alineamiento”, para comparar todos los experimentos descartando la mayor cantidad de ruido en el análisis. Se pasa a la “preparación de diseño de experimento”, donde se agrupan las localidades a evaluar. Después en la sección de seleccionar picos o “*peak picking*”, se compararon las intensidades de las distintas réplicas normalizando los datos a un archivo, tomando un cromatograma de referencia con la mayor cantidad de iones detectados dividiendo los valores entre esta referencia (QC). La “revisión de la deconvolución”, es donde puede ver la formación de aductos para ciertos iones. Después se “preidentificaron los compuestos”, en comparación a las bases de datos de metabolitos (ChEBI, HMDB y ChemSpider) determinando la similitud por los fragmentos, la m/z exacta y el patrón de relación isotópica. A partir de aquí se pueden exportar las listas de archivos separados por comas (.csv) para generar las matrices adecuadas para el análisis de datos. Se “revisan los compuestos”, curando los datos manualmente ya que muchas moléculas asignadas automáticamente tienen poca relevancia o sentido biológico. Finalmente, en “estadística de

compuestos”, se aprecia la tendencia de un metabolito por réplica biológica y se pueden exportar los datos a EZ Info que sirve para realizar análisis de componentes principales (PCA), loadings plots, score plots, histogramas de abundancias por ion o pre-identificaciones, entre otros (Imagen 4).

Se obtuvieron 2 matrices a través del programa Progenesis QI, que es un software de interfaz gráfica que permite crear archivos “.csv”, gráficos interactivos, exportables a EZ Info que es programa que sirve para generar gráficos de análisis de componentes principales para ver cómo se comportan los grupos de datos en función de su varianza, además de otros análisis estadísticos y gráficas para buscar diferencias entre las distintas condiciones ambientales y etapas del desarrollo.

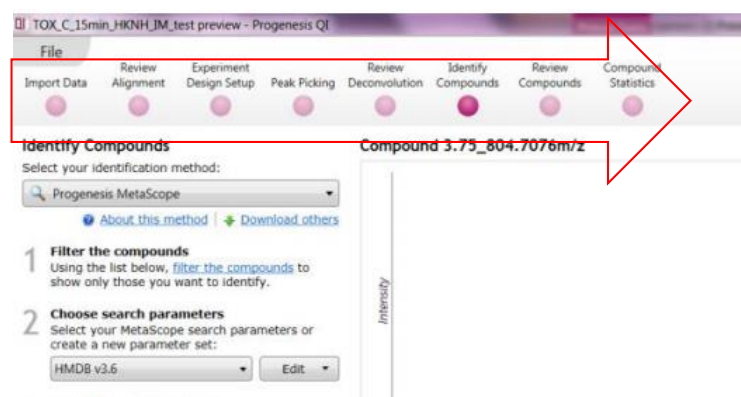


Imagen 13.- PROGENESIS QI 4.3, software para análisis metabolómico.

Para realizar el análisis estadístico se tomó una matriz de datos con los nombres de los metabolitos putativos ya sea por ID, nombre o la relación m/z en caso de iones sin pre-identificar en una columna, y en las demás filas se agrupaban las localidades y los puntos durante el desarrollo, se tomaron las abundancias normalizadas de cada metabolito por muestra, usando MetaboAnalyst 4.0 (Chong & Xia, 2018) se vuelve a normalizar con respecto a la mediana, con una transformación logarítmica de los datos, y una escala de Pareto (escala centrada en la media dividida entre la raíz cuadrada de la variación de la desviación estándar de cada variable). Este procedimiento se realizó para la matriz de datos obtenida del análisis de LC-MS en modo positivo y negativo.

4.9 Análisis de datos

Se usaron distintas metodologías de análisis estadístico y de datos para interpretar los resultados del metaboloma de vainas verdes de *V. planifolia*, para realizar una exploración general de los datos utilizamos PCA durante cada punto del desarrollo, así como para la identificación de *outliers* y para el agrupamiento de los subgrupos utilizamos análisis de agrupamiento jerárquico (HCA), también usamos análisis de componentes simultaneo de ANOVA (ASCA), análisis de varianza (ANOVA), entre otros. (Krumsiek & Theis, 2013)

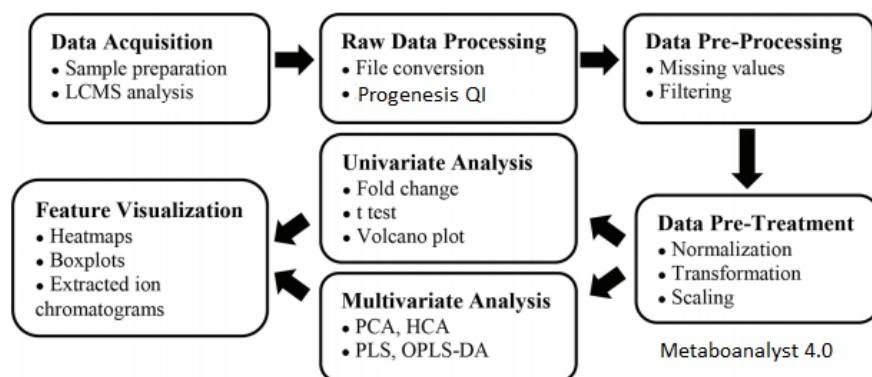


Imagen 14.- Diagrama de flujo del análisis de datos metabolómicos modificado de Grace & Hudson 2016

4.10 Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales es una mezcla de modelos lineales que explica la varianza dentro de un conjunto de datos a partir del número mínimo de componentes correlacionados, los componentes principales son vectores de metabolitos, la matriz de datos se factoriza en 2 matrices: una matriz de *scores*, la cual contiene las posiciones de las observaciones en un nuevo sistema de coordenadas y una matriz ordenada que contiene las variables originales (*loadings*) para transformarlas en *scores*, para la disminución de la

dimensionalidad de los datos, así podemos visualizar los datos, mediante su agrupamiento entre condiciones (Krusiek & Theis, 2013). Teniendo las matrices de datos se aplicaron estos métodos para ver el agrupamiento de los datos en cada etapa de desarrollo 27, 55, 118, 153, 180 y 215 dpp Imagen 30 y 31 e Imagen 42-51 del Anexo A.

4.11 Análisis de ANOVA de 2 factores (Two way ANOVA)

Se realizó el análisis de varianza de 2 factores tomando como base un factor el tiempo que consiste en los 6 puntos durante desarrollo y el otro factor son las 3 localidades evaluadas, aquí, mediante análisis con un FDR al 5 % se infiere que factores están condicionando las variables de respuesta que en nuestro caso son metabolitos en razón de la localidad y la etapa de desarrollo, para realizar este análisis se utilizó MetaboAnalyst 4.0 que es un software construido sobre una base de R, en este análisis se consideraron los valores normalizados en Progenesis y se volvieron a normalizar entre la media con una transformación logarítmica y una escala de Pareto para la realización de las comparaciones múltiples (Chong & Xia, 2018) (Imagen 31 y 33).

4.12 Análisis de componentes principales simultáneo (ASCA)

Este tipo de análisis nos permite ver la varianza en distintos puntos en un análisis, en este caso se puede observar la varianza de 6 etapas del desarrollo para cada una de las tres localidades, para realizar este análisis se utilizó MetaboAnalyst 4.0. Este tipo de análisis toma importancia cuando se tiene una gran dimensionalidad de datos y queremos buscar diferencias en función de la localidad y el tiempo (Imagen 32 y 34). Esto nos permite realizar distintos análisis y visualizar los datos mediante distintas herramientas como análisis de varianza que incluyen las diferencias entre las localidades evaluadas (diagrama de volcán) (Imagen 39-42) o bien diagramas llamados heatmaps (Imagen 37 y 39), por

etapa, buscando diferencias puntuales en una etapa del desarrollo específica considerando los valores transformados para cada variable de respuesta (ion o metabolito pre-identificado)(Chong & Xia, 2018).

4.13 Análisis de agrupamiento (HCA)

Los análisis de agrupamiento son técnicas adecuadas para el análisis de datos metabolómicos. En general, estas técnicas se basan en reagrupar las muestras de acuerdo con sus similitudes intrínsecas en las mediciones independientemente del agrupamiento, principalmente por métodos euclidianos o por correlaciones de Pearson. La diferencia principal entre estos métodos consiste en que en las distancias euclidianas se toman los valores cercanos y se recalcula una distancia entre 2 variables de respuesta a diferencia de las correlaciones de Pearson para tratar las variables de respuesta de manera independiente, por lo que se recomienda utilizar correlaciones más que las distancias euclidianas para encontrar datos de importancia biológica en función de su comportamiento relativo(Tiessen et al., 2017).

5.1 Resultados

5.2 Diferencias fenotípicas de peso y longitud en las vainas de tres condiciones ambientales

Se tomaron las mediciones de las longitudes y los pesos de las vainas colectadas durante las 6 etapas del desarrollo frutal en *V. planifolia* en las tres localidades evaluadas. Que se muestran en las siguientes figuras.

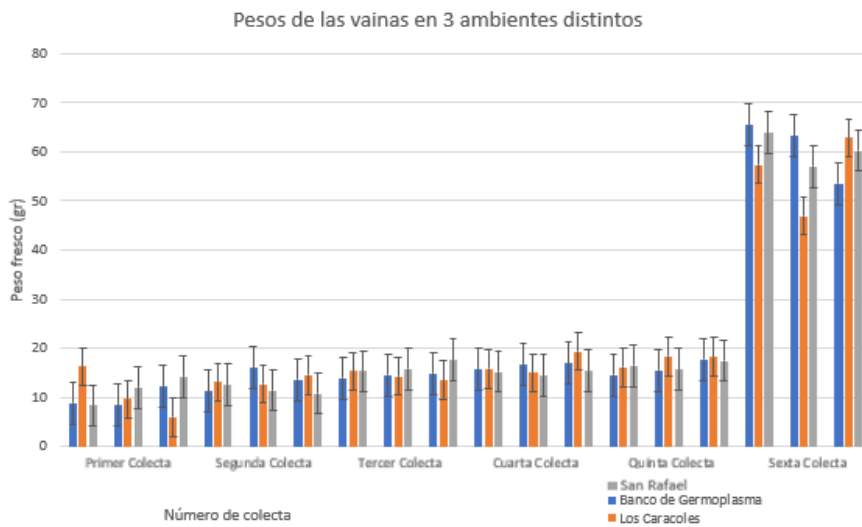


Imagen 15.- Peso fresco de vainas de *V. planifolia* durante las 6 etapas de desarrollo evaluadas, con el error estándar para cada columna

Longitudes de las vainas en los 3 ambientes diferentes

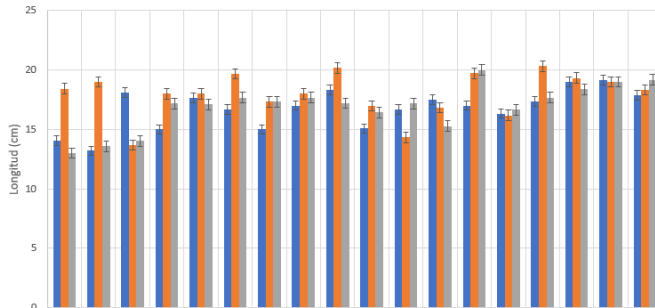


Imagen 16.-Tamaño de las vainas de *V. planifolia* colectadas durante las 6 etapas de desarrollo frutal, el rango en cada columna es correspondiente al error estándar.

Con los análisis de tamaño y peso se hizo un análisis de correlación. Existen reportes de que existe una correlación lineal entre el peso y la longitud de las vainas de *V. planifolia*, para evaluar si esto es cierto que dentro de cada condición existía una correlación, se buscó correlacionar mediante un modelo lineal para corroborar los datos publicados por Palama et al. 2009, en el caso del Banco de Germoplasma se tuvo una mejor correlación, pero con una línea de tendencia polinómica, con una correlación = 0.721, se obtuvo la misma tendencia para el rancho “Los Caracoles” pero con una correlación = 0.376, en la localidad de San Rafael también los datos se ajustan a una tendencia polinómica con una correlación = 0.657, y a pesar de no tener una correlación de 1 los datos de estos muestreos nos demuestran que no se cumple una tendencia lineal para estos datos.

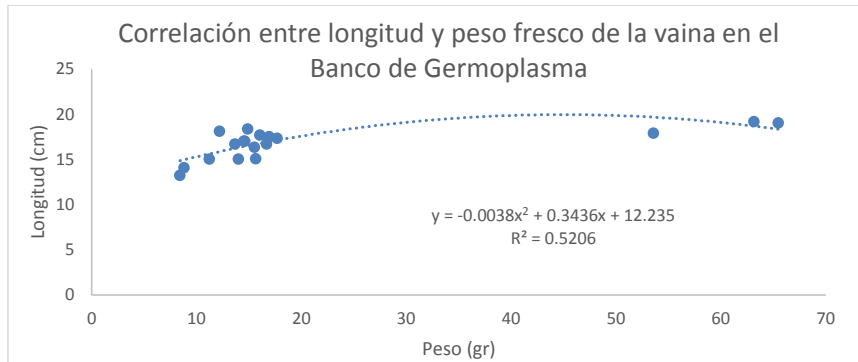


Imagen 17.- Correlación entre longitud y peso fresco en vainas del Banco de Germoplasma ajustados a un modelo de tendencia polinómica

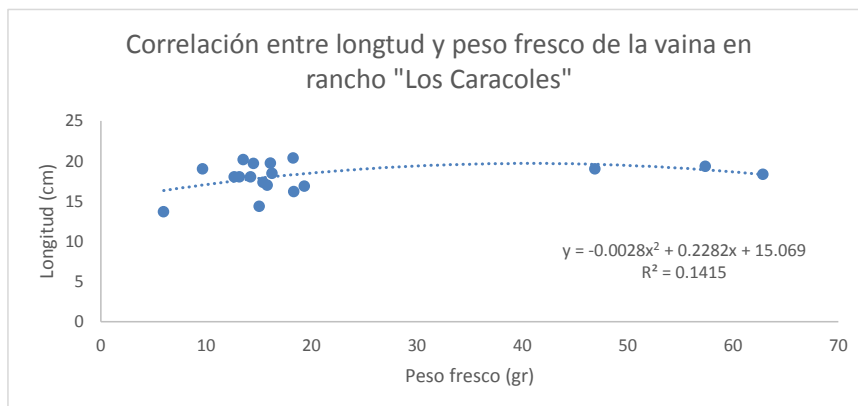


Imagen 18.- Correlación entre longitud y peso fresco de vainas en rancho "Los Caracoles" ajustados a un modelo de tendencia polinómica

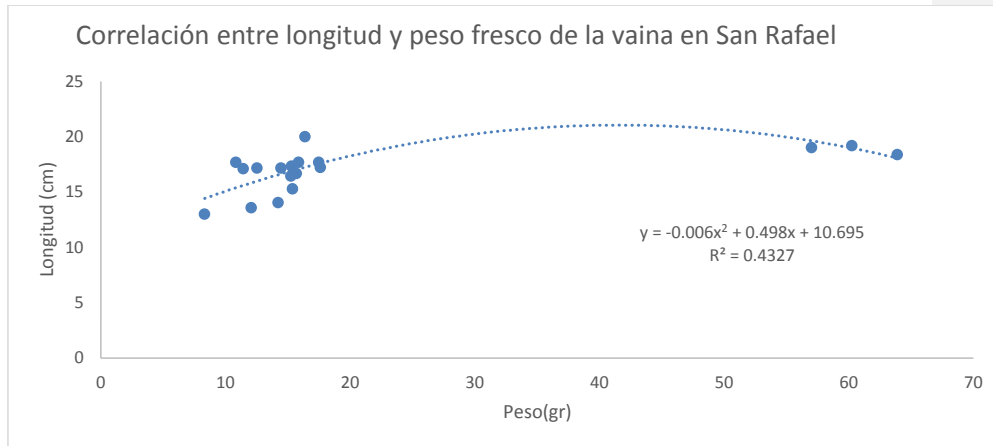


Imagen 19.- Correlación entre la longitud y el peso fresco de vainas en San Rafael, Ver. ajustados a un modelo de tendencia polinómica

5.3 Método cromatográfico y de espectrometría de masas

Se estandarizó el método cromatográfico y de espectrometría de masas para muestras de *V. planifolia*, el análisis cromatográfico se optimizó a un tiempo de 34 minutos con una columna C18 CSH (Charged Surface Hybrid) de Waters, México.

En modo positivo se detectaron 967 iones para las 6 etapas durante el desarrollo frutal de *V. planifolia*, tanto que en modo negativo 1885 iones fueron detectados igualmente para las 6 etapas durante el desarrollo frutal, los iones se detectaron mediante el software PROGENESIS QI®, los procesos para la detección de iones de modo positivo y negativo se detallan en la parte de metodología.

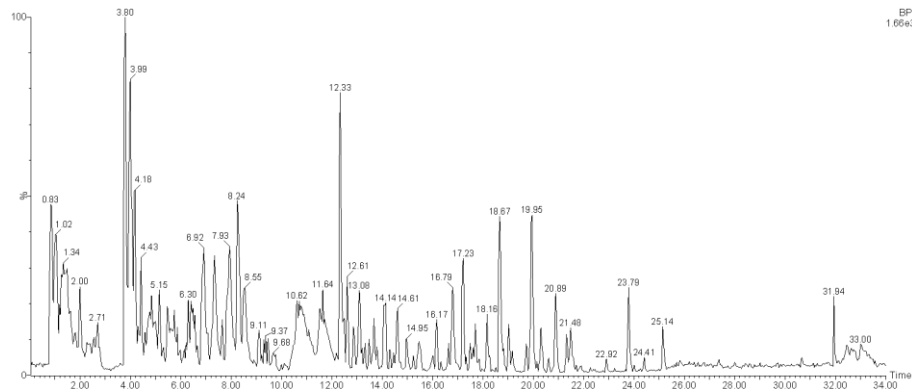


Imagen 20.- Cromatograma de una réplica biológica durante el primer mes de desarrollo con una ionización positiva.

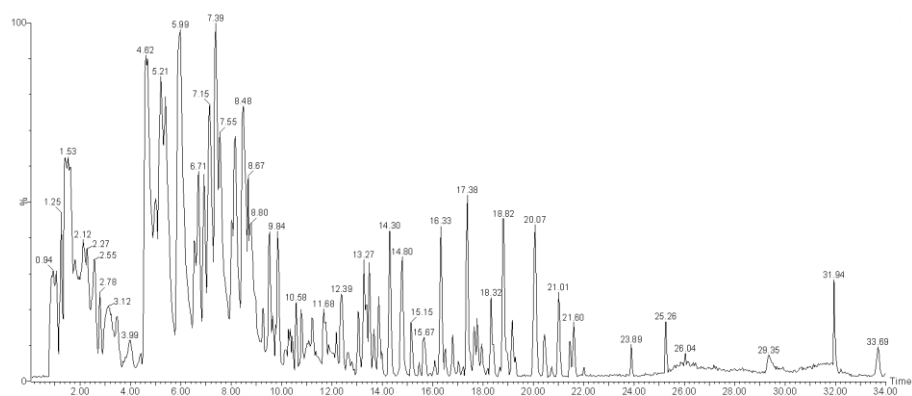


Imagen 21.- Cromatograma de una réplica biológica durante el primer mes de desarrollo con una ionización negativa

En el par de cromatogramas (Imagen 20 y 21) se puede notar la gran diferencia entre los perfiles metabólicos generados para la misma muestra del “Banco de Germoplasma” en ambos modos de ionización, aquí en la primer porción de picos se muestran compuestos altamente polares como azúcares, los demás picos corresponden a compuestos fenólicos, flavonoides y glucósidos.

Además de generar los análisis para cada muestreo correspondiente a cada etapa del desarrollo frutal se generaron análisis de controles de calidad (QC), así como estándares de referencia con las masas exactas de algunas moléculas presentes en nuestras muestras (vainillina y étil-vainillina), en ambos modos de ionización en el cromatograma (Imagen 22 y 23) se muestra el mismo tiempo de retención para la misma molécula, para la vainillina, el tiempo de retención a los 8.17 min., para la étil vainillina se muestra a los 9.96 min.

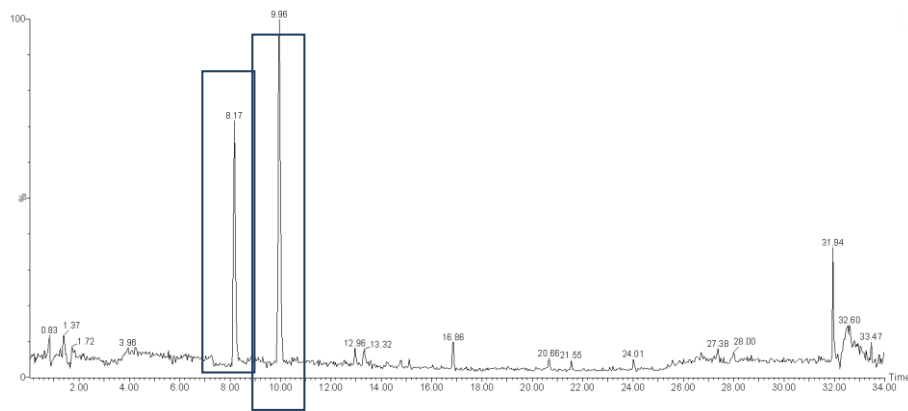


Imagen 22 Estándares de referencia en ionización positiva, el pico a 8.17min es correspondiente a la vainillina, a los 9.96 se muestra la étil vainillina.

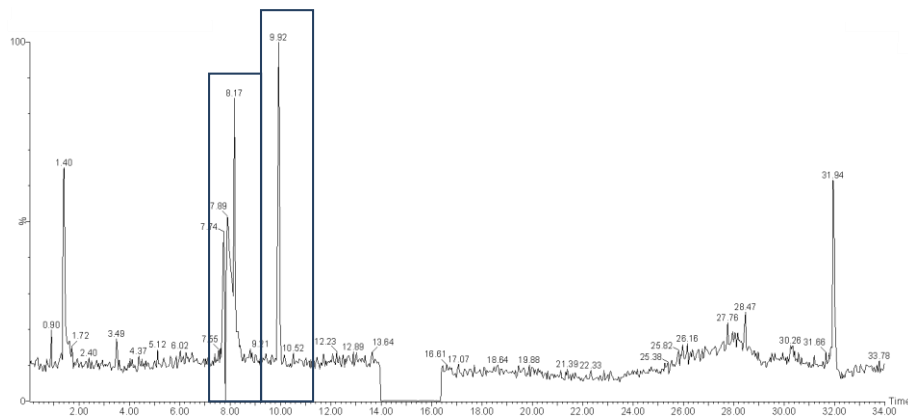


Imagen 23.- Estándares de referencia en ionización negativa, los picos coinciden con los tiempos de retención para la ionización negativa.

En las siguientes imágenes se puede apreciar el control de calidad que es un pool de todas las muestras en una concentración igual, y que contiene un porcentaje equitativo de todas las muestras, esto se puede visualizar en un PCA (Imagen 25 y 27), como puntos con una tendencia central ya que al tener componentes de todas las muestras presentan una varianza mínima y se agrupan en el centro del gráfico, este procedimiento se realizó en modo positivo y negativo, respectivamente, aquí se representa el contenido de todos los metabolitos totales durante todas las etapas del desarrollo en las 3 condiciones ambientales, que son descritos por los 2 componentes principales.

