



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA: ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN

**SISTEMA DE APAREAMIENTO, CARACTERIZACIÓN ECOLÓGICA Y
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex
(ORCHIDACEAE)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

VERÓNICA ADRIANA PÉREZ DECELIS

DIRECTORA DE TESIS: **DC. IRENE ÁVILA DÍAZ**

CO.-DIRECTOR: **DC. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO AGOSTO DE 2013





Cuitlauzina pendula La Llave & Lex.

Fotografía: Pérez-Decelis V. A. 2013

“Dejar de creer en el logro de tus sueños es no hacerlos realidad, pues antes de ser realidad han sido eso, sueños”. Esforzarte por lograrlos no es sólo desearlo, es hacerlo todo lo posible y a veces lo imposible por hacerlos una realidad.

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza para seguir adelante y enseñarme en cada uno de mis errores y tropiezos una forma de aprendizaje. Por permitirme ser madre, esposa, hija, hermana y haberme rodeado de amigas (os) llenos de luz que estuvieron siempre a mi lado. Por conservar mi esencia a pesar de lo dura que fue la vida conmigo y por permitirme realizar mis sueños.

A mis padres:

Domingo (†) por seguir siendo un ejemplo en mi vida e inculcarme la fe en Dios, el deseo de superación, perseverancia, coraje y amor en todo lo que hago. Por haberme permitido conocerlo, amarlo y aún en su ya larga ausencia estar presente en mis logros.

Carmelita: Mujer incansable que me enseñó a luchar, trabajar, aferrarme a la vida y a levantarme cuando caí. Gracias por ser mi fuerza y pilar en cada momento, por apoyarme con Nikté y darle tu amor incondicional, cariño y sobre todo por creer y apoyarme en la realización de mis sueños y aspiraciones. Gracias mamá, por ser tan “mágica” al saber lo que tengo sin siquiera preguntar y guiar tus actos con tu corazón, por aligerar mis tristezas y enseñarme a disfrutar de la vida con alegría. Gracias por recordar mi esencia cada vez que lo crees necesario y por todo lo que sigues haciendo por mí. Te amo mamá.

A mi esposo por su amor, paciencia y comprensión en mis momentos de estrés y por apoyarme en todo momento en la realización de mis sueños y ayudarme con el cuidado de nuestra hija, Nikté.

A mi hija, Nikté que con su llegada ilumino mi vida, por ser mi motivación, por regalarme en cada mirada paz, tranquilidad y amor puro. Por enseñarme a dedicarle tiempo a lo que más amo y descubrir en ti un amor sin límites.

A mi hermana Angelita por enseñarme a que no debo esperar más de lo que las personas están dispuestas a dar, por cuidar y amar a mi hija, por soportar

mis enojos, por respetarme y demostrarme su amor y cariño. Te amo hermanita.

A mis Abuelitos Constancio y Elenita, por cuidarnos cuando niños y seguir estando ahí para nosotros, por darme su cariño y amor aún en la distancia. Los amo.

A mis suegros Juan e Isabel, por apoyarme durante el embarazo y el nacimiento de mi hija, por cuidarla, amarla y darle todo su cariño de manera incondicional. Especialmente a mi suegra quién me acompañó y ayudó durante y después de mi embarazo con el cuidado de Nikté cuando tuve que dedicarle tiempo a la escritura de mi tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** y a la **Facultad de Biología** por albergarme durante cinco años durante mi formación como bióloga.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la **beca otorgada** para la realización de mis estudios de posgrado (2011-2013).

Agradezco enormemente al laboratorio de biotecnología vegetal del **Instituto de Investigaciones Químico y Biológicas** de la **UMSNH** por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis. Quedo especialmente agradecida con mi directora y co-director de tesis, la **Dra. Irene Ávila Díaz** y el **Dr. Rafael Salgado Garciglia** por brindarme la oportunidad de realizar la tesis de maestría. Gracias, por su enseñanza, tiempo, confianza, gran calidad humana y atenciones durante la corrección de esta tesis, haciendo posible la culminación del trabajo.

Mi más sincero agradecimiento por su excelente asesoría, paciencia y gran apoyo al **Dr. Eduardo Cuevas García**, **Dr. Josep Raventos Bonheví** y al **Dr. Diego R. Pérez Salicrup** por orientarme y darme valiosos consejos en la corrección de este trabajo y por la gran disponibilidad que mostraron al aclarar mis dudas. Gracias por ser tan humanos y enseñarme en este proceso de aprendizaje que puedo volar a donde desee.

A **Liliana Cerritos Bariiga** del departamento de posgrado por su paciencia, apoyo y orientación en la solución de problemas que se me presentaron durante los trámites de titulación.

A la **Dra. Gloria F. Tavera Alonso** directora del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio por los permisos y las facilidades prestadas para la realización de esta investigación.

A mis amigos en general **Ady, Marthita, Marbe, Mari y Celina** y aquellos amigos que me brindaron su apoyo en campo **Lúlu, Miki, Luis, Noé, Ángel** (por abrirme las puertas de su hogar durante los muestreos), **Julio, El chino, Maricela, Rubisel, Angelita, Faby y Dra. Irene**. Gracias por su incondicional apoyo, amistad tan única y por darme la confianza y compartirme sus experiencias. Han sido y serán siempre amigos que han marcando momentos importantes en mi vida y corazón.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal (IIQB-UMSNH): **D.C. Salgado, Cristobal, Rodo, Rafita, Yoshi, Richi, Jaz, Ale y Kari**. Gracias por su apoyo incondicional a lo largo de este proceso de aprendizaje, por orientarme, por corregirme cuando me equivoque y ayudarme cuando lo necesite y sobre todo por brindarme su cariño, confianza y permitirme albergar en sus corazones. Los quiero

A mis amigas Marthita, Adriana, mi hermana y Lucas que me demostraron el significado de la verdadera amistad, al cuidar de Nikté y estar en los momentos más difíciles después del nacimiento de mi hija, por acompañarme en esta etapa como madre, y por brindarme su apoyo guiadas por su corazón durante la revisión de esta tesis.

Al matemático **Carlos Gómez Alonso** por ayudarme y enseñarme a realizar los análisis estadísticos de esta investigación y al **Dr. Javier Ponce Saavedra** por aclarar ciertas dudas en los análisis estadísticos y por su gran disponibilidad como profesor y amigo.

A la **Dra. Dolores Uribe** por su ayuda en la identificación de los ejemplares de encinos y al **M. C. Xavier Madrigal** en la identificación de los ejemplares de pinos y otras especies producto de esta investigación. Gracias por su tiempo y disponibilidad.

A mi **familia** por alentarme en los momentos difíciles, por su comprensión y amor incondicional que me dio la fuerza para culminar con esta etapa tan importante en mi vida. Los amo

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN GENERAL	x
ABSTRACT	xii
i. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
ii. ANTECEDENTES GENERALES	3
2.1 Características de la familia Orchidaceae	3
2.2 Epífitas vasculares	3
2.3 Adaptaciones de las epífitas vasculares	4
2.4 Diversidad de epífitas vasculares	5
2.5 Papel ecológico de las epífitas en las comunidades vegetales	5
2.6 Efectos de la fragmentación del hábitat	6
iii. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	7
3.1 Vegetación	7
3.2 Geología	9
3.3 Suelos	9
3.4 Hidrología	10
3.5 Clima	10
iv. SISTEMA DE ESTUDIO	10
4.1 El género <i>Cuitlauzina</i>	10
4.2 Clasificación taxonómica de <i>Cuitlauzina pendula</i> La Llave & Lex.	11
4.3 Descripción de <i>Cuitlauzina pendula</i> La Llave & Lex.	11
v. OBJETIVO GENERAL	13

CAPÍTULO 1. SISTEMAS DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCUTIVO DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) EN EL PARQUE NACIONAL BARRANCA DEL CUPATITZIO EN URUAPAN, MICHOACÁN.

	Página
RESUMEN	14
1.1 INTRODUCCIÓN	16
1.2 ANTECEDENTES	18
1.2.1 Sistema de apareamiento	18
1.2.2 Éxito reproductivo	20
1.3 OBJETIVOS PARTICULARES	21
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	21
1.4.1 Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino	21
1.4.1.1 Viabilidad de semillas con la presencia de embriones	23
1.4.1.2 Desarrollo <i>in vitro</i>	24
1.4.2 Análisis estadístico	25
1.5 RESULTADOS	26
1.5.1 Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino	26
1.5.1.1 Viabilidad de semillas con la presencia de embriones	26
1.5.1.2 Desarrollo <i>in vitro</i>	28
1.6 DISCUSIÓN	31
1.6.1 Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino	31
1.6.1.1 Viabilidad de semillas con la presencia de embriones	33
1.6.1.2 Desarrollo <i>in vitro</i>	33
1.7 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	34
1.8 CONCLUSIONES	35
1.9 LITERATURA CITADA	36

CAPÍTULO 2. DISTRIBUCIÓN VERTICAL Y HORIZONTAL DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) SOBRE SUS HOSPEDEROS DENTRO DEL PARQUE NACIONAL BARRANCA DEL CUPATITZIO EN URUAPAN, MICHOACÁN.

	Página
RESUMEN	40
2.1 INTRODUCCIÓN	42
2.2 ANTECEDENTES	44
2.2.1 Problemática del estudio de epifitas vasculares	44
2.2.2 Factores que intervienen en la distribución espacial de epifitas vasculares	44
2.2.3 Formas de asociación de epifitas con respecto a sus hospederos	45
2.2.4 Distribución espacial de orquídeas epifitas	46
2.2.5 Estudios ecológicos en orquídeas epifitas en México	47
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES	49
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.4.1 Preferencia de hospedero (s) en <i>C. pendula</i>	49
2.4.2 Distribución vertical y horizontal de <i>C. pendula</i>	50
2.4.3 Preferencia por clases de edad y su posición en el árbol	51
2.4.4 Tipo de sustrato	52
2.4.5 Posición en las ramas	52
2.4.6 Orientación	52
2.4.7 Análisis estadístico	52
2.5 RESULTADOS	53
2.5.1 Preferencia de hospedero (s) en <i>C. pendula</i>	53
2.5.2 Distribución vertical y horizontal de <i>C. pendula</i>	56
2.5.3 Preferencia por clases de edad y su posición en el árbol	58
2.5.4 Tipo de sustrato	60

	Página
2.5.5 Posición en las ramas	61
2.5.6 Orientación	62
2.6 DISCUSIÓN	64
2.6.1 Preferencia de hospedero (s) en <i>C. pendula</i>	64
2.6.2 Distribución vertical y horizontal de <i>C. pendula</i>	65
2.6.3 Preferencia por clases de edad y su posición en el árbol	66
2.6.4 Tipo de sustrato	66
2.6.5 Posición en las ramas	67
2.6.6 Orientación	67
2.7 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	68
2.8 CONCLUSIONES	69
2.9 LITERATURA CITADA	71
CAPÍTULO 3. PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>Cuitlauzina pendula</i> La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) COMO UNA ALTERNATIVA PARA SU CONSERVACIÓN.	
RESUMEN	77
3.1 INTRODUCCIÓN	79
3.2 ANTECEDENTES	82
3.2.1 Propagación <i>in vitro</i> de orquídeas	82
3.2.2 Medios de cultivo utilizados en la propagación de orquídeas epifitas	83
3.2.3 Promotores del crecimiento vegetal en este estudio	84
3.2.4 Propagación <i>in vitro</i> de orquídeas epifitas a partir de semillas	84
3.2.5 Propagación <i>in vitro</i> de orquídeas epifitas a partir de explantes	86
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES	87
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	87
3.4.1 Material biológico	87
3.4.2 Propagación <i>in vitro</i> de <i>C. péndula</i>	87

	Página
3.4.2.1 Germinación de las semillas	87
3.4.2.2 Transferencia de protocormos <i>in vitro</i> con adición de reguladores de crecimiento	88
3.4.2.3 Multiplicación de PLBs	89
3.4.3 Diseño experimental y análisis estadístico	89
3.5 RESULTADOS	90
3.5.1 Germinación de las semillas	90
3.5.2 Transferencia de protocormos <i>in vitro</i> con adición de reguladores de crecimiento	93
3.5.3 Multiplicación de PLBs	95
3.6 DISCUSIÓN	96
3.6.1 Germinación de las semillas	96
3.6.2 Transferencia de protocormos <i>in vitro</i> con adición de reguladores de crecimiento	97
3.6.3 Multiplicación de PLBs	98
3.7 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	99
3.8 CONCLUSIONES	100
3.9 LITERATURA CITADA	101
vi. DISCUSIÓN GENERAL	109
vii. RECOMENDACIONES	111
viii. LITERATURA COMPLEMENTARIA	112

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 1. SISTEMAS DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCATIVO DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) EN EL PARQUE NACIONAL BARRANCA DEL CUPATITZIO EN URUAPAN, MICHOACÁN.

Cuadro 1. Número de flores y producción de frutos (%) con los tratamientos de polinización aplicados a *Cuitlauzina pendula* en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio municipio de Uruapan, Michoacán.....26

Cuadro 2. Desarrollo *in vitro* a los 90 días después de efectuada la siembra de las semillas de *C. pendula* de cada una de las cápsulas en los distintos tratamientos manuales realizados en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Uruapan, Michoacán.....29

CAPÍTULO 2. DISTRIBUCIÓN VERTICAL Y HORIZONTAL DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) SOBRE SUS HOSPEDEROS DENTRO DEL PARQUE NACIONAL BARRANCA DEL CUPATITZIO EN URUAPAN, MICHOACÁN.

Cuadro 1. Preferencia de *C. pendula* y otras especies de orquídeas de un total de 240 árboles muestreados y 281 individuos de *C. pendula* en 10 transectos en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio en Uruapan, Michoacán, México.....54

CAPÍTULO 3. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) COMO UNA ALTERNATIVA PARA SU CONSERVACIÓN.

Cuadro 1. Medios de cultivo más eficientes para el desarrollo *in vitro* de *C. pendula* en Phytamax al 50%, con Reguladores del Crecimiento Vegetal ANA (ácido naftalenacético) y BA (benciladenina) a los 125 días de efectuada la transferencia.....94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. A. disección floral y polinario; B. planta en floración; C. detalle del callo. Ilustrado por Eric Hágsater (tomada de Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007).....13

CAPÍTULO 1. SISTEMAS DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCATIVO DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) EN EL PARQUE NACIONAL BARRANCA DEL CUPATITZIO EN URUAPAN, MICHOACÁN.

Figura 1. Viabilidad de semillas en base a la presencia de embriones (%), de cada una de las cápsulas de *C. pendula* provenientes de los tratamientos de polinización manual (endocruzamiento, exocruzamiento) y polinización natural.....27

Figura 2. Viabilidad de semillas de *C. pendula* en base a la presencia de embriones (%), en los distintos tratamientos de polinización manual (endocruzamiento, exocruzamiento) y polinización natural.....28

Figura 3. Desarrollo *in vitro* de *C. pendula* en cada una de las cápsulas en los tratamientos de exocruzamiento y en la polinización natural.....30

CAPÍTULO 2. DISTRIBUCIÓN VERTICAL Y HORIZONTAL DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) SOBRE SUS HOSPEDEROS DENTRO DEL PARQUE NACIONAL BARRANCA DEL CUPATITZIO EN URUAPAN, MICHOACÁN.

Figura 1. Zonas y secciones de los hospederos consideradas para determinar la distribución vertical y horizontal de las epifitas sobre el hospedero (Tomada de Johnason, 1974; Dressler, 1981; Benzing, 1995).....51

Figura 2. Porcentajes de individuos de *Cuitlauzina pendula* en el Bosque de Encino-Pino y Pino-Encino en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.....56

Figura 3. Porcentajes de individuos de <i>Cuitlauzina pendula</i> en las zonas del árbol en los dos tipos de vegetación en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.....	57
Figura 4. Porcentajes de individuos de <i>C. pendula</i> en el Bosque de Encino-Pino y Bosque de Pino-Encino en las diferentes secciones de la copa (a: sección basal de las ramas, b: sección intermedia de las ramas y c: sección externa de las ramas) en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.....	58
Figura 5. Porcentajes de individuos de <i>C. pendula</i> por clases de edad (P: plántula, J: juvenil y A: adulto) en dos tipos de vegetación en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.....	59
Figura 6. Porcentajes de individuos de <i>C. pendula</i> en las zonas del árbol por clases de edad (P: plántula, J: juvenil y A: adulto) en dos tipos de vegetación en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.....	60
Figura 7. Porcentaje de individuos de <i>C. pendula</i> en los diferentes tipos de sustratos (CM: corteza-musgo, CML: corteza-musgo-liquen) en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.....	61
Figura 8. Porcentaje de individuos de <i>C. pendula</i> y su posición en la rama en dos tipos de vegetación en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.....	62
Figura 9. Porcentaje de individuos de <i>C. pendula</i> y su orientación (N, S, E, O y Zenit) en el Bosque de Encino-Pino y Pino-Encino en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.....	63

CAPÍTULO 3. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) COMO UNA ALTERNATIVA PARA SU CONSERVACIÓN

Figura 1. Categorías de desarrollo de <i>C. pendula</i> : a) embrión deforme, b) protocormo 1, c) Protocormo 2 y d) plántula 1.....	90
---	----

- Figura 2. Promedio de individuos de *C. pendula* en estadio de protocormo 2, A) a los 60 días de la siembra y B) a los 90 días después de la siembra, en los distintos medios de cultivo MS 1 (al 50%), MS 2 (al 100%), MS 3 (al 50% con BA 0.05), MS 4 (al 100% con BA 0.05), Phy 1(Phytamax 50%), Phy 2 (al 100%) y T1 (fertilizante comercial triple 17 al 50%) y T3 (fertilizante comercial triple 17 al 100 %). En donde: MS: medio Murishage y skoog y Phy: medio Phytamax.....91
- Figura 3. Promedio de individuos de *C. pendula* en estadio de plántula 1 en los medios de cultivo MS 1 (al 50%), MS 2 (al 100%), MS 3 (BA y MS 50%), MS 4 (BA y MS100%), Phy 1(Phytamax 50%), Phy 2 (al 100%) y T1 (fertilizante comercial triple 17 al 50%) y T3 (fertilizante comercial triple 17 al 100 %). A los 90 días de efectuada la siembra.....92
- Figura 4. Porcentaje de individuos de *C. pendula* en las distintas categorías de vigor en los tratamientos más sobresalientes con reguladores de crecimiento ANA y BA.....95

RESUMEN GENERAL

La pérdida tan acelerada de bosques en los que habita *Cuitlauzina pendula* (Orchidaceae) para su transformación en plantaciones de aguacate y la colecta y venta de individuos adultos son los principales factores que reducen y amenazan la persistencia de esta especie en la Región de Uruapan, Michoacán, México. Es por ello que se requieren estudios conducentes a su conservación, por lo que la presente investigación se realizó en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, situado en el área con la mencionada problemática, con el fin de evaluar el sistema de apareamiento y éxito reproductivo mediante tratamientos manuales y polinización natural, la preferencia de hospedero (s) y la distribución vertical y horizontal de *C. pendula* en dos tipos de vegetación (Bosque de Encino-Pino (BEP) y Bosque de Pino-Encino (BPE)). Finalmente se realizaron estudios para el establecimiento *in vitro* y desarrollo *in vitro* de esta especie por la siembra de semillas en distintos medios de cultivo (MS, MS con BA 0.05 mg/l, Phytamax y medio con fertilizante comercial triple 17) al 50% y 100% de sus componentes, así como de micropropagación mediante el cultivo de protocormos en el medio de cultivo Phytamax (50%) en una combinación de ANA (ácido naftalenacético) y BA (benciladenina) en concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg/L para ambos reguladores de crecimiento vegetal. Se determinó que *C. pendula* es una especie auto-incompatible y exógama, ya que para su reproducción sexual requiere de polinizadores, debido a que no se desarrollaron frutos por autopolinización espontánea, registrando un éxito reproductivo femenino bajo. Los bajos valores de fructificación (7.5%) con exocruzamiento indican que probablemente los individuos de esta población estén emparentados. Durante el proceso de germinación *in vitro*, se encontraron diferencias significativas en los diferentes medios de cultivo siendo los medios Phytamax al 50% y 100% los que mostraron los valores más altos de germinación. Los valores más altos de viabilidad de las semillas fueron en aquellas provenientes de exocruzamiento y polinización natural, mientras que las semillas de endocruzamiento no fueron viables. El desarrollo *in vitro* de los individuos provenientes de polinización abierta, fue significativamente mayor que el de exocruzamiento. La multiplicación de PLBs de *C. pendula* se obtuvo en diferentes medios de cultivo, considerando al medio Phytamax

con 0.1 y 0.5 mg/L de ANA/BA como el medio óptimo de proliferación con 7 PLBs a los 125 días del cultivo. Con los estudios de preferencia y de distribución en el huésped, se observó que las plantas de *C. pendula* mostraron preferencia principalmente hacia el hospedero *Quercus laeta*. La mayor abundancia de *C. pendula* se registró en la copa, en la sección intermedia de las ramas. La población está representada principalmente por la clase adulta con mayor número de individuos en la posición lateral y creciendo sobre corteza-musgo, en la posición Este en el BEP y en la posición Noroeste en el BPE. Los resultados de esta investigación, son de gran utilidad para generar estrategias de manejo adecuadas que integren distintos aspectos, como, promover la polinización cruzada entre individuos compatibles previamente identificados para asegurar la producción de frutos y semillas e incrementar el reclutamiento de nuevos individuos y a más largo plazo, la variabilidad genética; así como el establecimiento asistido de nuevos individuos de *C. pendula* en los árboles hospederos, en sitios adecuados. El desarrollo de un sistema eficiente de propagación *in vitro* de *C. pendula* puede ser muy útil para su propagación a gran escala, para su comercialización y con esto colaborar a bajar la presión que sobre sus poblaciones se ejerce. Finalmente, la obtención *in vitro* de gran cantidad de plántulas puede ser útil en programas de rehabilitación de poblaciones a través de reintroducción asistida en aquellas poblaciones muy depauperadas.

Palabras clave: Sistema de apareamiento, distribución vertical y horizontal, propagación *in vitro*, *C. pendula*

ABSTRACT

As accelerated loss of forests which inhabits *Cuitlauzina pendula* (Orchidaceae) for conversion into avocado orchards and the over-collection and sale of adult individuals, are the main factors that reduce and threaten the persistence of this species in the Region of Uruapan, Michoacán, Mexico. This is why studies leading to their conservation, are required so that this research was conducted in the Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, located in the area with the mentioned problems, in order to evaluate the system of mating and reproductive success using manual treatments and natural pollination, the preference of host (s) and the vertical and horizontal distribution of *C. pendula* in two types of vegetation, Oak-Pine Forest (BEP) and Pine-Oak Forest (BPE). Finally studies for *in vitro* establishment and development of *C. pendula* by culturing seeds in different culture media (MS, MS with BA 0.05 mg/L, Phytamax and commercial fertilizer triple media 17) at 50% and 100% of its components, as well as micropropagation by the protocorms cultures in the Phytamax culture medium (50%) in a combination of ANA (naphthaleneacetic acid) and BA (benzyladenine) concentrations of 0, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mg/L for both plant growth regulators. It was determined that *C. pendula* is a species of auto-incompatible and exogamous, for its sexual reproduction it requires pollinators, since fruits were not developed by spontaneous self-pollination, registering a low female reproductive success. The low values of fruiting (7.5%) with outcrossing indicate that individuals of this population are probably related. During the process of *in vitro* germination, significant differences were found in different culture media, being the media Phytamax to 50% and 100%, which showed the highest germination. The highest values of viability of the seeds were in those coming from outcrossing and natural pollination, while seeds of self pollination were not viable. Development *in vitro* from open-pollinated individuals was significantly greater than the outcrossing. The multiplication of PLBs of *C. pendula* was obtained in different culture media, whereas the average Phytamax with 0.1 and 0.5 mg/L of ANA/BA as the optimal means of proliferation with 7 PLBs at 125 days of cultivation. Studies of preference and distribution in the host showed that *C. pendula* mainly showed preference

towards the *Quercus laeta*. The greater abundance of *C. pendula* occurred in the branches, in the middle section of the branches. The population is mainly represented by the adult plants with highest number of individuals in the lateral position, growing on bark-moss, in East position in the BEP and in Northwest position in the BPE. The results of this research are very useful to generate appropriate management strategies that integrate different aspects. Such as to promote cross-pollination between compatible individuals previously identified to ensure the production of fruits and seeds and increase the recruitment of new individuals and in the longer term, genetic variability; as well as the assisted establishment of new individuals of *C. pendula* on tree hosts, on appropriate sites. The development of an efficient *in vitro* propagation of *C. pendula* can be very useful for spreading large scale, for its marketing and with this work together to lower the pressure that is exerted on their populations. Finally, obtaining large numbers of *in vitro* seedlings may be useful in programs of rehabilitation of populations through reintroduction in very impoverished populations.

Keywords: Mating system, vertical and horizontal distribution, propagation *in vitro*, *C. pendula*.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas en el reino vegetal, con aproximadamente 25,000 especies, considerándose una familia cosmopolita, con representantes principalmente en ambientes tropicales y subtropicales (Dressler, 1993; Soto-Arenas y Salazar, 2004). Debido a su gran variabilidad morfológica presentan hábitos de vida desde terrestres, litófilas, micoheterotróficas y epífitas, siendo este último hábito de vida el de mayor preferencia con un 73% de representantes dentro de la familia (Dressler, 1993).

En México se tienen aproximadamente 1,300 especies de orquídeas (Soto-Arenas y Salazar, 2004), de las cuales 444 especies son endémicas (Soto-Arenas, 1996). La subsistencia de la diversidad vegetal de esta familia está siendo seriamente amenazada debido a la susceptibilidad por perturbaciones (destrucción y fragmentación del hábitat) que ocasionan una reducción de los polinizadores, repercutiendo en la producción de frutos y semillas (Murren, 2002), (dependencia de polinizadores para su reproducción sexual del 60%) (Tremblay *et al.*, 2005). Esto puede influir en la estructura genética de las poblaciones por la reducción en las tasas de exocruzamiento, lo cual disminuye la variabilidad genética y favorece la endogamia (Murren, 2002). Aunado a esto, la extracción masiva de individuos de sus poblaciones naturales, que ocurre en los ecosistemas que habitan, afecta la recuperación de sus poblaciones (Murren, 2002). El conocimiento de su biología reproductiva y poblacional es esencial para la adecuada conservación y aprovechamiento de las especies de orquídeas (Soo *et al.*, 2001).

El estado de Michoacán posee aproximadamente 200 especies de orquídeas distribuidas de los 1500 hasta 2500 m.s.n.m. (Lapiner, 1975). Dicha orquídeoflora se encuentra seriamente amenazada, debido a que es el estado donde se registran las tasas más altas de pérdidas de bosques con más de 50 mil hectáreas por año, incrementando el riesgo de extinción de dichas especies (Maser, 1998).

Miles de plantas son cortadas cada año para su comercio en mercados y calles, lo cual ha ocasionado una extinción local de muchas de sus poblaciones naturales

(Halbinger y Soto, 1997), como es el caso de *C. pendula* La Llave & Lex. Esta especie se encuentra dentro de la categoría de especie endémica de México, y amenazada según la NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010), y en el Apéndice II dentro de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), siendo cada vez más raro encontrar poblaciones naturales de esta especie y cada vez con menor número de individuos (Ávila-Díaz, com. pers).

Por lo tanto el estudio del sistema de apareamiento y éxito reproductivo, ecología y propagación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*, son esenciales para el planteamiento de estrategias para el manejo y conservación de sus poblaciones a largo plazo.

ii. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Características de la familia Orchidaceae

Las orquídeas son plantas herbáceas perennes o subarborescentes, pueden ser epifitas, terrestres, litófilas y rara vez saprófitas. Presentan raíces con o sin velamen; tallos cortos o alargados, ligeramente engrosados o formando pseudobulbos, los pseudobulbos con uno o varios entrenudos; hojas dísticas, rara vez dispuestas en espiral, articuladas, plegadas o conduplicadas, en ocasiones lateralmente aplanadas o cilíndricas, raramente pecioladas, o bien ausentes; inflorescencia axilar, lateral, simple o ramificada, tienen flores solitarias o más comúnmente dispuestas en racimos, espigas o panículas, laterales o terminales; flores pequeñas e inconspicuas a grandes y vistosas. Las flores se agrupan casi siempre en racimos de 2 a 20 y pueden ser de muy variados colores. Los sépalos, pétalos y labelo cambian mucho de un género a otro, la flor es zigomorfa, frecuentemente resupinada (labelo situado en la parte inferior de la flor, debido a un giro de 180°). Generalmente son hermafroditas de flor sésil o “pedicelada”, el perianto está formado de 3 sépalos (exteriores) y 3 pétalos (interiores), que se encuentran libres a parcialmente unidos, uno de los pétalos está modificado y se llama labelo (parte más atractiva de la planta), difiere en forma, tamaño y color de los otros segmentos. Contienen una masa de polen de 2 a 8 polinias sostenidos en ocasiones por un pedículo (estípite) que conecta a los polinios con una parte viscosa (viscidio), la cual se remueve con los polinios y contribuye a su adhesión al agente polinizador. El fruto en forma de cápsula carnosa, generalmente ovoide, elipsoide o cilíndrica, dehiscente a todo lo largo, con 1, 2, 3 ó 6 suturas longitudinales; semillas diminutas y numerosas (Jiménez *et al.*, 1998).

