



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**SISTEMA DE APAREAMIENTO, ÉXITO
REPRODUCTIVO Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE
Rhynchostele cervantesii (ORCHIDACEAE): UNA
ESTRATEGIA PARA SU CONSERVACIÓN**

TESIS

Que presenta

ROSA ELIA MAGAÑA LEMUS

Para obtener el título de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directora de tesis: Dra. Irene Ávila Díaz

Morelia, Michoacán, marzo de 2018



CONTENIDO

I RESUMEN GENERAL.....	1
II GENERAL SUMMARY.....	3
III INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
IV ANTECEDENTES GENERALES.....	8
IV.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE	8
IV.2 SISTEMA DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCTIVO EN ORQUÍDEAS.....	9
IV.3 CULTIVO <i>in vitro</i> DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS.....	10
IV.4 SISTEMA DE ESTUDIO.....	14
IV.4.1 Características generales de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	14
IV.4.2 Sitio de estudio.....	18
V HIPÓTESIS.....	21
VI OBJETIVOS.....	22
CAPÍTULO 1. SISTEMA DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCTIVO DE <i>Rhynchostele cervantesii</i> (ORCHIDACEAE) EN EL MUNICIPIO DE SANTIAGO TINGAMBATO, MICHOACÁN	23
1 RESUMEN.....	23
ABSTRACT.....	24
2 INTRODUCCIÓN.....	25
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Sistema de apareamiento	28
3.1.1 Tratamientos de polinización.....	28
3.1.2 Viabilidad de semillas.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1 Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino.....	30
5. CONCLUSIONES.....	35
6. LITERATURA CITADA.....	36
Capítulo 2. Sistema de propagación <i>in vitro</i> y aclimatación de la orquídea epífita amenazada <i>Rhynchostele cervantesii</i> (Orchidaceae).	40
1 RESUMEN.....	40
ABSTRACT.....	41

2 INTRODUCCIÓN.....	42
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1 Germinación de las semillas de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	46
3.2 Efecto de la madurez de la cápsula en la germinación de <i>R. cervantesii</i>.....	47
3.3 Aclimatación de plántulas de <i>Rhynchostele cervantesii</i>.....	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1 Propagación <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	49
4.1.2 Germinación de las semillas de <i>Rhynchostele cervantesii</i>.....	49
4.2.3 Efecto de la madurez de la cápsula en la germinación de <i>R. cervantesii</i>.....	50
4.1.4 Efecto de diferentes periodos de pre-aclimatación en la sobrevivencia y el crecimiento de plántulas de <i>R. cervantesii</i> bajo condiciones de invernadero.....	52
5. CONCLUSIONES.....	55
6. LITERATURA CITADA.....	56
VII ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN.....	60
VIII DISCUSIÓN GENERAL.....	62
IX PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES.....	65
X BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	66

I. RESUMEN GENERAL

Rhynchostele cervantesii es una orquídea epífita, endémica de México, que actualmente se encuentra en la categoría de amenazada en la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, por lo que se considera de gran importancia la realización de estudios sobre la biología. El objetivo principal del presente trabajo fue generar información sobre el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *Rhynchostele cervantesii* en el Predio de Tenderio de la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato en los años 2014 y 2015, así como establecer un sistema de propagación *in vitro* eficiente, y con ello poder establecer una estrategia de conservación para dicha especie. El sistema de apareamiento se evaluó mediante los tratamientos de polinización manual de autopolinización espontánea, emasculación, endocruzamiento y exocruzamiento, y el éxito reproductivo femenino con el tratamiento de polinización abierta. También, se estableció un sistema de propagación *in vitro* para la germinación de semillas, probando los medios Murashige y Skoog, fertilizante comercial con agar-agar (vegetariano), Phytamax y Phytamax con plátano, todos al 50% y 100% de sus sales basales. Se probó el efecto de la madurez de la cápsula en la germinación de las semillas realizando la siembra de semillas de dos cápsulas inmaduras (7 meses después de efectuada la polinización manual) y dos maduras (12 meses después). Se llevó a cabo la aclimatación bajo condiciones de invernadero para lo cual se establecieron tratamientos de pre-aclimatación, es decir, se llevaron los frascos con las plántulas al invernadero y se dejaron ahí 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días previos a su aclimatación, además se realizaron mediciones tanto de las partes aéreas como de las raíces de cada plántula, cada 45 días. Los porcentajes de producción de frutos obtenidos en 2014 y 2015 respectivamente fueron: endocruzamiento: 18% y 14 %, exocruzamiento: 54.5% y 30.8% y polinización abierta 13.6% y 15.4%, en ambos años los tratamientos de autopolinización espontánea y emasculación no registraron producción de frutos; registrándose diferencias entre los tratamientos tanto del 2014 como del 2015, con una mayor producción de frutos en exocruzamiento que en endocruzamiento y polinización abierta; además de registrar altos valores de éxito reproductivo femenino con un 13.6 y 15.4 de fruit set, en 2014 y 2015 respectivamente. La germinación fue significativamente mayor en los medios Phytamax con plátano

(50% y 100% de sus sales basales) registrándose 81% de germinación (Phytamax al 50 y 100%) y en el medio Phytamax (50% de sus sales basales) con un 74% de germinación a los 60 días de siembra. En cuanto al efecto de la madurez de la cápsula, se observó que es determinante para la germinación de las semillas ya que en las cápsulas inmaduras no se observó germinación. Los mejores tratamientos de pre-aclimatación fueron: 0, 5 y 10 días con 93.75%, 81.25% y 87.5% de sobrevivencia. En cuanto al número total de hojas fueron mejores los tratamientos a los 5 y 15 días y en lo que se refiere a la longitud de la planta el mejor tratamiento fue a los 5 días. Se concluye que *R. cervantesii* es una especie que requiere de polinizadores para su reproducción sexual, con un sistema de apareamiento mixto con alta tendencia a la exogamia. Por otro lado, se recomienda para la germinación de esta especie el medio Phytamax al 50%, utilizar cápsulas maduras y un período de pre-aclimatación de 5 días. Además, se recomienda de manera general, realizar tratamientos de exocruza para aumentar el número de frutos, así como el número y viabilidad de las semillas, y realizar cruza selectivas para llevar a cabo la micropropagación a gran escala y mejoras así la calidad de las plantas, lo anterior como una manera de contribuir al establecimiento de una estrategia de conservación para esta especie.

Palabras clave: Sistema de apareamiento, propagación *in vitro*, madurez de la cápsula, *Rhynchostele cervantesii*.

II. GENERAL SUMMARY

Rhynchosele cervantesii is an epiphytic orchid, endemic to Mexico, which is currently in the category of threatened in the Official Mexican NOM NOM-059-ECOL-2010, so it is considered very important to conduct studies on biology. The main objective of this work was to generate information on the mating system and reproductive success of *Rhynchosele cervantesii* in the Tenderio Site of the Indigenous Community of Santiago Tingambato in 2014 and 2015, as well as to establish an efficient *in vitro* propagation system, and with that you can establish a conservation strategy for the species. The mating system was evaluated through manual pollination treatments of spontaneous self-pollination, emasculation, inbreeding and exocruzamiento, and female reproductive success with the open pollination treatment. Also, an *in vitro* propagation system for germination of seeds was established, testing the Murashige and Skoog media, commercial fertilizer with agar-agar (vegetarian), Phytamax and Phytamax with banana, all at 50% and 100% of their sales. The effect of the maturity of the capsule on germination of the seeds was tested by sowing the seeds of the immature capsules (7 months after manual pollination) and two mature ones (12 months later). The acclimatization was carried out under greenhouse conditions for which the pre-acclimatization treatments were established, that is, the vials were taken with the seedlings to the greenhouse and were left there 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days prior to acclimatization. The percentages of nut production were, in 2014: spontaneous self-pollination 0%, emasculation 0%, inbreeding 18%, exocruzamiento: 54.5% and open pollination 13.6%; in 2015, spontaneous self-pollination 0%, emasculation 0%, inbreeding: 14%, exocruzamiento 30.8% and open pollination was obtained 15.4%, registering differences between the treatments of 2014 and 2015, with a greater production of fruits in exocruzamiento that in endocruzamiento and open pollination; in addition to high register values of female reproductive success with a 13.6 and 15.4 set of fruit, in 2014 and 2015 respectively. Germination was significantly higher in the Phytamax media with plantain (50% and 100% of its basic sales) with 81% germination (Phytamax at 50 and 100%) and Phytamax medium (50% of its basic sales) with a 74% germination at 60 days of planting. As for the effect of the maturity of the capsule, which is crucial for the germination of the seeds and that the immature capsules germination

does not occur. The best pre-acclimatization treatments were: 0, 5 and 10 days with 93.75%, 81.25% and 87.5% survival. As for the number of leaves were the best for 5 and 15 days and what refers to the duration of the plant the best treatment was after 5 days. It is concluded that *R. cervantesii* is a species that requires pollinators for sexual reproduction, with a mixed mating system with high tendency to exogamy. On the other hand, 50% Phytamax medium is recommended for the germination of this species, use mature capsules and a pre-acclimation period of 5 days.

Key words: Mating system, *in vitro* propagation, maturity of the capsule, *Rhynchostele cervantesii*.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

La palabra *epífita* viene del griego: *epi* que significa “sobre”, y *phyte*, “planta”; según Granados-Sánchez *et al.*, en 2004 las epífitas son plantas que crecen adheridas a otras plantas, ya sea en sus ramas o troncos, el hospedero o “forofito”, solo le sirve a la planta como soporte sin obtener de ella ni agua, ni nutrientes; es esto lo que diferencia a las plantas epífitas de las parásitas. Algunas de las familias más conocidas del grupo de las epífitas son las Orchidaceae, Araceae, Piperaceae, Bromeliaceae, y diversas Pteridophytas (Krömer *et al.*, 2014). Las epífitas vasculares son plantas particularmente sensibles a los cambios provocados por las perturbaciones, debido a que su distribución está influenciada por diversos factores como, los bióticos y climáticos (Hernández-Rosas, 2001); dichas características provocan una dependencia directa con su hospedero y las condiciones microambientales.

En general, la mayoría de las epífitas son utilizadas con fines ornamentales principalmente, lo que provoca una gran extracción de plantas, que las pone en una situación de riesgo, por lo que en algunos casos las autoridades han comenzado a legislar al respecto, como es en el caso de las bromelias en Oaxaca (Mondragón y Villa-Guzmán, 2008). Por tal motivo, es de gran importancia realizar estudios sobre la distribución y usos de las epífitas vasculares, con el fin de establecer estrategias de conservación y uso sustentable de las mismas, lo que puede contribuir en gran medida, a una legislación adecuada.

Dentro de las epífitas se encuentra la mayoría de los representantes de la familia Orchidaceae; este grupo de plantas, son sujetas a extracciones masivas debido a sus diversos usos ornamentales y ceremoniales, principalmente (Soto-Arenas *et al.*, 2007); por lo tanto, las orquídeas son un grupo de plantas especialmente vulnerable. Los integrantes de esta familia se consideran cosmopolitas, ya que habitan prácticamente en todos los hábitats y en todos los continentes, con excepción de los polos y los desiertos muy extremos (Salazar, 2009), siendo más abundantes en las regiones tropicales (Rzedowski y Rzedowski, 2005). Según Chase *et al.* en 2003, esta familia presenta en el mundo unas 25 mil especies, de las cuales en México existen más de 1 260 (Hágsater *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007) siendo el porcentaje de endemismos

de 40% en especies y 8% en géneros (Soto, 1996), de las cuales la mayor parte son epífitas (Rzedowski y Rzedowski, 2005).

En Michoacán existen aproximadamente 200 especies de orquídeas, las cuales se distribuyen entre los 1500 y 2500 msnm (Lapiner, 1979). Como consecuencia de la vulnerabilidad, inestabilidad y extracción excesiva, la riqueza de esta familia está siendo amenazada debido a la disminución de sus poblaciones. Se calcula que en México se han extinguido al menos 22 especies de orquídeas (Carnevali, 2010). Además, la extracción irracional de plantas silvestres, así como el corte de sus flores puede tener consecuencias críticas en la reproducción de estas y esto puede llevar a la reducción de las poblaciones y en algunos casos a la extinción local (Cruz-García, 2013).

Dada la problemática ya mencionada anteriormente, se considera de vital importancia la generación de conocimientos básicos sobre la biología de los integrantes de la familia Orchidaceae. Es imprescindible, en la actualidad, la realización de trabajos integrales, en donde se abarquen tanto la biología reproductiva de las especies, esto es, la manera en la que cada especie es capaz de reproducirse y producir descendencia, así como el éxito reproductivo de cada especie, lo que se refiere a la cantidad de frutos que es capaz de producir la planta con respecto al número total de flores que posee, y además conocer los requerimientos nutricionales de la especie tanto para su germinación como para su desarrollo en las etapas tempranas, lo que contribuye a la producción de plantas en grandes cantidades, además lograr conocer cuáles son los requerimientos de las especies para lograr una mayor sobrevivencia *ex vitro*, al ser aclimatadas en invernadero. Todos estos conocimientos pueden ayudar a bajar la presión a la que son sometidas las poblaciones de estas plantas desde hace ya mucho tiempo, ya que, será posible el establecimiento de protocolos que contribuyan a que las especies sean más exitosas en cuanto a su establecimiento, desarrollo y crecimiento.

Rhynchostele cervantesii es una orquídea endémica de México y se encuentra dentro de la categoría de Amenazada según la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, ya que, dada la belleza de sus flores ha sido fuertemente extraída de sus poblaciones naturales. Para la planeación de estrategias adecuadas para la

conservación de sus poblaciones se considera necesaria la realización de estudios básicos de diversos aspectos de su biología.

En el capítulo 1, se incluye parte de la biología reproductiva de *R. cervantesii*, la cual se determinó mediante los tratamientos de polinización manual de autopolinización espontánea, emasculación, endocruzamiento, exocruzamiento, así como tratamientos de polinización abierta con los cuales se midió el éxito reproductivo femenino. Además, se evaluó la viabilidad de las semillas producto de dichos tratamientos, mediante la presencia de embrión.

En el capítulo 2, se incluye la propagación *in vitro*, para lo cual se probaron los medios de cultivo Murashige y Skoog, fertilizante comercial con agar-agar (vegetariano), Phytamax y Phytamax con plátano, todos al 50% y 100% de sus sales basales, además se probó el efecto de la madurez de la cápsula en la germinación de las semillas y se llevó a cabo la aclimatación de plántulas desarrolladas *in vitro*, bajo condiciones de invernadero.

Cabe mencionar que la presente investigación forma parte de un proyecto más amplio en el que también se estudia la ecología y hongos asociados de *R. cervantesii* (Ávila-Díaz *et al*, en proceso, Cervantes-Uribe *et al*, en proceso).

IV. ANTECEDENTES GENERALES

IV.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE

Los integrantes de la familia Orchidaceae poseen las siguientes características: son plantas herbáceas perennes o subarborescentes, epífitas o terrestres, rara vez paludícolas o saprófitas; porciones subterráneas a menudo bulboides, tuberiformes o cormoides (en ocasiones plantas rizomatosas); el tallo en las epífitas con frecuencia se encuentra modificado a modo de pseudobulbo (órgano caulinar engrosado) aéreo, en las terrestres a menudo el tallo cubierto por vainas foliares de posición alterna; hojas radiales o caulinas, por lo común envainantes en la base, enteras; flores solitarias o más comúnmente dispuestas en racimos, espigas o panículas, laterales o terminales; flor zigomorfa, frecuentemente resupinada (labelo situado en la parte inferior de la flor, debido a un giro de 180°), por lo general hermafroditas, sésiles o pediceladas, perianto formado por seis segmentos libres o unidos: los tres exteriores (sépalos) verdes o a menudo de otros colores, semejantes entre sí o el dorsal diferente, los tres segmentos interiores (pétalos) alternando con los sépalos, los laterales semejantes entre sí y el tercero, muy variadamente modificado, constituye el “labelo”; estambre(s) y estilo consolidados en una “columna” (ginostemo), con una a dos anteras en la parte terminal de la columna, el polen generalmente aglutinado en 2, 4, 6 u 8 polinios, que a veces se estiran en una porción filamentosa estéril, la caudícula; fruto por lo general capsular, abriéndose por 1, 2, 3 ó 6 valvas longitudinales que permanecen unidas apicalmente; semillas muy numerosas, muy pequeñas (Rzedowski y Rzedowski, 2005). Además, las semillas de las orquídeas carecen de endospermo y una sola cápsula contiene millones de semillas, sin embargo, solo unas pocas germinan en la naturaleza (Kalimuthu *et al.*, 2007).

Las orquídeas tienen una gran importancia ecológica ya que proporcionan refugio a los animales que viven cerca de sus raíces, principalmente hormigas, artrópodos, anfibios y algunas aves pequeñas (Ceja *et al.*, 2010); también algunas especies ofrecen recompensa nutricional como el néctar, seudonéctar y polen, a sus polinizadores (abejas, moscas, mariposas, entre otros) lo cual provee de alimento a dichas especies, a cambio de servicios de polinización; otro tipo de recompensa es la

que ofrecen algunas especies de *Maxillaria* que producen ceras y resinas, las cuales se infiere que son utilizadas por algunas avispas y abejas para la construcción de los panales (Tremblay *et al.*, 2005). Además, forman asociaciones con hongos y bacterias. Es bien conocido que las orquídeas forman asociaciones con hongos endófitos para su germinación y el establecimiento de plántulas (Selosse *et al.*, 2002; Ávila-Díaz *et al.*, 2013).