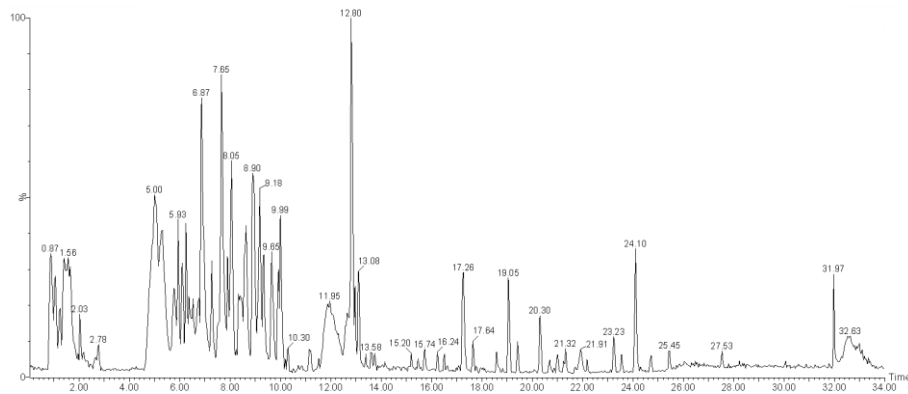


Imagen 24.- Control de calidad (QC) en modo positivo para los datos de las extracciones durante el desarrollo frutal de *V. planifolia*

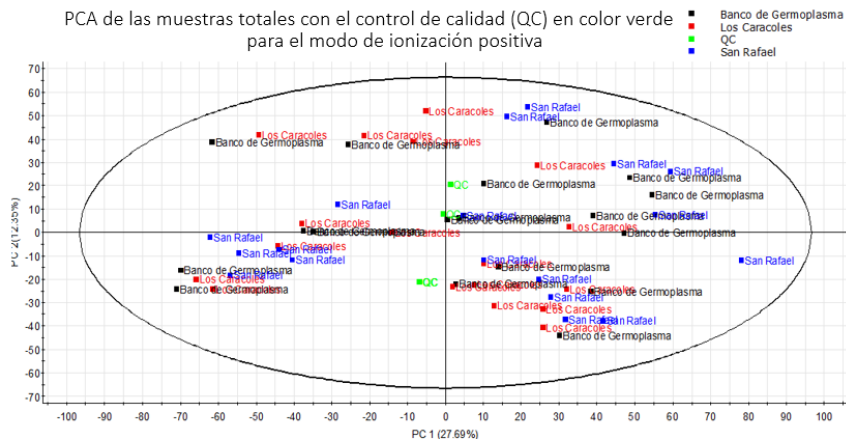


Imagen 25.- PCA de las muestras ionizadas en modo positivo, se aprecian los QC's con una tendencia central

Las mismas muestras fueron analizadas a través de la ionización negativa obteniendo lo siguientes resultados.

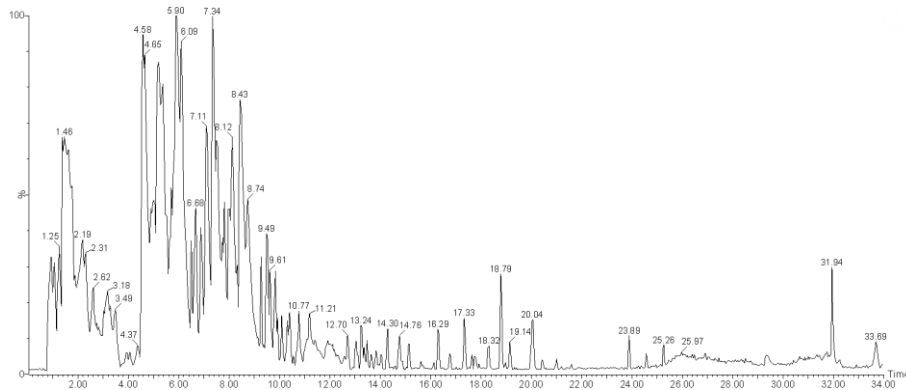


Imagen 26.- Control de calidad (QC) en modo negativo para los datos de los extractos durante el desarrollo frutal de *V. planifolia*

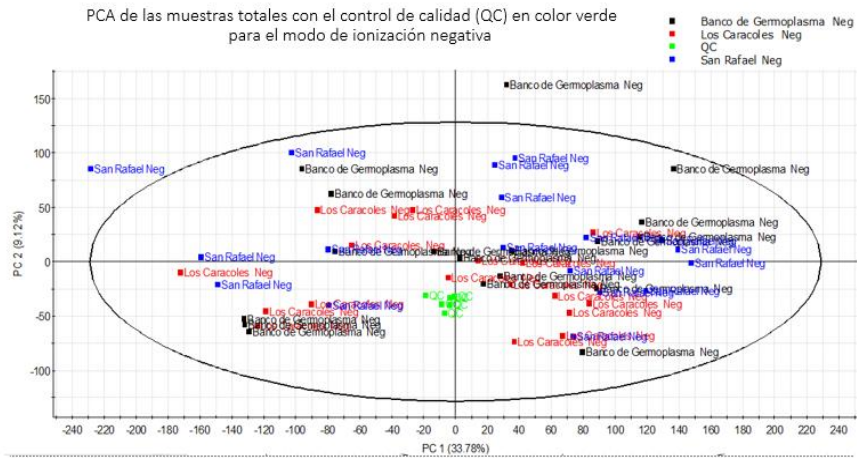


Imagen 27.- PCA de las muestras ionizadas en modo negativo, también se observa una tendencia central para los QC's

Cabe agregar que se usaron blancos cada que 7 muestras eran analizadas (Imagen 28 y 29).

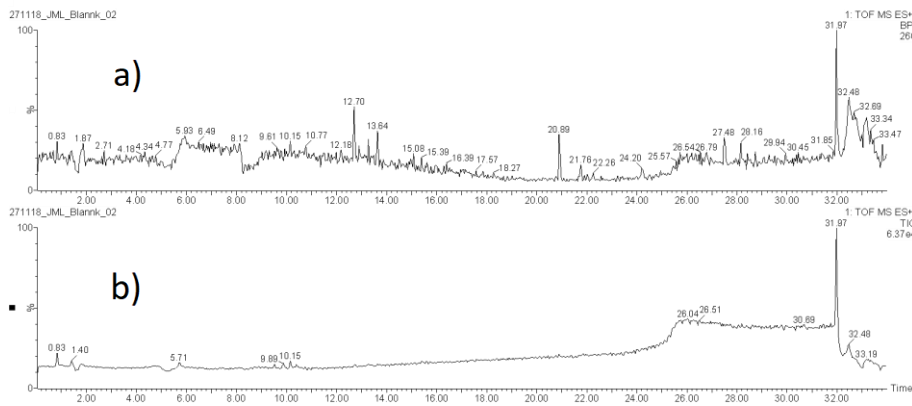
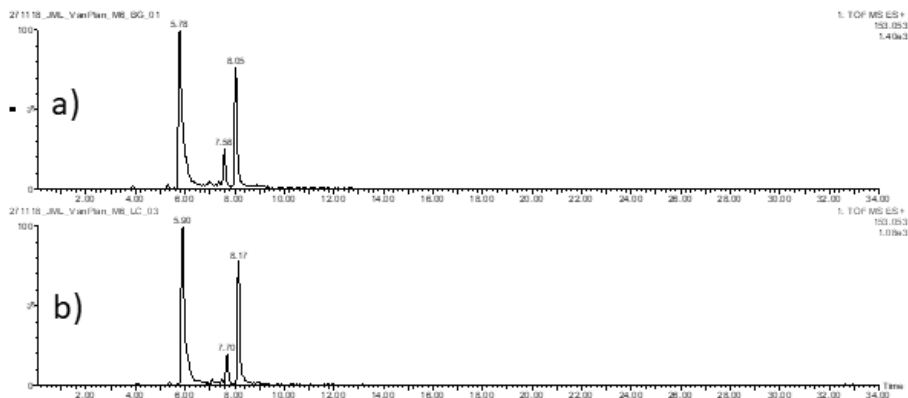


Imagen 28.- Blanco en modo positivo a) BPI, b) TIC

Un dato interesante es que pudimos encontrar tres moléculas del mismo peso molecular de la vainillina, pero diferente estructura química y tiempo de retención correspondientes a la o-vainillina e isovainillina, la vainillina se muestra al tiempo 8.17, y



las otras 2 moléculas deben ser comprobadas por estándares de referencia,

Imagen 29.- Cromatograma de moléculas vainilloides de peso molecular 153.0534 Da, a) muestra con 215 dpp del Banco de Germoplasma (TIC) b) muestra con 215 dpp de Los Caracoles (TIC), usando ionización positiva

5.4 Datos de LC-MS mediante ionización positiva y negativa

Se detectaron 886 iones más en la ionización negativa que en la ionización positiva, las muestras analizadas presentan una gran diversidad metabólica. Se detectaron 995 iones para la ionización positiva, en cambio en la ionización negativa se obtuvo una cantidad de 1881 de los cuales se pudieron pre-identificar 144 iones tanto que en modo positivo se pre-identificaron 134 iones, las tablas se encuentran en el Anexo B (Tabla 7 y 8), por otra parte, se pudo identificar gracias al tiempo de retención y la masa exacta metabolitos como la vainillina y la etilvainillina de los cuales se validó su identidad con el uso de estándares analíticos.

Los datos originales fueron usados para pre-identificar moléculas utilizando PROGENESIS QI® 2.4.6911.27652, teniendo una matriz de datos similar a la mostrada en la Tabla 2 pero con 1881 filas para los iones y 54 columnas para las localidades y los puntos durante el desarrollo, como datos de abundancias normalizadas. Los datos que se

obtuvieron de este software para pre-identificar iones fueron: m/z, tiempo de retención, masa neutra, abundancia, aductos, ID en base de datos, nombre (si se encuentra disponible), enlace del ID, score, patrón de relación isotópica, SMILES, entre otros.

Los datos fueron sometidos a distintos filtros, para encontrar iones que tuvieran diferencias significativas entre las 3 localidades evaluadas tomando los iones que tuvieran una intensidad máxima aceptable de este filtrado se obtuvieron 1881 iones en modo negativo y 950 iones en positivo para realizar HCA (Imagen 36 y 38) además realizamos análisis de varianza con un valor de $p < 0.05$ con una corrección por FDR, y una tasa de cambio (fold change) de 1.5, asimismo se realizaron PCA para las 3 condiciones muestreadas en cada etapa del desarrollo para averiguar entre qué localidades existe mayor diferencia.

Tomando en cuenta los 2 primeros componentes principales, se obtuvo que en modo positivo durante las 6 etapas de desarrollo los siguientes valores para los 2 primeros componentes principales: 1er muestreo: 54.46% (Imagen 45), 2do muestreo: 47.13% (Imagen 47), 3er muestreo: 46.96% (Imagen 49), 4to muestreo: 59.42% (Imagen 51), 5to muestreo: 56.66% (Imagen 53), 6to muestreo: 51.03% (Imagen 31). En tanto que para la ionización negativa se obtuvieron los siguientes resultados: 1er muestreo: 42.88% (Imagen 46), 2do muestreo: 52.50% (Imagen 48), 3er muestreo: 50.79% (Imagen 50), 4to muestreo: 55.88% (Imagen 52), 5to muestreo: 54.42% (Imagen 54), 6to muestreo: 56.43% (Imagen 30). Todos estos análisis fueron realizados por etapa y encontramos una mayor varianza descrita en el sexto muestreo para el modo de ionización negativa y en la ionización positiva durante el cuarto mes de muestreo, a fin de cuentas, durante el día 215 dpp para ambos modos de ionización presentan 3 grupos parcialmente definidos inherentes a cada localidad y existe una menor separación entre los grupos de la misma localidad y un mejor agrupamiento entre las tres localidades evaluadas (Imagen 30 y 31).

Comentado [JJ01]: CUALES FILTROS?, NOMBRALOS POR FAVOR

En la Tabla 2 se muestra un bosquejo de los datos obtenidos para las etapas de desarrollo y las localidades, se identificaban las muestras por mes de desarrollo y por el número de muestra para reconocer cada una de las 3 muestras.

Tabla 2.- Esquema de la matriz de datos de las abundancias de los datos crudos para la intensidad de cada compuesto

Compuesto	[M+H] ⁺ m/z	Carga	Tiempo de retención (min)	Mes 1 SR M1	Mes 1 SR M2	Mes 1 SR M3	[...]	Mes 7 LC M3
460.1603n	483.1495	1	7.3	130.2134	130.2199	130.2264	[...]	[...]
771.2423m/z	771.2423	1	8.2	0.7998	0.5993	0.3988	[...]	[...]
153.0549m/z	153.0549	1	7.6	0.5239	0.5103	0.4976	[...]	[...]
[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]
[...]	1881 lones [M-H] ⁻	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]
[...]	995 lones [M+H] ⁺	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]

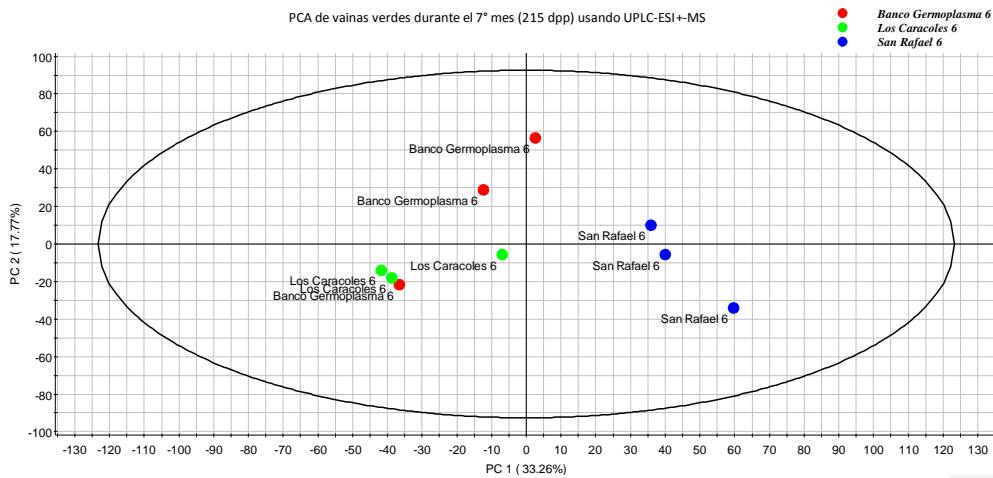


Imagen 30.- PCA de vainas verdes durante el 215 dpp (7° mes) usando UPLC-ESI+-MS

Se puede observar el agrupamiento de los tres puntos de la localidad de San Rafael separado de los grupos del Banco de Germoplasma y Los Caracoles, para ambos modos de ionización es apreciable esta tendencia en el agrupamiento.

Comentado [JJO2]: CORREGIR

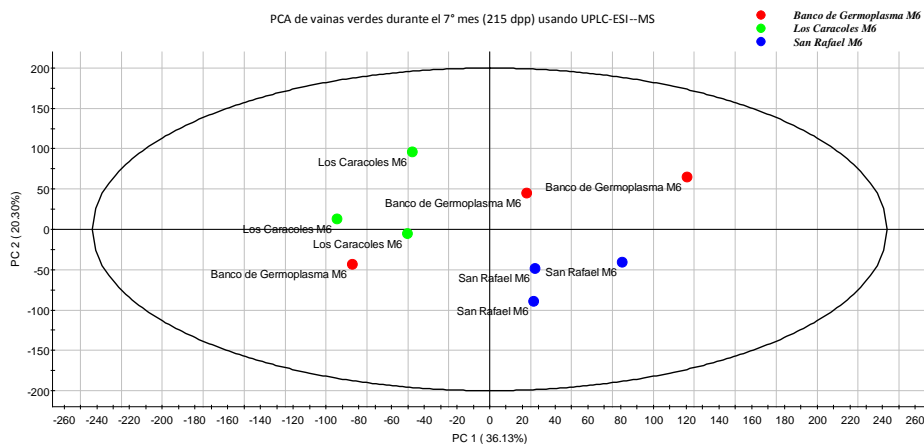


Imagen 31.- PCA de vainas verdes durante el 215 dpp (7° mes) usando UPLC-ESI-MS

5.5 Comparación de iones pre-identificados mediante ambos modos de ionización

Se obtuvieron iones pre-identificados en ambos modos de ionización, en el caso de los extractos de vainas de *V. planifolia* verdes se pudieron preidentificar 42 iones de forma positiva y negativa simultáneamente, de estos iones algunos ionizan mejor en uno u otro modo de ionización, se muestra un resumen en la Tabla 3, los iones totales se muestran en la Tabla 11 del Anexo B.

Tabla 3.- Resumen de los iones pre-identificados para ambos modos de ionización, la tabla incluye los valores en modo negativo

Tiempo de retención	Compuesto	m/z [M-H] ⁻
8.36	Isovanillina	151.0413

6.68	Beta- dihidroxifenil-glucopiranosa	645.1686
[...]	[...]	[...]

5.6 ANOVA de dos factores para las etapas de desarrollo y las localidades

Para saber si el metaboloma depende de la localidad en los metabolitos sintetizados durante el desarrollo frutal se realizó un análisis de varianza de 2 factores para determinar si los metabolitos estaban influenciados por la localidad, por las etapas de desarrollo, o por la interacción de ambas variables, evidentemente al ser un análisis de desarrollo existe una gran cantidad de variables metabólicas que se ven alteradas significativamente a través del tiempo (56.56% en modo negativo y 42.94% en modo positivo) (Imagen 32 y 34) para un ANOVA de 2 factores con los iones totales para la ionización en modo negativo (1881) y positivo (965), en un par de análisis independientes, con una corrección con FDR al 5%.

Cuando se realizó este ajuste con FDR, se obtuvieron más diferencias debidas al factor del tiempo que al factor ambiental o de la interacción. Además, los ASCA nos permiten ver la tendencia en la varianza a través del tiempo en ambos experimentos, pero a la vez describen poca varianza de cómo se comportan nuestras variables de respuesta respecto al ambiente y al tiempo, ya que no se describe ni el 50% de la varianza según este método para modo positivo y ni el 30% para el caso de la ionización negativa (Imagen 33 y 35)

Se tomaron en cuenta los valores obtenidos para la corrección con FDR al 5%, asegurándonos de esta forma que los compuestos presentan una influencia por el factor determinado ya sea el tiempo, el ambiente, la interacción o ambos (Imagen 32 y 34), en la tabla 4 se pueden apreciar los valores del FDR al 5% resumidos para la localidad, las etapas del desarrollo (tiempo) y la interacción de los factores resumida.

Two-way ANOVA (between subjects)

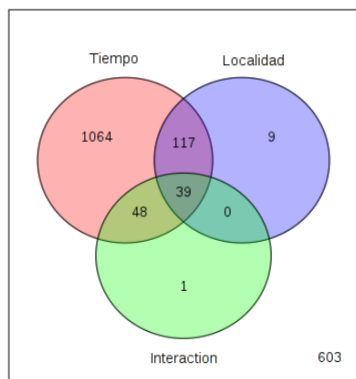


Imagen 32.- ANOVA de 2 factores para las 3 localidades tomando 1881 features como variables de respuesta en ionización negativa usando una corrección de FDR al 5%

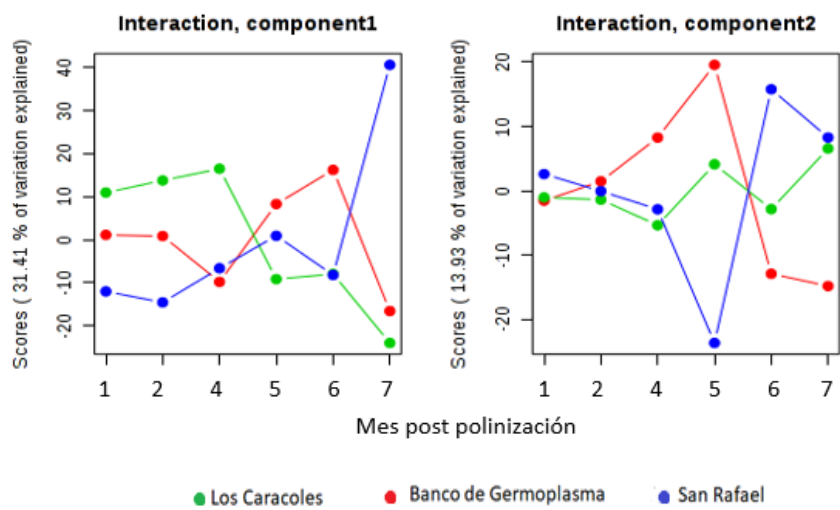


Imagen 33.- ASCA en las 3 localidades durante el desarrollo frutal de *V. planifolia* en ionización positiva

Two-way ANOVA (between subjects)

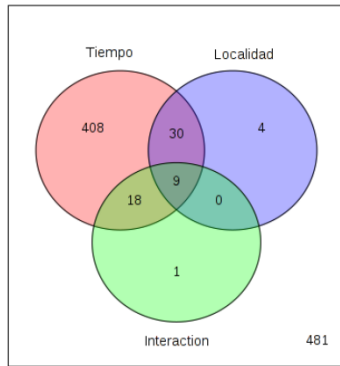


Imagen 35.- ANOVA de 2 factores para las 3 localidades tomando 995 features como variables de respuesta en ionización positiva usando una corrección por FDR al 5%

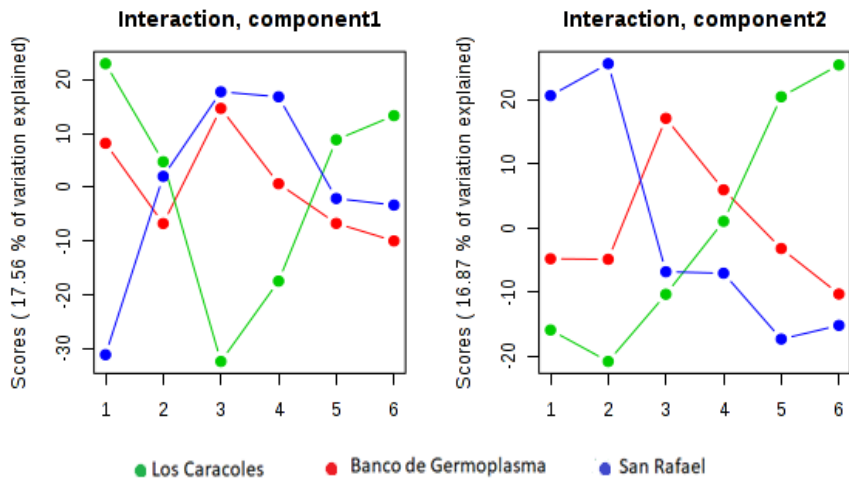


Imagen 34.- ASCA en las 3 localidades durante el desarrollo frutal de *V. planifolia* en ionización negativa

Tabla 4.- Resumen del ANOVA de dos factores para la corrección por FDR al 5% en modo positivo del análisis de los iones con influencia de la localidad y de la interacción

Ion (m/z) [M+H] ⁺	Localidad (p.corr)	Interacción (p. corr)	Tiempo (p. corr)
335.2216	1.60E-10	9.73E-17	3.49E-17
130.0511	1.87E-06	0.0065	2.48E-05
368.1300	1.24E-05	0.6100	4.95E-05
84.04519	3.28E-05	0.0096	2.90E-07
324.1400	3.28E-05	0.4855	4.99E-05
204.0878	0.0012	0.2512	0.0010
175.1089	0.0036	0.6874	0.0002
133.0611	0.0046	0.4780	6.00E-07
380.9842	0.0049	0.3749	0.0445
415.1702	0.0054	0.6813	6.12E-06
99.04425	0.0054	0.5622	0.2567
254.1632	0.0064	0.2548	0.0016
307.0936	0.0085	0.7071	4.13E-12
1048.5104	0.0085	0.0064	0.0059
[...]	[...]	[...]	[...]

