



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
División de Estudios de Posgrado

---

Facultad de Biología

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática: Ecología y Conservación

**“Manejo sustentable de *Prosthechea karwinskii* (Mart.) J. M. H. Shaw a través de su caracterización ecológica, la identificación de las fragancias florales y su propagación *in vitro*”**

Tesis

Que presenta:

**Cristella Diaz Bedolla**

Como requisito para obtener el título de

**Maestro en Ciencias Biológicas**

Directora de Tesis: Dra. Irene Ávila Díaz

Co-asesora de Tesis: Dra. Luicita Lagunez Rivera

Agosto de 2020 Morelia, Michoacán



# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	6
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	10
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	12
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	14
HIPÓTESIS .....	14
OBJETIVO GENERAL .....	15
SISTEMA DE ESTUDIO .....	15
CAPÍTULO 1 .....	17
Distribución y evaluación del estado de conservación de una población de <i>Prosthechea karwinskii</i> en el municipio de Indaparapeo, Michoacán, México .....	17
INTRODUCCIÓN .....	17
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	20
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVO GENERAL .....	20
Objetivos específicos: .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
Toma de datos. ....	21
Análisis estadístico .....	22
RESULTADOS .....	23
Patrón de distribución de <i>P. karwinskii</i> (en general y por categoría de edad) de acuerdo a la especie y al DAP de los forofitos. ....	23
Distribución de <i>P. karwinskii</i> (en general y por categoría de edad) de acuerdo a las zonas del forofito. ....	24
Frecuencia de <i>P. karwinskii</i> (en general y por categoría de edad) en las secciones de la copa (A, B, C) .....	25
Patrón de distribución de <i>P. karwinskii</i> (en general y por categoría de edad), de acuerdo a la orientación, la posición en la rama y los sustratos en los que se encuentra .....	26
DISCUSIÓN .....	31
CONCLUSIONES .....	36
RECOMENDACIONES .....	38
LITERATURA CONSULTADA .....	39
CAPÍTULO 2 .....	44
Composición química de las fragancias florales de <i>Prosthechea karwinskii</i> y su relación con la atracción de polinizadores .....	44
INTRODUCCIÓN .....	44

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	48
HIPÓTESIS.....	48
OBJETIVO GENERAL.....	48
Objetivos específicos:.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
Extracción de compuestos volátiles.....	49
Análisis químico por cromatografía de gases.....	51
RESULTADOS.....	53
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES.....	61
LITERATURA CONSULTADA.....	62
CAPÍTULO 3.....	66
Propagación <i>in vitro</i> de <i>Prosthechea karwinskii</i> para contribuir en su manejo sustentable.....	66
INTRODUCCIÓN.....	66
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	68
HIPÓTESIS.....	68
OBJETIVO GENERAL.....	68
Objetivos Específicos:.....	68
MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
Germinación y primeras etapas de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>P. karwinskii</i> en diversos medios de cultivo.....	69
Efecto de edulcorante comercial stevia y de la sacarosa sobre la germinación y primeras etapas de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>P. karwinskii</i> .....	69
Desinfección de cápsulas:.....	70
Siembra de semillas en los diferentes medios de cultivo.....	70
Desarrollo y crecimiento de plántulas de <i>P. karwinskii</i> en medios de cultivo enriquecidos con BA y/o ANA.....	71
Análisis estadístico.....	72
RESULTADOS.....	74
Germinación y primeras etapas de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>P. karwinskii</i> en diversos medios de cultivo (Experimento 1).....	74
Efecto de edulcorante comercial stevia vs sacarosa en la germinación y primeras etapas de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>P. karwinskii</i> (Experimento 2).....	76
Desarrollo y crecimiento de plántulas de <i>P. karwinskii</i> en medios de cultivo enriquecidos con BA y/o ANA.....	78
DISCUSIÓN.....	85
CONCLUSIONES.....	89
RECOMENDACIONES.....	90
LITERATURA CITADA.....	91
DISCUSIÓN GENERAL.....	96
CONCLUSIONES GENERALES.....	99
LITERATURA CITADA DE LA DISCUSIÓN GENERAL.....	100
ANEXO.....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>Prosthechea karwinskii</i> . Foto: Ávila-Díaz. ....	16
Figura 2. Categorías de edad en relación al DAP y el número de individuos de <i>P. karwinskii</i> registrados. ....	24
Figura 3. Número de individuos de <i>P. karwinskii</i> en las diferentes categorías de edad encontrados en las zonas del forofito (copa(C) y tronco(T)). ....	25
Figura 4. Número de individuos de <i>P. karwinskii</i> registrados por categoría de edad en las diferentes secciones de la copa (A: parte basal, B: parte intermedia, C: parte distal de las ramas). ....	26
Figura 5. Número de individuos de <i>P. karwinskii</i> registrados en las diferentes orientaciones y por categoría de edad. ....	27
Figura 6. Número de individuos de <i>P. karwinskii</i> observados por categoría de edad en las distintas posiciones de las ramas (Ab: abajo, Ar: arriba, L: lateral y V: vertical). ....	28
Figura 7. Proporciones de sustrato para <i>P. karwinskii</i> . ....	29
Figura 8. Porcentaje de sustrato de <i>P. karwinskii</i> y por categoría de edad. ....	29
Figura 9. Algunos de los ejemplares con flor de <i>P. karwinskii</i> usados en la captura de volátiles. Fotos: Diaz-Bedolla C. ....	50
Figura 10 a. Captura de volátiles de <i>P. karwinskii</i> por la técnica headspace dinámico. ....	50
Figura 10 b. Cartuchos Supelco ORBO Porapak 20063. Fotos: Diaz-Bedolla C. ....	50
Figura 11. Jeringa de inyección para cromatografía de gases, vial etiquetado con la muestra de los volátiles de <i>P. karwinskii</i> . Fotos: Diaz-Bedolla C. ....	52
Figura 12. Ejemplo de perfiles cromatográficos (9:00 h y 14:00 h) de una muestra de las fragancias florales de <i>P. karwinskii</i> . 1: Geraniol, 2: Citronelol, 3: Ipsidienol, 4: Linalol y 5: $\beta$ -Mirceno. ....	55
Figura 13. Perfiles cromatográficos de las fragancias florales de <i>P. karwinskii</i> en el primer día (cromatograma superior) y segundo día (cromatograma inferior). ....	56
Figura 14. Número de individuos germinados de <i>P. karwinskii</i> a los 20 días en medios de cultivo con suplementos orgánicos. ....	74
Figura 15. Número de individuos germinados de <i>P. karwinskii</i> a los 40 días en medios de cultivo suplementados con compuestos orgánicos. ....	75
Figura 16. Número de individuos germinados y en etapas posteriores de <i>P. karwinskii</i> a los 60 días en medios de cultivo con suplementos orgánicos. ....	76
Figura 17. Número de individuos germinados de <i>P. karwinskii</i> a los 20 días en medio Phytamax suplementado con sacarosa (Phy50%+Sac; control) o con edulcorante stevia (Phy50%+Stv). ....	77
Figura 18. Germinación de <i>P. karwinskii</i> a los 40 días en medio Phytamax suplementado con sacarosa (Phy50%+Sac; control) o con edulcorante stevia (Phy50%+Stv). ....	77
Figura 19. Número de individuos de <i>P. karwinskii</i> germinados y en etapas posteriores de desarrollo (plántula 1) a los 60 días en medio Phytamax suplementado con sacarosa (Phy50%+Sac; control) o con edulcorante stevia (Phy50%+Stv). ....	78

Figura 20. Crecimiento (longitud de hoja en mm) de <i>P. karwinskii</i> en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante.....	79
Figura 21. Crecimiento (longitud de pseudobulbo en mm) de <i>P. karwinskii</i> en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante.....	80
Figura 22. Crecimiento (longitud de raíz en mm) de <i>P. karwinskii</i> en medios de cultivo suplementados con ANA y BA a los 90 días de efectuado el trasplante. ....	81
Figura 23. Vigor de <i>P. karwinskii</i> en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante.....	82
Figura 24. Formación de Cuerpos Parecidos a Protocormos (PLB's) de <i>P. karwinskii</i> en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante. ....	83

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Categorías de edad.....	22
<b>Tabla 2.</b> Resultados de análisis estadístico de las variables estudiadas.....	30
<b>Tabla 3.</b> Compuestos volátiles identificados en <i>P. karwinskii</i> de Indaparapeo Michoacán.....	53
<b>Tabla 4.</b> Concentración promedio en µg/g de diferentes muestras de compuestos volátiles en <i>P. karwinskii</i> de Indaparapeo Michoacán n=6 a dos diferentes horarios: 9:00-13:00 h y 14:00-18:00h.....	54
<b>Tabla 5.</b> Categorías de desarrollo de las semillas de orquídeas.....	71
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones en miligramos sobre litro (mg/L) de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) utilizados para preparar medios de cultivo para la transferencia .....	72
<b>Tabla 7.</b> Resultados del análisis estadístico de las variables analizadas para el desarrollo y crecimiento de plántulas de <i>P. karwinskii</i> en medios enriquecidos con BA y/o ANA.....	84

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS por las bendiciones en todo mi caminar, por presentarme a una mujer maravillosa, la Dra. Irene que de ser una asesora se convierte sin esfuerzo en una amiga.

A la Virgen de Guadalupe que me concedió la oportunidad de realizar el posgrado.

A la Dra. Irene Ávila por su inigualable apoyo en todo momento y su guía constante en este proceso. Doctora, nunca olvide que Dios la puso en mi camino.

Al Dr. Leonel Toledo por su paciencia en los análisis y su amabilidad para resolver mis dudas

A la Dra. Yvonne Herrerías por siempre creer en mí y empeñarse en dejarme ver lo valiosa que soy.

Al Dr. Rafael Salgado por su apoyo en diversos puntos de mi tesis, así como por su amable forma de tratarme.

A la Dra. Luicita Lagunez por sus correcciones, comentarios y su participación en este proyecto.

Al Dr. Francisco Espinosa García por apoyo, interés en la realización de este proyecto y por el acceso a las instalaciones del laboratorio de Ecología Química y Agroecología.

A la M.C. Yola García por ayudarme en la realización del capítulo 2 de este proyecto y por las observaciones en toda la tesis. Gracias por la atención, el apoyo, la constancia, la amabilidad, por sus ganas de enseñarme y por su comprensión.

A la Lic. Lili Cerritos por motivarme, ayudarme y sobre todo por su hermoso trato.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por permitirme ser parte del mismo y por los apoyos.

A CONACYT por la beca otorgada durante la realización del posgrado.

A mi hermosa madre Bertha Bedolla por dar todo hasta el último momento y a mi valiente padre Carlos Diaz Solís que al pasar de los años se transforma en un hombre mejor, no me queda duda, que de usted aprendo día con día.

A mi tío el Dr. Arnoldo Bedolla por ser un hombre ejemplar para mí y por todo el apoyo a lo largo de mi vida.

A Guerrero Tigre Águila por la constancia en ayudarme a entender la estadística, por su apoyo y por motivarme en los momentos más difíciles.

A mi hermano Luis Martín Mar Silva por ser siempre mi ángel guardián y por todo su apoyo.

A Sergio por sus consejos constantes y su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio, Rosa, Tonathiu y Rosalba por los aprendizajes, las experiencias y las tantas carcajadas.

A Monste Serrato Ávila por sus correcciones en el abstract de la tesis.

A la dueña del predio donde se realizó la caracterización ecológica de *P. karwinskii* por permitirnos el acceso.

## RESUMEN

*Prosthechea karwinskii* es una orquídea endémica de México, en la categoría de riesgo de protección especial, ya que es altamente extraída de su hábitat natural; que, entre otras causas, hacen a esta orquídea susceptible a la extinción.

El objetivo general fue determinar los patrones de distribución vertical-horizontal, identificar los compuestos volátiles de las fragancias florales y determinar la respuesta de diversos medios sobre la propagación *in vitro* para favorecer el manejo sustentable de *P. karwinskii*.

Para la distribución vertical-horizontal se delimitaron dos cuadrantes de 12.5 m x 25 m, se marcaron los árboles con un diámetro a la altura del pecho (DAP)  $\geq 3$  cm. Se registró la presencia de *P. karwinskii* del nivel del suelo hasta aproximadamente 3.5 m, la distribución en el tronco o en la copa, zona de la copa, posición en la rama, la orientación y el sustrato donde se localizaba. Para el aislamiento e identificación de las fragancias florales, usando la técnica *headspace* dinámico, se colectaron los volátiles de 6 flores, de las 9:00 a las 13:00 h y de las 14:00 a las 18:00 h. Para la propagación *in vitro*, se realizaron tres experimentos, uno suplementado los medios con compuestos orgánicos, otro usando edulcorante comercial stevia y para el desarrollo de plántulas se prepararon medios con diferentes combinaciones de benciladenina (BA) y el ácido naftalenacético (ANA).

*Prosthechea karwinskii* se distribuyó mayormente sobre *Quercus deserticola*, en la copa del forofito, sin distribución específica por alguna sección de la copa, mostrando una ligera tendencia hacia el norte y las posiciones lateral y vertical y mayormente sobre la corteza del forofito. Los compuestos volátiles mayoritarios de las flores de esta especie fueron: ipsdienol (28.6%), linalol (25%), citronelol (19.4%) que contribuyeron al 73% del total de los compuestos, con la mayor liberación durante la mañana. El mejor medio para la germinación de esta especie es el medio MS suplementado con plátano y para el desarrollo de plántulas se recomienda la adición de 0.5 mg/L de ANA, ya que la auxina favorece el crecimiento de las plántulas de *P. karwinskii*.

Los resultados de esta investigación muestran las condiciones dónde *P. karwinskii* se establece y se determina que la población estudiada se encuentra en peligro de extinción local. Se sugiere que los himenópteros son probablemente los polinizadores de la flor de esta orquídea, información valiosa que en conjunto con el establecimiento de un sistema eficiente de la propagación *in vitro*, hacen posible contribuir a su manejo sustentable.

Palabras clave: orquídea, forofito, distribución vertical-horizontal, fragancias florales, *in vitro*.

## ABSTRACT

*Prosthechea karwinskii* is a Mexican endemic orchid, it's included in the risk category of special protection, since it is highly extracted from its natural habitat; that, among other causes, make this orchid susceptible to extinction.

The general objective was to determine the vertical-horizontal distribution patterns, identify the volatile compounds in floral fragrances and generate knowledge about *in vitro* propagation to favor the sustainable management of *P. karwinskii*.

For the vertical-horizontal distribution, two quadrants of 12.5 m x 25 m were delimited, the trees were marked with a diameter at breast height (DBH) 3 cm. The presence of *P. karwinskii* from the ground level up to approximately 3.5 m, the distribution on the trunk or on the branches, as well as the area branch, position on the branch, orientation and the substrate where it was located was recorded. For the isolation and identification of the floral fragrances, using the dynamic headspace technique, the volatiles of 6 flowers were collected from 9:00 a.m. to 1:00 p.m. and from 2:00 p.m. to 6:00 p.m. For *in vitro* propagation, three experiments were carried out, one supplemented the media with organic compounds, another using commercial sweetener stevia, and for the development of seedlings, media with different combinations of benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid (ANA) were prepared.

*Prosthechea karwinskii* was mainly distributed on *Quercus deserticola*, in the phorophyte tree top without specific distribution in any section of the tree top, showing a slight tendency towards the north and the lateral and vertical positions and mainly on the phorophyte bark. The main floral volatile compounds were: ipsdienol (28.6%), linalol (25%), citronellol (19.4%) that contributed to 73% of the total of the compounds, with the highest release during the morning. The best medium for the germination of this species is MS medium supplemented with banana and for the development of seedlings the addition of 0.5 mg/L of ANA is recommended, since auxin improvement the growth of *P. karwinskii* seedlings.

The results from this research show the conditions where *P. karwinskii* is established and determine that the population studied is in danger of local extinction. It is suggested that the Hymenopterans are probably the pollinators of this orchid flower providing valuable information that together with the establishment of an efficient *in vitro* propagation system make possible to contribute towards its sustainable management.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Orchidaceae, cuenta con cerca de 28 000 especies (Fay, 2018). En México se han descrito alrededor de 1 260 especies (Soto *et al.*, 2007). Las orquídeas habitan en todo tipo de ecosistemas, excepto en desiertos, entre éstas, las especies terrestres habitan más frecuentemente en zonas de montaña donde la sequía es estacional, sin embargo, las especies epífitas son de ambientes más cálidos y húmedos (Hágsater *et al.*, 2005). Estas últimas se desarrollan sobre otras plantas también conocidas como hospederos o forofitos, los cuales son utilizados por las orquídeas como soporte sin causarles daño (Granados-Sánchez *et al.*, 2003). Ejemplo de ello es *P. karwinskii* que es una orquídea endémica de México con una distribución restringida, tiene como forofito mayoritariamente a *Quercus deserticola* (Rodríguez, 2012), posee vistosas flores de color amarillo, lo que la hace ser una planta ornamental, además posee usos medicinales y ceremoniales (Cruz *et al.*, 2014); actualmente se encuentra bajo protección especial (SEMARNAT, 2019).

*Prosthechea karwinskii* es una orquídea que pertenece a un complejo de especies (entre ellas *Prosthechea citrina*), sólo ha sido reportada en Oaxaca y en una población en Michoacán (Camacho, 2009). Es necesario realizar investigaciones que contribuyan a la conservación de la especie dentro de su hábitat para promover su manejo sustentable a largo plazo. Los estudios básicos resultan importantes al momento de plantear normas y formas de aprovechamiento, así como estrategias para la conservación de especies poco protegidas como es el caso de *P. karwinskii*. La determinación de las condiciones más adecuadas para su establecimiento y desarrollo, puede favorecer su manejo tanto *in situ* como *ex situ* y a su vez contribuir a generar conocimiento sobre la ecología, las fragancias florales y de su propagación. La caracterización ecológica de *P. karwinskii* contribuirá a conocer el estado actual de esta población, la identificación de compuestos volátiles florales puede colaborar a identificar posibles polinizadores por medio del análisis e identificación de estos compuestos, así como a la posible diferenciación entre especies y a su vez a buscar compuestos útiles en medicina, como ha sido documentado por Cruz *et al.* (2014) y Rojas-Olivos *et al.* (2017).

Se ha generado información sobre la ecología y la propagación *in vitro* de orquídeas, sin embargo, cada especie y en ocasiones los individuos de diferentes poblaciones, tienen sus requerimientos particulares (Ávila-Díaz *et al.*, 2009) por tal motivo es necesario aportar información sobre la caracterización ecológica en una nueva población y de la propagación *in vitro* de *P. karwinskii* para contribuir al manejo sustentable de la especie, así como estudiar sus compuestos volátiles en las flores, en búsqueda de compuestos que puedan estar relacionados con sus polinizadores.

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo es la distribución de *P. karwinskii*, de acuerdo al diámetro a la altura del pecho (DAP) de sus forofitos?, ¿se distribuyen las plantas sobre el tronco o sobre la copa y en qué zona (A: parte basal, B: parte intermedia, C: parte distal de las ramas) se encuentra la mayor cantidad de individuos?, ¿en qué posición, sustrato y orientación se localizan?, ¿en qué estado de conservación se encuentra la población estudiada?

¿Cuáles son los compuestos volátiles presentes en las flores en antesis de *P. karwinskii* de una población en Michoacán? ¿A qué hora liberan más compuestos volátiles las flores de *P. karwinskii*?

¿Cuál medio enriquecido con suplementos orgánicos es el más efectivo para la germinación de *P. karwinskii*? ¿Qué concentraciones de benciladenina (BA) y/o el ácido naftalenacético (ANA) favorecen el desarrollo y crecimiento de plántulas de *P. karwinskii*?

## HIPÓTESIS

*P. karwinskii* se distribuye sobre *Quercus deserticola* con una distribución mayoritaria en la copa y en la parte media de ésta, sin un patrón de distribución respecto a la orientación y mayor número de individuos en la posición lateral y vertical respecto a la rama, sujetándose principalmente sobre corteza.

La fragancia floral de *P. karwinskii* está constituida principalmente por terpenos como mono y sesquiterpenos.

La liberación de una mayor cantidad de compuestos volátiles de *P. karwinskii* es por la mañana.

Los medios enriquecidos con suplementos orgánicos son efectivos para la germinación de *P. karwinskii*.

Los medios enriquecidos con concentraciones menores a 0.05 mg/L de BA son efectivos para el desarrollo de plántulas de *P. karwinskii*.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar los patrones de distribución vertical-horizontal de *P. karwinskii*, identificar los compuestos volátiles de las fragancias florales y determinar la respuesta de diversos medios sobre la propagación *in vitro* de *P. karwinskii* para favorecer el manejo sustentable de dicha especie.

## SISTEMA DE ESTUDIO

*Prosthechea karwinskii* (Mary.) J. M.H. Shaw (Fig. 1) en honor al naturalista Wilhelm Friedrich Karwinski es una orquídea endémica del sur de México, crece como epífita en bosques de pino-encino en los estados de Michoacán, Guerrero, México, Morelos, Puebla, Veracruz, y Oaxaca.

Es una planta con flores vistosas de color amarillo con un aroma particular a limón, de aquí que sea conocida como limoncillo, posee diversidad en cuanto a nombres comunes, algunos de los cuales son: lirio amarillo, monja amarilla, flor de mayo, flor castigada, (Oaxaca), cebolla (Guerrero), aurórica (Purépecha, Michoacán), olórica (Michoacán) entre otros (Solano y Huerta, 2019).

La floración de *P. karwinskii* se efectúa entre finales de febrero y principios de mayo y el desarrollo de frutos dura entre 42 y 47 semanas a partir de abril, por lo que los frutos alcanzan la maduración entre marzo y principios de mayo del siguiente año (Robalino, 2019) y presenta un sistema de apareamiento mixto, preponderantemente exógama y con un bajo éxito reproductivo (Camacho, 2009).

El uso etnomédico de *P. karwinskii* consta en el uso de los pseudobulbos para la cura de la tos, quemaduras y diabetes, las flores son usadas para prevenir el aborto y también ayudan a la tos, las hojas se usan para la disminución de los niveles de glucosa en sangre (Cruz *et al.*, 2014).

Las poblaciones enfrentan el riesgo de la extracción de ejemplares para el comercio ilícito local y para usos religiosos. (Solano-Gómez *et al.*, 2010), estas prácticas se realizan durante el periodo de floración teniendo consecuencias graves como la disminución de las poblaciones (Solano y Huerta, 2019).



Figura 1. Flor de *Prosthechea karwinskii*. Foto: Ávila-Díaz.

# CAPÍTULO 1

## Distribución y evaluación del estado de conservación de una población de *Prosthechea karwinskii* en el municipio de Indaparapeo, Michoacán, México

### INTRODUCCIÓN

El estudio de la caracterización ecológica involucra la contabilización de los forofitos, la abundancia del sistema forofito/orquídea, número de individuos en los diferentes hospederos, así como la distribución vertical de la planta sobre el forofito, que involucra: en qué zona de este se encuentra (tronco o copa), en qué zona de la copa; así como cuál es la orientación de las plantas entre otros parámetros (Avendaño y Cruz, 2007; Bravo-Monasterio *et al.*, 2012; Morales- Hernández *et al.*, 2016 y Rodríguez, 2012).

El análisis de los parámetros anteriormente mencionados, aporta conocimiento y al compararlos con estudios realizados en otras poblaciones, se puede evaluar el estado actual en que se encuentran las especies dentro de las poblaciones. Estos estudios pueden a su vez contribuir a la conservación *in situ* teniendo mayor éxito cuando se habla de reintroducciones.