IV.2 SISTEMA DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCTIVO EN ORQUÍDEAS

La mayoría de las orquídeas requieren de polinizadores para su reproducción sexual (Dressler, 1981), como se ha reportado para varias especies de orquídeas epífitas, como *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz, 2007), *Prosthechea* aff. *karwinskii* (Camacho-Domínguez, 2010) y *Cuitlauzina pendula* (Pérez-Decelis, 2013). También se han reportado especies dependientes de los polinizadores en orquídeas terrestres, tal es el caso de *Eulophia graminea* (Sun, 1999) y *Goodyera procera* (Wong y Sun, 1999).

Se ha reportado un sistema de apareamiento mixto para varias especies de orquídeas epífitas, es el caso de *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz, 2007), *Prosthechea* aff. *karwinskii* (Camacho-Domínguez, 2010), *Xylobium variegatum* (Quiroga *et al.*, 2010) y *Cuitlauzina pendula* (Pérez-Decelis, 2013), ya que se registró la producción de frutos tanto por tratamientos de endocruzamiento como de exocruzamiento. También se reporta este patrón en orquídeas terrestres como en *Spiranthes hongkongensis* (Sun, 1999) y *Goodyera procera* (Wong y Sun, 1999).

Para la familia Orchidaceae se reporta un patrón general en cuanto a la limitación de la polinización y un bajo éxito reproductivo femenino (Tremblay *et al.*, 2005). Se han reportado varias especies epífitas que presentan limitación de la polinización como *Epidendrum ciliare* (Ackerman y Montalvo, 1990), *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz, 2007), *Prosthechea* aff. *karwinskii* (Camacho-Domínguez, 2010), *Brassavola cebolleta* (Rech *et al.*, 2010) y *Cuitlauzina pendula* (Pérez-Decelis, 2013), en donde se registran mayores valores de producción de frutos por exocruzamiento que por polinización natural. En cuanto al éxito reproductivo femenino, medido mediante la producción de frutos, se han registrado diversos trabajos en orquídeas epífitas en donde el fruit set

es bajo como *Tolumnia variegata* (Ackerman *et al.*, 1997), *Comparettia falcata* (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2000), *Liparis makinoana* (Soo *et al.*, 2001), *Brassavola cebolleta* (Rech *et al.*, 2010) y *Bulbophyllum humboldtii* y *Bulbophyllum malawiense* (Gamisch *et al.*, 2014).

IV.3 CULTIVO *in vitro* DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS

Se ha reportado recientemente al medio Phytamax como óptimo para la germinación de diversas especies de orquídeas como es el caso de *Encyclia adenocaula* (Ruíz *et al.*, 2008) *Cuitlauzina pendula* (Pérez-Decelis, 2013) y *Epidendrum ibaguense* (Adnan, 2014) registrándose altos valores de germinación.

Por otro lado, el medio más utilizado es el Murashige y Skoog (MS) (García *et al.*, 1993; do Valle *et al.*, 2005; Stewart y Kane, 2006; Ruíz *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010; Flores-Escobar *et al.*, 2011; Salazar-Mercado, 2012; Hasnain, 2014; Velázquez-Kú *et al.*, 2016) (Cuadro 1). Existen trabajos previos en cuanto a la germinación *in vitro* de *Rhynchosstele cervantesii*, en donde se utilizó el medio MS al 50% y 100%, sin embargo, los porcentajes de germinación reportados son relativamente bajos, del 22-26% (Cruz-Higareda, 2014) y por otro lado se utilizó el medio MS al 50% adicionado con pulpa de plátano y carbón activado (Luna-Rosales, 2017).

Cuadro 1. Medios de cultivo probados para el cultivo *in vitro* de distintas especies de orquídeas. Letras en negritas muestran los trabajos en donde se reporta la utilización del medio Phytamax y letras en morado muestran los trabajos previos de propagación *in vitro* en *Rhynchosstele cervantesii*.

AÑO	AUTOR	ESPECIE	MEDIO
1993	José A. García y Ana T. Valerín	<i>Cattleya skinneri</i>	MS y tres medios orgánicos a base de puré de plátano, zanahoria y papa
2003	S. K. Bhadra y M. M. Hossain	<i>Geodorum densiflorum</i> (terrestre)	Murashige y Skoog y Phytamax
2004	A. Damon; E. Aguilar-Guerrero; L. Rivera; V. Nikolaeva	<i>Cattleya aurantiaca</i> , <i>Encyclia chacaoensis</i> y <i>Brassavola nodosa</i>	Hutner, Knudson C (modificado, utilizando micronutrientes según MS), Dalla Rosa y

			Laneri KO7 y Knudson C modificado
2005	Luciana do Valle Rego-Oliveira y Ricardo Tadeu de Faria	<i>Catasetum fimbriatum</i> y <i>Cyrtopodium paranaensis</i> , especies brasileñas	MS, ½ MS, ¼ MS, Vacin y Wen y Knudson C y fertilizantes comerciales: N.P.K (10-5-5) 2 mL L-1 y N.P.K (10-30-20) 3 g L-1
2006	Scott L. Stewart, Michael E. Kane	<i>Habenaria macroceratitis</i>	Lucke modificado, MS, Lindemann, Vacin y Went, Malmgren modificado, Knudson C
2007	L. P. Díaz, J.J. Namur y S.A Bollati	<i>Cyrtopodium punctatum</i>	MS 50% y 25%
2007	K. Kalimuthu, R. Senthilkumar and S. Vijayakumar	<i>Oncidium sp.</i>	Medio MS (Murashige y Skoog, 1962)
2007	Melania Muñoz y Víctor M. Jiménez	<i>Phragmipedium humboldtii</i> , <i>P. longifolium</i> y <i>P. pearcei</i>	Knudson C y Murashige y Skoog (50% de la concentración total de macro y micronutrientes); complementados con tiamina, ácido nicotínico y piridoxina
2008	Dutra D., Timothy R. Johnson, Philip J. Kauth, Scott L. Stewart, Michael E. Kane, Larry Richardson	<i>Bletia purpurea</i>	Knudson C, Malmgren modificado (orquídeas terrestres), medio PhytoTechnology, ½MS, Vacin y Went, BM-1 (orquídeas terrestres)
2008	Flores-Escobar G., J. P. Legaria-Solano, I. Gil-Vásquez y M. T. Colinas-León	<i>Oncidium stramineum</i>	Para desarrollo de plántulas: MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona, con carbón activado o polivinil pirrolidona

2008	Melania Muñoz y Víctor M. Jiménez	<i>Phragmipedium humboldtii</i> , <i>P. longifolium</i> and <i>P. pearcei</i>	Knudson C y ½-MS, ambos suplementados con Tiamina, Ácido nicotínico y Piridoxina
2008	Ruíz B. C. et al.	<i>Encyclia adenocaula</i>	Murashige y Skoog, Vacin y Went, Dalla Rosa y Laneri, y Phytamax.
2009	Irene Ávila-Díaz, Ken Oyama, Carlos Gómez-Alonso, Rafael Salgado-Garciglia	<i>Laelia speciosa</i> , endémica de México	Medio Knudson C, Murashige y Skoog (MS), ½-MS (con la mitad de sales) y medio MS sin sacarosa (control)
2010	Loexis Rodríguez, María C. González y Roberto González	<i>Encyclia phoenicea</i> Endémica de Cuba	Knudson C (K), MS 50% (modificado c/ macroelementos de (K)) y MS 50%; en estado semisólido y líquido, todos los medios suplementado c/ agua de coco, y los medios semisólidos c/ carbón activado
2011	Sana Asghar, Touqeer Ahmad, Ishfaq Ahmad Hafiz & Mehwish Yaseen	<i>Dendrobium nobile</i>	Medio Phytotechnology (O753)
2011	Flores-Escobar G. et al.	<i>Brassia verrucosa</i>	Para desarrollo de plántulas: MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona, con carbón activado o ácido giberélico
2012	Seir Antonio Salazar-Mercado	<i>Cattleya mendelii</i>	MS 100%, c/ myo-inositol y carbón activado
2013	Cristina Ester Billard, Carlos Alberto	<i>Bletilla striata</i>	Agua destilada y ½ MS

	Dalzotto y Víctor Hugo Lallana		
2013	Seir Antonio Salazar Mercado, Anggy Zulay Amaya Nieto, Fernando Barrientos Rey	Híbrido de <i>Phalaenopsis</i>	MS suplementado con diferentes concentraciones de jugo de piña, agua de coco, ácido indolacético y ácido giberélico
2013	Vincenzo Bertolini, Anne Damon, Javier Valle Mora y Ángel Rojas Velázquez Natanael	<i>Rhynchoatele bictoniensis</i>	Knudson C adicionado con tres distintas concentraciones de agua de coco
2014	Cruz-Higareda	<i>Rhynchoatele cervantesii</i>	MS al 100% y 50%
2014	Adnan Hasnain	<i>Epidendrum ibaguense</i> Kunth. (Orchidaceae), terrestre	Murashige y Skoog, Phytamax, Mitra et al. y Knudson C
2015	Edison Armando Díaz-Álvarez, Carolina Torres-Galeano, Ángela Patricia Rojas-Cortés y Erick de la Barrera	<i>Cattleya mendelii</i> y <i>Cattleya quadricolor</i>	Murashige y Skoog y Knudson C en combinación con diferentes concentraciones de AG3 y ANA
2016	Aguilar-Morales, M. A., Laguna-Cerda, A., Vences-Contreras, C. y Lee-Espinosa, H. E.	<i>Encyclia adenocaula</i> (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae)	Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962), adicionado con glicina, mio-inositol tiamina HCl, piridoxina y ácido nicotínico; tres tratamientos: MS+ carbón activado, MS+ plátano 10% y MS+ agua de coco 10%
2016	Tania Lizeth Cazarez favela, José de Jesús Graciano Luna, Santiago Solís González, Beatriz Díaz Ramírez, Juan Abel Nájera Luna,	<i>Prosthechea citrina</i> (La Llave & Lex.)	MS (Murashige y Skoog, 1962)

	José Bernardo Montoya Ayón		
2016	Victoriano N. Velázquez Kú, José del C. Quijano-Avila*, Norma L. Rodríguez-Ávila	<i>Catasetum integerrimum</i>	Phytamax; MS con agua de coco; MS con pulpa de tomate; MS con pulpa de tomate/plátano; MS con pulpa plátano y MS con Carbón activado (5 g/L) / AIA (5 mg/L).
2017	Luna-Rosales	<i>Rhynchostele cervantesii</i>	MS al 50% con pulpa de plátano y carbón activado

Damon *et al.*, en 2004 reportan que la madurez de la cápsula es un factor importante en la germinación de las semillas de orquídeas; por lo que se han realizado trabajos al respecto con varias especies de orquídeas *Guarianthe aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis* y *Brassavola nodosa*, (Damon *et al.*, 2004), *Dendrobium tosaense* (Lo *et al.*, 2004), *Phragmipedium longifolium*, *P. pearcei* y *P. humboldtii* (Muñoz y Jiménez, 2008), *Encyclia adenocaula* (Ruíz *et al.*, 2008), *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009) y *Dendrobium aggregatum* (Vijayakumar *et al.*, 2012), en donde la madurez de la cápsula ha influido en los porcentajes de germinación.

Por otro lado, se han realizado trabajos sobre la aclimatación de plantas, en donde se ha registrado la sobrevivencia de estas, como en el caso de *Euchile mariae* (Suárez-Quijada *et al.*, 2007), *Phragmipedium longifolium* y *P. humboldtii* (Muñoz y Jiménez, 2008), *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009) y *Prosthechea citrina* (Cazarez-Favela *et al.*, 2016). Además, para *Laelia speciosa* se establecieron tratamientos de pre-aclimatación, obteniendo diferencias entre ellos en cuanto a sobrevivencia (Ortega *et al.*, 2011).

IV.4 SISTEMA DE ESTUDIO

IV.4.1 Características generales de *Rhynchostele cervantesii*. Hierba epífita, cespitosa, de 7-20 cm de alto. Seudobulbos ovoides a globosos, carinados; verde

oscuro con pocas o muchas manchas púrpura-negruzcas, de 23-70 x 15-40 mm; cubiertos por 1-3 vainas conduplicadas, fugaces, sin lámina foliar. Hoja apical, solitaria, obovado-elíptica u oblongo-elíptica, aguda, de 6.5-21 x 1.9-3 cm; la base subpeciolada y conduplicada. Inflorescencia de la base del pseudobulbo maduro, de 10-20 cm de largo, un racimo con 1-6 flores; con brácteas triangular-acuminadas, de 2-4 cm de largo. Ovario pedicelado de 2-5 cm de largo. Flores vistosas, blancas, blancas esfumadas de rosado, especialmente en la superficie dorsal de los sépalos, o rosadas (en la subsp. membranacea) con líneas café-rojizas, concéntricas, en la base de los tépalos, ocasionalmente sobre el labelo (excepcionalmente se presentan plantas sin manchas o totalmente cubiertas de puntos y rayas); el callo amarillo con rayas y puntos café rojizo; de 3.5-6 cm de diámetro. Sépalo dorsal obovado, agudo, de 18-35 x 10-18 mm. Sépalos laterales oblongo-lanceolados, agudos, oblicuos, de 19-35 x 8-14 mm. Pétalos oblongo-lanceolados a elípticos, obtusos, de 19-35 x 10-22 mm. Labelo unguiculado, la uña con un callo cimbitiforme masivo, muy carnoso, arqueado y bífido en el ápice, de 6-10 x 3-5 mm; lámina ligeramente o netamente cordiforme, obtusa, a veces apiculada, los márgenes enteros, ondulados o lacerados, de 13-30 x 15-30 mm. Columna de 10-17 mm de largo, pubescente, ligeramente arqueada, ligeramente ensanchada a la altura del estigma, donde se originan 2 alas orbiculares a oblongas, redondeadas, convexas, descendentes, de 2-3 mm de largo. Polinario con 2 polinios obovoides, estípites y viscidio. Cápsula elipsoide, de 4-7 x 1-1.5 cm (Halbinger, 1982). La floración de *R. cervantesii* es en los meses de enero a abril (Espejo-Serna *et al.*, 2002) (Fig. 1).

Ocasionalmente se encuentran plantas con flores esfumadas de rosado, pero el color no es uniforme. *R. cervantesii* se establece en sitios templados, húmedos o subhúmedos, a una altitud de entre 1350 y 3100 msnm (www.naturalista.mx/taxa/206214-Rhynchostele-cervantesii).

En México, se distribuye en los estados de Guerrero, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Veracruz (Figura 2). En Michoacán se distribuye en la región de la Sierra Madre del Sur, la región de la Sierra del Centro y el Eje Neovolcánico Transversal (Figura 3) (SNIB, 2016).

Rhynchostele cervantesii es una especie de orquídea que se encuentra principalmente en los bosques mesófilos de montaña, que a pesar de representar apenas el 1% del territorio nacional, en este viven una gran cantidad de especies tanto animales como vegetales; además de predominar en estos sitios, los climas templados con una humedad elevada durante todo el año, el cual es óptimo para el desarrollo de esta especie. En lo que se refiere a las especies de flora, es característico que estos bosques presenten una vegetación extremadamente densa, entre la cual predominan los géneros *Quercus*, *Liquidambar* y *Fagus* (Rzedowski, 1978; Palacios y Rzedowski, 1993). En el predio de Tenderio, Domínguez-Gil en 2015 reporta que *R. cervantesii* se encuentra principalmente sobre *Ternstroemia lineata* (limoncillo) y aunque en un menor porcentaje, en *Quercus rugosa* (encino negro), además se registró un mucho menor porcentaje de plantas sobre *Styrax argenteus* (aguacatillo).

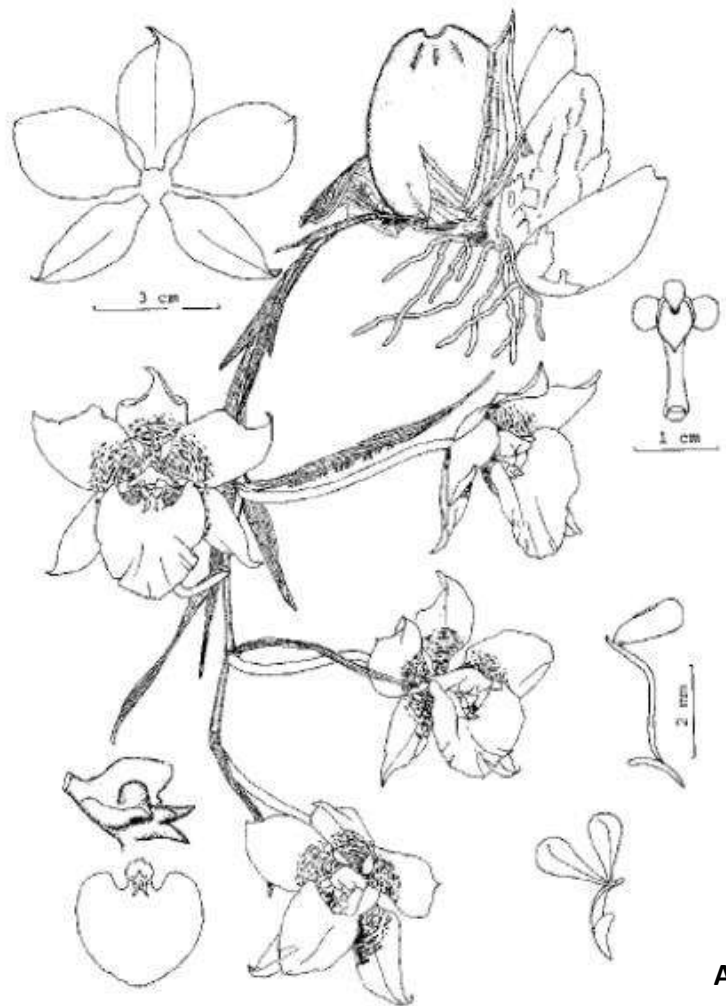




Figura 1. *Rhynchostele cervantesii*. A) Esquema de la flor, disección floral y polinario, planta en floración, (Tomado de Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007). B) Planta en floración. C) Flor de color rosado.