2.2 Epifitas vasculares

Las epifitas vasculares representan alrededor del 10% de la diversidad vegetal en el mundo, con más de 80 familias con 29, 505 especies de plantas con esta forma de vida (Zotz y Andrade, 2003). Son abundantes en bosques húmedos encontrándose algunas especies en bosques secos y estacionales. Las epifitas vasculares son

componentes florísticos importantes y susceptibles de los bosques húmedos tropicales, cuya diversidad se ha demostrado que es afectada negativamente por la perturbación del bosque o la conversión a vegetación secundaria (Zotz y Andrade, 2003; Wolf, 2005; Hietz *et al.*, 2006; Hirata *et al.*, 2009).

Las epifitas son plantas que crecen sobre otras plantas adheridas a los troncos y ramas de árboles y arbustos principalmente, por ello, son llamadas, epifitas (del griego *epi*, sobre, y *phyton*, planta) (Granados-Sánchez *et al.*, 2003). El hospedero o “hospedero” sobre el que crece una epífita es utilizado sólo como soporte sin recibir más daño que el que pueda provocar su abundancia dentro de sus ramas. A diferencia de una planta parásita que obtiene agua y nutrientes del hospedero (Zotz y Andrade, 2003).

2.3 Adaptaciones de las epifitas vasculares

Las epifitas crecen en condiciones muy diversas (Benzing, 1995). En un bosque, las condiciones climáticas (temperatura, humedad y concentración de CO₂) muestran un gradiente vertical considerable (Zotz y Andrade, 2003). Sequías pronunciadas, fuertes vientos, escasez de nutrientes, irradiación intensa, alelopatía, gravedad y poca uniformidad y permanencia del sustrato son algunas de las condiciones que las epifitas deben enfrentar al estar suspendidas del suelo. Ante tal problemática, las epifitas han desarrollado modificaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas que les permite captar, absorber y almacenar el agua, así como evitar su pérdida y la de los solutos en ella disueltos. Siendo éstas las siguientes: a) desarrollo de succulencia o engrosamiento de hojas y tallos como los seudobulbos de algunas orquídeas, b) presencia de una cutícula gruesa (Benzing, 1995), con distintas capas de cera, las cuales forman una capa impermeable que cubre el tejido, permitiendo que la evaporación del agua sea eficazmente regulada por los estomas (Ceja *et al.*, 2008), c) presencia de velamen que es un tejido epidérmico esponjoso especializado en cubrir las raíces para prevenir el colapso celular y proteger a la raíz de daños mecánicos, d) metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) que consiste en que los estomas abran de noche, captando CO₂ con la pérdida mínima de agua, e)

asociación de las raíces con hongos micorrizicos, f) producción de semillas en grandes cantidades para asegurar su supervivencia (Benzing, 1995; Granados-Sánchez, 2003; Ceja *et al.*, 2008), las cuales son pequeñas y dispersadas por el viento g) secreciones de néctar con una alta calidad energética u otros tipos de estrategias para atraer la atención de los polinizadores (Ackerman, 1986).

2.4 Diversidad de epifitas vasculares

La precipitación es sin duda el principal factor que más influye en la abundancia y diversidad de la flora epífita. Aunque la flora epífita puede ser muy numerosa en los bosques secos, alcanza su máxima diversidad en los bosques montanos y lluviosos (Kelly *et al.*, 1994). Su riqueza de especies es tal, que en algunos bosques tropicales equivale al 50 % de la riqueza total de las plantas vasculares (Ceja *et al.*, 2008). Las epifitas representan alrededor del 10% de la diversidad vegetal en el mundo, con más de 80 familias con 29, 505 especies de plantas vasculares con esta forma de vida (Zotz y Andrade, 2003). Siendo la familia Orchidaceae, el grupo más importante de epifitas vasculares con más de dos tercios del total de las especies de epifitas vasculares, seguidas por la familia Bromeliaceae (Ceja *et al.*, 2008).

2.5 Papel ecológico de las epifitas en las comunidades vegetales

Las epifitas juegan un papel muy importante en la dinámica de las comunidades, ya que al estratificarse verticalmente desde los troncos hasta las copas del dosel, ofrecen una gran variedad de nichos, recursos e insumos que son aprovechados por diversos grupos de animales (hormigas, artrópodos, anfibios, aves, entre otros), contribuyendo al incremento de la biodiversidad de las comunidades donde se encuentran (Granados-Sánchez *et al.*, 2003; Ceja *et al.*, 2008). En ambientes húmedos, su biomasa fotosintética activa es superior al de todas las otras plantas juntas (Gentry y Dodson, 1987). Por otro lado acumulan grandes cantidades de agua entre sus hojas, induciendo una vía alterna en la dinámica de este recurso dentro del bosque contribuyendo a la humedad ambiental. Además, su biomasa en descomposición proporciona nutrientes como el fósforo y nitrógeno que son reciclados y reincorporados al ciclo de nutrientes que soportan poblaciones de

vertebrados e invertebrados (Ceja *et al.*, 2008). A su vez sirven de refugio y alimento, ya que proporcionan un micro hábitat para el establecimiento de invertebrados que pueden ser usados como fuente de alimento por otros animales (Benzing, 1995). Son también indicadores de cambios climáticos puesto que poseen mayor sensibilidad en comparación con la vegetación terrestre (Gentry y Dodson, 1987; Benzing, 1995).

Otra interacción interesante es la llamada Mirmecofilia que ocurre entre las hormigas y las epifitas. En esta interacción las epifitas proporcionan: alimento, refugio y material para construcción de nidos y a su vez las hormigas proveen nutrientes, protección de herbívoros y actúan también como agentes diseminadores, incluso de semillas de orquídeas (Benzing y Clements, 1991; Benzing, 1995; Catling, 1997).

2.6 Efectos de la fragmentación del hábitat

Las epifitas vasculares son componentes susceptibles de los bosques húmedos tropicales, cuya diversidad se ha demostrado que es afectada negativamente por la perturbación del bosque o la conversión a vegetación secundaria (Zotz y Andrade, 2003; Wolf, 2005; Hietz *et al.*, 2006). Dicha amenaza se ve incrementada por la gravedad de la perturbación, tamaño de los árboles remanentes y la edad de los bosques secundarios (Hietz *et al.*, 2006).

Se ha documentado que el cambio de bosque primario a secundario tiene un efecto notorio en la disminución del número y densidad de especies de epifitas vasculares como en *Jacquinilla teretifolia* (Krömer *et al.*, 2007) en parcelas de bosques perturbados, bajo barbecho o ante disturbios antropogénicos, con mayor efecto en aquellas especies que crecen en las ramas más gruesas y en la parte más húmeda de la cubierta. Dicha reducción en los bosques perturbados es explicada por las características estructurales y la joven edad de los árboles, falta de una capa de musgos y un microclima más seco en este tipo de vegetación (Wolf, 2005; Krömer *et al.*, 2007).

Otro ejemplo del efecto de la fragmentación de hábitat es el que ocurrió en Yucatán, México, en el que se observó una disminución del éxito reproductivo en sitios

perturbados y/o modificados con respecto a los parches conservados en *Oncidium ascendens*, esto debido a una disminución en la disponibilidad de polinizadores o una disminución efectiva de la polinización. Esta situación ha llevado a un menor reclutamiento de individuos y un cambio posterior en la estructura por edad de la población repercutiendo en la diversidad genética (Parra-Tabla *et al.*, 2000).

Sin embargo, a pesar de la amenaza que implica la deforestación o fragmentación del hábitat son muy pocos los estudios dirigidos al impacto de estos sobre la diversidad de epifitas en bosques montanos y menos aún sobre la ecología de epifitas en los bosques secundarios (Hietz-Seifert *et al.*, 1996; Barthlott *et al.*, 2001).

iii. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en una población de *Cuitlauzina pendula* dentro de la Reserva Natural del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio en Uruapan, Michoacán en los años 2011 y 2012, situada en la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico Transversal y en la Subprovincia Neovolcánica Tarasca, al centro occidente del estado de Michoacán (19° 25' y 19° 26' 19" de latitud Norte; 102° 04' 06" y 102° 07' 07" de longitud Oeste) en la porción sur de la llamada regionalmente Sierra Purépecha, con altitudes que van de 1960 a 2114 m (Bello y Madrigal, 1996). Se ubica en el límite de los municipios de Uruapan y Nuevo Parangaricutiro, con una extensión total de 458.21 hectáreas de las cuales 438.55 corresponden al área de montaña en la cual se realizó el presente estudio.

3.1 Vegetación

La vegetación predominante del área de montaña de la Reserva del Parque Nacional corresponde al Bosque de Coníferas con dosel cerrado, específicamente Bosque de Pino-Encino, Bosque de Encino-Pino, Bosque de Pino, así como relictos de Bosque Mesofilo de Montaña y vegetación secundaria (Bello y Madrigal, 1996).

La Reserva presenta una cubierta vegetal natural en su mayor parte, aunque existen

áreas dedicadas a la producción de aguacate, además de encontrarse una pequeña área en donde se pueden encontrar un gran número de especies introducidas.

El Bosque de Pino-Encino está constituido por las especies: *Pinus douglaciana*, *P. michoacana* var. *cornuta*, *P. lawsonii*, *P. leiophylla*, *P. pseudostrobus*, *P. pringlei* y *P. oocarpa*, siendo escasos estos tres últimos (Bello y Madrigal, 1996; Zavala-Álvarez, 2006).

Otras especies de plantas presentes son: *Quercus obtusata*, *Q. castanea*, *Q. candicans*, *Q. magnoliifolia* y *Q. resinosa*.

El relicto del Bosque mesófilo de montaña se encuentra representado por: *Alnus jorullensis*, *Carpinus caroliniana*, *Clethra mexicana*, *Ilex toluicana*, *Fraxinus uhdei*, *Hedyosmus mexicanum*, *Bocconia arborea*, *Oreopanax salvinii*, *Ternstroemia lineta* y *Prunus capuli* (Bello y Madrigal, 1996).

Además existen numerosas plantas arbustivas y herbáceas de ornato como el aretillo (*Fuchsia arborescens*), bambú (*Bambusa* sp.) floripondio rojo (*Datura sanguínea*), floripondio blanco (*Datura candida*), higuera (*Ricinus communis*), tulipán (*Hibiscus rosa-sinensis*), noche buena (*Euphorbia pulcherrima*) y tripa de pollo (*Commelina* sp.).

El arboreto es una zona de plantación, constituida por especies del género *Eucaliptus*, *Cupressus* y *Pinus*. Se encuentra a una altitud de 2000 m y cuenta con una superficie de 6.5 ha (Gómez-Reyes, 2005).

En la reserva se describen 49 especies de pteridofitas pertenecientes a 26 géneros y 10 familias, entre los que se encuentran *Cheilanthes* con 7 especies, *Adiantum* con 6 especies y *Polypodium* con 5 especies. La mayoría de las especies son de tipo herbáceo, aunque se encontraron tres arborescentes, dos correspondientes al género *Cyathea* (*Cyathea bicrenata* y *C. myosuroides*) y una más correspondiente a *Nephrolepis exaltata*, las cuales han sido introducidas en el área, al igual que otras angiospermas encontradas (Zavala-Álvarez, 2006).

3.2 Geología

La formación geomorfológica del área corresponde al cenozoico superior, periodo en el que se originó la Faja Volcánica Transversal, dominado por materiales extrusivos que provienen de la erupción de volcanes, encontrándose que los últimos aportes fueron del volcán Parícutín entre 1943-1952 (Demant y Silva, 1976).

Los materiales geológicos identificados en el área, están representados por cenizas volcánicas en distintos grados de alteración, con fragmentos de tamaño reducido que dan la impresión de arenas finas y gruesas con material vítrico, roca basáltica en forma de derrames ocurridos en diferentes periodos, limos y arcillas en menor cantidad (Gómez-Tagle, 1985).

3.3 Suelos

Los suelos en el área corresponden a dos unidades: Andosoles y Litosoles FAO (Gómez-Tagle, 1985). Los primeros son suelos profundos, bien drenados, ligeros, de color negro y pardo rojizo, ricos en minerales asimilables; la presencia de alófanos es característica de estos suelos.

El contenido de material orgánico es variable, pudiéndose definir la subunidad andosol vítrico, que presentan acidez moderada; se desarrolla sobre cenizas volcánicas, con textura de tipo arenoso, areno migajosa y migajón arenosa, con las fases superficiales, media y profunda. Este tipo de suelo tiene una amplia distribución en toda el área de estudio (Gómez-Tagle, 1985).

Los litosoles son suelos someros, jóvenes, poco desarrollados, rocosos, limitados a cierta profundidad por roca basal continua, dura, coherente. Son de color gris a oscuro, varían de pobres a muy ricos en materia orgánica y la textura es de migajón arenosa y franca. Se encuentran en las zonas altas con pendientes relativamente pronunciadas o bien, en áreas de corriente de lava reciente conocidas como malpaís (Gómez-Tagle, 1985).

3.4 Hidrología

La Reserva Natural se ubica en la región hidrológica No. 18 Balsas (RH18) dentro de la cuenca Tepalcatepec-Infiernillo, subregión Cupatitzio, el cual nace en el manantial Rodilla del Diablo en el área natural protegida del Parque Nacional Barranca de Cupatitzio (INEGI, 1996).

La sección montañosa, también forma parte de la subcuenca de escurrimiento del río Cupatitzio, la cual es una zona importante de descarga de acuíferos por su conformación física y geológica. Al interior del área existe un afloramiento superficial en forma de manantial que se mantiene durante todo el año, aunque disminuye durante la época de estiaje (Gómez-Tagle, 1985).

3.5 Clima

De acuerdo con el sistema de clasificación de Köeppen , modificado por García (1988) y con la estación meteorológica ubicada dentro del área, se determinó que el clima es semi-cálido, subhúmedo, del tipo (A)C(w2)(w)b(i”) gi, encontrándose entre los climas cálidos y templados por lo que se considera un clima de transición, siendo el más fresco de los cálidos y el más cálido de los templados, con temperatura media anual de 23.8 ° C y la del mes más frío de 5.4 °C en Enero. La precipitación media anual es de 1600 mm y el porcentaje de lluvia invernal representa el 5 % de la anual.

iv. SISTEMA DE ESTUDIO

4.1 El género *Cuitlauzina*

A nivel mundial *Cuitlauzina* es un género de orquídeas representado por las siguientes seis especies: *C. candida*, *C. convallarioides*, *C. dubia*, *C. egertonii*, *C. pendula* y *C. pulchella*, distribuyéndose desde México hasta Panamá (Soto *et al.*, 2007).

4.2 Clasificación taxonómica de *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex.

De acuerdo con el catálogo de la CONABIO, la familia Orchidaceae se clasifica de la siguiente manera:

Subdivisión: Magnoliophyta

Clase: Liliopsidae

Orden: Orchidales

Familia: Orchidaceae

Dressler (2003) y Sandoval *et al.*, (2004) proponen con evidencias anatómicas nuevas combinaciones para la subtribu Oncidiinae e incluyen a *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. en esta subtribu, dejando de ser un género monotípico, con la siguiente clasificación:

Subfamilia: Vanidoiidae

Tribu: Cybidieae

Subtribu: Oncidiinae

Género: *Cuitlauzina*

Especie: *C. pendula* La Llave & Lex.

4.3 Descripción de *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex.

Hierba epífita cespitosa, más bien masiva, hasta de 40 cm de alto, sin incluir la inflorescencia. Seudobulbos algo agregados, ovoides, lateralmente comprimidos, verdes o amarillentos, lisos, arrugados con la edad, brillantes, hasta de 5-10 x 2.5-4 cm, con 2-3 vainas de 3-5 cm de largo. Hojas apicales, 2-3, coriáceas, oblongo-elípticas o lanceoladas, de 10-25 x 2-4.5 cm. Inflorescencia axilar, péndula o

arqueada, del brote nuevo; un racimo o una panícula con 2-3 ramas, de 25-120 cm de largo, el pedúnculo delgado, hasta de 70 cm de largo, muy rígido; el raquis denso, algo sinuoso, hasta con 20 flores. Flores muy vistosas, subcarnosas, de 40-70 mm de diámetro; tépalos y pétalos blanco puro, o frecuentemente esfumados, punteados o manchados de rosa, muy raramente con grandes manchas púrpura-magenta, la superficie dorsal frecuentemente rosada; labelo blanco o más frecuentemente rosado, el callo amarillo con puntos púrpura oscuro; fragantes, el aroma algo cítrico. Sépalos subunguiculados, rígidos, obovados a elípticos, ampliamente redondeados, el dorsal de 15-25 x 10-18 mm; los laterales algo oblicuos, de 22 x 15 mm. Pétalos subunguiculados, elípticos, el borde irregular, el ápice retuso de 15-22 x 12-15 mm. Labelo de 28-30 mm de largo, con una uña muy larga, de 5-10 mm de largo, donde se asienta en callo. Columna de 4.5-6 mm de largo, 2.5-3 mm de grosor. Estigma excavado, oblongo; rostelo una lámina transversal, gruesa. Antera de 4.5 mm de largo. Polinario de 2.5 mm de largo, con 2 polinios, estípites y viscidio. Cápsula elipsoide de 3 x 1.6 cm (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007) (Figura 1).

C. pendula es una especie endémica de México, variable en el tamaño de sus inflorescencias y en la coloración de sus flores a lo largo de su distribución, distribuyéndose principalmente en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Guerrero y Oaxaca en altitudes entre los 1500 y 2500 m (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007).

En la literatura se reporta en general un periodo de floración de Abril-Agosto (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007). En lo que respecta al desarrollo y maduración de las cápsulas de *C. pendula* en el sitio de estudio tuvieron una duración de 6 a 8 meses (observ. personal).

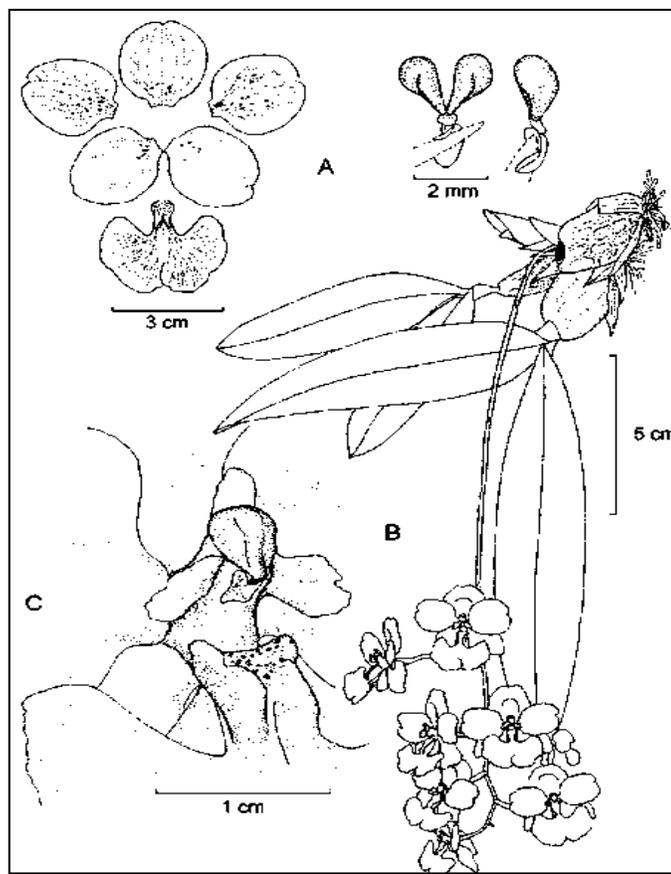


Figura 1. *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. A. disección floral y polinario; B. planta en floración; C. detalle del callo. Ilustrado por Eric Hágsater (tomada de Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007).

v. OBJETIVO GENERAL

El objetivo central de este estudio es el de generar información sobre el sistema de apareamiento y éxito reproductivo, la distribución vertical y horizontal de *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. así como de su propagación *in vitro* para proponer alternativas para su conservación en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán.

CAPÍTULO 1. SISTEMAS DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCTIVO DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) EN EL PARQUE NACIONAL BARRANCA DEL CUPATITZIO EN URUAPAN, MICHOACÁN.

RESUMEN

El estudio de la biología reproductiva es útil para promover y plantear estrategias para la conservación de las especies. *Cuitlauzina pendula* es una orquídea epífita, amenazada endémica de México, por lo que el estudio del sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino tienen gran importancia. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la necesidad de la visita de polinizadores de *C. pendula*, para asegurar la producción de frutos y semillas, y evaluar el sistema de apareamiento y éxito reproductivo en términos de la proporción de frutos, la viabilidad y desarrollo *in vitro* de semillas. Se llevaron a cabo tratamientos de polinizaciones manuales y se evaluó la producción de frutos por endocruzamiento, exocruzamiento, autopolinización espontánea y polinización natural y/o abierta, así como la viabilidad de semillas y el desarrollo *in vitro* de las mismas. No se desarrollaron frutos por autopolinización espontánea, lo cual indica que requiere de polinizadores para su reproducción sexual. No se encontraron diferencias significativas en la producción de frutos en el resto de los tratamientos de polinización ($\chi^2=6$, $gl=4$, $P=0.1991$), registrando valores bajos en todos los tratamientos (5 % en endocruzamiento; 7.5 % con exocruzamiento y 3.2 % en polinización natural). Respecto a la viabilidad de semillas y el desarrollo *in vitro* de las mismas, se encontraron diferencias significativas ($\chi^2=247.04$, $gl=4$, $P=0.000$ y $\chi^2=631.58$, $gl=10$, $P=0.000$ respectivamente), en los diferentes tratamientos de polinización, registrando valores altos en la viabilidad de las semillas provenientes de exocruzamiento y polinización natural, mientras que las semillas de endocruzamiento no fueron viables; por lo que *C. pendula* es considerada en este estudio como una especie auto-incompatible, lo que indica que *C. pendula* es una especie exógama. Cabe mencionar que el desarrollo *in vitro* de aquellos individuos provenientes de polinización abierta, fue significativamente mayor que el registrado en exocruzamiento ($\chi^2=75.77$, $gl=5$, $P=0.000$). Se registró un éxito reproductivo femenino bajo (3.2%) como en muchas

otras especies de la familia Orchidaceae. Los bajos valores de fructificación producto del exocruzamiento indican que muy probablemente los individuos de la población estudiada están emparentados, por lo que es urgente un manejo adecuado para promover la polinización cruzada entre individuos previamente identificados como los portadores de los frutos con la mayor viabilidad de semillas para incrementar el reclutamiento de nuevos individuos y a mas largo plazo, la variabilidad genética.

Palabras clave: Sistema de apareamiento, éxito reproductivo femenino, *Cuitlauzina pendula*, endémica.

1.1 INTRODUCCIÓN

La polinización es extremadamente compleja en la familia Orchidaceae que se distingue, por la diversidad de sus flores y por las intrincadas interacciones ecológicas con sus agentes polinizadores. Aproximadamente el 60% de las especies de orquídeas dependen de agentes polinizadores para su reproducción sexual (Tremblay *et al.*, 2005). Es bien sabido que la fragmentación de hábitat puede limitar la disponibilidad de polinizadores o provocar una extinción local de estos, disminuyendo el éxito reproductivo (Murren, 2002).

Los sistemas de apareamiento son uno de los factores más importantes que determinan la variabilidad genética de las plantas (Borba *et al.*, 2001), existiendo una gran variedad de sistemas de apareamiento en la familia Orchidaceae, predominando los sistemas de apareamiento mixtos, tendiendo a la exogamia (Tremblay *et al.*, 2005; Ávila, 2007). Las orquídeas son típicamente autocompatibles, aunque algunas orquídeas presentan barreras genéticas que evitan la autogamia, promoviendo así, el exocruzamiento (Borba *et al.*, 2001; Wallace, 2003). Estas barreras están generalmente asociadas a especies polinizadas por insectos que con frecuencia permanecen mucho tiempo sobre las flores e inflorescencias (Borba *et al.*, 2001). Sin embargo, la autogamia espontánea puede ser exitosa en condiciones ecológicas particulares, al impedir la dependencia de un polinizador cuando hay una baja densidad de éstos (Neiland y Wilcock, 1998). Se considera que los sistemas de apareamiento pueden influir en los niveles de diversidad y en la estructura genética de la población, los cuales son factores fundamentales para ser considerados en la conservación (Soo *et al.*, 2001)

En general, en la familia Orchidaceae, se presenta un bajo éxito reproductivo femenino (Parra-Tabla *et al.*, 2000; Murren, 2002; Tremblay *et al.*, 2005; Ávila, 2007) explicándose por una severa limitación de la polinización (Tremblay *et al.*, 2005). Por otro lado, los niveles de aborto y costos energéticos de frutos y semillas pueden estar asociados con algunas características particulares de las especies tales como la forma de vida, los sistemas de polinización y los sistemas de dispersión. El aborto de

estructuras reproductivas en plantas es jerarquizado y va desde flores, frutos, óvulos hasta semillas que no son viables, siendo la producción de frutos y semillas la capacidad reproductiva real de la planta (Castro y Ruiz, 2001).

El sistema de apareamiento y éxito reproductivo en diversas especies de orquídeas, puede ser variable tanto espacial como temporalmente (Ávila-Díaz, com. pers.), por lo cual este estudio se considera importante para determinar si *Cuitaluzina pendula* requiere de la visita de polinizadores para su reproducción sexual y evaluar el sistema de apareamiento y éxito reproductivo en términos de la proporción de frutos, la viabilidad y desarrollo *in vitro* de semillas. Así como, corroborar los patrones registrados previamente para esta especie por Torres (2006). Se considera que el conocer su sistema de apareamiento y éxito reproductivo puede ser útil para implementar estrategias de manejo tanto *in situ* como *ex situ*.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Sistema de apareamiento

El hermafroditismo en angiospermas es considerado una condición ancestral (Frohlich, 2003) a partir del cual ha evolucionado el mayor repertorio de sistemas reproductivos que se conocen en la naturaleza (Cuevas y Abarca, 2006); representando este entre el 75% y 90% del total de las especies (Richards, 1986). En las plantas hermafroditas los gametos masculinos y femeninos son producidos en la misma flor, por tanto, existe la posibilidad de que ocurra auto fecundación, y por consecuencia pueda existir depresión por endogamia (Cuevas y Abarca, 2006).

Los sistemas reproductivos resultan de la combinación específica de varias características como compatibilidad genética, sexualidad (monoica, dioica y/o hermafrodita), variación temporal en la maduración de los sexos (dicogamia) y separación espacial de las estructuras reproductivas (hercogamia) (Barret, 2002; Lemus-Jiménez, 2005; Abarca y López, 2007). De estos atributos, la unisexualidad y la autoincompatibilidad genética en especies hermafroditas representan los caracteres más eficientes en promover la polinización cruzada evitando así los efectos negativos de la endogamia (Barret, 2002; Lemus-Jiménez, 2005; Abarca y López, 2007).

El sistema de apareamiento se define como los caracteres reproductivos que determinan los patrones de apareamiento en los organismos, es decir, quién se aparee con quién y cómo lo hacen (Barret *et al.*, 1996; Vogler y Kalisz, 2001).

En especies preferentemente exógamas, la depresión por endogamia es un riesgo existente, el cual puede reducir la adecuación de los individuos ya que la descendencia proveniente de la autofecundación posee menor adecuación que la proveniente del exocruzamiento (Abarca y López, 2007). Sin embargo la endogamia puede resultar de la autofertilización o del apareamiento entre parientes por lo que, cualquier especie autocompatible muy probablemente estará en riesgo de sufrir los efectos negativos de la depresión por endogamia (Wallace, 2003).

En general las orquídeas son hermafroditas y autocompatibles, pero la estructura de la flor favorece el entrecruzamiento, puesto que poseen en su mayoría anteras y estigmas separados espacialmente, previniéndose la autofecundación, por lo que la mayoría de las especies no pueden producir frutos sin la polinización cruzada llevada a cabo por los polinizadores (Dressler, 1981). Aunado a esto, algunas orquídeas presentan barreras genéticas que evitan la autogamia (como la auto-incompatibilidad), que generalmente ocurren después de la polinización promoviendo también el exocruzamiento (Borba *et al.*, 2001; Wallace, 2003).