Morales-Hernández *et al.* en 2016, realizaron una caracterización ecológica de las orquídeas epífitas en el Parque Ecológico Universitario de la Universidad Autónoma de México y encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la abundancia de orquídeas entre y dentro de los transectos.

Se ha estudiado la distribución, abundancia y fenología de orquídeas en bosques de *Nothofagus glauca* en Chile central, las especies encontradas fueron *Gaviela venosa*, la cual prefiere el borde y los claros, *Codonorchis lessonii* en el borde interior y *Gaviela odoratissima* encontrada bajo cobertura (Bravo-Monasterio *et al.*, 2012). Así mismo, la

diversidad en un bosque húmedo tropical de Colombia fue estudiado, estableciendo tres zonas de acuerdo al grado de intervención del bosque (poco, medio y altamente intervenido), encontrando valores más altos de diversidad en las zonas poco y medianamente intervenidas (Mejía y Pino, 2010).

García-González y Damon estudiaron en 2013 la distribución en los forofitos de *Telipogon helleri* en una región de Chiapas, determinando las clases de vida, la distribución vertical y la orientación en el forofito. El 97.83% de la población estaba dada por plantas adultas y solo el 2.17% eran plantas inmaduras. El porcentaje mayor de orquídeas encontrado fue en el tronco (73.92%), seguido del 26.08% en las ramas y sin registro de plantas ocupando las horquetas ni las ramillas. El mayor número de orquídeas se encontró en la categoría medio de altura (78.26%) que va de 2.4 a 4 m de alto. Se aprecia una tendencia de *T. helleri* (45.67% de la población) a crecer en el lado noreste de los forofitos que ocupa. Comportamiento similar observaron García-González *et al.* (2016) en *Tetramicra malpighiarum* que presenta una pequeña tendencia a crecer preferentemente con orientaciones sur y noroeste. Respecto a las clases de vida, ellos obtuvieron que 69.3 % de los individuos fueron adultos. Éstos crecían fundamentalmente sobre ramillas (93.7%) y solo el 6.3% se encontró creciendo en troncos y no se localizaron individuos creciendo en ramas. Además, el 51.18% de los individuos se encontraron creciendo solitarios y el resto crecían agregados principalmente con otras orquídeas de su misma especie.

En 2013 García-González y Riverón-Giró, estudiaron la organización espacial y la estructura de una población de *Ionopsis utricularioides*, con un total de 217 plantas, obtuvieron que en el tronco de los árboles no se encontraron plantas de *I. utricularioides* y en las ramillas crecía el 98.61% y solo el 1.38% en las ramas. No se reportaron diferencias significativas en la orientación, sin embargo, observaron una tendencia con mayor número de plantas hacia el E (16.1 %) y SO (16.6 %). Una gran parte de *I. utricularioides* crecían en agregación con otros individuos de su misma especie o con otras especies de epífitas vasculares.

Cabe destacar los trabajos realizados con *P. karwinskii* en dos localidades de Oaxaca, donde se evaluó el patrón de distribución espacial, las preferencias del hospedero y las categorías de edad, observando que esta especie crece solo en los encinos, con densidades bajas (220 a 300 ind/ha) y mayormente son individuos adultos (Avendaño y Cruz, 2007). En un trabajo similar, realizado por Rodríguez en 2012, se evaluó los patrones de distribución vertical y horizontal de 355 individuos de *P. karwinskii* en la única población conocida entonces en Michoacán. El 70% de los individuos eran juveniles, 22.5% adultos y solo el 7% plántulas. La copa del forofito fue mayormente ocupada por todas las clases de vida, mientras que en las zonas del forofito las plántulas se distribuyeron homogéneamente, las demás clases de vida tuvieron mayor frecuencia en la parte media y parte interna de las ramas.

Como se mencionó anteriormente, existen estudios sobre los patrones de distribución de *P. karwinskii*, sin embargo, el estudio del presente trabajo se realizó en una nueva población de la que no se tenía registro. Conocer la distribución de *P. karwinskii* en esta población es importante para determinar si esta población sigue los mismos patrones que las poblaciones estudiadas anteriormente, si esto no se cumple, esto serviría de clave para interpretar por qué dichos patrones no son iguales y para realizar nuevos estudios.

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo es la distribución de *P. karwinskii*, de acuerdo al diámetro a la altura del pecho (DAP) de sus forofitos?, ¿se distribuyen las plantas sobre el tronco o sobre la copa y en qué zona (A: parte basal, B: parte intermedia, C: parte distal de las ramas) se encuentra mayor cantidad de individuos?, ¿en qué posición, sustrato y orientación se localizan?, ¿en qué estado de conservación se encuentra la población estudiada?

## HIPÓTESIS

*P. karwinskii* se distribuye sobre *Quercus deserticola* con una distribución mayoritaria en la copa y en la parte media de esta, sin un patrón de distribución respecto a la orientación y mayor número de individuos en la posición lateral y vertical respecto a la rama, sujetándose principalmente sobre corteza.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar los patrones de distribución vertical-horizontal de *P. karwinskii*.

### Objetivos específicos:

- Determinar el patrón de distribución de *P. karwinskii* (en general y por categoría de edad) de acuerdo a la especie y al diámetro a la altura del pecho (DAP) de los forofitos.
- Analizar la distribución de la orquídea en estudio (en general y por categoría de edad) en las zonas del forofito (tronco y la copa).
- Definir la frecuencia de registro de *P. karwinskii* (en general y por categoría de edad) en las secciones de la copa (A: parte basal, B: parte intermedia, C: parte distal de las ramas).
- Estimar el patrón en la distribución de la especie en estudio (en general y por categoría de edad) respecto a la orientación, la posición en la rama y los sustratos en los que se encuentra.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de datos.

Este estudio se llevó a cabo en una población de *P. karwinskii*, ubicada en el SE de Indaparapeo, Michoacán, en un Bosque Encino de *Quercus deserticola* Trell. (INAFED, 2020)

Se delimitaron dos cuadrantes de 12.5 m x 25 m considerando la presencia de árboles con la especie en estudio. Los dos cuadrantes, se ubicaron con una exposición, pendiente, tipo de suelo y orientación semejantes.

Se marcaron los árboles que estaban dentro de los cuadrantes con un diámetro a la altura del pecho (DAP)  $\geq 3$  cm y se anotó el DAP de cada uno de los mismos. Se realizó el registro de cada uno de los individuos de *P. karwinskii* que se localizaron desde el nivel del suelo hasta una altura de aproximadamente 3.5 m, semejante a como fue realizado por Rodríguez, en 2012. Se registró la distribución de *P. karwinskii*, si se encontraba en el tronco o en la copa, si estaba en la copa se hizo el registro de la parte donde se encontraba (en la parte basal, intermedia o distal de las ramas), así como también la posición en la rama (arriba, abajo, lateral o vertical), su orientación (N, S, E, O) y sobre que sustrato se localizaba (líquen, corteza, musgo), anotando el porcentaje de cada uno de los sustratos. Además, se anotó la categoría de edad de cada uno de los individuos registrados, de acuerdo a las descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Categorías de edad

Categorías de edad	Características consideradas
Plántula (Ptl)	Sin evento reproductivo. Sin pseudobulbo o pseudobulbo más joven $\leq 5$ mm.
Juvenil (Jvl)	Sin evento reproductivo. Pseudobulbo más joven, desarrollado el año pasado $> 5$ mm.
Adulta 1 (Ad 1)	Con evento reproductivo. Pseudobulbo más joven desarrollado el año pasado $< 30$ mm.
Adulta 2 (Ad 2)	Con evento reproductivo. Pseudobulbo más joven desarrollado el año pasado $\geq 30$ mm.

#### Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados en el programa R.

Para los análisis de todas las variables se tomaron solo los árboles de la especie de forofito *Quercus deserticola* debido a que solo había un individuo de *P. karwinskii* en un solo árbol registrado de *Crataegus mexicana*.

Se analizó el número de individuos de *P. karwinskii* para cada una de las variables y a su vez en relación a la categoría de edad. Para los análisis del DAP, las zonas del forofito (tronco y la copa), las secciones de la copa (A, B o C), la orientación y la posición en la rama, se realizaron modelos lineales generalizados (GLM's) utilizando un error de distribución Poisson. Se usó la versión quasipoisson (Crawley, 2007) debido a que en todas las variables se presentó sobredispersión en el error del modelo, se utilizaron las versiones quasipoisson (Crawley, 2007).

Para el análisis de los sustratos se utilizó una prueba de Ji-cuadrada debido a que se obtuvo la frecuencia de aparición de cada individuo en cada sustrato (corteza, musgo o líquen) expresado en porcentaje.

## RESULTADOS

### **Patrón de distribución de *P. karwinskii* (en general y por categoría de edad) de acuerdo a la especie y al DAP de los forofitos.**

De un total de 67 árboles censados dentro de los cuadrantes, solamente 33 árboles (49.25%) presentaron plantas de *P. karwinskii* (128 individuos), de los cuales el 97.05% fueron *Quercus deserticola* (66 árboles) y solo el 2.95% (un individuo) de otra especie (*Crataegus mexicana*). De los 128 individuos de *P. karwinskii* registrados, 105 (82.03%) fueron juveniles, 21 (16.40%) plántulas y tan solo 2 (1.56 %) adulto 2.

El DAP de los forofitos, se registró de 9 cm a 64 cm. No se observó una relación entre el número de individuos de *P. karwinskii* y el DAP de los forofitos. No se encontraron diferencias significativas en el número de individuos de la orquídea en estudio sobre los diferentes DAP de los forofitos ( $\chi^2=0.0014$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.9147$ ).

Tampoco se registraron diferencias significativas al considerar las categorías de edad ( $\chi^2=1.7298$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.5107$ ) así como en la interacción del DAP con las categorías de edad ( $\chi^2=0.009$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.9621$ ; Fig. 2).

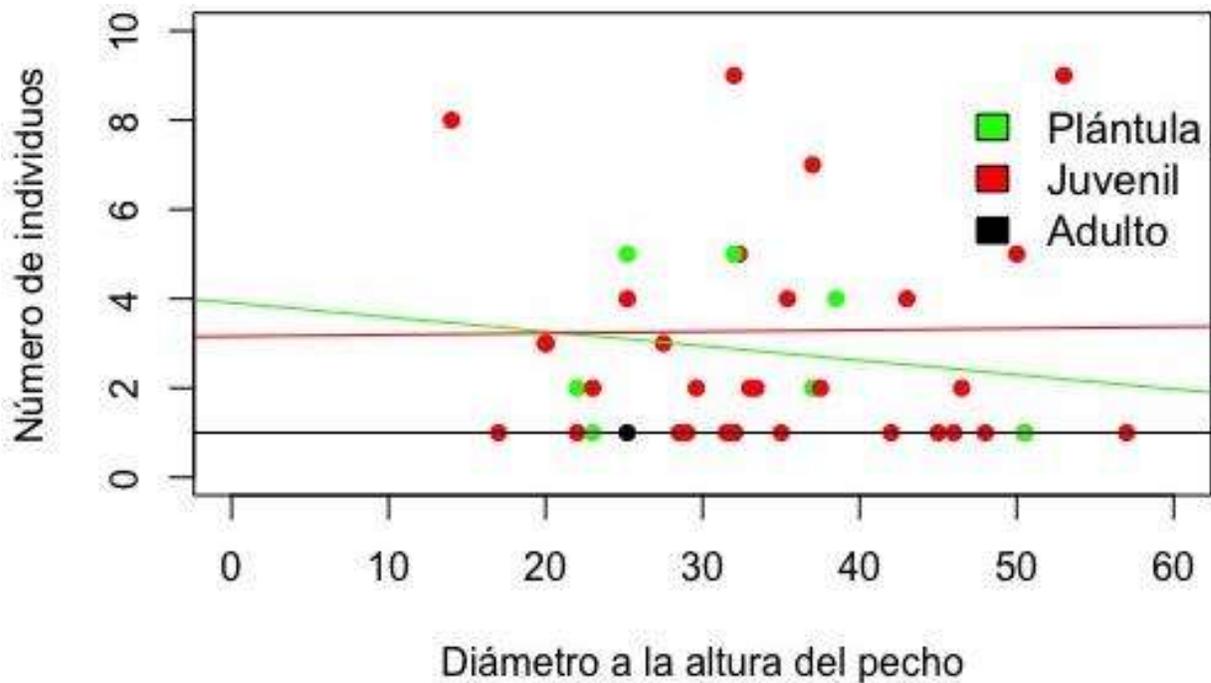


Figura 2. Categorías de edad en relación al DAP y el número de individuos de *P. karwinskii* registrados.

**Distribución de *P. karwinskii* (en general y por categoría de edad) de acuerdo a las zonas del forofito.**

El número de individuos de *P. karwinskii* fue mayor significativamente ( $\chi^2=13.2696$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.0002$ ) en la copa que en el tronco. Al considerar las categorías de edad de *P. karwinskii*, se observa que no se registran diferencias significativas ( $\chi^2=4.3854$ ;  $gl=2$ ;  $p=1116$ ), aunque se observa una tendencia de valores mayores en la copa. Cabe resaltar que los individuos adultos solamente se observaron en la copa, como se muestra en la Fig. 3. La interacción de la zona del forofito y la categoría de edad tampoco arrojó diferencias significativas ( $\chi^2=0.2675$ ;  $gl= 1$ ;  $p=0.6049$ ) (Fig. 2 y Tabla 2).

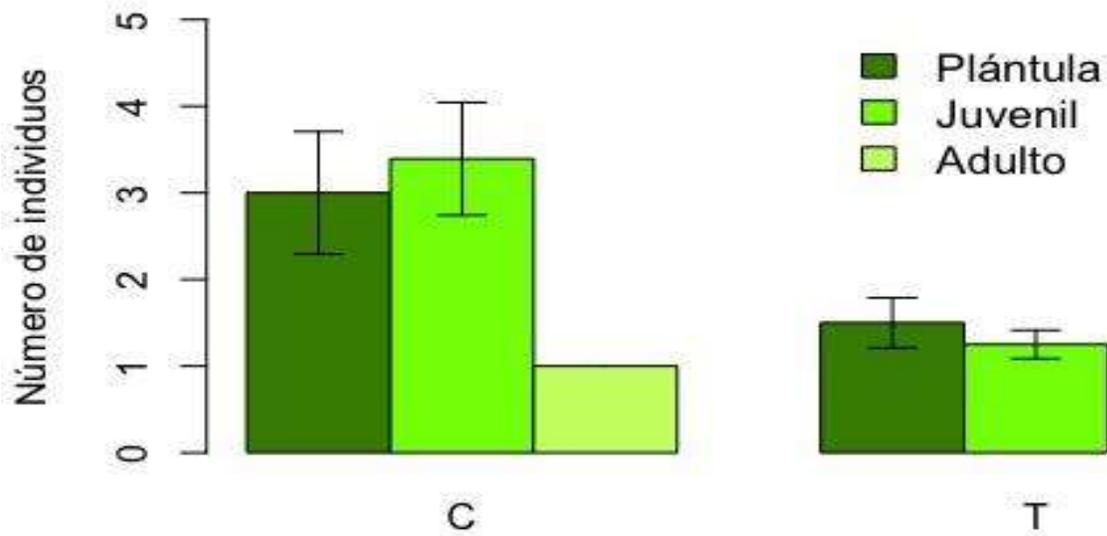


Figura 3. Número de individuos de *P. karwinskii* en las diferentes categorías de edad encontrados en las zonas del forofito (copa(C) y tronco(T)).

#### **Frecuencia de *P. karwinskii* (en general y por categoría de edad) en las secciones de la copa (A, B, C)**

El análisis no muestra diferencias significativas ( $\chi^2=4.1190$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.1275$ ). Aun así, se pudo apreciar la tendencia a tener más registros en la zona C de plántulas y de juveniles, mientras que los adultos registrados (solamente dos) se localizaron en las zonas A y B (Fig. 4). Tampoco se observaron diferencias significativas en el análisis de las categorías de edad ( $\chi^2=0.9024$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.6369$ ) ni en la interacción de las categorías con las zonas de la copa ( $\chi^2=0.1446$ ;  $gl=3$ ;  $p=0.9860$ ; Tabla 2).

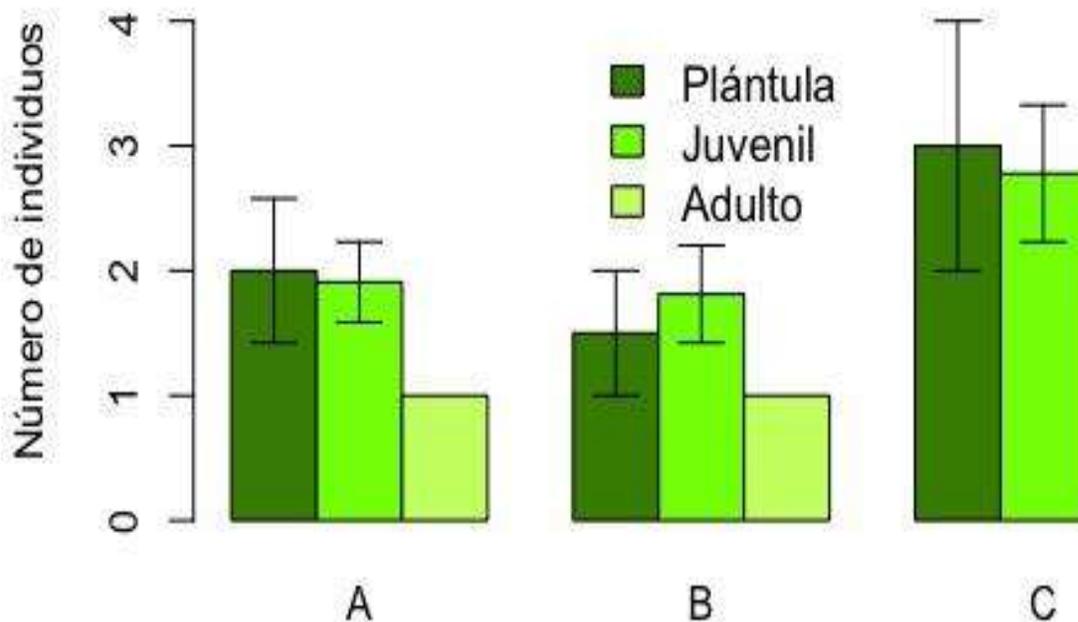


Figura 4. Número de individuos de *P. karwinskii* registrados por categoría de edad en las diferentes secciones de la copa (A: parte basal, B: parte intermedia, C: parte distal de las ramas).

**Patrón de distribución de *P. karwinskii* (en general y por categoría de edad), de acuerdo a la orientación, la posición en la rama y los sustratos en los que se encuentra**

Orientación. No se observó algún patrón de distribución de *P. karwinskii* respecto a la orientación, ya que no se registraron diferencias significativas ( $\chi^2=7.3108$ ;  $gl= 3$ ;  $p=0.0626$ ), no obstante, se observó una tendencia hacia las orientaciones N y E (Fig. 5). Al analizar la distribución de las categorías de edad de los individuos de *P. karwinskii*, tampoco se observaron diferencias significativas ( $\chi^2=0.9435$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.6239$ ), ni entre la interacción entre la orientación y las categorías ( $\chi^2=1.2366$ ;  $gl=3$ ;  $p=0.7442$ ; Tabla 2).

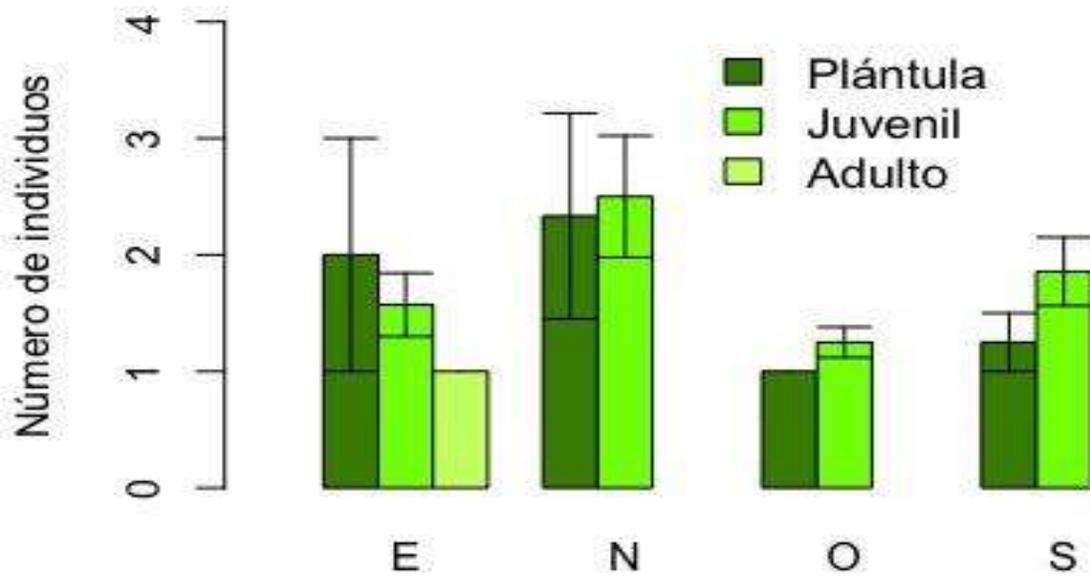


Figura 5. Número de individuos de *P. karwinskii* registrados en las diferentes orientaciones y por categoría de edad.

Posición en la rama. No se observaron diferencias significativas en la posición de *P. karwinskii* en las ramas ( $\chi^2=3.6306$ ;  $gl=3$ ;  $p=0.3042$ ), tampoco hubo relación significativa con las categorías de edad ( $\chi^2=1.0560$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.5898$ ) ni en la interacción de las categorías con la posición de los organismos en las ramas ( $\chi^2=2.7335$ ;  $gl=3$ ;  $p=0.4346$ ; Fig. 6). No obstante, se observó una ligera tendencia de las plántulas y los individuos juveniles, en las posiciones lateral, vertical y abajo; observando que los adultos solamente se registraron en la posición abajo.

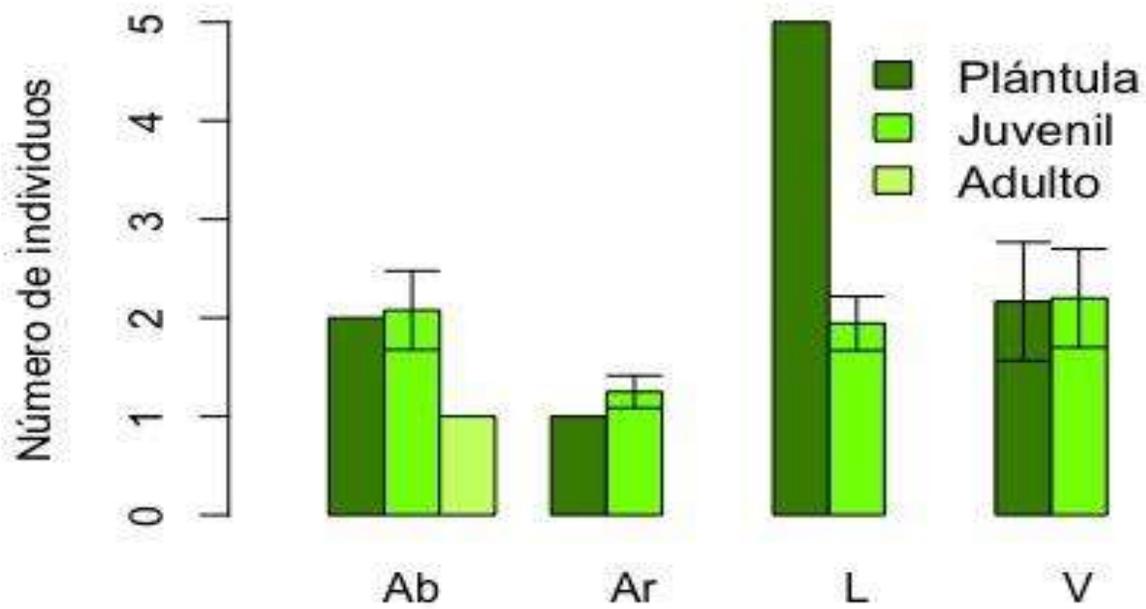


Figura 6. Número de individuos de *P. karwinskii* observados por categoría de edad en las distintas posiciones de las ramas (Ab: abajo, Ar: arriba, L: lateral y V: vertical).