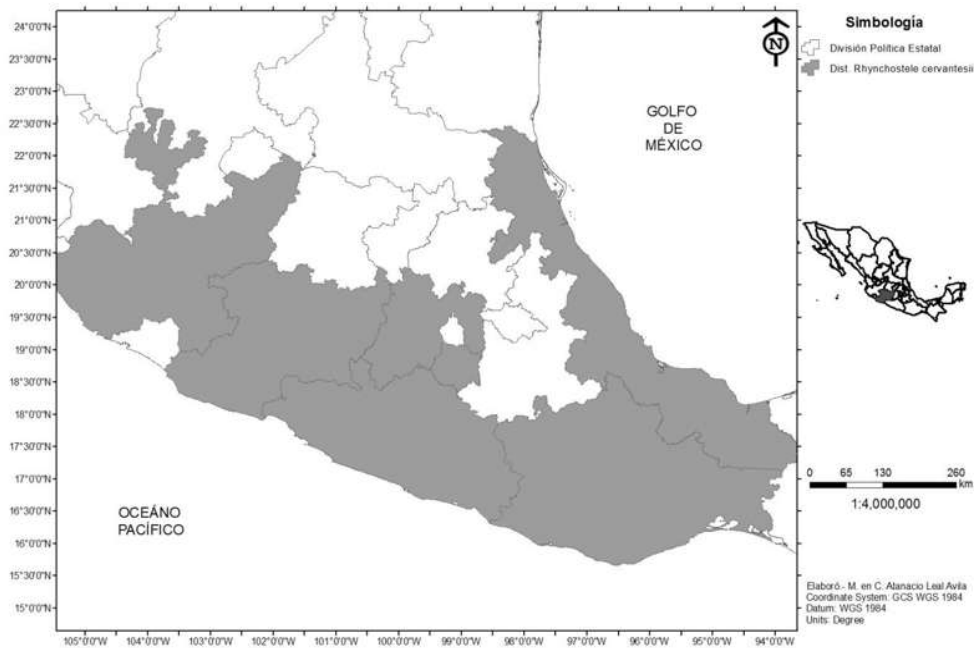


Figura 2. Distribución de *Rhynchostele cervantesii* en México. (Leal-Ávila, 2017, tomado de SNIB,2016).

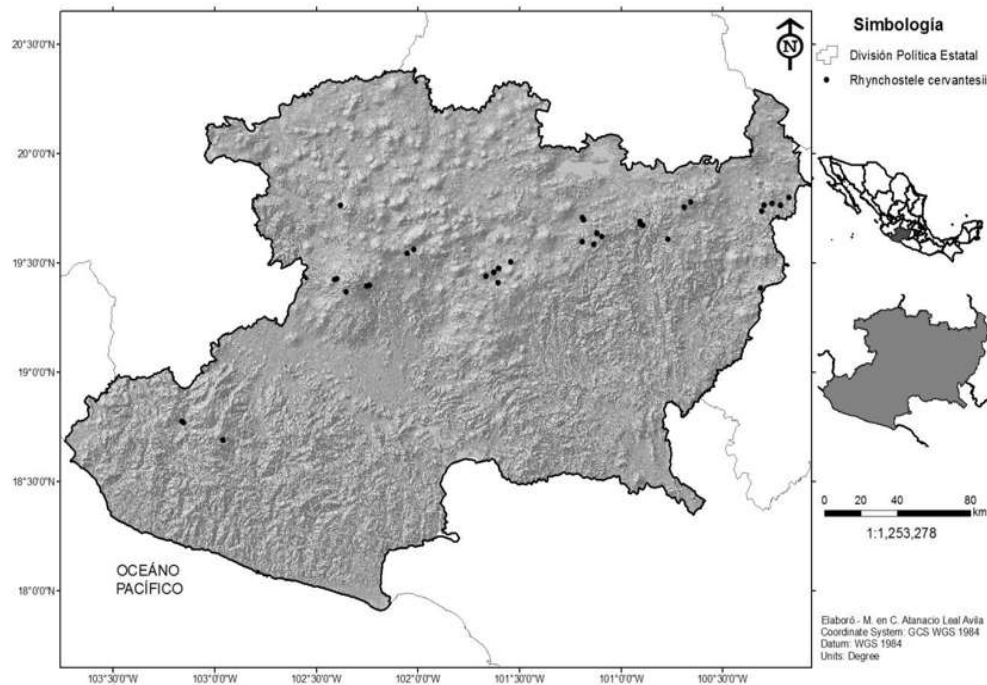


Figura 3. Distribución de *Rhynchostele cervantesii* en Michoacán. (Leal-Ávila, 2017, tomado de SNIB,2016).

IV.4.2 Sitio de estudio. El municipio de Tingambato se localiza al Norte del Estado, en las coordenadas extremas 19°30' de latitud norte y 101°51' de longitud oeste, a una altura de 1,980 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Nahuatzen, al este con Erongarícuaro y Pátzcuaro, al sur con Santa Clara y Ziracuaretiro y al oeste con Uruapan. Su distancia a la capital del Estado es de 95 km, tiene una superficie de 188.77 Km² y representa el 0.32 % del total del Estado (Fig. 4).

Dado que para el sitio de estudio en particular del Predio de Tenderio, no se encontraron datos precisos para su descripción, esta se hace con base a todo el Municipio de Tingambato, Michoacán, y en aquellos casos que se conoce la información precisa, se hace mención de esta.

El Área de Conservación Voluntaria de la Biodiversidad de los Recursos Naturales se localiza en las tierras de la comunidad indígena de Santiago Tingambato, y la zona de muestreo en el Predio de Tenderio abarca 150 hectáreas aproximadamente (Figura 4).



Figura 4. Localización geográfica del predio de muestreo y la comunidad de Santiago Tingambato (Polígono tomado de Domínguez, 2015).

De acuerdo con el Prontuario de Información Municipal de Tingambato (PIM, 20099), el municipio está ubicado en la Provincia Fisiográfica del Eje Neovolcánico, a su vez, pertenece a la Subprovincia Neovolcánica Tarasca y al Sistema de Topoformas Sierra volcánica. Su relieve está constituido por el sistema volcánico transversal. Su hidrología está constituida por los arroyos, El Tecojote, Capixio, Barranca del Molino, Barranca del Comay y Agua Escondida. Además, cuenta con numerosos manantiales de agua fría (INAFED, 2010). En la zona de muestreo predomina el clima C(w2), que es un clima templado, subhúmedo, con una temperatura media anual entre 12°C y 18°C, temperatura del mes más frío entre -3°C y 18°C y temperatura del mes más cálido bajo 22°C. Lluvias de verano con índice P/T mayor de 55 y porcentaje de lluvia invernal del 5 al 10.2% del total anual (García, 1964). No se han realizado estudios en el municipio para determinar que especies de fauna silvestre se localizan, sin embargo, de acuerdo con el INAFED (2010) la fauna la conforman principalmente el gato montés, zorrillo, coyote, ardilla, paloma y pato.

La superficie forestal maderable es ocupada por pino y encino la no maderable es ocupada por matorrales espinosos y chaparrales. La vegetación predominante es Bosque de Pino, Bosque de Encino y Bosque Mesófilo de Montaña, en particular la

zona de muestreo se localiza en el Bosque Mesófilo de Montaña (INEGI, 2004) (Figura 5).

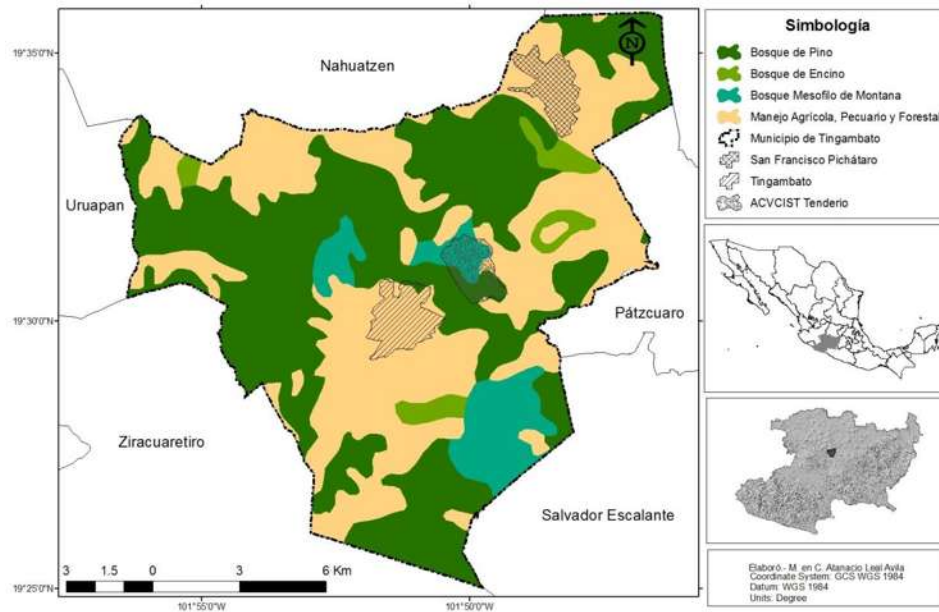


Figura 5. Uso de suelo y vegetación del municipio de Tingambato Michoacán, México (Leal-Ávila, 2016; tomado de...).

V. HIPÓTESIS

En base a los antecedentes, se plantearon las siguientes hipótesis:

- I. *R. cervantesii* tendrá un sistema de apareamiento mixto, como muchas otras especies de la familia Orchidaceae.
- II. *R. cervantesii* presentará el patrón general de orquídeas con una limitación de la polinización y un bajo éxito reproductivo femenino.
- III. El medio de cultivo Phytamax al 50% será eficiente para la germinación de *R. cervantesii* ya que, recientemente ha sido reportado como medio eficiente para la germinación de diversas especies de orquídeas epifitas.
- IV. La madurez de la cápsula influirá en la germinación de las semillas de *R. cervantesii*, como ha sido reportado para otras especies.
- V. El establecimiento de distintos períodos de pre-aclimatación influirá en la sobrevivencia y desarrollo de las plántulas de *R. cervantesii* desarrolladas *in vitro* como se ha reportado para *Laelia speciosa*.

VI. OBJETIVOS

VI.1. Generales

VI.1.1 Generar información sobre el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *Rhyncho스테le cervantesii*, así como establecer un sistema de propagación *in vitro* eficiente para colaborar a su conservación.

VI.1.2 Proponer una estrategia de conservación para *R. cervantesii*, con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo.

VI.2. Particulares

VI.2.1 Evaluar el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *R. cervantesii*, mediante la producción de frutos y la viabilidad de semillas en cuanto a presencia de embrión.

VI.2.2 Probar diferentes medios de cultivo para determinar el óptimo para la germinación de *R. cervantesii*, según el porcentaje de germinación que se presente en cada medio.

VI.2.3 Determinar el efecto de la madurez de la cápsula en la germinación de las semillas de *R. cervantesii*, mediante los porcentajes de germinación que se registren en el medio que resulte óptimo para esta especie.

VI.2.4 Evaluar el efecto de diferentes periodos de pre-aclimatación en la sobrevivencia y el crecimiento de plántulas de *R. cervantesii* bajo condiciones de invernadero.

CAPÍTULO 1.

SISTEMA DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCTIVO DE *Rhyncho스테le cervantesii* (ORCHIDACEAE) EN EL MUNICIPIO DE SANTIAGO TINGAMBATO, MICHOACÁN

1. RESUMEN

Las orquídeas presentan limitación por la polinización, y en general, presentan valores bajos en la producción de frutos. El objetivo general del presente capítulo fue generar información sobre el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *Rhyncho스테le cervantesii*, orquídea epífita, amenazada (NOM-059-ECOL-2010), endémica de México, para colaborar a su conservación. Se llevaron a cabo tratamientos de polinización manual y abierta, durante 2014 y 2015. Para cada tratamiento en cada período, se seleccionaron entre 20 y 30 inflorescencias al azar, a las cuales se les colocó una bolsa de tul antes de abrir los botones, una vez abiertos, se llevaron a cabo los tratamientos de autopolinización espontánea, emasculación, endocruzamiento, exocruzamiento y polinización abierta. Se contaron y colectaron los frutos desarrollados para determinar la viabilidad de las semillas, realizándose observaciones al microscopio para evaluar presencia de embrión. Los porcentajes de producción de frutos fueron: autopolinización espontánea 0% y 0%, emasculación 0% y 0%, endocruzamiento: 18% y 14%, exocruzamiento: 54.5% y 30.8% y polinización abierta 13.6% y 15.4% en 2014 y 2015, respectivamente. Se registraron diferencias significativas en los tratamientos del 2014 y 2015, con mayor producción de frutos en exocruzamiento que en endocruzamiento y polinización abierta en ambos casos. Se registran diferencias significativas en la viabilidad de las semillas, con mayores valores para polinización abierta, seguido de exocruzamiento y finalmente en endocruzamiento. Puede concluirse que *R. cervantesii* es una especie que requiere de polinizadores para su reproducción sexual y es una especie con un sistema de apareamiento mixto con una alta tendencia a la exogamia, registrándose altos valores de éxito reproductivo femenino.

ABSTRACT

Orchids are limited by pollination, and in general, have low values in fruit production. The general objective of this chapter was to generate information on the mating system and reproductive success of *Rhynchostele cervantesii*, orphan epiphyte, threatened (NOM-059-ECOL-2010), endemic to Mexico, to assist in its conservation. Manual and open pollination treatments were carried out during 2014 and 2015. For each treatment in each period, 20 to 30 random inflorescences were selected, to which a tulle bag was placed before opening the buttons, once opened, the treatments of spontaneous self-pollination, emasculation, endocruzamiento, cross-pollination and open pollination were carried out. The developed fruits were counted and collected to determine the viability of the seeds, making observations under the microscope to evaluate the presence of the embryo. Fruit production percentages were: spontaneous self-pollination 0% and 0%, emasculation 0% and 0%, endocruzamiento: 18% and 14%, exocruzamiento: 54.5% and 30.8% and open pollination 13.6% and 15.4% in 2014 and 2015, respectively. Significant differences were registered in the treatments of 2014 and 2015, with higher fruit production in exocruzamiento than in endocruzamiento and open pollination in both cases. There are significant differences in the viability of the seeds, with higher values for open pollination, followed by exocruzamiento and finally in endocruzamiento. It can be concluded that *R. cervantesii* is a species that requires pollinators for its sexual reproduction and is a species with a mixed mating system with a high tendency to exogamy, registering high values of female reproductive success.

2. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae se considera vulnerable por la destrucción y/o transformación de los hábitats de sus representantes, así como por la extracción de grandes cantidades de individuos de sus poblaciones. De hecho, esta familia es uno de los mejores ejemplos en los cuales muchas especies están amenazadas de extinción como resultado de las actividades humanas (Salazar-Chávez, 1996; Ávila-Díaz y Oyama, 2007; Hágsater *et al.*, 2005). Tal es el caso del género *Rhynchostele* que habita principalmente en el Bosque Mesófilo de Montaña, y en los últimos años se ha registrado la desaparición de estos ecosistemas, colocando a este grupo de plantas en una situación de vulnerabilidad muy alta y un riesgo eminente de desaparecer (Téllez-Velasco, 2011). Dentro de las acciones que se consideran importantes para proponer estrategias adecuadas de manejo es la generación de conocimiento básico, como es el referente a la biología reproductiva de las especies, que pueda ser útil para proponer estrategias adecuadas de manejo.

Carranza en 1994, define al sistema de apareamiento como el conjunto de estrategias e interacciones que ocurre entre los individuos de una población, en donde tiene lugar la unión de los gametos. En plantas, el sistema de apareamiento puede definirse como aquellas estrategias que utiliza la planta para la producción de semillas, mediante interacciones con vectores (aire, agua o animales). Dichos sistemas resultan de la combinación de varios factores, como son compatibilidad genética, barreras morfológicas florales o variación en la temporalidad de la maduración de los órganos reproductores o gametos (Bawa y Beach, 1981). Se considera que los sistemas de apareamiento en la familia Orchidaceae pueden ser influyentes en los niveles de diversidad y estructura genética de la población (Soo Oh *et al.*, 2001); lo que es determinante para considerarse en la conservación. El sistema de apareamiento en diferentes especies de esta familia puede ser variable tanto en espacio como en tiempo (Torres, 2006; Ávila-Díaz, 2007).

Con frecuencia, la gran diversidad de la familia Orchidaceae se atribuye a la radicación adaptativa que presenta esta familia por selección para los polinizadores específicos para su cruzamiento (Tremblay *et al.*, 2005), lo que conduce a sorprendentes

adaptaciones de estas plantas y contribuye a la atracción de los polinizadores (Borba *et al.*, 2011). La mayoría de las especies de orquídeas requieren de un agente polinizador externo (Dressler, 1981), también presentan limitación de la polinización, y existe una gran variedad de sistemas de polinización en orquídeas, estando ausentes solo la polinización abiótica y por mamíferos. Algunos factores que influyen en dicha limitación son: la abundancia y distribución de los polinizadores, la calidad y cantidad de polen (Trembaly *et al.*, 2005).