En la tabla mostrada previamente, se aprecia un resumen de los iones que tienen una influencia significativa de la localidad, las etapas del desarrollo (tiempo) y la interacción entre ellos, para el modo de ionización positiva.

Se detectó una mayor cantidad de iones con diferencias significativas para el tiempo durante el desarrollo que entre las localidades y la interacción utilizando un ANOVA con un ajuste por FDR al 5% en ambos modos de ionización.

Tabla 5.- Resumen de los ANOVA de dos factores para la corrección por FDR en modo negativo del análisis de los iones con influencia de la localidad y de la interacción

Ion (m/z) [M-H] ⁻	Localidad (p. corr)	Interacción (p.corr)	Tiempo (p. corr)
486.1488	5.78E-18	4.99E-24	1.26E-43
847.4300	1.21E-16	1.41E-24	1.53E-42
529.231324	1.84E-09	2.30E-05	5.72E-12
441.2543	5.44E-08	0.0014	1.00E-12
385.1923	7.22E-07	0.0272	2.15E-10
971.4992	1.04E-05	0.0004	1.22E-08
Pedunculosumside F	5.55E-05	8.91E-07	3.15E-15
480.1828	5.55E-05	0.0003	5.29E-15
1349.4529	5.55E-05	0.2701	0.0022
586.0758	0.0001	1.43E-13	1.73E-21
3-hydroxyphliretin 2'-O-xylosylglucoside	0.0001	0.0001	1.30E-18
207.0534	0.0001	0.0037	2.10E-54
897.2096	0.0001	0.9556	0.0041
399.2438	0.0001	0.0076	8.52E-11
5-hydroxyhexanoate	0.0001	0.0097	3.53E-54
951.3163	0.0002	2.69E-05	4.36E-07
[...]	[...]	[...]	[...]

Para el modo de ionización negativa se encontraron una mayor cantidad de iones en general que están siendo afectados significativamente por la localidad, el tiempo y la interacción de

estos factores, a pesar de que la mayoría de los iones tienen una fuerte influencia temporal, existe una pequeña cantidad de iones y metabolitos pre-identificados que son afectados por la localidad únicamente.

5.7 Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) en tres localidades durante el día 215(7 meses) dpp en ionización negativa

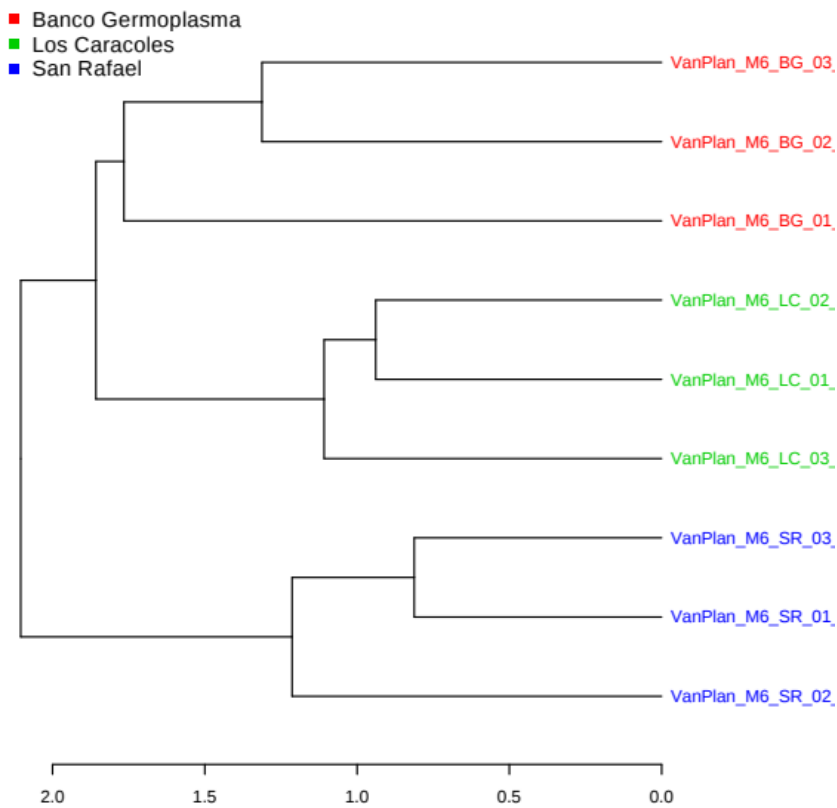


Imagen 36.- Dendograma del agrupamiento (distancia medida usando correlación de Pearson y un algoritmo de agrupamiento de promedio) para los iones en modo de ionización negativa.

Se nota un agrupamiento de los subconjuntos, cada muestra representa 3 vainas por planta, de color azul se notan las muestras de San Rafael y como se agrupan en un subconjunto, y las condiciones de Los Caracoles en rojo y el Banco de Germoplasma en verde se agrupan en otro subconjunto más grande (Imagen 36).

5.8 Heatmap de 3 condiciones ambientales durante el día 215 (7 meses) dpp en ionización negativa.

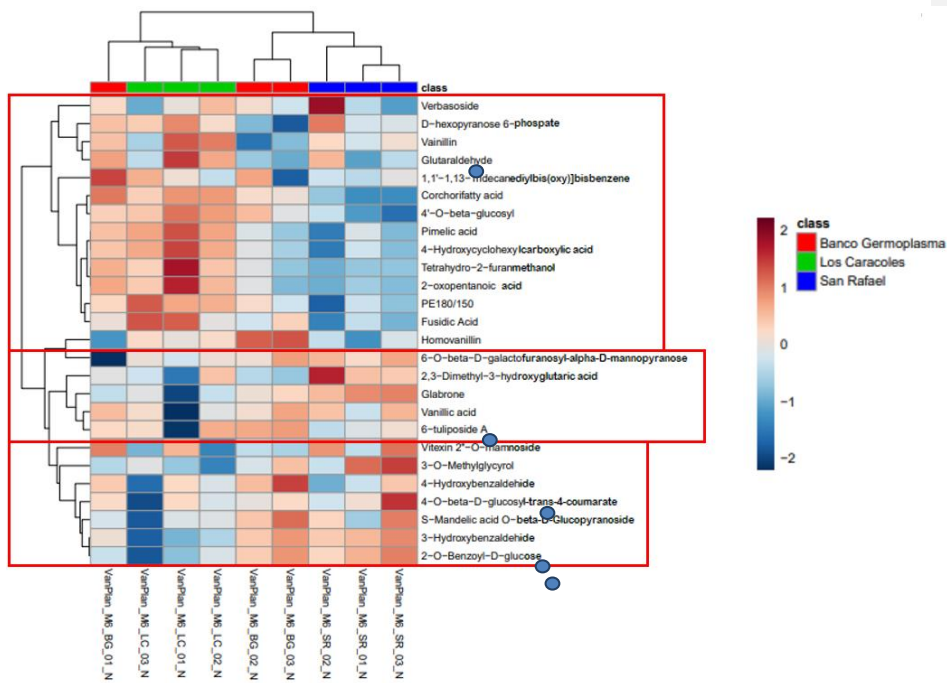


Imagen 37.- Heatmap de 362 iones midiendo distancias por la correlación de Pearson y un algoritmo de agrupamiento por promedio en modo de ionización negativa

Se puede observar el agrupamiento de compuestos específicos de la ruta de la vainillina (Imagen 9) y de los fenilpropanoides en los metabolitos remarcados en el rectángulo rojo superior, así como algunos flavonoides. En el grupo del segundo rectángulo rojo se nota una mayor cantidad de flavonoides y fenólicos con una mayor abundancia en las regiones del Banco de Germoplasma y Los Caracoles, se muestra una tendencia similar en el tercer rectángulo y las moléculas en esa sección corresponden también a fenólicos y flavonoides

para este par de rectángulos se encuentra un aumento parcial para la localidad de San Rafael, aunque son productos relacionados con la síntesis de la vainillina no todos presentan un carácter organoléptico como el de la vainillina (Imagen 37).

5.9 Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) en tres localidades durante el día 215 (7 meses) dpp en ionización positiva

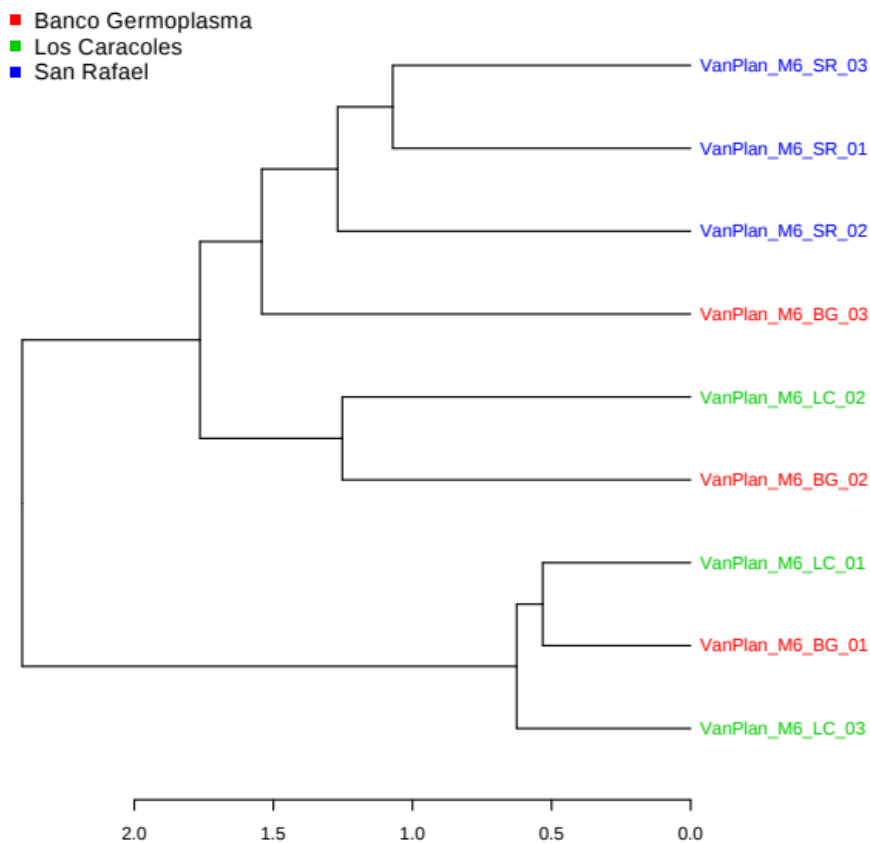


Imagen 38.-Dendograma resultante del agrupamiento (distancia medida usando la correlación y un método de agrupamiento por promedio) para los iones en modo de ionización positiva.

Se aprecia un agrupamiento parcial de la localidad de San Rafael, junto con una muestra del Banco de Germoplasma, en el otro conjunto se agrupan las muestras restantes del Banco de Germoplasma intercaladas con las muestras de Los Caracoles (Imagen 28).

5.10 Heatmaps en tres localidades durante el día 215 (7 meses) dpp en ionización positiva.

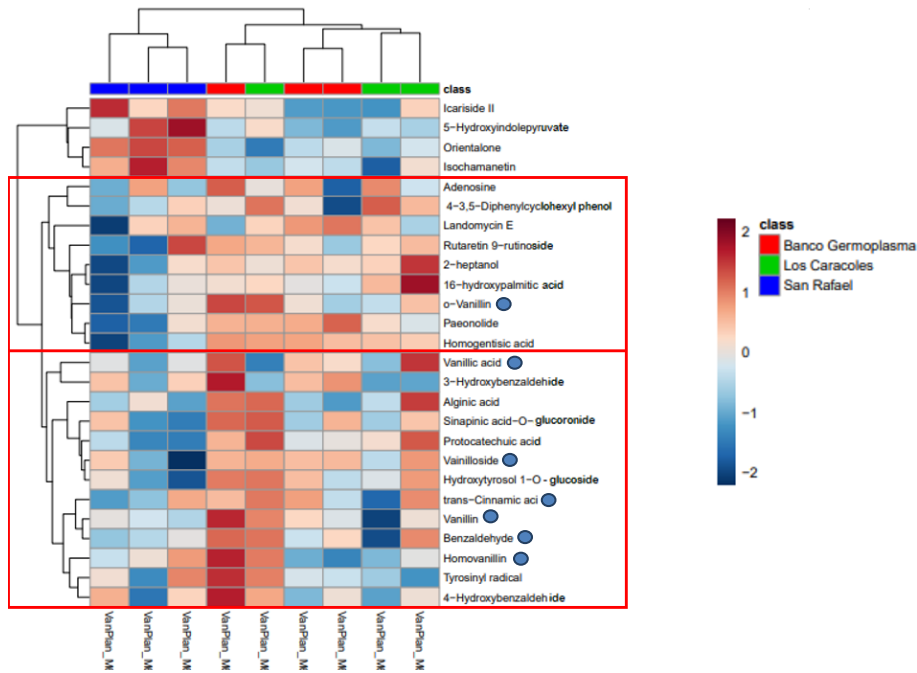


Imagen 40.- Heatmap de metabolitos pre-identificados, agrupados por distancias de correlación de Pearson y un algoritmo de agrupamiento por promedio en modo de ionización positiva.

Imagen 39.- Heatmap de 362 iones mediante distancias por la correlación de Pearson y un algoritmo de agrupamiento por promedio en modo de ionización negativa

Se puede apreciar el claro agrupamiento independiente de las muestras referentes a la ruta de la biosíntesis de vainillina (Imagen 39) y su acumulación disminuida para la localidad de San Rafael y un aumento para las localidades de Los Caracoles y el Banco de Germoplasma, la escala usada nos permite ver rangos de -2 a 2 porque se realizó una transformación logarítmica de los valores de las abundancias (Imagen 39).

5.11 Iones con diferencias por análisis de varianza durante el día 215 post polinización en ionización negativa (mes 7 post polinización)

Se realizaron análisis de varianza entre cada localidad considerando además la tasa de cambio (*fold change*) en la última etapa del desarrollo buscando biomarcadores pertenecientes a cada localidad.

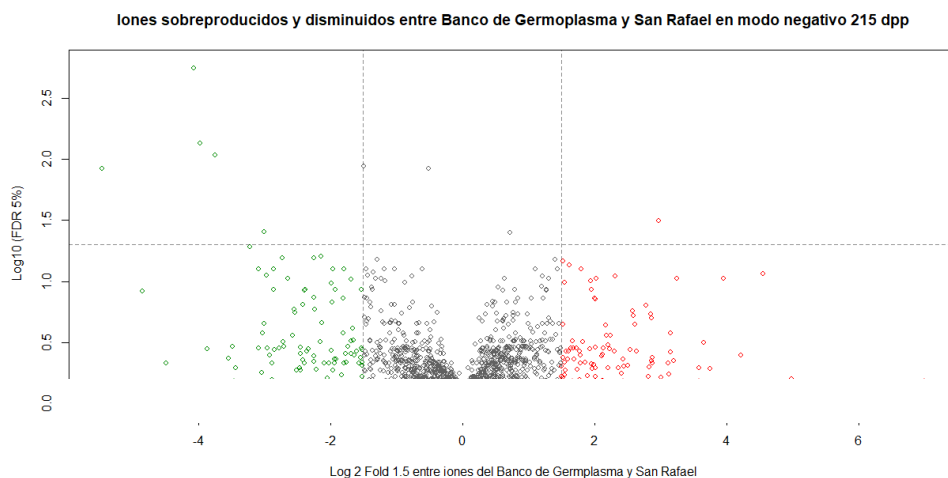
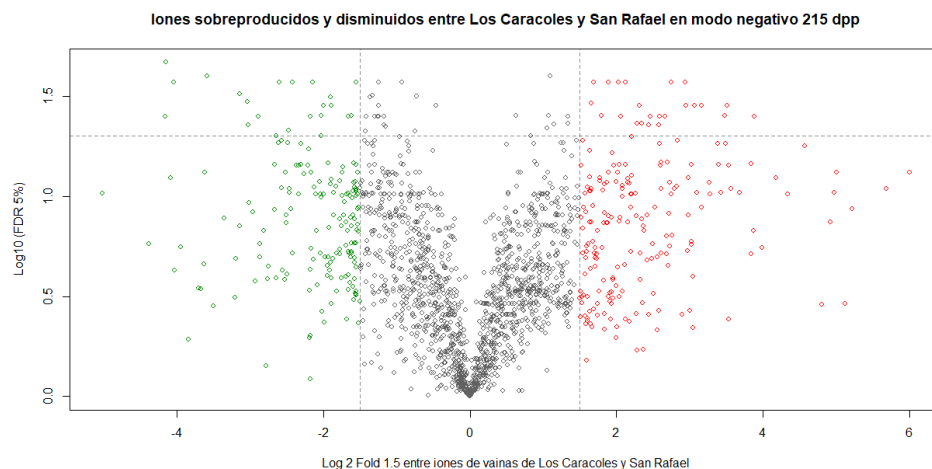


Imagen 41.- Diferencias entre las abundancias de los iones detectados para las localidades del Banco de Germoplasma y San Rafael

Se encontraron diferencias en algunos iones sin pre-identificación, aumentados en el Banco de germoplasma: 443.0705 [M-H]⁻, 479.1624[M-H]⁻, 209.1212 [M-H]⁻ y 303.0913 [M-H]⁻, en el caso de San Rafael fueron los siguientes iones: 374.1407[M-H]⁻, 337.0966 [M-H]⁻, 431.1383 [M-H]⁻, 361.1131 [M-H]⁻ y 550.2583 [M-H]⁻, los detalles de las diferencias entre estos iones se muestran en la tabla 12 del Anexo B, en total se encontraron 9 iones variando significativamente entre estas 2 localidades, siendo el 0.47% del total de iones detectados, existen iones con valores de 0 que al ser divididos entre cualquier valor dan como resultado infinito.

Para la ionización negativa se encontraron diferencias en los iones pre-identificados y sin pre-identificar para el caso de la comparación entre Los Caracoles y San Rafael, se



muestran en las Tablas 11 de Anexo B.

Imagen42.- Diferencias entre las abundancias de los iones detectados para las localidades de Los Caracoles y San Rafael

Para la comparación entre Los Caracoles y San Rafael se pudieron encontrar diferencias en iones preidentificados, aumentando el 4-hidroximetilcatecol y el Corchorifatty acid F, así como 28 iones sin pre-identificar (mostrados en la tabla 11 del Anexo B) para la localidad de Los Caracoles. En cambio, en San Rafael se encontró un aumento en un flavonoide glucosilado, que es un compuesto reportado presente en *Glycyrrhiza uralensis* (Licorice) perteneciente a la familia de los fénil propanoides, pero aún debe de ser validada su presencia. En tanto al otro par de posibles pre-identificaciones, el catecol es una molécula que consta de un anillo aromático de bajo peso molecular (140.0473 Da) y Corchorifatty acid F que es un lípido reportado en cereales, se muestran en la Tabla 11 de Anexo B los detalles de las pre-identificaciones. En total se encontraron 50 iones diferenciales entre las condiciones ambientales de Los Caracoles y San Rafael inherentes al 2.65% de los iones detectados.

Al comparar las localidades del Banco de Germoplasma y Los Caracoles no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Considerando esto, y los resultados de los análisis de componentes principales, reagrupamos los datos en 2 conjuntos. Inherentes a Tenampulco, Puebla, aquí agrupamos las localidades de Los Caracoles y el Banco de Germoplasma y lo comparamos contra la localidad de San Rafael, Veracruz.

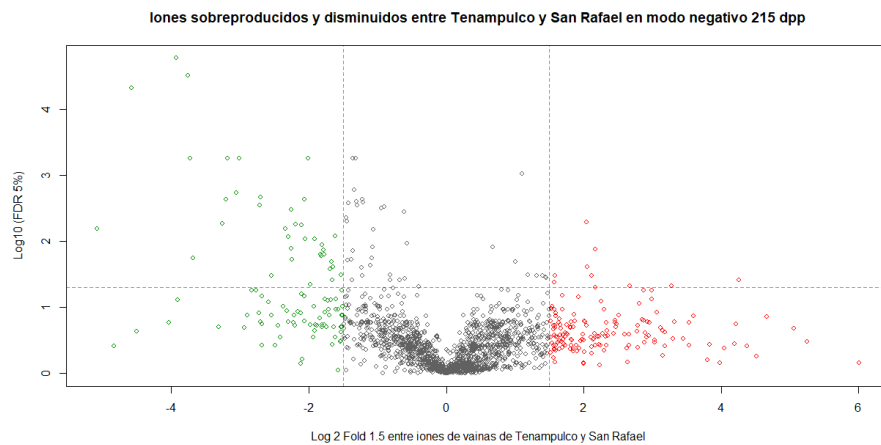


Imagen 43.- Diferencias entre las abundancias de los iones detectados para las localidades de Tenampulco y San Rafael en modo negativo

En este análisis de varianza encontramos que los compuestos pre-identificados en la comparación entre Los Caracoles y San Rafael mantienen las diferencias con significancia cuando agrupamos Los Caracoles y el Banco de Germoplasma en el grupo de Tenampulco, y además se encontraron diferencias en algunos compuestos pre-identificados en Tenampulco que tiene un aumento en un ácido octadecanoico, en cambio dentro de San Rafael se nota un aumento en distintos compuestos putativos mostrados en la Tabla 13 del Anexo B a detalle, entre estos compuestos putativos interesantemente se nota el aumento en el isovainillina para la localidad de San Rafael.

5.12 Iones con diferencias por análisis de varianza durante el día 215 post polinización en ionización positiva (mes 7 post polinización)

No se encontraron diferencias en los iones detectados en el análisis de varianza con una corrección por FDR al 5% y una tasa de cambio de 1.5.