Sustratos en los que se encuentra. El análisis arrojó diferencias significativas ( $\chi^2=12.2$ ;  $g/4$ ;  $p<0.05$ ). Se observó que existen mayor número de individuos sobre corteza (Fig. 7 y Tabla 2).

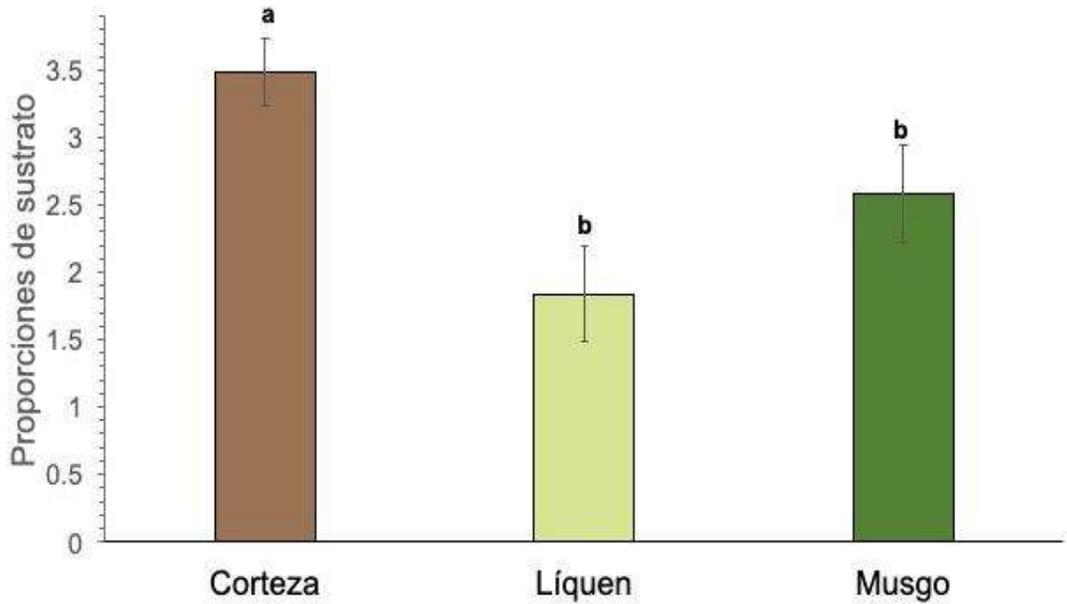


Figura 7. Proporciones de sustrato para *P. karwinskii*.

Al considerar las categorías de edad, puede apreciarse que se registraron mayor cantidad de las plántulas en musgo y los adultos en corteza (Fig. 8).

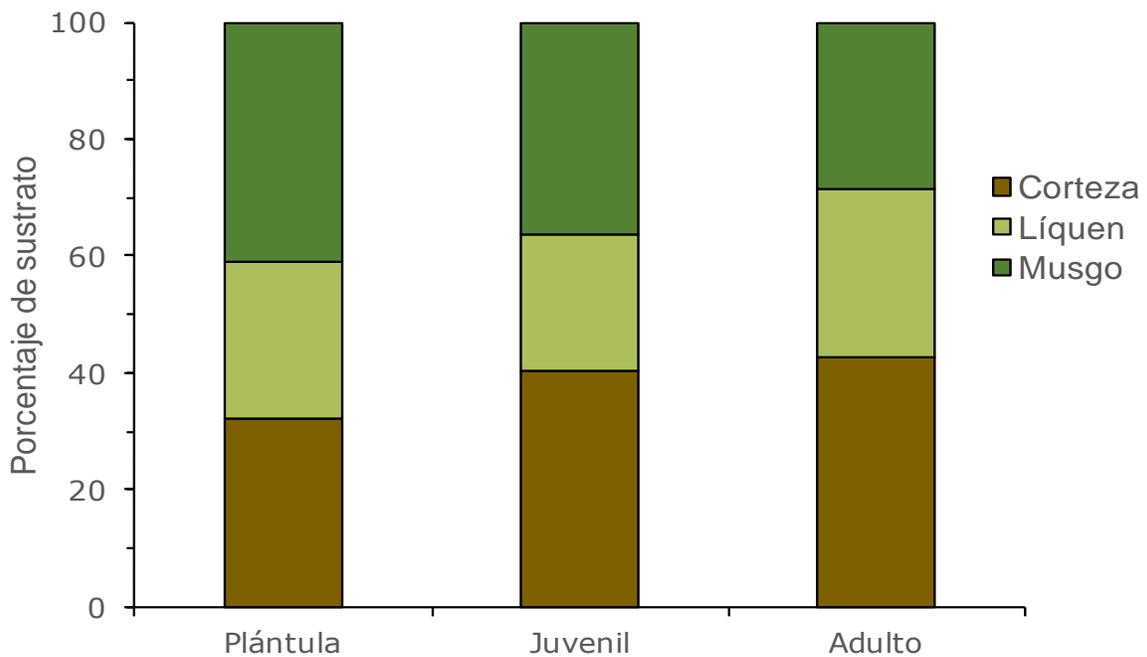


Figura 8. Porcentaje de sustrato de *P. karwinskii* y por categoría de edad.



## DISCUSIÓN

*Prosthechea karwinskii* crece predominantemente sobre *Quercus deserticola* en la población estudiada, registrando más del 90% de individuos sobre este forofito, similar a lo encontrado por Rodríguez en 2012, en una población también en Michoacán, en la que reporta que la misma orquídea crecía solamente sobre *Q. deserticola*. Avendaño y Cruz en 2007, reportan a *P. karwinskii* distribuida sobre diferentes especies de *Quercus spp.* (*Q. acutifolia*, *Q. laeta*, *Q. liebmannii*, *Q. obtusata*, *Q. peduncularis* y *Q. rugosa*).

Morales-Hernández *et al.*, en 2016, reportan la preferencia de diversas epífitas, entre ellas 128 orquídeas, sobre *Quercus sp.* reporte similar para *Encyclia pyriformis* (Teste *et al.*, 2017). La preferencia de las orquídeas sobre forofitos del género *Quercus sp.* puede deberse a las cortezas rugosas y sin resinas tóxicas, en contraste con otras especies de árboles con cortezas lisas, presencia de resinas o producción de glicógenos, los cuales limitan el crecimiento de las epífitas (Halle, 1999).

Los resultados de este estudio de la predominancia de *P. karwinskii* sobre *Q. deserticola* son semejantes a lo encontrado para *Laelia speciosa*, que también ha sido reportada, principalmente sobre *Q. deserticola*, lo cual indica una fuerte interacción biótica (Hálbinger y Soto, 1997; Flores-Tolentino *et al.*, 2020). Lo anteriormente mencionado, refuerza que la conservación de las especies, debe llevarse a cabo de manera conjunta y no exclusiva en el hábitat en donde se encuentran, esto quiere decir que hay que conservar de manera conjunta tanto a las orquídeas epífitas como a sus árboles hospederos y a otros organismos con quienes establecen estrechas relaciones (Fay *et al.*, 2015; Flores-Tolentino *et al.*, 2020).

El número total de individuos registrados para el presente trabajo es mayor en comparación con la población Oaxaqueña en la que se registró una abundancia de 52 organismos (Avendaño y Cruz, 2007) donde los individuos adultos predominaban. En este estudio se registraron 128 orquídeas, menos de la mitad registradas por Rodríguez (355) en 2012, quien uso una metodología similar, no obstante, en ambas

poblaciones la categoría juvenil fue la más representada, 82.03% y 70.42% respectivamente.

A pesar de que la etapa adulta puede ser la más importante, ya que contribuye a la reproducción y expansión de la especie como fue en *Guarianthe aurantiaca* (Mondragón, 2009). En *P. karwinskii* se registró tan solo el 1.56% de adultos y 16.40% de plántulas por lo que se puede sugerir que esta población sobrevive a partir de los individuos juveniles, además se podría suponer poca viabilidad de semillas, poco éxito de germinación o bajo éxito en la supervivencia de las plántulas o que la disponibilidad de polinizadores es baja por lo que tasa de polinización también lo es, teniendo como resultado un bajo reclutamiento. Lo más factible es considerar también que la fuerte extracción ilegal de adultos y en especial orquídeas en floración, está afectando fuertemente el equilibrio de esta población, lo cual la hace más vulnerable y la pone en un riesgo alto de extinción local.

El no encontrar correlación positiva entre el DAP de los forofitos y el número de individuos de *P. karwinskii*; se puede relacionar con la presencia o ausencia de plantas madre y de los hongos micorrízicos con los que se asocia *P. karwinskii* para establecerse, germinar y desarrollarse, como ha sido mencionado para otras especies de orquídeas epífitas (Mújica 2007; Otero *et al.* 2007; Mújica *et al.* 2010).

Los resultados obtenidos de la distribución sobre el tronco y la copa concuerdan con lo expuesto en estudios similares, al registrar el mayor número de individuos de orquídeas epífitas en la copa (Rodríguez, 2012; Morales-Hernández *et al.*, 2016; García-González *et al.*, 2016); lo cual se ha explicado debido a que en la copa hay más captación de luz y de humedad que favorece a las plantas epífitas (Hernández-Rosas, 2001 y Mejía *et al.*, 2008).

En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de individuos de *P. karwinskii* entre la parte basal, intermedia y distal de las ramas, con cierta tendencia en la parte distal (C) y solamente se registraron dos adultos, uno en

la parte basal de las ramas (A) y otro en la parte intermedia (B), lo cual es diferente a lo encontrado por Rodríguez en 2012, para la misma especie, en otra población cercana, en Michoacán, quien encontró significativamente mayor número de individuos en la parte B, los cuales eran adultos, juveniles y plántulas.

Se observaron ligeramente más organismos (plántulas y juveniles) en la zona C, lo cual puede deberse a que son los menos propensos a la extracción debido a la altura del árbol. Cabe mencionar que, en la población trabajada por Rodríguez en 2012, no se registró extracción de plantas.

Avendaño y Cruz en 2007, reportan la preferencia de *P. karwinskii* por establecerse en la parte superior del tronco y las ramas primarias de los forofitos, resultado similar para *Telipogon helleri* en la cual la mayor cantidad de individuos se encontraron creciendo sobre el tronco (García-González y Damon, 2013; García- González *et al.*, 2016; Sánchez, 2019).

En muchas especies de orquídeas epífitas, como son *Oncidium poikilostalix*, *Oncidium reichenheimii*, *Cuitlauzina pendula*, *Epidendrum anisatum*, *Isochilus bracteatus*, *Prosthechea cretacea*, *Rhynchosstele cervantesii*, se ha reportado mayor abundancia en la parte intermedia de las ramas (García-González, 2011; Domínguez-Gil, 2015; Herrera *et al.*, 2019).

Existen diferentes patrones reportados respecto a la orientación de diversas orquídeas epífitas, por ejemplo *T. helleri* presenta una tendencia a crecer hacia el lado noreste (García-González y Damon, 2013). Para *Ionopsis utricularioides* las orientaciones con mayor número de plantas fueron este y suroeste (García-González y Riverón-Giró, 2013), y para *Tetramicra malpighiarum* las orientaciones reportadas son sur y noroeste (García- González *et al.*, 2016).

*Prosthechea karwinskii* en la población estudiada, no muestra un patrón respecto a la orientación, semejante a lo reportado por Rodríguez en 2012, quien tampoco registra

diferencias significativas respecto a este parámetro para la misma especie. Sin embargo, aquí se observó un ligero aumento de individuos de *P. karwinskii* orientados hacia el Norte y Este, semejante a lo reportado para *Broughtonia cubensis* en González *et al.*, 2007.

Se considera que se requieren estudios a largo plazo para determinar la estacionalidad y dirección los vientos, su posible influencia en la dispersión, la temporada de lluvia y la germinación de las semillas, así como el buen desarrollo y persistencia de las plántulas (García- González y Damon, 2013).

Aunque no hubo diferencias significativas respecto a la posición de la rama de *P. karwinskii* en este trabajo, se observa una tendencia por las posiciones lateral y vertical, semejante a lo reportado por Rodríguez en 2012 quien reporta mayor número de individuos en las mismas posiciones ocupadas por las adultos, plántulas y juveniles de *P. karwinskii*, sin embargo para esta población solamente se registraron dos adultos en la posición abajo y no hay registro de adultos en las posiciones lateral y vertical, lo cual se atribuye al bajo número de ejemplares adultos encontrados (2). La posición arriba es la menos ocupada, esto puede atribuirse a que *P. karwinskii* presenta un crecimiento colgante (Solano-Gómez, 2009) y, por lo tanto, se recomienda cultivar esta planta hacia abajo o con una posición lateral o vertical, incluso aquellos ejemplares cultivados *in vitro*.

En este estudio, se observa una tendencia a una mayor cantidad de las plantas adultas y juveniles de *P. karwinskii*, sobre la corteza de *Q. deserticola* y las plántulas en musgo, lo cual concuerda con los resultados de Rodríguez en 2012 en otra población de Michoacán. Se considera que las plántulas principalmente se encuentran en musgo porque en esta etapa es necesario un sustrato que les proporcione mayor humedad ya que estas epífitas no vasculares (musgo o el líquen) probablemente favorecen el establecimiento de orquídeas epífitas (Hernández-Rosas, 2001; Damon, 2003; Hágsater *et al.*, 2005).

El obtener la mayoría de los valores sin diferencias significativas muestran probablemente y de manera directa el daño ocasionado a las poblaciones por una excesiva extracción. Durante la toma de datos los mismos habitantes de la comunidad comentaron que las plantas epífitas de la zona entre ellas *P. karwinskii* y *L. speciosa* son altamente extraídas para comercio ilegal.

## CONCLUSIONES

*Prosthechea karwinskii* se distribuye mayormente sobre *Q. deserticola*, por lo que es importante considerar a los forofitos en cualquier plan de manejo y conservación *in situ* de orquídeas epífitas

No existe correlación positiva entre el número de individuos de *P. karwinskii* y el DAP de los forofitos, probablemente debido a la presencia o ausencia de plantas madre y de los hongos micorrízicos con los que se asocia.

La especie en estudio, se establece principalmente en la copa de los forofitos, como la mayoría de las orquídeas epífitas.

*Prosthechea karwinskii* no presentó un patrón definido respecto a la distribución en las zonas de la copa, respecto a la orientación de las plantas por algún punto cardinal o en la posición sobre las ramas; sin embargo, se aprecia una tendencia de crecer hacia la zona distal de las ramas del forofito, con una orientación hacia el norte y el este; así como crecer en las posiciones “lateral” y “vertical” seguida de la posición “abajo” atribuyendo esto a su forma de crecimiento (colgante).

La corteza fue el sustrato donde mayormente se registró la presencia de *P. karwinskii*, esto se debe probablemente a que el 82.03% eran individuos juveniles y en esta etapa las plantas ya son capaces de sobrevivir sin la protección de sustratos más húmedos como el líquen y el musgo.

Se considera que el estado de conservación de la población de *P. karwinskii* estudiada, es muy precario, ya que su estructura ha sido alterada por la extracción ilegal de las plantas, afectado su abundancia y distribución natural sobre el forofito, en todas las categorías de edad consideradas, especialmente en los individuos adultos, ya que solamente se encontraron dos individuos.

Los conocimientos generados con este estudio, pueden ser útiles para un mejor manejo de *P. karwinskii*.

## RECOMENDACIONES

La extracción es probablemente el factor más importante que está afectando la supervivencia de *P. karwinskii*, por lo que se recomienda buscar alternativas para disminuir esta actividad.

Otra recomendación es realizar estudios para evaluar una posible reintroducción con plantas producidas en laboratorio con la finalidad de recuperar esta población de *P. karwinskii* en la que solo se registró 1.56% de plantas adultas, la cual es una cifra muy baja para su permanencia a largo plazo. Se considera necesario evaluar previamente la factibilidad de las cápsulas a usar, que estas cápsulas sean de la misma población o alguna muy cercana, así como la mayor cantidad de cápsulas posible de diferentes individuos (sin alterar la población original) para evitar depresión por exogamia o endogamia.

Otra acción que se considera importante, es brindar platicas en la comunidad para un manejo sustentable de la especie, enseñándoles el valor de la orquídea en el ecosistema e incluso preparar a los pobladores para protegerla de las personas que van a extraerla ya que los mismos nativos comentan que la gente de otros municipios es la que va a sacar las plantas de su hábitat natural.

## LITERATURA CONSULTADA

- Avendaño, S y Cruz, G. 2007. **Crecimiento, patrones de distribución y estructura de edades de *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) en San Vicente Lachixio, Oaxaca, México.** Memoria de residencia profesional, Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Oaxaca.
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K. Gómez-Alonso, C y Salgado-Garciglia, R. 2009. ***In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (99) 3: 335.
- Bravo-Monasterio, P y San Martín, J. 2012. **Distribución, abundancia y fenología de orquídeas en un bosque caducifolio endémico de Chile central.** Polibotánica. 33: 117-129.
- Camacho, D. E. V. 2009. **Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino de *Prosthechea aff. Karwinskii* (Orchideaceae).** Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán. México. 35 pp.
- Crawley, M.J., 2007. **The R Book.** John Wiley & Sons Ltd., Chichester. 1076 pp.
- Cruz, G. G., R. Solano G. L. Lagunez R. 2014 **Documentation of medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico.** Rev Brass Farmacogn. 24: 153-8.
- Damon, A. 2003. **Las epífitas. Ecosistemas y comunidades: procesos naturales y sociales de los bosques.** Ecofronteras. 18: 17-20.
- 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.** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis para recibir el grado de licenciado. 53 pp.
- Dressler, R. L. 2005. **How many orchid species? Selbyana. 26: 155-158.**
- Fay, M. F., T. Pailler y K. W. Dixon. 2015. **Orchid conservation: making the links.** Annals of Botany. (116)3: 377–313.
- Flores-Tolentino, M. R. García-Valdés. C. Sáenz-Romero. I. Ávila-Díaz. H. Paz y L. López-Toledo. 2020. **Distribution and conservation of species is misestimated if biotic interactions are ignored: the case of the orchid *Laelia speciosa*.** Scientific Reports. (10)1: 1-14.

- García-González, A., A. Damon. G. E. Olgún, L y J. Valle-Mora. 2011. **Population structure of *Oncidium poikilostalix* (Orchidaceae), in coffee plantations in Soconusco, Chiapas, México.** Lankesteriana International Journal on Orchidology. (11)1: 23-32.
- García-González, A y A. Damon. 2013. **Abundancia, distribución en los forofitos y producción de frutos de la primera población de *Telipogon helleri* (Orchidaceae) descubierta en México.** Revista mexicana de biodiversidad. (84)3: 894-900.
- García-González, A y F. B. Riverón-Giró. 2013. **Organización espacial y estructura de una población de *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae) en un área suburbana de Pinar del Río, Cuba.** Lankesteriana International Journal on Orchidology. (13)3: 419-427.
- García-González, A. F. B. Riverón-Giró. I. S. González-Ramírez. R. Y. Escalona, D. Y. Hernández M. y E. Palacio, V. 2016. **Ecología y estructura poblacional del endemismo cubano *Tetramicra malpighiarum* (Orchidaceae), en el Parque Nacional Desembarco del Granma, Cuba.** Lankesteriana. (16)1: 1-11.
- Granados-Sánchez D., G. López-Ríos, M. Hernández-García y A. Sánchez-Gonzales, A. 2003. **Ecología de plantas epífitas.** Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente. (9)2: 101-111.
- González, E., J. Raventós. E. Mújica y A. Bonet. 2007. **Estructura y ecología de la población del endemismo cubano *Broughtonia cubensis* (Orchidaceae), en Cabo San Antonio, Península de Guanahacabibes, provincia de Pinar del Río, Cuba.** Lankesteriana (7)3: 469-478
- Hagsater, E., M. Á. Soto, A. G. A. Salazar, C. R, Jimenez, M. M. A. López, R. y R. L. Dressler. 2005. **Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.** 304 pp.
- Halbinger, F y M. Soto. 1997. ***Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr.** Laelias of México. Orquídea (Méx.). Vol.15: 133-142. Asociación Mexicana de Orquideología, Mexico City, Mexico.
- Halle, F. 1999. **Las Interacciones bióticas. Un mundo sin invierno, los trópicos: naturaleza y sociedades.** Fondo de Cultura Económica, México, DF. 1ª ed. 116-127 pp.

- Hernández-Rosas, J. 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.
- Herrera, V. P., I. Ávila-Díaz. L. López-Toledo. L. I. Cabrera-Martínez y L. Villanueva-Camacho. 2019. **Ecological Characterization of *Oncidium reichenheimi* with regard to its conservation.** Ecology. 576-587
- Mejía, R. H. T. Pino A y N. Pino, B. 2008. **Distribución vertical de orquídeas dentro de un bosque húmedo tropical (bh-T).** Investigación, Biodiversidad y Desarrollo. (2)27: 165-174.
- Mejía, R. H. T. Pino A y N. Pino, B. **Diversidad de Orquídeas Epífitas en un Bosque Húmedo Tropical (BH-T) del Departamento del Chocó, Colombia.** Acta Biológica Colombiana. (15)2: 37-45.
- Mondragón, D. 2009. **Population viability analysis for *Guarianthe aurantiaca*, an ornamental epiphytic orchid harvested in Southeast Mexico.** Plant Species Biology. 24: 35-41.
- Morales-Hernández, J. L., F. D. J. González-Razo y M. A. Pérez-Chávez. 2016. **Caracterización de las orquídeas epífitas y sus forofitos en el Parque Ecológico Universitario “José Mariano Mociño” de la Universidad Autónoma del Estado de México.** Polibotánica. 42: 103-119.
- Mújica, B. E. 2007. **Ecología de las orquídeas epífitas *Broughtonia cubensis* (Lindley) Cogniaux, *Dendrophylax lindenii* (Lindley) Bentham et Rolfe y *Encyclia bocourtii* Mújica et Pupulin en el Cabo San Antonio, Península de Guanahacabibes, Cuba. Análisis espacio-temporal e implicaciones del impacto de un fenómeno atmosférico severo.** Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de Alicante, España.
- Mújica, E., Raventós, J y González, E. 2010. **Análisis de la selección de sustrato por parte de *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae) en Cabo San Antonio, Península de Guanahacabibes, Pinar del Rio, Cuba.** Lankesteriana. (9)3: 533-540.
- Otero, J. T., N. S. Flanagan. E. A. Herre. E. A. J.D. Ackerman Y P. Bayman. 2007. **Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the**

- neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae).** American Journal of Botany. (94)12: 1944-1950.
- Pérez, D. V. A. 2013. **Sistema de apareamiento, caracterización ecológica in vitro de *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex (Orchidaceae).** Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 116 pp.
- Robalino, S. M. I. S. 2019. **Aislamiento y Determinación de la Estructura Molecular de Metabolitos Secundarios de *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae).** Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 41 pp.
- Rodríguez, C. L. L. 2012. **Patrones de distribución vertical y horizontal de la epífita endémica *Prosthechea aff. karwinskii* (Orchidaceae) en Michoacán, México.** Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 49 pp.
- Rojas-Olivos A., R. Solano-Gómez. B. Jiménez-Estrada y L. Lagunez-Rivera. 2014. **Antioxidant Capacity of *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) Extraxts Obatin by Sonification.** (4)3.
- Sánchez, V. R. 2019. **Listado y Caracterización ecológica de las orquídeas epífitas del bosque mesófilo de montaña de la Estación “Vasco de Quiroga” en Uruapan, Michoacán, México.** Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 59 pp.
- Solano, G., R. y Huerta, E. H. 2019. **Método de Evaluación de Extinción De las Especies Silvestres en México. Propuesta de inclusión en la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010: *Prosthechea karwinskii* en la categoría de Sujeta a Protección Especial (Pr).** 19 pp.
- Soto-Arenas, M. A., E. Hágsater. R. Jiménez, M. y R. Solano G. 2007. **Las orquídeas de México.** Herbario AMO-Instituto Chinoin, A.C. y Centro Interdisciplinario de Investigaciones para el Desarrollo Integral Regional-Unidad-Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. Informe final SNIB CONABIO proyecto No. P107. México D.F.