En lo que se refiere a especies epífitas, en 2007 Ávila-Díaz, encontró que *Laelia speciosa* es una especie que posee un sistema de apareamiento mixto, preferentemente exógama con algunos eventos de endogamia, y presenta limitación de la polinización para la producción de frutos, al igual que *Prosthechea aff. karwinskii* (Camacho-Domínguez, 2010), mientras que *Cuitlauzina pendula* es una especie exógama que requiere de polinizadores para la reproducción sexual y presenta limitación de la polinización (Pérez-Decelis, 2013). En cuanto al sistema de apareamiento de las orquídeas terrestres, en 1997, Sun realizó estudios sobre el sistema de apareamiento de *Eulophia graminea*, *Spiranthes hongkongensis* y *Zeuxine strateumatica*, a partir de observaciones en campo, actividad de los polinizadores y polinizaciones experimentales, como exocruzamientos, autopolinizaciones y emasculación, resultando que *E. sinensis* es autocompatible pero depende de los polinizadores, *S. hongkongensis* es autocompatible y *Z. strateumatica* es apomictica. Wong y Sun en 1999, trabajaron con la orquídea terrestre *Goodyera procera* y obtuvieron como resultado de experimentos de polinización, que la especie es auto-compatible pero depende de polinizadores para la producción de frutos.

Tremblay *et al.*, en 2005 definen el fruit set como la relación entre el número total de frutos y el número total de flores en la muestra, mientras que en ocasiones se utiliza para medir el éxito reproductivo masculino el número de remociones de polinias, y mencionan que la producción de frutos es más del doble en especies templadas que en especies tropicales, y observaron que la recompensa y la latitud tienen un efecto significativo en el fruit set; sin embargo, la mayoría de las especies de orquídeas presentan una producción baja de frutos. Existen diversos trabajos en los que se ha

tomado la producción de frutos como indicador del éxito reproductivo femenino, tal es el caso de Vallius en el 2000, quien evaluó los efectos de la posición de las flores en la inflorescencia sobre la producción de frutos mediante tratamientos manuales en la orquídea terrestre *Dactylorhiza maculata*; y la orquídea terrestre *Listera cordata*, en cuyo caso se evaluó el efecto de la densidad poblacional sobre la producción de frutos (Meléndez-Ackerman y Ackerman, 2001).

En cuanto a las orquídeas epífitas, también existen trabajos que evalúan el éxito reproductivo femenino mediante la producción de frutos (fruit set), un ejemplo de ello es el trabajo en el que se avalúo el éxito reproductivo femenino de *Tolumnia variegata* en función de la densidad poblacional y como esta afecta la visita de los polinizadores (Ackerman *et al.*, 1997); para *Comparettia falcata* se realizaron tratamientos manuales de polinización y se registró la producción de frutos, cantidad y viabilidad de semillas bajo limitación de polinizadores o recursos (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2000).

Se considera de gran importancia la realización de este estudio, que aporte datos sobre el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *R. cervantesii*, para poder contribuir a su conservación y uso sustentable, ya que, al conocer mejor los aspectos de su biología reproductiva, se facilita el establecimiento e implementación de estrategias adecuadas para poder lograr una reproducción y producción de frutos más exitosa de esta especie.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sistema de apareamiento

3.1.1 Tratamientos de polinización. Se realizaron visitas a campo entre diciembre y marzo (época de floración de la especie) de 2014 y 2015, para realizar los tratamientos de polinización. Cuando los botones se encontraron aún cerrados se seleccionaron 20 inflorescencias al azar y se cubrieron con bolsas de tul fino. Una vez abiertas las flores se realizaron los siguientes tratamientos: **a)** Autopolinización espontánea (T1): no se llevó a cabo ningún tipo de polinización manual solo se etiquetaron las flores, esto para saber si *R. cervantesii* recurre a algún mecanismo de autopolinización. **b)** Emasculación (T2): se retiraron las polinias de la flor, para determinar si *R. cervantesii* es una especie apomictica, es decir, si es capaz de producir semillas sin que ocurra la fecundación. **c)** Endocruzamiento (T3): se extrajeron las polinias de la flor y se colocaron dentro de su propio estigma. **d)** Exocruzamiento (T4): las flores se polinizaron con polinias que se tomaron de flores provenientes de otro individuo, que se encontraba al menos a 30 metros de distancia, con el fin de reducir al mínimo las posibilidades de que las plantas estuvieran emparentadas. Una vez efectuados los tratamientos, se cubrieron nuevamente con las bolsas de tul. **e)** Polinización abierta (T5): se seleccionaron otras inflorescencias que se etiquetaron y se dejaron descubiertas para poder evaluar la polinización natural.

En 2014 se realizaron 15 tratamientos de autopolinización espontánea, 2 de emasculación, 39 de endocruzamiento, 33 de exocruzamiento y 59 de polinización abierta. Mientras que para el período del 28 de enero al 22 de marzo de 2015 se realizaron 26 tratamientos de autopolinización espontánea, 24 de emasculación, 22 de endocruzamiento, 26 de exocruzamiento y 26 de polinización abierta.

3.1.2 Viabilidad de semillas. Para cada uno de los tratamientos, se determinó la viabilidad de las semillas realizando observaciones con un microscopio óptico marca ZEISS modelo Primo Star, a un aumento de 40x, para determinar la presencia o ausencia de embrión y sus características, estableciéndose las siguientes categorías: **1)** Testa vacía, **2)** Semilla inviable, cuando el embrión se observó deforme, **3)** Semilla

viable, cuando el embrión se observó de forma alargada y **4)** Protorcormo 1, cuando el embrión se observó globular dentro de la testa. Cabe mencionar que se hicieron algunas siembras *in vitro*, corroborando que las categorías 1 y 2 fueron semillas inviábiles y las categorías 3 y 4 fueron viables.

Se observaron al microscopio 100 semillas por cápsula, de 15 cápsulas: 8 cápsulas de exocruzamiento, 4 de endocruzamiento y 3 de polinización abierta (Figura 1 y 2).

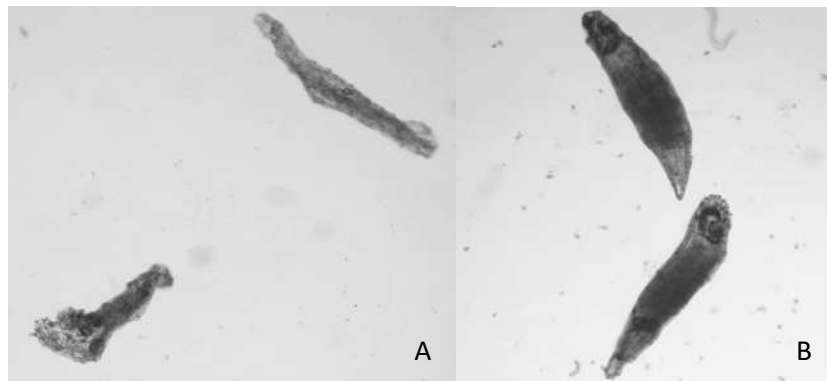


Figura 1. Semillas de *Rhynchosstele cervantesii*; A- categorías 1 y 2) semillas inviábiles; B- categorías 3 y 4) semillas viables.

Para determinar las diferencias entre los tratamientos en cuanto a la producción de frutos se realizó una prueba de Chi cuadrada. El factor de variación fueron los tratamientos de polinización y la variable de respuesta fue la producción de frutos. La variable de respuesta tuvo una distribución binomial y se empleó una función asociada de tipo Logit. Mientras que, para determinar las diferencias entre las categorías de viabilidad de las semillas se realizó una ANOVA de una vía. El factor de variación fueron los tratamientos de polinización y la variable de respuesta fueron las categorías de viabilidad. Además, se realizó una prueba a posteriori de Tukey HSD, para determinar las diferencias entre pares de comparaciones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino. Los porcentajes de producción de frutos en los diferentes tratamientos fueron: autopolinización espontánea 0% (N=15) y 0% (N=26), emasculación 0% (N=2) y 0% (N=24), endocruzamiento: 18% (N=39) y 14% (N=22), exocruzamiento: 54.5% (N=33) y 30.8% (N=26), y polinización abierta 13.6% (N=59) y 15.4% (N=26), en 2014 y 2015, respectivamente (Figura 2).



Figura 2. Producción de frutos de *R. cervantesii* en 2014 y 2015 con diferentes tratamientos de polinización, en el Predio de Tenderio, de la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato, Michoacán, México. Las letras sobre las barras representan las diferencias entre los pares de comparaciones y la línea representan el error estándar.

Mediante una prueba de *Chi* cuadrada se registraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2=37.70$, $gl=4$ $p=0.0001$) en ambos años, además se registraron también diferencias significativas tanto en los tratamientos del 2014 ($X^2= 28.27$, $gl=4$ $p=0.0001$) como en los tratamientos del y 2015 ($X^2=19.52$, $gl=4$ $p=0.0006$), con una

mayor producción de frutos en exocruzamiento que en endocruzamiento y polinización abierta.

La mayoría de las orquídeas requieren de agentes polinizadores externos para su reproducción sexual (Dressler, 1981; Tremblay *et al.*, 2005), tal es el caso de *Rhynchostele cervantesii* ya que en el presente trabajo no se observó la producción de frutos en el tratamiento de autopolinización espontánea, resultados similares se observaron en *Liparis makinoana* (Soo *et al.*, 2001), *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz, 2007) *Gomesa bifolia* (Torretta *et al.*, 2011), *Prosthechea vespa* y *Cattleya luteola* (Quiroga *et al.*, 2010), *Brassavola cebolleta* la cual no registró producción de frutos en los tratamientos de autopolinización espontánea y agamospermia (Rech *et al.*, 2010), *Prosthechea aff. karwinskii* (Camacho-Domínguez, 2010), *Cuitlauzina pendula* (Pérez-Decelis, 2013) y representantes de los principales clados de Pleurothallidinae (22 especies de 8 géneros) (Borba *et al.*, 2011). Por otro lado, existen trabajos que difieren de nuestros resultados, como *Spiranthes hongkongensis* y *Eulophia gramínea* (Sun, 1997) y *Pleurothallis ruscifolia* que no dependen de polinizadores para su reproducción sexual (CaraDonna y Ackerman, 2012).

En *R. cervantesii* para los años 2014 y 2015 se observó una mayor producción de frutos en los tratamientos de exocruzamiento, mientras que se registró un menor porcentaje en la producción de frutos por polinización abierta y endocruzamiento, lo que sugiere que esta especie tiende a la exogamia. Nuestros resultados son similares a los obtenidos para *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz, 2007), *Cattleya luteola* y *Prosthechea vespa* (Quiroga *et al.*, 2010), representantes de Pleurothallidinae (21 de las 22 especies estudiadas) (Borba *et al.*, 2011), registrando altos valores de producción de frutos mediante tratamientos de exocruza, los cuales resultan significativamente mayores a los producidos por endocruza. De manera contratante para *Schomburgkia undulata* (Quiroga *et al.*, 2010), se reporta la producción de frutos por autopolinización espontánea, así como por endocruzamiento, mientras que en los tratamientos de polinización natural y exocruzamiento no se registra la producción de frutos. En especies terrestres como *Goodyera procera*, se reporta un alto porcentaje de producción de frutos en tratamientos de endocruzamiento, geitonogamia y

exocruzamiento (92%, 94% y 95% respectivamente) (Wong & Sun, 1999) así como en *Dactylorhiza maculata* (Vallius, 2000).

Los porcentajes de producción de frutos en el tratamiento de polinización abierta de *R. cervantesii* para el 2014 fue del 13.6% mientras que para el 2015 fue del 15.4%, lo que sugiere que esta especie presenta niveles relativamente altos de fruit set. Tremblay *et al.*, 2005, mencionan que la mayoría de las especies de orquídeas presentan un bajo fruit set, sin embargo las especies distribuidas en zonas templadas presentan valores mucho más altos de producción de frutos que las especies tropicales. Existen trabajos previos que muestran resultados similares al presente estudio, como en *Liparis kumokiri*, especie japonesa, que presentó un fruit set de 10.2%-12.2% en los años 1999 y 2000 (Soo *et al.*, 2001); *Brassavola cebolleta* presenta un fruit set de 6.1% (Rech *et al.*, 2010). Sin embargo, Soo *et al.*, en 2001 también encontraron niveles bajos de entre 0.1% y 0.2% de fruit set en una especie del mismo género, *Liparis makinoana* la cual se distribuye en Korea; así como *Bulbophyllum humboldtii* y *Bulbophyllum malawiense* que registran valores de 8% y 2% de fruit set, respectivamente (Gamisch *et al.*, 2014) y *Gomesa bifolia* para la cual no se registra producción de frutos en plantas a las que no se les realizó ningún tratamiento manual (Torretta *et al.*, 2011).

Con respecto a la viabilidad de las semillas de los frutos producto de los tratamientos de polinización manual que se determina mediante la presencia de embrión, se observó que el único tratamiento que registró el 100% de viabilidad en todos los frutos fue el tratamiento de Polinización abierta. En el tratamiento de exocruzamiento se registró el 99% de viabilidad. Mientras que el tratamiento de endocruzamiento es el que registra los porcentajes más bajos de viabilidad, con un 88%.

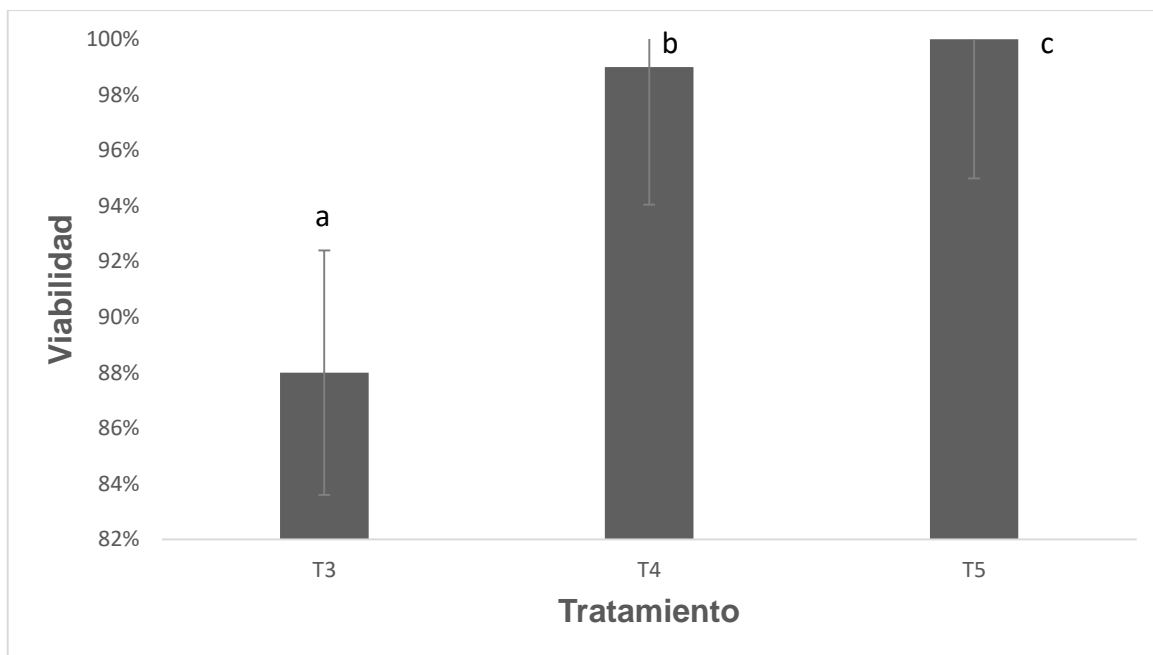


Figura 3. Viabilidad evaluada con la presencia de embrión, en los tratamientos de endocruzamiento, exocruzamiento y polinización abierta en *Rhynchostele cervantesii*. La línea sobre las barras representa el error estándar y las letras representan las diferencias entre pares de comparaciones.

Se presentaron diferencias significativas ($F=23.94$, $g=14$ $p=0.0001$) entre los tratamientos y se determinó que existen diferencias entre los tres tratamientos, resultando con mayor viabilidad las semillas de polinización abierta, seguido de las semillas de exocruzamiento y finalmente las semillas de endocruzamiento.

Rhynchostele cervantesii presenta mayor viabilidad en las semillas producto de los frutos de los tratamientos de polinización abierta seguido de exocruzamiento mientras que para el tratamiento de endocruzamiento se registra una menor viabilidad. Resultados similares se reportan para las especies más representativas de Pleurothallidinae (22 especies, de 8 géneros), en donde en la mayoría de las especies se registró una viabilidad mayor en tratamientos de exocruzamiento que en los tratamientos de endocruzamiento (Borba *et al.*, 2011). En contraste para *Brassavola cebolleta* la viabilidad de las semillas se registró con porcentajes menores en cápsulas procedentes de tratamientos de polinización natural que en las semillas de exocruzamiento (Rech *et al.*, 2010); por otro lado, para *Cuitlauzina pendula* se registran los mayores porcentajes de viabilidad en las semillas del tratamiento de

polinización abierta, seguido del tratamiento de exocruzamiento, mientras que para el tratamiento de endocruzamiento no se registró viabilidad mediante la presencia de embrión (Pérez-Decelis,2013). Para la orquídea terrestre *Caladenia tentaculata* no se registran diferencias entre la viabilidad de semillas producto de los tratamientos de exocruzamiento y endocruzamiento (Peakall y Beattie, 1996).