Sin embargo la autogamia espontánea no es infrecuente en las especies de orquídeas, sugiriendo incluso que en la familia puede ocurrir en un 5% y 20 % y que esta incrementa con la latitud y es más reincidente en las zonas insulares, donde la actividad de polinizadores puede ser impredecible o habitualmente baja (Cattling, 1990).

Algunos estudios reportan especies de orquídeas con un sistema de auto-compatibilidad como en *Liparis kumokiri* (Soo *et al.*, 2001), *Pseudolaelia corcovadensis* (Borba y Braga, 2003) y *Earina mucronata* y *E. autumnalis* (Lehnebach y Robertson, 2004). Mientras que en otras especies se ha registrado un sistema de auto-incompatibilidad parcial como en *Pleurotallis johannensis*, *P. ochreatea*, *P. teres* (Borba *et al.*, 2001), *Earina aestivalis* y *Winika cunninghamii* (Lehnebach y Robertson, 2004) y *Prostechea aff. karwinskii* (Camacho, 2010). Dichos sistemas de apareamiento incluso, pueden variar, tanto espacial como temporalmente (Tremblay *et al.*, 2005, Ávila-Díaz, com. pers.). Tal como ocurrió en *Pseudolaelia corcovadensis* (Borba y Braga, 2003) y *Prostechea aff. karwinskii* (Camacho, 2010) que aunque ambas pertenecen a la subtribu Laeliinae, su sistema de compatibilidad difirió.

Otro de los parámetros para determinar el sistema de apareamiento es la viabilidad de semillas que ha sido evaluado en diferentes especies de orquídeas, encontrando en general una mayor viabilidad de semillas en los frutos provenientes de exocruzamiento que en los de endocruzamiento (Borba *et al.*, 2001; Borba y Braga,

2003; Camargo *et al.*, 2006; Torres, 2006; Ávila, 2007).

Se ha reportado en diversos estudios en el estado de Michoacán, México que *C. pendula* (Torres, 2006), *Laelia speciosa* (Ávila, 2007) y *Prostechea aff. karwinskii* (Camacho, 2010) son especies con un sistema de apareamiento mixto en el que se favorece la exogamia.

1.2.2 Éxito reproductivo

El éxito reproductivo femenino en la familia Orchidaceae expresado como *fruit set* (Borba y Braga, 2003) (termino de origen inglés, que se refiere a la relación entre el número de frutos producidos y el número de flores marcadas por tratamiento (Inouye *et al.*, 1994), se ha sugerido, como un mecanismo adaptativo en algunos casos, especialmente en especies epifitas que comúnmente están expuestas a la limitación de recursos (Borba y Braga, 200) (agua y disponibilidad de nutrientes) (Tremblay *et al.*, 2005). Tal limitación de recursos en plantas puede provocar variaciones en los ritmos fenológicos (floración, duración de la floración y fructificación, grado de sincronía entre la floración y fructificación) y estas a su vez afectar la relación de los polinizadores con las plantas (Gutián *et al.*, 1992). En tales casos, es más importante asegurar un *fruit set* bajo con altas tasas de exocruzamiento que un alto porcentaje de frutos resultantes de cruces que implican una menor variabilidad genética (Ackerman y Zimmerman, 1994; Borba y Braga, 2003).

La limitación de la polinización es característica de esta familia, debido a que la presencia y disponibilidad de polinizadores es imprevisible (Tremblay *et al.*, 2005), lo que posiblemente ha favorecido la predominancia de sistemas reproductivos mixtos, incluyendo a especies exógamas que pueden producir frutos con su propio polen, además de beneficiarse de la polinización cruzada y por otro lado con la autopolinización, las cuales pueden ser una muestra de la hipótesis del aseguramiento reproductivo (Ávila, 2007).

En la familia Orchidaceae se ha reportado un bajo *fruit set* con la polinización abierta.

Cabe señalar que de manera global en orquídeas se presenta un patrón en la producción de frutos, reportándose un mayor *fruit set* en especies de regiones templadas respecto a las especies de regiones tropicales y un *fruit set* aún más bajo en aquellas especies que no ofrecen recompensa donde la polinización es por engaño (Tremblay *et al.*, 2005).

1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la necesidad de la visita de polinizadores de *C. pendula* La Llave & Lex. para asegurar la producción de frutos y semillas.
2. Evaluar el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *C. pendula* La Llave & Lex. en términos de la proporción de frutos y la viabilidad y desarrollo *in vitro* de semillas.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino

La elección de las inflorescencias se hizo de forma sistemática, seleccionando todas las inflorescencias encontradas. Los árboles hospederos fueron marcados con celocinta naranja alrededor del tronco.

Para el estudio del sistema de apareamiento se hicieron exclusiones antes de la antesis con bolsas de tul fino para evitar la interacción de las flores con polinizadores o cualquier otro insecto en 223 botones florales de 20 inflorescencias correspondientes a 20 plantas distribuidas en 8 árboles. Una vez que los botones florales abrieron, fueron descubiertos y se aplicaron los siguientes tratamientos manuales:

- a) Endocruzamiento: en dos flores de cada inflorescencia se tomaron las polinias de la misma flor y se colocó dentro de su propio estigma, inmediatamente después se etiquetaron con la letra E.

b) Exocruzamiento: otras dos flores de cada inflorescencia fueron polinizadas con polinias tomadas de flores provenientes de otro individuo creciendo sobre otro hospedero, que se encontraban a una distancia aproximada de 15 m entre estos para disminuir la posibilidad de cruce entre plantas con parentesco. Una vez efectuado el tratamiento se etiquetaron con la letra X y fueron cubiertas nuevamente con las bolsas de tul fino.

Para realizar una evaluación cuantitativa del sistema de apareamiento, se utilizó el índice de auto-compatibilidad (SCI) (Lehnebach y Robertson, 2004) con los resultados de los tratamientos manuales de endocruzamiento y exocruzamiento de la siguiente manera: $SCI = \text{producción de frutos con endocruzamiento} / \text{producción de frutos con exocruzamiento}$.

El rango de valores de SCI oscila entre 0 (especie completamente auto-incompatible), $0.2 < SCI < 0.9$ (de moderada a parcialmente auto-incompatible) y $SCI > 0.9$ (especie auto-compatible) (Dafni, 1992; Lehnebach y Robertson, 2004).

c) Autopolinización espontánea: a las flores restantes de cada inflorescencia no se les llevó a cabo ningún tipo de polinización manual, solo se emplearon para saber si *C. pendula* recurre a mecanismos de autopolinización. Una vez efectuados todos los tratamientos, las inflorescencias, fueron cubiertas con las bolsas de tul, hasta que se secaron las flores.

Se contabilizó, el número de flores totales y el número de flores que fueron polinizadas para cada uno de los tratamientos manuales.

Las bolsas de tul fueron retiradas una vez que las flores se secaron y dejaron de ser receptivas, esto con la finalidad de no influir en el posterior desarrollo de los frutos.

Éxito reproductivo femenino

Para estimar la polinización natural y/o abierta: se etiquetaron con la letra N, 253 flores provenientes de inflorescencias de 20 plantas sin manipularlas ni cubrirlas. Lo

anterior para evaluar el *fruit set* natural o éxito reproductivo femenino como producto de la interacción con los polinizadores.

Para cada inflorescencia incluida en los distintos tratamientos arriba mencionados se llevó un registro en cada visita del número de frutos que se desarrollaron hasta su madurez o aborto, para obtener la proporción de flores que produjeron frutos maduros.

El *fruit set* fue calculado dividiendo el número de frutos producidos entre el número de flores marcadas por tratamiento, determinando así el sistema de apareamiento y el éxito reproductivo femenino de *C. pendula*.

1.4.1.1 Viabilidad de semillas con la presencia de embriones

Otros componentes importantes para evaluar el sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino fueron la viabilidad de las semillas evaluada con la presencia de embrión (cuándo el embrión se encontró llenando en su totalidad la testa de la semilla) y a través del desarrollo *in vitro*.

Se analizaron 13 cápsulas provenientes de los tratamientos de endocruzamiento (2), exocruzamiento (3) y polinización natural (8); excepto el tratamiento de autopolinización espontánea en el que no hubo desarrollo de cápsulas.

Para cada una de las cápsulas obtenidas se tomó una muestra de semillas de 5mg aproximadamente con una espátula colocándolas en un portaobjetos previamente etiquetado a las cuales se les agregó 1 ml de agua destilada. Posteriormente se colocó el cubreobjetos para la evaluación de las semillas provenientes de las cápsulas resultantes de cada tratamiento de polinización. Se evaluó la viabilidad de 1300 semillas (100 por cápsula) en un microscopio óptico (Carl Zeiss, modelo Primo Star, con un aumento de 10X) para detectar la presencia de embriones en las semillas en cada una de las cápsulas correspondientes a cada tratamiento.

Para la viabilidad de las semillas observadas al microscopio se establecieron tres categorías de desarrollo del embrión: 1) sin embrión (semillas vacías); 2) embrión

deforme (cuando el embrión se encontró llenando ≤ 50 % de la testa); y 3) embrión sano (cuando el embrión se encontró llenando en su totalidad a la testa). Para cada uno de los tratamientos, se registró el número de semillas en las diferentes categorías de desarrollo. Dicho método ha sido reportado en previos estudios de orquídeas basados en la morfología de semillas (Borba *et al.*, 2001; Torres, 2006; Ávila, 2007, Camacho, 2010).

1.4.1.2 Desarrollo *in vitro*

La evaluación de la viabilidad *in vitro* fue medida con el desarrollo *in vitro* de semillas de *C. pendula* provenientes de los distintos tratamientos de polinización.

Para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, las semillas fueron colocadas en frascos de vidrio con embudos de papel filtro previamente esterilizados, el método de asepsia de las semillas fue el siguiente:

- a) Se colocaron en una solución de detergente (hyclin neutro) al 15%, durante 5 minutos
- b) Después de varios enjuagues con agua destilada estéril, se agrego una solución de etanol al 70%, durante 5 minutos
- c) Posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex) al 10% (0.6 de cloro activo), durante 5 minutos
- d) En el área estéril (campana de flujo laminar), se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril y se prosiguió a la siembra.

Las semillas para su siembra fueron esparcidas con una espátula sobre el medio nutritivo Phytamax al 50%, puesto que se ha probado con éxito este medio de cultivo para la germinación de esta especie. Para cada cápsula proveniente de los tratamientos de polinización manual (endocruzamiento, exocruzamiento) y para las cápsulas provenientes de la polinización natural se sembraron 7 frascos por cápsula, haciendo un total de 91 frascos.

Posteriormente se llevó a cabo la evaluación del desarrollo *in vitro* a los 90 días, de efectuada la siembra, después de ocurrida la germinación en cada una de las cápsulas provenientes de los distintos tratamientos de polinizaciones manuales y de polinización natural mediante observaciones en un microscopio estereoscópico (Fisher Scientific, stereomaster, 4 X). Para la evaluación del desarrollo *in vitro*, se asignaron las siguientes categorías: Sin embrión, embrión deforme, protocormo 1 (aquellas semillas que tenían el embrión llenando en su totalidad a la testa), protocormo 2 (aquellas semillas que tenían más del 50% o todo el embrión, fuera de la testa), plántula 1 (plántulas con 1 ó 2 hojas) y plántula 2 (plántulas con más de 2 hojas). La siembra *in vitro* de las semillas de *C.pendula*, se llevó a cabo también con la finalidad de descartar o en su defecto comprobar la viabilidad de los embriones deformes (cuando el embrión se encontró llenando $\leq 50\%$ la testa).

1.4.2 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos de la evaluación de la viabilidad de semillas y el desarrollo *in vitro* en los distintos tratamientos de polinización de *C. pendula* fueron analizados con la prueba estadística Chi-cuadrada (SPSS, 2009).

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino

No hubo producción de frutos con la autopolinización espontánea, de las 143 flores que se dejaron con el capuchón mientras estaban en anthesis, sin aplicar ningún tratamiento de polinización, ninguna de estas produjo fruto. En los tratamientos restantes, los valores de *fruit set* de *C. pendula* no difirieron significativamente ($\chi^2=6$, $gl=4$, $P=0.1991$) entre si (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de flores y producción de frutos (%) con los tratamientos de polinización aplicados a *Cuitlauzina pendula* en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio municipio de Uruapan, Michoacán.

Tratamientos de polinización	Número de flores por tratamiento	Producción de frutos (%)
Endocruzamiento	40	5.0
Exocruzamiento	40	7.5
Polinización autogama	143	0
Polinización natural	253	3.2

1.5.1.1 Viabilidad de semillas con la presencia de embriones

La mayor cantidad de embriones sanos se registró en las cápsulas 2 y 3 con un 88% y 45%, respectivamente en el tratamiento de exocruzamiento y en el tratamiento de polinización natural en las cápsulas 1, 2, 6, 7 y 8 con un 93%, 93%, 61%, 79% y 42%, respectivamente (Figura 1). Observando diferencias significativas en la viabilidad de semillas entre las distintas cápsulas de *C. pendula* en los tratamientos de exocruzamiento ($\chi^2=263.61$, $gl=4$, $P=0.000$) y de polinización natural ($\chi^2=586.94$, $gl=14$, $P=0.000$).

Mientras que en el tratamiento de endocruzamiento en las cápsulas 1 y 2 se presentó un 2% y 8% de semillas con embriones deformes y un 98% y 92%, respectivamente de semillas sin embrión (Figura 1). Semejante a la C1 del tratamiento con exocruzamiento y a las cápsulas C3, C4 y C5 del tratamiento de polinización natural. Por lo que no hubo diferencias significativas en las dos cápsulas obtenidas, en cuanto a la viabilidad de sus semillas de acuerdo a la presencia de embrión sano ($X^2=3.79$, $gl=1$, $P=0.052$).

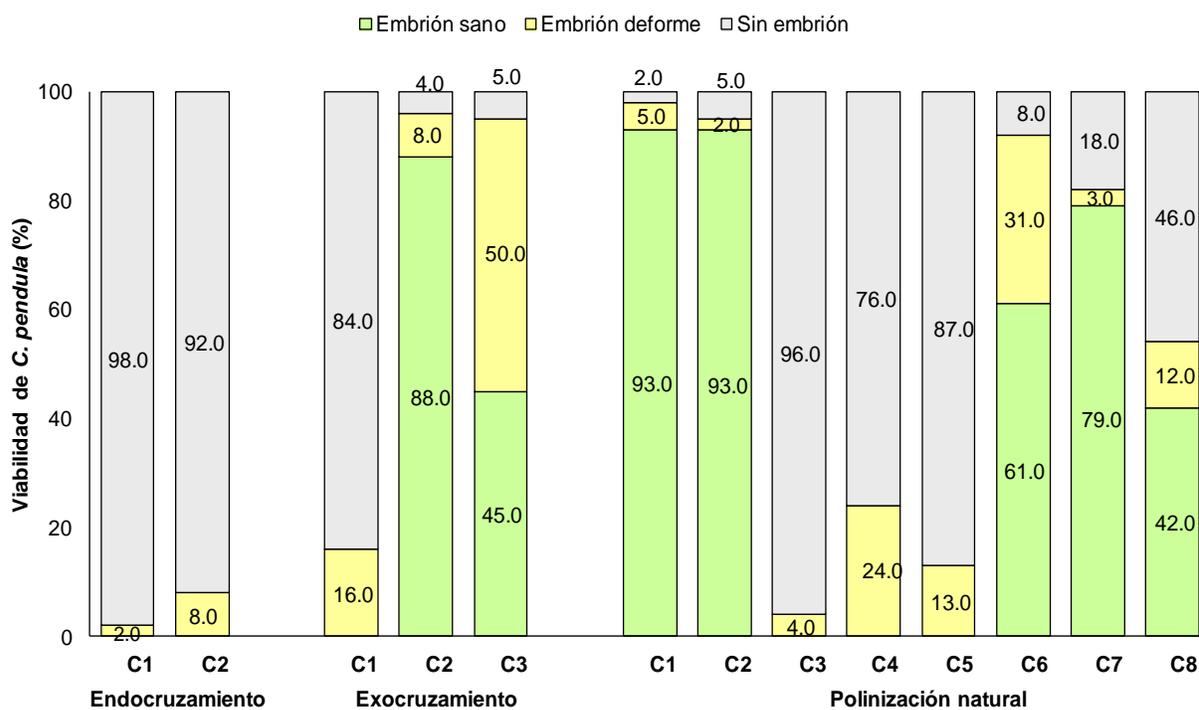


Figura 1. Viabilidad de semillas en base a la presencia de embriones (%), de cada una de las cápsulas de *C. pendula* provenientes de los tratamientos de polinización manual (endocruzamiento, exocruzamiento) y polinización natural.

La viabilidad de las semillas, evaluada con la presencia de embriones de *C. pendula* con respecto a los distintos tratamientos (endocruzamiento, exocruzamiento y polinización natural) de manera general, mostró diferencias significativas ($X^2=247.035.24$, $gl=2$, $P=0.000$). Encontrando en los tratamientos de exocruzamiento y polinización abierta porcentajes similares (44.3% y 46%) de embriones sanos

(Figura 2).

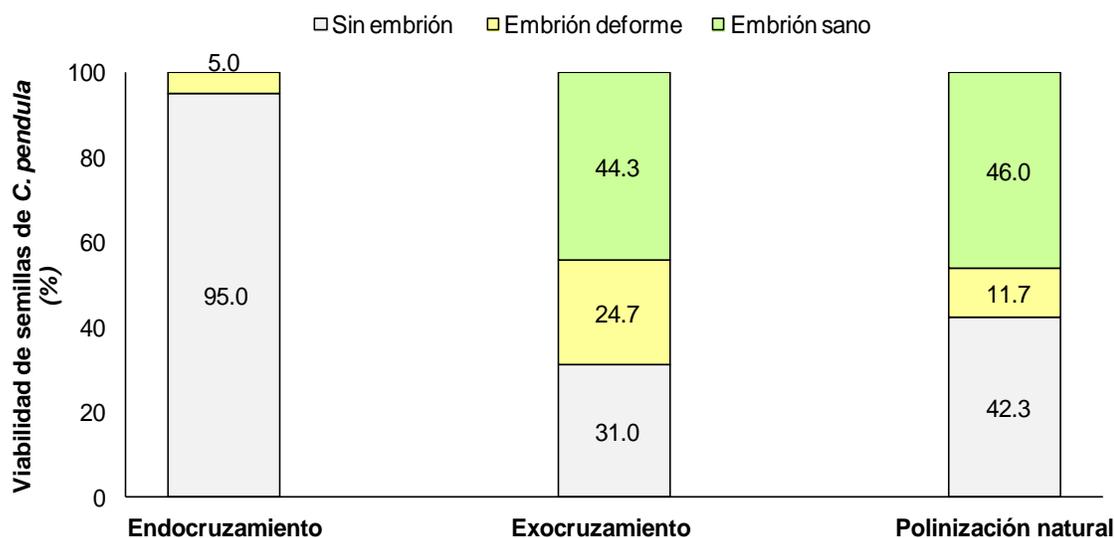


Figura 2. Viabilidad de semillas de *C. pendula* en base a la presencia de embriones (%), en los distintos tratamientos de polinización manual (endocruzamiento, exocruzamiento) y polinización natural.

1.5.1.2 Desarrollo *in vitro*

El desarrollo *in vitro* de las semillas de *C. pendula* a los 90 días de efectuada la siembra, mostró diferencias significativas en cuanto al desarrollo *in vitro* de las semillas de cada cápsula dentro de los tratamientos de exocruza y polinización natural pero no en el tratamiento de endocruzamiento (cuadro 2).

Puede apreciarse que con endocruzamiento en general las semillas no presentaron embrión y solamente el 1% fueron embriones deformes y en protocormo 1 en ambas cápsulas, es decir que al momento de la observación, ninguna de las semillas logró germinar (estado de protocormo 2). En el tratamiento de exocruzamiento el mayor desarrollo fue para las categorías de protocormo 1 y 2 (cápsulas 2 y 3) y en la polinización natural para las categorías de protocormo 1, protocormo 2 y plántula 1 (en las cápsulas 1, 2, 6, 7 y 8), excepto las cápsula 3, 4 y 5 con más del 50% de semillas sin embrión y el porcentaje restante de semillas deformes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Desarrollo *in vitro* a los 90 días después de efectuada la siembra de las semillas de *C. pendula* de cada una de las cápsulas en los distintos tratamientos manuales realizados en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Uruapan, Michoacán.

Categorías de desarrollo del embrión	Endocruzamiento $\chi^2=4$, $gl=2$, $P=0.135$		Exocruzamiento $\chi^2=593.65$, $gl=10$, $P=0.000$			Polinización natural $\chi^2=225.8$, $gl=35$, $P=0.000$							
	(%)		(%)			(%)							
	C1	C2	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Sin embrión	99	99	99.5	-	22	-	-	82.5	62.5	97.5	5	-	24.5
Deformes	1	-	-	-	5.5	-	-	17	37	2.5	12.5	-	4
Protocormo 1	-	1	0.5	47	66.5	16	21.5	0.5	0.5	-	81	26.5	68.5
Protocormo 2	-	-	-	16	6	44	30			-	0.5	23	2.5
Plántula 1	-	-	-	31	-	30	35.5	-	-	-	0.5	39.5	0.5
Plántula 2	-	-	-	6	-	10	13	-	-	-	0.5	11	

De manera general, el desarrollo *in vitro* de las semillas de *C. pendula* a los 90 días, mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de polinización ($\chi^2=631.58$, $gl=10$, $P=0.000$). Es interesante hacer notar que los tratamientos de exocruzamiento y polinización natural son significativamente diferentes ($\chi^2=75.774$, $gl=5$, $P=0.000$), registrándose un mejor desarrollo *in vitro* en las semillas producto de la polinización natural (Figura 3).

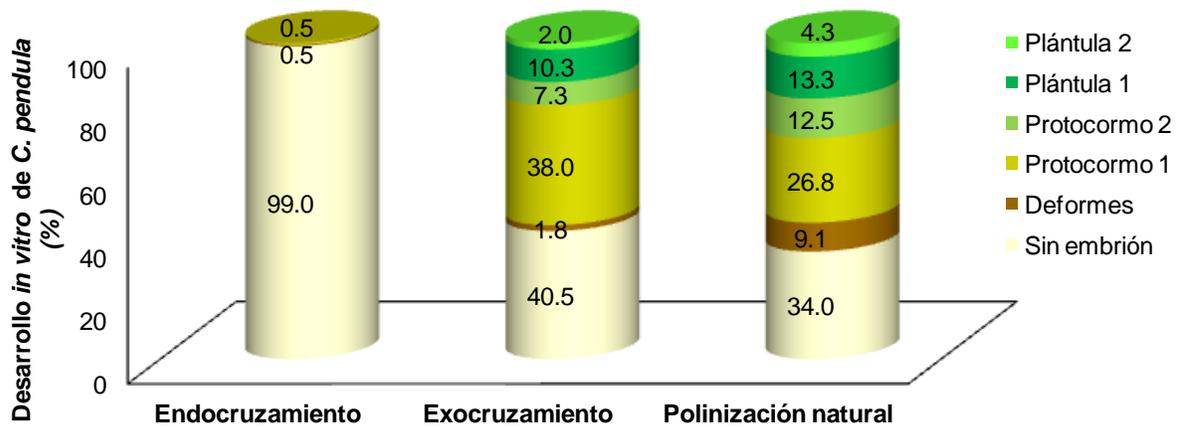


Figura 3. Desarrollo *in vitro* de *C. pendula* en cada una de las cápsulas en los tratamientos de exocruzamiento y en la polinización natural.

1.6 DISCUSIÓN

1.6.1 Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino

C. pendula al igual que muchas otras especies de orquídeas (Tremblay *et al.*, 2005) como *Liparis makinoana* (Soo *et al.*, 2001), *Pseudolaelia corcovadensis* (Borba y Braga, 2003), *Cattleya elongata* (Camargo *et al.*, 2006), *Sophronitis sincorana* y *S. pfisteri* (Silva-Pereira *et al.*, 2007), *Laelia speciosa* (Ávila, 2007) y *Prostecchia* aff. *karwinskii* (Camacho, 2010), no presenta autopolinización autónoma lo que señala el requerimiento de polinizadores para su reproducción sexual.

La mayoría de las orquídeas son típicamente auto-compatibles, sin embargo, en algunos casos se pueden expresar mecanismos de depresión por endogamia (Wallace, 2003; Borba *et al.*, 2001) o bien se presentan barreras genéticas que evitan la autogamia, como la auto-incompatibilidad (Borba *et al.*, 2001; Wallace, 2003; Lehnebach y Robertson, 2004; Tremblay *et al.*, 2005).

En el presente estudio, *C. pendula*, se define como una especie auto-incompatible, semejante a lo reportado para las especies: *Cattleya warneri* (Stort y Martins, 1980) y más recientemente para *Liparis makinoana* (Soo *et al.*, 2001). Sin embargo, Torres en el 2006, encontró para esta misma especie, en San Andrés Coru, sitio cercano al PNBC, que el tratamiento de endocruzamiento desarrolló algunas semillas viables con embriones sanos (22.98%), pero también encontró significativamente mayor viabilidad con exocruzamiento (68.3%), sus resultados sugieren que *C. pendula* puede ser una especie parcialmente auto-incompatible, predominando la exogamia. Algo similar ocurrió en *Galearis spectabilis* que fue reportada por Dieringer (1982) como una especie auto-incompatible y en un estudio posterior como especie auto-compatibile por Zimmerman datos no publicados (Tremblay *et al.*, 2005). Lo cuál corrobora que los sistemas de apareamiento pueden ser variables, tanto espacial como temporalmente (Tremblay *et al.*, 2005, Ávila-Díaz, com. pers.)

Una auto-incompatibilidad parcial en plantas puede influir en la reducción o

producción de semillas debido a la interferencia de polen incompatible proveniente de individuos relacionados genéticamente o por la ocurrencia de geitonogamia (Castro y Ruiz, 2001). En *C. pendula*, pudo haber ocurrido esa interferencia de polen incompatible, en aquellas cápsulas que no produjeron semillas viables producto de la polinización natural o exocruzamiento. Esto concuerda con el bajo porcentaje de frutos en este mismo tratamiento de exocruzamiento con tan solo 7.5%. Este porcentaje es muy bajo comparado con otras especies de orquídeas, en las que se reporta una mayor producción de frutos como resultado de exocruzamientos como en: *Liparis makinoana* (91.4%) y *Liparis kumokiri* (92.5%) (Soo *et al.*, 2001), *Earina aestivalis*, *Winika cunninghamii*, *E. mucronata* y *E. autumnalis* (>60%) (Lehnebach y Robertson, 2004), *Cattleya tenuis* y *C. elongata* (75% y 86%) (Camargo *et al.*, 2006), *Laelia speciosa* (80%) (Ávila, 2007) y *Prosthechea aff. karwinskii* (69.23%) (Camacho, 2010).

Éxito reproductivo femenino

Cuitlauzina pendula presentó bajos valores de *fruit set* en condiciones naturales en el presente trabajo (3.2%) así como en un trabajo previo (7.14%) (Torres, 2006), los cuales podrían deberse a que esta especie no ofrece recompensa, sino que su polinización es por engaño. Esos valores, se encuentran dentro de los rangos reportados para otras orquídeas que no ofrecen recompensa (Tremblay, 2005).

Estos bajos valores pueden deberse a la presencia de un mecanismo de autoincompatibilidad o ser la expresión de la depresión por endogamia en estados tempranos de desarrollo por la posible presencia de individuos emparentados genéticamente en la población en estudio (reserva del PNBC), por los distintos niveles de aborto de las estructuras reproductivas como flores, frutos y semillas (que no son viables), ya que incluso, en el tratamiento de exocruzamiento el porcentaje de frutos producidos fue bajo (7.5%) comparado con otras especies de orquídeas.

1.6.1.1 Viabilidad de semillas con la presencia de embriones

Las diferencias en la viabilidad de las semillas (presencia de embriones) en los tratamientos de exocruzamiento y endocruzamiento, indican que *C. pendula* es una especie exógama en el que la polinización cruzada es favorecida puesto que en el tratamiento de endocruzamiento las semillas no fueron viables (corroborada con la evaluación del desarrollo *in vitro*).

La más alta viabilidad de semillas en *C. pendula* reportada en este trabajo, fue para los tratamientos de exocruzamiento y polinización natural tal como ocurrió en la misma especie en el 2006, reportado por Torres, con un 68.3% para exocruzamiento y 49.2% para polinización natural. También en *Pseudolaelia corcovadensis* se han reportado altos porcentajes de viabilidad de semillas (55.7% en frutos producto del exocruzamiento y 54.2% para semillas de frutos con polinización abierta) (Borba y Braga, 2003), así como en *Catleya tenuis* con un 45% en exocruzamiento (Camargo *et al.*, 2006) y *Laelia speciosa* con 67% de viabilidad en las semillas producto del exocruzamiento y un 49.4% en polinización abierta (Ávila, 2007).