Testé, E., L. Orihuela, P. W. Díaz, G. R. Serrano, V. E. Fernández, G. V. Pérez, H. B. Falcon. A. Palmarola y L. González-Torres. 2017. **Estructura poblacional de *Encyclia pyriformis* (Orchidaceae) en Los Pretiles, Pinar del Río, Cuba.** Revista del Jardín Botánico Nacional. 38: 133-138.

## CAPÍTULO 2

### Composición química de las fragancias florales de *Prosthechea karwinskii* y su relación con la atracción de polinizadores

#### INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen un valor comercial alto, debido a su utilidad en la elaboración de colorantes, saborizantes, en la farmacéutica e incluso por sus fragancias. Estas últimas son actualmente muy utilizadas en la industria de la perfumería (Méndez, 2014), no obstante, en la naturaleza, las plantas usan la liberación de estas fragancias como estrategia de supervivencia, para repeler insectos o detener la colonización de bacterias y hongos fitopatógenos, así como para atraer enemigos naturales de herbívoros (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007; Raguso, 2008). Además, las fragancias también sirven de atracción para los polinizadores, teniendo como resultado una efectiva transferencia de polen, la reducción en la pérdida de polen y el mantenimiento de barreras reproductivas entre las especies (Grant, 1994) y por lo tanto jugando un papel importante en la reproducción (Gershenzon, y Gershenzon y Dudareva, 2007; Tholl, 2015). La producción de estos metabolitos especializados se da principalmente en hojas y flores, siendo las fragancias que se producen en las flores el principal atractivo para polinizadores (Brown, 2005; Dudareva y Pichersky, 2000), los cuales usan como recurso alimenticio a la flor, y también como refugio y lugar de apareamiento (Calvo, 2014).

Las orquídeas tienen una amplia gama de mecanismos para la atracción de polinizadores, como la liberación de compuestos volátiles, que atraen al polinizador en busca de néctar (Grajales-Conesa, 2011). De las 25,000 especies reconocidas a nivel mundial, aproximadamente 10,000 utilizan el engaño (Brown, 2005; Dudareva y Pichersky, 2006) consiguiendo que el insecto transporte las polinia de una flor a otra, logrando polinización cruzada y por lo tanto aumentando la probabilidad de supervivencia de la planta. Algunas flores del género *Orchis* imitan morfológicamente a la hembra de los polinizadores, quienes al intentar copular a la flor la polinizan

(Jersáková *et al.*, 2006). La flor libera una fragancia con alto contenido de ipsdienol, el cual está relacionado con la feromona femenina de ciertas abejas euglosinas (Salzmann *et al.*, 2007). Se ha visto que una gran variedad de compuestos liberados por las flores son una importante señal para polinizadores los cuales realizan una percepción en el aprendizaje del aroma (Dudareva y Pichersky, 2000).

Los polinizadores más comunes de las flores de las orquídeas son algunos himenópteros como las abejas y las avispas, aunque también se han reportado lepidópteros, dípteros y coleópteros (Tremblay *et al.*, 2005; Micheneau *et al.*, 2010). Por ejemplo, especies de orquídeas como *Gimnadenia*, *G. conopsea* y *G. odoratissima* son polinizadas por lepidópteros atraídos por aromas constituidos por esteroides, aldehídos y fenoles (Huber *et al.*, 2005).

Algunos volátiles de las fragancias de las flores del género *Encyclia* (eugenol, vainillina, benzoato de bencilo y metil salicilato) son atractivos importantes para las abejas euglosinas. No obstante, Cancino y Damon en 2006, reportan algunos terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) y al menos un éster y un alqueno como constituyentes mayoritarios de las fragancias atractivos para las especies de este género. Así mismo, se reportan sesquiterpenos como los constituyentes mayoritarios de los aromas florales de *Maxillaria tenuifolia* y las lactonas ( $\gamma$ -nonalactona) como las responsables del olor a coco (Perraudin *et al.*, 2006).

Por otra parte, se han reportado aromas que contienen *p*-metil anisol, E-ocimeno, oxoforono,  $\alpha$ -farneseno y bencil benzonato como compuestos mayoritarios producidos por especies del género *Prosthechea* excepto para *P. cochleata* (Cancino y Damon, 2006), la cual produce aromas que contienen pseudocumeno, nonanal y el mesitileno, como compuestos volátiles más abundantes a las 8:00 y 16:00 h (Ray *et al.*, 2018). Se cree que las especies del género *Prosthechea* son polinizadas por abejas y avispas, no obstante, se ha visto que *P. vitellina* es visitada por colibríes (Hágsater *et al.*, 2005).

Para el estudio de estos aromas existen diferentes técnicas de extracción de volátiles: destilación por arrastre de vapor, destilación a presión reducida, ultrasonido, extracción por líquido sobre calentado (Mijangos, 2010) entre otros. La técnica actualmente más usada es la extracción de volátiles por *headspace* (HS), la cual permite un muestreo selectivo que no afecta la naturaleza de la muestra. Esta técnica puede ser dinámica o estática. En el *headspace* dinámico la muestra se mantiene en un recipiente inerte por donde se hace pasar un gas inerte o simplemente aire, a través de unos filtros de carbón activado durante el período de muestreo. En este método se requiere un control del tiempo de muestreo y de la velocidad del gas. Y en la técnica *headspace* estático, la toma de volátiles se realiza en un vial totalmente cerrado después de que la muestra ha alcanzado el equilibrio con su vapor. En este método se requiere un estricto control de la temperatura de equilibrio, tiempo y presión (Bicchi y Joulain 1990).

La captura de compuestos volátiles en plantas, en especial en flores no es algo reciente, no obstante, para el 2006 tan solo el 1.6% de los trabajos publicados de fragancias florales eran de orquídeas, por lo que es de suma importancia realizar más investigaciones de este tipo y generar conocimiento básico que puede ser útil para inferir de manera indirecta el tipo de polinizadores y su actividad, favoreciendo una mayor reproducción de las orquídeas, un manejo sustentable y con ello la conservación de dichas plantas.

*Prosthechea karwinskii* es una orquídea endémica de México, que ha sido reportada en, Guerrero, Morelos, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Michoacán (Solano y Huerta, 2019). En este último estado con tres poblaciones, aunque no se conoce el estado actual de cada una de las poblaciones se sabe que grandes cantidades de individuos son extraídos de su hábitat natural debido a su uso ornamental y en ceremonias religiosas (Solano-Gómez *et al.*, 2010), lo cual aunado a la destrucción de sus hábitats ha motivado a incluirla en la norma oficial vigente en la categoría de protección especial (SEMARNAT, 2010; Solano y Huerta, 2019).

Pantaleón en 2011 realizó un estudio de las fragancias florales de esta especie en tres muestras procedentes de una población de Oaxaca, encontrando al nerol oxido, nerol, shisofuran, ipsdienol, como compuestos mayoritarios.

En Michoacán, Camacho en 2009 realizó un estudio sobre su sistema de apareamiento y éxito reproductivo, encontrando que es dependiente de polinizadores para su reproducción sexual, con un sistema de apareamiento mixto, preponderantemente exógama y con un bajo éxito reproductivo. También se ha trabajado otros aspectos de su ecología, como son: la relación con sus forofitos, su distribución horizontal y distribución de acuerdo a la posición en las ramas, orientación, sustratos, entre otros (Avendaño y Cruz, 2007; Rodríguez, 2012; Díaz-Bedolla, en proceso). Cabe mencionar que no se conoce nada sobre sus polinizadores a pesar de muchas horas de observación en las poblaciones trabajadas, por lo cual se planteó la realización de este estudio en el que se analiza y se estudia las fragancias florales producidas por *P. karwinskii* de una población de Indaparapeo, Michoacán; usando la técnica *headspace* dinámico con el propósito de identificar los compuestos volátiles que componen su fragancia floral como una forma indirecta de investigar sus posibles polinizadores.

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los compuestos volátiles presentes en las flores en antesis de *P. karwinskii* de una población en Michoacán? ¿A qué hora liberan más compuestos volátiles las flores de *P. karwinskii*?

## HIPÓTESIS

La fragancia floral de *P. karwinskii* está constituida principalmente por terpenos como mono y sesquiterpenos.

La liberación de una mayor cantidad de compuestos volátiles de *P. karwinskii* es por la mañana.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición química de *P. karwinskii* de una población de Michoacán.

Objetivos específicos:

- Identificar los compuestos volátiles presentes en las fragancias florales de *P. karwinskii* usando la técnica *headspace* dinámico.
- Determinar la hora de mayor liberación de compuestos volátiles florales
- Relacionar los compuestos identificados con los reportados para otras especies de orquídeas asociados con sus polinizadores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de seis plantas con flor se colectaron en una población de *P. karwinskii* en el municipio de Indaparapeo en Michoacán. Las plantas se cortaron un día antes del experimento, mantuvieron bajo sombra y en un ambiente ventilado y se trasladaron al laboratorio de Ecología Química y Agroecología en el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad donde se realizó la extracción y análisis de los compuestos volátiles. Después de realizar la extracción de volátiles, las flores fueron separadas del forofito, se pesaron y se pusieron a secar dentro de un horno de secado a 80°C durante 24 horas y se volvieron a pesar. De esta manera se obtuvo el peso en fresco y el peso en seco de cada muestra. Este último se utilizó para calcular la concentración de los compuestos en la muestra.

### Extracción de compuestos volátiles.

La extracción de compuestos volátiles se realizó en dos días usando la técnica *headspace* dinámico, de las 9:00 a las 13:00 h y de las 14:00 a las 18:00 h. Se colectaron los volátiles de 3 plantas el primer día y de 3 plantas el segundo día (Fig. 9). Las orquídeas se colocaron de forma colgante con un soporte de metal, cubriendo solamente la flor con una bolsa de plástico para hornear pavo (Reynolds®) sujetándola con alambre plastificado. La bolsa fue perforada por un extremo con un cartucho de carbón activado para filtrar el aire que entraba al sistema (Figura 10a); y por el otro extremo con un cartucho Supelco ORBO Porapak 20063 para capturar los volátiles (Fig. 10b). Este cartucho se conectó a un sistema de vacío con una manguera de silicón. El flujo del sistema de vacío fue de 100 mL/min durante 4 horas.

Posteriormente se realizó una desorción química con 1mL de hexano que contenía estándar interno (tetradecano) a una concentración de 0.125 mg/mL. La mezcla se agito vigorosamente en el vortex durante 5 minutos, se extrajo el sobrenadante con una micropipeta y se transfirió a otro vial; esta solución fue concentrada a un volumen final de 200 µl bajo una corriente suave de nitrógeno gaseoso.



Figura 9. Algunos de los ejemplares con flor de *P. karwinskii* usados en la captura de volátiles. Fotos: Diaz-Bedolla C.



Figura 10 a. Captura de volátiles de *P. karwinskii* por la técnica headspace dinámico.  
Figura 11 b. Cartuchos Supelco ORBO Porapak 20063. Fotos: Diaz-Bedolla C.

Análisis químico por cromatografía de gases.

Los compuestos volátiles de *P. karwinskii* extraídos se analizaron por medio de una inyección con flujo con división en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890) acoplado a un detector de masas (Agilent 5793). Se inyectaron 2  $\mu$ l de cada una de las muestras (Fig. 11) en modo split (20:1) con una temperatura en el puerto de inyección de 300°C, usando una columna no polar HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m) a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: una temperatura inicial de 40°C durante 5 min, seguida de un aumento de 15°C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 280°C para mantenerla durante 5 minutos. El espectrómetro de masas se mantuvo a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, con un voltaje de ionización de 70eV y una temperatura de interfase de 280°C. El análisis se hizo en modo Scan a un rango de masas de 50-550  $m/z$  y con retardo del disolvente de 3.5 min.

La identificación de compuestos se realizó por comparación de espectros con los reportados por la Biblioteca NIST02 usando el Software Data Analysis. Se revisó la pureza de pico aceptando la identidad de los compuestos con pureza de pico de uno y con concordancia por arriba del 90%. Para validar esta identificación se calcularon Índices de Retención experimentales inyectando 1  $\mu$ L de una serie de alcano C8-C20 en las mismas condiciones en que se analizaron las muestras. Estos Índices de Retención fueron comparados con los reportados en la literatura (Adams, 2007).

La concentración de los volátiles se calculó por el método de estándar interno: relacionado el área bajo la curva de cada compuesto con el área del tetradecano. Esta concentración se relacionó con el peso de la muestra para reportarla en microgramos por gramo de muestra de peso seco.



Figura 11. Jeringa de inyección para cromatografía de gases, vial etiquetado con la muestra de los volátiles de *P. karwinskii*. Fotos: Diaz-Bedolla C.

## RESULTADOS

Se registraron un total de 18 compuestos volátiles de los cuales 15 fueron monoterpenos, un sesquiterpeno, un ácido graso y un éster. Los compuestos mayoritarios fueron: ipsdienol (28.6%), linalol (25%), citronelol (19.4%), constituyendo el 73% del total de los compuestos (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos volátiles identificados en *P. karwinskii* de Indaparapeo Michoacán.

	Compuesto	IK exp	IK teo	%	Tipo de compuesto
1	$\alpha$ -pineno	937	932	1.3	Monoterpeno
2	$\beta$ -pineno	941	974	0.8	Monoterpeno
3	$\beta$ -mirceno	954	988	5.0	Monoterpeno
4	1,7-Octadieno, 3,6-dimetileno-	962	990	0.2	Monoterpeno
5	4-careno	964	1004	0.2	Monoterpeno
6	D-Limoneno	965	1024	0.5	Monoterpeno
7	Eucaliptol	965	1026	0.6	Monoterpeno
8	Z-b-Ocimeno	967	1032	0.1	Monoterpeno
9	E- $\beta$ -Ocimeno	969	1044	7.7	Monoterpeno
10	3,8-p-Mentadieno	980	1076	4.7	Monoterpeno
11	<b>Linalol</b>	982	1095	<b>25.0</b>	Monoterpeno
12	Ácido octanoico, éster metílico	987	1128	0.2	Ácido graso
13	<b>Ipsdienol</b>	994	1140	<b>28.6</b>	Monoterpeno
14	<b>Citronelol</b>	1021	1223	<b>19.4</b>	Monoterpeno
15	Geraniol	1032	1249	2.8	Monoterpeno
16	Citral	1039	1316	0.2	Monoterpeno
17	Ácido decanoico, éster metílico	1057	1328	2.3	Éster
18	Cariofileno	1104	1417	0.2	Sesquiterpeno

Donde IK exp son los índices de retención determinados experimentalmente; IK teo son los índices de retención reportados en la literatura (Adams, 2007). Se muestra el porcentaje promedio (n=6) y el tipo de compuesto orgánico

La mayor emisión de volátiles fue en un periodo de las 9:00 a las 13:00 h (Tabla 4), para todas las muestras analizadas.

Tabla 4. Concentración promedio en  $\mu\text{g/g}$  de diferentes compuestos volátiles en *P. karwinskii* de Indaparapeo Michoacán  $n=6$  a dos diferentes horarios: 9:00-13:00 h y 14:00-18:00 h.

Pico	RT	Compuesto	IK exp	IK teo	Abundancia ( $\pm$ EE) 09:00-13:00 h	Abundancia ( $\pm$ EE) 14:00-18:00 h
1	6.44	$\alpha$ -pineno	937	932	$2.1 \pm 0.6$	$0.3 \pm 0.2$
2	6.59	$\beta$ -pineno	941	974	$1.5 \pm 1.5$	$0.2 \pm 0.0$
3	7.13	$\beta$ -mirceno	954	988	<b><math>25.4 \pm 15.0</math></b>	$1.7 \pm 3.4$
4	7.47	1,7-Octadieno, 3,6-dimetileno-	962	990	$1.1 \pm 0.8$	$1.7 \pm 0.0$
5	7.55	4-careno	964	1004	$1.6 \pm 1.3$	$0.0 \pm 0.0$
6	7.59	D-Limoneno	965	1024	$1.5 \pm 0.9$	$0.0 \pm 0.0$
7	7.60	Eucaliptol	965	1026	$1.9 \pm 1.3$	$0.5 \pm 0.7$
8	7.66	Z-b-Ocimeno	967	1032	$0.6 \pm 0.6$	$0.5 \pm 0.0$
9	7.75	E- $\beta$ -Ocimeno	969	1044	<b><math>14.7 \pm 12.4</math></b>	$0.4 \pm 0.4$
10	8.21	3,8-p-Mentadieno	980	1076	$10.4 \pm 7.7$	$0.5 \pm 0.2$
11	8.31	Linalol	982	1095	<b><math>72.7 \pm 26.8</math></b>	$6.0 \pm 11.5$
12	8.50	Ácido octanoico, éster metílico	987	1128	$0.8 \pm 0.4$	$5.9 \pm 0.2$
13	8.78	Ipsidienol	994	1140	<b><math>83.2 \pm 27.4</math></b>	$8.2 \pm 15.6$
14	9.46	Citronelol	1021	1223	<b><math>69.0 \pm 32.8</math></b>	$15.8 \pm 15.4$
15	9.69	Geraniol	1032	1249	<b><math>14.6 \pm 10.8</math></b>	$7.7 \pm 0.0$
16	9.83	Citral	1039	1316	$0.8 \pm 0.6$	$0.0 \pm 0.0$
17	10.18	Ácido decanoico, éster metílico	1057	1328	$6.4 \pm 2.3$	$0.8 \pm 1.0$
18	11.11	Cariofileno	1104	1417	$0.6 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.2$

Donde TR, es el tiempo de retención en la columna; IK exp son los índices de retención determinados experimentalmente y IK teo son los índices de retención reportados en la literatura (Adams, 2007).

Los compuestos mayoritarios fueron: ipsdienol, linalol, citronelol,  $\beta$ -mirceno, E- $\beta$ -ocimeno y geraniol a las 9:00 y ipsdienol, citronelol y linalol a las 14:00 con abundancias menores a las de los compuestos registrados en las muestras de la mañana (Fig.12).

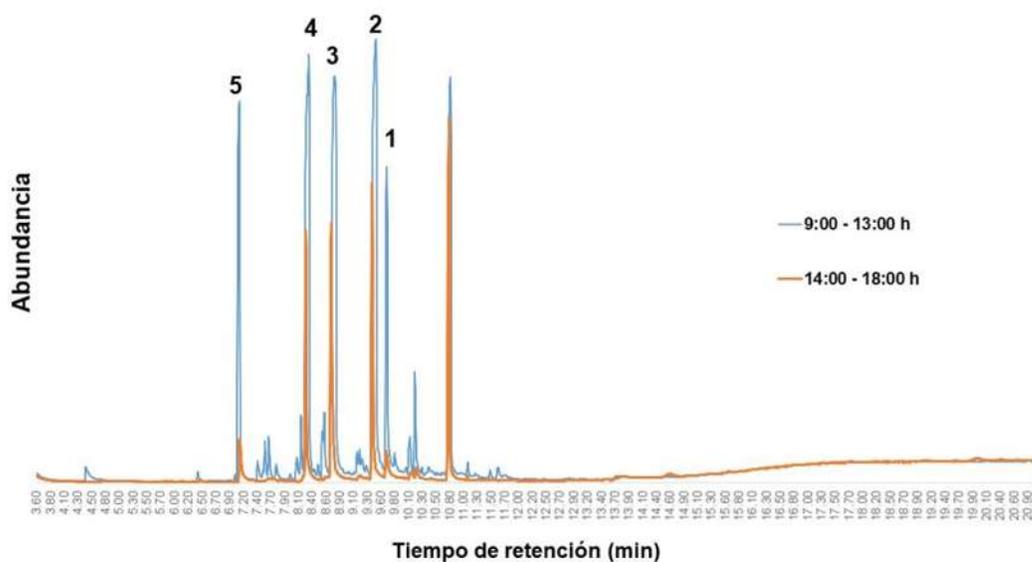


Figura 12. Ejemplo de perfiles cromatográficos (9:00 h y 14:00 h) de una muestra de las fragancias florales de *P. karwinskii*. 1: Geraniol, 2: Citronelol, 3: Ipsidienol, 4: Linalol y 5:  $\beta$ -Mirceno.

Las muestras analizadas el primer día (Fig.13a), presentaron menor liberación de compuestos, respecto a las analizadas el segundo día (Fig.13b).