5. CONCLUSIONES

Rhynchostele cervantesii es una especie que requiere de polinizadores para su reproducción sexual.

La orquídea en estudio presenta una limitación de la polinización ya que se registran diferencias significativas entre la producción de frutos por el tratamiento manual de exocruza y el tratamiento de polinización abierta.

R. cervantesii es una especie con un sistema de apareamiento mixto con alta tendencia a la exogamia en los años 2014 y 2015, en la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato.

Esta especie presenta altos valores de éxito reproductivo femenino, comparado con la mayoría de las especies de orquídeas reportadas.

6. LITERATURA CITADA

Ackerman, J., E. Melendez-Ackerman y J. Salguero-Faria. 1997. **Variation in pollinator abundance and selection on fragrance phenotypes in an epiphytic orchid.** American Journal of Botany 84(10): 1383-1390.

Aguilar-Morales M. A., A. Laguna-Cerda, C. Vences-Contreras y H. E. Lee-Espinosa. 2016. **Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación *ex situ*.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(7): 1741-1747.

Ávila-Díaz, I. y K. Oyama. 2007. **Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae).** American Journal of Botany 94(2): 184-193.

Ávila-Díaz, I., K. Oyama, C. Gómez-Alonso y R. Salgado-Garciglia. 2009. ***In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*.** Plant Cell Tiss. Organ Cult 99:335-343.

Bawa, K.S. y J.H. Beach. 1981. **Evolution of sexual systems in flowering plants.** Ann. Missouri Bot. Gard. 68: 254-274.

Borba E. L., A. R. Barbosa, M. Cabral de Melo, S. L. Gontijo y H. Ornellas de Oliveira. 2011. **Mating systems in the Pleurothallidinae (ORCHIDACEAE): evolutionary and systematic implications.** LANKESTERIANA 11(3): 207-221.

Camacho-Domínguez E. y Ávila- Díaz I. 2010. **Mating system and female reproductive success of the endemic, epiphytic *Prosthechea* aff. *karwinskii* (Orchidaceae).** LANKESTERIANA 11(3): 366.

CaraDonna P. J. y J. D Ackerman. 2012. **Reproductive assurance for a rewardless epiphytic orchid in Puerto Rico: *Pleurothallis ruscifolia* (Orchidaceae, Pleurothallidinae).** Caribbean Journal of Science 2-3 (46): 249-257.

Carranza, J. 1994. **Etología: Introducción a la Ciencia del Comportamiento.** Universidad de Extremadura. Cáceres. 363-406 pp.

Díaz-Álvarez E. A., C. Torres-Galeano, A. P. Rojas-Cortés y R. de la Barrera. 2015. ***In vitro* germination and development of two endangered endemic Colombian orchids *Cattleya mendelii* and *Cattleya quadricolor***. *Gayana Bot.* 72(2): 213-220.

Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Gamisch A., G. A. Fischer y H. P. Comes. 2014. **Recurrent polymorphic mating type variation in Madagascan *Bulbophyllum* species (Orchidaceae) exemplifies a high incidence of auto-pollination in tropical orchids**. *Botanical Journal of the Linnean Society* 175, 242-258.

Hágsater, E., M. A. Soto-Arenas, G. A. Salazar-Chávez, J. Jiménez-Machorro, M. A. López-Rosas Y R. L. Dressler. 2005. **Las orquídeas de México**. Instituto Chinoín, México.

Meléndez-Ackerman, E. J., J. D. Ackerman y J. A. Rodríguez-Robles. 2000. **Reproduction in an orchid can be resource-limited over its lifetime**. *BIOTROPICA* 2 (32):282-290.

Meléndez-Ackerman E. J. y J. D. Ackerman. 2001. **Density-dependent variation in reproductive success in a terrestrial orchid**. *Plant Systematics and Evolution* 1(227): 27-36.

Peakall R. y A. J. Beattie. 1996. **Ecological and genetic consequences of pollination by sexual deception in the orchid *Caladenia tentaculata***. *Evolution* 50(6): 2207-2220.

Pérez-Decelis V. A., C. A. Gómez e I. Ávila-Díaz. 2013. **Distribution patterns of *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex (Orchidaceae) over its phorophytes at the ‘Barranca de Cupatitzio’ National Park, in Uruapan, Michoacán, México**. *LANKESTERIANA* 13(1-2).

Pierik R L M (1990) **Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores**. Edic. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.

Quiroga D., M. Martínez y D. M Larrea-Alcázar. 2010. **Pollination systems of five species of orchids growing under greenhouse conditions**. *Ecología en Bolivia* 45(2): 131-137.

Rech A. R., Y. B. C. Jardim-Rosa y F. C. L. Manente-Balestieri. 2010. **Aspects of the reproductive biology of *Brassavola cebolleta* Rchb.f. (Orchidaceae)**. *Acta Scientiarum Biological Sciences Maringá* 4(32) 335-341.

Salazar-Chávez, G. A. 1996. **Conservation. Orchids: Status Surrery and Conservation Action Plan (6-10)**. Cambridge, UK: Inter Natural Union for the Conservation of Nature/ Species Survival Commission.

Soo Oh G., M. Y. Chung, S. G. Chung y M. G. Chung. 2001. **Contrasting breeding systems: *Liparis Kumokiri* and *L. makinoana* (Orchidaceae)**. *Annals of Botany fennici* 38: 281-284.

Stancato G., E. Pereira y P.Mazzafera. 1998. **Development and Germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae)**. *Lindleyana* 13(2): 97-100.

Sun, M. 1997. **Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems**. *American Journal of Botany* 84(2): 224-232.

Téllez-Velazco M. A. A. 2011. **Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México**. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Texcoco, Estado de México. 171 pp.

Torres G. K. I. 2006. **Sistéma y éxito reproductivo de *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) en San Andrés Corú, Michoacán, México**. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 42 pp.

Torretta J. P., N. E. Gomiz, S. S. Aliscioni y M. E. Bello. 2011. **Biología reproductiva de *Gomesa bifolia* (ORCHIDACEAE, CYMBIDIEAE, ONCIDIINAEE)**. DARWINIANA 49(1): 16-24.

Tremblay R. L., J. D. Ackerman, J. K. Zimmerman y R. N. Calvo. 2005. **Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification**. Biological Journal of the Linnean Society 84: 1-54.

Vallius E. 2000. **Position-dependent reproductive success of flowers in *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae)**. Functional Ecology 14, 573-579.

Wong K. C. y M. SUN. 1999. **Reproductive Biology and Conservation Genetics of *Goodyera procera* (ORCHIDACEAE)**. *American Journal of Botany* 86(10): 1406-1413.

CAPÍTULO 2.

Sistema de propagación *in vitro* y aclimatación de la orquídea epífita amenazada *Rhynchostele cervantesii* (Orchidaceae).

1. RESUMEN

Las semillas de las orquídeas poseen muy pocas sustancias de reserva, por lo que, en la naturaleza se asocian con hongos micorrízicos para germinar. Por medio de la técnica de propagación *in vitro*, se les proporciona a las semillas los nutrientes y azúcares necesarios para germinar. *Rhynchostele cervantesii* es una orquídea epífita, amenazada (NOM-059-ECOL-2010), endémica de México, por lo que el objetivo del presente capítulo es establecer un sistema de propagación *in vitro* eficiente para colaborar a su conservación. Se probaron ocho diferentes medios de cultivo en la germinación: Murashige y Skoog (MS), Fertilizante comercial con agar-agar, Phytamax y Phytamax con plátano (al 50% y 100%), realizándose observaciones al microscopio cada 30 días para registrar la germinación, las categorías establecidas fueron: semilla, protocormo 1, y protocormo 2. También se probó el efecto de la madurez de la cápsula en la germinación, realizando la siembra de las semillas de dos cápsulas inmaduras (a los 7 meses de efectuada la polinización manual) y dos maduras (12 meses), realizando observaciones al microscopio cada 30 días. Se probaron diferentes tratamientos de pre-aclimatación: 0,5,10,15,20,25 y 30 días, para evaluar el porcentaje de sobrevivencia y se midieron las partes aéreas y raíces de cada plántula, cada 45 días. La germinación fue significativamente mayor en los medios Phytamax con plátano (al 50% y 100% de sus sales basales) registrándose 81% de germinación y en el medio Phytamax (al 50% de sus sales basales). En cuanto a la madurez de la cápsula se observó que las cápsulas maduras alcanzaron porcentajes de germinación de 69% y 71% a los 90 días de siembra y las cápsulas inmaduras no registraron germinación. El mejor tratamiento de pre-aclimatación fue, a los 5 días en cuanto a sobrevivencia (81.25%), número de hojas totales (6.8 hojas) y longitud de la planta (17.7 mm).

ABSTRACT

The seeds of orchids have very few reserve substances, so in nature they are associated with mycorrhizal fungi to germinate. By means of the *in vitro* propagation technique, the seeds are given the nutrients and sugars necessary to germinate. *Rhyncho스테le cervantesii* is an endangered epiphyte orchid (NOM-059-ECOL-2010), endemic to Mexico, so the objective of this chapter is to establish an efficient *in vitro* propagation system to assist in its conservation. Eight different culture media were tested on germination: Murashige and Skoog (MS), Commercial fertilizer with agar-agar, Phytamax and Phytamax with banana (50% and 100%), with observations under the microscope every 30 days to record germination, the established categories were: seed, protocormo 1, and protocormo 2. The effect of the maturity of the capsule on germination was also tested, by sowing seeds of two immature capsules (7 months after manual pollination) and two mature (12 months), making observations under a microscope every 30 day. Different pre-acclimation treatments were tested: 0,5,10,15,20,25 and 30 days, to evaluate the percentage of survival and the aerial parts and roots of each seedling were measured every 45 days. Germination was significantly higher in the Phytamax media with plantain (50% and 100% of its basal salts) with 81% germination and Phytamax medium (50% of its basal salts). Regarding the maturity of the capsule, it was observed that the mature capsules reached germination percentages of 69% and 71% 90 days after sowing and the immature capsules did not register germination. The best pre-acclimation treatment was, after 5 days in terms of survival (81.25%), number of total leaves (6.8 leaves) and length of the plant (17.7 mm).

2. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas constituyen una de las familias de plantas con mayor demanda entre las ornamentales. Sin embargo, y debido a las características biológicas de los integrantes de la familia Orchidaceae, como son: sus ciclos de vida relativamente largos, tasas bajas de desarrollo y crecimiento, así como en general un escaso reclutamiento de nuevos individuos en la naturaleza; junto con otros factores como la presión a la que son sometidas por las altas tasas de extracción y la destrucción de sus hábitats, han provocado que muchas de las especies de esta familia hayan disminuido considerablemente o peor aún, se encuentren en grave peligro de desaparecer (Rodríguez *et al.*, 2005).

Una opción viable para bajar la presión que se ejerce sobre las poblaciones naturales de orquídeas es la micropropagación *in vitro*, es por esto por lo que resulta de gran utilidad el establecimiento de protocolos para la producción masiva de plantas de orquídeas mediante estas técnicas, esto representa una buena alternativa para un uso sustentable de dichas especies (Stewart y Kane, 2006; Ávila-Díaz *et al.*, 2009). Sin embargo, existen dos principales obstáculos para lograr dicho objetivo: 1) el establecimiento de protocolos eficientes y confiables para la germinación de semillas y, 2) estudios que permitan comprender de una mejor manera los procesos mediante los cuales llevan a cabo el crecimiento y desarrollo de plántulas en estadíos tempranos (Stewart y Kane, 2006).

Un factor importante que debe tomarse en cuenta para el cultivo *in vitro* de orquídeas es que, en la naturaleza, sus semillas mantienen relaciones estrechas con hongos para poder germinar y lograr su desarrollo, ya que dichos hongos les proporcionan los nutrientes necesarios (Ordoñez *et al.*, 2012). En condiciones *in vitro* se debe proveer de dichos nutrientes mediante el medio de cultivo, sin embargo, los requerimientos de cada género o especie son muy distintos (McKendrick, 2000).

Se han realizado diversos trabajos de propagación *in vitro* con orquídeas mexicanas que han permitido establecer técnicas eficientes para la producción masiva de plantas. Tal es el caso de *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Sarabia *et al.*, 2010; Ortega

et al., 2011; Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013), *Guarianthe aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis* y *Brassavola nodosa* (Damon *et al.*, 2004), *Encyclia adenocaula* (Aguilar-Morales *et al.*, 2016). En lo que respecta a los estudios realizados en especies de otras partes de América existen estudios en diversas especies, como son *Habenaria macroceratitis* (Stewart y Kane, 2006), *Bletia purpurea* (Dutra *et al.*, 2008), *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* y *P. pearcei* (Muñoz y Jiménez, 2007 y 2008), *Catasetum fimbriatum* y *Cyrtopodium paranaensis* en donde se probaron distintos medios de cultivo como el medio MS modificado, Vacin & Went y Knudson C, además, en este mismo trabajo, se utilizaron fertilizantes comerciales con diferentes formulaciones (Rego-Oliveira y Tadeu de Faria, 2005). Para el caso de *Rhynchostele cervantesii* se llevó a cabo la germinación *in vitro* de semillas utilizando el medio MS al 50% y 100%; por otro lado, para la misma especie se llevó a cabo la germinación de semillas procedentes de cápsulas maduras, en medio MS al 50% adicionado con pulpa de plátano y carbón activado (Cruz-Higareda, 2014; Manzano-Hernández, 2017).

El medio más utilizado en propagación *in vitro* de orquídeas es el medio MS (Murashige y Skoog), ya sea, utilizado en la concentración total o parcial de sus sales basales, o en combinación con fitohormonas, dependiendo de los fines con los que se utiliza (Rego-Oliveira y Tadeu de Faria, 2005; Kalimuthu *et al.*, 2007; Muñoz y Jiménes, 2007; Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Salazar-Mercado, 2012; Billard *et al.*, 2013; Díaz-Álvarez *et al.*, 2015; Aguilar-Morales *et al.*, 2016; Cazarez-Favela *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha implementado la utilización de medios líquidos y semisólidos para la germinación de semillas de orquídeas, como es el caso de la germinación de *Bletilla striata* (Billard *et al.*, 2013) y *Encyclia phoenicea* (Rodríguez *et al.*, 2010).

Otra opción para la propagación de orquídeas *in vitro* son los medios de cultivo tradicionales adicionados con componentes orgánicos, para mejorar las técnicas de germinación y abaratar los costos, tanto con fines de investigación como comerciales (García *et al.*, 1993; Flores-Escobar *et al.*, 2008 y 2011; Salazar-Mercado, 2012;

Salazar *et al.*, 2013; Velázquez-Kú *et al.*, 2016), como es el caso de *Rhynchostele bictoniensis* (Bertolini *et al.*, 2013)

Otro factor que se ha considerado en la germinación de semillas de orquídeas es el grado de madurez de la cápsula, ya que este puede influir de manera importante sobre el porcentaje de germinación (Ruíz *et al.*, 2008; Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Damon *et al.*, 2014).

Se considera que una de las etapas más críticas durante la propagación a gran escala de orquídeas es su establecimiento en condiciones *ex vitro* o aclimatación. Se han realizado diversas investigaciones al respecto en orquídeas tropicales, tales como *Euchile mariae*, en la que se obtuvo un 100% de sobrevivencia de plántulas colocadas en troncos de encino y tepozán (Suárez-Quijada *et al.*, 2007). En *Cattleya aurantiaca*, *Brassavola nodosa*, *Prosthechea chacaoensis* (*Encyclia*), *Anathallis* (*Pleurothallis*) *racemiflora*, *Cattleya skinneri*, *Cycnoches ventricosum* y *Encyclia cordigera* se probaron diversos sustratos orgánicos (Damon *et al.*, 2005).

Con el fin de incrementar la sobrevivencia *ex vitro* de plántulas de orquídeas, se han implementado variantes en las técnicas de propagación *in vitro*, como es el caso de la adición de compuestos orgánicos a los medios basales. Tal es el caso de *Stanhopea tigrina* donde se utilizó el medio de cultivo comercial Seed Sowing Orchid para la germinación de las semillas y se evaluó también el desarrollo posterior de las plántulas en medio MS suplementado con diferentes compuestos orgánicos (Moreno-Martínez y Menchaca-García, 2007).

En el caso de *Laelia speciosa* se estudió la dinámica estomática y el efecto de diferentes períodos de pre-aclimatación, así como el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes y sacarosa, observando que en esta especie el mejor período de preaclimatación es a los 20 días y la concentración óptima de nutrientes fue en el medio MS al 100% con una concentración de sacarosa de 40 g/L con valores más altos de sobrevivencia (97.5%) (Ortega-Loeza *et al.*, 2011).

Un adecuado protocolo para la aclimatación de orquídeas obtenidas a partir de propagación *in vitro* puede contribuir de gran manera a la conservación de las

poblaciones silvestres de orquídeas, bajando considerablemente la presión por extracción de las poblaciones al ofrecer plantas de calidad en el mercado (Ávila-Díaz *et al.*, 2009).