1.6.1.2 Desarrollo *in vitro*

Se encontraron grandes diferencias en el desarrollo *in vitro* de individuos de *C. pendula* entre los distintos tratamientos de polinización. Observándose a los 90 días un mejor desarrollo *in vitro* en los individuos provenientes de la polinización natural. Resultados semejantes fueron reportados para *Laelia speciosa* (Ávila, 2007) y para *P. aff karwinskii* (Camacho, 2010). Lo cual podría deberse a un aumento en la diversidad del polen en el estigma que afecta positivamente la cantidad y calidad de la progenie (Montalvo, 1992; Ávila-Díaz 2007; Camacho, 2010). En orquídeas, los efectos de la paternidad múltiple no son muy conocidos. Sin embargo, la polinización multipaternal es posible porque los polinizadores pueden llevar más de un polinario (Medina, 2004; Tremblay *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Tremblay (1994) en *Cypripedium calceolus*, donde realizó exocruzamientos con una mezcla de diez

diferentes padres, resultando una mayor velocidad de germinación en la polinización multipaternal aunque los embriones fueron generalmente más pequeños.

Cabe mencionar que son pocos los reportes de desarrollo *in vitro* de orquídeas provenientes de diferentes tratamientos de polinización (Ávila, 2007; Camacho, 2010) los cuales se consideran útiles para esclarecer mejor el papel del tipo de polen en la adecuación y desempeño de los individuos.

Es importante, aclarar que para demostrar en este estudio el posible parentesco entre los individuos de *C.pendula* en la población del PNBC es necesario llevar a cabo estudios con marcadores genéticos que revelen lo que está ocurriendo en ella y poder tomar las medidas necesarias para evitar que esta especie forme parte de las poblaciones extintas localmente.

1.7 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

El conocer y entender el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de *C. pendula* nos ayuda a evaluar e inferir el estado actual y futuro de conservación de sus poblaciones de acuerdo al tamaño de estas.

Para este estudio en particular, se encontró una sola población de *C. pendula* dentro de la reserva del PNBC. Por lo que el conocimiento básico de la biología reproductiva es fundamental para implementar estrategias de manejo de *C. pendula* que permitan su conservación a largo plazo. Por ejemplo, el desarrollo de frutos en el campo a través de polinizaciones manuales con exocruzamiento entre individuos compatibles, que produzcan frutos con valores altos de semillas viables, para favorecer su dispersión y establecimiento de nuevos individuos que ayuden en la rehabilitación de esta población que se encuentra en grave riesgo local. También, en este caso, se podría sugerir una reintroducción asistida de plántulas de *C.pendula* producto de la cruce de individuos compatibles y del mayor número de cápsulas posibles de la misma población, para favorecer una mayor diversidad genética, como se ha

sugerido previamente para *L. speciosa* (Ávila, 2007).

Los resultados aquí presentados, también son útiles para la obtención de cápsulas con semillas viables, para el establecimiento de un sistema de reproducción *in vitro* que permita la reproducción de plantas sanas a gran escala en invernaderos para disminuir en cierto grado, el impacto causado por la extracción de *C. pendula* para afrontar esta problemática desde una perspectiva más práctica y puntual coadyuvando así en su conservación.

1.8 CONCLUSIONES

C. pendula es dependiente de polinizadores para su reproducción sexual.

C. pendula en el sitio de estudio (PNBC), para el año 2011, se comportó como una especie exógama, autoincompatible.

El éxito reproductivo femenino de *C. pendula* en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio fue bajo, como en otras especies de orquídeas que no ofrecen recompensa.

1.9 LITERATURA CITADA

Abarca G. C. A. y V. A. López. 2007. Capítulo 6. La estimacion de la endogamia y la relacion entre la tasa de fecundacion cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: una interpretacion de su significado evolutivo. En: Ecologia Molecular. Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre (eds). Secretaria de Medio mambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Univesidad Nacional Autónoma de México y Comision Nacional para el Conocimiento y el Uso de la Biodiversidad. 183-213pp.

Ackerman J. D. y J. K. Zimmerman. 1994. Bottlenecks in the life histories of orchids: resources, pollination, population structure, and seedling establishment. *In* Proceedings of the 14th World Orchid Conference (A. Pridgeon, edit.). Her Majesty's Stationery Office, London, p.125-129.

Ávila D. I. 2007. Biología de poblaciones de *Laelia speciosa* (HBK) Schitr (ORCHIDACEAE) para su manejo y conservación. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. Morelia, Michoacán. 162 pp.

Barret, S. C. H., L. D. Harder y A. C. Worley. 1996. The comparative biology of pollination and mating flowering plants. Philosophical transactions in aroyal society of London, series B 351:127-1280.

Barret S. C. 2002. The evolution of plant sexual diversity. Nature reviews. 3:274-284.

Borba, E. L., J. Semir y G. J. Shepherd. 2001. Self-incompatibility, Inbreeding depression and crossing potetial in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. Annals of Botany 88: 89-99.

Borba E. L. y P. I. S. Braga. 2003. Biologia reproductiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. Revista Brasil. Botany 26 (4): 541-549.

Camargo S. E., V. Silva-Pereira y E. L. Borba, 2006. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant species Biology* 21:85-91.

Camacho D. E. V. 2010. Sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino de *Prostechea* aff. *Karwinskii* (ORCHIDACEAE). Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 43pp.

Castro M. y T. Ruiz. 2001. Niveles de aborto en cinco especies de *Cestrum* L. (Solanaceae). *Acta Científica Venezolana* 52: 261-264.

Catling P. M. 1990. Auto-pollination in the Orchidaceae. En: Arditti J, ed. *Orchid biology: reviews and perspectives*, V. Portland, OR: Timber Press, 121–158.

Cuevas G. E. y G. C. A. Abarca. 2006. Origen, mantenimiento y evolución del ginodiosismo. *Boletín de la sociedad Botánica de México* 78: 33-42.

Dafni A. 1992. Capítulo 2: Breeding systems. En: *Pollination Ecology. Practical. Approach*. IKL press. Oxford university press oxford, New York, Tokio. 25-58.

Dieringer G. 1982. The pollination ecology of *Orchis spectabilis* L. (Orchidaceae). *Ohio Journal of Science* 82: 218–225.

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

Frohlich M. 2003. An evolutionary scenario for the origin on flowers. *Nature reviews*. 4:559-566.

Gutián, J. J. M. Sánchez y P. Gutián. 1992. Niveles de fructificación en *Crataegus monogyna* Jacq., *Prunus mahaleb* y *Prunus spinosa* (ROSACEAE) *Anales jardín botánico de madrid*, 50(2). 1-7

Inouye, D. W., D. E. Gill, M. R. Dudash y C. B. Fenster. 1994. A model and a Lexicon for pollen fate. *American Journal of Botany* (81)12: 1517-1530.

Lehnebach C. A y A. W. Robertson. 2004. Pollination ecology of four epiphytic orchids of New Zealand. *Annals of botany* 93: 773-781.

Lemus-Jiménez L. J. y N. Ramírez. 2005. Sistemas reproductivos de las plantas en tres hábitats de la planicie costera de Paraguaná, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 53 (3-4): 415-430.

Medina N. D. 2004. Éxito reproductivo en dos poblaciones de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr (Orchidaceae), en Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. Morelia, Michoacán. 41.

Montalvo A. M. 1992. Relative success and outcross pollen comparing mixed and single-donor pollinations in *Aquilegia caerulea*. *Evolution* 46: 1181–1198.

Murren C. J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *Journal of Ecology* 90: 100-107.

Neiland M. R. M., y C. C. Wilcock . 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal Of botany* 85:1657-1671.

Parra-Tabla, V., C. F. Vargas, S. Magaña-Rueda y J. Navarro. 2000. Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindey (Orchidaceae) in two contrasting hábitat patches: forest vs agricultural field. *Biological Conservation* 94:335-340.

Richards A. 1986. *Plant Breeding Systems*. Cambridge University Press, Cambridge.

Soo, O. G., C. M. Yoon, C. S. Gi y C. M. Gi. 2001. Contrasting breeding systems. *Liparis kumokiri* and *L. makinoana* (Orchidaceae). *Annals of Botany Fennici* 38: 281-284.

Stort M. N. S. y P. S. Martins. 1980. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do género *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciencia y Cultura* 32: 1080–1083.

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

Tremblay R. L. 1994. Frequency and consequences of multiparental pollinations in a population of *Cypripedium calceolus* L. var. *pubescens* (Orchidaceae). *Lindleyana* 9: 161–167.

Tremblay, R. D., 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.

Silva-Pereira, V., S. E. Camargo y E. L. Borba. 2007. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophranitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeast Brazil. *Plant Systematic and Evolution* 269:171-182.

Vogler D. W. y S. Kalisz. 2001. Sex among flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution* 55 (1): 202-204.

Wallace L. E. 2003. The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 90 (2): 235-242.

CAPÍTULO 2. DISTRIBUCIÓN VERTICAL Y HORIZONTAL DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) SOBRE SUS HOSPEDEROS DENTRO DEL PARQUE NACIONAL BARRANCA DEL CUPATITZIO EN URUAPAN, MICHOACÁN.

RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron evaluar si *C. pendula* tiene preferencia por algún hospedero (s), evaluar la distribución vertical y horizontal de *C. pendula* para determinar la zona del hospedero con la mayor abundancia de esta orquídea de manera general y por clases de edad y determinar la abundancia de individuos de *C. pendula* en alguna posición en el árbol (lateral, arriba, abajo), en un tipo de sustrato (corteza, musgo y/o líquen) y en cuanto a la orientación (N, S, E, O). Se realizaron 10 transectos para la evaluación de la preferencia de hospederos contabilizando el número de individuos de *C. pendula*. Para la evaluación de la distribución vertical y horizontal se establecieron 4 cuadrantes de 12.5 x 25 m, 2 en el Bosque de Encino-Pino (BEP) y 2 en el Bosque de Pino-Encino (BPE). *C. pendula* mostró preferencia por el hospedero *Q. laeta*, tal como lo indica el alto porcentaje (83.27%) de individuos encontrados en este y una menor preferencia hacia forofitos como *Garrya longiflora* (8.19%) y *Quercus sp.* (8.54%). La mayor abundancia de *C. pendula* se registró en la copa (95.3% en el BEP y 77% en el BPE), en la sección intermedia de las ramas (45.4% y 37.8%, respectivamente) en ambos tipos de vegetación. La población está representada principalmente por la clase adulta (67.8% en el BEP y 40.5% en el BPE) con mayor número de individuos en la posición lateral (54.5%) y sobre el sustrato corteza-musgo en un 76.7% en el Bosque de Encino-Pino y 77% en el Bosque de Pino-Encino, la posición cardinal este (22%) en el BEP y noroeste en el BPE (32.4%). *C. pendula* presentó mayor número de individuos en el BEP que en el BPE. Estos resultados aportan conocimientos básicos de la ecología de *C. pendula* útiles para generar estrategias adecuadas de manejo como el restablecimiento en los árboles y sitios adecuados que promuevan su conservación a largo plazo, tanto *in situ* como *ex situ*.

Palabras clave: Preferencia de hospedero, distribución vertical y horizontal, *C. pendula*, amenazada.

2.1 INTRODUCCIÓN

En epifitas vasculares se menciona la existencia de una distribución vertical y horizontal del dosel, relacionada con la diversidad de microambientes y con las características propias del hospedero sobre el que crecen (Zimmerman, 1992; Hietz y Hietz-Seifert, 1995; Hernández-Rosas, 2000; Granados-Sánchez *et al.*, 2003; Zotz y Andrade, 2003; González *et al.*, 2007; Ceja *et al.*, 2008) que son determinantes en la abundancia y colonización de sitios por epifitas existiendo así una preferencia por más de un estrato dentro del mismo hospedero (Hernández-Rosas, 2000; Martínez-Meléndez *et al.*, 2008).

La familia Orchidaceae, es el grupo más importante de epifitas vasculares con más de dos tercios del total de las especies de epifitas de este tipo, seguidas por la familia Bromeliaceae (Ceja *et al.*, 2008). A pesar de esto, la gran mayoría de los estudios ecológicos a nivel mundial, están encaminados principalmente hacia orquídeas terrestres (Kindlman *et al.*, 2002; Kull, 2002) y existe relativamente poca información sobre las especies de orquídeas epifitas. Principalmente se tienen reportes sobre aspectos de demografía (Zotz, 1998; Pérez, 2003; Mondragón, 2009), preferencia de hospedero (Catling y Lefcovitch, 1989; Tremblay, 1997; Tremblay *et al.*, 1998; Hernández-Rosas, 2000; González *et al.*, 2007; Tremblay y Velázquez, 2009), distribución espacial de epifitas (Hernández-Rosas, 2000; Martínez-Meléndez *et al.*, 2008), entre otros.

Uno de los grupos más susceptibles a la fragmentación y perturbación de los bosques son la epifitas (Padmawathe *et al.*, 2004). En orquídeas epifitas, la destrucción del hábitat, la colecta desmedida con fines comerciales y ceremoniales da como resultado la disminución o en su caso la extinción de las poblaciones naturales amenazando la persistencia de estas (Abdelnour y Muñoz, 1997; Flores-Palacios y Valencia, 2007). Tal es el caso de *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex., la cual es una orquídea que actualmente se encuentra dentro de la categoría de especie endémica, amenazada según la NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010).

Por tal motivo, los objetivos de este estudio integran aspectos como la evaluación de la preferencia de hospedero (s) en *C. pendula*, su distribución vertical y horizontal en los hospederos de esta especie para determinar la zona del hospedero con la mayor abundancia de esta orquídea de manera general y por clases de edad. Así como determinar la abundancia de individuos en las distintas posiciones en el árbol (lateral, arriba, abajo), tipos de sustratos (corteza, musgo y/o liquen) y su orientación (N, S, E, O). Considerándose este conocimiento básico, esencial e integral puesto que permitirá la planeación, propuesta de acciones y/o estrategias adecuadas para la conservación y manejo *in situ* de sus poblaciones, así como también para su manejo *ex situ* a largo plazo.

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 Problemática del estudio de epifitas vasculares

Los estudios de los patrones de epifitas vasculares utilizan distintos métodos y por lo tanto, sus resultados no son comparables. Dichos estudios se han enfocado principalmente en arboles individuales, transectos y en grupos aislados de arboles remanentes (Johansson, 1974; Yeaton y Gladstone, 1982; Hietz-Seifer *et al.*, 1996; Tremblay, 1997; Vandunné, 2002). Es por ello que su estudio enfrenta una gran problemática debido a lo siguiente: a) las epifitas viven en un discontinuo paisaje tridimensional y la mayoría de los métodos estandarizados en ecología asumen que las mediciones se hacen en paisajes continuos, b) falta de conocimiento previo a cerca de la escala de un fenómeno, c) la información detallada de la distribución espacial de la epifitas es escasa y d) el difícil diseño de los experimentos debido a la complejidad de la interacción de las epifitas y sus hospederos, la estructura del bosque y el clima (Vandunné, 2002).

2.2.2 Factores que intervienen en la distribución espacial de epifitas vasculares

Diferentes factores intervienen para definir la distribución espacial de una especie La distribución de las epifitas en el bosque se relaciona con la diversidad de microambientes y con las características propias del hospedero sobre el que crecen, como son el tamaño, la arquitectura, la estructura y la transparencia del dosel en función de la densidad del follaje, el número y diámetro de las ramas, la textura de la corteza, la presencia de briofitas y la disponibilidad de agua y de nutrientes. Los requerimientos ecofisiológicos de las epifitas también determinan tanto el patrón de distribución como la abundancia y colonización de las mismas (Hietz y Hietz-Seifert, 1995; Zotz *et al.*, 1999; Hernández-Rosas, 2000; Graham y Andrade, 2004; Jácome *et al.*, 2004; Maldonado-Mijangos y Mondragón-Chaparro, 2007; Hirata *et al.*, 2008; Martínez-Meléndez *et al.*, 2008; Vergara-Torres *et al.*, 2010).

Otros factores importantes a considerar en la distribución de las epifitas, son la

fenología en árboles deciduos (al proporcionar condiciones de luz en la cubierta interior) (Hirata *et al.*, 2008) y la posición cardinal de las orquídeas en los hospederos que pudieran ser factores importantes en la abundancia de epifitas hacia ciertos hospederos (Ceja *et al.*, 2008; Hirata *et al.*, 2008; Tremblay y Velázquez, 2009). En términos generales existe una mayor preferencia por árboles de lento crecimiento, con copa abierta, corteza estable y absorbente, que resultan excelentes hospederos (Zimmerman, 1992; Hietz y Hietz-Seifert, 1995; Hernández-Rosas, 2000; Granados-Sánchez *et al.*, 2003; Zotz y Andrade, 2003; González *et al.*, 2007; Ceja *et al.*, 2008).

2.2.3 Formas de asociación de epifitas con respecto a sus hospederos

Dentro de una escala local, como es el caso de la mayoría de los estudios dirigidos hacia la asociación de epifitas con respecto al hospedero se reportan cuatro formas de asociación: 1) especificidad de hospedero (es la existencia exclusiva de especies epifitas en una sola especie de hospedero); 2) preferencia de hospedero (es cuando una epífita habita varios hospederos pero esta mayoritariamente en uno) y generalistas en la preferencia de hospedero (es decir que se encontraron en todos los árboles pero con mayor abundancia en dos o tres hospederos); 3) limitación de hospedero (es la concentración de epifitas en pocas especies como resultado de la escasez de hospederos habitables); y 4) Abstinencia de hospedero (cuándo una epífita no esta en un hospedero) (Martínez-Meléndez, 2008; Vergara-Torres *et al.*, 2010).

Generalmente existe una baja preferencia de hospederos en epifitas vasculares (Martínez-Meléndez, 2008). Esto se evidencia en estudios realizados en orquídeas epifitas en los que se encuentran una fuerte especificidad de hospedero como en *Lepanthes caritensis* (Tremblay *et al.*, 1998) y *Laelia rubescens* (Trapnell y Hamrick, 2006) mientras que en *Broughtonia cubensis* (González *et al.*, 2007), *Dendrophylax lindenii* (Múgica *et al.*, 2010), *Arpophyllum alpinum*, *Lepanthes tenuiloba*, *Lepanthes matudana*, *Maxillaria* sp, *Specklinia* aff. *lewisiae*, *Specklinia villosa*, *Stelis* cf. *ovatilabia* (Martínez-Meléndez *et al.*, 2008) y *Dendrobium scabrilingue* (Watthana *et*

al; 2008) son generalistas en la preferencia de hospedero. Por otro lado *Dichaea suaveolens* y *Dracontia tuerckheimii* (Martínez-Meléndez *et al.*, 2008) muestran tanto preferencia generalista como abstinencia hacia dos hospederos.

2.2.4 Distribución espacial de orquídeas epifitas

Estudios en epifitas vasculares mencionan la existencia de un patrón de distribución espacial y por tanto, una división horizontal y estratificación vertical del dosel, sugiriendo que la identidad del hospedero es determinante en la abundancia y colonización de sitios por epifitas existiendo así una preferencia por más de un estrato dentro del mismo hospedero (Hernández-Rosas, 2000; Martínez-Meléndez *et al.*, 2008). Un claro ejemplo de esto es *Lepanthes caritensis* que mostró mayor preferencia en hospederos con troncos menores a 20 cm de diámetro (Tremblay *et al.*, 1998) y *L. eltoroensis* una preferencia en árboles con diámetro a la altura del pecho cercanos a 20 cm (Tremblay y Velázquez, 2009). Otro caso, es la orientación espacial de *Lepanthes eltoroensis* que expone una mayor preferencia hacia la parte noroeste (Tremblay y Velázquez, 2009) y *Broughtonia cubensis* hacia el norte y este de los troncos (González *et al.*, 2007), sugiriendo que la posición cardinal sobre los árboles es un factor importante en la distribución espacial en las orquídeas epifitas (Tremblay y Velázquez, 2009).

En general se ha reportado que la mayoría de epifitas vasculares se distribuyen principalmente en la copa de los árboles en la sección intermedia de las ramas reportada en diversas especies de plantas epifitas, incluyendo orquídeas como *Cattleya violacea* y *Pleurothallis fockei* (Hernández-Rosas, 2000), *Arpophyllum alpinum*, *Lepanthes tenuiloba*, *Maxillaria sp.* y *Stelis cf. ovatilabia* (Martínez-Meléndez, *et al.*, 2008), *Prosthechea aff. karwinskii* (Rodríguez, 2012). Dicha estratificación hacia la copa está relacionada con las diferencias en la tolerancia a la luz, humedad y a sus adaptaciones ecofisiológicas (Nieder *et al.*, 1999; Krömer *et al.*, 2007). Además en las zonas intermedias de los árboles, los cambios microclimáticos

son más atenuados, puesto que la luz disminuye y la humedad aumenta desde el dosel hasta el piso boscoso (Parker, 1995; Hernández-Rosas, 2000).

En el estudio demográfico de la orquídea epífita *Dimerandra emarginata* (Zotz, 1998) de los patrones estacionales y relacionados con el tamaño sugieren que una causa importante de mortalidad en plántulas que habitan sobre la corteza, es la desecación. Una vez que las plántulas han pasado esta etapa vulnerable, su longevidad se limita casi exclusivamente por la durabilidad del sustrato. *D. emarginata* mostró en etapas tempranas un mayor crecimiento vegetativo con un menor o nulo crecimiento en etapa adulta debido a una mayor inversión relativa de carbono y nutrientes en la producción de frutos (Zotz, 1998).

2.2.5 Estudios ecológicos en orquídeas epifitas en México

Existen diversos estudios que demuestran preferencia de hospedero, por cierta zona del árbol y una división del dosel por el tamaño de las ramas. Como lo señalan los siguientes estudios realizados en epifitas vasculares, en el género *Tillandsia* se observó preferencia por ramas menores a 1 cm de diámetro en Cancún, México (Zimmerman, 1992). En otro estudio en Veracruz, el número de epifitas vasculares se relacionó positivamente con el tamaño del árbol sobre todo en aquellos sitios con un gran número de especies, obteniendo los valores más altos para biomasa y especies a los 1,430 msnm (altitud intermedia). Encontrando que los pinos tienen un evidente efecto negativo en epifitas, particularmente hostiles en orquídeas por la producción de fenoles y resinas (Hietz y Hietz-Seifert, 1995).

La epífita *Gentlea tacanensis* en Chiapas, México (Martínez-Melendez *et al.*, 2008) logra establecimientos generalistas con una tendencia débil a preferir algunos hospederos. Sugiriendo que la identidad del hospedero es un factor determinante en la abundancia y colonización de sitios por las epifitas, tanto verticalmente como horizontalmente, prefiriendo más de un estrato.

La orquídea epífita *Erycina crista-galli* en Chiapas, México se distribuye principalmente en las zonas más externas en la copa de los árboles relacionados con una mayor disponibilidad de ramas colonizables y una mayor diversidad de microclimas y tipos de sustratos. Dicha distribución se encontró influenciada por el diámetro de las ramas medianas y ramillas que van de 0.22 a 3.36 cm de diámetro sobre las que se encontró la mayor abundancia (Maldonado-Mijangos y Mondragón-Chaparro, 2007).

En Michoacán, se han realizado estudios florístico-ecológicos de las especies de orquídeas epifitas en el Bosque de Pino-Encino (López, 1989) y en el Bosque Tropical Caducifolio (Huerta, 1989) en el municipio de Coalcomán. También en cuatro tipos de vegetación (Bosque Mesófilo de Montaña (BMM), Bosque de Encino (BE), Bosque de Pino-Encino-Oyamel (BPEO) y Bosque de Pino-Encino (BPE) en el municipio de Indaparapeo (Ponce, 2011), encontrando preferencia de algunas orquídeas epifitas por determinados hospederos como: *Quercus obtusata* (BMM y BPE), *Quercus deserticola* (BE) y *Quercus crassifolia* (BPEO) en los diferentes tipos de vegetación (Ponce, 2011). Con una mayor incidencia hacia la copa (zona II) principalmente en la sección b (parte intermedia de las ramas) (López, 1989; Ponce, 2011). Por otro lado también el diámetro del huésped (*Guarianthe aurantiaca*) y el diámetro de la rama (*Barkeria uniflora*) son factores determinantes para el establecimiento de una o más orquídeas epifitas (López, 1989).

Otros trabajos de ecología se refieren a la demografía de diversas especies, como son *Laelia speciosa* (Hernández-Apolinar, 1992) y con la misma especie en la zona Centro-Norte de Michoacán. En un análisis demográfico comparativo de cuatro poblaciones (Pérez, 2003) bajo diferentes condiciones de manejo reveló que las tasas de crecimiento poblacional fueron inferiores a 1 en los sitios con manejo y de 1 en el sitio conservado. Evidenciando que la permanencia es la principal estrategia de esta especie tan longeva con un crecimiento mínimo. En otro estudio se evaluaron procesos demográficos (estasis, crecimiento, regresión y fecundidad) mediante un análisis matricial de viabilidad poblacional en *Guarianthe aurantiaca* en Chiapas,

México. Encontrando que la supervivencia de los individuos reproductores es fundamental. Puesto que en poblaciones donde no hay recolección de individuos reproductivos el riesgo de extinción es nulo y cuando estos fueron recolectados, la probabilidad de extinción es de uno, con una fuerte disminución de vida a 35 años. Debido también a que la fecundidad, es el proceso demográfico con la menor elasticidad (Mondragón, 2009).

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar si existe preferencia de hospedero (s) en *C. pendula*.
2. Evaluar la distribución vertical y horizontal en los hospederos de *C. pendula* para determinar la zona del hospedero con la mayor abundancia de esta orquídea de manera general y por clases de edad.
3. Determinar la abundancia de individuos de *C. pendula* por clases de edad, en alguna posición en el árbol (lateral, arriba, abajo), en un tipo de sustrato (corteza, musgo y/o líquen) y en cuanto a la orientación (N, S, E, O).

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Preferencia de hospedero (s) en *C. pendula*

Se realizaron 10 transectos de 100 m de longitud por 10 m de ancho semejante a lo reportado por Tremblay (1997) y González *et al.*, (2007) para orquídeas epifitas, delimitados principalmente por la presencia de Pinos. En estos transectos se registró y midió el DAP (diámetro a la altura del pecho) de todos los árboles y arbustos que cayeron dentro de los transectos, tomando muestras de estos para su determinación y preparación de ejemplares de herbario. Para el caso específico de *C. pendula* se consideró presencia (contabilizando el número de individuos) y ausencia. Mientras que para las otras orquídeas epifitas presentes en los árboles se tomó nota del género o especie y se determinó abundancia en base a 3 categorías (escasa, moderada y abundante) (Hernández-Rosas, 2000; González *et al.*, 2007).

2.4.2 Distribución vertical y horizontal de *C. pendula*

El muestreo se realizó durante julio-noviembre del 2011 tras un recorrido para la localización de poblaciones de *C. pendula*, encontrando que la población del Paraje Lomas del Rosario es la única población actual en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio. La ubicación de los cuadrantes se hizo de forma sistemática, ya que se buscaron condiciones homogéneas dentro del área de estudio para el establecimiento de 4 cuadrantes de 12.5 X 25 m, dos en el Bosque de Encino-Pino y las otras dos en el Bosque de Pino-Encino. En estos cuadrantes se identificaron y marcaron todos los árboles con un diámetro del tronco a la altura del pecho (DAP) ≥ 15 cm. También fueron tomadas muestras de cada uno de los árboles y arbustos para su determinación y preparación de ejemplares de herbario, los cuales fueron depositados en el herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH (EBUM).

Para poder evaluar la distribución vertical y horizontal de *C. pendula* en los hospederos, se dividió el árbol en dos estratos en forma vertical: zona I, parte baja del árbol (tronco) y zona II, la parte alta (copa). Posteriormente la zona II (copa) del árbol, fue subdividida en tres secciones en forma horizontal, de la siguiente manera: a) sección interior de la copa, b) sección intermedia de la copa; y c) sección final de la copa (Dressler, 1981; Benzing, 1995) (Figura 1). En las secciones mencionadas se cuantificó el número de individuos encontrados en el árbol para determinar la abundancia de *C. pendula* en cada una de estas zonas y secciones (a, b y c) en general y para cada una de las categorías de edad. Para aquellos casos en los que fue imposible diferenciar los individuos en el árbol se contabilizaron como Stand (individuos unidos en masas compactas en donde no se distinguió la separación entre estos, por lo que fueron considerados como uno solo) o macollos (Sanford, 1968).