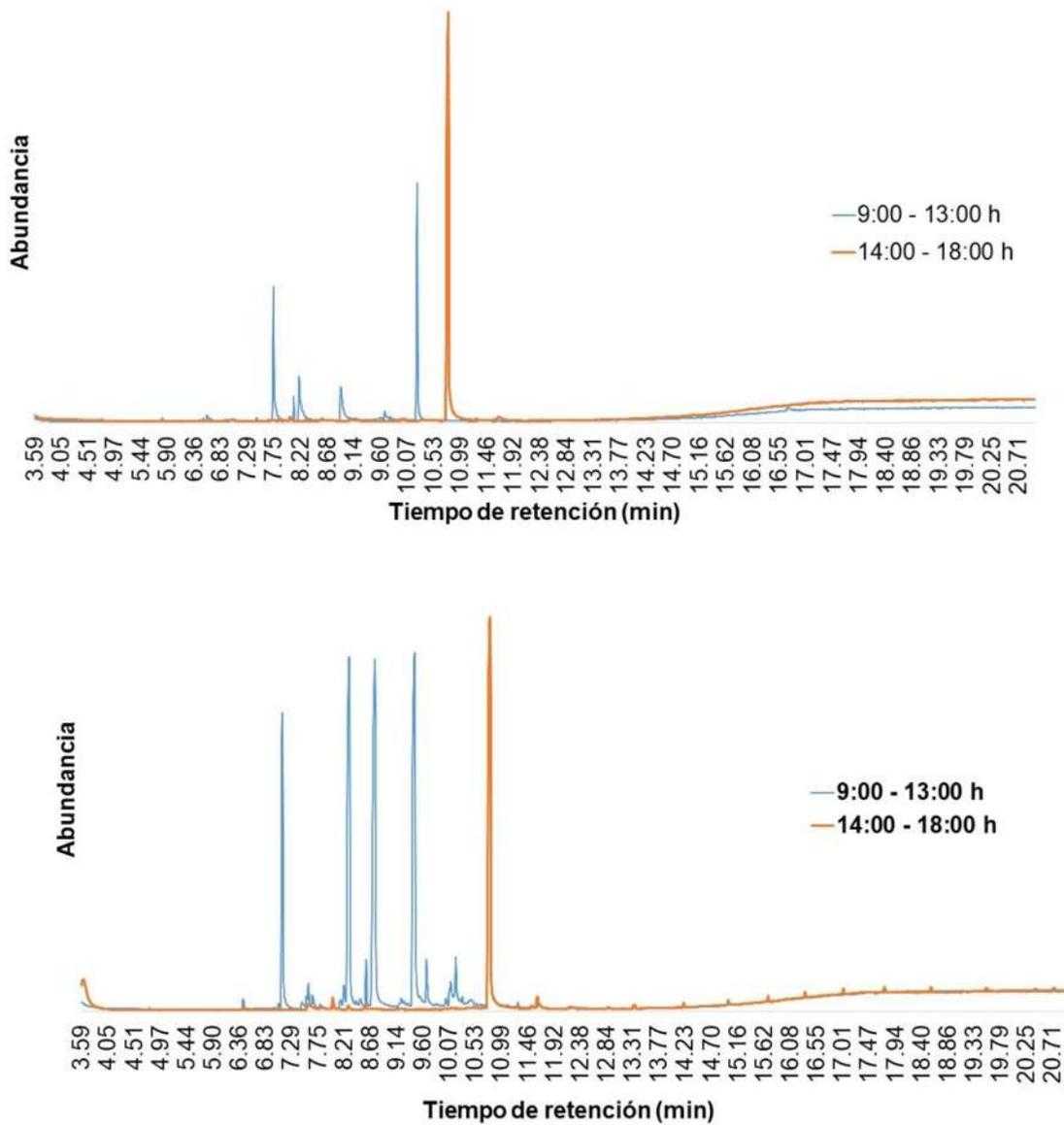


Figura 13. Perfiles cromatográficos de las fragancias florales de *P. karwinskii* en el primer día (cromatograma superior) y segundo día (cromatograma inferior).

## DISCUSIÓN

De los 18 compuestos identificados en este estudio, cuatro (limoneno, linalol, ipsdienol y cariofileno) fueron reportados por Pantaleón en 2011 en un estudio realizado con la misma especie en Oaxaca. En este estudio se identificaron 14 compuestos más, entre los que sobresalen: ipsdienol, linalol, citronelol,  $\beta$ -mirceno, E- $\beta$ -ocimeno y geraniol (Tabla 4). Esta diferencia puede ser probablemente debido al tamaño de muestra (tres muestras en Pantaleón, 2011 y seis muestras en este trabajo). Se considera que el tamaño de muestra en esta investigación, es suficiente, ya que son los mismos compuestos en todas las flores.

Los compuestos  $\alpha$ -pineno, E- $\beta$ -ocimeno, limoneno, linalol, y  $\beta$ -myrceno son de los 5 compuestos más comunes en plantas (Knudsen *et al.*, 2006), todos estos están presentes en la fragancia de *P. karwinskii* identificados en este estudio. Dos de los compuestos anteriormente mencionados se han reportado como mayoritarios para *P. cochleata*: E-  $\beta$ -ocimeno y  $\alpha$  -pineno, el cual también se ha registrado en *Stelis quadrifida* (Damon *et al.*, 2002)

De los compuestos reportados en este estudio, el ipsdienol es uno de los compuestos que presenta actividad biológica, el cual tiene la función de atraer a abejas (Whitten, 1988; Salzmann *et al.*, 2007 y Parra- Tabla *et al.*, 2009). Algunas especies de euglosidos como: *Andrena nigroaenea* y *A. limata* son polinizadores de *Ophrys sphegodes* subsp. *sphogodes* mientras que *O. bertolonii* subsp. *benacensis* tiene un polinizador más específico (*Chalicodoma parietina*; Manzo *et al.*, 2014), sin embargo, ambas especies presentan compuestos terpenoides ( $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno, limoneno y cariofileno) los cuales son característicos en flores que son polinizadas por abejas. Por lo anteriormente mencionado y en base a que el ipsdienol es el compuesto más abundante (28.6% del total), así como también la presencia de  $\alpha$ -pineno (1.3%), limoneno (0.5%) y cariofileno (19.4%), se propone que *P. karwinskii* en la población estudiada es polinizada por abejas.

Por otro lado el linalol está presente en especies como *P. karwinskii* (Pantaleón, 2011) y *Catasetum galeritum* (Milet-Pinheiro *et al.*, 2018), en esta última se ha registrado la visita de abejas euglosinas macho sobre flores femeninas, siendo por lo tanto un compuesto atractivo para algunas especies de algunos géneros de euglosidos: *Euglossa*, *Eufriesea* y *Eulaema* (Ramírez *et al.*, 2002); e incluso este compuesto forma parte del aroma floral de flores del género *Silene* polinizadas por palomillas (Jurgens *et al.*, 2002), lo cual podría apoyar que *P. karwinskii* puede ser polinizada por abejas.

Como ya se mencionó con anterioridad el citronelol fue uno de los tres compuestos mayoritarios en *P. karwinskii*, mismo compuesto reportado por Kaiser en 1993 quien reporta al citronelol como mayoritario para *Brassavola digbyana*, *B. glauca*, *B. nodosa*. El citronelol es un componente del aceite esencial de citronela. La citronela es un efectivo repelente para insectos y para el crecimiento de otras plantas (Ganjewala, 2009), por lo que probablemente este compuesto tenga también una función protectora para esta especie.

Otros compuestos que se encontraron presentes en las muestras de *P. karwinskii*, que han sido reportado en otras especies y que además tienen funciones biológicas en la polinización son: ocimeno componente principal de los aromas florales de algunas especies del género *Brassavola* (Kaiser, 1993), linalol, mirceno y limoneno (Salzmann *et al.*, 2007 y Parra-Tabla *et al.*, 2009), el limoneno es uno de los compuestos que se encuentra en la fragancia floral del mango (*Mangifera indica*) y a pesar de que son bajas las respuestas se sabe que tiene relación en la atracción del escarabajo *Epitragus sallaei*, por lo que podría existir la posibilidad de que *P. karwinskii* atrae himenopteros y también alguna especie de coleóptero como lo reportan Ray *et al.*, en 2019 para *Encyclia tampensis*.

El haber encontrado una mayor emisión de volátiles el segundo día, en todas las plantas trabajadas, sugiere que esta especie requiere de al menos un día para aclimatarse y obtener una extracción mejor. Se considera que lo óptimo sería realizar la extracción de los volátiles directamente en campo.

El registrar una mayor emisión de compuestos volátiles en todas las flores y días trabajados a las 9:00 h, sugiere que los polinizadores de *P. karwinskii* presentan una mayor actividad durante la mañana.

Para poder proteger cualquier organismo se requiere conocer su biología, esto incluye la interacción que tiene con otros organismos en su medio, de aquí la importancia de conocer los polinizadores de las orquídeas, y es de mayor importancia cuando se sabe que la mayoría de las orquídeas presentan polinizadores específicos.

Conocer el polinizador específico de cierta especie es trabajo arduo y complejo por lo que el análisis de la captura de volátiles florales es paso importante para conocer más sobre su polinización de manera indirecta y por lo tanto no debe excluirse de los trabajos de observaciones visuales y directas de polinizadores en campo.

## CONCLUSIONES

Se logró identificar las fragancias florales de *P. karwinskii* de Indaparapeo, a través de la técnica *headspeace* dinámico, la cual es adecuada para obtener los volátiles de distintas especies de plantas por la forma poco invasiva de trabajar con el organismo de estudio.

Se colectaron 18 compuestos del aroma floral de esta especie, de los cuales más del 83% fueron monoterpenos, como era de esperarse.

De las 9:00 a las 13:00 h fue el periodo de mayor emisión de los compuestos volátiles, por lo que se propone que la mañana es la mayor actividad de los polinizadores.

Los compuestos mayoritarios fueron ipsdienol, linalol, citronelol, los cuales han sido registrados para otras especies tanto de orquídeas como de otras familias de plantas con flor y están relacionados con diversos polinizadores entre los que sobresalen las abejas, por lo que, en base a los resultados obtenidos en el presente estudio y los compuestos volátiles registrados en la literatura consultada, se sugiere que los polinizadores de *P. karwinskii* son abejas.

## RECOMENDACIONES

De ser posible, se recomienda que las orquídeas se extraigan con el tronco de donde están sujetas para no desprenderlas y dañar las raíces. Los ejemplares que vayan a usarse como replicas en experimentos posteriores deben ser del mismo tamaño y de la misma madurez para evitar disparidades en los resultados de los análisis individuales. Además, se sugiere que se repita el experimento con la misma cantidad de muestras durante tres días, esto generara más certeza en los resultados.

Para un mejor resultado, se recomienda hacer la captura lo más pronto posible después de haber desprendido la planta del forofito, así se evitará que la liberación de los compuestos se modifique por el estrés que la planta presenta. Si la planta se desprende del forofito mucho antes de ser usada en los experimentos se recomienda que se mantenga en un lugar con humedad y luz similares a las de su hábitat natural.

De ser posible se recomienda que la extracción de los compuestos volátiles sea directamente en campo, esto evitara que la planta sufra estrés durante la extracción de su hábitat natural y al momento de ser transportada al laboratorio, de esta manera se lograra obtener la abundancia real durante el proceso de la captura de los volátiles.

## LITERATURA CONSULTADA

- Adams, R. P. 2007. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 788 pp.
- Avendaño, S y Cruz, G. 2007. **Crecimiento, patrones de distribución y estructura de edades de *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) en San Vicente Lachixio, Oaxaca, México**. Memoria de residencia profesional, Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Oaxaca.
- Bicchi, C. y D. Joulain, 1990. **Review headspace-gas chromatographic analysis of medicinal and aromatic plants and flowers**. Flavour and Fragrance Journal. (5)3: 131-145.
- Brown, P. M. 2005. **Wild orchids of Florida: With references to the Atlantic and Gulf coastal plains**. Gainesville: University Press of Florida. 432 pp.
- Calvo I. L. M. 2014. **Aromas Florales Ecología y Evolución**. Herbario CICY. 6: 77-79.
- Camacho, D. E. V. 2009. **Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino de *Prosthechea aff. Karwinskii* (Orchideaceae)**. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán. México. 35 pp.
- Cancino, A. D. M. y A. Damon. 2006. **Comparison of floral fragrance components of species of *Encyclia* and *Prosthechea* (Orchidaceae) from Soconusco, southeast Mexico**. Lankesteriana. (6)3: 83-89.
- Dudareva, N. y E. Pichersky. 2000. **Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents**. Plant physiology. (122)3: 627-634.
- Dudareva, N. y E. Pichersky. 2006. **Biology of floral scent**. Eds. CRC press. Taylor and Francis. CRC press.
- Damon, A. 2002. **Analysis of the fragrance produced by the epiphytic orchid *Anathallis (Pleurothallis) racemiflora* (Orchidaceae) in the Soconusco region, Chiapas, Mexico**. Lindleyana. 17: 93-97.
- Ganjewala, D. 2009. **Cymbopogon essential oils: Chemical compositions and bioactivities**. International Journal of Essential Oil Therapeutics. 3: 56-65.

- Grant, V. 1994. **Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms.** Proceedings of the National Academy of Sciences. (91)1: 3-10.
- Gershenzon, J. y N. Dudareva. 2007. **The function of terpene natural products in the natural world.** Nature chemical biology. 3(7): 408-414.
- Grajales-Conesa, J., V. Meléndez-Ramírez y L. Cruz-López, L. 2011. **Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores.** Revista mexicana de biodiversidad. (8)24: 1356-1367.
- Hagsater, E., M. Á. Soto, A. G. A. Salazar, C. R. Jimenez, M. M. A. López, R. y R. L. Dressler. 2005. **Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.** 304 pp.
- Huber, F. K., Kaiser, R. Sauter, W y Schiestl, F. P. 2005. **Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae).** Oecologia. (142) 4: 564-575.
- Jersakova, J., S. D. Johnson y P. Kindlmann. 2006. **Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids.** Biological reviews. (81)2: 219-235.
- Jurgens, A., T. Witt y G. Gottsberger. 2002. **Flower scent composition in night-flowering *Silene* species (Caryophyllaceae).** Biochemical Systematics and Ecology. (30)5: 383-397.
- Kaiser, R. 1993. **The scent of orchids: olfactory and chemical investigations.** Elsevier Science Publishers BV. 264 pp.
- Knudsen, J. T., R. Eriksson. J. Gershenzon y B. Stahl. 2006. **Diversity and distribution of floral scent.** The botanical review. (72)1: 1-120.
- Manzo, A., S. Panseri. I. Vagge y A. Giorgi. 2014. **Volatile fingerprint of Italian populations of Orchids using solid phase microextraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry.** Molecules 19: 7913-7936.
- Marín-Loaiza, J. y C. Céspedes. 2007. **Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro.** Revista Fitotécnica Mexicana. 30: 327-351.
- Méndez V. J. 2014. **Los compuestos químicos, esencia y aroma de las plantas.** Depto. De Química. Contactos. 92: 21–25.

- Micheneau, C., J. Fournel. B. H. Warren. S. Hugel. A. Gauvin-Bialecki. T. Pailler. D. Strasberg y M. W. Chase. 2010. **Orthoptera, a new order of pollinator**. *Annals of botany*. (105)3. 355-364.
- Mijangos R. O. F. 2010. **Optimización de métodos de extracción y caracterización de la fracción de *Prosthechea karwinskii* y *Prosthechea varicosa***. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Oaxaca, Mexico. 62 pp.
- Milet-Pinheiro, P., J. B. Silva, F. D. M. A. F. Navarro. I. C. S. Machado y G. Gerlach. 2018. **Notes on pollination ecology and floral scent chemistry of the rare neotropical orchid *Catasetum galeritum* R chb. f.** *Plant Species Biology*. (33)2: 158-163.
- Pantaleón, B. X. 2011. **Análisis químico de las fragancias producidas por las orquídeas *Prosthechea varicosa* y *Prosthechea karwinskii* para la identificación de compuestos volátiles**. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Oaxaca, Mexico.
- Parra-Tabla, V., L. Abdala-Roberts. J. Rojas, C. J. Navarro y L. Salinas-Peba. 2009. **Floral longevity and scent respond to pollen manipulation and resource status in the tropical orchid *Myrmecophila christinae***. *Plant Systematics and Evolution*. ( 282)1-2: 1-11.
- Perraudin, F., J. Popovici y C. Bertrand. 2006. **Analysis of headspace-solid microextracts from flowers of *Maxillaria tenuifolia* Lindl. by GC-MS**. *Electronic Journal of Natural Substances*. 1: 1-5.
- Raguso, R. A. 2008. Wake up and smell the roses: **The ecology and evolution of floral scent**. *Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics* 39:549-569.
- Ramírez, S., R. L. Dressler y M. Ospina. 2002. **Abejas euglosinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología**. *Biota colombiana*. (3)1.
- Ray, H. A., C. J. Stuhl y J. L. Gillett-Kaufman. 2018. **Floral fragrance analysis of *Prosthechea cochleata* (Orchidaceae), an endangered native, epiphytic orchid, in Florida**. *Plant signaling & behavior*. (13)1.
- Rodríguez, C. L. L. 2012. **Patrones de distribución vertical y horizontal de la epífita endémica *Prosthechea aff. karwinskii* (Orchidaceae) en Michoacán, México**.

- Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 49 pp.
- Salzmann, C., A. Nardella. S. Cozzolino y F. Schiestl. 2007. **Floral scent in food-deceptive orchids: species specificity and sources of variability.** Plant Biology. 9:720-729.
- Solano G. R., G. Cruz L. A. Martínez F. y L. Lagunez R. 2010. **Plantas utilizadas en la celebración de la Semana Santa en Zaachila, Oaxaca, México.** Polibotánica. 29: 263-279.
- Solano, G., R y Huerta, E. H. 2019. **Método de Evaluación de Extinción De las Especies Silvestres en México. Propuesta de inclusión en la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010: *Prosthechea karwinskii* en la categoría de Sujeta a Protección Especial (Pr).** 19 pp.
- Tholl, D. 2015. **Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In Biotechnology of isoprenoids.** Springer, Cham. 63-106 pp.
- 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.
- Whitten, W. M., H. G. Hills, H. G y N. H. Williams. 1988. **Occurrence of ipsdienol in floral fragrances.** Phytochemistry. (27)9: 2759-2760.

## CAPÍTULO 3.

### Propagación *in vitro* de *Prosthechea karwinskii* para contribuir en su manejo sustentable

#### INTRODUCCIÓN

Los factores que mantienen en riesgo las poblaciones de orquídeas son diversos, algunos de ellos son: la tala de bosques, la extracción no regulada de ejemplares para el comercio ilícito y usos religiosos (Acosta, 2004 y Solano y Huerta, 2019), la tasa baja de germinación en el medio natural, la susceptibilidad a los cambios ambientales y probablemente la falta de polinizadores (Fay *et al.*, 2015). *P. karwinskii* es un ejemplo de lo anteriormente mencionado, en Veracruz existen localidades donde se considera extinta. Y en los demás estados las poblaciones son escasas.

Las técnicas de propagación *in vitro* son una opción a la solución de problemas cuando se habla de conservación. La propagación por semilla y los bancos de semillas de especies de plantas en riesgo o en peligro de extinción son otras alternativas. No obstante, hay especies que tienen pocas semillas e incluso semillas recalcitrantes (Pence, 2011), otras especies necesitan de hongos para poder germinar tal es el caso de las semillas de orquídeas (Damon *et al.*, 2004), las cuales presentan semillas diminutas que carecen de endospermo, por lo tanto, su desarrollo no ocurre como en las demás angiospermas, pasando por una serie de estadios de desarrollo, esto ha llevado al desarrollo de otras técnicas como lo son la germinación *in vitro* y el cultivo de tejidos la cual se desarrolla en medios nutritivos y es actualmente ampliamente usada (Ortega-Larrocea, 2009). Sin embargo, la germinación de las semillas en ocasiones depende de la madurez de la cápsula (Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Damon *et al.*, 2004 y Magaña, 2018). Ruiz *et al.*, en 2008 estudiaron el efecto de la madurez de la cápsula en una escala de 4 valores (verde, verde-amarillenta, amarilla sin dehiscencia y café con inicio de dehiscencia), observando el porcentaje más alto de germinación y mayor crecimiento en medio Phytamax (Phy) con cápsulas verdes y verdes amarillentas.

En la actualidad los medios de cultivo *in vitro* son enriquecidos con compuestos orgánicos (Arditti y Ernest, 1993), siendo los más usados la pulpa de plátano y el agua de coco, debido al alto contenido de azúcares, aminoácidos, antioxidantes y otros compuestos (Arditti, 1993). En 2007, Moreno y Menchaca realizaron la propagación de *Stanhopea tigrina* enriqueciendo los medios con pulpa de plátano, agua de coco y la combinación de ambos, observando un mejor desarrollo en plántulas en el medio que contenía plátano y agua de coco.

La pulpa de la piña y el agua de coco son otra alternativa para suplementar medios y reducir costos como fue sugerido por Salazar-Mercado en 2012, quien encontró un porcentaje de germinación más alto en cultivos con medio Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) suplementados con agua de coco o con jugo de piña para *Cattleya mendelii*, siendo el medio suplementado con agua de coco el mejor para la germinación de esta especie, y para *Prosthechea vespa* y *Sobralia klotzscheana* se registró una mayor germinación en medio MS enriquecido con jugo de piña (Mercado y Cancino, 2012).

Ávila-Díaz *et al*, en 2009, trabajaron con *Laelia speciosa* y la germinación de las semillas en medio (MS) con 30 g/L de sacarosa y diferentes concentraciones de benciladenina (BA) en condiciones de luz y oscuridad, observando que el medio MS con 30 g/L de sacarosa fue efectivo para la germinación. Los efectos de BA y luz sobre la germinación de las semillas de *L. speciosa* difirieron con la madurez de la cápsula.

Se ha demostrado que los protocormos de orquídeas como en *Epidendrum nocturnum* y *Oncidium pyramidale* se ven favorecidos utilizando medios de cultivo MS al 50 % enriquecidos (Pérez- Martínez y Castañeda-Garzón, 2016).

El conocimiento resultante de este trabajo contribuirá a un manejo sustentable de *P. karwinskii* ya sea *ex situ* con fines comerciales o *in situ* si el objetivo es rehabilitar poblaciones depauperadas.

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál medio enriquecido con suplementos orgánicos es el más efectivo para la germinación de *P. karwinskii*? ¿Qué concentraciones de benciladenina (BA) y/o el ácido naftalenacético (ANA) favorecen el desarrollo y crecimiento de plántulas de *P. karwinskii*?

## HIPÓTESIS

Los medios enriquecidos con suplementos orgánicos son efectivos para la germinación de *P. karwinskii*.

Los medios enriquecidos con concentraciones menores a 0.05 mg/L de BA son efectivos para el desarrollo de plántulas de *P. karwinskii*.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la respuesta de diversos medios de cultivo sobre la propagación *in vitro* de *P. karwinskii*

### Objetivos Específicos:

- Evaluar el efecto sobre la germinación y primeras etapas de desarrollo *in vitro* de *P. karwinskii* de diversos medios de cultivo (MS, Phy, con suplementos orgánicos).
- Evaluar el efecto del edulcorante comercial stevia sobre el de la sacarosa, en la germinación y primeras etapas de desarrollo *in vitro* de *P. karwinskii*.
- Determinar el efecto de la citocinina (BA) y la auxina (ANA) en un medio eficiente enriquecido para fomentar el desarrollo y crecimiento de plántulas *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Germinación y primeras etapas de desarrollo *in vitro* de *P. karwinskii* en diversos medios de cultivo**

Para la preparación del medio MS 30% de sus sales basales, se mezclaron 300 mL agua destilada con los stocks correspondientes (Anexo 1) en un vaso de precipitados, se agregaron 6 g de sacarosa y se agitó. La mezcla resultante se dividió en tres vasos de precipitado con cantidades iguales (100 mL), posteriormente se agregaron 75 mL de agua de coco en uno de los vasos. En un segundo vaso se agregaron 15 g de pulpa de piña molida y finalmente 15 g de pulpa de plátano molido en el tercer vaso. Se usó agua destilada para colar las pulpas y se aforó a 175 mL, esto se realizó solo para el medio de piña y plátano ya que el de coco se aforó con agua de coco. Se midió y ajustó el pH a 5.75 en los tres vasos de precipitados usando NaOH o HCl, posteriormente se agregaron 1.22 g de agar a cada medio (coco, piña y plátano). La mezcla resultante se hirvió hasta que el agar se disolviera por completo. Esta mezcla se repartió en 7 frascos por lo que al final se tuvo un total de 21 frascos (7 de coco, 7 de piña y 7 de plátano), los frascos con medio se esterilizaron en la autoclave a 20 libras de presión. Para la preparación del medio Phytamax (Phy) al 30% de sus sales basales, se llevó a cabo la misma metodología con la única diferencia de agregar 3.75 g de Phy con sus compuestos correspondientes (Anexo 2).