Debido a que *Rhynchostele cervantesii* es una especie amenazada (NOM-059-ECOL-2010) se considera necesario establecer un sistema de propagación *in vitro* eficiente, así como un protocolo adecuado para su establecimiento en condiciones *ex vitro*, para poder contribuir a su conservación, ya que mediante la generación de dicho conocimiento es posible propagar a gran escala ejemplares de calidad para ofrecerlos a la venta y con esto reducir en gran medida la presión por extracción de individuos de las poblaciones de dicha especie.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Germinación de las semillas de *Rhynchosstele cervantesii*. Se recolectaron cápsulas maduras de *Rhynchosstele cervantesii*, en el Predio de Tenderio de la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato, Michoacán, México. En seguida, dichas cápsulas se colocaron en bolsas de papel y fueron guardadas en un lugar fresco y seco, hasta el momento de la siembra de semillas. Se prepararon los siguientes medios de cultivo: fertilizante comercial (NUTRICEL 20-30-10) al 50% (T1) y 100% (T2) con agar-agar (vegetariano) (fertilizante 1 gr/L), MS (Murashige y Skoog) al 50% (T3) y 100% (T4) de la concentración basal de sus sales, Phytamax al 50% (T5) y 100% (T6) de la concentración basal de sus sales y Phytamax al 50% (T7) y 100% (T8) con plátano. De cada uno de los medios mencionados, se prepararon 10 frascos con 25 ml de medio cada uno. En seguida se realizó el proceso de desinfección de las cápsulas de acuerdo con Ávila-Díaz *et al.*, 2009. Posteriormente, cada cápsula se disectó de manera transversal y longitudinal en cuatro secciones, en total se mezclaron perfectamente las semillas de cápsulas y se tomaron aproximadamente 5 mg de semillas que se distribuyeron de manera homogénea sobre cada uno de los frascos.

Todos los cultivos se mantuvieron bajo condiciones naturales de luz con una intensidad lumínica de 424 Lux y en un rango de temperatura de (26.5±3 °C), en el Laboratorio de Biología de la Conservación Vegetal, en el Jardín Botánico de la Facultad de Biología de la UMSNH.

Se realizaron observaciones al microscopio óptico ZEISS, a un aumento de 40x cada mes, para registrar el desarrollo de *R. cervantesii* en cada medio de cultivo. Las categorías de desarrollo establecidas fueron: **a)** semilla, que se considera cuando el embrión está dentro de la testa y no ha comenzado su desarrollo, **b)** protocormo 1, cuando el embrión comienza su desarrollo y forma una estructura globular, pero aún está dentro de la testa y **c)** protocormo 2, cuando el protocormo se encuentra el 50% o más fuera de la testa.

Para determinar las diferencias entre las categorías de germinación se realizó una ANOVA de una vía. El factor de variación fue el medio de cultivo y la variable de

respuesta fue la categoría de germinación. Además, se realizó una prueba a posteriori de Tukey HSD, para determinar las diferencias entre pares de comparaciones.

3.2 Efecto de la madurez de la cápsula en la germinación de *R. cervantesii*.

Se llevaron a cabo polinizaciones manuales (exocruzamiento) de cuatro flores en enero de 2014, las primeras dos se colectaron a los 7 meses de realizada la polinización (agosto del mismo año) y las otras dos se colectaron a los 12 meses de efectuada la polinización (enero de 2015). Se prepararon 10 frascos con aproximadamente 25 ml de medio cada uno, para cada una de las cuatro cápsulas. Posteriormente, se realizó la siembra de semillas de las cápsulas de acuerdo con Ávila-Díaz *et al.*, 2009. Se realizaron observaciones al microscopio cada mes para registrar el estadio de desarrollo, mencionado anteriormente.

Para determinar las diferencias entre las categorías de germinación se realizó una ANOVA de una vía. El factor de variación fue el grado de madurez de la cápsula y la variable de respuesta fue la categoría de germinación. Además, se realizó una prueba a posteriori de Tukey HSD, para determinar las diferencias entre pares de comparaciones.

3.3 Aclimatación de plántulas de *Rhynchostele cervantesii*.

Para la aclimatación, se utilizaron plántulas germinadas *in vitro* de entre 4 y 5 mm, con un desarrollo de 24 meses aproximadamente. Se pusieron a prueba diferentes períodos de pre-aclimatación que consiste en llevar los frascos con las plántulas al invernadero y sacarlas del frasco a diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días. Se llevaron todos los frascos con las plántulas al invernadero, y se fueron sacando un total de 16 plántulas por tratamiento (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días). Para la aclimatación se colocó en la maceta tezontle rojo mediano en el fondo de la maceta, hasta la mitad aproximadamente; en seguida se colocó una mezcla de tezontle fino, corteza de encino y Sphagnum en proporciones de 1:1:1. Posteriormente se sacaron las plántulas del frasco y se enjuagaron perfectamente las raíces con agua limpia para retirar por completo el agar y se enjuagaron nuevamente con Tecto 60 (tiabendazol: 2-(4-Tiazolil)-1H-benzimidazol), esto para reducir el riesgo de infecciones por hongos. En seguida, se colocaron las plántulas en la maceta, cuidando que las raíces cayeran de

manera natural sobre el sustrato y se cubrió lo que faltaba de la maceta con la mezcla del sustrato, cuidando de no cubrir los pseudobulbos. Posteriormente, se pusieron las macetas en una charola con el fondo cubierto con tezontle rojo grueso y se colocó agua en el fondo cuidando que el agua no tocara las macetas. Finalmente, para simular las condiciones del frasco y favorecer la adaptación de las plántulas a las nuevas condiciones de una manera gradual, se colocaron palitos de madera en las esquinas de las charolas y después se cubrió cada charola con una bolsa de plástico grande, cuidando que el plástico no tocara las plántulas, ayudándose de los palitos de madera, esto para evitar pudrición en los tejidos.

De manera gradual, se realizaron orificios pequeños en la bolsa de plástico cada 2 días, hasta los 15 días aproximadamente; tiempo en que se retiraron las bolsas de plástico por completo. Finalmente se realizó el registro de las medidas de las partes aéreas y las raíces cada 45 días.

Para determinar las diferencias entre los tratamientos de pre-aclimatación con respecto a la sobrevivencia se realizó una Chi cuadrada. El factor de variación fue los tratamientos de pre-aclimatación y la variable de respuesta fue la sobrevivencia. La variable de respuesta tuvo una distribución binomial. Por otro lado, para determinar las diferencias entre los tratamientos de pre-aclimatación con respecto a las medidas de partes aéreas y raíces se aplicó un modelo no lineal generalizado (Procedimiento GENMOD, SAS) donde el factor de variación fue el tratamiento y la variable de respuesta fue el número de hojas y la longitud de la planta. Las variables de respuesta tuvieron una distribución de tipo Poisson y se empleó una función asociada de tipo log.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Propagación *in vitro* de *Rhynchosstele cervantesii*.

4.1.2 Germinación de las semillas de *Rhynchosstele cervantesii*. De los ocho diferentes medios que se probaron, se observó que 60 días después de la siembra de las semillas, los medios Phytamax al 100% y 50% con plátano fueron en los que se registraron los porcentajes más altos de germinación de esta especie, obteniendo un 81% en ambos casos; seguidos del medio Phytamax al 50%, con un 74% de germinación, mientras que en el medio MS al 50% se obtuvo el menor porcentaje de germinación con un 7%, como se muestra en la figura 1.

Se encuentran diferencias significativas en cuanto a la germinación de semillas de *R. cervantesii* ($F=293.51$, $gl=7$, $p=0.0001$) en los diferentes medios de cultivo. También se encontró que existen diferencias significativas entre las medias en los porcentajes de germinación en los medios de cultivo Phytamax al 50% y 100% con plátano y Phytamax al 50% con respecto a los otros medios.

Por cuestiones prácticas se sugiere utilizar el Phytamax al 50%, ya que con respecto a los medios Phytamax al 100% y 50% con plátano no se encontraron diferencias significativas (Fig.2).

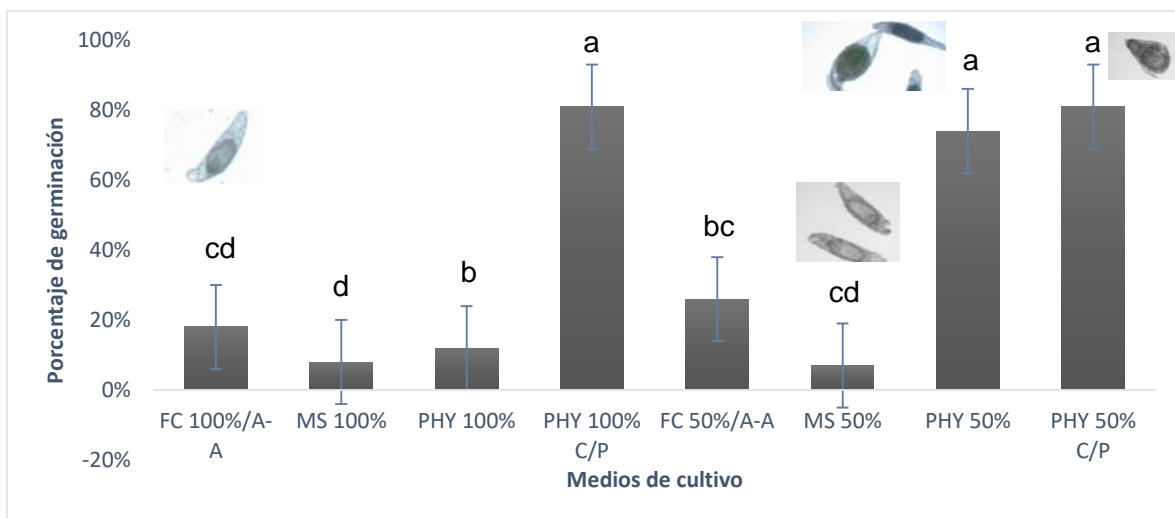


Figura 1. Porcentajes de germinación en los diferentes medios de cultivo: a) Medio de fertilizante al 100% con agar-agar, b) Medio MS 100%, c) Medio Phytamax 100%, d) Medio Phytamax al 100% con

plátano, e) Medio de fertilizante al 50% con agar-agar, f) Medio MS 50%, g) Medio Phytamax al 50% y h) Medio Phytamax al 50% con plátano.

Resultados similares se reportan para otras especies como *Cuitlauzina pendula* con mayores porcentajes de germinación en el medio Phytamax al 50% y 100% (Pérez-Decelis, 2013) y *Encyclia adenocaula* se obtuvieron tanto altos porcentajes de germinación (69.16%) como de vigor (3.24%) (Ruíz *et al.*, 2008); en contraste, se reporta para *Catasetum integerrimum*, resultados negativos del medio Phytamax, comparado con el medio MS adicionado con distintos componentes orgánicos (Velázquez-Kú *et al.*, 2016). Mientras que Ávila-Díaz *et al.*, en 2009 encontró que para *Laelia speciosa* el medio óptimo para su germinación fue el MS, por otro lado, para *Dendrobium aggregatum* se utilizó también el medio MS al 100% adicionado con distintas concentraciones de fitoreguladores (ácido naftalenacético y bencil aminopurina) y agua de coco (Vijayakumar *et al.*, 2012). En lo que se refiere a orquídeas terrestres como es *Habenaria macroceratitis*, se reporta el establecimiento de un medio de propagación *in vitro* eficiente, para lo cual se probaron distintos medios de cultivo como son: Lucke modificado, Murashige & Skoog, Lindemann, Vacin y Went, Malmgren modificado y Knudson C, en combinación con distintas concentraciones de cuatro fitoreguladores (dimetilalilamino purina, benziladenina, cinetina y zeatina), registrándose los mayores porcentajes de germinación en los medios Lindemann con un 89.1% y Knudson C con un 89.2% (Stewart y Kane, 2006).

4.1.3 Efecto de la madurez de la cápsula en la germinación de *R. cervantesii*. En cuanto a la determinación del efecto de la madurez de la cápsula en la germinación de las semillas de *R. cervantesii* obtuvimos que el grado de madurez es determinante para la germinación, según nuestros resultados, existe una correlación entre el grado de madurez de la cápsula y el porcentaje de germinación, como se muestra en el cuadro 1. Las cápsulas maduras alcanzaron porcentajes de germinación de entre 69% y 71% hasta los 90 días de siembra, mientras que en las cápsulas inmaduras no se observó germinación.

Se presentaron diferencias significativas en la germinación de semillas de cápsulas maduras (12 meses) y cápsulas inmaduras (7 meses) ($F=615.63$, $gl=1$ $p=0.0001$).

Cuadro 1. Resultados de los porcentajes de germinación obtenidos en cuatro cápsulas de *R. cervantesii*, colectadas en el Predio de Tenderio, de la Comunidad Indígena0. de Santiago Tingambato, Mich. México, con diferente grado de madurez (cápsulas x-1 y x-7 inmaduras, cápsulas x-3 y x-6 maduras).

Madurez de la cápsula	Germinación de semillas a diferentes tiempos (días)		
	30 días	60 días	90 días
Cápsula inmadura 1	0	0	0
Cápsula inmadura 2	0	0	0
Cápsula madura 1	23	55	69
Cápsula madura 2	31	57	71

Estos resultados sobre el efecto de la madurez de la cápsula son semejantes a los reportados para *Bletia purpurea* (Dutra *et al.*, 2008) y *Phragmipedium longifolium*, *P. pearcei* y *P. humboldtii* (Muñoz y Jiménez, 2008), así como *Laelia speciosa*, en donde también se registró el efecto de la madurez de la cápsula observando que hubo una mayor germinación de las semillas de cápsulas maduras que en semillas provenientes de cápsulas inmaduras (Ávila-Díaz *et al.*, 2009); sin embargo para esta misma especie Aguilar-Morales y López-Escamilla en 2013 registran que las semillas provenientes de cápsulas maduras no presentan embrión, mientras que las algunas de las semillas de cápsulas inmaduras si presentan embrión, lo que se podría deber a la endogamia que podría estar sucediendo en la población en donde se colectaron las cápsulas ya que la ausencia de embrión indica un proceso de incompatibilidad precigótica y no germinarían maduras o inmaduras. Existen otros trabajos en orquídeas epífitas que difieren con los resultados presentados en el presente trabajo, en donde se utilizaron cápsulas inmaduras logrando la germinación de sus semillas en diferentes medios de cultivo (Knudson C, Dalla Rosa y Laneri y Hutner, en distintas concentraciones de macro y micronutrientes) en las especies *Guarianthe aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis* y *Brassavola nodosa*, (Damon *et al.*, 2004); *Encyclia adenocaula* en donde se probaron cuatro distintos estadios de madurez (195, 210, 240 y 255 días) obteniendo que las

cápsulas con menor grado de madurez (195 y 210 días) fueron las que registraron mayores porcentajes de germinación con un 68.94% (Ruíz *et al.*, 2008); así como el trabajo reportado para *Dendrobium tosaense*, *D. nobile*, y *D. moniliforme* (Lo *et al.*, 2004); para *Dendrobium aggregatum* se registró germinación en semillas inmaduras cosechadas 4 meses después de la polinización, para lo cual se agregaron diferentes concentraciones de BAP y ANA (fitorreguladores del crecimiento) al medio basal (MS) (Vijayakumar *et al.*, 2012), y otras especies de híbridos de *Laelia* (Pierik, 1990; Stancato *et al.* 1998), en donde se observó germinación en semillas provenientes de cápsulas inmaduras.

4.1.4 Efecto de diferentes periodos de pre-aclimatación en la sobrevivencia y el crecimiento de plántulas de *R. cervantesii* bajo condiciones de invernadero. Se llevó a cabo la aclimatación de 16 plántulas por tratamiento, un total de 120 plántulas se sometieron a los distintos periodos de pre-aclimatación (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días). Hasta los 225 días de comenzado el experimento, los mejores tratamientos son los de 0, 5 y 10 días de pre-aclimatación con un 93.75%, 81.25% y 87.5% de sobrevivencia, respectivamente. Mientras que el tratamiento que muestra el menor porcentaje de sobrevivencia es el tratamiento de 15 días de pre-aclimatación con un 37.5%. Los tratamientos de 20, 25 y 30 días muestran una sobrevivencia intermedia con porcentajes de 43.75% a los 20 y 25 días, y un 50% a los 30 días (Fig. 3).

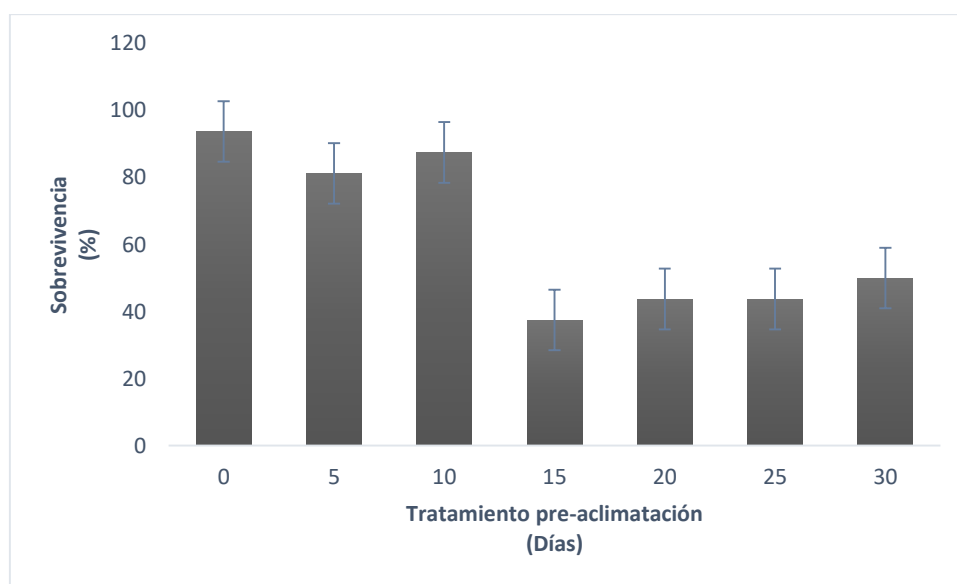


Fig. 3. Efecto de los tratamientos de pre-aclimatación en la supervivencia de plántulas germinadas *in vitro* de *Rhynchosstele cervantesii*. Tratamientos de pre-aclimatación: 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días.

Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de pre-aclimatación en lo que respecta a sobrevivencia ($X^2=25.99$; $gl=6$; $p=0.0002$). En cuanto a las variables área foliar, longitud de la planta, número de hojas, número de pseudobulbos y volumen de los pseudobulbos, se presentaron diferencias significativas en cuanto al número de hojas ($X^2=20.74$; $gl=6$; $p=0.0020$) resultando como mejores tratamientos de pre-aclimatación los 5 y 15 días con 6.82 y 6.23 hojas respectivamente. También se registraron diferencias significativas en cuanto a la longitud de la planta ($X^2=13.36$; $gl=6$; $p=0.0376$), a los 5 días de pre-aclimatación con una longitud de planta de 17.68 mm.

Se observó que para *Rhynchosstele cervantesii* el mejor tratamiento de pre-aclimatación fue a los 5 días con un porcentaje de sobrevivencia de 81.25%, así como un mayor número de hojas y longitud de planta, hasta los 220 días de aclimatación; dichos resultados difieren de los obtenidos para *Laelia speciosa*, en donde se establecieron los mismos períodos de pre-aclimatación (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días) obteniéndose como mejor tratamiento los 20 días con un 97.5% de sobrevivencia, a los 210 días de aclimatación (Ortega *et al.*, 2011).

Los resultados del presente trabajo difieren de los obtenidos por Ávila-Díaz *et al.* en 2009 para *Laelia speciosa*, quienes obtuvieron bajos porcentajes de sobrevivencia en la aclimatación de plántulas al probar diferentes sustratos, dichos porcentajes van desde el 42% al 5%, además probaron el efecto del tamaño de plántula en la aclimatación obteniendo que las plántulas de 5 cm de longitud tuvieron un mayor porcentaje de sobrevivencia (77.5%) que aquellas que median solamente 2 y 1 cm (5% y 0% respectivamente). En lo que respecta a la aclimatación de *Prosthechea citrina* se reporta una sobrevivencia del 85% a los 30 días en un sustrato que consistió de una mezcla de corteza de encino, tezontle y carbón (1:1:1), probando además otros dos sustratos: corteza de pino, perlita, tezontle y carbón (1:1:1:1) y estípite de palma, zeolita y carbón (1:1:1) (Cazarez-Favela *et al.*, 2016); *Phragmipedium longifolium* y *P. humboldtii* registran una sobrevivencia del 100% a los 180 días de aclimatación,

utilizando como sustrato musgo de turba o sphagnum (Muñoz y Jiménez, 2008), en el caso de *Euchile mariae* se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 100%, probando dos tipos de sustrato que fueron troncos de encino y troncos de tepozán, en ambos casos adicionando una pequeña cantidad de una mezcla de Sphagnum y agrolita (3:1) (Suárez-Quijada *et al.*, 2007); lo que concuerda con nuestros resultados, obteniendo altos porcentajes de sobrevivencia en *R. cervantesii* (93.75%-81.25%) para los mejores tratamientos , aunque los sustratos utilizados en cada caso difieren. En cuanto a las orquídeas terrestres, para *Bletia purpurea* se probaron cuatro distintos sustratos, además se registró el efecto de distintos fotoperiodos en la aclimatación, observándose una alta sobrevivencia de 98.8% después de las 15 semanas (Dutra *et al.*, 2008); *Phragmipedium pearcei* registra una supervivencia de 100% s los 180 días de aclimatación (Muñoz y Jiménez, 2008).

5. CONCLUSIONES

El medio óptimo para la germinación y desarrollo de *Rhynchostele cervantesii* fue el phytamax al 50%.

La madurez de la cápsula es determinante en la germinación de *R. cervantesii*, ya que las semillas de cápsulas inmaduras presentaron una germinación nula.

Para *Rhynchostele cervantesii* el mejor tratamiento de pre-aclimatación fue a los 5 días, para obtener una sobrevivencia alta y el mejor crecimiento en cuanto a número de hojas y longitud de la planta.

6. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Morales M. A. y A. L. López-Escamilla. 2013. **Germinación in vitro de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación ex situ.** Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, Volumen II. Hidalgo, México.
- Aguilar-Morales M. A., A. Laguna-Cerda, C. Vences-Contreras y H. E. Lee-Espinosa. 2016. **Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación ex situ.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(7): 1741-1747.
- Ávila-Díaz I., K. Oyama, C. Gómez-Alonso y R. Salgado-Garciglia. 2009. **In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*.** Plant Cell Tiss. Organ Cult 99:335-343.
- Bertolini V., A. Damon, J. V. Mora, y A. R. Velazquez-Natanael. 2013. **Influencias de tres niveles de agua de coco en la germinación in vitro de *Rhynchostele bictoniensis* (Bateman) Soto Arenas & Salazar, en medio de cultivo Knudson C.** Lankesteriana International Journal on Orchidology 13(1-2): 148.
- Billard C. E., C. A. Dalzotto, y V. H. Lallana. 2013. **Germinación de *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. en medio líquido y evolución de plantas en medio semisólido.** Investigación Agraria 15(1): 7-14.
- Cazarez-Favela T. L., J. J. Graciano-Luna, S. Solís-González, B. Díaz-Ramírez, Juan J. A. Nájera-Luna y J. B. Montoya-Ayón. 2016. **Propagación in vitro de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México.** Investigación y Ciencia 67: 19-25.
- Cruz-Higareda J. B. 2014. **Desarrollo de una trampa in situ para el aislamiento micorrízico de una orquídea epífita del Parque Nacional el Tepozteco. Tesis de Licenciatura.** Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. 117 pp.

- Damon, A., E. Águilar-Guerrero, L. Rivera y V. Nikolaeva. 2004. **Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del soconusco, Chiapas, México.** Revista Chapingo Serie Horticultura 10(2): 195-203.
- Damon A., M. Pérez-Soriano y M. L. Rivera. 2005. **Substrates and fertilization for the rustic cultivation of *in vitro* propagated native orchids in Soconusco, Chiapas.** Renewable Agriculture and Food Systems: 20(4): 214-222.
- Dutra, D., T. R. Johnson, P. J. Kauth, S. L. Stewart, M. E. Kane y L. Richardson. 2008. **Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 94(1): 11-21.
- Flores-Escobar, G. J. P. Legaria-Solano, I. Gil-Vásquez y M. T. Colinas-León. 2008. **Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México.** Revista Chapingo. Serie horticultura 14(3): 347-353.
- Flores-Escobar G., I. Gil-Vásquez, M. T. Colinas-León y M. Mata-Rosas. 2011. **Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl.** Revista Chapingo. Serie horticultura, 17(1), 5-8.
- García, J. A., A. T. Valerín, y R. Salazar. 1993. **Utilización de tres medios orgánicos para la germinación *in vitro* de semillas de guaria morada, *Cattleya skinneri* (Bateman).** Uniciencia, 10(1): 79-83.
- Kalimuthu K., R. Senthilkumar y S. Vijayakumar. 2007. ***In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls).** African Journal of Biotechnology 6 (10): 1171-1174.
- LO S. F., S. M. NALAWADE, C. L. KUO, C. L. CHEN y H. S. TSAY. **Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino a medicinally important orchid.** In Vitro Cellular and Development Biology-Plant 40(5): 528-535.

McKendrick, S. (2000). **Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas**. Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador. 14 pp.

Moreno-Martínez D. y R. A. Menchaca-García. 2007. **Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (ORCHIDACEAE)**. Foresta Veracruzana 9(2): 27-32. 2007.

Muñoz, M. y V. M. Jiménez. 2008. **Capsule development, *in vitro* germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei***. LANKESTERIANA 8(2): 23-31.

Ordoñez N. F., M. C. Díez y J. T. Otero. 2012. **La *Vanilla* y los hongos formadores de micorrizas**. ORQUIDEOLOGÍA XXIX (1): 56-69.

Ortega-Loeza M. M., R. Salgado-Garciglia, C. Gómez-Alonso e I. Ávila-Díaz. 2011. **Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr.** European Journal of Environmental Sciences 2(1): 48-54.

Pérez-Decelis V. A., C. Gómez-Alonso e Irene A. D. 2013. **Distribution patterns of *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex (Orchidaceae) over its phorophytes at the 'Barranca de Cupatitzio' National Park, in Uruapan, Michoacán, México**. LANKESTERIANA 13(1-2).

Rego-Oliveira, L. D. V. y de R. T. Faria. 2005. ***In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations**. Acta Scientiarum-Agronomy 27(1): 1-5.

Rodríguez, L., M. C. González y R. González. 2010. **Micropropagación de *Encyclia phoenicea* (lindl.) neum, orquídea epífita endémica de Cuba**. In Congreso Científico del INCA, XVII. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. San José de las Lajas. 22-26 pp.

Ruíz, B.C., C. A. Laguna, A. L. G. Iglesias, A. Damon, H. T. N. J. Marín, R. H. S Azpíroz y M. J. L. Moreno. 2008. **Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae).** Phytion 77: 203-215.

Salazar Mercado S. A. 2012. **Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae).** Acta Agronómica 1(6).

Salazar-Mercado, S. A., A. Z. Amaya-Nieto y F. Barrientos-Rey. 2013. **Evaluation of different *in vitro* culture media in the development of *Phalaenopsis* hybrid (Orchidaceae).** Revista Colombiana de Biotecnología 2(15).

Sarabia-Ochoa, M.E., I. Ávila-Díaz, C. Gómez-Alonso y R. Salgado-Garciglia. 2010. **Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE).** LANKESTERIANA 10(1): 13-18.

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. **Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.** Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 30 de diciembre de 2010.

Stewart, S.L. y M. E. Kane 2006. **Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid.** Plant Cell Tiss Organ Cult 86:147-158.

Suárez-Quijada, I., M. Hernández-Altamirano, V. Chávez-Ávila, E. Sandoval-Zapotilla y A. Martínez-Palacios. 2007. **Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae).** Lankesteriana 7(1-2).

Velázquez Kú V. N., J. C. Quijano-Avila y N. L. Rodríguez-Ávila. 2016. **Análisis de diferentes sustratos en la germinación y multiplicación *in vitro* de orquídeas silvestres del estado de Campeche.** Revista del Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida 63(31): 27-31.

Vijayakumar S., G. Rajalkshmi y K. Kalimuthu. 2012. **Propagation of *Dendrobium Aggregatum* by green capsule culture.** LANKESTERIANA 12(2): 131-135.

VII. ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN

Tomando en cuenta que los resultados obtenidos en esta investigación y que el presente trabajo se lleva a cabo dentro de otro proyecto, que se realiza en conjunto con personas representantes de la comunidad indígena de Santiago Tingambato, con el fin de que hagan uso sustentable de sus recursos, y de esta manera reducir la presión que se ejerce sobre las poblaciones naturales de orquídeas en sus predios, se recomienda:

- ✚ Realizar tratamientos de exocruza para obtener mayor producción de frutos y aumentar en gran medida la viabilidad de las semillas producto de esos frutos. Esto debido a que, mediante las polinizaciones manuales realizadas en el presente trabajo, se registra a *Rhynchostele cervantesii* como una orquídea con un sistema de apareamiento mixto registrando el mayor porcentaje de producción de frutos en los tratamientos de exocruza, además de registrar altos valores de semillas viables en cuanto a la presencia de embrión, por otro lado, en algunas pruebas preliminares de germinación *in vitro* de semillas provenientes de los tratamientos de polinización, se observó que las semillas provenientes de exocruzamiento y los tratamientos de polinización abierta, registran valores de germinación *in vitro*.
- ✚ Llevar a cabo la propagación a gran escala de ejemplares de *R. cervantesii* en base a cruza de manera selectiva. Se recomienda seleccionar plantas con las mejores características, como son las de flores más grandes o, las flores de coloración rosada. Estas cruza selectivas aumentan la calidad de las plantas que se utilizarán posteriormente para la micropropagación, aumentando así la demanda en un futuro mercado en donde comercializar dichas plantas, además de aumentar su valor comercial.
- ✚ Utilizar el medio phytamax al 50% de sus sales basales para la germinación de las semillas de *R. cervantesii* esto por cuestiones prácticas, que les simplifiquen la elaboración del medio de cultivo a las personas de la Comunidad Indígena. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de utilizar el medio phytamax 50% y 100% con pulpa de plátano, debido a que también se obtuvieron excelentes

resultados. Por otro lado, *R. cervantesii* registró porcentajes de germinación en el medio de fertilizante comercial con agar vegetariano, lo que reduce en gran medida los costos de producción, por tal motivo se sugiere la utilización de dicho medio en la germinación de semillas, representando una buena opción para la Comunidad Indígena.

- ✚ Utilizar cápsulas maduras para la germinación *in vitro* de semillas de *R. cervantesii*, ya que no se registró germinación en las semillas de cápsulas inmaduras.
- ✚ Se recomienda durante el proceso de propagación de *R. cervantesii*, llevar a cabo una pre-aclimatación de 5 días de las plántulas, para obtener altos porcentajes de sobrevivencia en la aclimatación de esta especie, así como plantas con una mayor cantidad de hojas y una mayor longitud.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Rhynchostele cervantesii presenta un sistema de apareamiento mixto con alta tendencia a la exogamia en los años 2014 y 2015, para la comunidad de Tenderio, Michoacán, lo anterior se puede establecer debido a que en el presente trabajo se registró una alta producción de frutos mediante el tratamiento de exocruzamiento, y una menor cantidad de frutos fueron registrados para los tratamientos de endocruzamiento y polinización abierta, lo cual concuerda con lo reportado para otras especies como *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009) y *Cuitlauzina pendula* (Torres, 2006) sin embargo esta misma especie se reporta como una especie exógama auto-incompatible (Pérez-Decelis *et al.*, 2013), lo cual nos confirma que dentro de la familia de las orquídeas, como ya se ha mencionado anteriormente, el sistema de apareamiento puede ser variable tanto en espacio como en tiempo (Torres, 2006; Ávila-Díaz, 2007). Por otro lado, *Cattleya luteola* y *Prosthechea vespa* se reportan también como especies con un sistema de apareamiento mixto, pero no se reportan diferencias entre los tratamientos de exocruzamiento y endocruzamiento, mientras que *Xylobium variegatum* se reporta como una especie fuertemente exógama (Quiroga *et al.*, 2010) y *Prosthechea aff. karwinskii* también se reporta como especie con sistema de apareamiento mixto con mayor producción de frutos mediante los tratamientos de exocruzamiento, seguidos de los de endocruzamiento y en menor proporción los de polinización natural (Camacho-Domínguez, 2010). Aunado a lo anterior, en el presente trabajo, se obtuvo para *R. cervantesii* que los frutos producto de los tratamientos de endocruzamiento presentaron bajos porcentajes de semillas viables en cuanto a la presencia de embrión, en comparación con la viabilidad de semillas en exocruzamiento y polinización abierta, resultados similares se obtuvieron para *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009); por otro lado para *Cuitlauzina pendula* se reportan semillas viables en los tratamientos de exocruza y polinización abierta, mientras que las semillas del tratamientos de endocruzamiento no registraron viabilidad (Pérez-Decelis *et al.*, 2013) y para *Prosthechea aff. karwinskii* se reportan altos valores en cuanto a la viabilidad de semillas de los tratamientos de polinización abierta, seguido de los tratamientos de exocruzamiento y menores valore para las semillas de endocruzamiento (Camacho-Domínguez, 2010).

En los integrantes de la familia Orchidaceae es muy común la limitación por polinización (Dressler, 1981; Tremblay *et al.*, 2005) tal es el caso de *Liparis makinoana* (Soo *et al.*, 2001), *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz, 2007) *Gomesa bifolia* (Torretta *et al.*, 2011), *Prosthechea vespa* y *Cattleya luteola* (Quiroga *et al.*, 2010), entre otras. Al igual que todas las especies antes mencionadas *R. cervantesii* se registra en el presente trabajo como una especie con limitación de la polinización, debido a que hay significativamente más frutos en el tratamiento de exocruzamiento que en el de polinización abierta.

En el presente trabajo se registran para *R. cervantesii* mayores porcentajes de viabilidad en cuanto a la presencia de embrión en los frutos producto de polinización abierta y exocruzas que en los de endocruzas. Resultados similares se obtuvieron para *Brassavola cebolleta* y *Cuitlauzina pendula* en donde se registran semillas viables solo por tratamiento de exocruzamiento y polinización abierta (Rech *et al.*, 2010; Pérez-Decelis, 2013).