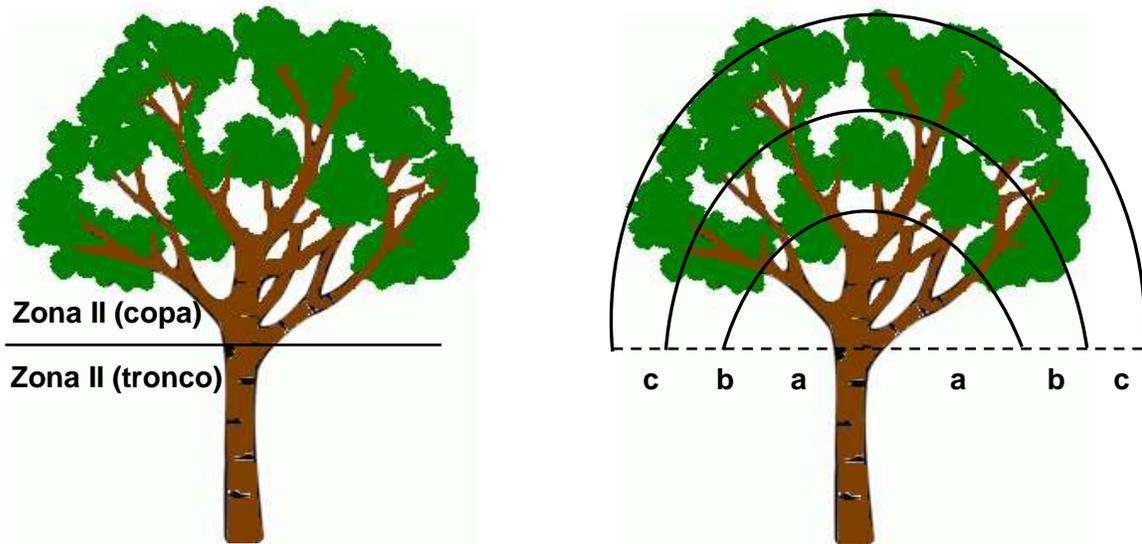


Figura 1. Zonas y secciones de los hospederos consideradas para determinar la distribución vertical y horizontal de las epifitas sobre el hospedero (Tomada de Johnason, 1974; Dressler, 1981; Benzing, 1995).

2.4.3 Preferencia por clases de edad y su posición en el árbol

Preferencia por clases de edad. Para definir las zonas del árbol con mayor preferencia por clases de edad, se establecieron principalmente las categorías de edades (clase 1: plántulas, clase 2: juveniles y clase 3: adultos reproductivos), se consideró como plántulas a aquellas plantas de *C. pendula* que tenían de 0 a 3 pseudobulbos, juveniles a aquellas con más de 3 pseudobulbos sin rastros de pedúnculo que indicarán algún evento reproductivo y adultas aquellas plantas con presencia de pedúnculo floral o restos de este. Posteriormente, se cuantificó el número de individuos de *C. pendula* por clases de edad (plántulas, juveniles y adultos) encontradas en la zona I (tronco), zona II (copa) y en sus diversas secciones (a, b y c) en cada uno de los cuadrantes en el Bosque de Encino-Pino y en el Bosque de Pino-Encino.

2.4.4 Tipo de sustrato. Se contabilizó el número de individuos de *C. pendula* presentes en los diferentes sustratos: corteza, musgo y liquen para determinar la preferencia de sustrato en los hospederos en las zonas y secciones anteriormente mencionadas.

2.4.5 Posición en las ramas. Se evaluó la posición en las ramas (copa) de los hospederos de *C. pendula* considerando las categorías: lateral, arriba, abajo y sus combinaciones (Yeaton y Gladstones, 1982). Se usaron binoculares para aquellas plantas de difícil visualización debido a la fisonomía de la vegetación que impidió el acceso a las partes más altas.

2.4.6 Orientación. En lo referente a la orientación, se realizó en base a la posición cardinal de cada una de las plantas de *C. pendula* presentes en el hospedero con la ayuda de una brújula (Norte, Sur, Este y Oeste) para determinar si tiene una mayor distribución hacia cierta orientación en las distintas zonas (I y II) y secciones en el árbol.

2.4.7 Análisis estadístico. Todos los datos obtenidos de la distribución vertical y horizontal de *C. pendula* fueron analizados con la prueba estadística Chi- cuadrada (SPSS, 2009).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Preferencia de hospedero (s) en *C. pendula*

C. pendula se encuentra preferentemente en hospederos de *Quercus laeta*, como lo indica el alto porcentaje (83.27%) de individuos encontrados en este árbol. Los individuos restantes de *C.pendula*, se encontraron sobre *Garrya longiflora* (8.19%) y *Quercus sp.* (8.54%), como se muestra en el Cuadro 1.

Es interesante hacer notar que también *Q. laeta* es un buen hospedero para otras especies de orquídeas epifitas como: 1) *Jacquiniella leucomelana*, 2) *Erycina hyalinobulbon*, 3) *Stelis resupinata*, 4) *Prostechea linkiana*, 5) *Cuitlauzina pulchella*, 6) *Acianthera chrysantha*, 7) *Epidendrum anisatum*, 8) *Laelia autumnalis*, 9) *Encyclia adenocaula*, 10) *Encyclia microbulbon* y 11) *Stelis villosa*

Cuadro 1. Preferencia de *C. pendula* y otras especies de orquídeas de un total de 240 árboles muestreados y 281 individuos de *C. pendula* en 10 transectos en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio en Uruapan, Michoacán, México.

Especie	No. de árboles	No. de	Promedio	Frecuencia	% en relación al total	Otras orquídeas epifitas	Categoría
		individuos de <i>C. pendula</i>	individuos de <i>C. pendula</i>				
<i>Acacia pennatula</i>	2	0	0	0	0	0	
<i>Arbutus xalapensis</i>	1	0	0	0	0	1	E
<i>Bursera fagaroides</i>	3	0	0	0	0	1,2	ME
<i>Clusia salvinii</i>	19	0	0	0	0	1,2, 3, 8	MA, ME
<i>Sp. desconocida 1</i>	1	0	0	0	0	0	
<i>Garrya longifolia</i>	17	23	1.35	0.12	8.19	1,3,4,5,6,12	A, M y E
<i>Sp. desconocida 2</i>	1	0	0	0	0	1	E
<i>Meliosma dentata</i>	1	0	0	0	0	1,2,3,6	ME
<i>No Quercus</i>	6	0	0	0	0	1,7	E
<i>Pinus douglasiana</i>	18	0	0	0	0	0	
<i>Pinus lawsonii</i>	5	0	0	0	0	0	
<i>Pinus maximinoii</i>	2	0	0	0	0	0	
<i>Pinus sp</i>	46	0	0	0	0	0	
<i>Prunus capulí</i>	4	0	0	0	0	1,7	ME

Especie	No. de arboles	No. de individuos de <i>C. pendula</i>	Promedio individuos de <i>C. pendula</i>	Frecuencia	% en relación al total	Otras orquídeas epifitas	Categoría
						1,2,3,4,5,6,7,8,9,	
<i>Quercus laeta</i>	27	234	8.67	0.15	83.27	10, 11	A, M y E
<i>Quercus magnolifolia</i>	19	0	0	0	0	1,3,4,6,8,9	A, M y E
<i>Quercus planipocula</i>	24	0	0	0	0	1,3,7,8	ME
<i>Quercus prob. híbrido</i>	24	0	0	0	0	1,4,6,8	A, M y E
<i>Quercus sp.</i>	19	24	1.26	0.05	8.54	1,3,4,6,8,10	ME
<i>Sp. desconocida 3</i>	1	0	0	0	0	5,6	E

A: abundante, MA: moderadamente abundante, ME: moderadamente escasa, E: escasa y M: moderada

1) *Jacquiniella leucomelana*, 2) *Erycina hyalinobulbon*, 3) *Stelis resupinata*, 4) *Prostechea linkiana*, 5) *Cuitlouzina pulchella*, 6) *Acianthera chrysantha*, 7) *Epidendrum anisatum*, 8) *Laelia autumnalis*, 9) *Encyclia adenocaula*, 10) *Encyclia microbulbon*, 11) *Stelis villosa* y 12) *Erycina echinata*.

2.5.2 Distribución vertical y horizontal de *C. pendula*

El Bosque de Encino-Pino con un 79.9% de individuos presentó la mayor abundancia de individuos de *C. pendula* con respecto al Bosque de Pino-Encino que presentó un 20.1% (Figura 2). En ambos casos se encontró diferencias significativas ($\chi^2=132.36$, $gl= 1$, $P=0.000$).

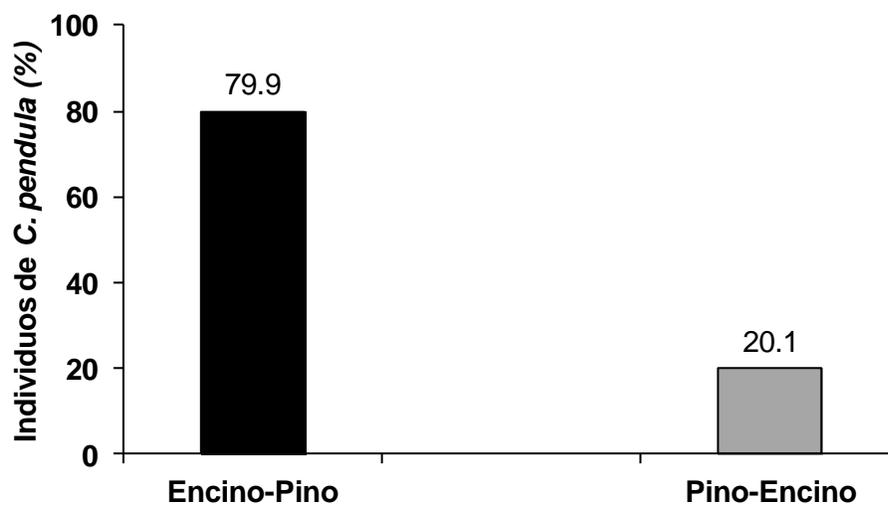


Figura 2. Porcentajes de individuos de *Cuitleuzina pendula* en el Bosque de Encino-Pino y Pino-Encino en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.

Se presentó un mayor número de individuos de *C. pendula* en la copa tanto en el Bosque de Encino-Pino (95.3%) como en el Bosque de Pino-Encino (77%) con respecto al tronco que tuvo un 4.7% y 23% respecto a los tipos de vegetación (Figura 3). Encontrando diferencias significativas en la distribución de esta especie en el tronco y la copa en los hospederos en ambos casos ($\chi^2=241.658$, $gl=1$, $P=0.000$ y $\chi^2=21.622$, $gl=1$, $P=0.000$).

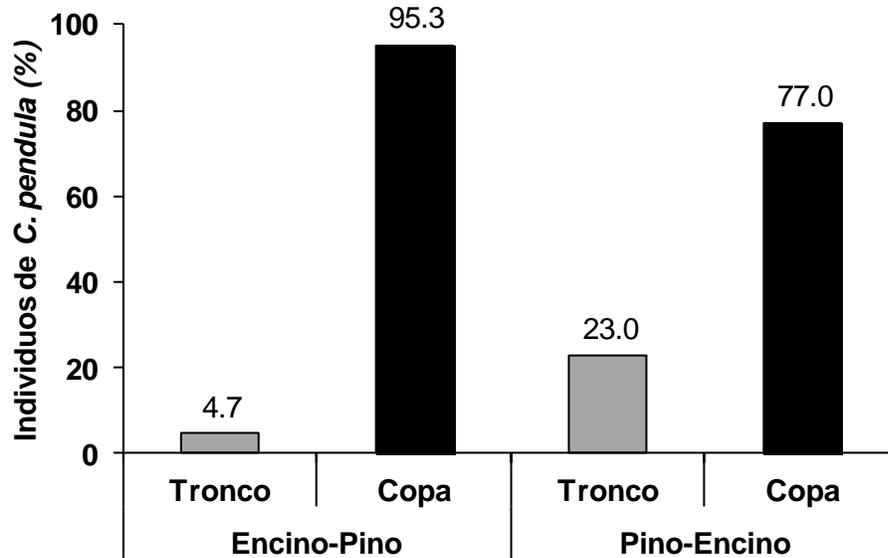


Figura 3. Porcentajes de individuos de *Cuitlauzina pendula* en las zonas del árbol en los dos tipos de vegetación en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.

En cuanto a la distribución de plantas de *C. pendula* en las diferentes secciones de la copa (a, b y c), se exhibe un valor numérico mayor en la sección intermedia de las ramas (zona b) con un 45.4% en el Bosque de Encino-Pino y 37.8 % en el Bosque de Pino-Encino (Figura 4). Observándose diferencias significativas en ambos tipos de vegetación ($\chi^2=111.359$, $gl=3$, $P=0.000$ y $\chi^2=8.919$, $gl=3$, $P=0.030$).

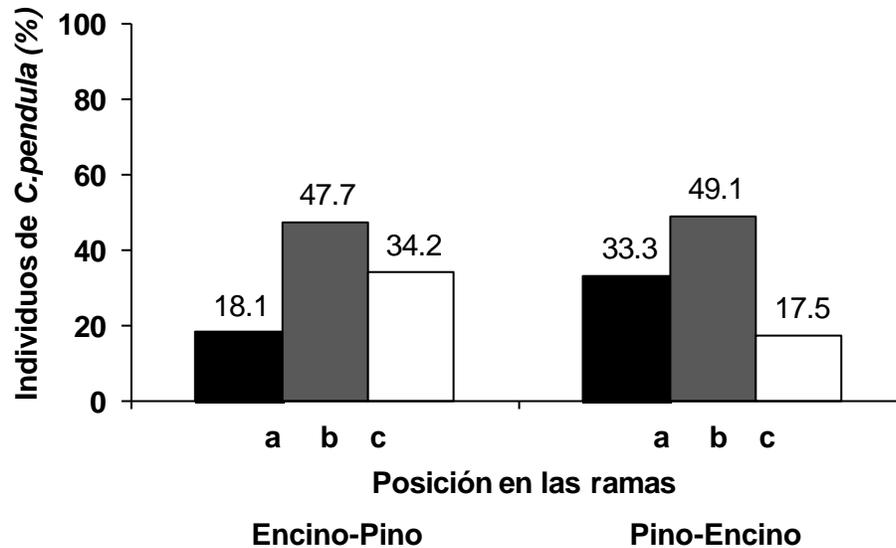


Figura 4. Porcentajes de individuos de *C.pendula* en el Bosque de Encino-Pino y Bosque de Pino-Encino en las diferentes secciones de la copa (a: sección basal de las ramas, b: sección intermedia de las ramas y c: sección externa de las ramas) en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.

2.5.3 Preferencia por clases de edad y su posición en el árbol

En lo que respecta al número de individuos de *C. pendula* por clases de edad (plántulas, juveniles y adultas), la clase adulta fue la más abundante con un 67.8% tanto en el Bosque de Encino-Pino como en el Bosque de Pino-Encino con el 40.5% (Figura 5). Apareciéndose diferencias significativas en ambos tipos de vegetación ($X^2=170.895$, $gl=2$, $P=0.000$ y $X^2=6.919$, $gl=2$, $P=0.031$) por clases de edad.

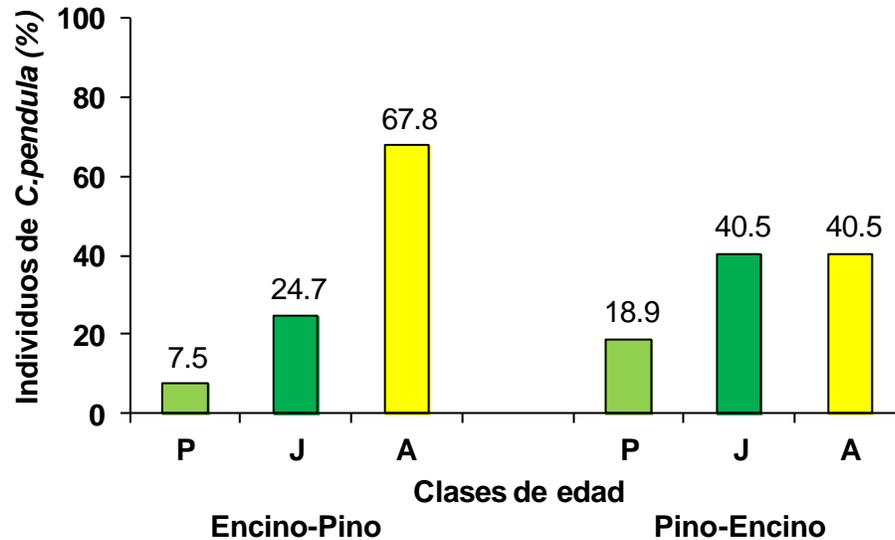


Figura 5. Porcentajes de individuos de *C. pendula* por clases de edad (P: plántula, J: juvenil y A: adulto) en dos tipos de vegetación en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.

En cuanto al número de individuos de *C. pendula* por clases de edad (plántulas, juveniles y adultas) en las zonas del árbol (tronco y copa), la copa fue donde se encontró el mayor porcentaje de individuos de las clases juvenil y adulta con un 24.1% y 67.5% para el Bosque de Encino-Pino y 37.8% y 39.2% para el Bosque de Pino-Encino, respectivamente. Por otro lado las plántulas se encontrarán en un 3.7% tanto en el tronco como en la copa en el BEP y un 18.9% en el tronco, en el BPE (Figura 6). Obteniendo diferencias significativas clases de edad en las distintas zonas del árbol tanto en el BEP ($X^2=108.292$, $gl=2$, $P=0.000$) como en el BPE ($X^2=57.988$, $gl=2$, $P=0.000$).

En ambos tipos de vegetación, la copa fue donde se encontró el mayor porcentaje de individuos de las clases juvenil y adulta con un 97.3% y 93.3% (BEP), 99.5% y 96.7% (BPE), respectivamente para los tipos de vegetación. Sin embargo no se encontró diferencias significativas en el número de plántulas de *C. pendula* en el tronco y copa en el Bosque de Encino-Pino ($X^2=0.000$, $gl=1$, $P=1$) mientras que el Bosque de Pino-

Encino el 100% de los individuos se encontraron en el tronco. Por otro lado las clases juvenil y adulta de *C. pendula* mostrarón diferencias significativas en la cantidad de individuos presentes en el tronco y la copa en el Bosque de Encino-Pino ($X^2=65.219$, $gl=1$, $P=0.000$ y $X^2=196.020$, $gl=1$, $P=0.000$) y en el Bosque de Pino-Encino ($X^2=22.533$, $gl=1$, $P=0.000$ y $X^2=26.133$, $gl=1$, $P=0.000$).

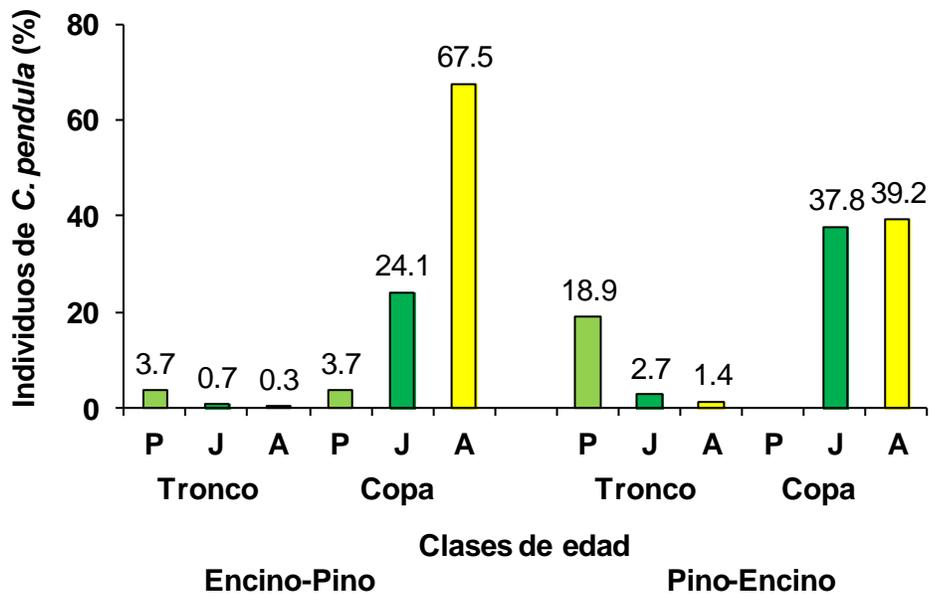


Figura 6. Porcentajes de individuos de *C. pendula* en las zonas del árbol por clases de edad (P: plántula, J: juvenil y A: adulto) en dos tipos de vegetación en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.

2.5.4 Tipo de sustrato

Se puede apreciar una mayor preferencia de *C. pendula* hacia el sustrato CM (corteza-musgo) tanto en el Bosque de Encino-Pino (BEP) con el 76.6 % como en el Bosque de Pino- Encino (BPE) con el 77 % (Figura 7). Presentando diferencias significativas en el número de individuos con respecto a los sustratos (corteza-musgo, corteza-musgo-liquen) en los que se encontró la orquídea en estudio en los dos tipos de vegetación ($X^2=83.556$, $gl=1$, $P=0.000$ y $X^2=21.622$, $gl=1$, $P=0.000$)

respectivos.

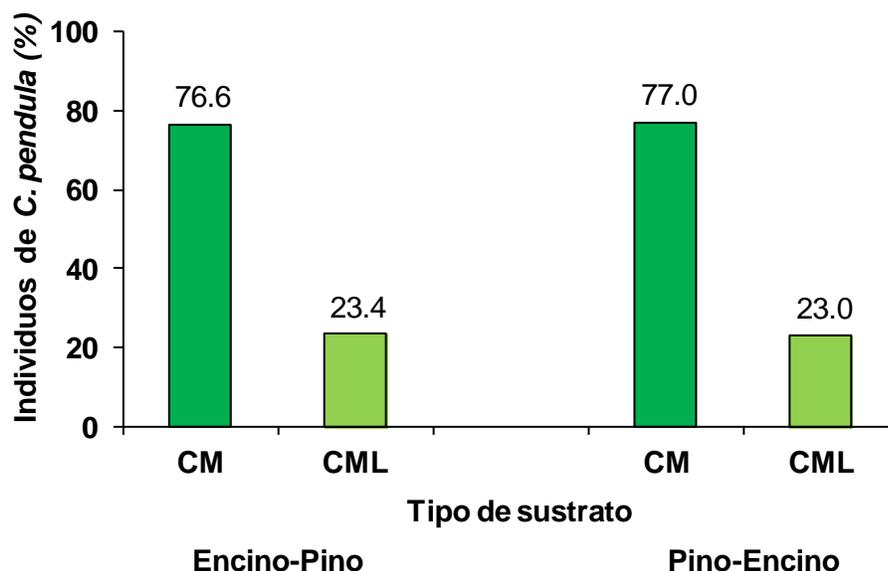


Figura 7. Porcentaje de individuos de *C. pendula* en los diferentes tipos de sustratos (CM: corteza-musgo, CML: corteza-musgo-liquen) en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.

2.5.6 Posición en las ramas

Se observa que *C. pendula*, se encuentra principalmente en la posición lateral de las ramas y muy pocas veces en la parte de abajo en ambos tipos de vegetación, siendo la parte lateral la que presentó la mayor abundancia de individuos con el 54.6% en el Bosque de Encino-Pino (BEP) y 54% en el Bosque de Pino-Encino (BPE) (Figura 8). Encontrando diferencias significativas de la posición en las ramas de *C. pendula* en ambos tipos de vegetación ($\chi^2=382.399$, $gl=4$, $P=0.000$ y $\chi^2=67.946$, $gl=3$, $P=0.000$).

Porcentaje de individuos de *C. pendula*

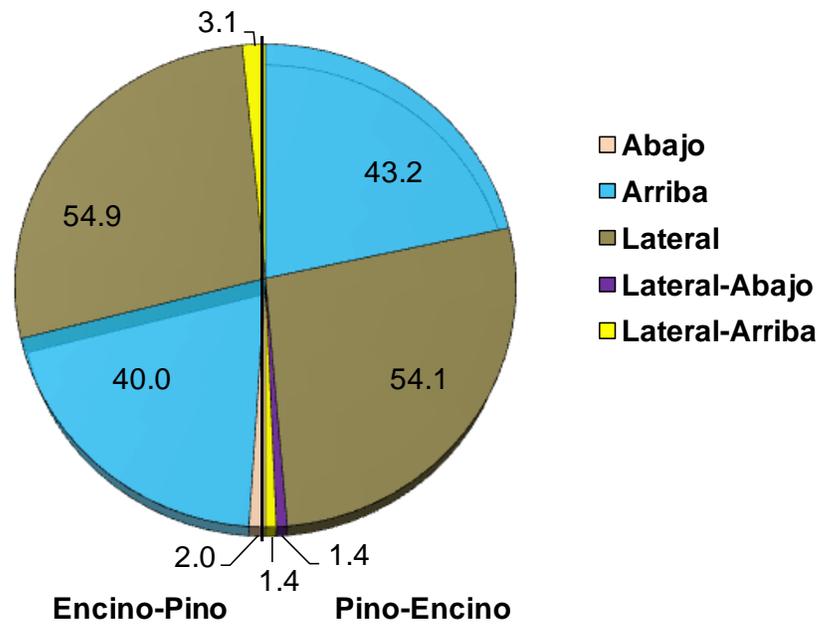


Figura 8. Porcentaje de individuos de *C. pendula* y su posición en la rama en dos tipos de vegetación en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.

2.5.7 Orientación

La mayoría de los individuos de *C. pendula* están orientados principalmente hacia el Este con un 22% en el Bosque de Encino-Pino y en el Bosque de Pino-Encino hacia el Noroeste con un 32.4% (Figura 9). Se mostraron diferencias significativas en relación a la orientación (Este, Norte, Noreste, Noroeste, Oeste, Sur, Sureste, Suroeste y Zenit) de esta especie sobre los hospedero en ambos tipos de vegetación ($X^2=79.797$, $gl=8$, $P=0.000$ y $X^2=45.351$, $gl=8$, $P=0.000$).

Porcentaje de individuos de *C. pendula*

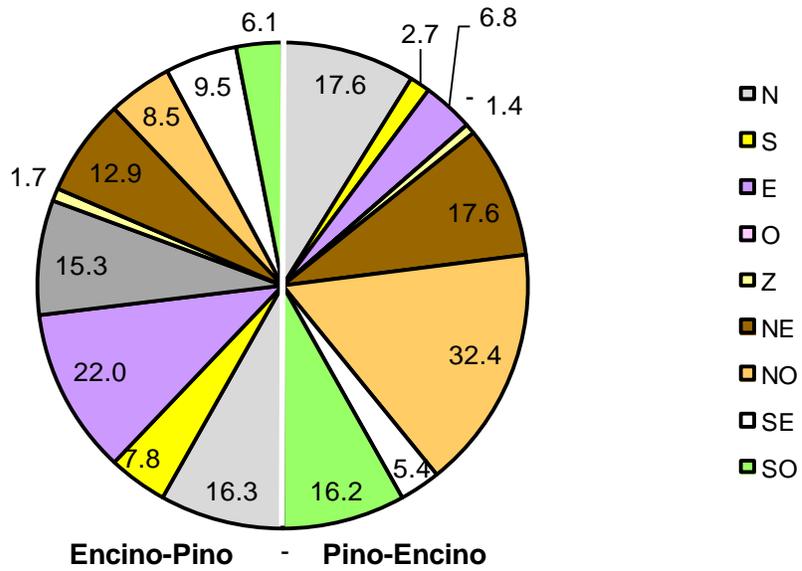


Figura 9. Porcentaje de individuos de *C. pendula* y su orientación (N, S, E, O y Zenit) en el Bosque de Encino-Pino y Pino-Encino en el Parque Nacional Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México.

2.6. DISCUSIÓN

2.6.1 Preferencia de hospedero (s) en *C. pendula*. Los resultados muestran preferencia hacia el hospedero *Quercus laeta* en los 10 transectos evaluados. Un estudio previo de *C. pendula* en un Bosque de Encino-Pino con elementos de Bosque Mesófilo reportó preferencia hacia el hospedero *Q. obtusata* en San Andres Coru (Torres, 2006). Esta preferencia hacia distintos forofitos dentro del mismo género podría deberse al tipo de vegetación presente en los sitios de estudio donde se distribuye esta especie.