### **Efecto de edulcorante comercial stevia y de la sacarosa sobre la germinación y primeras etapas de desarrollo *in vitro* de *P. karwinskii***

Para evaluar el efecto de edulcorante comercial stevia y de la sacarosa, se preparó el medio Phy 50% de sus sales basales, con sacarosa (para los grupos control) y Phy al 50 % con stevia, de la siguiente manera: se usaron 175 mL de agua destilada a la cual se le agregó 2.19 g de Phy y 3.5 g de sacarosa y se agitó. Se midió y ajustó el pH a 5.75 usando NaOH o HCl, posteriormente se agregaron 1.22 g de agar. La mezcla resultante se hirvió hasta que el agar se disolvió por completo. Esta mezcla se repartió en 7 frascos los cuales se esterilizaron en la autoclave a 20 libras de presión. La preparación del medio Phy al 50 % stevia se usó la misma metodología que se

mencionó anteriormente, con la diferencia de que en lugar de sacarosa se usó edulcorante comercial stevia de la marca N'joy.

Desinfección de cápsulas:

Las cápsulas se sumergieron en etanol al 75% y posteriormente se flamearon con el mechero Bunsen, por tres veces consecutivas (Ávila-Díaz *et al.*, 2009, modif.). Cada cápsula fue disectada de manera transversal y longitudinal en cuatro secciones, el contenido de 3 cápsulas se mezcló y se colocaron aproximadamente 5 mg de semillas de manera uniforme sobre cada uno de los frascos.

Siembra de semillas en los diferentes medios de cultivo.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, para evaluar la germinación y primeras etapas de desarrollo *in vitro* de *P. karwinskii* en diversos medios de cultivo, se realizaron dos experimentos:

Experimento 1: Las semillas de *P. karwinskii* fueron colocadas en frascos de vidrio, con tapas traslúcidas con los siguientes medios de cultivo: Phy 30% con agua de coco (PhyCo), Phy 30% con jugo de piña (PhyPi), Phy 30% con plátano (PhyPI), MS 30% con agua de coco (MSCo), MS 30% con jugo de piña (MSPI), MS 30% con plátano (MSPI) y Phy 50% con sacarosa (Phy, grupo control).

Experimento 2: Las semillas de *P. karwinskii* del mismo lote anterior, fueron colocadas en el mismo tipo de recipientes utilizados en el experimento anterior, sobre Phy 50% con stevia (Phy50%+Stv) marca N'joy (Anexo 3) y Phy 50% con sacarosa (Phy50%+Sac, grupo control).

Los cultivos se mantuvieron en condiciones de laboratorio, con luz natural a una temperatura aproximada de 23°C a 25°C. Se realizaron observaciones con un microscopio estereoscópico cada 20 días, para registrar el estado de desarrollo de cada uno de los individuos observados de *P. karwinskii* en cada medio de cultivo, con el fin de observar el número de semillas germinadas (embrión en estadio de

protocormo fuera de la testa), las etapas de desarrollo registradas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Categorías de desarrollo de las semillas de orquídeas.

	<b>Categorías de desarrollo</b>	<b>Descripción</b>
1	Vacía	Semilla cerrada sin embrión
2	Torpedo	Embrión alargado dentro de la testa
3	Protocormo 1 (Prot1)	Embrión globular dentro de la testa
4	Protocormo 2 (Prot 2)	Embrión con más del 50% fuera de la testa
5	Plántula 1 (Plant 1)	Con 1 a 2 hojas
6	Plántula 2 (Plant 2)	Con 3 a más hojas

### **Desarrollo y crecimiento de plántulas de *P. karwinskii* en medios de cultivo enriquecidos con BA y/o ANA**

Para determinar el medio de cultivo óptimo para el desarrollo de plántulas, se llevó a cabo la transferencia de protocormos (provenientes de un mismo medio del que se tuvo mayor disponibilidad de estos) en diferentes medios de cultivo con un barrido hormonal con benciladenina (BA) y el ácido naftalenacético (ANA).

Para la preparación de los medios de cultivo se usaron 5,250 mL de agua destilada a la cual se le agrego 65.62 g de Phy, 105 g de sacarosa y 36.75 g de agar, posteriormente esta mezcla se agitó hasta que se disolviera el agar, se repartió en 25 partes iguales (210 mL) en vasos de precipitado, a cada vaso se le agregó una de las combinaciones que se mencionan en la Tabla 6, se midió y ajustó el pH a 5.75 usando NaOH o HCl. Cada uno de los 25 medios de cultivo se dividió en 7 frascos de vidrio con 30 mL de medio, los cuales se esterilizaron en la autoclave a 20 libras de presión.

Tabla 6. Concentraciones en miligramos sobre litro (mg/L) de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) utilizados para preparar medios de cultivo para la transferencia.

ANA mg/L BA mg/L	0	0.05	0.1	0.5	1.0
0	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
0.05	Medio 6	Medio 7	Medio 8	Medio 9	Medio 10
0.1	Medio 11	Medio 12	Medio 13	Medio 14	Medio 15
0.5	Medio 16	Medio 17	Medio 18	Medio 19	Medio 20
1.0	Medio 21	Medio 22	Medio 23	Medio 24	Medio 25

Los frascos se mantuvieron bajo condiciones de asepsia, dentro de una campana de flujo laminar, se colocaron de manera equidistante cinco protocormos por frasco. Se registró el tamaño inicial del protocormo, así como el vigor. Cada 30 días se registraron el crecimiento y desarrollo de cinco protocormos por frasco y a los 90 días se registró el tamaño de la parte aérea (longitud de la hoja y largo por ancho del pseudobulbo, en caso de estar presente) y la raíz, número de PLB's (Protocorm Like Bodies) y el desarrollo de callos.

#### Análisis estadístico.

Todos los análisis se realizaron en el programa R. Para evaluar la influencia de los tratamientos sobre la variable de respuesta se realizaron modelos lineales. Posteriormente a estos modelos se les aplicó un ANOVA. Con los residuales de estos modelos se realizaron tres pruebas de normalidad (Cramer-von Mises, Hegazy-Green, Shapiro-Wilk) y una prueba de homogeneidad de varianza (Fligner-Killeen). En caso de que no cumplieran con los supuestos del ANOVA se realizó la prueba no

paramétrica correspondiente. Se analizaron a los 20, 40 y 60 días por estado de desarrollo y medio de cultivo de manera independiente. Para el barrido hormonal se realizaron análisis multifactoriales, se analizó la longitud de hoja, la longitud de pseudobulbo y la longitud de la raíz con un ANOVA, para el vigor y para la formación de PLB's y callo se analizaron con un modelo lineal generalizado (GLM).

## RESULTADOS

### Germinación y primeras etapas de desarrollo *in vitro* de *P. karwinskii* en diversos medios de cultivo (Experimento 1)

Se realizaron un total de 18 modelos, de los cuales, solo se presentarán a partir de protocormo 2 que es considerado como la germinación en orquídeas. De estos únicamente “plant1” de la fecha 60 no presentó distribución normal (Shapiro-Wilk:  $W=0.87985$ ,  $p=0.0316$ ). Para este específico caso, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. De los modelos restantes solo dos presentaron diferencias significativas: “prot 2” para la fecha 20 ( $F=13.812$ ;  $gl=6$ ;  $p=1.043e-05$ ) y “prot 2” para la fecha 40 ( $F=6.078$ ;  $gl=6$ ;  $p=0.0008$ ).

MSPI fue el mejor medio de cultivo ( $24\pm 4.24$ ) para la germinación de *P. karwinskii* a los 20 días (Fig. 14). Mientras que el medio PhyPI y Phy (control) mostraron el menor número de individuos germinados ( $2\pm 0$ ).

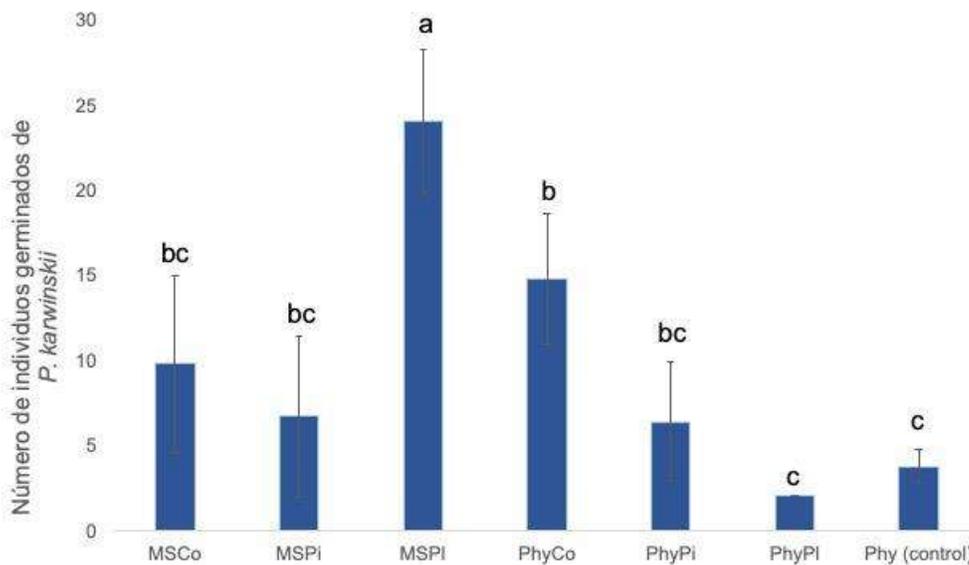


Figura 14. Número de individuos germinados de *P. karwinskii* a los 20 días en medios de cultivo con suplementos orgánicos.

A los 40 días de efectuada la siembra, los medios de cultivo PhyPi, MSPi, PhyPI y PhyCo; fueron en los que se registró una mayor germinación (Fig. 15). El medio de cultivo Phy (control) presentó el menor número de individuos germinados ( $21.25\pm 5.25$ ).

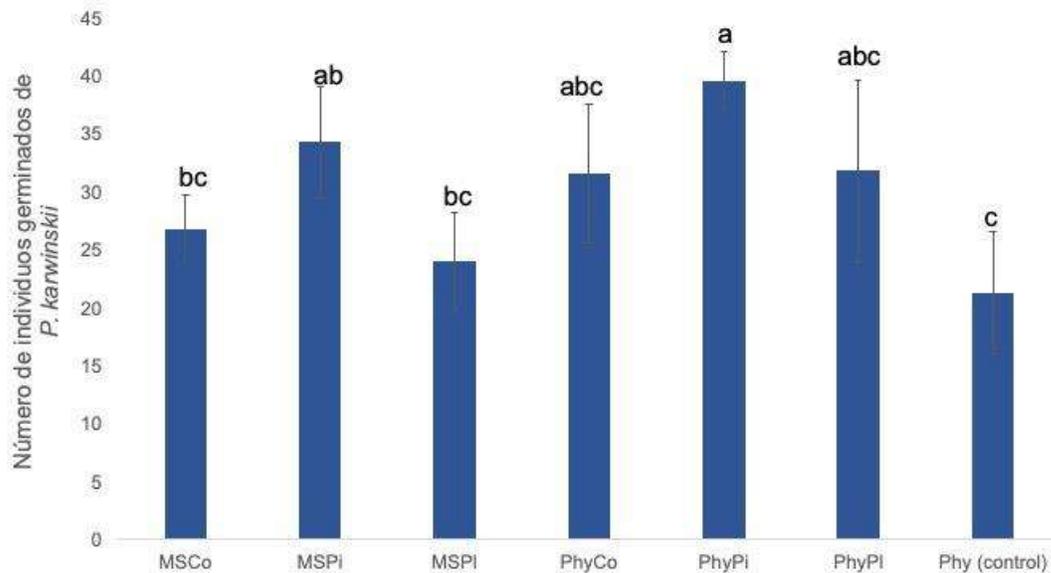


Figura 15. Número de individuos germinados de *P. karwinskii* a los 40 días en medios de cultivo suplementados con compuestos orgánicos.

A los 60 días de efectuada la siembra ya no se observaron diferencias significativas en la germinación, y ya se registran plántulas, aunque tampoco se observan diferencias significativas en su desarrollo. Sin embargo, el medio MSPI, muestra un ligero mayor desarrollo de plántulas en comparación con los otros medios ( $18 \pm 0$ , Fig.16). El medio PhyPi registra poco más de germinación que los otros medios de cultivo ( $35.75 \pm 8.99$ ) y el medio Phy (grupo control) menor desarrollo ( $27.25 \pm 2.87$ ).

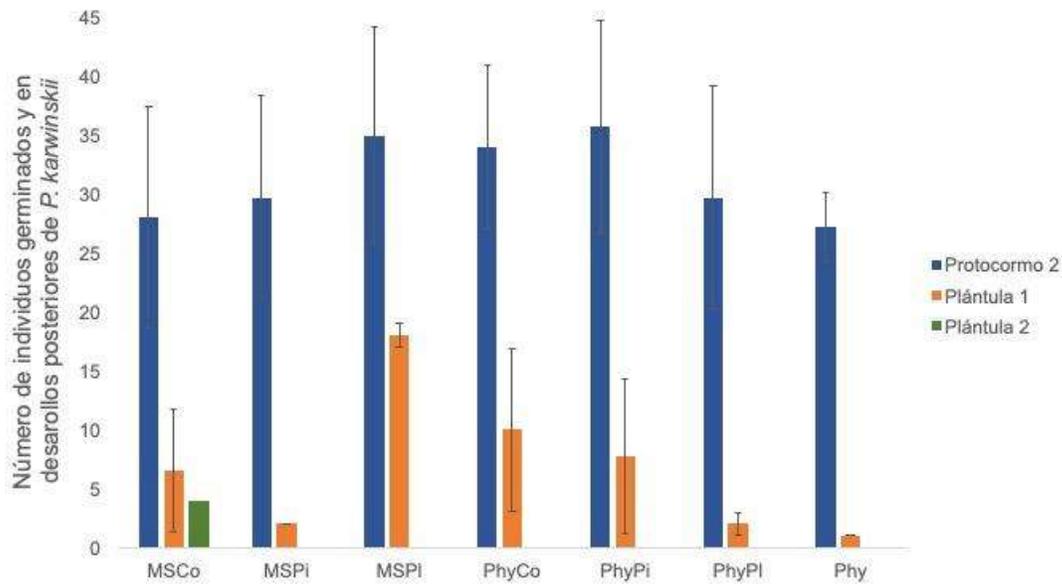


Figura 16. Número de individuos germinados y en etapas posteriores de *P. karwinskii* a los 60 días en medios de cultivo con suplementos orgánicos.

### Efecto de edulcorante comercial stevia vs sacarosa en la germinación y primeras etapas de desarrollo *in vitro* de *P. karwinskii* (Experimento 2)

En este apartado se realizaron los análisis de la misma manera que la sección anterior. Se obtuvieron un total de 18 modelos, de los cuales sólo uno no obtuvo distribución normal (“prot 2” para la fecha 20, Shapiro-Wilk:  $W=0.93502$ ,  $p=0.5628$ ). De todos estos modelos, el único que presentó diferencias significativas fue “prot 2” en la fecha 20, con el análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis  $X_2=4.3418$ ,  $g/1=1$ ,  $p=0.0371$ ).

El medio Phy50%+Stv se encontró significativamente mayor en número de individuos germinados de *P. karwinskii* ( $8.50 \pm 4.73$ , Fig. 17).

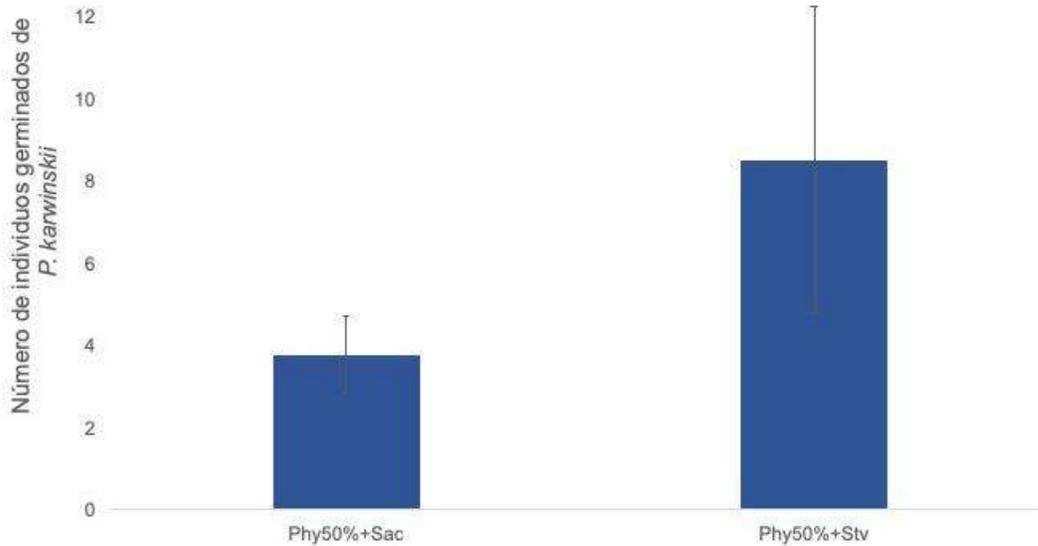


Figura 17. Número de individuos germinados de *P. karwinskii* a los 20 días en medio Phytamax suplementado con sacarosa (Phy50%+Sac; control) o con edulcorante stevia (Phy50%+Stv).

A los 40 días de efectuada la siembra, ya no se registran diferencias significativas en la germinación de *P. karwinskii* (Fig. 18). No obstante, en el medio Phy50%+Stv aún se observó una tendencia de mayor germinación ( $26.25 \pm 6.07$ ).

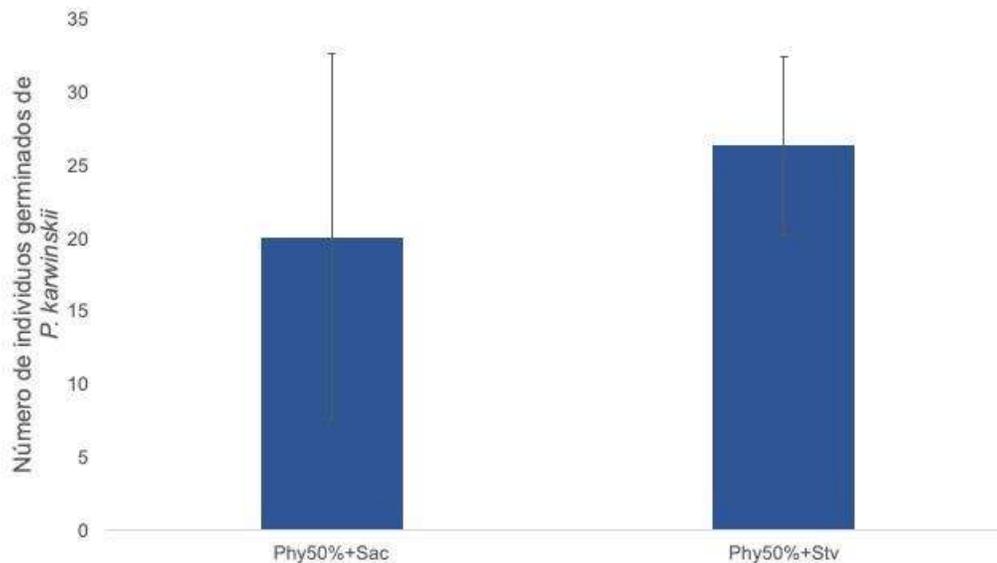


Figura 18. Germinación de *P. karwinskii* a los 40 días en medio Phytamax suplementado con sacarosa (Phy50%+Sac; control) o con edulcorante stevia (Phy50%+Stv).

A los 60 días tampoco se encontraron diferencias significativas para la germinación, no obstante, el medio Phy50%+Stv (23.25±13.57) muestra valores más altos que el medio de cultivo con sacarosa en la germinación (16.50±16.29) y se observa el desarrollo de plántulas 1 (una a dos hojas, Fig.19, 7.75±4.99).

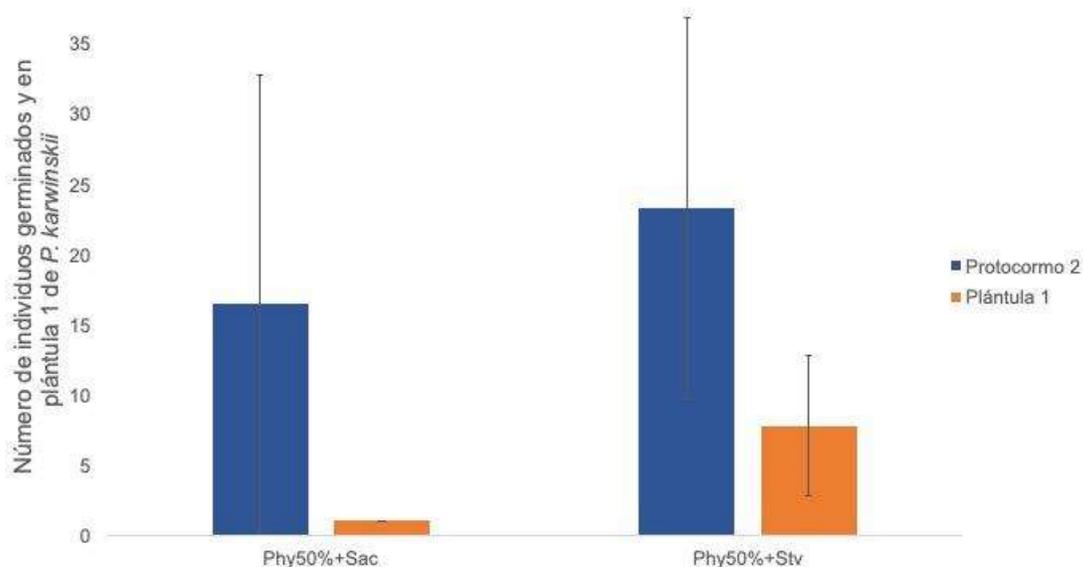


Figura 19. Número de individuos de *P. karwinskii* germinados y en etapas posteriores de desarrollo (plántula 1) a los 60 días en medio Phytamax suplementado con sacarosa (Phy50%+Sac; control) o con edulcorante stevia (Phy50%+Stv).

### Desarrollo y crecimiento de plántulas de *P. karwinskii* en medios de cultivo enriquecidos con BA y/o ANA

#### Longitud de hoja

El análisis de la interacción de las dos hormonas sobre el efecto en la longitud de hoja arrojó diferencias significativas ( $p=0.0054$ ). Los medios de cultivo con mayor longitud de hoja fueron aquellos sin benciladenina, con mejores resultados en los medios 4 (0.5 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA), 5 (1 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA) y 2 (0.05mg/L de ANA y 0 mg/L de BA) respectivamente, Figura 20.