Iones sobreproducidos y disminuidos entre Los Caracoles y San Rafael detectados en modo positivo durante 215 dpp

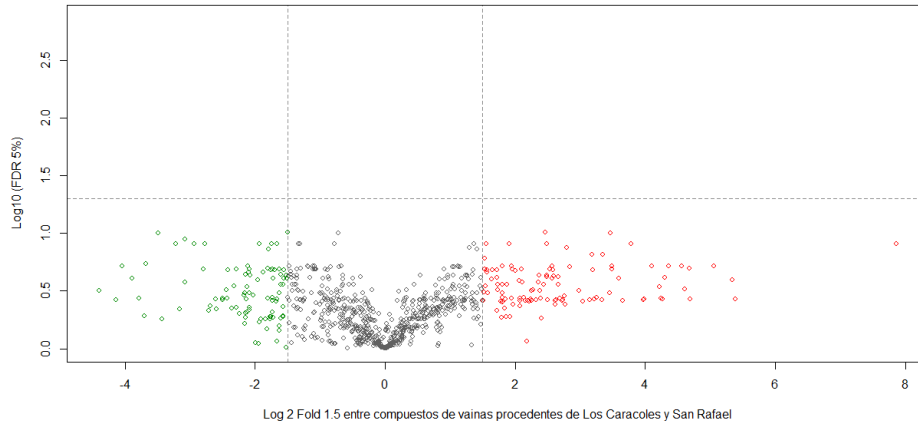


Imagen 44.- Diferencias entre las abundancias de los iones detectados para las localidades de Los Caracoles y San Rafael en modo positivo

Iones sobreproducidos y disminuidos entre Banco de Germoplasma y San Rafael durante en modo positivo 215 dpp

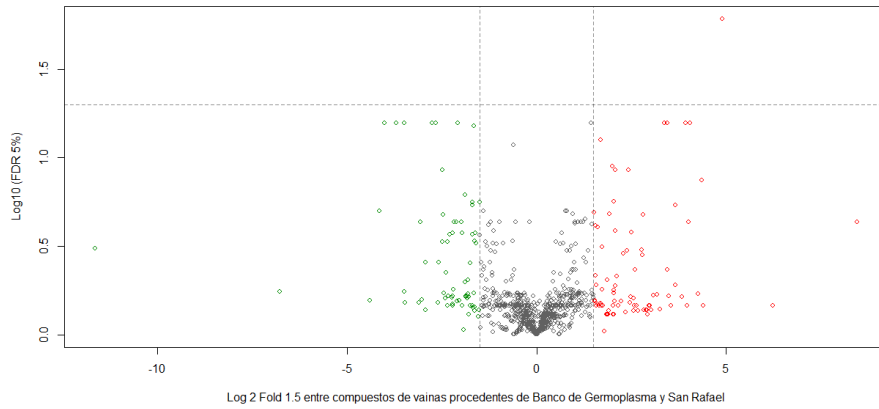


Imagen 45.- Iones sobreproducidos y disminuidos entre Banco de Germoplasma y San Rafael en modo positivo durante 215 dpp

Para la comparación llevada a cabo entre las localidades entre el Banco de Germoplasma y San Rafael solamente se encontró un ion aumentado con una diferencia

significativa entre estas localidades, aquí se encontró el ion 206.0590n con una carga neutra, se buscó esta masa en la base de datos de METLIN y se encontraron 11 posibles coincidencias, debemos realizar una fragmentación dirigida hacia este ion, y así tomar en cuenta los candidatos que son compuestos catalogados principalmente como flavonoides, por lo que es muy probable que este ion pertenezca a esta familia.

5.13 Metabolitos mapeados a rutas metabólicas dentro de *V. planifolia*.

Se mapearon los metabolitos pre-identificados contra una base de datos con el metaboloma de *Dendrobium catenatum* que es una planta filogenéticamente cercana a *V. planifolia* de la familia de las orquídeas. Se pudieron mapear distintas rutas en el análisis para los compuestos pre-identificados en ambos modos de ionización pero se usó el total de compuestos putativos (Imagen 44) (Chong & Xia, 2018). Los colores varían de amarillo a rojo dependiendo de los niveles de significancia para las rutas metabólicas se consideraron los más significantes con un *pathway impact* >0.1, para este caso cumplen este criterio la ruta de la fenilalanina y la tirosina únicamente.

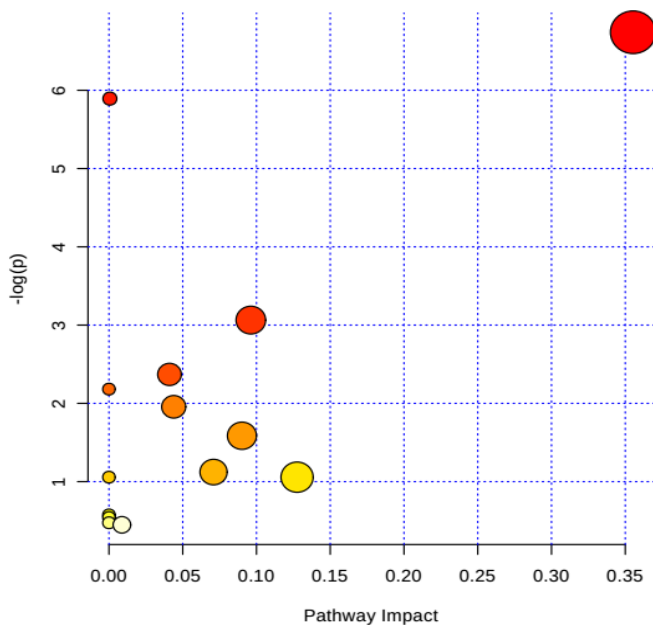


Imagen 46.- Resultado del análisis de rutas en modo positivo y negativo

Tabla 6.-Detalles del análisis de rutas en ambos modos

	Total	Expected	Hits	Raw p	-log(p)	Holm adjust	FDR	Impact
Phenylalanine metabolism	45	0.49	4	1.18E-03	6.74E+00	9.45E-02	9.45E-02	0.36
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	27	0.29	3	2.76E-03	5.89E+00	2.18E-01	1.10E-01	0.00
Tyrosine metabolism	76	0.82	3	4.67E-02	3.06E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.10
Fructose and mannose metabolism	48	0.52	2	9.35E-02	2.37E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.04
Biotin metabolism	11	0.12	1	1.13E-01	2.18E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	14	0.15	1	1.41E-01	1.96E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.04
Caffeine metabolism	21	0.23	1	2.05E-01	1.59E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.09
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	36	0.39	1	3.26E-01	1.12E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.07
Nitrogen metabolism	39	0.42	1	3.48E-01	1.06E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Glycerophospholipid metabolism	39	0.42	1	3.48E-01	1.06E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.13
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	0.81	1	5.63E-01	5.75E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Tryptophan metabolism	79	0.85	1	5.82E-01	5.41E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	88	0.95	1	6.22E-01	4.74E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Purine metabolism	92	0.99	1	6.39E-01	4.48E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.01

Se realizó el mapeo para rutas metabólicas, se pudieron anotar 22 metabolitos pre identificados para distintas rutas, entre las cuales la ruta de la fenilalanina se encontró con un mayor número de identificaciones.

El repositorio de MetaboAnalyst 4.0 permite la visualización simultánea de las rutas mapeadas, pudimos identificar la ruta de la fenilalanina, para algunos alcaloides derivados del tropano, piridina y piperidinas, así como del metabolismo del nitrógeno, la tirosina, la purina, la biotina, la fructosa, la cafeína, la ubiquinona, el triptófano, la biosíntesis de los aminoacil tRNA's, y otros terpenoides quinólicos (Tabla 6), cabe agregar que para este análisis se tomaron todos los compuestos pre-identificados para ambos modos de ionización.

6.1 Discusión

Los resultados sugieren que algunos de los iones con mayor abundancia son estructuras sencillas de bajo peso molecular como la vainillina, 3-hidroxi y 4-hidroxi benzaldehído para el modo de ionización negativa, mientras que en el modo de ionización positiva una de las moléculas con mayor abundancia resultó ser la vainillina glucosilada una de las moléculas pre-identificadas.

La relevancia de poder detectar una alta cantidad de iones reside en que existen aún una gran cantidad de compuestos sin saber cuál es su función o su estructura, a pesar de que existen bases de datos con millones de moléculas reportadas o incluso el hecho de saber que hay 200,000 metabolitos reportados para plantas (Dubery, 2013; Hong et al., 2016), aún existe un largo camino por recorrer en el área de la química de los productos naturales producidos por plantas.

Pudimos detectar 995 iones para el modo de ionización positiva y 1881 iones en el caso de la ionización negativa, dentro de todas estas entidades químicas se pudieron pre-identificar 134 y 144 moléculas respectivamente, debemos considerar que puede haber metabolitos o compuestos químicos que pueden tener una baja abundancia relativa o una baja ionización con los parámetros que usamos, pero puede que cumplan funciones importantes dentro de los frutos de *V. planifolia*, por lo que vale la pena considerar que la abundancia no es un factor para poder destacar un ion como una entidad química significativa, en el marco referencial de su posible función biológica.

Son de vital importancia los análisis estadísticos, ya que al tener una gran matriz de datos es posible asumir que al comparar las distintas condiciones localidades o etapas del desarrollo existen diferencias, pero dichos supuestos pueden ser considerados como falsos positivos (error tipo 1), por el problema de las comparaciones múltiples, se consideró unacorrección por FDR al 5% para descartar este tipo de errores en los análisis de varianza de 2 factores y en los ANOVA de un factor para los análisis en las etapas específicas de desarrollo que se comparaban entre las distintas localidades.

6.2 Fenotipo de vainas durante el desarrollo

Las vainas de *V. planifolia* tienen un peso que se mantiene variando parcialmente durante los primeros 180 días después de la polinización en promedio (6 meses post polinización), según las mediciones y los resultados observados en la Imagen 16 -19, el peso de estas se mantiene constante durante los primeros 5 muestreos en los que no se aprecian diferencias notables, en cambio en el último muestreo se encontró que el peso de las vainas se ve aumentado drásticamente, existiendo una diferencia de 35 días del muestreo realizado del día 180 (5to muestreo) al 215 (6to muestreo) post polinización, en un reporte (Palama et al., 2009) afirma que existe una correlación lineal del peso y de la longitud de las vainas durante el desarrollo frutal, nuestros resultados no concuerdan con dichos datos, los muestreos que realizamos durante este proyecto tampoco concordaron con los tiempos que se usaron en el reporte mencionado previamente .

En el reporte de Gallage et al., 2018 localizan las enzimas VpVAN que son las responsables de producir vainillina y glucovainillina en tejidos frutales de 7 meses de desarrollo, ellos emplearon distintas técnicas de biología molecular y de química analítica para desmentir ciertas controversias que surgieron a raíz de que hubo reportes que desacreditaban (Kundu, 2017; H. Yang et al., 2017) a esta enzima como la responsable de sintetizar vainillina y glucovainillina (Gallage & Møller, 2015), al mismo tiempo comprueban que a pesar de ser una enzima promiscua no sintetiza vainillina o glucovainillina a partir de fenilalanina ni ácido cinámico, pero sí únicamente de ácido ferúlico y ácido ferúlico glucosilado (Gallage et al., 2014, 2018), en nuestros hallazgos cabe resaltar que se pudieron pre-identificar distintos compuestos que pertenecen a la ruta del ácido cinámico los compuestos como el ácido ferúlico y su glucósido no fueron detectados en nuestro estudio.

No se observó un fenotipo distintivo entre las tres condiciones de las vainas muestreadas en relación con su peso, longitud y apariencia, prácticamente estamos hablando de que el fruto que estamos analizando en las 3 localidades además no presenta diferencias significativas en su genoma; dado que partimos del hecho de que cuentan con el

mismo genoma debido principalmente al sistema de reproducción por esquejes, por lo que suponemos que podemos evaluar su respuesta al ambiente, en todas las condiciones ambientales se presentaban vainas que llegaban a pesar individualmente inclusive 80 gr durante la última etapa de desarrollo.

Aquí cabe resaltar que a pesar de que en las distintas localidades condiciones climáticas no eran idealmente óptimas, y muchas de las plantas inclusive se secaban en la región de San Rafael, Veracruz se tomaban vainas de plantas que sobrevivían con sombra y riego durante la etapa de junio-julio del 2018, y se registraban temperaturas de hasta 45° C, evidentemente etiquetamos más vainas de las necesarias teniendo en cuenta que este problema podría darse.

6.3 UPLC-ESI- MS^E para vainas verdes durante el desarrollo de *V. planifolia*

La técnica de UPLC-ESI- MS^E nos permitió detectar metabolitos antes reportados dentro de vainas verdes, como distintos compuestos vainilloides que son los responsables de darle el aroma a la vainilla, cabe agregar que las moléculas vainilloides pueden ser detectadas mediante distintas estrategias analíticas, cómo: GC-MS, LC-MS, NMR, (Gu et al., 2017; Guo et al., 2019; Palama et al., 2009; Pérez-Silva et al., 2006), en nuestro estudio detectamos una gran cantidad moléculas pertenecientes a la familia de los vainilloides como la vainillina, ácido vainillínico, 3-hidroxibenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, glucovainillina, entre otros compuestos fenólicos como el cresol, además de moléculas que pueden estar involucradas en procesos de señalización y regulación, pero sus abundancias siempre fueron menores en relación a la familia de compuestos vainilloides.

Además de la amplia gama de compuestos pre-identificados se obtuvo una lista de iones sin pre-identificar que pueden tener distintas funciones y estructuras por descubrir, a pesar de encontrar diferencias en las etapas finales el metabolismo secundario, también puede haber una gran cantidad de moléculas que jueguen un papel importante en las primeras etapas del desarrollo frutal, sobre todo al no encontrar una variación tan grande como en las posteriores etapas analizadas.

Se detectaron 1881 iones en modo negativo y 995 en modo positivo mediante una extracción metanólica, removiendo parcialmente los compuestos lipídicos y la clorofila con hexano, los iones fueron sometidos a filtrados dependiendo de su abundancia, pre-identificando 144 en modo negativo y 134 iones en modo positivo (Tablas 7 y 8), se identificaron distintos compuestos vainilloides, flavonoides, alcanos, ácidos grasos, nucleósidos, esteroides, alcaloides, entre otros. A diferencia de los métodos en los cuales se reportan concentraciones de compuestos vainilloides (Palama et al., 2009; Pérez-Silva et al., 2006; Zhang et al., 2014), nosotros en cambio no realizamos mediciones de las concentraciones, aun así, obtuvimos abundancias relativas donde los iones más abundantes son estructuras químicas sin pre-identificación, pero de igual manera la vainillina y su familia de compuestos siempre se mantenían en la cima de la tabla de compuestos más abundantes, a pesar de estar analizando vainas verdes.

Analizando los datos de la Tablas 8 y 9, compuestos relacionados con el crecimiento vegetativo (Guo et al., 2019) fueron pre-identificados, entre ellos distintos derivados de la quercetina y el kaempferol, con una baja intensidad a comparación de otros compuestos vainilloides, solamente la quercetina en su forma de aglicona presentaba una abundancia normalizada alta.

6.4 Abundancia de compuestos vainilloides durante el desarrollo

Los distintos compuestos vainilloides los comenzamos a detectar desde el cuarto mes (118 dpp), a diferencia de Palama y colaboradores, 2009 no obtuvimos una muestra al tercer mes de desarrollo, aunque ellos en su estudio se enfocan en la vainillina, ácido vainillínico, p-hidroxibenzaldehído y ácido benzoico. Estos compuestos surgen a partir del 3er mes y son producidos en tejidos como el mesocarpio y dentro de la placenta del fruto (Brillouet et al., 2014; Dignum et al., 2004; Gallage et al., 2014, 2018; Joel et al., 2003).

En nuestras observaciones los compuestos vainilloides aparecen a partir del 4to mes (118 dpp) y se mantiene su producción o aumenta gradualmente, teniendo algunos de ellos sus picos de abundancia máxima durante la última etapa de desarrollo, en nuestro análisis en modo positivo pudimos ver que la glucovainillina tiene una mayor abundancia que la

vainillina libre lo que concuerda con reportes previos (Palama et al., 2009)(Apéndice A, Imagen 56 y 57) además de que este compuesto no presenta una gran variación entre las localidades, un caso similar es el de la glucovainillina que presenta una variación significativa dentro las etapas del desarrollo.

Los distintos modos de ionización nos permitieron ver una mayor cantidad de moléculas vainilloides que pudieron ser pre-identificadas en PROGENESIS QI ®, a pesar de que en modo negativo se pudieron detectar más iones en comparación con la ionización positiva, la cantidad de iones pre-identificados resultó ser muy similar respecto a la cantidad de compuestos asignados a las posibles masas ionizadas (134 en modo positivo y 144 en modo negativo) de las cuales 43 iones pre-identificados eran detectables en ambos modos de ionización, entonces poniendo las cifras finales se obtuvieron un total de 2831 iones totales en ambos modos de ionización, de los cuales fuimos capaces de obtener 212 pre- identificaciones que corresponde al 7.4% de los iones detectados, por lo que existen aún moléculas por pre-identificar e identificar dentro de los 2619 iones sin identificar.

6.5 Iones con influencia de la localidad y su interacción con el desarrollo

Desarrollamos análisis que nos permitieron tomar los datos crudos de las abundancias relativas obtenidas de los análisis de LC-MS, de ahí se obtiene un par de matrices de datos para cada modo de ionización (positiva y negativa). El ANOVA de dos factores nos permitió relacionar la influencia ya sea del tiempo, la localidad o la interacción de estas o ambas, una vez realizado este procedimiento, dicho valor se fijó al 5% con una corrección de FDR para disminuir la tasa de falsos positivos(errores tipo 1).

Lo anterior se puede explicar de la siguiente manera: existen metabolitos que evidentemente se verán afectados durante el transcurso del tiempo, entre estos se encuentran los compuestos vainilloides que aparecen a partir del 3er mes, entonces dichos metabolitos estarán influenciados por el tiempo principalmente, por lo que este análisis nos

ayudará a darnos cuenta qué iones tienen una influencia de la localidad o por la interacción del tiempo y la localidad.

Para estos datos se consideraron los resultados con la corrección de FDR al 5% a pesar de que se recomienda usar un valor de 5% (Benjamin et al., 2018), se optó por considerar la corrección por FDR al 5% para las diferencias en el ANOVA de 2 factores y para las comparaciones entre localidades por etapa de desarrollo se mantuvo una corrección con FDR al 5%.

Se puede mostrar la tendencia de las moléculas vainilloides en el Anexo A en la Imágenes 56-60, en las que se puede apreciar que existe una tendencia similar en las moléculas dentro de las 3 localidades. Una gran cantidad de diferencias se encuentran en iones que presentan una menor abundancia que las moléculas vainilloides, pero de igual forma encontramos diferencias en algunos iones sin pre-identificaciones con abundancias altas.

Existen más diferencias significativas dadas por el tiempo de desarrollo principalmente en ciertos compuestos pre-identificados, como era de esperarse, así como para la interacción del tiempo con el ambiente, pero para los iones afectados solamente por el ambiente no existen pre-identificaciones para el ANOVA de 2 factores utilizando una corrección por FDR del 5%, a excepción de un compuesto llamado rutarina que es un flavonoide reportado para la ruda (*Ruta graveolens*) que presenta una mayor abundancia en la localidad de Los Caracoles.

6.6 Diferencias significativas durante etapas específicas del desarrollo

En los seis muestreos se observan diferencias parciales que pudimos visualizar realizando análisis de componentes principales, heatmaps y gráficos de volcán durante cada etapa del desarrollo dentro de las 3 condiciones ambientales, en las que se encontraban más diferencias significativas en la última etapa de desarrollo (215 dpp), para encontrar diferencias puntuales en cada etapa de desarrollo. Dichos análisis se generaron para los datos obtenidos en modo positivo y negativo.

Dentro de cada etapa evaluada durante el desarrollo frutal, nos dimos cuenta de que existe una mayor dispersión entre los grupos durante el día 215 (7° mes) post polinización en el modo de ionización negativa y durante el cuarto mes en el modo de ionización positiva, a pesar de esto, al ver los datos dentro de los 2 componentes principales en los PCA de la última etapa se aprecian 3 grupos establecidos, que a su vez 2 de ellos se reagrupan en uno solo, y como era de esperarse, en el subgrupo mayor al buscar diferencias significativas no existen, lo que nos dice que las condiciones ambientales de Los Caracoles y el Banco de Germoplasma tienen diferencias mínimas o que no afectan drásticamente el metaboloma del fruto de *V. planifolia*.

Cuando estas localidades se ven alteradas por la sequía, la falta de riego, y la falta de humedad, se sufren cambios a nivel metabólico, caso de la localidad de San Rafael donde al día 215 (7° mes) post polinización se encontraron diferencias significativas en iones con pre-identificaciones, aquí se presenta una abundancia relativa mayor del ácido isovainillínico (Tabla 7 y 11), aspecto relevante porque esta molécula no se encuentra presente en la ruta de la biosíntesis de la vainillina reportada, y puede ser otro intermediario importante en esta ruta o un sub-producto de la misma.

En la imagen 37 y 39 en el heatmap se puede apreciar el agrupamiento de las 3 condiciones ambientales para los modos de ionización positiva y negativa respectivamente, en ambos casos se forma un grupo que incluye las 3 réplicas de la localidad de San Rafael que se agrupa en un subgrupo, cabe resaltar que los iones marcados con un punto azul son correspondientes a los pertenecientes de la ruta de la vainillina. Los distintos compuestos vainilloides se mantienen parcialmente agrupados para los 2 modos de ionización, por lo

que se infiere que tienen una tendencia similar, en este par de gráficos solamente se tomaron los iones que tienen una abundancia relativa arriba alta respecto de la máxima intensidad obtenida para cada modo de ionización, así se puede observar claramente que los compuestos relacionados a la vainillina tienen una relación entre ellos, y que el agrupamiento entre las condiciones evaluadas es similar entre ellas. Además, en las Imágenes 56-60 se muestra la tendencia durante el crecimiento de los frutos de *V. planifolia* en las tres localidades.

No se consideró adjuntar las comparaciones entre las localidades referentes al Banco de Germoplasma y Los Caracoles, ambos están en una región cercana y pertenecen al mismo municipio de Tenampulco, Puebla, por lo que presentan diferencias significativas despreciables entre ellas, por lo que se demostró que las diferencias se encuentran entre San Rafael, Veracruz y Tenampulco, Puebla.M

Muchas de las moléculas vainilloides no presentan diferencias en la tendencia de abundancia y en la aparición dentro las 3 condiciones ambientales con los ANOVA, se presentan ligeras diferencias que afectan el metaboloma, por lo que conocer a detalle que variables ambientales tienen mayor influencia sobre los distintos metabolitos es fundamental para optimizar las condiciones en las que se cultivan estos frutos, pensando en el cambio ambiental considerando las temporadas de sequía que pueden generar pérdidas importantes en la cosecha del fruto de *V. planifolia*, por lo que es pareciera ser que es recomendable cultivar donde se tengan temperaturas que oscilen entre los 20 y 30 °C sin aumentos ni disminuciones drásticas de temperatura, aunque esto necesitará de futuras investigaciones para su validación.

6.7 Reagrupando datos en 2 conjuntos

Considerando los resultados obtenidos en los PCA (Imagen 30 y 31) y los HCA (Imagen 36 y 38) se decidió realizar un agrupamiento en 2 localidades solamente, ya que a pesar de encontrarse a una diferencia de altitud sobre el nivel del mar de 56 metros entre las regiones de Los Caracoles y Banco de Germoplasma. Observaron una diferencia despreciable en el análisis de varianza con un ajuste por FDR (5%) y una tasa de cambio (*fold change*) de 1.5, para encontrar metabolitos específicos para cada localidad, optamos por hacer una serie de análisis tomando en cuenta 2 grupos Tenampulco, Puebla (Los Caracoles y Banco de Germoplasma) y San Rafael, Veracruz para la búsqueda de diferencias en la última etapa de desarrollo al día 215 post polinización (7° mes) y encontramos lo siguiente en los iones pre-identificados.

Tabla 7.- Compuestos diferenciales pre-identificados entre los grupos de Tenampulco, Puebla y San Rafael, Veracruz en modo negativo.