La literatura muestra un gradiente en cuanto a la especificidad, preferencia, limitación y abstinencia de hospedero en otras especies de orquídeas epifitas, por ejemplo se reportan especies con preferencia de hospedero (aquellas que se encuentran exclusivamente en un tipo de hospedero) como *Lepanthes caritensis* (Tremblay *et al.*, 1998) y *Laelia rubescens* (Trapnell y Hamrick, 2006) mientras que *Broughtonia cubensis* (González *et al.*, 2007), *Dendrophylax lindenii* (Múgica *et al.*, 2010), *Arpophyllum alpinum*, *Lepanthes tenuiloba*, *Lepanthes matudana*, *Maxillaria* sp, *Specklinia aff. lewisiae*, *Specklinia villosa* y *Stelis cf. ovatilabia* (Martínez-Meléndez *et al.*, 2008), *Dendrobium scabrilingue* (Watthana *et al.*, 2008) son generalistas en la preferencia de hospedero (es decir que se encontraron en todos los árboles pero con mayor abundancia en dos o tres hospederos). También *Dichaea suaveolens* (Martínez-Meléndez *et al.*, 2008) mostró preferencia generalista pero con abstinencia hacia dos hospederos mientras que *Dracontia tuerckheimii* (Martínez-Meléndez *et al.*, 2008) mostró preferencia por cuatro hospederos y abstinencia hacia tres hospederos.

Algunos estudios mencionan que las epifitas logran establecimientos generalistas con una tendencia débil a preferir algunos hospederos reiterando así la rareza de la especificidad de hospederos (Benzing, 1990; Martínez-Meléndez *et al.*, 2008).

Probablemente varias de las características del hospedero como el tamaño, la arquitectura, la estructura y la transparencia del dosel en función de la densidad del follaje, el número y diámetro de las ramas, la textura de la corteza, la presencia de briofitas y la disponibilidad de agua y de nutrientes que determinan tanto la abundancia como la colonización de epifitas (Hietz y Hietz-Seifert, 1995; Zotz *et al.*, 1999; Hernández-Rosas, 2000; Graham y Andrade, 2004; Jácome *et al.*, 2004, Maldonado-Mijangos y Mondragón-Chaparro, 2007; Hirata *et al.*, 2008, Martínez-Meléndez *et al.*, 2008; Vergara-Torres *et al.*, 2010), pudieron haber influido en la preferencia de *C. pendula* hacia *Q. laeta*.

2.6.2 Distribución vertical y horizontal de *C. pendula*

El hecho de que la mayoría de los individuos de *C. pendula* se encontraran en el Bosque de Encino-Pino, podría deberse a la identidad (características) de los hospederos que es uno de los factores determinantes en la abundancia y colonización de sitios por epifitas (Hernández-Rosas, 2000; Martínez-Meléndez *et al.*, 2008). Puesto que la distribución de las epifitas en el bosque se relaciona con la diversidad de microambientes y con las características propias del hospedero sobre el que crecen, tal como lo hemos visto en el apartado anterior sobre preferencia de hospederos.

Los resultados sobre la distribución vertical y horizontal de *C. pendula* en los árboles muestran que no fue uniforme. Se encontró una mayor abundancia de individuos en la copa de los árboles y en la sección intermedia de las ramas, como ha sido reportado para muchas otras especies de plantas epifitas, incluyendo diversas orquídeas como son *Cattleya violacea* y *Pleurothallis fockei* (Hernández-Rosas, 2000), *Arpophyllum alpinum*, *Lephantes tenuiloba*, *Maxillaria sp.* y *Stellis cf. ovatilabia* (Martínez-Meléndez, *et al.*, 2008), *Prosthechea aff. karwinskii* (Rodríguez, 2012). Dicha estratificación hacia la copa está relacionada con las diferencias en la tolerancia a la luz, humedad y a sus adaptaciones ecofisiológicas (Nieder *et al.*, 1999, Kromer *et al.*, 2007). Además en las zonas intermedias los cambios

microclimáticos son más atenuados, puesto que la luz disminuye y la humedad aumenta desde el dosel hasta el piso boscoso (Parker, 1995; Hernández-Rosas, 2000).

2.6.3 Preferencia por clases de edad y su posición en el árbol

La estructura de la población de acuerdo a las clases de edad presentó un mayor número de individuos en la clase adulta y un pequeño número de plántulas. Es posible que nuestros resultados estén desestimando en alguna medida el número de plántulas ya que no fue posible observar en su totalidad las ramas muy altas. Sin embargo, las partes observadas directamente en dichos hospederos se hicieron a una altura aproximada de 3 m sobre el nivel del suelo y en las partes más altas fueron observadas con binoculares, registrándose muy pocas plántulas como lo muestran nuestros resultados. Tal dominio de plantas adultas en una población demuestra el bajo reclutamiento de nuevos individuos (Wathana *et al.*, 2008).

Las plántulas de *C. pendula* tienen una distribución homogénea tanto en el Bosque de Encino-Pino como en el de Pino-Encino. Mientras que los juveniles y adultos predominan en la copa particularmente en la sección intermedia de las ramas. En el Bosque de Pino-Encino hubo un mayor número de plántulas en el tronco, sin embargo este resultado podría estar subestimado debido a la posible exclusión en las observaciones de las partes altas donde fue imposible observarlas aún con los binoculares lo que evitó una evaluación en su totalidad de ramas muy altas en ambos bosques. Un claro ejemplo es *Prosthechea aff. Karwinskii*, (Rodríguez, 2012) en la que se encontró una distribución diferente con respecto a los estadios de vida, en general las plántulas con distribución homogénea, las juveniles en la parte basal e intermedia de las ramas y las adultas con distribución heterogénea.

2.6.4 Tipo de sustrato

C. pendula se encuentra con mayor abundancia en sustratos como corteza-musgo y corteza-musgo-liquen, probablemente porque una densa cobertura de líquenes y

briofitas en los troncos y ramas de árboles tropicales tienden a cambiar las características del sustrato proporcionando condiciones microclimáticas favorables para la germinación de las semillas, (Tremblay *et al.*, 1998; Wolf, 2005; Krömer *et al.*, 2007; Ceja *et al.*, 2008; Múgica *et al.*, 2010) por la retención de pequeñas cantidades de humus y la reducción de la evaporación (Arditti, 1992; Watthana, 2005; Watthana *et al.*, 2008).

2.6.5 Posición en las ramas

Se encontró que el mayor número de individuos de *C. pendula* se distribuyen principalmente en la parte lateral y arriba de las ramas en ambos tipos de vegetación (E-P y P-E). Este patrón generalmente está relacionado con un aumento en la caída de propágulos y plántulas de las partes de abajo de las ramas y puede diferir en algunas especies de orquídeas epifitas (Benzing, 1995; Hernández-Rosas, 2000). Como en el caso de *P. aff. karwinskii* (Rodríguez, 2012) en cual, las plántulas se encontraron en la posición lateral, vertical y abajo mientras que la clase juvenil y adulta se encontraron en las posiciones lateral y vertical, siendo este patrón, particular de esta especie.

2.6.6 Orientación

La especie estudiada mostró un patrón de distribución en cuanto a su orientación hacia el Este en BEP y al Noroeste en el BPE, estos resultados son semejantes a lo encontrado para *Broughtonia cubensis* (González *et al.*, 2007) que se ubica al Norte y Este; *Lepanthes eltoroensis* (Tremblay y Velázquez, 2009) en el lado Noroeste y *Prosteckea aff. karwinski* hacia el Este, Sur y Oeste (Rodríguez, 2012). Esto podría deberse a las condiciones microclimáticas del hábitat muestreado y de las características del hospedero puesto que en el sitio de estudio se encontró en la parte alta de un barranco seguida de una ladera denominada malpaís (se refiere a un relieve accidentado caracterizado por la presencia de rocas erosionadas de origen volcánico). Se ha reportado para otras especies de epifitas, que la posición cardinal

en los hospederos es un factor determinante en su establecimiento y abundancia (Ceja *et al.*, 2008; Tremblay y Velázquez, 2009), puesto que en la copa se pueden reflejar los vientos dominantes en una región, como es el caso de los barrancos (Van der Molen, 2002).

En algunas ocasiones, los vientos directos influyen en la disminución del crecimiento de musgos, mientras que en la dirección opuesta se encuentra más cubierta y por lo tanto, disminuye la incidencia solar e incrementa la humedad, factores importantes para la distribución y establecimiento de epifitas (González *et al.*, 2007; Ceja *et al.*, 2008; Tremblay y Velázquez, 2009).

2.7 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

Con base a esta investigación, pueden plantearse diversas propuestas para la conservación tanto *in situ* como *ex situ* de *C. pendula*.

Los resultados aquí presentados parecen indicar que la población de *C. pendula* en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio está dominada por individuos adultos lo cual es un grave problema y urge tomar las medidas necesarias ante tal situación. En base a los resultados, se sugiere la reintroducción asistida de plántulas (provenientes de semillas) o el restablecimiento de individuos de ramas caídas que deberán ser colocadas en la copa de los hospederos, principalmente en *Q. laeta*, en la sección intermedia, en una posición lateral o arriba de las ramas, principalmente con presencia de musgo lo que puede contribuir en el incremento de su sobrevivencia. Aunado a esto el alto porcentaje de individuos de *C. pendula* encontrados en *Q. laeta* lo convierte en una especie clave para el mantenimiento y la conservación de esta orquídea.

Cuitlauzina pendula, como muchas otras especies de orquídeas mexicanas está sujeta a una gran extracción de individuos en sus poblaciones silvestres, práctica que debe pararse. Una alternativa es la propagación a gran escala para proporcionar plantas de calidad y ayudar a disminuir la presión que sobre sus poblaciones se

ejerce. Cabe mencionar que actualmente se tiene una gran cantidad de plántulas de *C. pendula* propagadas *in vitro*. Por otro lado, es necesario crear conciencia entre la población para que ya no compren plantas extraídas del campo y tengan conocimiento acerca del buen cultivo de esta especie, ya que muchas plantas adquiridas son desechadas por falta de conocimiento de su cultivo.

El buen cultivo de especies de orquídeas puede colaborar de manera indirecta a la conservación de las mismas, ya que de esta forma pueden mantenerse por largos periodos de tiempo en cultivo y con esto evitar el saqueo de individuos de las poblaciones silvestres. Con los resultados de la presente investigación, se puede sugerir que *C. pendula* sea cultivada con musgo.

Dicha práctica la han llevado a cabo algunos cultivadores de orquídeas con gran éxito en especies con un requerimiento similar (Ávila- Díaz, com. pers.).

Constituyendo este estudio una valiosa herramienta para conocer el estado actual de conservación de esta especie en dicha población.

2. 8 CONCLUSIONES

Cuitlauzina pendula tuvo preferencia principalmente hacia el hospedero *Q. laeta*.

En el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio existe una mayor abundancia de *C. pendula* en el Bosque de Encino-Pino que en el de Pino-Encino.

La mayor abundancia de *C. pendula* se presentó en la copa de los hospederos, distribuyéndose principalmente en la sección intermedia de las ramas en ambos tipos de vegetación.

Existe una mayor abundancia de individuos adultos y juveniles de *C. pendula* que plántulas.

Un alto porcentaje de individuos de *C. pendula* se encuentran en la posición lateral de las ramas principalmente en sustratos como corteza-musgo

C. pendula de acuerdo a los puntos cardinales en el Bosque de Encino-Pino se encontró con mayor frecuencia hacia el Este y al Noroeste en el Bosque de Pino-Encino.

2.9 LITERATURA CITADA

Arditti J. 1992. Fundamental of Orchid Biology. John Wiley y Sons, New York.

Abdelnour A. y A. Muñoz. 1997. Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 4-10.

Benzing D. H. 1995. Vascular epiphytes. En: Forest canopies. Lowman M. D y Nadkarni N. M (eds). Capítulo 11: 225-252

Catling P. M. y L. P. Lefkovick. 1989. Associations of vascular epiphytes in a Guatemala cloud forest. Biotropica 21: 35-40.

Ceja, R. J., S. A. Espejo, F. A. R. López, C. J. García, R. A. Mendoza y G. B. Pérez. 2008. Las plantas epifitas, su diversidad e importancia. Ciencias: Disponible en: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=64411463006>> ISSN 0187-6376. Consultada: 17 de septiembre de 2011.

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

Flores-Palacios A. y S. Valencia-Díaz. 2007. Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. Biological Conservation 136 (3): 372-387.

González, H. E., J. Raventos, B. 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.

Granados-Sánchez, D., G. F. López-Ríos, M. A. Hernández-García y A. Sánchez-González. 2003. Ecología de las plantas epifitas. Revista Chapingo. Serie ciencias

forestales y del ambiente 9 (2): 101-111.

Hernández-Rosas J. I. 2000. Patrones de distribución de las epifitas vasculares y arquitectura de los forofitos de un Bosque húmedo tropical de Alto Orinoco, Edo. Amazonas, Venezuela. Acta biológica Venezolana 20 (3): 43-60.

Hernández-Apolinar M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK.) Schl. (Orquidaceae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias UNAM. México 138 pp.

Hietz P. y U. Hietz-Seifert. 1995. Composition and ecology of vascular epiphyte communities along an altitudinal gradient in central Veracruz, Mexico. Journal of Vegetation Science 6: 487-498.

Hietz-Seifert, U., P. Hietz y S. Guevara. 1996. Epiphyte vegetation and diversity on remnant trees after forest clearance in southern Veracruz, Mexico. Biological Conservation 75: 103-111.

Hirata A., K. Takashi y S. Satoshi. 2009. Host trait preferences and distribution of vascular epiphytes in a warm-temperate forest. Plant Ecol 201:247–254.

Huerta P. J. A. 1989. Contribución al conocimiento florístico y ecológico de las epifitas (Orchidaceae y Bromeliaceae) en un Bosque tropical caducifolio de la región de Coalcomán, Michoacán, México. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 36 pp.

Jácome, J., G. Galeano, M. Amaya y M. Mora. 2004. Vertical distribution of epiphyte and hemiepiphytic Araceae in a tropical rain forest in Chocó, Colombia. Selbyana 23: 118-123.

Johansson D. R. 1974. Ecology of vascular epiphytes in West African rain forest. Acta phytogeografica Suecica 59:1-136.

Kindlmann, P., J. H. Willems y D. F. Whigham. 2002. Trends and Fluctuations and

Underlying Mechanisms in Terrestrial Orchid Populations. Backhuys Publishers, Leiden.

Kull T. 2002. Population dynamics of north temperate orchids. *In*: T. Kull & J. Arditti (eds.), *Orchid Biology: Review and Perspectives*, vol. VIII. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Krömer, T., S. R. Gradstein y A. Acebey. 2007. Diversidad y ecología de epifitas vasculares en bosques montanos primarios y secundarios de Bolivia. *Ecología en Bolivia* 42(1): 23-33.

López, G. J. 1989. Contribución al conocimiento florístico y ecológico de las orquídeas epifitas en un bosque de Pino-Encino en el municipio de Coalcomán, Michoacán, México. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 43 pp.

Maldonado-Mijangos, C. y D. Mondragón-Chaparro. 2007. Distribución de *Erycina crista-galli* (Orchidaceae) sobre arbustos de café. *Naturaleza y Desarrollo*. 5 (1):1-6.

Martínez-Meléndez, N., M. A. Pérez-Farrera y A. Flores-Palacios. 2008. Estratificación vertical y preferencia de un hospedero de las epifitas vasculares de un Bosque nublado de Chiapas, México. *Biología tropical* 56 (4): 2069-2086.

Mondragón D. 2009. Population viability analysis for *Guarianthe aurantiaca*, an ornamental epiphytic orchid harvested in Southeast México. *Plant Species Biology*. 24: 35–41.

Múgica, E., J. Raventos y E. González. 2010. Analisis de la selección de sustrato por parte de *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae) en Cabo San Antonio, Península de Guanahabibes, Pinar del Río, Cuba. *Lankesteriana* 9 (3); 533-540.

Nieder, J., S. Engwald y W. Barthlott. 1999. Patterns of Neotropical epiphyte diversity. *Selbyana* 20: 66-75.

Padmawathe, R., Q. Qureshi y G. S. Rawat. 2004. Effects of selective logging on vascular epiphyte diversity in a moist lowland forest of Eastern Himalaya, India. *Biological Conservation* 119:81-92.

Parker G. G. 1995. Structure and microclimate of forest canopies,. *In* M.D. Lowman y N.M. Nadkarni (eds). Forest canopies. Academic, San Diego, California, EUUU. 73-106 pp

Pérez P. M. 2003. Demografía de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr (ORCHIDACEAE) bajo diferentes condiciones de manejo en la zona centro- norte del estado de Michoacán. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. 1-45pp.

Ponce P. M. A. 2011. Estudio florístico y ecológico de las orquídeas epifitas del municipio de Indaparapeo, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura.1-41pp.

Rodríguez C. L. L. 2012. Patrones de distribución de la epífita endémica *Prostechea* aff. *Karwinskii* (Orchidaceae) en Michoacán, México. Tesis de licentura en biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.49pp

SEMARNAT (secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2010. NOM-ECOL-059-SEMARTNAT 2010.PROTECCION AMBIENTAL. Disponible en línea en: <http://www.profepa.gob.mx/NR/rdonlyres/841412613-CF26-4223-BFE9-38BE4AEB0C96/1426/NOMECOL0592001.pdf> (Se acceso 17 Septiembre, 2010).

Stanford W. W. 1968. Distribution of epiphytic of orchids in semideciduos tropical forest in Southern Nigeria. *Journal. Ecology* 56: 697-705.

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

Trapnell D. W. y J. L. Hamrick. 2006. Variety of phorophyte species colonized by the Neotropical epiphyte, *Laelia rubescens* (Orchidaceae). *Selbyana* 27 (1): 60-64.

Tremblay, R. D. 1997. Distribution and dispersion patterns of individual in Nine species of *Lepanthes* (Orchidaceae). *Biotropica* 29:38-45.

Tremblay, R. D., J. D. Ackerman, J. K. Zimmerman, L. Lebron, I. S. Bayman, F. Axelrod y J. Alers-García. 1998. Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. *Biological Conservation* 85:297-394.

Tremblay, R. L. y C. J. Velázquez. 2009. Circular distribution of an epiphytic herb on trees in a subtropical rain forest. *Tropical Ecology* 50 (2):211-217.

Van der Molen M. K. 2002. Methodological Impacts of Land Use Change in Maritime Tropics. Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands.

Vandunné H. J. F. 2002. Effects of the spatial distribution of trees, conspecific epiphytes and geomorphology on the distribution of epiphytic bromeliads in a secondary montane forest (Cordillera Central, Colombia). *Journal of Tropical Ecology* 18:193–213.

Vergara-Torres, C. A, M. C. Pacheco-Álvarez y A. Flores-Palacios. 2010. Host preference and host limitation of vascular epiphytes in a tropical dry forest of central México. *Journal of Tropical Ecology* 26:563-570.

Watthana S. 2005. Ecology and conservation biology of *Pomatocalpa naevata* J.J. Sm. (Orchidaceae). *Natural History Bulletin of Siam Society*, 52: 201- 215.

Watthana S. y H. E. Pedersen. 2008. Phorophyte diversity, substrate requirements and *Fruit set* in *Dendrobium scabrilingue* Lindl. (Asparagales: Orchidaceae): Basic

Observations for Re-introduction Experiments. The Natural History Journal of Chulalongkorn University 8(2): 135-142.

Wolf J. H. D. 2005. The response of epiphytes to anthropogenic disturbance of pine-oak forests in the highlands of Chiapas, Mexico. For. Ecology Management 212: 376–393.

Yeaton R. I. y D. E. Gladstone. 1982. The pattern of colonization of epiphytes on calabash trees (*Crescentia alata* HBK.) in Guanacaste Province, in Costa Rica. Biotropica 14:137-140.

Zimmerman J. K. y I. C. Olmsted. 1992. Host Tree Utilization by Vascular Epiphytes in a Seasonally Inundated Forest (Tintal) in Mexico. : Biotropica (24) 3: 402-407.

Zotz G. 1998. Demography of the epiphytic orchid, *Dimerandra emarginata*. *Journal of Tropical Ecology*. 14:725–741.

Zotz, G., P. Bermejo y H. Dietz. 1999. The epiphyte vegetation of *Annona glabra* on Barro Colorado Island, Panama. *Journal of Biogeografía* 26:761-776.

Zotz G. y J. L. Andrade. 2003. La Ecología y fisiología de las epifitas y hemiepifitas. 271-291.

CAPÍTULO 3. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cuitlauzina pendula* La Llave & Lex. (ORCHIDACEAE) COMO UNA ALTERNATIVA PARA SU CONSERVACIÓN.

RESUMEN

Con el propósito de contribuir de manera indirecta a la conservación de *Cuitlauzina pendula*, una orquídea epífita amenazada que habita en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán, se estableció un sistema de propagación *in vitro* a partir del cultivo de semillas y por la multiplicación masiva de PLBs (cuerpos parecidos a protocormos, de origen asexual). El objetivo de esta investigación fue determinar los medios de cultivo óptimos para la germinación, desarrollo de protocormos, formación de plántulas y multiplicación de PLBs. El cultivo *in vitro* se llevó a cabo a partir de semillas de cápsulas maduras, en diferentes medios de cultivo (MS1, MS 50%; MS2, MS 100%; MS3, MS 50% con BA 0.05 mg/L; MS4, MS 100% con BA 0.05 mg/L; Phy1, Phytamax 50%; Phy2, Phytamax100%; Triple17 T1, fertilizante comercial triple 17 (1000 mg/L); Triple17 T2, fertilizante comercial triple 17 (500 mg/L). Las observaciones de las distintas etapas (deformes, protocormo 1, protocormo 2, plántula 1 y 2), se realizaron a los 60 y 90 días para determinar el medio de cultivo más eficiente para la germinación de *C. pendula*. Los valores más altos de germinación se obtuvieron en los medios Phy1 y Ph2, con un promedio de 31 y 32 “protocormos 2” a los 60 días con 20.25 y 18.0 “protocormos 2” a los 90 días, respectivamente. Cabe señalar que a los 90 días, únicamente estos medios de cultivo registraron desarrollo de plántulas de *C. pendula*. Encontrando diferencias significativas en los diferentes medios de cultivo tanto a los 60 días ($F=101.78$, $g=7$ $P=0.0001$) y 90 días ($F=3.23$, $g=7$ $P=0.0146$). Por lo que después de 90 días de cultivo, los protocormos en el estadio 2 de los tratamientos Phy1 y Phy2 fueron transferidos al medio Phy1 suplementados con una combinación de ANA (ácido naftalenacético) y BA (benciladenina) en concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg/L para ambos reguladores de crecimiento. Las observaciones se realizaron a los 95 y 125 días después de haber hecho la transferencia, para determinar las diferentes etapas de desarrollo, hasta la formación de plántulas (con vástago y/o

presencia de 1 o 2 hojas y rizoides). A los 125 días se evaluarón en los distintos tratamientos las variables: longitud del vástago, número de hojas, largo y ancho de hojas, número de raíces, longitud de raíces y número de PLBs). Se registraron los valores más altos en los tratamientos T19 (0.5/0.5 mg/L de ANA/BA) con un valor promedio de 6.34 mm en la longitud del vástago y 1.13 mm en el número de raíces, en el T18 (0.1/0.5 mg/L) en las variables longitud del vástago con 6.28 mm y 0.88 mm en el ancho de hojas. En el tratamiento T5 (1/0 mg/L) se obtuvieron promedios de 5.38 mm y 6.75 mm en las variables número y longitud de hojas y finalmente un promedio de 2.05 mm en la longitud de las raíces en el tratamiento T20 (1/0.5 mg/L). En lo que respecta a la producción de PLBs en el T18 (0.1/0.5 mg/L) con un promedio de 6.94 PLBs se observaron diferencias significativas a los 125 días ($F=2.77$, $g= 24$, $P=0.0001$). En este muestreo, se obtuvo una respuesta favorable a medianas y altas concentraciones de ANA, considerando este tratamiento (T18) como el medio más eficiente para el desarrollo de plántulas de *C. pendula* en el que se registraron valores altos de cualidades importantes como plántulas sanas con desarrollo de pseudobulbo y raíces, las cuales en aproximadamente 7 % de ellas ya presentaron velamen. Los resultados de esta investigación son un aporte para la propagación masiva de esta especie, como una alternativa para colaborar en su conservación.

Palabras clave: Propagación *in vitro*, *C. pendula*, germinación *in vitro*, medios de cultivo, transferencia *in vitro*

3.1 INTRODUCCIÓN

Las orquídeas han sido una de las plantas más admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones, debido a la belleza impresionante de sus flores (Ramírez, 1996). La primera propagación exitosa de orquídeas *in vitro* mediante la germinación de semillas en medios de cultivo fue lograda por Knudson (1922) con los géneros de *Cattleya* y *Laelia* en agar. Desde entonces la propagación *in vitro* de plantas se ha ido convirtiendo en una de las técnicas de cultivo indispensables como herramienta alterna en la producción de plantas de interés agrícola, comercial, hortícola y ornamental (Mckendrick, 2000).

El cultivo *in vitro* permite propagar un mayor número de plantas en un período relativamente corto por medio de semillas, órganos o tejidos. Por lo tanto, este método se perfila como una alternativa de reintroducción y de propagación *ex situ* para especies endémicas o en peligro de extinción contribuyendo en la disminución de la presión que sobre las poblaciones naturales se ejerce (Arditti y Krikorian, 1996; Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

La biología reproductiva de las orquídeas es compleja, por ejemplo sus flores presentan mecanismos de atracción muy particulares a los polinizadores que les permite producir semillas y perpetuar su especie (Anderson *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2005). La propagación natural de las orquídeas se dificulta porque sus semillas son diminutas, carecen de endosperma y requieren de hongos simbióticos para la germinación de sus semillas (para abastecimiento de azúcares y nutrientes) (Dressler, 1981; Arditti, 1992). Es por ello, que el uso de medios de cultivo en la propagación *in vitro* es de particular importancia en estas plantas puesto que éstos suministran los nutrientes necesarios para su adecuado crecimiento y desarrollo (Buyun *et al.*, 2004; Lo *et al.*, 2004; Santos-Hernández *et al.*, 2005). La propagación *in vitro* por la germinación de semillas provenientes de distintas cápsulas permite mantener una mayor variabilidad genética que a través de la propagación a partir de explantes asexuales o micropropagación.

Es muy difícil encontrar en la literatura, antecedentes sobre los diferentes medios de cultivo utilizados para cada especie de orquídea, pues sus requerimientos nutricionales son diferentes entre especies aún dentro de un mismo género (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Damon, *et al.*, 2004; Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010). Para el establecimiento *in vitro* de semillas de orquídeas es necesario plantear protocolos que estudien la respuesta de germinación dependiendo de la etapa de madurez de las cápsulas, la madurez de las semillas, de los componentes de los medios de cultivo y de factores de crecimiento como luz y temperatura (Arditti, 1982; Damon, *et al.*, 2004; Ávila-Díaz *et al.*, 2009).

México, al igual que otros países neotropicales poseedores de una gran orquídeoflora, sufre de una severa alteración de sus ecosistemas, afectando a muchas poblaciones silvestres (Soto, 1996). En los dos últimos siglos se han extinguido varias especies de orquídeas en México y a partir de 1998 han desaparecido al menos 22 (Hágsater *et al.*, 2005). La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010), incluye 181 especies de la familia Orchidaceae en alguna categoría de riesgo.

Un claro ejemplo de orquídeas mexicanas en alguna categoría de riesgo es *Cuitlauzina pendula*, una especie con imponente belleza catalogada como amenazada y endémica de México, conocida localmente como chorritos por la caída en forma de péndulo de sus inflorescencias. En el caso particular en Michoacán, presenta la grave problemática de: la destrucción de su hábitat por la expansión del cultivo de aguacate y la extracción ilegal para su venta en mercados; lo cual ha ocasionando una muy severa extinción local de sus poblaciones, quedando muy pocas poblaciones remanentes de *C. pendula* en esta región (Ávila-Díaz com. pers.). En el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, en Uruapan, Michoacán (México) hay una población de esta orquídea (Salgado-Garciglia *et al.*, 2012), sitio de donde se obtuvieron las semillas para esta investigación. Este estudio es parte de un proyecto integral que incluye aspectos de su biología reproductiva y otros aspectos de su

ecología, como la distribución vertical en sus hospederos. Los conocimientos generados, pueden ser útiles en la búsqueda de alternativas para su conservación.

Los objetivos de este trabajo fueron establecer un medio de cultivo eficiente para la germinación *in vitro* de *C. pendula* La Llave & Lex., por la siembra de semillas y determinar los medios de cultivo óptimos para el desarrollo de plántulas y la proliferación de PLBs con el fin conseguir la propagación sexual y vegetativa para coadyuvar en su preservación de manera indirecta.