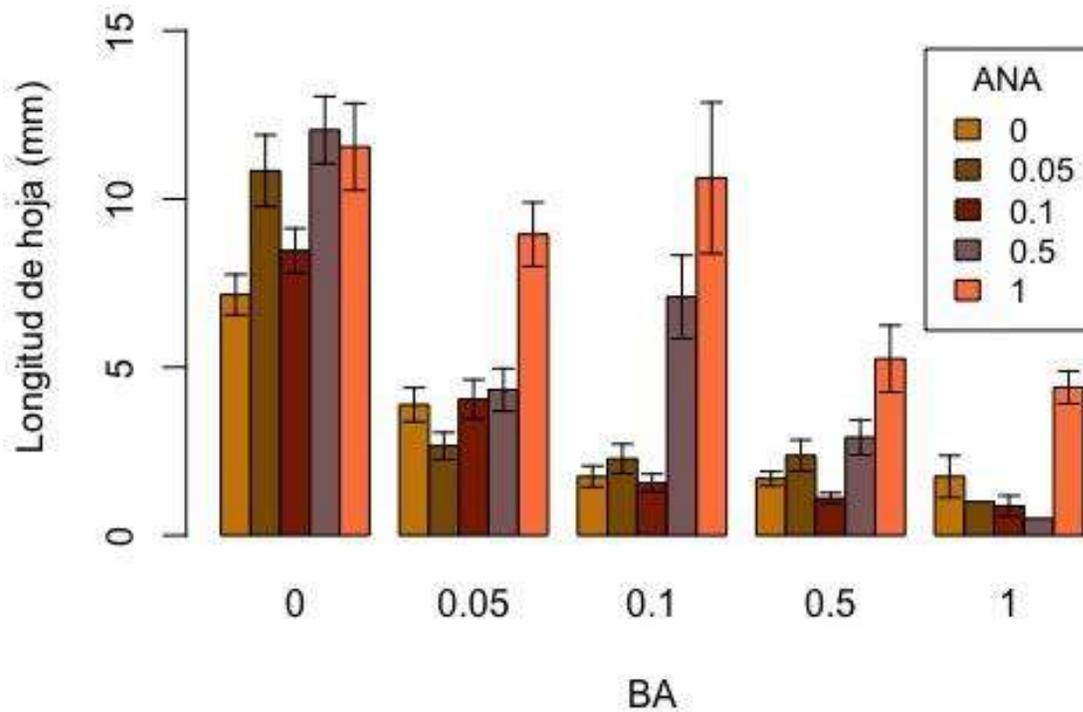


Figura 20. Crecimiento (longitud de hoja en mm) de *P. karwinskii* en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante.

#### Área del pseudobulbo

El análisis de la interacción de las dos hormonas sobre la longitud del pseudobulbo no arrojó diferencias significativas ( $p=0.114$ ), no obstante, se puede observar que los medios de cultivo sin benciladenina, específicamente los medios 3 (0.1 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA) y 4 (0.5 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA) tienen valores numéricos de longitud más altos en comparación con los demás medios de cultivo, Figura 21.

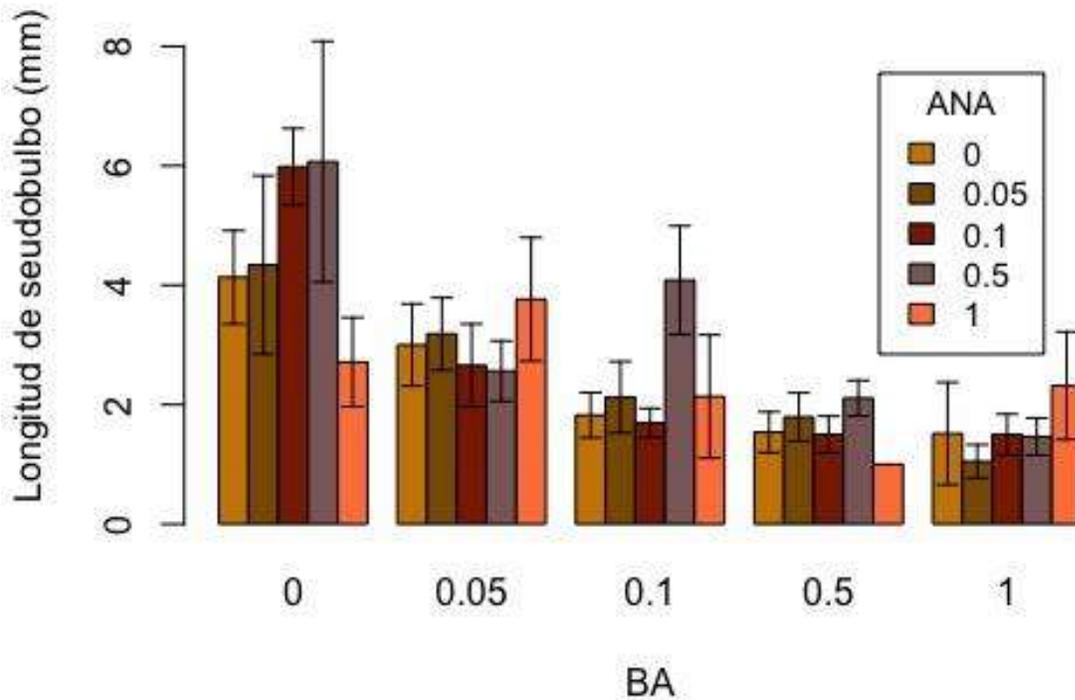


Figura 21. Crecimiento (longitud de pseudobulbo en mm) de *P. karwinskii* en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante.

#### Longitud de raíz

Los medios de cultivo con mayor longitud de raíz fueron aquellos sin benciladenina (Figura 22), siendo el medio 4 (0.5 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA), el mejor para el desarrollo de raíz en esta especie. El análisis de la interacción de las dos hormonas en la longitud de la raíz arrojó diferencias significativas ( $p=0.0305$ ).

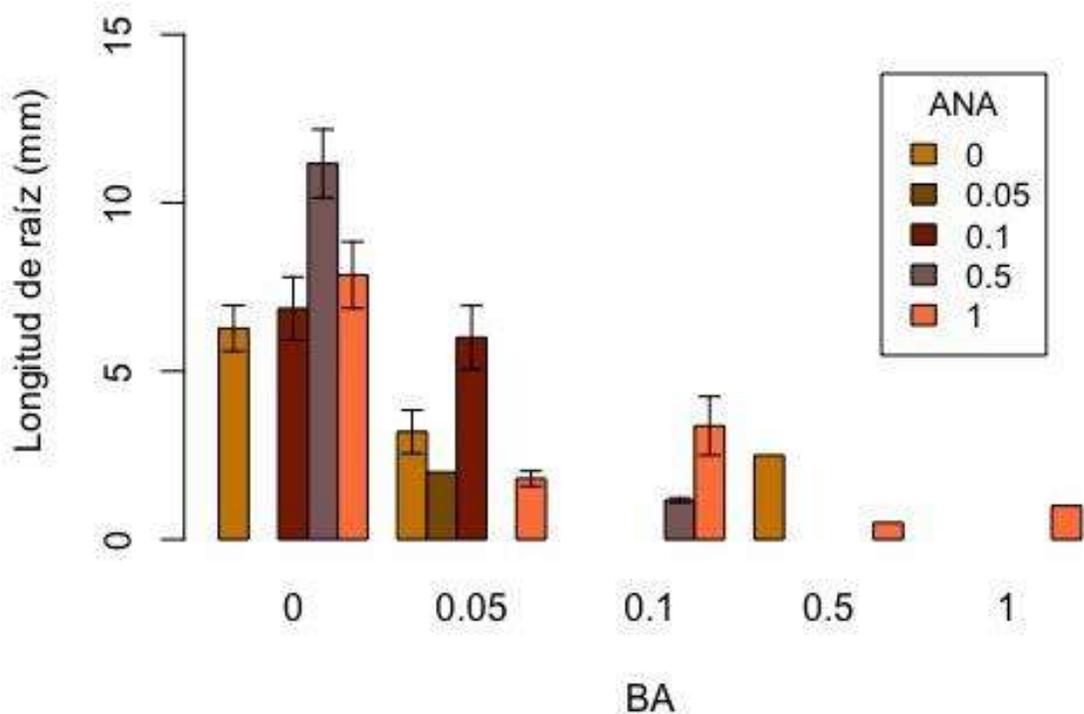


Figura 22. Crecimiento (longitud de raíz en mm) de *P. karwinskii* en medios de cultivo suplementados con ANA y BA a los 90 días de efectuado el trasplante.

### Vigor

El vigor de las plantas disminuye cuando se aumentan las cantidades de ANA.

El análisis de la interacción de las dos hormonas en el vigor arrojó diferencias significativas ( $p=0.0203$ ). Siendo los medios 1 (0 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA), 8 (0.1 mg/L de ANA y 0.05 mg/L de BA) y 23 (0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA) los que presentaron los valores más altos (plantas más verdes, Figura 23).

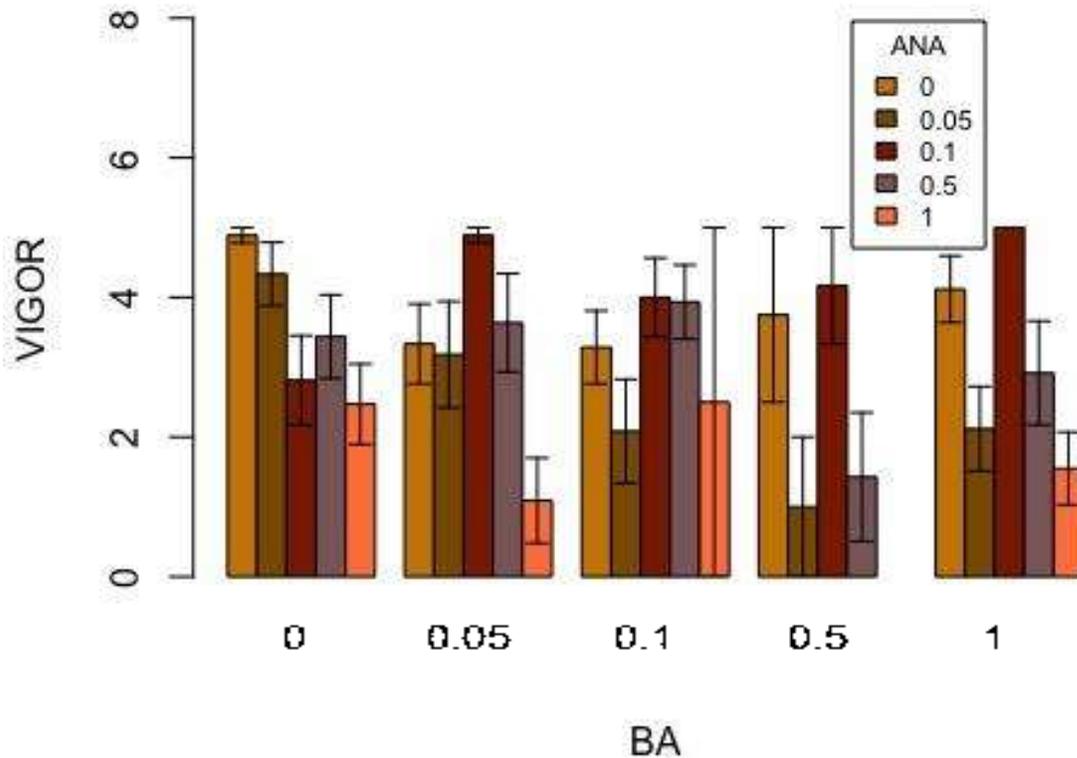


Figura 23. Vigor de *P. karwinskii* en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante.

#### Cuerpos Parecidos a Protocormos (PLB's)

La interacción de ANA y BA en la formación de PLB's no arrojó diferencias significativas ( $p=0.1865$ ). No obstante, se observa una tendencia a más formación de PLB's en los medios 2 (0.05 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA), 6 (0 mg/L de ANA y 0.05 mg/L de BA) y 8 (0.1 mg/L de ANA y 0.05 mg/L de BA); por lado, se observa que los medios de cultivo con 0 mg/L (1, 2, 3, 4 y 5) y 1 mg/L (21, 22, 23, 24, 25) de BA en interacción con altas cantidades de ANA no favorecen a la formación de PLB's, Figura 24.

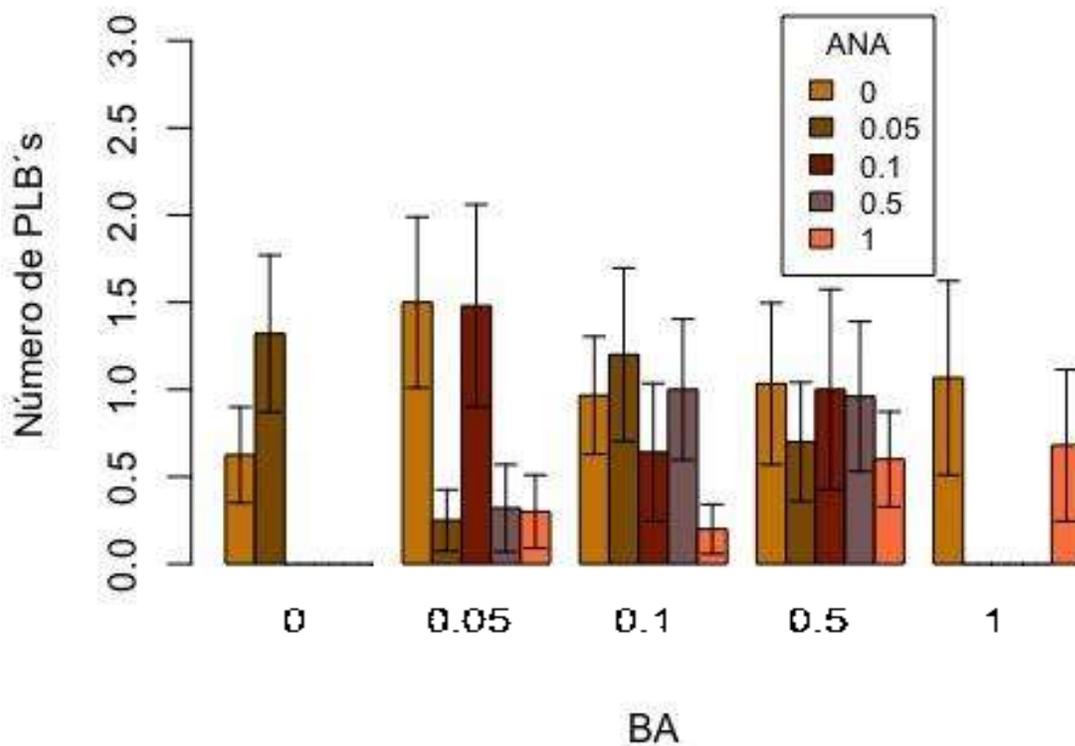


Figura 24. Formación de Cuerpos Parecidos a Protocormos (PLB's) de *P. karwinskii* en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante.

#### Formación de Callo

El desarrollo de callo de *P. karwinskii*, mostró diferencias significativas para la interacción de ANA y BA ( $p=0.0059$ ). El desarrollo de callos se dio en todos los medios de cultivo usados, no obstante, los medios 3 (0.1 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA), 5 (1.0 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA), 18 (0.1 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BA) y 22 (0.05 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA), presentan ligeramente una mayor formación como se muestra en la Figura 25.

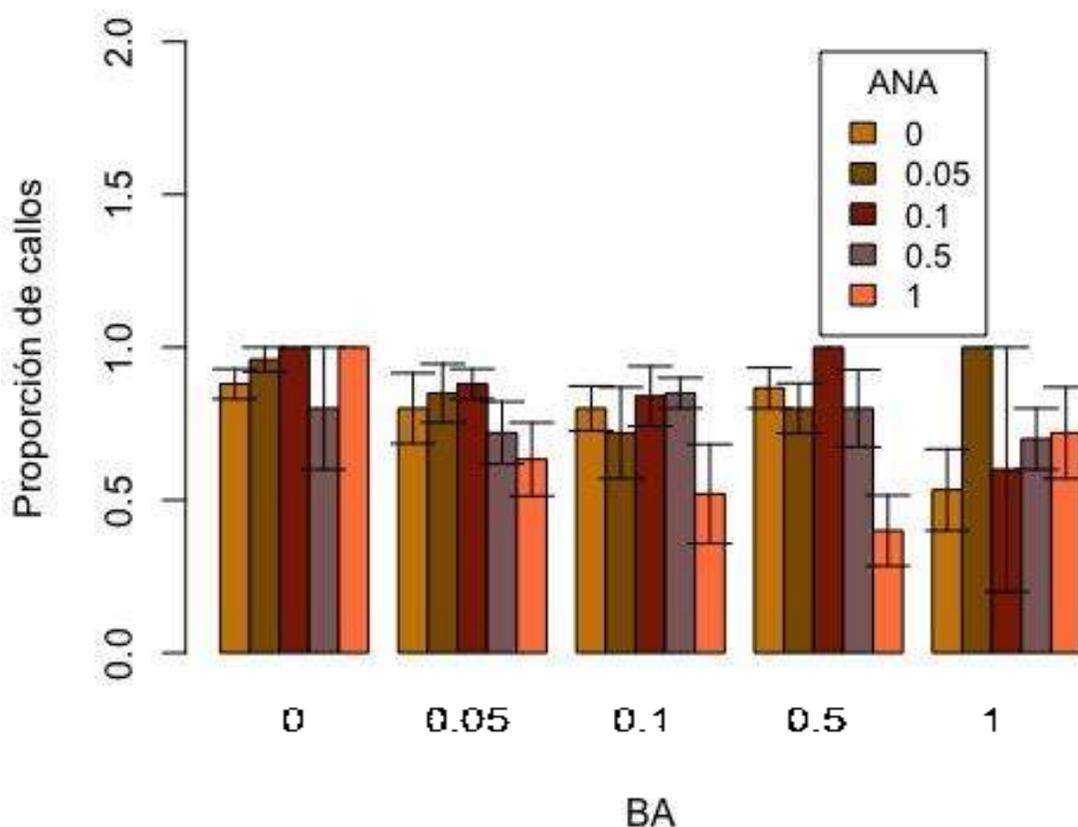


Figura 25. Formación de callo de *P. karwinskii* en medios de cultivo suplementados con ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) a los 90 días de efectuado el trasplante.

Tabla 7. Resultados del análisis estadístico de las variables analizadas para el desarrollo y crecimiento de plántulas de *P. karwinskii* en medios de cultivo enriquecidos con BA y/o ANA.

Variable	ANA			BA			ANA:BA		
	F	gl	P	F	gl	P	F	gl	P
Long. de hoja	16.9	4:448	<0.001***	99.12	4:448	<0.001***	14.66	16:448	<0.01**
Long. de pseudobulbo	1.83	4:296	0.309	13.98	4:296	<0.001***	8.85	4:296	0.114
Long. raíz	11.59	4:80	<0.001***	11.68	4:80	<0.001***	3.81	5:80	<0.1*
	$\chi^2$	gl	P	$\chi^2$	gl	P	$\chi^2$	gl	P
Vigor	40.5	5	<0.001***	5.0	4	0.2834	28.2	15	<0.1*
PLB's	10.5	4	<0.1*	3.2	4	0.52209	20.7	16	0.18657
Callo	16.6	4	<0.01**	19.6	4	<0.001***	33.7	16	<0.01**

## DISCUSIÓN

Cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para su germinación y desarrollo. Por tal razón es necesario conocer los requerimientos de cada una (Ávila-Díaz *et al.*, 2009). A través del tiempo se han suplementado los medios de cultivo con la finalidad de enriquecerlos y de favorecer el cultivo *in vitro* de orquídeas (Salazar-Mercado, 2012). Para *P. karwinskii* en particular, no se encontraron investigaciones sobre su cultivo *in vitro*, pero se ha trabajado con *Euchile citrina* (sinónimo de *Prosthechea citrina*), especie muy cercanamente relacionada con *P. karwinskii*, y se ha encontrado que el medio de cultivo MS con la adición de promotores de crecimiento es efectivo para su germinación y desarrollo de plántulas (Ávila y Salgado-Garcigilia, 2006).

El medio de cultivo realizado por Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) se ha utilizado con éxito en muchas especies de orquídeas (Asghar *et al.*, 2011) y su efecto se potencializa al ser enriquecido con suplementos orgánicos como la pulpa de plátano, la pulpa de piña o el agua de coco.

En este trabajo se observó germinación desde los 20 días, germinación temprana en comparación con otras especies tal como lo reportan diferentes autores que mencionan que en promedio germinan entre los 30 y 60 días de cultivo (Ávila y Salgado-Garcigilia, 2006; Lee y Lee, 1991) tal es el caso de *Stanhopea trigrina* que germinó a los 30 días (Moreno y Menchaca, 2007).

El medio MSPI mostro mejor resultado para la germinación a los 20 días después de efectuarse la siembra esto se ha observado también para *Comparettia speciosa* (Molina Cabrera, 2012). Este resultado puede ser debido a que el plátano presenta mayor cantidad de macronutrientes en comparación con la pulpa de piña y el agua de coco (USDA National Nutrient database), lo cual favoreció a la germinación de las semillas en un periodo de tiempo corto.

El medio PhyCo también mostró mayor germinación en comparación con los demás medios de cultivo, este resultado podría deberse a la presencia de citocinina en el agua

de coco (Shantz y Steward, 1955). Resultado similar fue encontrado por Kitsaki *et al.*, 2004, quienes reportaron al medio MSCo, como el más eficaz para la germinación y formación de protocormos de *Ophrys*. La adición del agua de coco a los medios de cultivo también dio mejores resultados en la proliferación de PLB's y la regeneración de plántulas de *Phalaenopsis sp.* (Piña *et al.*, 2020); así como en el desarrollo de plántulas en *S. klotzscheana* (Orlando Cancino, 2012), lo mismo para *Cattleya mendelii* (Salazar Mercado en 2012) y *Coelogyne ovalis* y *Grammatophyllum scriptum* (Abbas *et al.* 2011 y Nongrum *et al.*, 2007); es por ello que el agua de coco ha sido uno de los suplementos más usados debido a su contenido de aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, mioinositol, citoquininas (Huan *et al.*, 2004 y Ritcher *et al.*, 2005; Abbas *et al.*, 2011)

A los 40 días después de la siembra de *P. karwinskii* los medios MSPi y PhyPi presentaron la mayor geminación en contraste con los demás medios de cultivo suplementados, debido probablemente a su alto contenido de energía, de iones inorgánicos, de aminoácidos, de vitaminas, así como, de reguladores de crecimiento (Kitsaki *et al.*, 2004). Salazar Mercado y Orlando Cancino en 2012 reportan una mayor respuesta en la geminación y formación de plántulas de *Prosthechea vespa* y *Sobralia klotzscheana* en el medio MS suplementado con jugo de piña.

Se ha observado que la adición de dos suplementos orgánicos en el mismo medio MS puede ser mejor que utilizar los suplementos por separado; como lo realizado por Menchaca *et al.* en 2007 que reportaron al medio MS con coco y plátano, como el mejor medio de cultivo para el desarrollo de plántulas de *Stanhopea trigrina*.

En tan solo 20 días después de la siembra, en el medio Phy50%+Stv se observó mayor germinación en comparación con el medio Phy50%+Sac (grupo control); un resultado similar se observó en el cultivo *in vitro* de *Cuitlauzina pendula* en la formación de pseudobulbos (Altamirano, 2017). Además, a los 60 días de efectuada la siembra de *P. karwinskii*, en el medio con Stv. ya se registraron plántulas. Esto puede deberse a la cantidad de glucósidos que contiene el edulcorante (Lemus-Mondaca, 2012).

Para favorecer el desarrollo de protocormos a plántulas de *P. karwinskii*, se propone utilizar el medio 4 (0.5 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA) ya que este fue el mejor para el desarrollo de la longitud de hoja, longitud de raíz y longitud de pseudobulbo, no obstante, en *P. citrina* se observa que la adición de cantidades elevadas de ANA (3 mg/L) favorece la longitud de hojas y de raíces (Favela, *et al.*, 2016) por lo que se puede inferir que no todas las orquídeas incluso siendo del mismo género presentan los mismos requerimientos para su desarrollo.