Nombre del compuesto en inglés	log ₂ (FC)	FDR (5%)	Sobreproducción
3-hydroxyphloretin 2'-O-xyloglucoside	-2.53934257	3.30E-02	San Rafael
4-Hydroxymethylcatechol	2.04042303	5.16E-03	Tenampulco
(-)-pinellic acid	3.27322233	4.73E-02	Tenampulco
LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	-2.24445742	1.91E-02	San Rafael
Glabrone	-1.97536716	4.52E-02	San Rafael
Licorice glycoside D1	-1.61852728	8.38E-03	San Rafael
Cyclocommunin	-2.19416249	5.54E-03	San Rafael
13-Hydroxy-9-methoxy-10-oxo-11-octadecenoic acid	2.17192195	4.99E-02	Tenampulco
Isovanillic acid	-1.6463338	2.43E-02	San Rafael
Phenytain methylcatechol	-1.81027717	1.14E-02	San Rafael

Las tabla 7 muestra las diferencias encontradas entre las dos localidades de Tenampulco, Puebla contra San Rafael, Veracruz a través de los compuestos que presentan un valor negativo de log₂ (FC = 1.5) son compuestos que tiene valores disminuidos en la región de Tenampulco en comparación con San Rafael, en la tablas para la ionización

negativa, dónde fueron apreciables diferencias significativas, se agregó el valor del FDR al 5%.

7.1 Conclusiones

Las vainas de *V. planifolia* se obtuvieron de la región de la Sierra Madre Oriental, en la región de Totonacapan en la denominación de origen, donde se observan las condiciones climáticas adecuadas para el crecimiento y la floración de la planta, requiere altas cantidades de humedad, sombra del 50%, entre otros factores nutrimentales que deben mantenerse óptimos para el desarrollo frutal, y de la planta misma, aunque en general se recomienda cortar la punta del brote cuando se polinizan flores en tiempo de floración para que los nutrientes de la planta sean dirigidos al fruto y no hacia el crecimiento vegetativo.

Se identificaron moléculas vainilloides como la vainillina y la etilvainillina para ambos modos de ionización, dentro de las muestras de *V. planifolia*, comparamos los tiempos de retención y los espectros de fragmentación de las muestras contra los estándares de referencia, obteniendo tiempos de retención y espectros de fragmentación iguales para vainillina y etilvainillina, quedando de esta manera validado los compuestos en las vainas verdes estudiadas.

Determinamos que con nuestro método es posible pre-identificar una gran cantidad de compuestos para llevar un monitoreo de qué compuestos pre-identificados actúan dentro de los frutos de vainilla en relación al ambiente, esta información sirve para darnos cuenta de qué tanta abundancia puede esperarse de ciertos tipos de moléculas en determinadas condiciones ambientales, se logró pre-identificar una gran cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, derivados del tropano, nucleótidos, con abundancias relativas razonablemente altas.

Se mapearon los compuestos pre-identificados usando MetaboAnalyst 4.0 para ambos modos de ionización, el genoma de *V. planifolia* sigue sin estar disponible en ninguno repositorio en línea, aunque se puede ver qué tendencias se tienen en distintas plataformas, ya sea por mapeando a rutas metabólicas específicas, o mapeando con respecto a plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, aunque en este caso el mapeo se realizó para *D. catenatum* que es la especie filogenéticamente más cercana a *V. planifolia*, los datos fueron tomados del repositorio de la KEGG usando MetaboAnalyst 4.0.

Específicamente se pudieron pre-identificar compuestos y iones específicos a cada localidad, de dichos compuestos se sabe el tiempo de retención, la relación de su masa sobre carga, sus aductos, y su patrón de relación isotópica.

Es importante resaltar que se obtuvo la pre-identificación de metabolitos que están relacionados en la ruta de biosíntesis de los fénil propanoides como la 2-*O*-benzoyl-D-glucosa y una hidroxycumarina (Anexo B, Figuras 58 y 59) tienen una mayor abundancia dentro de la región de San Rafael, Veracruz a diferencia de Tenampulco, Puebla.

Dentro la evidencia en San Rafael se encontró que el ácido isovainillínico, que es una molécula que puede estar implicada en la ruta de la vainillina, presentaba un aumento, es difícil justificar su presencia por el hecho de que las variaciones ambientales pueden estar afectando el metaboloma *de* los frutos de *V. planifolia*, pero al tener significancia estadística podemos decir que las fluctuaciones entre las localidades nos sugieren que un ambiente es propicio para redirigir la ruta de biosíntesis en otras moléculas similares a la vainillina. Para el caso de Tenampulco, Puebla también se encontró un metabolito pre-identificado interesante (4-metilcatecol) que tiene una influencia importante de la localidad.

Se comprobó que existe una mayor cantidad de precursores de la vainillina dentro de las localidades más elevadas sobre el nivel del mar (Tenampulco, Veracruz) (Imagen 37 y 39), estas condiciones se correlacionan con una mayor humedad y una menor temperatura a comparación con la localidad de San Rafael, Veracruz, donde en esta temporada hubo sequías y una menor humedad a pesar de ser una localidad costera.

La influencia de la localidad durante el desarrollo es pequeña en comparación con la influencia del tiempo durante el desarrollo, ya que como es evidente muchos metabolitos presentan cambios porque su biosíntesis no se mantiene constante durante todas las etapas de desarrollo.

8.1 Perspectivas

- Generar análisis MS/MS para los iones pre-identificados y no pre-identificados como diferenciales entre las distintas localidades para buscar caracterizarlos estructuralmente más a detalle.
- Desarrollar métodos de análisis de MALDI-MS para ver la localización de moléculas importantes estructuralmente similares a la vainillina y moléculas de interés en tejido frutal, considerando el análisis previamente propuesto.
- Realizar extracciones tejido-específicas (pericarpio, mesocarpio, semilla, placenta) utilizando UPLC-MS/MS, para profundizar en los compuestos.
- Generar análisis de RNASeq para ver qué tipo de transcritos abundan durante las distintas etapas del desarrollo frutal dentro de las distintas localidades.
- Comparar localidades con condiciones climáticas más drásticas de las evaluadas en este proyecto para ver si se mantienen las tendencias en los compuestos que varían en función de las localidades.
- Crear base de datos de compuestos relacionados a *V. planifolia*.

9.1 Anexos

9.1.1 Anexo A

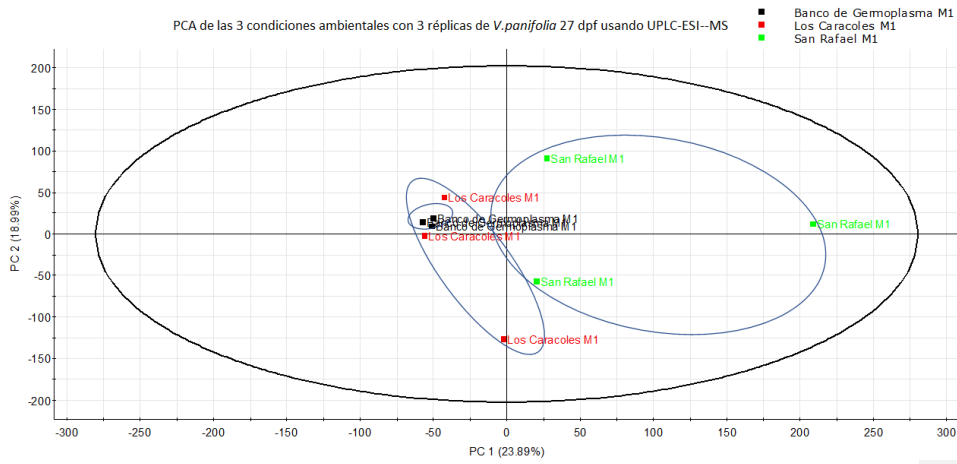


Imagen 47.- PCA de vainas verdes durante el 27 dpp usando UPLC-ESI-MS

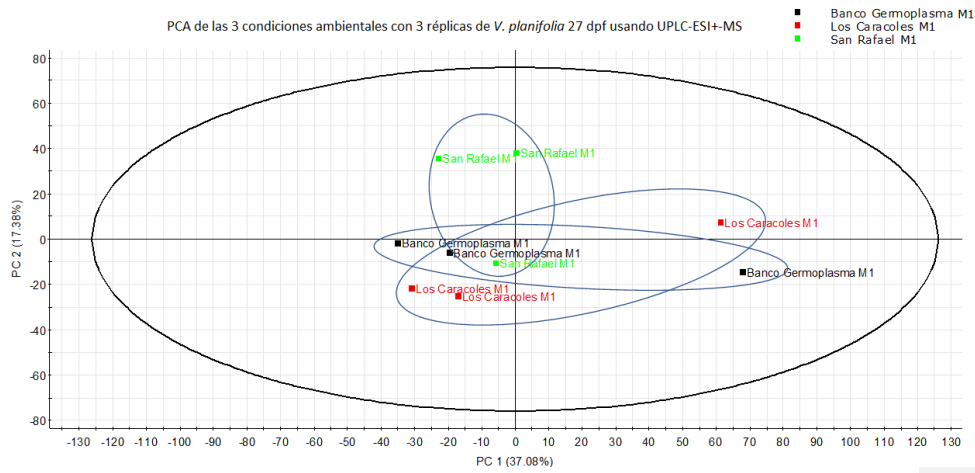


Imagen 48.- PCA de vainas verdes durante el 27 dpp usando UPLC-ESI+MS

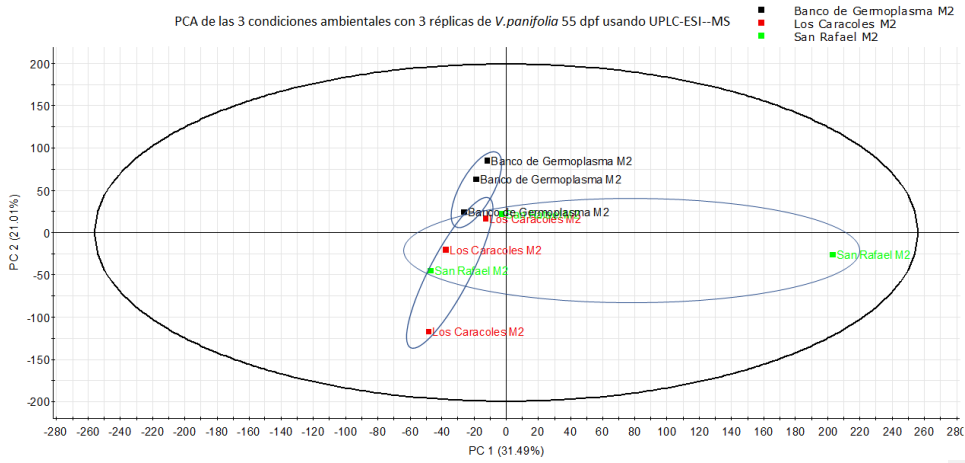


Imagen 49.- PCA de vainas verdes durante el 55 dpp usando UPLC-ESI-MS

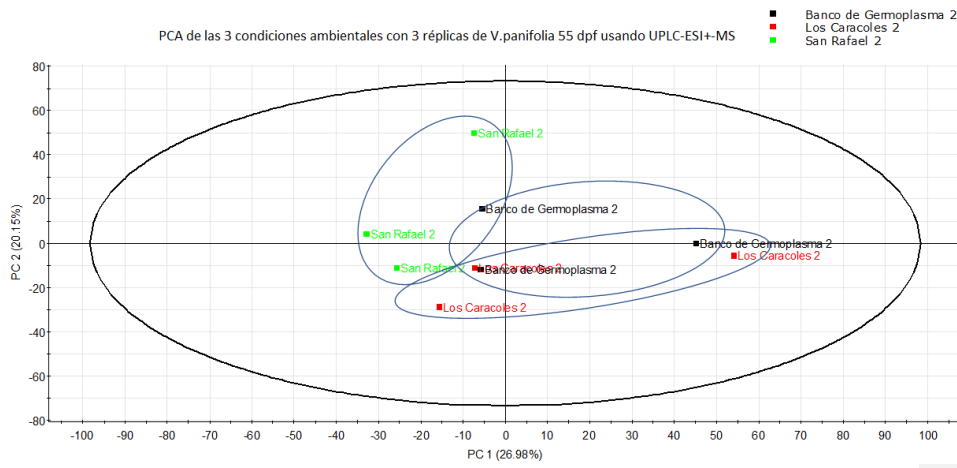


Imagen 50.- PCA de vainas verdes durante el 55 dpp usando UPLC-ESI+MS

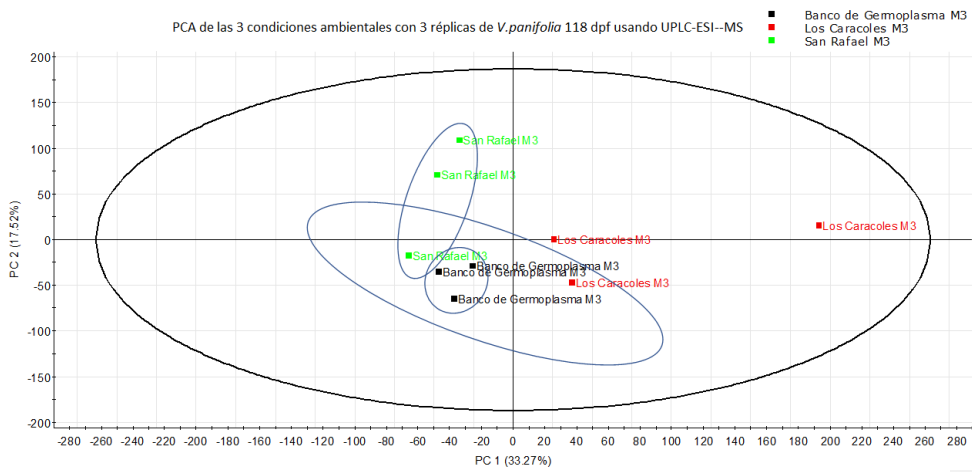


Imagen 51.- PCA de vainas verdes durante el 118 dpp usando UPLC-ESI+MS

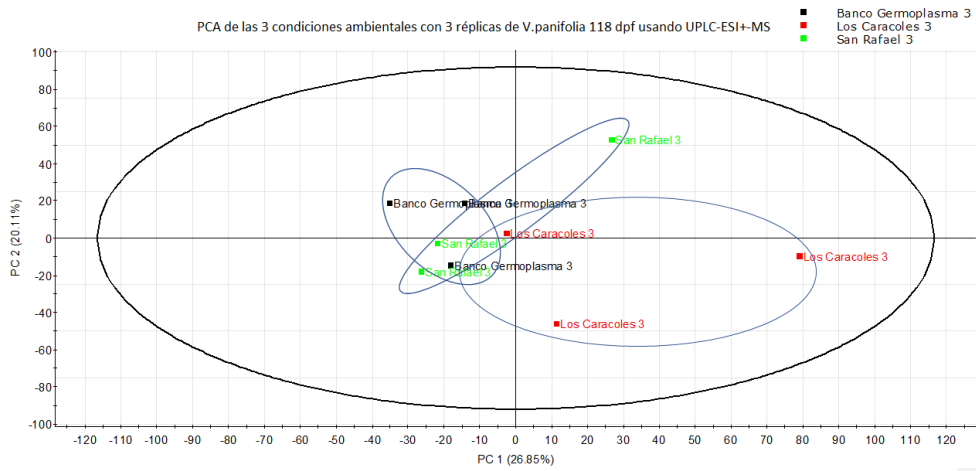


Imagen 52.- PCA de vainas verdes durante el 118 dpp usando UPLC-ESI+MS

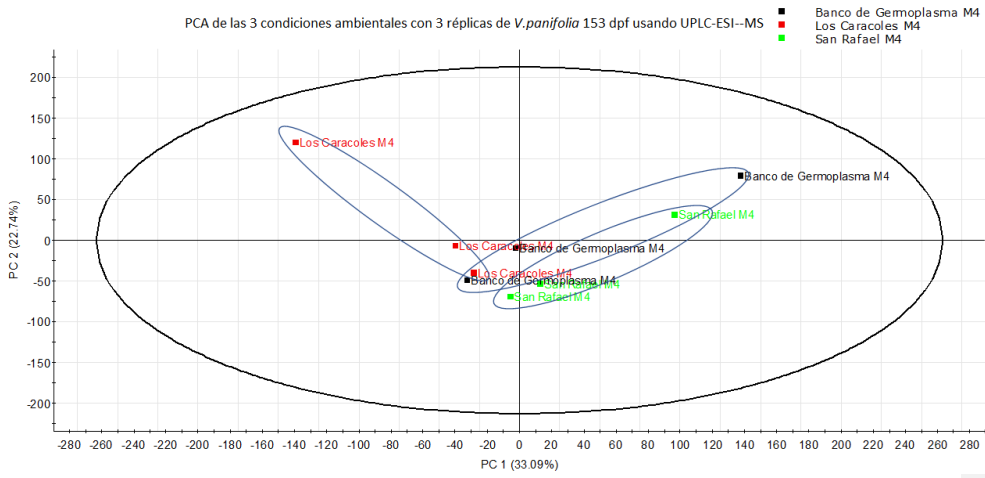


Imagen 53.- PCA de vainas verdes durante el 153 dpp usando UPLC-ESI-MS

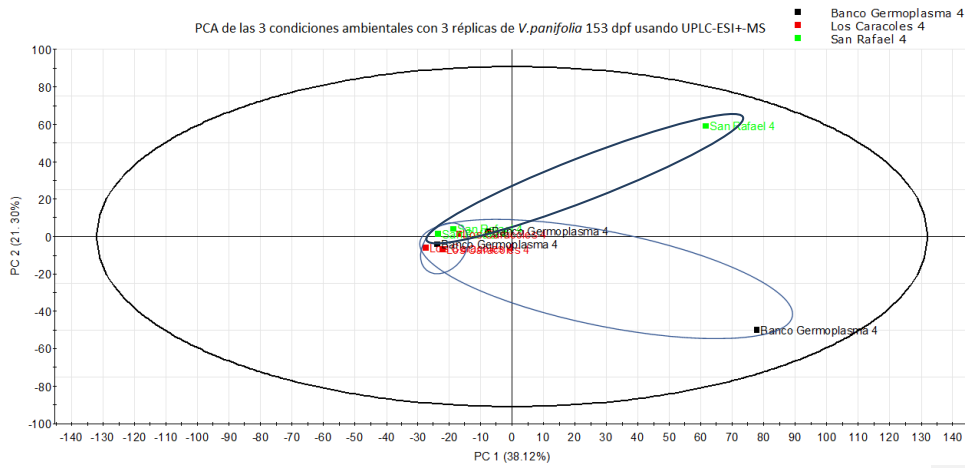


Imagen 54.- PCA de vainas verdes durante el 153 dpp usando UPLC-ESI+MS

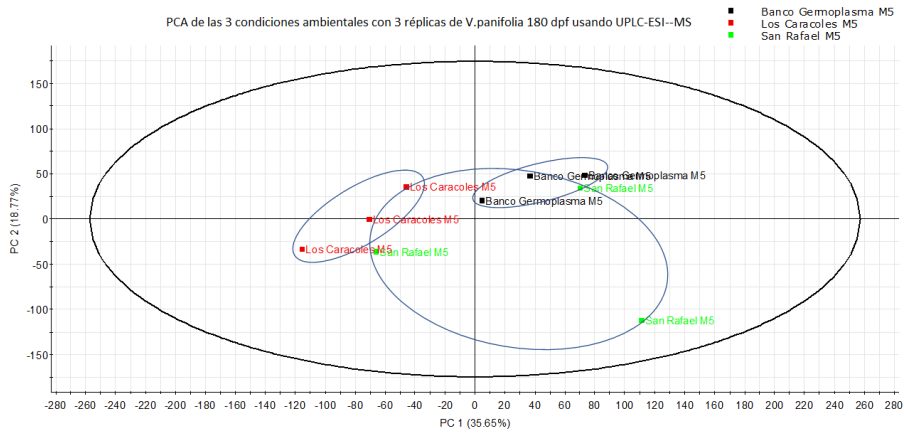


Imagen 55.- PCA de vainas verdes durante el 180 dpf usando UPLC-ESI--MS

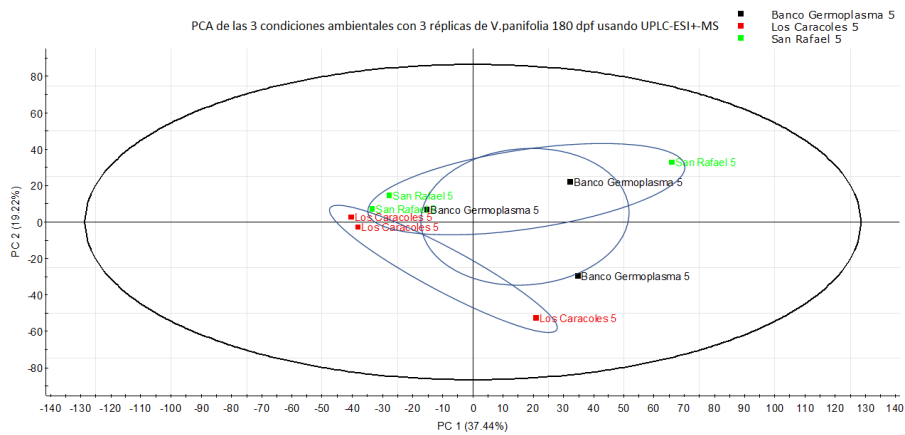


Imagen 56.- PCA de vainas verdes durante el 180 dpf usando UPLC-ESI+MS

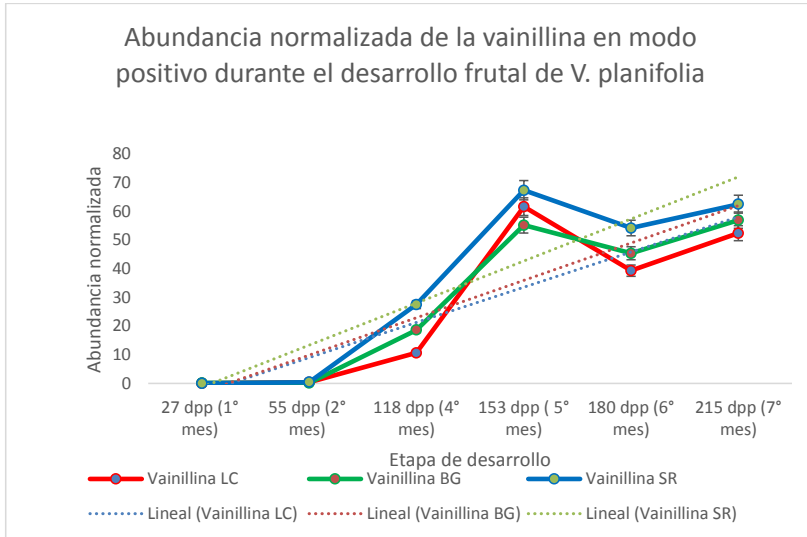


Imagen 57.- Abundancia normalizada de la vainillina en modo positivo para las 3 condiciones ambientales

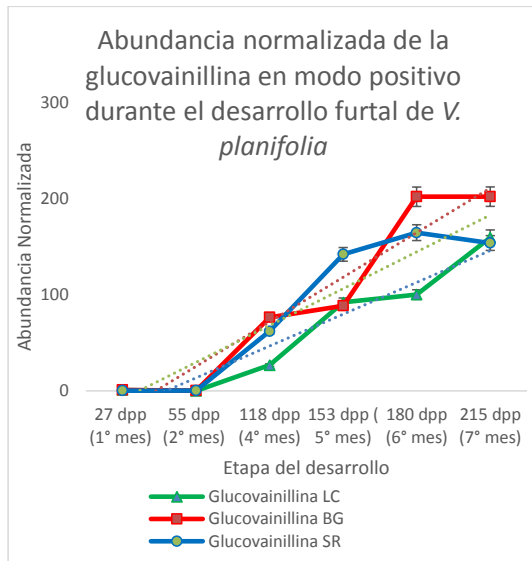


Imagen 58.- Abundancia normalizada de glucovainillina en modo de ionización positiva durante el desarrollo frutal de *V. planifolia*.