3.2 ANTECEDENTES

3.2.1 Propagación *in vitro* de orquídeas

El concepto de propagación *in vitro* (del latín en vidrio), se refiere al cultivo de un inóculo con potencialidad de diferenciación en recipientes de vidrio en condiciones estériles sobre un medio nutritivo balanceado previamente definido con o sin presencia de hormonas e incubados en condiciones ambientales controladas (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994). Este tipo de propagación puede ser a través de semillas (propagación sexual) o bien por multiplicación vegetativa (propagación asexual) de diferentes segmentos de la planta (tallo, flor, primordios de hoja, raíz, cotiledones, esquejes, yemas y meristemos) que son útiles en la obtención de individuos con características deseables (por ejemplo color, número y tamaño de las flores) de alto potencial ornamental (Seeni y Latha, 1992; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Park *et al.*, 2003; Santos-Hernández *et al.*, 2005, Lavrentyeva e Ivannikov, 2007).

En la propagación *in vitro* de orquídeas, un factor muy importante a considerar es la edad fisiológica en las plantas por su gran influencia en la morfogénesis. La literatura reporta como regla general que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro* para la inducción de PLBs o brotes en comparación con explantes maduros (Nayak *et al.*, 1997; Murthy y Pyati, 2001; Chen *et al.*, 2002; Park *et al.* 2003; Salazar y Mata, 2003; Damon *et al.* 2004; Condemarín-Montealegre *et al.*, 2007; Lavrentyeva e Ivannikov, 2007; Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010). Es por ello que los meristemos apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. Por otro lado se menciona que la madurez de las semillas al momento de la germinación es también un factor importante y poco estudiado en la propagación de las orquídeas (Damon *et al.* 2004; Ávila-Díaz, *et al.*, 2009).

3.2.2 Medios de cultivo utilizados en la propagación de orquídeas epifitas

En la propagación *in vitro*, la selección de un medio de cultivo y los reguladores de crecimiento, son muy importantes para establecer protocolos de propagación eficientes. Los medios de cultivo, básicamente están conformados de entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran una fuente de carbono, nutrientes minerales, vitaminas y en algunos casos reguladores del crecimiento (Mroginski y Roca, 1993). Además de un agente gelificante que de consistencia al medio de cultivo (en el caso de medios semisólidos) que suelen ser agar o gelatina simple (Mendieta, 2002; Mroginski, *et al.*, 2010).

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Para la germinación de semillas de orquídeas se reportan en la literatura los medios Knudson C (Knudson, 1946), MS (Murashige y Skoog, 1962), Dalla Rosa y Laneri (Dalla Rosa y Laneri, 1977), VW (Vacín y Went, 1949), Lindemann (1970) y Phytamax (Químicos Sigma, Aldrich, Inglaterra), como los principales medios de mayor uso con algunas modificaciones en su concentración total o parcial (Mackendrik, 2000; Salazar y Mata, 2003; Damon *et al.*, 2004; Ruíz *et al.*, 2008; Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Mayo *et al.*, 2010; Molina, 2012). Los requerimientos entre especies pueden ser muy diversos, encontrando desde orquídeas que se cultivan en medios simples que consisten de sales minerales, sacarosa y agua de coco (Goh, 1990), el medio Knudson C (Knudson, 1946) y aquellas con requerimientos nutricionales más complejos que requieren suplementos con auxinas, citocininas o giberelinas en el medio basal como puede ser el medio de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) (Bopana y Saxena, 2008).

Dentro de la familia Orchidaceae se presenta una enorme variabilidad en lo que refiere a sus requerimientos nutricionales y otras variables como temperatura, luz y humedad (Damon, *et al.*, 2004; Ávila-Díaz *et al.*, 2009). Cabe aclarar que aunque existen similitudes en los medios de cultivo en algunas especies de orquídeas, sus

necesidades nutrimentales durante la germinación y desarrollo pueden ser distintas, por lo que la investigación encaminada a encontrar los medios de germinación y desarrollo más adecuado para cada una de ellas cobra vital importancia.

3.2.3 Promotores del crecimiento vegetal en este estudio

En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen sustancias reguladoras del crecimiento como auxinas (por ej. ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citocininas (por ej. BA, KIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemos o para la elongación de brotes (Mroginski *et al.*, 2010). La incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas. Por lo menos en lo que se refiere a la temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene. En general, los cultivos son incubados a temperatura constante de 25-28 °C, con ciclo de luz/oscuridad de 16/8horas. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes del tipo «luz día» con una irradiancia de entre 50 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La humedad atmosférica debe ser elevada al 80 y/o 90% (Mroginski *et al.*, 2010).

Reportándose en la literatura que el ácido abscísico (ABA), en concentraciones altas inhibe la germinación; en contra parte el ácido 3-indolbutírico (IBA), el ácido naftalenacético (ANA), ácido giberélico (GA3) y la kinetina en concentraciones bajas así como el extracto de plátano y de coco estimulan el crecimiento (Van der Kinderen, 1987).

3.2.4 Propagación *in vitro* de orquídeas epifitas a partir de semillas

A pesar de la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se ha demostrado también que es posible obtener un gran número de plantas de manera sexual con alta variabilidad genética a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de cultivo *in vitro* (Arditti, 1993; Serna, 1999; Mckendrick, 2000; Cavalcante *et al.*, 2001; Damon *et al.*, 2004; Pedroza *et al.*, 2005; Yamazaki y

Kasumitzu, 2006; Pedroza y Mican, 2006; Steele, 2007; Ávila-Díaz, *et al.*, 2009). El desarrollo de protocolos de propagación *in vitro*, que puedan ser adoptados por horticultores, comunidades organizadas e interesadas en la explotación racional de sus recursos, contribuye indirectamente en su conservación, disminuyendo en gran medida la presión de colecta de sus poblaciones silvestres, al ofrecer plantas de calidad libres de patógenos, aplicable en la producción de plantas en alguna categoría de riesgo de extinción (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Koopowitz, 1996; Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

En la propagación sexual (germinación de semillas), las estructuras formadas durante los primeros estadios que dan lugar a las plántulas se denominan protocormos (Pierik, 1990). Partiendo de esto, se considera que la germinación ocurre cuando el embrión rompe la testa y emerge de ésta, produciendo una masa indiferenciada de células (protocormo) sobre el que puede distinguirse un meristemo del vástago (Flores-Escobar *et al.*, 2008). Los reportes de germinación *in vitro* de algunas orquídeas señalan períodos de germinación desde los 14 días hasta los 10 meses, como en *Dactylorhiza majalis* (Rasmussen, 1990) y *Dendrobium parishii* (Buyun *et al.*, 2004), respectivamente. En general, las plántulas pueden presentar el desarrollo de un par de hojas y raíces, desde los 30 y 45 días después de la siembra, también se ha reportado la formación de plántulas de *Cattleya sp.* (Buyun *et al.*, 2004) hasta 500 días después de su cultivo *in vitro*. Aunque este desarrollo temprano o tardío de plántulas depende más bien de factores como el tipo de especie, la madurez de la cápsula y el medio de cultivo (Lee y Lee, 1991; Buyun *et al.*, 2004; Damon *et al.*, 2004; Ávila y Salgado-Garciglia, 2006; Ávila-Díaz, *et al.*, 2009).

Se han realizado numerosos estudios de propagación *in vitro* realizados a partir de semillas en distintos medios de cultivo en especies como *Encyclia adenocaula* (Ruíz *et al.*, 2008) en el medio Phytamax (medio de mantenimiento en orquídeas); *Mormodes tuxtlensis*, *Cuitlauzina pendula* y *Lycaste skinneri* (Salazar y Mata, 2003); *Oncidium stramineum* (Flores-Escobar *et al.*, 2008); *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009); *Comparetia speciosa* (Molina, 2012) en el medio MS (Murashige y Skoog)

en concentraciones totales o parciales; *Cattleya aurantiaca*, *Brassavola nodosa* (Damon *et al.*, 2004) en el medio Dalla Rosa y Laneri KO7 modificado; y *Catasetum integerrimum*, *Encyclia alata*, *Encyclia cordigera*, *Epidendrum flexuosum*, *Epidendrum chlocorymbos*, *Epidendrum stamfordianum*, *Myrmecophila sp.*, *Trichocentrum ascendens*, *Trichocentrum carthagenense*, *Oncidium sphacelatum*, *Prosthechea cochleata*, *Nidema boothii*, *Trichocentrum lindenii* (Mayo *et al.*, 2010) en los medios VW (Vacin y Went, 1949) y MS (Murashige y Skoog, 1962). En estos se evidencian las diferencias en los requerimientos nutricionales entre las distintas especies de orquídeas, ya que algunas especies mostraron preferencia hacia el medio de cultivo MS en concentraciones totales o parciales mientras que otras responden de manera similar en más de un medio de cultivo ya que se obtuvieron altos porcentajes de germinación y sobrevivencia de plántulas en cada uno de estos medios.

Desde el punto de vista de la conservación *ex situ*, las semillas de orquídeas procedentes de distintas cápsulas presentan una mayor variabilidad genética, lo que las convierte en un material apropiado para ser incluido en programas de conservación (Mayo *et al.*, 2010).

3.2.5 Propagación *in vitro* de orquídeas epifitas a partir de explantes

Tradicionalmente, las orquídeas se han propagado asexualmente mediante la división de plantas y protocormos, demostrando la factibilidad del método con éxito en *Bletia urbana*, *Lycaste skinneri* (var. *alba*), *Laelia anceps*, *Encyclia citrina* y *Rhyncholaelia glauca* (Rubluo *et al.*, 1993), *Euchile mariae* (Suárez-Quijada *et al.*, 2007) y *Laelia speciosa* (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010) con fines encaminados a la conservación de estas especies con un mayor auge en los géneros *Phalaenopsis*, *Oncidium*, *Cymbidium*, *Dendrobium* y *Paphiopedilum* en la producción comercial (Pan, 2007).

Es importante resaltar que la regeneración de plántulas provenientes de callos, tejidos de hoja, raíces o pseudobulbos da como resultado la producción de brotes o PLBs idénticos genéticamente, que son importantes en la industria hortícola y ornamental puesto que conservan caracteres deseables en las especies como tamaño, coloración, mayor número de brotes y/o varas florales entre otros. (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994).

3.3. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un medio de cultivo eficiente para la germinación *in vitro* de *C. pendula*.
2. Determinar los medios de cultivo óptimos para el desarrollo *in vitro* de plántulas a partir de protocormos de *C. pendula*.
3. Determinar el medio de cultivo con mayor producción de PLBs en *C. pendula*

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material biológico

Para el cultivo *in vitro* de semillas de *C. pendula* La Llave & Lex., se colectaron dos cápsulas provenientes de una planta sana, con una gran cantidad de pseudobulbos formando stands, con al menos 5 cápsulas al momento de la colecta en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán (México).

3.4.2 Propagación *in vitro* de *C. pendula*

3.4.2.1 Germinación de las semillas

Dos cápsulas cerradas y maduras de *C. pendula* fueron desinfestadas de acuerdo a Ávila-Díaz *et al.* (2009). Cada cápsula fue disectada, transversal y longitudinalmente en cuatro secciones en una caja de petri estéril. Las semillas desinfestadas se separaron de los tejidos maternos con agujas de disección previamente esterilizados

y se tomaron 5 mg de semillas distribuyéndolas uniformemente sobre la superficie de cada uno de los frascos conteniendo los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962): MS1 (MS 50%), MS2 (MS 100%), MS3 (MS 50% con BA 0.05 mg/L) y MS4 (MS100% con BA 0.05 mg/L); el medio de cultivo comercial Phytamax, Phy1: (Phytamax 50%) y Phy2 (Phytamax 100%); y medios con fertilizante comercial triple 17, T1 (Triple 17: 50%) y T2 (Triple 17 100%). Para cada medio de cultivo, se sembraron semillas en 15 frascos de 100 ml, los cuales fueron sellados con parafilm, etiquetados previamente con la fecha de siembra, especie y el medio de cultivo correspondiente.

Las condiciones de crecimiento *in vitro*, fue en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 25°C bajo un fotoperíodo de 16 horas luz (2000 lux).

A los 60 y 90 días después del cultivo se extrajo una porción de semilla o muestras cultivadas de 0.5 cm² aproximadamente con una espátula, de cuatro frascos por cada tratamiento, para observar en un microscopio óptico (Carl Zeiss) el número de semillas germinadas, (considerándose como germinación, cuando el embrión se encontró fuera de la testa denominada estadio de protocormo 2). Además, se consideraron los siguientes estadios de desarrollo: a) deformes (semillas con el embrión reducido a un 50% o menos dentro de la testa); b) protocormo 1 (aquellas semillas que tenían el embrión completo dentro de la testa); c) protocormo 2 (aquellas semillas que tenían más del 50% o todo el embrión, fuera de la testa); d) plántula 1 (plántula con una o dos hojas) y e) plántula 2, (plántula con más de dos hojas). Las observaciones fueron realizadas para determinar el medio de cultivo óptimo para germinación y desarrollo de plántulas de *C. pendula*.

3.4.2.2 Transferencia de protocormos *in vitro* con adición de reguladores de crecimiento

Debido a que los medios Phy1 y Phy2 no mostraron diferencias en cuanto a la germinación en general y puesto que Phy1 fue el segundo medio más eficiente para

el desarrollo de plántulas, se decidió utilizar este medio (50% de sus sales basales) para disminuir costos, en el cual se transfirieron los protocormos en estadio 2 después de 90 días de cultivo, que fue suplementado con distintas concentraciones de una combinación de la auxina ácido naftalenoacético (ANA) y la citocinina benciladenina (BA) (benciladenina): (0, 0.05, 0.1 y 0.5 mg/L para ambos reguladores de crecimiento), cultivando 5 frascos por tratamiento.

La evaluación del número de protocormos transferidos, así como del número de PLBs, se realizó a los 95 y 125 días, determinando la longitud del vástago, el número de hojas, largo y ancho de las hojas, número y longitud de raíces y finalmente el vigor de las plántulas. Este último parámetro fue determinado con la asignación de las siguientes categorías: 1) Muerta, 2) Necrosis con más del 50% con coloración café, 3) Necrosis con menos del 50% con coloración café o alguna hoja clorótica, 4) Plántula, sin desarrollo de vástago, 5) Plántula sana, con desarrollo de vástago y 6) plántula sana con vástago, con pseudobulbo y raíces con velamen.

3.4.2.3 Multiplicación de PLBs

También se evaluó el número de PLBs, para determinar el medio de cultivo más eficiente para la reproducción asexual de *C. pendula*.

3.4.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento de propagación *in vitro* fue organizado de acuerdo a un diseño de bloques al azar con 25 tratamientos (medios de cultivo con diferentes concentraciones de ANA/BA) y 20 repeticiones por tratamiento (plántulas). Se realizó un análisis de ANOVA y una prueba de Tukey y Kramer con un 95% de confiabilidad cuando hubo diferencias significativas (JMP 8, 2009). Para las variables cualitativas categóricas (vigor) se llevó a cabo un análisis de Chi-cuadrada con el programa SPSS 18 (SPSS, 2009).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Germinación de las semillas

Para evaluar el medio de cultivo más eficiente para la germinación de *C. pendula*, se cuantificó el número total de individuos que germinaron (protocormo 2) en los distintos medios. Las categorías de desarrollo establecidas durante el desarrollo *in vitro* de *C. pendula*, se muestran en la Figura 1.

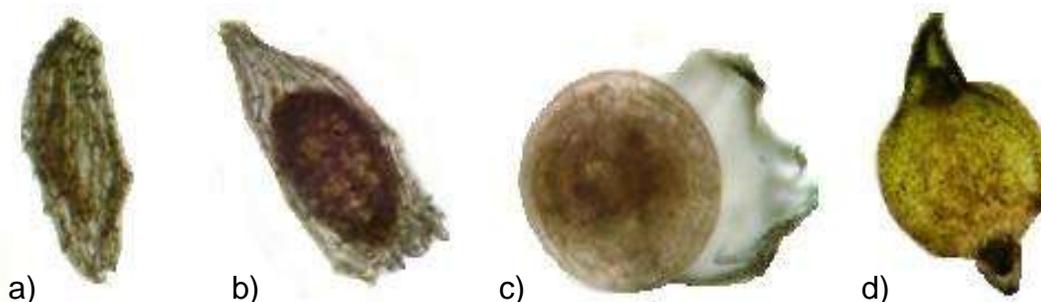
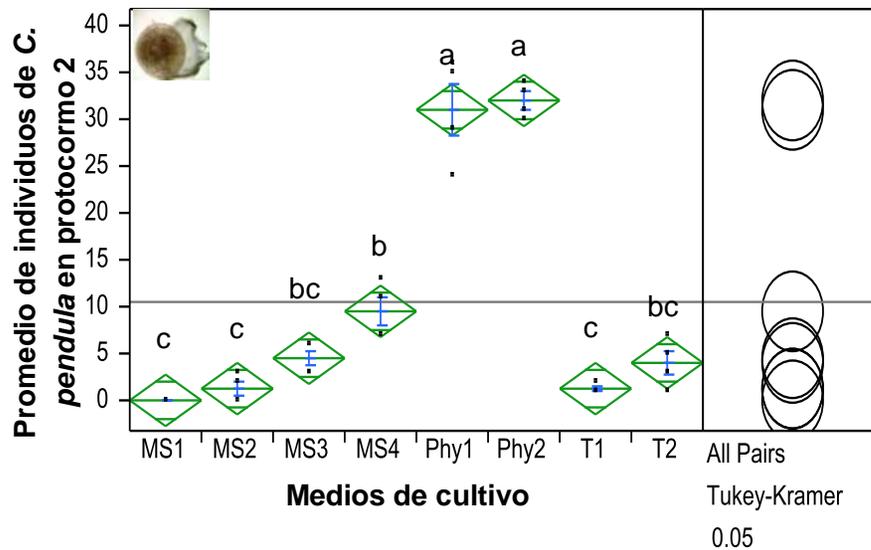


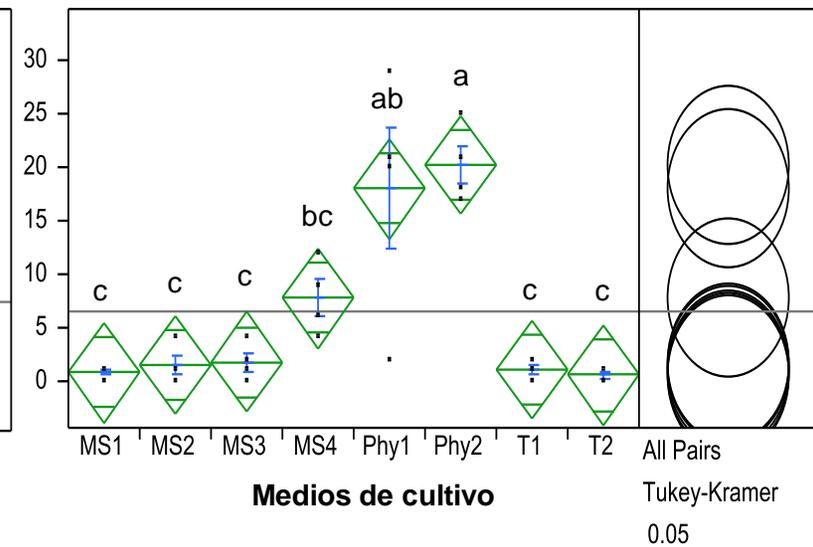
Figura 1. Categorías de desarrollo de *C. pendula*: a) embrión deforme, b) protocormo 1, c) Protocormo 2 y d) plántula 1.

Al analizar los diferentes medios de cultivo a los 60 y 90 días, se encontraron diferencias significativas. A los 60 días ($F=101.78$, $gl=7$ $P=0.0001$) se obtuvieron las germinaciones más altas con promedios de 32 y 31 en estadio de “protocormo 2” en los medios Phytamax al 100 y 50% y a los 90 días ($F=3.23$, $gl=7$ $P=0.0146$) nuevamente se registraron valores altos de germinación de 20.25 y 18 (protocormos 2) para estos mismos medios (Phytamax 100% y 50%) como se muestra en la Figura 2.

La disminución observada en los promedios de protocormos 2 a lo 90 días, fue debido al paso del estadio de protocormo 2 a plántula 1. Es importante mencionar que a los 90 días, únicamente los medios Phy1 y Phy2 registraron el desarrollo de plántulas de *C. pendula*.



A) 60 días



B) 90 días

Figura 2. Promedio de individuos de *C. pendula* en estadio de protocormo 2, A) a los 60 días de la siembra y B) a los 90 días después de la siembra, en los distintos medios de cultivo MS 1 (al 50%), MS 2 (al 100%), MS 3 (al 50% con BA 0.05), MS 4 (al 100% con BA 0.05), Phy 1(Phytamax 50%), Phy 2 (al 100%) y T1 (fertilizante comercial triple 17 al 50%) y T3 (fertilizante comercial triple 17 al 100 %). En donde: MS: medio Murishage y skoog y Phy: medio Phytamax

Las plántulas registradas a los 90 días en dichos medios, se observaron en estado de desarrollo de plántula 1 (con 1-2 hojas). El medio más eficiente para el desarrollo de plántulas fue el Phy al 100% con un promedio de 17.25 plántulas seguido por el medio Phy al 50% con 6.25 plántulas (Figura 3). Diferenciando estos medios (Phy1 y Phy2) significativamente ($F=11.95$, $gl=1$, $P=0.0135$) entre los medios probados respecto al desarrollo de plántulas.

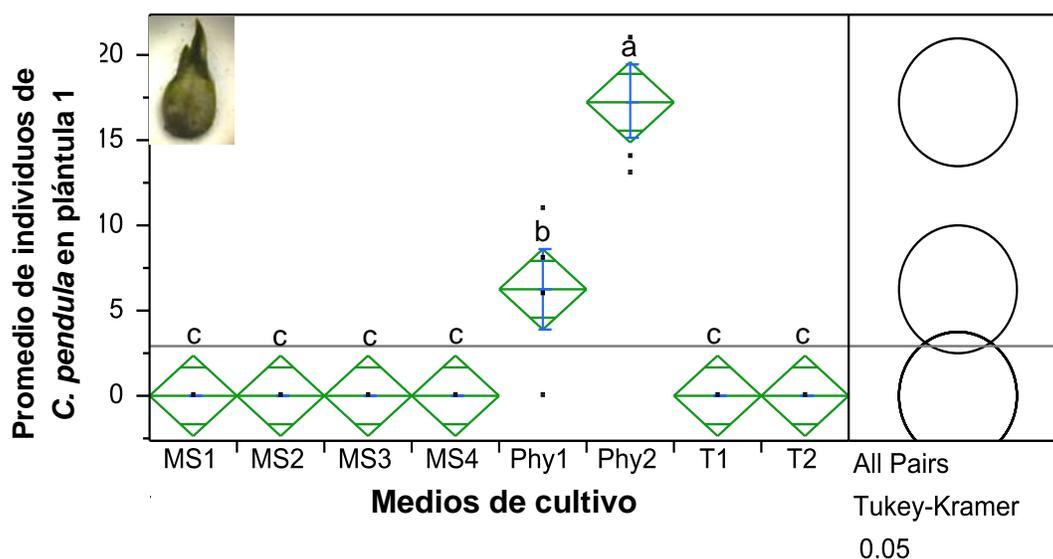


Figura 3. Promedio de individuos de *C. pendula* en estadio de plántula 1 en los medios de cultivo MS 1 (al 50%), MS 2 (al 100%), MS 3 (BA y MS 50%), MS 4 (BA y MS100%), Phy 1(Phytamax 50%), Phy 2 (al 100%) y T1 (fertilizante comercial triple 17 al 50%) y T3 (fertilizante comercial triple 17 al 100 %). A los 90 días de efectuada la siembra.

3.5.2 Transferencia de protocormos *in vitro* con adición de reguladores de crecimiento

Se encontraron diferencias significativas a los 125 días en los tratamientos con ANA (ácido naftalenacético) y BA (benciladenina) en todas las variables evaluadas (longitud del vástago, número de hojas, largo y ancho de hojas, número de raíces, longitud de raíces y número de PLBs) tal como se muestra en el Cuadro 1.

A los 125 días se observaron valores altos en los tratamientos T19 (0.5 mg/L / 0.5 mg/L), T18 (0.1 mg/L / 0.5 mg/L) y T5 (1 mg/L / 0 mg/L). En el tratamiento T19 (0.5 mg/L / 0.5 mg/L de ANA/BA) con un promedio de 6.34 mm en la longitud del vástago y 1.13mm en el número de raíces, en el T18 (0.1 mg/L / 0.5 mg/L de ANA/BA) en las variables longitud del vástago con 6.28 mm y el ancho de hojas con 0.88 mm. En el tratamiento T5 (1 mg/L / 0 mg/L de ANA/BA) se registraron valores de 5.38 mm en el número de hojas y 6.75 mm en su longitud y finalmente la longitud de las raíces en el tratamiento T20 (1 mg/L / 0.5 mg/L) con 2.05 mm, observándose entonces, una respuesta favorable a moderadas y altas concentraciones de ANA (Cuadro 1).

Cabe mencionar que el medio T18 a los 125 días de haber efectuado la siembra (protocormos 2), es en el que se registraron valores altos de cualidades importantes como plántulas sanas con desarrollo de pseudobulbo y raíces desarrolladas, las cuales en aproximadamente 7 % de las plántulas ya presentaban velamen, como se muestra también en el cuadro siguiente.

Cuadro 1. Medios de cultivo mas eficientes para el desarrollo *in vitro* de *C. pendula* en Phytamax al 50%, con Reguladores del Crecimiento Vegetal ANA (ácido naftalenacético) y BA (benciladenina) a los 125 días de efectuada la transferencia.

Variables de desarrollo <i>in vitro</i> de plántulas de <i>C. pendula</i>	Tratamiento ANA/BA	Concentración ANA/BA mg/L en Phy 50%	Promedios (mm)
Longitud del vástago	T19	0.5/0.5	6.34
	T18	0.1/0.5	6.28
Número de hojas	T5	1/0	5.38
Longitud de hojas	T5	1/0	6.75
Ancho de hojas	T18	0.1/0.5	0.881
Número de raíces	T19	0.5/0.5	1.25
Longitud de raíces	T20	1/0.5	2.05
Número de PLBs (asexual)	T18	0.1/0.5	7 PLBs

PLBs: estructuras parecidas a protocormos de origen asexual

Se obtuvieron diferencias significativas en los distintos tratamientos (ANA/BA) con respecto a las distintas categorías de vigor en plántulas a los 125 días ($X^2=205.11$, $gl=168$ $P=0.027$) en *C. pendula*. Mostrando a los tratamientos T5 (1 mg/L / 0 mg/L), T9 (0.5 mg/L / 0.5 mg/L), T18 (0.1 mg/L / 0.5mg/L), T19 (0.5 mg/L / 0.5 mg/L), T20 (1 mg/L / 0.5 mg/L) y T21 (0 mg/L / 1 mg/L) como lo más sobresalientes (4.5%-5.5%) a los 125 días en este primer análisis.

Un segundo análisis de los tratamientos con reguladores de crecimiento más sobresalientes con respecto a las categorías de vigor mostró diferencias significativas a los 125 días ($X^2=38.464$, $gl=20$ $P=0.008$) en el tratamiento T18 (0.1 mg/L /0.5 mg/L) con un 17.9%, siendo el tratamiento que presento las plántulas con el mayor vigor (Figura 4).

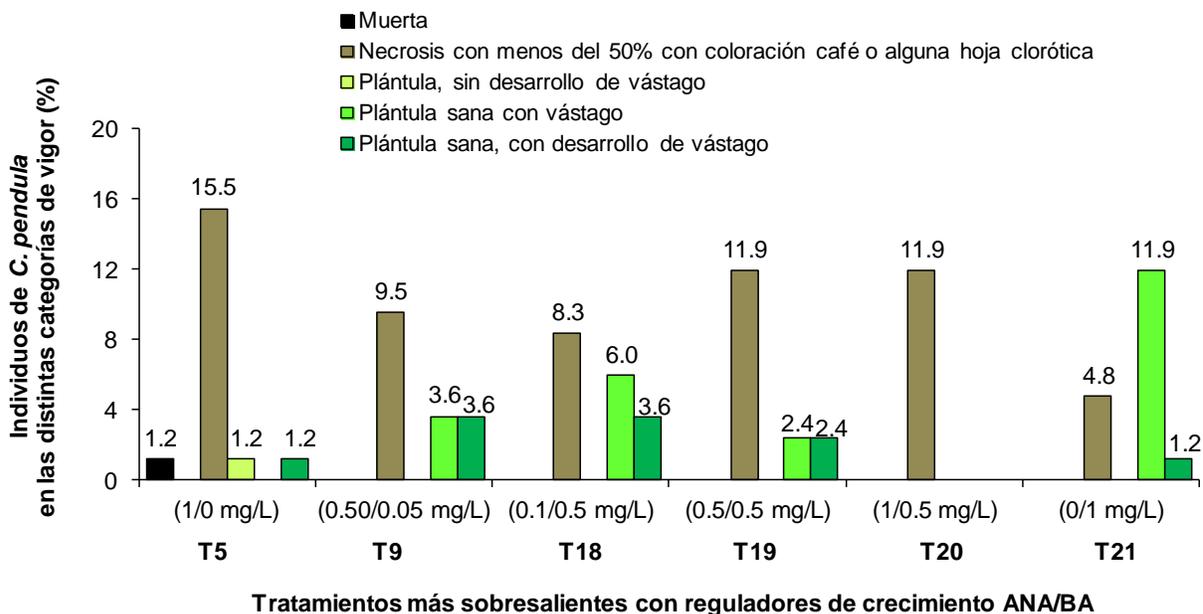


Figura 4. Porcentaje de individuos de *C. pendula* en las distintas categorías de vigor en los tratamientos más sobresalientes con reguladores de crecimiento ANA y BA.