Sarabia *et al.*, en 2010 reportan el medio MS con 2.5 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA como el mejor medio de cultivo para el desarrollo de PLB's, otros autores reportan que las concentraciones altas de BA inducen a la formación de PLB's, como lo menciona Hernández *et al.* 2001 con *Laelia anceps* y *Catasetum intergerrimum* y Suárez-Quijada *et al.* en 2007 con *Euchile mariae*. En este estudio no hubo diferencias significativas en la formación de estas estructuras asexuales en los diferentes medios de cultivo probados, observando que los medios 2 (0.05 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA), 6 (0 mg/L de ANA y 0.05 mg/L de BA) y 8 (0.1 mg/L de ANA y 0.05 mg/L de BA) fueron los que formaron más PLB's presentaron.

Se observó la producción de callo sin registrar deferencias significativas. Es interesante hacer notar que la formación de PLB's y callo, puede ser muy útil, ya que se puede llevar a cabo una reproducción asexual de *P. karwinskii* de plantas con características particulares de interés o con alto valor comercial. Sin embargo, se sugiere probar con otras concentraciones y tipos de promotores de crecimiento vegetal para aumentar su cantidad.

El desarrollo de protocormos de *Euchile mariae* cortados transversalmente y transferidos en medios de cultivo enriquecidos con ANA y BA fue evaluado por Suárez-Quijada *et al.*, en 2007, obteniendo un mejor desarrollo de PLB's en los explantes basales en los medios de cultivo enriquecidos con 0 mg/l de ANA y 1 mg/L de BA, y para los explantes apicales se obtuvo mejor respuesta con el medio de cultivo enriquecido con 1mg/L de ambos reguladores. Sin embargo, Zhao *et al.*, 2008, reporta

la formación de PLB's a partir de callo en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento y el mejor desarrollo de plántulas en el medio enriquecido con 2.7  $\mu$ M de ANA. Sarabia *et al*, en 2010, encuentran para *Laelia speciosa*, medios de cultivo óptimos enriquecidos con ácido naftalenacético (ANA) y BA para la reproducción asexual a través de callo y PLB's.

Se considera que los resultados obtenidos en esta investigación, pueden ser útiles para la propagación ya sea sexual o asexual de *P. karwinskii* para contribuir a un manejo sustentable de esta especie, tan utilizada como planta ornamental, medicinal, ceremonial, entre otros.

## CONCLUSIONES

Se logró establecer un sistema eficiente para la germinación de *P. karwinskii* con la adición de suplementos orgánicos, lo cual es sumamente beneficioso para reducir costos, por lo tanto, se puede inferir que la adición adecuada de suplementos orgánicos a los medios de cultivo como el plátano, el agua de coco y el jugo de piña juegan un papel importante en la germinación y en el desarrollo de plántulas.

El edulcorante comercial stevia puede ser utilizado como fuente alternativa de carbono en el cultivo *in vitro* de *P. karwinskii* ya que favorece la germinación y desarrollo de plántulas en un corto periodo de tiempo.

Para el desarrollo de plántulas de *P. karwinskii* el medio 4 con 0.5 mg/L de ANA y 0 mg/L de BA, es el más eficiente, ya que en este medio de cultivo se registró el mayor crecimiento de hojas, pseudobulbos y raíz.

Se obtuvieron estructuras (PLB's y callo) para la reproducción asexual de *P. karwinskii*, que pueden ser útiles para la propagación a gran escala de plantas con características.

Se logró establecer un sistema eficiente de propagación *in vitro* para *P. karwinskii* que puede ser útil en su manejo sustentable.

## RECOMENDACIONES

Se sugiere llevar a cabo experimentos posteriores con especies del mismo género, usando suplementos orgánicos a base de pulpa de plátano, pulpa de piña y agua de coco; para favorecer la germinación y el desarrollo de plántulas y también hacer combinaciones entre estos suplementos como puede ser plátano-piña.

Es recomendable estimar el costo del uso del edulcorante stevia vs sacarosa para evaluar costo-beneficio de su utilización en la preparación de medios de cultivo para la propagación de *P. karwinskii*, ya que a pesar de que se obtuvieron mejores resultados en la germinación y el desarrollo de plántulas usando medios de cultivo con edulcorante stevia, probablemente este no sea el mejor medio en términos económicos.

Para la propagación *in vitro* de orquídeas se recomienda sustituir o disminuir la cantidad de los promotores de crecimiento vegetal comerciales (ANA, BA) por suplementos orgánicos como son pulpa de plátano, piña y agua de coco en los medios de cultivo para favorecer su desarrollo y bajar su costo de producción.

## LITERATURA CITADA

- Abbas, B., F. Heningtyas. B. Amriati. 2011. ***In vitro* seeds germination and plantlets development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae).** International Research Journal of Plant Science. (2)5:154-159.
- Acosta S. 2004. **Afinidades de la flora genérica de algunos bosques mesófilos de montaña del nordeste, centro y sur de México: un enfoque fenético.** Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica. (75)1: 61-72.
- Ardiiti, J y R. Ernest. 1993. **Micropropagation of orchids.** Wiley-Interscience Publication. New York. 682 pp.
- Arditti, J. 1969. **Floral anthocyanins in species and hybrids of *Broughtonia*, *Brassavola*, and *Cattleyopsis* (Orchidaceae).** American Journal of Botany. (56)1: 59-68.
- Asghar, S., T. Ahmad. I. Ahmad y M. Yaseen. 2011. ***In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white.** African Journal of Biotechnology. (10)16: 3097-3103
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K. Gómez-Alonso, C y Salgado-Garciglia, R. 2009. ***In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (99) 3: 335.
- Ávila-Díaz, I., R. Salgado-Garciglia. 2006. **Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación.** Biológicas 8: 138-149.
- Barták, P., P. Bednár. L. Cap. L. Ondráková y Z. Stránský. 2003. **SPME—A valuable tool for investigation of flower scent.** Journal of Separation Science. (26)8: 715-721.
- Damon, A., E. Aguilar-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.
- Cázares, F. T. L., J. D. J. Graciano, L. S. Solís, G. B. Díaz, R. J. A. Nájera, L. J. B. Montoya, A. 2016. **Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina***

- (La Llave & Lex.) WE Higgins** nativa del estado de Durango, México. Investigación y Cienci., (24)67: 19-25.
- Fay, M. F., T. Pailler y K. W. Dixon. 2015. **Orchid conservation: making the links.** Annals of Botany. (116)3: 377–313.
- Hernández H. J., S. O. Hernández y R. M. Mata. 2001. **Regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de mitades de protocormos de *Laelia anceps* Lindl. y *Catasetum intergerrimum* Hook.** Amaranto. (14)1: 3-12.
- Huan, L. V. T., T. Takamura. M. Tanaka. 2004. **Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid*.** Plant Science. (166)6: 1443-1449.
- Kitsaki, C., S. Zygouraki. M. Ziobora. S. Chintziest. 2004. ***In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae).** Plant Cell Reports. 23: 284-290.
- Lee, J. y H. Lee. 1991. **Micropropagación de orquídeas a partir de semillas.** Boletín informativo de FIRA XXIV 2:15-30.
- Lemus-Mondaca, R., A. Vega-Gálvez. L. Zura-Bravo y K. Ah-Hen. 2012. ***Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects.** Food chemistry. (132)3: 1121-1132.
- Altamirano. L. J. C., Cabezas, A. A. I. y Garcia, H. D. 2017. **Efecto de edulcorante a base de *Stevia rebaudiana* en el cultivo *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*.** Biotecnología Vegetal. (17)2: 135- 141.
- Magaña L. R. E. 2018. **Sistema de apareamiento, éxito reproductivo y propagación *in vitro* de *Rhynchostele cervantesii* (Orchidaceae): una estrategia para su conservación.** Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 27 pp.
- Mercado, S. A. S y Cancino, G. O. 2012. **Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia.** Revista Colombiana de Biotecnología. (14)1: 53-59.

- Molina Cabrera, J. 2012. **Evaluación de cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en *Comparettia speciosa* Rchb. f.** Tesis de Licenciatura. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. 171 pp.
- Moreno, M. D., y R. A. Menchaca G. 2007. **Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae).** Foresta Veracruzana. (9)2: 27-32.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** Physiologia plantarum. (15)3. 473-497.
- Nongrum, I., S. Kumaria y P. Tandon. 2007. **Influence of *in vitro* media on asymbiotic germination, plantlet development and *ex vitro* establishment of *Coelogyne ovalis* Lindl. and *Coelogyne nitida* (Wall. ex Don) Lindl.** Proceedings-Indian National Science Academy. (73)4. 205.
- Ortega-Loeza, M. M., R. Salgado-Garciglia. C. Gómez-Alonso y I. Ávila-Díaz. 2011. **Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (HBK) Schltr.** European Journal of Environmental Sciences. 12: 48-54.
- Ortega-Larrocea, M. P., M. Palacios, A. y V. M. Ávila, C. 2009. **Conservación y propagación de orquídeas.** 484-495.
- Pence, V. C. 2011. **Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants.** In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. (47)1: 176-187.
- Pérez-Martínez, B. A., y S. L. Castañeda-Garzón. 2016. **Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*.** Biotecnología Vegetal. (16)3:143-151.
- Piña, S. A. A. A. Arzate-Fernandez. T. H Norman, M. 2020. **Efecto de dos suplementos orgánicos y un sustrato orgánico en la respuesta de proliferación PLB's y regeneración *in vitro* de plántulas de *Phalaenopsis sp.*** Tesis de licenciatura. Universidad Autonoma del Estado de Mexico. Toluca, estado de Mexico. 11 pp.

- Ritcher, E. M., Jesus, D. P., Muñoz, R. A. A., Lago, C. L., Agnes, L. 2005. **Determination of anions, cations, and sugars in coconut water by capillary electrophoresis.** Journal of the Brazilian of the Chemical Society. 16: 1134-1139.
- Ruiz, B. C., Laguna, C. A., Iglesias, A. L. G., Damon, A., Marín, H. T. N. J., Azpíroz, R. H. S., y Moreno, M. J. L. 2008. **Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave y Lex.) Schltr (Orchidaceae).** Phytón (Buenos Aires). 77: 203-215.
- Salazar-Mercado, S. A. 2012. **Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae).** Acta Agronómica. (61)1: 69-78.
- Sarabia-Ochoa, M. E., I. Ávila-Díaz. A. Carlos-Gómez y R. Salgado-Garciglia. 2010. **Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae).** Lankesteriana International Journal on Orchidology. (10)1: 13-18.
- SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES (SEMARNAT).** 2010.NOM-059-SEMARNAT-2010.
- Shantz, E. M. y F. C. Steward.1955. **The Identification of Compound A from Coconut Milk as 1, 3-Diphenylurea<sup>1</sup>.** Journal of the American Chemical Society. (77)23: 6351-6353.
- Solano, G., R. y Huerta, E. H. 2019. **Método de Evaluación de Extinción De las Especies Silvestres en México. Propuesta de inclusión en la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010: *Prosthechea karwinskii* en la categoría de Sujeta a Protección Especial (Pr).** 19 pp.
- Suárez-Quijada, I., M. Hernández-Altamirano. V. M. Chávez-Ávila. E. Sandoval-Zapotitla y A. Martínez-Palacios. 2007. **Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae).** Lankesteriana International Journal on Orchidology. (7)1-2: 388-393.
- U.S. Department Of Agriculture.** Acceso en julio de 2020. <https://fdc.nal.usda.gov>
- Zhao, P., F. Wu. F. S. Feng y W. J. Wang. 2008. **Protocorm-like body (PLB's) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium***

***candidum* Wall ex Lindl.** In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. (44)3:  
178-185.

## DISCUSIÓN GENERAL

El disturbio antropogénico afecta a gran escala los diferentes grupos de plantas, como son las orquídeas, las cuales son más susceptibles a los cambios en su medio ambiente, debido a sus características complejas de historia de vida y a los siguientes factores: cambio climático, destrucción de su hábitat, como la tala de los bosques y el cambio de uso de suelo y una amenaza también que afecta directamente las poblaciones de orquídeas es la constante extracción ilegal no regulada a la que están sometidas las poblaciones debido a que estas plantas son usadas con diversos fines algunos de ellos son: ornamental, religioso y medicinal (Acosta, 2004; Fay, 2018; Gale *et al.*, 2018; Solano y Huerta, 2019).

*Prosthechea karwinskii* es una de las orquídeas endémicas más carismáticas y utilizadas de México, que debido a la extracción de que es objeto y a la destrucción de su hábitat, se considera en un alto riesgo, y recientemente ha sido incluida en la NOM-059-2010 en la categoría de Protección especial.

No se dispone de información que documente su importancia ecosistémica, a pesar de que es una de las plantas con mayor abundancia en los bosques de encino estacionalmente secos de la Mixteca de Oaxaca. En el estado de Michoacán están registradas solo tres poblaciones, las cuales se encuentran localmente escasas (Solano y Huerta, 2019). Se considera que el estudio de esta especie es de gran relevancia, para generar conocimiento básico que pueda ser útil para su manejo sustentable. En esta tesis se trabajó con dos poblaciones en Michoacán, las cuales están localizadas en el municipio de Indaparapeo.

Se cumplieron satisfactoriamente los objetivos planteados, ya que en el capítulo 1 se determinaron los patrones de distribución vertical y horizontal de *P. karwinskii*, considerándose de gran utilidad los resultados obtenidos para poder hacer un mejor manejo de la especie, ya sea *in situ* o *ex situ*. Cabe resaltar que la población estudiada se considera en alto riesgo, ya que solamente se registraron dos individuos adultos y muy poco reclutamiento, por lo que, si no se llevan a cabo acciones para restaurarla,

tomando en consideración a *Q. deserticola*, como forofito mayoritario, se extinguirá localmente esta especie.

En el capítulo 2, se determinó la composición química de las fragancias florales de *P. karwinskii* y su relación con la atracción de polinizadores de una de las tres poblaciones registradas. Se sabe que *P. karwinskii* es dependiente de sus polinizadores para la reproducción sexual, esto implica que la disminución en la disponibilidad de estos afectaría directamente la supervivencia de la especie (Camacho, 2009). Si bien en esta tesis no se ha abordado el estudio de los polinizadores, gracias al trabajo realizado, nosotros podemos sugerir que *P. karwinskii* es polinizada por himenópteros, sin embargo, se requieren más estudios de observaciones en campo para poder describir específicamente quien es el polinizador.

Toda esta información sobre la ecología, incluyendo las fragancias florales, es de gran valor cuando se busca reintroducir plantas para restaurar las poblaciones, de aquí la importancia del capítulo 3, sobre la propagación *in vitro* de *P. karwinskii* para contribuir a su manejo sustentable. En este capítulo, se logró establecer un medio de cultivo de bajo costo para la germinación y desarrollo de las plántulas y otro medio de cultivo enriquecido con ANA para fomentar más su crecimiento y desarrollo.

Las plántulas obtenidas, después de ser aclimatadas, podrían ser usadas a largo plazo en un proyecto de reintroducción. Antes de realizar una reintroducción, los planes de manejo deben incluir un estudio para conocer la distribución de la planta en el sistema natural y sus requerimientos en este, el estudio de los polinizadores es otro factor ecológico importante debido a la interacción estrecha de las orquídeas con sus polinizadores (Gershenson y Dudareva, 2007; Tholl, 2015), ya que sin el polinizador difícilmente la orquídea podría subsistir, por lo que es sumamente importante conocer a los polinizadores y asegurarse de la presencia y los lugares de anidamiento.

Se considera importante promover estrategias que puedan inspirar a la gente a otro tipo de manejo de los recursos, por ejemplo, las plantas obtenidas de la formación de

estructuras asexuales como callo y PLB's pueden usarse para la venta al público y así mismo disminuir la compra ilegal de estas orquídeas y por lo tanto bajar el impacto sobre las poblaciones naturales, esto sería un gran paso para la conservación de esta especie (Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Ortega-Larrocea, 2009).

Las plantas propagadas *in vitro* no solo podrían usarse para la reintroducción, ya que las capturas de los volátiles de estas plantas también se podrían usar para la generación de perfumes como una forma de aprovechamiento de este recurso forestal no maderable (Knezhevich, 2011 y Pantaleón, 2011) y para incrementar el conocimiento y el uso de las orquídeas en la medicina (Cruz *et al.* 2014 y Rojas-Olivos *et al.* 2017).

Para la conservación de *P. karwinskii* y otras especies de orquídeas en riesgo, debe incluirse la conservación de su hábitat en conjunto, ya que estas plantas dependen de la interacción con otros seres vivos, como son sus hongos micorrízicos, sus polinizadores y en el caso de epífitas, sus forofitos (Fay, *et al.*, 2015). Debe considerarse en especial, aquellos hábitats con especies vulnerables y ricos en especies (Fay, 2018); como es en este caso las poblaciones de Indaparapeo, Mich. e incrementar los estudios e investigaciones para generar conocimiento básico que sea útil en proponer estrategias adecuadas de manejo que aseguren su permanencia a largo plazo en su hábitat (Herrera *et al.*, 2019). Es necesario también controlar la extracción ilegal para asegurar su manejo sustentable, así como implementar otras estrategias de manejo que sean ecológicamente, biológicamente y económicamente viables.

## CONCLUSIONES GENERALES

- *Prosthechea karwinskii* crece principalmente sobre *Quercus deserticola*, sin correlación positiva entre el número de individuos con el DAP, se distribuyó principalmente en la copa sin un patrón respecto a su orientación ni en la posición en la rama. Debido a que solo se registraron dos individuos adultos y pocas plántulas, se considera que esta población es muy vulnerable a la extinción local
- La fragancia de las flores analizadas estuvo constituida mayormente por terpenos, principalmente por monoterpenos. La mayor liberación se registró durante la mañana, de las 9:00 a las 13:00 h
- La germinación de *P. karwinskii* fue mayor en los medios de cultivo enriquecidos con suplementos orgánicos, principalmente en el medio MS suplementado con plátano. La adición del edulcorante comercial stevia al medio de cultivo favorece la germinación de *P. karwinskii*. En el crecimiento y desarrollo de plántulas se observó que el mejor desarrollo de estructuras aéreas y radicales fue en el medio con 0.5 mg/L de ANA y sin adición de BA

## LITERATURA CITADA DE LA DISCUSIÓN GENERAL

- Acosta S. 2004. **Afinidades de la flora genérica de algunos bosques mesófilos de montaña del nordeste, centro y sur de México: un enfoque fenético.** Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica. (75)1: 61-72.
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K. Gómez-Alonso, C y Salgado-Garciglia, R. 2009. ***In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (99) 3: 335.
- Camacho, D. E. V. 2009. **Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino de *Prosthechea aff. Karwinskii* (Orchideaceae).** Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán. México. 35 pp.
- Cruz, G. G., R. Solano G. L. Lagunez R. 2014. Documentation of medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico. Rev Brass Farmacogn. 24: 153-8.
- Fay, M. F. 2018. **Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century?** Botanical studies. (59)1: 16.
- Fay, M. F., T. Pailler y K. W. Dixon. 2015. **Orchid conservation: making the links.** Annals of Botany. (116)3: 377–313.
- Gershenzon, J. y N. Dudareva. 2007. **The function of terpene natural products in the natural world.** Nature chemical biology. (3)7: 408-414.
- Herrera, V. P., I. Ávila-Díaz. L. López-Toledo. L. I. Cabrera-Martínez y L. Villanueva-Camacho. 2019. **Ecological Characterization of *Oncidium reichenheimi* with regard to its conservation.** Ecology. 576-587.
- Knezhevich E. 2011. **Fragantica.** Accesada Agosto 2020. <https://www.fragrantica.com/news/Orchids-in-Perfumery-Olympic-Orchids-Artisan-Perfume-House-2706.html>.
- Solano, G., R. y Huerta, E. H. 2019. **Método de Evaluación de Extinción De las Especies Silvestres en México. Propuesta de inclusión en la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010: *Prosthechea karwinskii* en la categoría de Sujeta a Protección Especial (Pr).** 19 pp.

**SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES (SEMARNAT).**

2010.NOM-059-SEMARNAT-2010.

Tholl, D. 2015. **Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants.**

**In Biotechnology of isoprenoids.** Springer, Cham. 63-106 pp.

Ortega-Larrocea, M. P., M. Palacios, A. y V. M. Ávila, C. 2009.**Conservación y propagación de orquídeas.** 484-495.

Pantaleón, B. X. 2011. **Análisis químico de las fragancias producidas por las orquídeas *Prosthechea varicosa* y *Prosthechea karwinskii* para la identificación de compuestos volátiles.** Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Oaxaca, Mexico.

Rojas-Olivos A., R. Solano-Gómez. B. Jiménez-Estrada y L. Lagunez-Rivera. 2014. **Antioxidant Capacity of *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) Extraxts Obatin by Sonification.** (4)3.

## ANEXO

Anexo 1. Stocks del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

STOCKS	g	CLASE
<b>STOCK I (50 mL)</b>		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	22.5	Macronutriente
<b>STOCK II (250 mL)</b>		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9.25	Macronutriente
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.25	Macronutriente
<b>STOCK III (100 mL)</b>		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.557	Hierro
Na <sub>2</sub> EDTA	0.745	Hierro
<b>STOCK IV (10 mL)</b>		
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.69	Micronutriente
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.05	Micronutriente
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62	Micronutriente
KI	0.083	Micronutriente
Mg <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.025	Micronutriente
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0.025	Micronutriente
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	Micronutriente
<b>STOCK V (250 mL)</b>		
Glicina	0.050	Vitamina
Piridoxina	0.0125	Vitamina
Ácido nicotínico	0.125	Vitamina
Tiamina	0.0025	Vitamina
Myo-inositol	2.5	Vitamina
<b>STOCK VI (250 mL)</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	41.25	Macronutriente
KNO <sub>3</sub>	47.5	Macronutriente

Anexo 2. Componentes del medio de cultivo Phytamax (Phy).

<b>COMPONENTE</b>	<b>mg/L</b>	<b>CLASE</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	Macronutriente
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.10	Micronutriente
CaCl <sub>2</sub>	166	Macronutriente
MgSO <sub>4</sub>	90.350	Macronutriente
KNO <sub>3</sub>	950	Macronutriente
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	Macronutriente
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0125	Micronutriente
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0.0125	Micronutriente
KI	0.4150	Micronutriente
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.30	Micronutriente
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.1250	Micronutriente
MnSO <sub>4</sub>	8.450	Micronutriente
Na <sub>2</sub> EDTA	37.240	Hierro
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.850	Hierro
Myo-inositol	100	Vitamina
Ácido nicotínico	1	Vitamina
Peptona tipo I	2000	Vitamina
Piridoxina	1	Vitamina
Clorhidrato de tiamina	10	Vitamina
Sacarosa	2000	Carbohidrato

Anexo 3. Información nutricional del edulcorante comercial stevia marca N'joy.

Información nutricional	Tamaño de la porción 1 g
Energía	336 Cal
Grasas	0 g
- Grasas saturadas	0 g
Hidratos de carbono	84 g
- Azúcares	84 g
Fibra alimentaria	0 g
Proteínas	0 g
Sal	0 g
Sodio	0 g

Plántulas de *P. karwinskii* en diferentes etapas de desarrollo.

Fotos: Salgado-Garciglia R.