Con el afán de conservar las poblaciones de orquídeas silvestres y reducir un poco la presión de estas, se han establecido diversos sistemas de propagación *in vitro* para varias especies de orquídeas (Damon *et al.*, 2004; Ávila-Díaz *et al.*, 2007; Coello *et al.*, 2010). *R. cervantesii* es una especie de orquídea silvestre endémica de México, que se encuentra en la NOM-059-2010 bajo la categoría de amenazada, de ahí la importancia de establecer un sistema óptimo de propagación *in vitro*. En baso a los resultados obtenidos en el presente trabajo se recomienda al medio Phytamax al 50% como el indicado para la germinación de las semillas de *R. cervantesii*. Existen muy pocos trabajos reportados en los que se haya utilizado el medio Phytamax, como medio base para el establecimiento de un sistema de propagación *in vitro* (Bhadra y Hossain, 2003; Ruíz *et al.*, 2008; Hasnain, 2014; Velázquez-Kú *et al.*, 2016). Por tal motivo el presente trabajo puede ser de gran utilidad para el futuro establecimiento de sistemas de propagación *in vitro* utilizando el medio Phytamax para otras especies.

Se ha reportado anteriormente en la literatura que la germinación es influenciada no solo por el medio de cultivo sino también por la madurez de la cápsula y de las semillas (Lo *et al.*, 2004). Para *R. cervantesii* no solo influye, sino que es determinante la

madurez de la cápsula, ya que no se registró germinación en las cápsulas inmaduras. Existen algunos trabajos con otras especies, en donde también se registraron buenos resultados con la utilización de cápsulas maduras para la germinación de las semillas, tal es el caso de *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009), *Bletia purpurea* (Dutra *et al.*, 2008), *Phragmipedium longifolium*, *P. pearcei* y *P. humboldtii* (Muñoz y Jiménez, 2008). Por otro lado, existen especies en las que sus semillas presentan mayores porcentajes de germinación, cuando estas proceden de cápsulas inmaduras, como son *Guarianthe aurantiaca*, *Encyclia chacaoensis* y *Brassavola nodosa*, (Damon *et al.*, 2004), *Encyclia adenocaula* (Ruíz *et al.*, 2008) y *Dendrobium tosaense*, *D. nobile*, y *D. moniliforme* (Lo *et al.*, 2004a), *Dendrobium aggregatum* (Vijayakumar *et al.*, 2012).

Probablemente, la etapa más crítica en cuanto al cultivo de plantas es la aclimatación (Ramsay y Dixon, 2003), y la familia de las orquídeas no es la excepción. Existen diversos trabajos sobre la aclimatación en orquídeas con buenos resultados, utilizando diferentes sustratos, por ejemplo, *Prosthechea citrina* (Cazarez-Favela *et al.*, 2016), *Phragmipedium longifolium* y *P. humboldtii* (Muñoz y Jiménez, 2008) y *Euchile mariae* (Suárez-Quijada *et al.*, 2007); dichos resultados concuerdan con los reportados en el presente trabajo para *R. cervantesii*. En donde además se probaron distintos tratamientos de pre-aclimatación (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días), al igual que los establecidos para *Laelia speciosa*, aunque los resultados para ambas especies difieren, reportando para esta última especie como tratamiento óptimo los 20 días de pre-aclimatación, mientras que para *R. cervantesii* los 5 días de pre-aclimatación.

Se considera que los resultados obtenidos en esta investigación son una contribución importante al conocimiento de la biología de orquídeas tropicales, a través de los resultados obtenidos sobre el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *R. cervantesii*, así como sobre su propagación *in vitro*, que en su conjunto fueron útiles para plantear una estrategia de conservación al final de ambos capítulos.

IX. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

- Debido a que, se ha considerado a la fragmentación como una de las principales causas de la modificación en la estructura de los bosques, así como las interacciones que en ellos ocurren (Gracia-Franco, 2017), se recomienda realizar nuevos tratamientos de polinización en el predio de Tenderio, diferenciando entre bosque perturbado y bosque conservado, para determinar cómo influye la perturbación en el sistema de apareamiento en *R. cervantesii*.
- R. cervantesii* posee flores de gran belleza, lo cual le confiere un gran potencial ornamental. Es por ello, que se recomienda implementar el sistema de propagación *in vitro* que aquí se desarrolló y probablemente hacerlo más eficiente para la propagación masiva de plantas, mediante la utilización de promotores del crecimiento vegetal (fitohormonas). Dichos promotores pueden ser N⁶- Benciladenina (BA) y Ácido Nafthalenacético (ANA), ya que se han utilizado con eficiencia para otras especies de orquídeas epífitas *Euchile mariae* (Suárez-Quijada *et al.*, 2007) y *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz, *et al.*, 2009).
- Como ya se mencionó anteriormente, *R. cervantesii* habita principalmente en Bosques Mesófilos de Montaña. Tal es el caso de la población de estudio, la cual se desarrolla en el predio de Tenderio. Es ya conocido que los Bosques Mesófilos de Montaña ocupan apenas el 1% del territorio en México, y a pesar de esto, es uno de los ecosistemas que albergan una mayor diversidad biológica; sin embargo, estos ecosistemas han sido drásticamente reducidos en superficie, se calcula que aproximadamente el 50% han sido reemplazados (Challenger, 1998). Ya que, en el predio de Tenderio se ha reportado a *R.cervantesii* como la especie más abundante (Domínguez-Gil, 2015) y presente en un mayor número de forofitos (Domínguez-Gil, 2015 y Cervantes-Uribe, en proceso), se considera, no solo de gran importancia, sino urgente, llevar a cabo acciones para frenar el cambio de uso de suelo en este sitio, con el fin de conservar la población de *R. cervantesii*, que es una especie que se encuentra amenazada según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010.

X. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

Adnan, H. 2014. **Vitro seedling development and Asymbiotic seed germination of Epidendrum ibaguense Kunth. (Orchidaceae).** International Journal of Horticulture and Floriculture 2(8): 119-123.

Ackerman, J., E. Melendez-Ackerman y J. Salguero-Faria. 1997. **Variation in pollinator abundance and selection on fragrance phenotypes in an epiphytic orchid.** American Journal of Botany 84(10): 1383-1390.

Ávila-Díaz, I. y K. Oyama. 2007. **Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae).** American Journal of Botany 94(2): 184-193.

Ávila-Díaz, I., K. Oyama, C. Gómez-Alonso y R. Salgado-Garciglia. 2009. **In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*.** Plant Cell Tiss. Organ Cult 99: 335-343.

Ávila-Díaz, I., Roberto Garibay-Origel., R. E. Magaña-Lemus y K. Oyama. 2013. **Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) SCHLTR.** Botanical Sciences 91 (4): 523-529.

Bhadra S. K. y M. M. Hossain. 2003. **In vitro Germination and Micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an Endangered Orchid Species.** Plant Tissue Cult. 13(2): 165-171.

Camacho-Domínguez E. y Ávila- Díaz I. 2010. **Mating system and female reproductive success of the endemic, epiphytic *Prosthechea* aff. *karwinskii* (Orchidaceae).** LANKESTERIANA 11(3): 366.

Carnevali Fernández-Concha, G. J.L. Tapia Muñoz, R. Duno de Stefano e I.M. Ramírez (eds.). 2010. **Flora ilustrada de la Península de Yucatán: listado florístico.** Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida.

Cazarez-Favela T. L., J. J. Graciano-Luna, S. Solís-González, B. Díaz-Ramírez, Juan J. A. Nájera-Luna y J. B. Montoya-Ayón. 2016. **Propagación in vitro de la orquídea**

***Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins** nativa del estado de Durango, México. Investigación y Ciencia 67: 19-25.

Ceja-Romero J., A. Espejo-Serna, A. R. López-Ferrari, J. García-Cruz, A. Mendoza-Ruiz y B. Pérez-García. 2010. **Las epífitas vasculares del estado de Hidalgo, México: diversidad y distribución.** Acta Botánica Mexicana 93: 1-39.

CONABIO. 2006. **Enciclo vida.** México, CDMX. Biodiversidad Mexicana. Recuperado en <http://www.enciclovida.mx/especies/6024602>.

Cruz-García G., R. Solano Gomez y L. Lagunez Rivera. 2013. **Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico.** Rev Bras Farmacogn 24: 153-158.

Chase M. W., J. V. Freudenstein, K. M. Cameron y R. L. Barrett. 2003. **DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification.** 69-89.

Coello C.Y., C.L. Miceli. C. Orantes, L. Dendooven y F.A. Gutiérrez. 2010. **Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E. Higgins.** Gayana Bot. 67(1): 19-26.

Cruz-Higareda J. B. 2014. **Desarrollo de una trampa *in situ* para el aislamiento micorrízico de una orquídea epífita del Parque Nacional el Tepozteco. Tesis de Licenciatura.** Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. 117 pp.

Damon A., E. Águilar-Guerrero, L. Rivera y V. Nikolaeva. 2004. **Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del soconusco, Chiapas, México.** Revista Chapingo Serie Horticultura 10(2): 195-203.

Domínguez Gil I. 2015. **Listado y caracterización ecológica de las orquídeas epífitas del predio de Tenderio, de la comunidad Indígena de Santiago Tingambato, Michoacán, México.** Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. Pp. 53.

Dressler R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification.** Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Dutra D., T. R. Johnson, P. J. Kauth, S. L. Stewart, M. E. Kane y L. Richardson. 2008. **Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 94(1): 11-21.

Espejo-Serna A., J. García-Cruz, A. R. López-Ferrari, R. Jiménez-Machorro y L. Sánchez-Saldaña. 2002. **Orquídeas del Estado de Morelos.** Orquídea (Méx.) 16: 1-392. Pp.

Flores-Escobar G., I. Gil-Vásquez, M. T. Colinas-León y M. Mata-Rosas. 2011. **Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl.** Revista Chapingo. Serie horticultura, 17(1): 5-8.

Gamisch A., G. A. Fischer y H. P. Comes. 2014. **Recurrent polymorphic mating type variation in Madagascan *Bulbophyllum* species (Orchidaceae) exemplifies a high incidence of auto-pollination in tropical orchids.** Botanical Journal of the Linnean Society 175, 242-258.

García, J. A., A. T. Valerín y R. Salazar. 1993. **Utilización de tres medios orgánicos para la germinación *in vitro* de semillas de guaria morada, *Cattleya skinneri* (Bateman).** Uniciencia, 10(1): 79-83.

García-Franco. 2017. **La fragmentación del bosque de niebla y su efecto en la comunidad de orquídeas (Orchidaceae).** Agroproductividad (10): 13-18.

Granados-Sánchez D., G. F. López-Ríos, M. Á. Hernández-García y A. Sánchez-González. 2004. **Ecología de las plantas epífitas.** Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 9(2): 101-111.

Hágsater, E., M. A. Soto, G. A. Salazar, R. Jiménez, M. A. López y R. L. Dressler. 2005. **Las orquídeas de México.** Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.

Hasnain A. 2014. ***In vitro* seedling development and Asymbiotic seed germination of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae).** International Journal of Horticulture and Floriculture 2(8): 119-123.

Hernández-Rosas. 2001. **Ocupación de los portadores por epífitas vasculares en un bosque húmedo tropical del alto Orinoco, Edo. Amazonas, Venezuela.** Acta Científica Venezolana, 52(4): 292-303.

<http://www.naturalista.mx/taxa/206214-Rhynchostele-cervantesii>. Colaboración de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Naturalista. **Orquídea Lirio (*Rhynchostele cervantesii*).** Consultada en abril de 2016.

Kalimuthu K., R. Senthilkumar y S. Vijayakumar. 2007. ***In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls).** African Journal of Biotechnology 6(10): 1171-1174.

Krömer, T., J. G. García-Franco y T. Toledo-Aceves. 2014. **Epífitas vasculares como bioindicadores de la calidad forestal: impacto antrópico sobre su diversidad y composición.** In: González-Zuarth, C. A., A. Vallarino, J. C. Pérez-Jimenez y A. M. Low-Pfeng (eds.). Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). México, D.F. y Campeche, México. 606-623 pp.

Lapiner, J. 1979. **Orquídeas Michoacanas.** Comisión Forestal del Estado de Michoacán. Morelia.

Lo S. F., S.M. Nalawade, C.L. Kuo, C.L. Chen y H.S. Tsay. (2004a). **Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino—a medicinally important orchid.** In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant 40: 528-535.

Luna-Rosales B. S. 2017. **Estudio de *Rhynchostele cervantesii* (La Llave & Lex.) Soto-Arenas & Salazar (ORCHIDACEAE) *in situ* e *in vitro*.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. 104 pp.

Meléndez-Ackerman, E. J., J. D. Ackerman y J. A. Rodríguez-Robles. 2000. **Reproduction in an orchid can be resource-limited over its lifetime.** BIOTROPICA 2 (32):282-290.

Mondragón D. y D. M. Villa-Guzmán. 2008. **Estudio etnobotánico de las bromelias epifitas en la comunidad de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, México.** Polibotánica 26: 175-191.

Muñoz, M. y V.M. Jiménez. 2008. **Capsule development, *in vitro* germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*.** LANKESTERIANA 8(2): 23-31.

Ortega-Loeza M. M., R. Salgado-Garciglia, C. Gómez-Alonso e I. Ávila-Díaz. 2011. **Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr.** European Journal of Environmental Sciences 2(1): 48-54.

Palacios Chávez, R. y J. Rzedowski. 1993. **Estudio palinológico de floras fósiles del Mioceno Inferior y principios del Mioceno Medio de la región de Pichucalco, Chiapas, México.** Acta Bot. Mex. 24:1-96.

Pérez-Decelis V. A., C. Gómez-Alonso y A. D. Irene. 2013. **Distribution patterns of *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex (Orchidaceae) over its phorophytes at the ‘Barranca de Cupatitzio’ National Park, in Uruapan, Michoacán, México.** LANKESTERIANA 13(1-2).

Quiroga D., M. Martínez y D. M. Larrea-Alcázar. 2010. **Pollination systems of five species of orchids growing under greenhouse conditions.** Ecología en Bolivia 45(2): 131-137.

Ramsay M. M. y K. W. Dixon. 2003. **Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids.** Pp. 259-286, en: K. W. Dixon, S. P. Kell, R. I. Barrett y P.J. Cribb (eds.). Orchid conservation. Natural History Publications, Borneo.

Rech A. R., Y. B. C. Jardim-Rosa y F. C. L. Manente-Balestieri. 2010. **Aspects of the reproductive biology of *Brassavola cebolleta* Rchb.f. (Orchidaceae)**. Acta Scientiarum Biological Sciences Maringá 4(32) 335-341.

Rodríguez, L., M. C. González, y R. González. 2010. **Micropropagación de *Encyclia phoenicea* (lindl.) neum, orquídea epífita endémica de Cuba**. In Congreso Científico del INCA, XVII, San José de las Lajas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas 22-26 pp.

Ruíz, B.C., C. A. Laguna, A. L. G. Iglesias, A. Damon, H. T. N. J. Marín, R. H. S Azpíroz y M. J. L. Moreno. 2008. **Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae)**. Phytion 77: 203-215.

Rzedowski, J. 1978. **Vegetación de México**. Limusa, México.

Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. **Flora fanerogámica del Valle de México**. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.

Salazar-Mercado S. A. 2012. **Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae)**. Acta Agronómica 1(61).

Selosse, M.A., M. Weiã, J.L. Jany y A. Tillier. 2002. **Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidusavis* (L.) L.M.C. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae**. Mol. Ecol. 11: 1831-1844.

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. **Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010**. Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 30 de diciembre de 2010.

Soo Oh G., M. Y. Chung, S. G. Chung y M. G. Chung. 2001. **Contrasting breeding systems: *Liparis Kumokiri* and *L. makinoana* (Orchidaceae)**. Annals of Botany fennici 38: 281-284.

Soto, M. A., E. Hágsater, R. Jiménez, G. A. Salazar, R. Solano, R. Flores y I. Ruiz. 2007. **Orchids of Mexico: digital catalogue**. Instituto Chinoín. Mexico, D.F.

Soto-Arenas M. A., R. Solano-Gómez, E. Hágsater. 2007. **Risk of extinction and patterns of diversity loss in mexican orchids**. Lankesteriana International Journal on Orchidology 7(1-2): 114-121.

Stewart, S.L. y M. E. Kane 2006. **Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid**. Plant Cell Tiss Organ Cult 86:147-158.

Sun, M. 1997. **Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems**. American Journal of Botany 84(2): 224-232.

Suárez-Quijada, I., M. Hernández-Altamirano, V. Chávez-Ávila, E. Sandoval-Zapotilla y A. Martínez-Palacios. 2007. **Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae)**. Lankesteriana, 7(1-2).

Torres G. K. I. 2006. **Sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) en San Andrés Corú, Michoacán, México**. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 42 pp.

Torretta J. P., N. E. Gomiz, S. S. Aliscioni y M. E. Bello. 2011. **Biología reproductiva de *Gomesa bifolia* (ORCHIDACEAE, CYMBIDIEAE, ONCIDIINAEE)**. DARWINIANA 49(1): 16-24.

Tremblay R. L., D. A. James, K. Z. Jess y N. C. Ricardo. 2005. **Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification**. Biological Journal of the Linnean Society, 84: 1–54.

Velázquez Kú V. N., J. C. Quijano-Avila y N. L. Rodríguez-Ávila. 2016. **Análisis de diferentes sustratos en la germinación y multiplicación *in vitro* de orquídeas silvestres del estado de Campeche**. Revista del Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida 63(31): 27-31.

Vijayakumar S., G. Rajalkshmi y K. Kalimuthu. 2012. **Propagation of *Dendrobium* *Aggregatum* by green capsule culture.** LANKESTERIANA 12(2): 131-135.

Wong K. C. y M. SUN. 1999. **Reproductive Biology and Conservation Genetics of *Goodyera procera* (ORCHIDACEAE).** *American Journal of Botany* 86(10): 1406-1413.