3.5.3 Multiplicación de PLBs

En lo que respecta a la producción de PLBs el T18 (0.1 mg/L / 0.5 mg/L) con un promedio de 7 PLBs, mostro diferencias significativas a los 125 días ($F=2.77$, $g/l= 24$, $P=0.0001$) tal como se observó en el Cuadro 1.

3.6 DISCUSIÓN

3.6.1 Germinación de las semillas

Existe gran preocupación por conservar las orquídeas que se encuentran en alguna categoría de riesgo (Szalansky *et al.*, 2001; Avila y Oyama, 2007). *C. pendula* esta en la categoría de amenazada de acuerdo a la NOM-059-2010. Este estudio demuestra la utilidad de emplear el medio Phy2 para lograr los mayores porcentajes de germinación *in vitro* de las semillas de *C. pendula* como en el estudio realizado en *Encyclia adenocaula* (Ruíz *et al.*, 2008) en el que se obtuvo el 69.16% de germinación en el medio Phytamax.

Por otro lado, en un estudio utilizando como medio de cultivo base Murashige y Skoog, realizado en diferentes especies de orquídeas, como: *C. pendula*, adicionado con BA (0.5 mg/L) y en ausencia de auxinas (ANA); en *Mormodes tuxtlensis*, adicionado con BA (3 mg/L) y en *Lycaste skinneri*, adicionado con ANA (0.5 mg/L) (Salazar y Mata, 2003; Salazar-Rojas y Mata-Rosas, 2009) se obtuvo un 100% de germinación en las tres especies.

Esta respuesta favorable de *C. pendula* en medios de cultivo como Phytamax y Murashige y Skoog sin reguladores de crecimiento, como medios de germinación podría sustentarse en la idea de que plantas provenientes de distintas zonas tienen requerimientos de cultivo ligeramente distintos (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007). Sin embargo, el medio Murashige y Skoog no siempre es utilizado como medio de germinación. Diversos estudios reportan al medio Murashige y Skoog como un excelente medio de desarrollo (Salazar y Mata, 2003; Ávila y Salgado-Garciglia, 2006; Suárez-Quijada, 2007; Flores-Escobar *et al.*, 2008; Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Coello *et al.*, 2010; Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010) y en su contraparte escasos estudios realizados en el medio de cultivo Phytamax por lo que este estudio cobra aún más

relevancia al haber encontrado en este último, el mas alto porcentaje de germinación en semillas de *C. pendula*.

3.6.2 Transferencia de protocormos *in vitro* con adición de reguladores de crecimiento

El mayor desarrollo de *C. pendula* a los 125 días de su trasplante con reguladores de crecimiento vegetal en el medio Phytamax, se presentó en los tratamientos T18 (0.1 mg/L / 0.5 mg/L de ANA/BA) y T19 (0.5 mg/L / 0.5 mg/L de ANA/BA), los cuales tienen moderadas y altas concentraciones de ANA/BA. También en el tratamiento T5, a altas concetraciones de ANA (1.0 mg/L / 0 mg/L de ANA/BA) se obtuvo buen desarrollo. Un estudio realizado en *C. pendula* (Salazar y Mata, 2003) reportó una alta formación de plántulas en el medio MS adicionado con BA (0.5mg/L) o sin reguladores de crecimiento, similar a lo que ocurre en el T18 ANA/BA (0.1mg/L / 0.5 mg/L) y T19 ANA/BA (0.5 mg/L / 0.5mg/L) en el presente estudio.

En protocormos de *Lycaste skinneri* (Salazar y Mata, 2003) y mitades de protocormos en *Oncidium tigrinum* (Baltazar, 2004) y *Euchile mariae* (Suarez-Quijada *et al.*, 2007), se reportó la mayor formación de plántulas en distintas concentraciones de reguladores de crecimiento. Por ejemplo, *Euchile mariae* con 1 mg/L / 1 mg/L de ANA/BA y con la adición solamente de 1 mg/L de BA, *Lycaste skinneri* con la adición de 0.5 mg/L de ANA y *Oncidium tigrinum* con 1mg/L de BA.

El uso del tratamiento T18 ANA/BA (0.1 mg/L / 0.5 mg/L) para el desarrollo de plántulas de *C. pendula* es el más adecuado en este estudio ya que en esta concentración se encontró la mayor cantidad de plántulas vigorosas con características deseables tales como, plántulas sanas con pseudobulbos y raíz con velamen.

3.6.3 Multiplicación de PLBs

En cuanto a la formación de PLBs, como una forma de reproducción asexual para *C. pendula*, en este trabajo el tratamiento T18 fue el mejor (0.1 mg/L / 0.5 mg/L de ANA/BA). Se reporta también la formación de PLBs en *C. pendula* con BA a una concentración de 0.5 mg/L, y sin reguladores de crecimiento. En *Cattleya aurantiaca* con 0.1 mg/L de ANA y 10 mg/L de BA (Mauro *et al.*, 1995), en *Euchile mariae* con 1mg/L de ANA y 1 mg/L de BA y también con la adición de 1 mg/L de BA, *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2009) con 0.5 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de GA₃, y *Oncidium tigrinum* (Baltazar, 2004) con 1mg/L de BA en el medio MS.

La formación de brotes ha sido reportada, en especies como: *Cattleya aurantiaca* (Mauro *et al.*, 1995) con 0.1 mg/L y 10mg/L de ANA/BA, *Mormodes tuxtlensis* (Salazar y Mata, 2003) con la adición de 3 mg/L de BA en el medio MS y *Laelia anceps* (Hernández *et al.*, 2001) con 1 mg/L y 0.5 mg/L de ANA/BA en el medio Knudson C.

Se considera necesario llevar a cabo este tipo de investigaciones debido a la respuesta diferencial entre las distintas especies y sus requerimientos nutrimentales en función de la interacción con el tipo y nivel del regulador de crecimiento (Hernández *et al.*, 2001; Salazar y Mata, 2003, Coello *et al.*, 2007; Suárez-Quijada *et al.*, 2007; Ávila-Díaz *et al.*, 2009; Mata-Rosas y Salazar-Rojas, 2009).

3.7 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

Existen relativamente pocos trabajos enfocados a la propagación y conservación de especies de orquídeas mexicanas, por lo que haber logrado establecer el cultivo *in vitro* de *C. pendula*, una especie amenazada (NOM-ECOL-059-2010) es una aportación importante, que puede colaborar a la conservación de la misma.

C. pendula, ha sido muy fuertemente extraída de sus poblaciones naturales, y dada la extinción local de muchas de sus poblaciones y una gran disminución del tamaño poblacional de muchos sitios, se considera en este caso particular útil llevar a cabo algunos programas de reintroducción (Ávila, com pers.), particularmente en el caso de el PNBC, en donde en base a estudios previos de su sistema de apareamiento (que han mostrado un posible alto grado de parentesco entre los individuos), y de su estructura de tamaños de la misma población (en donde el mayor porcentaje de individuos son adultos), se justifica la reintroducción de plántulas, tal como se menciona en el capítulo 1 y 2 de esta tesis. Cabe mencionar que la germinación de semillas que tengan la finalidad de reintroducirse debe ser a partir de semillas procedentes de distintas cápsulas del mismo sitio o lo más cercano posible, para contribuir en la conservación de la variabilidad genética y estructura genética de las poblaciones en la naturaleza (Ávila y Oyama, 2007).

La continuidad del estudio en *C. pendula* es muy importante puesto que muchas de sus poblaciones naturales casi han desaparecido por el cambio de uso de suelo (de bosques a huertas de aguacate) y la extracción de individuos de sus poblaciones. Siendo necesario un proyecto multidisciplinario que incluya la participación del sector gubernamental, del sector académico con estudios biológicos (demografía, establecimiento de plántulas, la relación con micorrizas, entre otros) y programas de educación ambiental que involucren a personas de las comunidades en donde se encuentra *C. pendula* para concientizarlas así como la búsqueda de alternativas para el beneficio de las comunidades sin tener que llevar en un futuro no muy lejano a

esta especie de orquídeas a su extinción local.

3.8 CONCLUSIONES

C. pendula presentó la mayor geminación en los medios de Phytamax al 100% y al 50% de la concentración de sus sales basales, a los 60 y 90 días de efectuada la siembra

El medio Phy 50% adicionado con 0.1 y 0.5 mg/L de ANA y BA respectivamente (T18) fue el más eficiente para el crecimiento y desarrollo de plántulas de *C. pendula*, obteniéndose plántulas más sanas, con pseudobulbo y raíz desarrollada.

El medio T18, fue también el mejor para producir la mayor cantidad de PLBs.

3.9 LITERATURA CITADA

Abdelnour-Esquivel A. y E. J. Vincent. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. 48pp. Digitalizado por google.

Anderson, B., S. D. Johnson y C. Carbutt. 2005. Exploitation of a specialized mutualism by a deceptive orchid. *American Journal of Botany* 92: 1342-1349.

Arditti J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture a manual. En: J. Arditti (Ed.) *Orchid biology: reviews and perspectives II*. Cornell University Press, Londres. 243-370pp

Arditti J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. Department of Developmental and Cell Biology. Ed. John Wiley and Sons. USA. 691pp.

Arditti J. 1993. *Micropropagation of orchids*. Ed. John Wiley and Sons. New York. 949 pp.

Arditti J. y A. D. Krikorian. 1996. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigations. *Bot Journal Linn Soc* 122:183–241.

Ávila D. I. y R. Salgado-Garciclia. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biologicas*. Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 8: 138-149.

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

Baltazar R. 2004. Micropropagación de *Oncidium tigrinum* Llave & Lex. (Orchidaceae) a partir de protocormos. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. 124 pp.

Bopana N. y S. Saxena. 2008. *In vitro* propagation of a high value medicinal plant: *Asparagus racemosus* Willd. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 44 (6): 525-532.

Buyun, L., A. Lavrentyeva, L. Kovalskay R. Ivannikov.2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. *Acta Univ. Latviensis Biol* 676:159–162.

Cavalcante, M. P., L. Willadino, A. G. Diaz y S. D. V. M. Tenório. 2001. Propagacao de orquídea *Góngora quinquenervis* por sementeura *in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras* 36: 1319-1324.

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

Condemarín-Montealegre, C.E., J. Chico-Ruíz y C. Vargas-Arteaga. 2007. Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo *in vitro* de yemas axilares de *Encyclia microtos* (Rchb.F.) Hoehne (Orchidaceae). *Lankesteriana* 7: 247-254.

Chen, L. R., J. T. Chen y W. C. Chang. 2002. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. *In vitro cell. Dev. Biol. Plant* 38: 441-445.

Damon, A., G. E. Aguilar, 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: 195-203.

Dalla-Rosa, M. y U. Laneri. 1977. Modification of nutrient solutions for germination and growth "in vitro" of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. *American Orchid Society Bulletin* 46: 813-820.

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

Flores-Escobar, G., J. P. Legaria-Solano, I. Gil-Vásquez y M. T. Colinas-León. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3): 347-353.

Hagsater, E., M. A. Soto-Arenas, G. A. Salazar-Chávez, M. R. Jiménez, M. A. López-Rosas y R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, 303 p.

Hernández, J., O. Hernández y M. Mata. 2001. Regeneración de plántulas a partir de cultivo *in vitro* de mitades de protocormos de *Laelia anceps* Lindl. y *Catasetum intergerrimum* Hook. *Boletín Amaranto-Asociación Mexicana de Jardines Botánicos, A. C.* 14(1): 3-12.

Huber, F. K., R. Kaiser, W. Sauter y F. P. Schiestl. 2005. Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecología* 142: 564-575.

Knudson L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *American Orchid Soc. Bull* 15 :214-217.

Koopowitz H. 1996. Conservation Strategy. En: E. Hágsater y V. Dumont (eds.), *Orchids—Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 11-47.

Lavrentyeva, A. M. y R.V. Ivannikov. 2007. *In vitro* propagation of *Cattleya* Lindl. and *Laelia* Lindl. species. *Lankesteriana* 7: 147-149.

Lee, J. y H. Lee. 1991. Micropropagacion de orquídeas a partir de semillas. Boletín informativo de FIRA XXIV. 2:15-30

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

Mata-Rosas, M. y V. M. Salazar-Rojas. 2009. Propagation and Establishment of Three Endangered Mexican Orchids from Protocorms. *Hortscience* 44(5):1395–1399.

Mayo, M. A., C. J. G. Cázares, E. C. Lázaro y H. A. Flores. 2010. Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Agropecuarias. 34 pp.

McKendrick S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Copyright, Ceiba Foundation for Tropical Conservation.

Mendieta M. 2002. Propagación de orquídeas. Disponible en línea en: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/dpg/98051.pdf>. Consultado el 5 de Noviembre del 2012.

Morel G. 1965. Tissue culture: a new means of clonal propagation of orchids. México. D.F.

Molina C. J. C. 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. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad de Cuenca, Ecuador. 9-144pp. Disponible en:

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/387>. Consultada el 4 de Enero 2013.

Mroginski L. A. y W. M. Roca. 1993. Capítulo 2: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. (Editores: Mroginski L. A. y W. M. Roca). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 20-40pp.

Mroginski L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal II. (Editores: V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argenbio 16-25.

Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.

Murthy, H. N. y A. N. Pyati. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 37:223-226.

Nayak, N. R., S. Patnaik y S. P. Rath. 1997. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Rep* 16:583–586.

Park, S. Y., H. N. Murthy y K. Y. Paek. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science* 164: 919-923.

Pan Ch. L. 2007. Marching Towards the Market: The business potencial of agricultural biotechnology in the Republic of China, pp. 89- 92. *En: Business potencial for agricultural biotechnology products*. TENG, S. P. (ed). The Asian Productivity Organization. Tokio, Japon. 89-92 pp

Pedroza M. J. y G. Y. Mican. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb. F. (Orchidaceae) under in vitro conditions. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42: 543-547.

Pedroza, M. J., L. Ch. Fernández y S. A. Suarez. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comporettia falcate* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 38-843.

Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 pp.

Ramírez J. 1996. Orquídeas de México. CONABIO. Biodiversitas. 5:1-5

Rasmussen H. 1990. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* Orchidaceae during germination *in vitro*. *New Phytologist*, 116 :137-147.

Rubluo, A., V. Chávez, A. P. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids.

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

SAS Institute Inc. 2009. JMP8 Desig of Experiments Guide, second edition. Cary NC, SAS Institute Inc. 292pp

Salazar R. V. y R. M. Mata. 2003. Micropropagación y conservación de orquídeas mexicanas en el Jardín Botánico Clavijero. *Lankesteriana* 7: 151-153.

Salgado, G. R., R. L. Ma. Suárez, Q. L. Ma. Malagón, G. A. Hernández, A. M. Revuelta, E. P. García, C. A. Mora y L. G. Chávez. 2012. Conservación y

propagación *ex situ* de las orquídeas del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio. En: Conservación de orquídeas de México (M.A.A. Téllez-Velasco, Editora y compiladora). Edit. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. pp. 53-58.

Santos-Hernández, L., M. Martínez-García, J. E. Campos y L. E. Aguirre. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. Hortscience 40: 439-442.

Sarabia-Ochoa, M. E, I. Avila-Díaz, A. Carlos-Gómez y R. Salgado-Garciglia. 2010. Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). Lankesteriana 10(1): 13-18.

Seeni S. y P. G. Latha. 1992. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). Plant Cell Tiss. Organ Cult 29: 167-172.

SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. NOM-ECOL-059-SEMARNAT, 2010.PROTECCION AMBIENTAL. Disponible en línea en: <http://www.profepa.gob.mx/NR/rdonlyres/841412613-CF26-4223-BFE9-38BE4AEB0C96/1426/NOMECOL0592010.pdf> (Se acceso 17septiembre de 2011).

Serna A. L. 1999. Propagación *in vitro* de orquídeas a partir de semilla sexual. FIT TECNIA No. 034 Genética. Universidad de Caldas, A. A. 275. Manizales, Colombia.

SIGMA. Phytamax Orchid Maintenance Médium. P6668. Sigma Aldrich.

Soto A. M. A. 1996. Regional Accounts. En: E. Hágsater y V. Dumont (eds.), Orchids –Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 53-58.

Steele W.K. 2007. Propagation protocol for ram's head lady's slipper (*Cypripedium arietinum*). Native Plants Journal. 8: 58-64.

SPSS version 18 para windows. 2009. Chiago: SPSS Inc. (programa informático en CD-ROM)."

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 7(1-2): 388-393.

Yamazaki J. y M. Kazumitsu. 2006. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). Annals of Botany 98: 1197-1206.

Vacin E. F. y F. W. Went (1949). Some pH changes in nutrient solutions. Botanical Gazette 110: 605-613.

Van der Kinderen, G. 1987. Abscisic acid in terrestrial orchid seed: a possible impact on their germination. Lindleyana 2: 84-87.

vi. DISCUSIÓN GENERAL

Cuitlauzina pendula, como muchas otras especies de orquídeas mexicanas casi han desaparecido en sus poblaciones naturales por el cambio de uso de suelo (de bosques a huertas de aguacate) y la fuerte extracción de individuos lo que ha ocasionado una gran disminución del tamaño poblacional y la extinción local de muchas de sus poblaciones silvestres (Ávila, com pers.). Por lo que el conocimiento básico de la biología reproductiva es fundamental para implementar estrategias de manejo de *C. pendula* que permitan su conservación a largo plazo. Por ejemplo es urgente en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio (PNBC), el desarrollo de frutos en el campo a través de polinizaciones manuales con exocruzamiento entre individuos compatibles, que produzcan frutos con valores altos de semillas viables, para favorecer su dispersión y el establecimiento de nuevos individuos para ayudar en la rehabilitación de esta población que se encuentra en grave riesgo local debido al posible parentesco entre los individuos de la población.

C. pendula en el PNBC, está particularmente dominada por individuos adultos lo que indica un serio problema y urge tomar medidas necesarias ante esta situación. Por lo que en este caso particular, si se sugiere la reintroducción asistida de plántulas (producto de la cruce de individuos compatibles y del mayor número de cápsulas posibles de la misma población). En base a los resultados de este estudio, se sugiere colocar dichas plántulas sobre *Q. laeta*, en la copa, en la sección intermedia, en una posición lateral o arriba de las ramas, especialmente con presencia de musgo, orientadas hacia el norte o noroeste contribuyendo en el incremento de su sobrevivencia. El manejo adecuado del hospedero *Q. laeta* es también fundamental para el establecimiento, mantenimiento y la conservación de *C. pendula* debido a la alta incidencia de individuos en este hospedero.

Es importante conocer que en base a los resultados obtenidos en esta investigación, *C. pendula* es una especie exógama o como lo reporta Torres en 2006, de sistema

de apareamiento mixto en la que predomina la exogamia, por lo que para la obtención de cápsulas útiles para su propagación *in vitro* es recomendable, llevar a cabo exocruzamientos, para la obtención de semillas viables.

En lo que respecta al desarrollo de un protocolo eficiente para la propagación *in vitro* de *C. pendula*, se considera que es útil para proveer de plántulas con las características deseadas para su posible reintroducción (de semillas procedentes de distintas cápsulas del mismo sitio o lo más cercano posible, para contribuir en la conservación de la variabilidad genética y estructura genética de las poblaciones en la naturaleza (Ávila y Oyama, 2007)). El sistema de propagación desarrollado, también contempla la obtención de PLBs en el medio T18 (0.1-0.5 mg/L de ANA/BA), lo cual abre la posibilidad de la obtención a gran escala de plantas de calidad en invernaderos donde sean cultivadas con musgo (capítulo 2 y 3), para disminuir en cierto grado, el impacto causado por la extracción de *C. pendula*. Por lo que haber logrado establecer el cultivo *in vitro* de *C. pendula*, es una aportación importante, que puede colaborar a la conservación de esta especie.

Entre otras acciones que se consideran prioritarias para la conservación de los recursos naturales, es la educación ambiental, con la que se puede crear conciencia entre la población para que no compren plantas extraídas del campo y también para que tengan conocimiento acerca del buen cultivo de esta especie, lo que puede colaborar a la conservación de las poblaciones, ya que muchas plantas adquiridas son desechadas por falta de conocimiento de su cultivo, siendo que si se cultivan por mucho tiempo, se disminuiría el saqueo de individuos de las poblaciones silvestres año, con año.

Los distintos aspectos abordados en esta investigación son integrales debido a que su sistema de apareamiento y éxito reproductivo, ecología y propagación *in vitro* aportan resultados importantes para llevar a cabo acciones urgentemente necesarias

en el PNBC con una única finalidad, el manejo adecuado de *C. pendula* que incluya su conservación.

vii. RECOMENDACIONES

Se recomienda en un futuro llevar a cabo estudios demográficos y genéticos para abordar a *C. pendula* de una manera integral y coadyuvar en su conservación.

Se sugiere continuar con el estudio de aclimatización en *C. pendula* para poder establecer un sistema completo de propagación *in vitro* y aclimatización eficiente de *C. pendula*, útil para obtener plántulas de extraordinaria calidad que pueden ofrecerse a la venta y de manera indirecta bajar la presión que se ejerce en las poblaciones naturales.

También se recomienda evaluar la adecuación de *C. pendula* a partir de de plántulas cultivadas *in vitro* provenientes de semillas de distintas cápsulas de polinización manual y natural para evaluar que tratamiento aporta el mejor desempeño (mayor adaptación, crecimiento y/o vigor de las plántulas) de las plántulas

Se recomienda que aquellas plantas de *C. pendula* que se encuentran tiradas en el bosque, sean rescatadas al levantarlas y limpiar todas aquellas partes enfermas, aplicando un fungicida y entonces colocarlas sobre *Q. laeta* en las secciones arriba mencionados de tal forma que no se mueran.

viii. LITERATURA COMPLEMENTARIA

Ackerman J. D. 1986. Doping with the epiphytic existents: pollination strategies. *Slbyana* 9: 52-60.

Barthlott, W., V. Schmit-Neuerburg, J. Nieder y S. Engwald. 2001. Diversity and abundance of vascular epiphytes: a comparison of secondary vegetation and primary montane rain forest in the Venezuelan Andes. *Plant Ecology* 152: 145-156.

Bello G. M. A. y S. X. Madrigal. 1996. Estudio florístico del campo experimental "Barranca del Cupatitzio", Uruapan, Michoacán. Folleto científico del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Benzing D. H. y M. A. Clements. 1991. Dispersal of the orchid *Dendrobiu insigne* by the ant *Iridomyrmex cordatus* in Papua New Guinea. *Biotropica* 23: 606-607.

Benzing D. H. 1995. Vascular epiphytes. En: *Forest canopies*. Lowman M. D y Nadkarni N. M (eds). Capítulo 11: 225-252.

Catling P. M. 1997. Influence of aerial Azteca nests on the epiphyte community of some Belizean orange orchids. *Biotropica* 29: 237-242.

Ceja, R. J., S. A. Espejo, F. A. R. López, C. J. García, R. A. Mendoza, G. B. Pérez. 2008. Las plantas epifitas, su diversidad e importancia. *Ciencias*: Disponible en: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=64411463006>> ISSN 0187-6376. Consultada: 17 de septiembre de 2011.

Demant A. R. y I. Silva. 1976. El Eje Neovolcánico. En: *Congreso Latinoamericano de Geología*. México. D. F. 22pp.

Dressler R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge University Press, Massachusetts, USA.

Dressler R. L. y N. H. Williams. 2003. New combination in Mesoamerican Oncidiinae (Orchidaceae). *Selbyana* 24(1):44-45.

García E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Larios, México, D. F. 252 pp.

Gentry A. W y C. H. Dodson. 1987. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 74:205–233.

Granados-Sánchez, D., G. F. López-Ríos, M. A. Hernández-García y A. Sánchez-González. 2003. Ecología de las plantas epifitas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 9 (2): 101-111.

Gómez-Reyes V. 2005. Diversidad de hongos ectomicorrízicos y su relación con diferentes unidades ambientales en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán. Tesis de Maestría. Conservación y Manejo de Recursos Naturales. UMSNH. 67pp.

Gómez-Tagle R. A. 1985. Levantamiento de suelos del Campo Experimental Forestal Barranca del Cupatitzio y sus relaciones con la vegetación de coníferas. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias, UNAM. México. 212pp.

Halbinger F. y M. A. Soto. 1997. Laelias of México. *Orquídeas. Asociación Mexicana de Orquideología A. C.*, México, D. F. 5: 1-160.

Hietz-Seifert, U., P. Hietz y S. Guevara. 1996. Epiphyte vegetation and diversity on remnant trees after forest clearance in southern Veracruz, Mexico. *Biological Conservation* 75: 103-111.

Hietz P., G. Buchberger y M. Winkler. 2006. Effect of forest disturbance on abundance and distribution of epiphytic bromeliads and orchids. *Ecotropica*.12: 103–112.

Hirata A., K. Takashi y S. Satoshi. 2009. Host trait preferences and distribution of vascular epiphytes in a warm-temperate forest. *Plant Ecol* 201:247–254.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1996. Carta topográfica 1:50 000 E13B39, Imágenes aéreas E13B29 y E13B39 esc. 1:40 000.

Jiménez, M. I., S. Sánchez y J. García-Cruz. 1998. La Familia Orchidaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. 67:1-83.

Kelly, D. L., E. V. J. Tanner, E. M. Niclughadha y V. Kapos. 1994. Floristics and biogeography of a rain forest in the Venezuelan Andes. *Journal of Biogeography* 21: 223-241.

Krömer, T., S. R. Gradstein y A. Acebey. 2007. Diversidad y ecología de epifitas vasculares en bosques montanos primarios y secundarios de Bolivia. *Ecología en Bolivia*. 42(1): 23-33.

Lapiner J. 1975. Orquídeas Michoacanas. Comisión Forestal del Estado de Michoacán.

Murren C. J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *Journal of Ecology*. 90: 100-107.

Parra-Tabla, V., C. F. Vargas, S. Magaña-Rueda y J. Navarro. 2000. Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindey (Orchidaceae) in two contrasting hábitat patches: forest vs agricultural field. *Biological Conservation* 94:335-340.

Sandoval Z., A. L. Rojas y D. V. Barrera. 2004. Evidencias anatómicas para el clado *Cuitlauzina sensu Sosa et al.* (Orchidaceae: Oncidiinae). *Memorias XVI Congreso Mexicano de Botánica*. Oaxaca, Oax.

SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2010. NOM-059-SEMARNAT 2010. PROTECCION AMBIENTAL. Disponible en línea en: <http://www.profepa.gob.mx/NR/rdonlyres/841412613-CF26-4223-BFE9-38BE4AEB0C96/1426/NOMECOL0592001.pdf> (Se acceso 17 Septiembre, 2010).

Soo, O. G., C. M. Yoon, C. S. Gi, y C. M. Gi. 2001. Contrasting breeding systems. *Liparis kumokiri* and *L. makinoana* (Orchidaceae). *Annals of Botany Fennici* 38: 281-284.

Soto-Arenas M. A. 1996. México (Regional account). En: IUCN/SSC Orchid specialist group Orchids. Status survey and conservation Action Plan, UICN. 53-58.

Soto-Arenas M. A. y G. A. Salazar. 2004. Orquídeas. En: A. García-Mendoza, M. de J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*. 271-295 pp. Instituto de Biología, UNAM–Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, México–World Wildlife Fund.

Soto, A. M. A., E. Hágsater, M. R. Jiménez y R. G. Solano. 2007. Listado actualizado

de las orquídeas de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. P107. Herbario AMO-Instituto Chinoín, A.C. y Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad-Oaxaca.

Soto-Arenas M. A. y A. R. Solano-Gómez. 2007. Ficha técnica de *Cuitlauzina pendula*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059- ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.

Tremblay, R. D., 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.

Wolf J. H. D. 2005. The response of epiphytes to anthropogenic disturbance of pine-oak forests in the highlands of Chiapas, Mexico. *For. Ecol. Manag* 212: 376–393.

Zavala-Álvarez C. 2006. Pteridoflora del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. 87pp.

Zotz G. y J. L. Andrade. 2003. La Ecología y fisiología de las epifitas y hemiepifitas. 271-291.