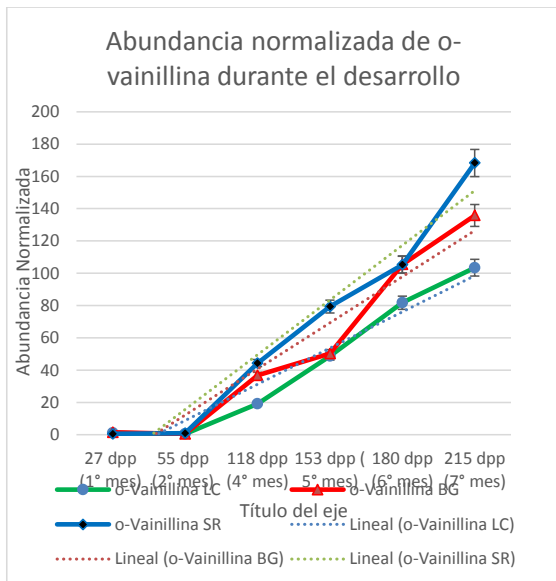


Imagen 59.- Abundancia normalizada de o-vainillina en modo de ionización positiva durante el desarrollo frutal de *V. planifolia*.

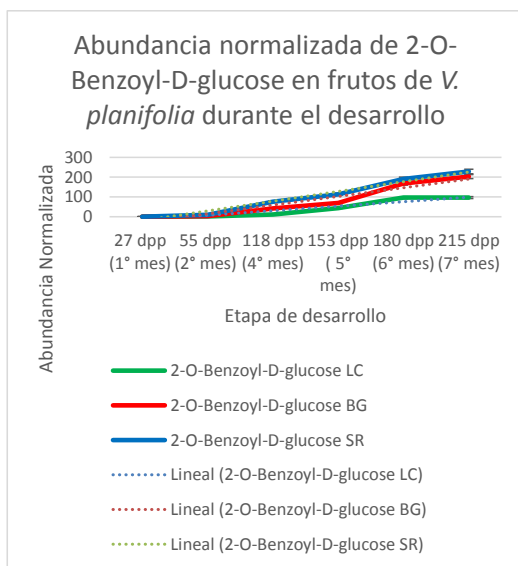


Imagen 60.- Abundancia normalizada de 2-O-Benzoyl-D-glucose en modo de ionización negativa durante el desarrollo de *V. planifolia*

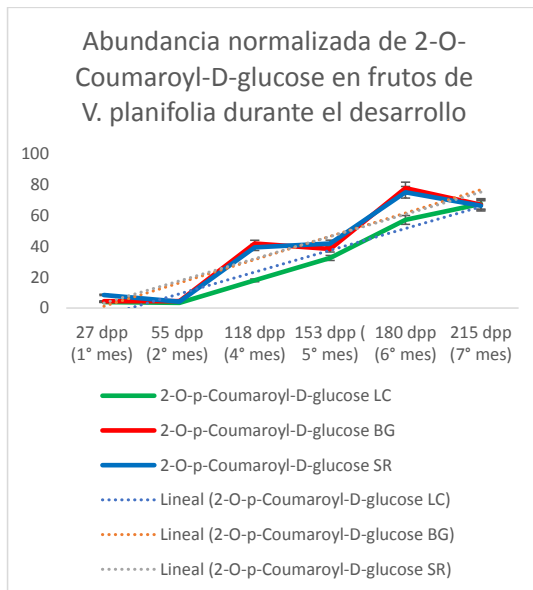


Imagen 61.- Abundancia normalizada de 2-O-p-Coumaroyl-D-glucose en modo de ionización negativa durante el desarrollo de *V. planifolia*

9.1.2 Anexo B

Tabla 8.- Compuestos pre-identificados mediante ionización negativa (145 compuestos)

Nombre común o IUPAC en inglés	m/z	Identificador aceptado	Tiempo de retención	Formula general	Score	Aductos
3-hydroxyphloretin 2'-O-xylosylglucoside	629.1721	CHEBI:88354	6.8015	C26H32O15	53	M-H2O-H, M+FA-H
4-hydroxymethyl-2-methoxyphenyl-1-O-beta-D-apiofuranosyl-(1->6)-O-beta-D-glucopyranoside	469.130252	CHEBI:68964	7.26993333	C19H28O12	46.2	2M-H
6-O-(trans-4-coumaroyl)-beta-D-glucopyranose	697.209804	CHEBI:76092	7.30408333	C15H18O8	50.8	M-H2O-H, M-H
(-)-pinellic acid	329.237455	CSID8034429	13.3595833	C18H34O5	56.1	M-H2O-H
(+)-7-epi-Syringaresinol 4'-glucoside	579.213434	HMDB38261	9.21181667	C28H36O13	57.2	M-H2O-H
(S)-Isowillardiine	443.114526	HMDB30376	8.20678333	C7H9N3O4	55.2	M-H2O-H, M-H
(S)-Mandelic acid O-beta-D-Glucopyranoside	359.098667	HMDB38335	6.14275	C14H18O8	46.2	2M+FA-H
1,1'-[1,13-Tridecanediylbis(oxy)]bisbenzene	367.267877	HMDB39761	26.0416833	C25H36O2	56.6	M+Cl
1,5-Octadien-3-one	293.179938	HMDB32447	16.1361167	C8H12O	48.7	M-H
1,6-dihydroxy-2-methylcyclohexa-2,4-dienecarboxylic acid	151.041395	CSID389947	8.3629	C8H10O4	51.2	M-H
1,6-dihydroxycyclohexa-2,4-dienecarboxylate	136.017506	CHEBI:17708	8.3629	C7H7O4-	49.4	M+FA-H
11'-Carboxy-gamma-chromanol	853.588801	HMDB12517	9.64611667	C25H40O4	53.7	M-H2O-H
13-Hydroxy-9-methoxy-10-oxo-11-octadecenoic acid	363.220532	HMDB40901	19.9860167	C19H34O5	53.2	M-H
1-Acetyl-3,27-dihydroxywitha-5,24-dienolide 3-glucoside	697.336936	HMDB33729	10.9832	C36H54O11	53.8	M+Cl, M+K-2H
1-O-E-Cinnamoyl-(6-arabinosylglucose)	477.110072	HMDB30294	10.2365833	C20H26O11	54.8	M-H2O-H, M-H
2,3-Dimethyl-3-hydroxyglutaric acid	175.062772	HMDB02025	11.24175	C7H12O5	53.3	M-H2O-H

2,4-didehydro-3-deoxy-L-rhamnonic acid	141.021293	CHEBI:132125	4.8936	C6H8O5	53.8	M+K-2H
2,6-dihydroxy-5-hydroxymethylcyclohex-2-en-1-one	139.041689	CHEBI:16694	4.80571667	C7H10O4	56.3	2M+FA-H
2-[4-(3-Hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol 1-xyloside	387.161099	HMDB41552	10.4268667	C18H28O9	51.5	M+K-2H
2-Hydroxy-3-(5-hydroxy-3,6,7-trimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-6-methoxyphenyl beta-D-glucopyranoside	533.135487	CSID58829950	7.89451667	C25H28O14	54.8	M-H
2-Hydroxy-3-methyl-4H-pyran-4-one O-(6E-cinnamoyl-b-D-glucoside)	881.251165	HMDB41098	9.99256667	C21H22O9	47.5	M+Cl
2-Methyl-1,4-benzoquinone	121.030798	CSID10651	4.83985	C7H6O2	55	M-H
2-O-Benzoyl-D-glucose	329.089605	HMDB34618	4.77158333	C13H16O7	54.6	M-H2O-H
2-O-p-Coumaroyl-D-glucose	697.227646	HMDB39167	6.86976667	C15H18O8	50.2	M-H
2-oxocyclohexanecarboxylic acid	123.046562	CHEBI:37375	8.55315	C7H10O3	54.9	M-H, M+Na-2H
2-oxopentanoic acid	115.040808	CHEBI:33033	5.93286667	C5H8O3	51.6	M+K-2H
3'-(3-methyl-2-butenyl)-4'-O-beta-D-glucopyranosyl-4,2'-dihydroxychalcone	485.183539	CHEBI:66712	6.95765	C26H30O9	56.8	M+FA-H
3',4',5'-Trimethoxytricetin 7-[rhamnosyl-(1->6)-glucoside]	697.207197	HMDB35439	10.8953167	C30H36O16	51.8	M+Cl
3,4-dimethoxy-N-[4-[oxo(1-piperidinyl)methyl]phenyl]benzamide	405.123417	CHEBI:114263	5.55233333	C21H24N2O4	58.6	M-H2O-H
3-acetylcoumarin	375.092393	CHEBI:137384	12.8569833	C11H8O3	52.4	M-H2O-H
3-dehydroquininate	188.030993	CHEBI:32364	8.98738333	C7H9O6-	54	M-H2O-H, M+K-2H
3-Hydroxybenzaldehyde	121.030008	CSID21105795	5.55233333	C7H6O2	57.4	M+FA-H, 2M+FA-H
3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycolaldehyde	163.042179	HMDB04061	8.89951667	C9H10O4	55.1	M-H2O-H
3-O-Caffeoyl-4-O-methylquinic acid	413.103651	HMDB39960	7.73836667	C17H20O9	46.3	2M+FA-H
3-O-Methylglycyrol	361.11207	HMDB33883	13.8280333	C22H20O6	51.8	M+FA-H

4-[(1E,4Z,6E)-3,5-Dihydroxy-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-1-yl]-2-methoxyphenyl 6-O-hexopyranosylhexopyranoside	715.218544	CSID24785043	8.67516667	C33H42O16	53.7	M-H2O-H
4'-Cinnamoylmussatioside	753.271467	CSID10128242	10.2707167	C34H44O16	51.3	M+K-2H
4-Coumaroyl-2-hydroxyputrescine	285.101539	HMDB33462	7.54808333	C13H18N2O3	49.7	M+Na-2H, M+Cl
4-Coumaroyl-2-hydroxyputrescine	285.101543	HMDB33462	8.17263333	C13H18N2O3	48.9	M-H2O-H
4-hydroxy-2-methoxyphenyl 1-O- β -D-glucoopyranoside	301.096743	CHEBI:68337	4.80571667	C13H18O8	54.6	M+Na-2H
4-hydroxy-3-oxocyclohexane-1-carboxylic acid	139.041928	CHEBI:15567	8.58728333	C7H10O4	53.2	M-H, M+Na-2H
4-Hydroxy-5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-valeric acid-O-glucuronide	401.11185	HMDB59971	5.77671667	C17H22O11	53.3	M+FA-H
4-Hydroxybenzaldehyde	121.029674	CSID123	7.77251667	C7H6O2	43.4	2M-H
4-Hydroxycyclohexylcarboxylic acid	143.072417	HMDB01988	7.42608333	C7H12O3	54.4	M-H
4-Hydroxymethylcatechol	121.030656	CSID91016	7.30408333	C7H8O3	56.9	M-H
4-O-beta-D-glucosyl-trans-4-coumarate	695.183935	CHEBI:79066	8.17263333	C15H17O8-	50.5	M-H2O-H
4'-O-beta-glucosyl-7-O-(6-O-sinapoylglucosyl)tricin	841.228091	CHEBI:75461	7.92866667	C40H44O21	49.3	M-H2O-H
4'-O-Methyldephinidin 3-O-rutinoside	670.171357	HMDB41677	9.57785	C28H33O16+	51	M-H, M+FA-H
4-oxocyclohexanecarboxylic acid	123.046704	CHEBI:1921	6.2989	C7H10O3	50.7	M+K-2H
5-Hydroxy-2-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-3-methylphenyl D-glucoopyranoside	455.12438	CSID24534055	8.95325	C19H22O10	52.4	M-H2O-H, M-H
5-hydroxyhexanoate	152.045717	CHEBI:132985	6.14275	C6H11O3-	53.9	M+Na-2H
6''-Malonylchrysanthemin	572.055031	CSID391980	5.08388333	C24H23O14+	56.7	M-H2O-H, M+Cl
6-Caffeoylsucrose	539.109581	HMDB35486	5.7426	C21H28O14	40.5	M+K-2H
6-Hydroxyflavone	275.011932	CSID65233	6.24516667	C15H10O3	46.6	M-H
6-O-beta-D-galactofuranosyl-alpha-D-mannopyranose	377.089325	CHEBI:61743	1.64863333	C12H22O11	55.1	M-H2O-H
6-tuliposide A	299.078791	CSID19979617	5.62058333	C11H18O8	48.8	M-H2O-H
7-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-5-chromeniumolate	507.108782	CSID58830063	7.61636667	C15H10O4	50.4	M+K-2H

7-Hydroxy-3-methoxy-1-primeverosyloxyxanthone	573.119947	HMDB33770	7.42608333	C25H28O14	46.4	M-H
8-D-Olivosyl-landomycin	489.111225	CSID30791345	9.92428333	C25H24O9	54.8	2M-H
Arborinine	266.085592	HMDB30177	9.61198333	C16H15NO4	53.8	M-H
Asparaginyln-Leucine	282.081573	HMDB28735	6.40131667	C10H19N3O4	52.3	M+Cl
Asparenyol	605.21637	HMDB41304	8.64101667	C18H16O3	52.6	M+FA-H
Aspartame	275.10706	HMDB01894	10.7050333	C14H18N2O5	47.4	M+Na-2H, M+FA-H
Aurin	335.096881	CHEBI:34544	13.7060167	C19H14O3	54	M-H
Averantin	353.101265	CHEBI:64522	11.24175	C20H20O7	52.9	M+FA-H
Axillarin	383.012905	CSID4444922	5.55233333	C17H14O8	53.1	M+Na-2H
Benzoyl-CoA	852.117187	HMDB02252	7.86038333	C28H40N7O17P3S	33.1	M-H2O-H
beta-Hydroxyacteoside	675.164198	CSID8184897	9.57785	C29H36O16	49.9	M+Na-2H
Calabaxanthone	373.145674	HMDB30655	9.14353333	C24H24O5	55.4	M-H2O-H
CHEBI:136858	691.181969	CHEBI:136858	5.15215	C24H38O20	49.8	2M-H
CHEBI:66883	653.212211	CHEBI:66883	9.33381667	C24H42O18	49.5	M-H
Chrysaloin	423.113655	HMDB39379	11.76395	C21H22O8	53.6	2M+FA-H
cis-4-coumaric acid	163.041849	CSID1266072	12.17865	C9H8O3	56.3	M+FA-H
Coniferyl ferulate	711.241882	CSID4946034	7.61636667	C20H20O6	39.3	M-H2O-H, M+Cl
Corchorifatty acid F	327.22139	HMDB35919	14.7649167	C18H32O5	56.3	M-H
Correolide	769.308472	CSID30791068	13.0814167	C40H52O16	52.1	M-H2O-H, M-H
Cyanidin 3-rutinoside	616.132103	HMDB31458	11.2076167	C27H31O15+	51.6	M-H2O-H, M-H
Cyclocommunin	441.139343	HMDB40480	14.8869333	C25H24O6	50.1	M-H2O-H
Delphinidin 3-(6''-malonylglucoside) 5-glucoside	750.103838	HMDB39938	4.83985	C30H33O20+	47.9	M-H2O-H
D-hexopyranose 6-phosphate	259.025133	CHEBI:61667	2.8637	C6H13O9P	56.3	M-H2O-H, M-H

Digallic acid	357.002941	CHEBI:30814	2.80996667	C14H10O9	47.5	M+Cl
Dimoracin	637.185137	HMDB30068	9.52411667	C38H32O8	48.2	M-H
Etaqualone	285.10234	CHEBI:135090	6.2989	C17H16N2O	51.7	2M+FA-H
Ethyl vanillin	165.05763	HMDB29665	9.83641667	C9H10O3	45.1	M-H, M+K-2H
Fucose	145.05175	CSID2299091	9.68026667	C6H12O5	56.2	M-H
Fusidic Acid	561.333276	HMDB15570	20.0739	C31H48O6	52.8	2M+FA-H
Gamma-Glutamyltyrosine	665.236517	HMDB11741	8.24091667	C14H18N2O6	49.6	M-H, M+Cl, M+FA-H
Genipin 1-gentiobioside	531.17756	CSID2339749	8.86538333	C23H34O15	53	M+K-2H
Glabrone	335.09466	HMDB29533	15.9262333	C20H16O5	53.9	M-H2O-H
Glicophenone	357.138715	HMDB35467	9.17766667	C20H22O6	56.1	M+Cl
Glutamylphenylalanine	633.252823	HMDB00594	12.1445167	C14H18N2O5	50.9	M-H
Glutaraldehyde	99.0454441	CHEBI:64276	4.61543333	C5H8O2	58.4	M-H
Heteroflavanone A	341.109517	HMDB40910	9.14353333	C19H20O7	52.6	M+Na-2H
Homofureanol	123.046468	HMDB33736	4.77158333	C7H10O3	55.5	M-H2O-H
Homovanillin	165.056543	HMDB05175	5.77671667	C9H10O3	54	M+Cl
Isoferulic acid	239.059307	HMDB00955	5.62058333	C10H10O4	53.8	2M+FA-H
Isorhamnetin 3-beta-lamaribioside	677.11061	HMDB41383	8.64101667	C28H32O17	51.6	M-H2O-H
Isosyringinoside	515.167143	HMDB40814	5.04975	C23H34O14	52.4	M-H2O- H, M+K- 2H
Isovanillic acid	167.03719	HMDB60003	9.80226667	C8H8O4	40.5	M-H, M+FA-H
Leachianone A	475.150288	CHEBI:66559	6.2989	C26H30O6	55.6	M+Na-2H
Licorice glycoside D1	677.200761	HMDB31994	10.51475	C35H36O15	52.7	M-H2O-H
L-Menthyl acetoacetate	221.157863	HMDB32369	16.1361167	C14H24O3	54	M-H2O-H
Loniphenyruviridoside C	557.106881	CHEBI:69640	9.83641667	C25H28O12	48.5	M-H2O-H

LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	476.284132	HMDB11507	18.5124333	C23H44NO7P	54.9	2M+FA-H
Maltopentaose	827.27213	HMDB12254	10.3048667	C30H52O26	49	M+Cl
Methyl -2,8-dihydroxy-6-hydroxymethyl-9-oxo-1,2-dihydroxanthene-1-carboxylate	299.059585	CHEBI:68224	10.7733	C16H14O7	54.2	M+Cl
Methylstyrylpyron	533.145843	CHEBI:29629	7.14793333	C14H12O4	47.2	M+Cl
Mucisoflavone A	717.199262	CHEBI:69741	8.24091667	C40H32O10	48.3	M-H2O-H
Mucisoflavone B	707.157163	CHEBI:69742	8.27503333	C40H32O10	49	M-H
Mucisoflavone C	655.197194	CHEBI:69743	9.17766667	C40H34O10	49.8	M+Na-2H, M+Cl
N-(2-furanylmethylideneamino)-2-[(1-oxo-2-phenoxyethyl)amino]acetamide	282.087866	CHEBI:107112	4.52755	C15H15N3O4	56.6	M-H2O-H
Naphthalene-1,2,3,4-tetrone	168.992848	CHEBI:78854	2.8978	C10H4O4	55.8	M+FA-H
Nb-p-Coumaroyltryptamine	327.112339	HMDB41518	9.1094	C19H18N2O2	49.2	M+FA-H
Oxopurine	460.17402	CHEBI:116413	1.37066667	C20H23N7O4	48.3	M-H, M+FA-H
Paeonolide	919.32083	CHEBI:7891	9.36796667	C20H28O12	49.7	M-H
Parabenzlactone	351.091773	CHEBI:70489	14.05245	C20H18O7	56.3	M+Cl
PE(18:0/15:0)	740.502504	HMDB08988	9.29968333	C38H76NO8P	53.7	M-H2O-H, M-H
Peduncululoside F	639.165575	CHEBI:67878	7.89451667	C28H32O17	50.5	M+K-2H
Phenytoin methylcatechol	277.060401	HMDB60867	6.08901667	C16H12N2O4	45.8	M-H
Pimelic acid	159.067878	CSID376	7.39195	C7H12O4	55.4	M-H
Pimelic acid	159.068002	CSID376	8.17263333	C7H12O4	54	M-H, M+Cl, M+FA-H, 2M-H
Pyranojacareubin	829.252078	CHEBI:66302	7.6505	C23H20O6	54.1	M-H
Quercetin 3-(glucosyl-(1->4)-rhamnoside) 7-rutinoside	899.261521	HMDB32009	8.89951667	C39H50O25	51.1	M-H, 2M-H, 2M+FA-H

Quercetin 3-O-(6''-acetyl-glucoside)	541.083215	HMDB29271	7.92866667	C23H22O13	54.2	M-H2O-H
Quercetin 7-glucuronoside 3-sophoroside	801.172137	HMDB39335	1.71691667	C33H38O23	54.5	M-H
Quercetin 7-rutinoside	609.1545	HMDB37934	7.42608333	C27H30O16	49.5	M+Na-2H
Quercitrin	447.101961	HMDB33751	9.734	C21H20O11	53.9	M-H
Rhamnazin 3-rutinoside	675.13251	HMDB37467	9.4217	C29H34O16	50.3	M+K-2H
Rubrofusarin 6-[glucosyl-(1->3)-glucosyl-(1->6)-glucoside]	803.235982	HMDB34569	6.55746667	C33H42O20	52.2	M+FA-H, 2M+FA-H
Rutarin	461.115177	HMDB30884	9.76813333	C20H24O10	49.9	M+Na-2H
Scoparin 2''-glucoside	623.17159	HMDB38813	9.4217	C28H32O16	55.1	M-H2O- H, M-H
Sesaminol 2-O-triglucoside	867.19238	HMDB41775	7.73836667	C36H46O22	45.3	M+Na-2H
Sweroside	379.098361	CSID141471	6.40131667	C16H22O9	53.2	M-H2O-H
Ternstroside E	487.098801	CHEBI:66207	9.92428333	C22H26O10	56	2M+FA-H
Tetrahydro-2-furanmethanol	101.059903	HMDB31175	5.93286667	C5H10O2	54.1	2M+FA-H
Theobromine	161.047631	CSID5236	9.21181667	C7H8N4O2	54.5	M+K-2H
Theobromine	161.047392	CSID5236	4.77158333	C7H8N4O2	49.8	M+Na-2H
trans-2-oxohex-4-enoate	108.022705	CHEBI:19751	8.3629	C6H7O3-	54.7	M-H
Tyrosyl-Phenylalanine	309.12872	HMDB29112	8.01653333	C18H20N2O4	49	M+FA-H
Vanillic acid	167.035648	HMDB00484	5.70846667	C8H8O4	52.8	M+K-2H, M+FA-H
Vanillin	151.041641	HMDB12308	7.86038333	C8H8O3	54.6	M-H
Verbaside	443.159341	HMDB39233	9.52411667	C20H30O12	50.3	M-H
Vitexin 2''-O-rhamnoside	577.16243	CSID4445348	9.4217	C27H30O14	54.9	M-H2O-H

Tabla 9.- Iones pre-identificados mediante ionización en modo positivo (133 compuestos)

Nombre común o IUPAC en inglés	m/z	ID del compuesto	Tiempo de retención y masa	Fórmula general	Score	Aductos
--------------------------------	-----	------------------	----------------------------	-----------------	-------	---------

		aceptado	exacta			
Paeonolide	483.149501	CHEBI:7891	7.34_460.1603n	C20H28O12	50.2	M+NH4, M+Na, M+K, 2M+K
Swertiamarin	771.242313	CHEBI:9370	8.24_771.2423m/z	C16H22O10	52.4	2M+Na
Isovainillin	153.054864	CSID11629	7.65_153.0549m/z	C8H10O4	58.3	M+H-H2O
Tyrosinyl	221.04469	CHEBI:32787	7.93_221.0447m/z	C9H12NO3+	49.6	M+K
4-(3,5-Diphenylcyclohexyl)phenol	367.1475	CHEBI:34379	8.79_367.1475m/z	C24H24O	58	M+K
Phenyl [1-(N-succinylamino)pentyl]phosphonate	376.152802	CHEBI:43012	8.52_376.1528m/z	C15H22NO6P	51.8	M+CH3OH+H
Desferrioxamine G	682.385837	CHEBI:50439	5.24_682.3858m/z	C27H50N6O10	53.8	M+ACN+Na
Dopaminium	347.134278	CHEBI:59905	6.33_347.1343m/z	C8H12NO2+	36.9	2M+K
Gorlic acid	279.233071	CHEBI:61676	23.78_278.2262n	C18H30O2	57.9	M+H-2H2O, M+H-H2O, M+H
6-O-(trans-feruloyl)-beta-D-galactopyranosyl-(1-4)-D-galactopyranose	536.20353	CHEBI:62050	5.90_536.2035m/z	C22H30O14	51.7	M+NH4
3,4-dihydro-4-hydroxyphenylpyruvic acid	365.122229	CHEBI:64939	5.98_365.1222m/z	C9H10O4	57.5	2M+H
Celebixanthone	325.108566	CHEBI:65606	9.68_325.1086m/z	C19H18O6	57.1	M+H-H2O
Ternstroside C	449.141769	CHEBI:66205	6.61_449.1418m/z	C22H26O11	56.1	M+H-H2O
12-demethylmultiorthoquinone	295.131734	CHEBI:66410	4.02_295.1317m/z	C19H18O3	45.4	M+H
CHEBI:68343	611.201656	CHEBI:68343	5.83_611.2017m/z	C28H34O15	46.7	M+H
Globosuxanthone B	301.07255	CHEBI:68713	9.36_301.0725m/z	C16H16O8	55.5	M+H-2H2O
Isochamanetin	287.092412	CHEBI:69476	5.83_287.0924m/z	C15H10O4	54.4	M+CH3OH+H
4,7-dioxooctanoic acid	363.124437	CHEBI:69679	13.63_363.1244m/z	C22H18O5	58.2	M+H
L-m-tyrosine zwitterion	385.106931	CHEBI:69679	13.63_385.1069m/z	C22H18O5	57.4	M+Na
3-[6-(Carboxymethylene)cyclohexa-2,4-dien-1-ylidene]-2-oxopropanate	137.060236	CHEBI:73742	7.49_137.0602m/z	C8H12O4	55	M+H-2H2O
Icariside II	146.060724	CHEBI:78290	7.80_146.0607m/z	C9H11NO3	56.4	M+H-2H2O
Veratryl glycerol	203.034175	CHEBI:80384	7.93_203.0342m/z	C11H8O5	55.8	M+H-H2O

2-heptanol	532.221777	CHEBI:82619	5.74_532.2218m/z	C27H30O10	53	M+NH4
3-[(1-methyl-3-indolyl) methylidene]-1H-pyrrolo[3,2-b] 113yridine-2-one	229.104124	CHEBI:86962	5.62_229.1041m/z	C11H16O5	52.1	M+H
LSM-4216	274.272127	CHEBI:88815	12.33_274.2721m/z	C7H16O	51.6	2M+ACN+H
2-[(2-acetyloxyphenyl)-oxomethoxy]benzoic acid	298.098967	CHEBI:92072	4.99_298.0990m/z	C17H13N3O	52.5	M+Na
Hydroxycoumarin	382.037601	CHEBI:93723	5.55_382.0376m/z	C20H16FNO4S2	54.2	M+H-2H2O
Salicylamide	301.072799	CHEBI:94629	13.11_301.0728m/z	C16H12O6	57.3	M+H
3-methyl-6-prop-2-enoxy-[1,2,4] triazolo[4,3-b]pyridazine	243.067405	CHEBI:107616	7.61_243.0674m/z	C14H14O6	54.4	M+H-2H2O
Validone	283.1077	CHEBI:108162	8.95_260.1171n	C14H16N2O3	56.3	M+H, M+Na
3-hydroxy-2-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2-dihydroquinazolin-4-one	232.119455	CHEBI:109835	1.40_232.1195m/z	C9H10N4O	52.5	M+ACN+H
Decavanadate	141.055321	CHEBI:111542	6.21_141.0553m/z	C7H12O5	56.6	M+H-2H2O
CHEBI:131769	269.093568	CHEBI:113023	7.96_269.0936m/z	C15H14N2O4	54.6	M+H-H2O
Tidiacic	374.148907	CHEBI:113195	3.75_374.1489m/z	C22H16N2O3	57.7	M+NH4
Styramate	711.184392	CHEBI:131769	8.52_711.1844m/z	C33H36O16	48	M+Na
Ftivazide	174.055509	CHEBI:133222	6.92_191.0588n	C10H9NO3	55.2	M+H-H2O, M+H
Pipotiazine palmitate	215.973031	CHEBI:134811	1.80_215.9730m/z	C5H7NO4S	52.7	M+K
Protocatechuic acid	146.060547	CHEBI:134820	6.92_146.0605m/z	C9H11NO3	54.6	M+H-2H2O
Phenylpyruvic acid	581.156169	CHEBI:135117	8.43_581.1562m/z	C14H13N3O3	55.4	2M+K
4-Nonylphenol	347.134221	CHEBI:135382	6.77_347.1342m/z	C19H20N2O3	53.2	M+Na
protocatechuic acid	187.060436	CSID71	8.17_187.0604m/z	C7H6O4	56.9	M+CH3OH+H
Phenylpyruvic acid	147.044549	CSID972	7.23_147.0445m/z	C9H8O3	57.2	M+H-H2O
4-Nonylphenol	185.165796	CSID1688	4.37_185.1658m/z	C15H24O	40	M+H-2H2O
16-hydroxypalmitic acid	290.270104	CSID10034	12.64_290.2701m/z	C16H32O3	56.5	M+NH4
erythro-phenylserine	146.060755	CSID66244	4.99_146.0608m/z	C9H11NO3	49.4	M+H-2H2O
3-Methoxybenzyl alcohol	103.054481	CSID73481	5.55_103.0545m/z	C8H10O2	39	M+H-2H2O

2-Hydroxycinchoninic acid	190.051	CSID76740	8.36_190.0510m/z	C10H7NO3	55.1	M+H
5-Hydroxyindolepyruvate	261.087959	CSID389613	6.92_261.0880m/z	C11H9NO4	49.2	M+ACN+H
1,6-dihydroxy-2-methylcyclohexa-2,4-dienecarboxylic acid	153.054271	CSID389947	5.86_153.0543m/z	C8H10O4	47.1	M+H-H2O
1,6-dihydroxy-2-methylcyclohexa-2,4-dienecarboxylic acid	153.054409	CSID389947	8.12_153.0544m/z	C8H10O4	51.7	M+H-H2O
(+)-taxifolin 3-O-acetate	379.102468	CSID390962	8.52_379.1025m/z	C17H14O8	57.9	M+CH3OH+H
Pseudoecgonine	393.202446	CSID391940	25.18_393.2024m/z	C9H15NO3	56	2M+Na
4-Hydroxybutanoate	229.069289	CSID2300886	10.61_229.0693m/z	C4H7O3-	57.4	2M+Na
2-succinyl-6-hydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylic acid	273.093565	CSID3826452	5.62_273.0936m/z	C11H12O6	52.6	M+CH3OH+H
Hellicoside	689.232633	CSID4445091	7.42_689.2326m/z	C29H36O17	54.3	M+CH3OH+H
Coumarin	188.070575	CSID13848793	5.43_188.0706m/z	C9H6O2	57	M+ACN+H
6,7,4'-trihydroxyflavanone	290.104443	CSID24784895	8.27_290.1044m/z	C15H12O5	53.7	M+NH4
5-[(1-Carboxylatovinyl)oxy]-6-hydroxy-1,3-cyclohexadiene-1-carboxylate	189.018246	CSID24785389	7.93_189.0182m/z	C10H8O6-2	53.3	M+H-2H2O
2',4,4',6'-tetrahydroxychalcone 4'-O-beta-D-glucoside	467.155658	CSID28533056	8.39_467.1557m/z	C21H22O10	50.7	M+CH3OH+H
4-coumaroyltriacetic acid lactone	290.10415	CSID30791104	8.74_290.1042m/z	C15H12O5	56.4	M+NH4
Landomycin E	735.253692	CSID30791349	9.33_712.2645n	C37H44O14	50.1	M+NH4, M+Na, M+K
Adenosine	268.104574	HMDB00050	3.71_268.1046m/z	C10H13N5O4	56.7	M+H
Homogentisic acid	169.050238	HMDB00130	6.21_168.0430n	C8H8O4	46	M+H, M+Na
L-Phenylalanine	166.085372	HMDB00159	4.18_166.0854m/z	C9H11NO2	57.1	M+H
trans-Cinnamic acid	149.060261	HMDB00930	5.55_148.0530n	C9H8O2	58.2	M+H-H2O, M+H
Ethenodeoxyadenosine	258.100147	HMDB01786	4.15_258.1001m/z	C12H13N5O3	50.9	M+H-H2O
1,7-Dimethylguanosine	344.151806	HMDB01961	6.52_311.1179n	C12H17N5O5	52.4	M+H, M+CH3OH+H
Benzaldehyde	107.049512	HMDB06115	4.30_106.0422n	C7H6O	37.6	M+H, 2M+H

S-4'-Hydroxywarfarin	325.109153	HMDB13881	9.96_325.1092m/z	C19H16O5	54.3	M+H
Histidinyl-Tyrosine	283.119163	HMDB28897	8.39_283.1192m/z	C15H18N4O4	56.8	M+H-2H2O
Tyrosyl-Cysteine	285.092255	HMDB29102	6.09_285.0923m/z	C12H16N2O4S	54.3	M+H
3-Hydroxy-2-methylglutarate	199.058377	HMDB29169	6.64_199.0584m/z	C7H12O5	53.6	M+Na
Vanilloside	337.08943	HMDB29664	5.86_314.1002n	C14H18O8	40.2	M+Na, M+K
Quercetin 8-C-(2''-rhamnosylglucoside)	611.167218	HMDB29812	7.77_611.1672m/z	C27H30O16	48.8	M+H
Camellianin A	653.214959	HMDB29908	10.74_653.2150m/z	C29H32O15	54.6	M+CH3OH+H
Alginic acid	208.012999	HMDB29940	4.93_208.0130m/z	C12H16O12P2	51.9	M+2H
Citrusinine II	252.067307	HMDB30373	6.17_252.0673m/z	C15H13NO5	49.8	M+H-2H2O
Atalantoflavone	337.108603	HMDB30450	14.73_337.1086m/z	C20H16O5	51.2	M+H
Atalantoflavone	337.106981	HMDB30450	15.82_337.1070m/z	C20H16O5	58.7	M+H
1,4-Ipomeadiol	135.081107	HMDB30471	16.82_135.0811m/z	C9H14O3	55.4	M+H-2H2O
(Z)-6-Nonenal	123.11743	HMDB30958	23.78_123.1174m/z	C9H16O	56	M+H-H2O
Licorice glycoside D1	719.185126	HMDB31994	7.70_719.1851m/z	C35H36O15	54.2	M+Na
Nona-2,4,6-trienal	119.085984	HMDB32441	16.82_119.0860m/z	C9H12O	56.9	M+H-H2O
2-Hydroxy-4-methylbenzaldehyde	119.049916	HMDB32603	7.86_119.0499m/z	C8H8O2	56.1	M+H-H2O
(-)-Matairesinol 4'-[apiosyl-(1->2)-glucoside]	675.217466	HMDB32830	6.68_652.2287n	C31H40O15	55.7	M+NH4, M+Na
22-Angeloylbarringtonenol C	595.388827	HMDB32835	21.47_572.4000n	C35H56O6	53.5	M+NH4, M+Na
2',4',5,7,8-Pentahydroxyisoflavone	335.076288	HMDB33264	8.17_335.0763m/z	C15H10O7	51.2	M+CH3OH+H
2-Methoxystyandrone	243.065534	HMDB33265	14.73_243.0655m/z	C14H12O5	56.2	M+H-H2O
Hydroxypropyl methyl cellulose	719.191991	HMDB33369	7.96_719.1920m/z	C25H44O21	39.3	M+K
Lycopersiconolide	380.282277	HMDB33677	11.01_380.2823m/z	C22H34O4	57.3	M+NH4
1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione	355.120327	HMDB33877	9.96_354.1126n	C20H18O6	56.3	M+H-H2O, M+H
Caryoptosidic acid	357.119221	HMDB34249	8.08_357.1192m/z	C16H24O11	50.3	M+H-2H2O
Rutaretin 9-rutinoside	535.185508	HMDB34611	7.86_535.1855m/z	C26H34O14	49.8	M+H-2H2O
Methyl 3,4,5-trimethoxycinnamate [arabinosyl-(1->3)-[glucosyl-(1->6)]-glucosyl] ester	659.222104	HMDB34756	8.27_659.2221m/z	C29H42O19	50.4	M+H-2H2O

4-Demethylsimmondsin 2'-(E)-ferulate	502.174533	HMDB34773	9.96_502.1745m/z	C25H31NO12	54.7	M+H-2H2O
Glucarubolone 15-O-beta-D-glucopyranoside	595.172742	HMDB35036	9.30_595.1727m/z	C26H36O13	49.5	M+K
Avocadyne	323.197758	HMDB35473	23.78_323.1978m/z	C17H32O3	57.8	M+K
6-Caffeoylsucrose	543.108285	HMDB35486	4.80_543.1083m/z	C21H28O14	46.9	M+K
(E)-2-Glucosyl-3,4',5-trihydroxystilbene	355.120142	HMDB36294	8.05_355.1201m/z	C20H22O8	53	M+H-2H2O
8-Hydroxyluteolin 4'-methyl ether 8-glucoside	479.121993	HMDB37332	8.67_479.1220m/z	C22H22O12	54.9	M+H
Chrysoeriol 7-O-(6''-malonyl-glucoside)	549.129882	HMDB37455	10.61_549.1299m/z	C25H24O14	51.5	M+H
Calendoflavoside	625.183051	HMDB37745	8.74_625.1831m/z	C28H32O16	54.6	M+H
3-Hydroxybenzyl alcohol glucoside	269.103376	HMDB38331	8.27_269.1034m/z	C13H18O7	54.5	M+H-H2O
Dihydromelilotoside	351.108243	HMDB38334	5.55_328.1190n	C15H20O8	51.9	M+Na, M+K
2-Hydroxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanamide	198.076893	HMDB38336	4.74_198.0769m/z	C9H11NO4	48.2	M+H
Sideritiflavone	393.117466	HMDB38356	9.52_393.1175m/z	C18H16O8	56.9	M+CH3OH+H
alpha-Ionol O-[arabinosyl-(1->6)-glucoside]	489.260837	HMDB38732	8.12_488.2536n	C24H40O10	50.5	M+H, M+Na
Avenic acid B	204.087588	HMDB38751	5.36_204.0876m/z	C8H15NO6	50	M+H-H2O
Rhamnetin 3-(4-rhamnosylrhamnoside)	609.186616	HMDB38810	9.36_609.1866m/z	C28H32O15	55.2	M+H
9-Hydroxy-4-methoxypsoralen 9-glucoside	395.097536	HMDB39047	6.02_395.0975m/z	C18H18O10	51.1	M+H
Citrusin F	559.139798	HMDB39235	5.58_559.1398m/z	C22H32O14	45.3	M+K
Olitorusin	922.398183	HMDB39542	5.36_922.3982m/z	C41H62O19	50.6	M+ACN+Na
Orientalone	243.064438	HMDB39616	15.82_243.0644m/z	C14H12O5	56.3	M+H-H2O
(3E,5Z)-3,5-Octadien-1-ol	109.101719	HMDB40149	23.78_109.1017m/z	C8H14O	56.5	M+H-H2O
2,5-Heptadien-1-ol	95.0859495	HMDB40339	23.78_95.0859m/z	C7H12O	56.7	M+H-H2O
Eugenol O-[3,4,5-Trihydroxybenzoyl-(->6)-b-D-glucopyranoside]	511.183456	HMDB40721	8.95_511.1835m/z	C23H26O11	55.7	M+CH3OH+H
Kaempferide 3-[rhamnopyranosyl-(1->6)-glucoside] 7-rhamnoside	719.213674	HMDB40804	8.27_719.2137m/z	C34H42O19	50.6	M+H-2H2O
Arjunolic acid 3-glucoside	683.442333	HMDB40941	21.35_683.4423m/z	C36H58O10	54.5	M+CH3OH+H
Hydroxytyrosol 1-O-glucoside	339.106014	HMDB41024	4.77_316.1168n	C14H20O8	57.6	M+Na, M+K

1-O-Sinapoylglucose	404.152699	HMDB41175	5.08_404.1527m/z	C17H22O10	57	M+NH4
Betavulgarin glucoside	507.154454	HMDB41215	11.14_507.1545m/z	C23H22O11	55.5	M+CH3OH+H
α -L-Fucopyranosyl-(1->2)- β -D-galactopyranosyl-(1->2)-D-xylose	497.131718	HMDB41222	6.40_497.1317m/z	C17H30O14	50.9	M+K
Marmesin rutinoside	593.157743	HMDB41413	12.07_593.1577m/z	C26H34O13	55.6	M+K
3-O-Methylrosmarinic acid	392.135995	HMDB41667	7.58_392.1360m/z	C19H18O8	56.5	M+NH4
4'-Methoxy-2',3,7-trihydroxyisoflavanone	303.089367	HMDB41673	8.12_303.0894m/z	C16H14O6	48.7	M+H
Ocimenol	137.133148	HMDB59881	23.78_137.1331m/z	C10H18O	56.3	M+H-H2O
Benzyl glycinate	130.066009	HMDB59934	7.80_130.0660m/z	C9H11NO2	51.7	M+H-2H2O
Phenol glucuronide	541.157028	HMDB60014	5.62_541.1570m/z	C12H14O7	46.8	2M+H
Sinapinic acid-O-glucuronide isomer	423.09175	HMDB60019	7.65_400.1025n	C17H20O11	53.1	M+Na, M+K
Lamivudine sulfoxide	309.05987	HMDB60599	1.25_309.0599m/z	C8H11N3O4S	50.5	M+ACN+Na

Tabla 10.- Iones presentes en ambos modos de ionización (Nombre común o IUPAC en inglés), se muestra la m/z para iones [M-H]-

T. de retención_ [M-H]-	ID del compuesto	m/z	Nombre de compuesto en inglés
20.07_279.2372m/z	HMDB30958	279.2371	(Z)-6-Nonenal
8.12_1391.3906m/z	HMDB31994	1391.3905	1,6-dihydroxy-2-methylcyclohexa-2,4-dienecarboxylic acid

11.76_283.0284m/z	HMDB33264	283.0284	2',4',5,7,8-Pentahydroxyisoflavone
8.90_163.0422m/z	CHEBI:64939	163.0421	3,4-dihydro-4-hydroxyphenylpyruvic acid
12.18_163.0418m/z	CHEBI:64939	163.0418	3,4-dihydro-4-hydroxyphenylpyruvic acid
13.27_299.0589m/z	CHEBI:69476	299.0588	3',4'-dihydroxyisoflavone
9.11_310.0760m/z	CHEBI:92072	310.0760	3-[(1-methyl-3-indolyl)methylidene]-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2-one
8.55_697.2441m/z	HMDB32830	697.2440	3-Hydroxybenzyl alcohol glucoside
7.18_355.1073m/z	CHEBI:9370	355.1073	3-Hydroxybenzyl alcohol glucoside
12.58_189.0790m/z	CHEBI:109835	189.0789	3-methyl-6-prop-2-enoxy-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pyridazine
25.26_379.1623m/z	CHEBI:109835	379.1622	3-methyl-6-prop-2-enoxy-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pyridazine
7.08_190.0544m/z	CHEBI:133222	190.0544	5-methoxyindole-2-carboxylic acid
13.08_469.2501m/z	HMDB38732	469.2501	alpha-Ionol O-[arabinosyl-(1->6)-glucoside]
13.71_335.0969m/z	HMDB30450	335.0968	Atalantoflavone
13.71_335.0969m/	HMDB30450	335.0968	Atalantoflavone
15.67_329.2377m/z	HMDB35473	329.2377	Avocadyne
7.86_151.0416m/z	CSID389947	151.041641	Benzaldehyde
9.42_623.1716m/z	HMDB37745	623.1715	Calendoflavoside
11.24_341.1074m/z	CHEBI:65606	341.1073	celebixanthone
9.11_327.1123m/z	HMDB38334	327.1123	Dihydromelilotoside

9.46_593.1568m/z	HMDB35036	593.156	Glucarubolone 15-O-beta-D-glucopyranoside
8.90_1157.4075m/z	HMDB35036	1157.40755	Glucarubolone 15-O-beta-D-glucopyranoside
11.24_353.1013m/z	HMDB28897	353.1012	Histidiny-Tyrosine
15.93_361.1131m/z	HMDB41024	361.1131	Hydroxytyrosol 1-O-glucoside
10.90_297.1018m/z	HMDB41024	297.1018	Hydroxytyrosol 1-O-glucoside
10.74_361.1131m/z	CHEBI:69679	361.1131	Isochamanetin
7.15_285.1016m/z	HMDB38331	285.1015	Kaempferide 3-[rhamnopyranosyl-(1->6)-glucoside] 7-rhamnoside
8.68_715.2185m/z	HMDB34756	715.2185	Landomycin E
8.55_285.1014m/z	HMDB38331	285.1013	Licorice glycoside D2
9.30_1153.3764m/z	HMDB41413	1153.3764	Marmesin rutinoside
8.64_757.2653m/z	CSID30791349	757.2653	Matairesinol 4'-[apiosyl-(1->2)-glucoside]
7.86_151.0416m/z	HMDB06115	151.041641	Matairesinol 4'-[apiosyl-(1->2)-glucoside]
8.68_715.2185m/z	HMDB33369	715.2185	Methyl 3,4,5-trimethoxycinnamate [arabinosyl-(1->3)-[glucosyl-(1->6)]-glucosyl] ester
11.05_519.1210m/z	HMDB39616	519.1210	Orientalone
14.89_241.0542m/z	HMDB39616	241.0542	Orientalone
9.58_643.1518m/z	HMDB38810	643.1517	Rhamnetin 3-(4-rhamnosylrhamnoside)
10.27_305.0817m/z	HMDB13881	305.0816	S-4'-Hydroxywarfarin
9.11_259.1117m/z	CHEBI:108162	259.1117	salicylamides

7.34_651.2214m/z	HMDB32830	651.2214	Swertiamarin
12.49_193.0528m/z	HMDB00930	193.0528	trans-Cinnamic acid

Tabla 11.-Iones afectados en el día 215 dpp mediante ionización negativa detectados mediante un análisis de varianza (FDR 5%) y un fold change de 1.5 entre Los Caracoles y San Rafael (Imagen 40)

Compuestos pre-identificados en inglés	Tiempo de retención _ [M-H] ⁻ (m/z)	UP/DOWN	Log 2 (Diferencia)
Licorice glycoside D1	10.51_677.2008m/z	DOWN	-2.148037
Sin pre-identificación	9.21_449.1146m/z	DOWN	-1.552745
Sin pre-identificación	8.68_374.1407m/z	DOWN	-4.154347
Sin pre-identificación	12.18_337.0966m/z	DOWN	-2.027274

Sin pre-identificación	12.96_629.2113m/z	DOWN	-3.143227
Sin pre-identificación	11.80_315.0549m/z	DOWN	-Inf
Sin pre-identificación	18.36_723.3906m/z	DOWN	-Inf
Sin pre-identificación	10.77_431.1383m/z	DOWN	-4.042307
Sin pre-identificación	10.74_361.1131m/z	DOWN	-3.584346
Sin pre-identificación	10.15_259.1121m/z	DOWN	-1.891261
Sin pre-identificación	2.93_519.9992m/z	DOWN	-1.900917
Sin pre-identificación	6.87_443.2568m/z	DOWN	-2.002497
Sin pre-identificación	6.87_145.0338m/z	DOWN	-3.031229
Sin pre-identificación	7.08_664.0828m/z	DOWN	-4.154889
Sin pre-identificación	7.08_633.1536m/z	DOWN	-2.477522
Sin pre-identificación	7.08_405.0079m/z	DOWN	-2.59951
Sin pre-identificación	5.55_284.0942n	DOWN	-2.886714
Sin pre-identificación	5.52_472.1268n	DOWN	-2.423966
Sin pre-identificación	5.43_705.1978m/z	DOWN	-1.620747
Sin pre-identificación	5.62_325.0971m/z	DOWN	-1.658325
Sin pre-identificación	5.74_550.2583m/z	DOWN	-3.031315
Sin pre-identificación	5.71_1372.3041m/z	DOWN	-2.179332
4-Hydroxymethylcatechol	7.30_140.0485n	UP	2.122094
Corchorifatty acid F	14.76_328.2293n	UP	2.279892
Sin pre-identificación	7.65_167.0374m/z	UP	1.690147
Sin pre-identificación	9.52_311.1161m/z	UP	2.462919

Sin pre-identificación	12.70_509.2431m/z	UP	2.941934
Sin pre-identificación	12.70_441.2543m/z	UP	1.890711
Sin pre-identificación	12.70_971.4992m/z	UP	Inf
Sin pre-identificación	11.87_445.2497m/z	UP	2.348337
Sin pre-identificación	17.54_305.1800m/z	UP	Inf
Sin pre-identificación	10.77_399.2438m/z	UP	2.032004
Sin pre-identificación	9.96_561.2986m/z	UP	2.441667
Sin pre-identificación	1.65_1440.9916m/z	UP	2.591357
Sin pre-identificación	1.65_1098.8755m/z	UP	3.509617
Sin pre-identificación	4.65_205.2160m/z	UP	2.743303
Sin pre-identificación	4.65_206.1616n	UP	2.660393
Sin pre-identificación	4.65_125.1215m/z	UP	3.480139
Sin pre-identificación	1.37_131.0842m/z	UP	Inf
Sin pre-identificación	1.09_154.0642m/z	UP	Inf
Sin pre-identificación	1.25_370.0227n	UP	2.055772
Sin pre-identificación	1.25_311.1131m/z	UP	2.952471
Sin pre-identificación	6.92_210.0649n	UP	3.87844
Sin pre-identificación	6.80_314.1074m/z	UP	2.464628
Sin pre-identificación	7.08_93.0350m/z	UP	1.659516
Sin pre-identificación	7.03_475.1518m/z	UP	1.795217
Sin pre-identificación	7.30_123.0465m/z	UP	2.318311
Sin pre-identificación	5.24_187.1441m/z	UP	2.577949

Sin pre-identificación	5.24_125.1217m/z	UP	3.063553
Sin pre-identificación	5.93_191.1748m/z	UP	3.156381
Sin pre-identificación	5.93_101.1475m/z	UP	Inf

Tabla 12.- Iones afectados en el día 215 dpp mediante ionización negativa detectados mediante un análisis de varianza (FDR 5%) y un fold change de 1.5 entre Banco de Germoplasma y San Rafael (Imagen 41)

		Tiempo de retención _ [M-H] ⁻ (m/z)	UP/DOWN	Log 2 (Diferencia)
8.68_374.1407m/z	DOWN	-3.73866379		
12.18_337.0966m/z	DOWN	-4.06951796		
10.77_431.1383m/z	DOWN	-5.45756061		
10.74_361.1131m/z	DOWN	-3.97124816		
5.74_550.2583m/z	DOWN	-2.99699805		
9.27_443.0705m/z	UP	Inf		
8.21_479.1624m/z	UP	Inf		

10.74_209.1212m/z	UP	2.97116787
6.52_303.0913m/z	UP	Inf

Tabla 13.- Iones afectados en el día 215 dpp mediante ionización negativa detectados mediante un análisis de varianza (FDR 5%) y un fold change de 1.5 entre Tenampulco y San Rafael (Imagen 42)

	Compuestos pre-identificados en inglés	Tiempo de retención [M-H] ⁻ (m/z)	UP/DOWN	Log 2 (Diferencia)
3-hydroxyphloretin 2'-O-xyloglucoside	6.80_629.1721m/z	DOWN	-2.53934257	
LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	18.51_476.2841m/z	DOWN	-2.24445742	
Glabrone	15.93_335.0947m/z	DOWN	-1.97536716	
Licorice glycoside D1	10.51_677.2008m/z	DOWN	-1.61852728	
Cyclocommunin	14.89_441.1393m/z	DOWN	-2.19416249	
Isovanillic acid	9.80_167.0372m/z	DOWN	-1.6463338	
Phenytoin methylcatechol	6.09_277.0604m/z	DOWN	-1.81027717	
Sin identificación	8.68_374.1407m/z	DOWN	-3.93158569	
Sin identificación	8.90_582.2650m/z	DOWN	-2.25200873	
Sin identificación	12.54_259.1123m/z	DOWN	-5.08402134	
Sin identificación	12.18_337.0966m/z	DOWN	-2.71369622	
Sin identificación	13.12_275.1073m/z	DOWN	-3.2569373	
Sin identificación	12.96_629.2113m/z	DOWN	-3.18033598	
Sin identificación	11.80_315.0549m/z	DOWN	-1.69211515	
Sin identificación	14.89_403.0853m/z	DOWN	-2.29879094	
Sin identificación	14.89_335.0960m/z	DOWN	-1.77162838	

Sin identificación	14.89_241.0542m/z	DOWN	-2.05621422
Sin identificación	18.36_723.3906m/z	DOWN	-3.72830153
Sin identificación	17.23_721.3741m/z	DOWN	-3.6866266
Sin identificación	10.98_480.1828m/z	DOWN	-Inf
Sin identificación	9.68_468.0417m/z	DOWN	-1.66992925
Sin identificación	9.84_329.1007m/z	DOWN	-1.66075253
Sin identificación	10.93_461.1507m/z	DOWN	-1.79231243
Sin identificación	10.83_302.9848m/z	DOWN	-1.91523524
Sin identificación	10.77_431.1383m/z	DOWN	-4.58293466
Sin identificación	10.74_361.1131m/z	DOWN	-3.76486609
Sin identificación	10.15_527.2100m/z	DOWN	-2.34690927
Sin identificación	10.15_259.1121m/z	DOWN	-2.00795123
Sin identificación	2.93_519.9992m/z	DOWN	-2.06468881
Sin identificación	6.87_145.0338m/z	DOWN	-3.05510022
Sin identificación	7.08_664.0828m/z	DOWN	-3.20723295
Sin identificación	7.08_633.1536m/z	DOWN	-2.70328768
Sin identificación	7.08_405.0079m/z	DOWN	-2.259277
Sin identificación	6.56_613.2925m/z	DOWN	-Inf
Sin identificación	7.11_337.1964m/z	DOWN	-1.81638849
Sin identificación	7.46_1369.4286m/z	DOWN	-1.82608693
Sin identificación	5.74_550.2583m/z	DOWN	-3.0140543
Sin identificación	5.71_1372.3041m/z	DOWN	-1.53261835
Sin identificación	6.09_782.2622m/z	DOWN	-2.10427292

4-Hydroxymethylcatechol	7.30_140.0485n	UP	2.04042303
(-)-pinellic acid	13.36_329.2375m/z	UP	3.27322233
13-Hydroxy-9-methoxy-10-oxo-11-octadecenoic acid	19.99_363.2205m/z	UP	2.17192195
Sin identificación	9.14_213.1165m/z	UP	2.11174886
Sin identificación	11.64_449.2813m/z	UP	2.05099607
Sin identificación	19.99_295.2317m/z	UP	2.6704343
Sin identificación	25.26_415.2131m/z	UP	1.58596589
Sin identificación	25.26_379.1623m/z	UP	1.57592397
Sin identificación	6.92_210.0649n	UP	4.25666905
Sin identificación	6.52_303.0913m/z	UP	Inf
Sin identificación	7.30_123.0465m/z	UP	2.17228163

10.1 Trabajos citados

- Anuradha, K., Shyamala, B. N., & Naidu, M. M. (2013). Vanilla- Its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(12), 1250–1276. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.563879>
- Benjamin, D. J., Berger, J. O., Johannesson, M., Nosek, B. A., Wagenmakers, E. J., Berk, R., ... Johnson, V. E. (2018). Redefine statistical significance. *Nature Human Behaviour*, 2(1), 6–10. <https://doi.org/10.1038/s41562-017-0189-z>
- Bory, S., Lubinsky, P., Risterucci, A. M., Noyer, J. L., Grisoni, M., Duval, M. F., & Besse, P. (2008). Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany*, 95(7), 805–815. <https://doi.org/10.3732/ajb.2007332>
- Bouetard, A., Lefeuvre, P., Gigant, R., Bory, S., Pignal, M., Besse, P., & Grisoni, M. (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(2), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.021>
- Brillouet, J., Verdeil, J., Odoux, E., Lartaud, M., Grisoni, M., & Conéjéro, G. (2014). Phenol homeostasis is ensured in vanilla fruit by storage under solid form in a new chloroplast-derived organelle , the phenyloplast, 65(9), 2427–2435. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru126>
- Busconi, M., Lucini, L., Soffritti, G., Bernardi, J., Bernardo, L., Brunschwig, C., ... Raharivelomanana, P. (2017). Phenolic Profiling for Traceability of *Vanilla x tahitensis*, 8(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01746>
- Cambiaghi, A., Ferrario, M., & Masseroli, M. (2017). Analysis of metabolomic data : tools , current strategies and future challenges for omics data integration, 18(February 2016), 498–510. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw031>

- Cannes, N., & Fett-neto, A. G. (2010). Plant Secondary Metabolism Engineering, *643*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-723-5>
- Chong, J., & Xia, J. (2018). Systems biology MetaboAnalystR : an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data, *34*(June), 4313–4314. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty528>
- Converti, A., Aliakbarian, B., Domínguez, J. M., Vázquez, G. B., & Perego, P. (2010). Microbial production of biovanillin. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(3), 519–530. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300001>
- Creydt, M., & Fischer, M. (2017). Plant Metabolomics: Maximizing Metabolome Coverage by Optimizing Mobile Phase Additives for Nontargeted Mass Spectrometry in Positive and Negative Electrospray Ionization Mode. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02592>
- Díaz-Bautista, M., Francisco-Ambrosio, G., Espinoza-Pérez, J., Barrales-Cureño, H. J., Reyes, C., Herrera-Cabrera, B. E., & Soto-Hernández, M. (2018). Morphological and phytochemical data of Vanilla species in Mexico. *Data in Brief*, *20*, 1730–1738. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.08.212>
- Dignum, M. J. W., Van Der Heijden, R., Kerler, J., Winkel, C., & Verpoorte, R. (2004). Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase. *Food Chemistry*, *85*(2), 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00293-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00293-0)
- Donini, P., Bory, S., Catrice, O., Brown, S., Leitch, I. J., Gigant, R., ... Besse, P. (2008). Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Genome*, *51*(10), 816–826. <https://doi.org/10.1139/G08-068>
- Dubery, I. (2013). Plant metabolomics : A new frontier in phytochemical analysis, *109*(5), 18–20.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes, 155–171.
- Gallage, N. J., Hansen, E. H., Kannangara, R., Olsen, C. E., Motawia, M. S.,

- Jørgensen, K., ... Møller, B. L. (2014). Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme, (May).
<https://doi.org/10.1038/ncomms5037>
- Gallage, N. J., Jørgensen, K., Janfelt, C., Nielsen, A. J. Z., Naake, T., Duński, E., ... Møller, B. L. (2018). The Intracellular Localization of the Vanillin Biosynthetic Machinery in Pods of *Vanilla planifolia*. *Plant and Cell Physiology*, 59(2), 304–318. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx185>
- Gallage, N. J., & Møller, B. L. (2015). Vanillin – Bioconversion and Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its De Novo Biosynthesis in the Vanilla Orchid. *Molecular Plant*, 8(1), 40–57.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.008>
- Godwin, I. D., Aitken, E. A. B., & Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18(9), 1524–1528. <https://doi.org/10.1002/elps.1150180906>
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., & Kell, D. B. (2004). Metabolomics by numbers : acquiring and understanding global metabolite data, 22(5). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.03.007>
- Gu, F., Chen, Y., Fang, Y., Wu, G., & Tan, L. (2015). Contribution of *Bacillus* Isolates to the Flavor Profiles of Vanilla Beans Assessed through Aroma Analysis and Chemometrics, 18422–18436.
<https://doi.org/10.3390/molecules201018422>
- Gu, F., Chen, Y., Hong, Y., Fang, Y., & Tan, L. (2017). Comparative metabolomics in vanilla pod and vanilla bean revealing the biosynthesis of vanillin during the curing process of vanilla. *AMB Express*. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0413-2>
- Gujas, C., Montenegro-Burke, J. R., Warth, B., Spilker, M. E., & Siuzdak, G. (2018). Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nature Biotechnology*, 36(4), 316–320.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4101>

- Guo, H., Guo, H., Zhang, L., Tang, Z., Yu, X., & Wu, J. (2019). Metabolome and Transcriptome Association Analysis Reveals Dynamic Regulation of Purine Metabolism and Flavonoid Synthesis in Transdifferentiation during Somatic Embryogenesis in Cotton, 1–23.
- Hansen, A. S. S., Fromberg, A., & Frandsen, H. L. (2014). Authenticity and traceability of vanilla flavours by analysis of stable isotopes of carbon and hydrogen. <https://doi.org/10.1021/jf503055k>
- Hassan, S., Araceli, P.-S., Denis, B., De Los Angeles, V.-V. M., Mayra, N.-G., & Delfino, R.-L. (2016). Identification of volatile compounds in cured Mexican vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans using headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Fruits*, 71(6), 407–418. <https://doi.org/10.1051/fruits/2016032>
- Havkin-Frenkel, D & C. Belanger, F. (2011). *Handbook of Vanilla Science and Technology*.
- Hong, J., Yang, L., Zhang, D., & Shi, J. (2016). Plant Metabolomics : An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. <https://doi.org/10.3390/ijms17060767>
- Hu, Y., Jr, M. F. R. R., Bombarely, A., Brym, M., Bassil, E., & Chambers, A. H. (2019). Genomics-based diversity analysis of Vanilla species using a Vanilla planifolia draft genome and. *Scientific Reports*, (February), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40144-1>
- Joel, D. M., French, J. C., Graft, N., Kourteva, G., Dixon, R. A., & Havkin-Frenkel, D. (2003). A hairy tissue produces vanillin. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51(January 2015), 157–159. <https://doi.org/10.1560/5G0H-9X2K-FLUA-46TC>
- Kim, J. H., Lee, H. O., Cho, Y. J., Kim, J., Chun, J., Choi, J., ... Jung, W. H. (2014). A vanillin derivative causes mitochondrial dysfunction and triggers oxidative stress in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089122>

- Krumsiek, J., & Theis, F. J. (2013). Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data Abstract : Metabolomics is a relatively new high-throughput technology that aims at measuring all endogenous metabolites within a biological sample in an unbiased fashion . The resu, (January).
- Kundu, A. (2017). Vanillin biosynthetic pathways in plants. *Planta*, *245*(6), 1069–1078. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2684-x>
- Li, J., Lee, Y., Li, C., Lo, H., Chen, Y., Chen, Y., ... Ho, T. (2018). Vanillin Ameliorated the Development of Azoxymethane / Dextran Sodium Sulfate-Induced Murine Colorectal Cancer : the Involvement of Proteasome / Nuclear Factor- # B / Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01582>
- Lionel, T., Grisoni, M., Fock-bastide, I., Jade, K., Bartet, L., Hae, Y., ... Kodja, H. (2012). Plant Physiology and Biochemistry Metabolome of Vanilla planifolia (Orchidaceae) and related species under Cymbidium mosaic virus (CymMV) infection. *Plant Physiology et Biochemistry*, *60*, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.015>
- Martin, A. C., Pawlus, A. D., Jewett, E. M., Wyse, D. L., Angerhofer, C. K., & Hegeman, A. D. (2014). Evaluating solvent extraction systems using metabolomics approaches. *RSC Advances*, *4*(50), 26325–26334. <https://doi.org/10.1039/c4ra02731k>
- Masamoto, Y., Kawabata, F., & Fushiki, T. (2009). Intra-gastric Administration of TRPV1, TRPV3, TRPM8, and TRPA1 Agonists Modulates Autonomic Thermoregulation in Different Manners in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(5), 1021–1027. <https://doi.org/10.1271/bbb.80796>
- Mehdi, S., Rohani, R., Mahmoudi, R., Kaboudari, A., & Kazeminia, M. (2018). Antimicrobial Effects of Some Herbal Plants and Spices on Staphylococcus epidermidis and Pseudomonas aeruginosa, (August).
- Palama, T. L., Khatib, A., Young Choi, H. A. E., Payet, B., Fock, I., Verpoorte, R., &

- Kodja, H. (2009). Metabolic changes in different developmental stages of vanilla planifolia pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7651–7658. <https://doi.org/10.1021/jf901508f>
- Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., ... Günata, Z. (2006). GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, 99(4), 728–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.050>
- Pretreatments, S., & Curing, R. (2007). Specific Pretreatments Reduce Curing Period of Vanilla (*Vanilla planifolia*) Beans, 2947–2955.
- Quality of green and cured Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks . Ex Andrews) fruit in relation to its age at harvest [Article @ Calidad de fruto verde y beneficiado de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks . Ex Andrews) con relación a su edad a la cosecha. (2019), (May), 2019. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2018.02.004>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2017). Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) cell suspension cultures: establishment, characterization, and applications. *3 Biotech*, 7(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0871-x>
- Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ortíz-García, M., Andueza-Noh, R. H., Octavio-Aguilar, P., & Luna-Rodríguez, M. (2016). Evaluation of molecular variability in germplasm of vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in Southeast Mexico: implications for genetic improvement and conservation. *Plant Genetic Resources*, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1479262115000660>
- Schlichting, C. D. (1986). The Evolution of Phenotypic Plasticity in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17(1), 667–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.003315>
- Schwarz, B., & Hofmann, T. (2009). Identification of Novel Orosensory Active Molecules in Cured Vanilla Beans (*Vanilla planifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3729–3737. <https://doi.org/10.1021/jf900086m>

- Sciences, A., Marton, A., Kúsz, E., Kolozsi, C., Tubak, V., Zagotto, G., ... Vizler, C. (2016). Inhibit NFκB Activation and Suppress Growth of A375 Human Melanoma, *5750*, 5743–5750. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11157>
- Tiessen, A., Cubedo-Ruiz, E. A., & Winkler, R. (2017). Improved Representation of Biological Information by Using Correlation as Distance Function for Heatmap Cluster Analysis. *American Journal of Plant Sciences*, *08*(03), 502–516. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.83035>
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., & Fernie, A. R. (2013). The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage, *9238*(2), 123–152. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.758083>
- Villanueva-Viramontes, S., Hernández-Apolinar, M., Fernández-Concha, G. C., Dorantes-Euán, A., Dzib, G. R., & Martínez Castillo, J. (2017). Wild & Vanilla planifolia and its relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic analyses with ISSR and ITS. *Botanical Sciences*, *95*(2), 169. <https://doi.org/10.17129/botsci.668>
- Weckwerth, W. (2011). Green systems biology - From single genomes, proteomes and metabolomes to ecosystems research and biotechnology. *Journal of Proteomics*, *75*(1), 284–305. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.07.010>
- Widhalm, J. R., & Dudareva, N. (2015). A familiar ring to it: Biosynthesis of plant benzoic acids. *Molecular Plant*, *8*(1), 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.001>
- Winkler, R., Tiessen, A., Irapuato, U., & Norte, K. L. (2015). Metabolic Profiling of Plant Extracts Using Direct-Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry Allows for High-Throughput Phenotypic Characterization According to Genetic and Environmental Effects. <https://doi.org/10.1021/jf504853w>
- Yang, F., & Zheng, J. (2017). Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein and Cell*, *8*(3), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0353-7>

- Yang, H., Barros-rios, J., Kourteva, G., Rao, X., Chen, F., Shen, H., ... Dixon, R. A. (2017). Phytochemistry A re-evaluation of the final step of vanillin biosynthesis in the orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry*, 139, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.003>
- Yusof, E. N., Latif, M. A. M., Tahir, M. I. M., Sakoff, J. A., Simone, M. I., Page, A. J., ... Ravoof, T. B. S. A. (2019). o-Vanillin Derived Schiff Bases and Their Organotin (IV) Compounds: Synthesis, Structural Characterisation, In-Silico Studies and Cytotoxicity, 112(Iv). <https://doi.org/10.3390/ijms20040854>
- Zhang, Y., Mo, L., Chen, F., Lu, M., Dong, W., Wang, Q., ... Gu, F. (2014). Optimized Production of Vanillin from Green Vanilla Pods by Enzyme-Assisted Extraction Combined with Pre-Freezing and Thawing, (Ccd), 2181–2198. <https://doi.org/10.3390/molecules19022181>

10.2 Páginas web

Recuperado en Mayo, 13, 2019 de Integrated Taxonomic Information System online database (ITIS), <http://www.itis.gov>.

Kancungira, N. (2 de Mayo de 2019). Fighting the vanilla thieves of Madagascar. *BBC*, págs. https://www.bbc.co.uk/news/resources/idt-sh/madagascar_vanilla

O'Reilly, F. (4 de Septiembre de 2018). Precious as Silver, Vanila Brings Cash and Crime to Madagascar. *New York Times*, págs. <https://www.nytimes.com/interactive/2018/08/30/world/africa/madagascar-vanilla.html>.

Pagano, A., & Echeverría, G. (27 de Septiembre de 2018). Why vanilla is so expensive. *Business Insider*, págs. <https://www.businessinsider.com/vanilla-expensive-stolen-madagascar-2018-9>.