



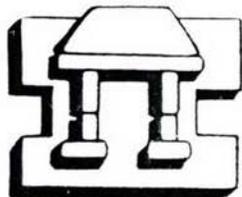
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

ESTIMACION DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA
DE LA ORQUIDEA *Laelia albida* EN EL VALLE DE
ZAPOTITLAN DE LAS SALINAS, PUEBLA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LETICIA SANTOS HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA MARTHA MARTINEZ GARCIA
LABORATORIOS BIOQUÍMICA MOLECULAR
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES. UBIPRO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO JULIO 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



U.N.A.M. CAMPUS



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por que me has permitido alcanzar una meta más en mi vida y siempre estas a mi lado aunque yo ingratamente te olvide.

A MIS PADRES

MARIA

Por tu amor absoluto y confianza, por enseñarme tu entrega y dedicación en cada meta que te propones y siempre me cuidas gracias "patita".

SANTOS

Por tu cariño incondicional y comprensión, porque dices que el desempeño demostrado es la mejor carta de uno, y has estado a mi lado gracias "pelusín".

A "Pipo" y "Pequeñuelo" por ser mis amigos, mis confidentes y mis hermanos, por los ánimos, los quiero mucho...

A Doña Celsa y Don Leobardo (solo te adelantaste), Doña Paula y Don Anselmo por tenerme paciencia

A mis tíos (as) y primos (as) de "*Yolotopes*" y de "*Tepetzintla*" (aunque algunos ya son "gueritos") por todas las patoaventuras que hemos vivido y que me han tenido que soportar

A todos los amigos por estar en la buenas y en las malas conmigo, Rocio, "Plocky", Bety, Aarón, "Bugs", Cesar, Sara, "abuela", "Fido", "Puerquito" del grupo, Lucy, Vero, Liz, Chole, Silvia, Magda de CTV, Paty, Mario, Amelia, Miguel, Jenny, Irma, Wendy, Alejandro y los chicos nuevos de LBM, Alejandro (bichito) y Roberto de IMAGEN, Adelaida, Lupita, Rosario (cuentitas) y todos los que me faltan....

A todos mis maestros de la carrera por la dedicación de su tiempo, Angeles (aunque ya no estás en la (FESI), Bety, Arnulfo, Juanita, Héctor Barrera, Margarita Canales, Rafael Lira, Edith López y Ernesto Aguirre.

Especialmente para los pobladores del Valle de Zapotitlán Salinas por la riqueza de sus valores culturales y hospitalidad



AGRADECIMIENTOS

A todas esas personas dedicadas a su profesión y que me apoyaron en el transcurso de este trabajo

Dra. Martha, bastante tengo que agradecerle como mi directora de tesis pero más como persona pues, a su lado se aprende mucho. Por la formación que me hereda, su confianza, su aprecio y por lo que queda....

Dr. Jorge, fue mi segundo guía; agradezco su disposición para aclarar las dudas que surgieron en el desarrollo de mi tesis. Por su afecto y cordialidad. Gracias doc...

Dr. Ernesto, mi tercer guía, por su apreciable contribución a mi formación gracias maestro...

M. en C. Elías Piedras, M. en C. Edith López, Dr. Oswaldo Téllez, M, en C. Lucia Pavón, Biol. Silvia Reyes, Dr. Miguel Soto, Biol. Adelaida Ocampo por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron esta investigación.

En particular a los pobladores de las comunidades por la valiosa colaboración y hacerme participe de sus conocimientos, así como por el alojamiento. A la "Panchita" en Zapotitlán; San Martín: familias Flores, Méndez, Martínez y Guevara; San Juan Raya; Los Reyes Metzontla: familia Flores; Agua Mezquite y familias de los niños Janel, Ramón y Gerardo; Santiago Acatepec: familia Rivera y de Plan de San Miguel: familias Ramírez, Méndez y Cruz. Sin su ayuda hubiese sido difícil terminar muchas gracias.....



Agradezco al Comité Científico de la Reserva de la Biosfera “Tehuacán-Cuicatlán” por los permisos y facilidades para realizar el estudio; a las autoridades del Municipio de Zapotitlán Salinas y Municipio de Caltepec”.

Agradezco al programa PAPIIT-DGAPA Proyecto **IN220599** por la beca de un año y el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación.

Este proyecto se realizó con el financiamiento del programa PAPIIT-DGAPA, proyecto **IN220599** y parcialmente con los proyectos PAPCA-FES-Iztacala y UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM.



INDICE IZT.

INDICE	.
ABREVIATURAS
RESUMEN	—
ABSTRACT	—
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III: Marco teórico	4
3.1. Variación genética	4
3.2. Detección de variación genética	5
3.3. Marcadores moleculares tipo RAPD	6
3.4. Sistemas de reproducción en plantas	8
3.5. Plantas cultivadas y domesticadas	9
3.6. Sistemas de conservación	10
IV. Biología de las orquídeas	12
4.1. Generalidades de las orquídeas	12
4.2. Germinación y viabilidad de las semillas de orquídea	13
V. Importancia del género <i>Laelia</i> en México	14
5.1. Importancia de <i>Laelia albida</i>	15
5.1.1. Características generales	15
5.1.1.1. Descripción	15
5.1.1.2. Hábitat	15
5.1.1.3. Distribución	17
5.2. Problemática	17
VI. Objetivos	20
VII. Hipótesis	20
VIII. Metodología	21
8.1. Área de estudio	21
8.2. Distribución regional	22
8.2.1. Trabajo de gabinete	22
8.2.2. Trabajo de campo	22



8.3. Detección de variación genética	22
8.3.1. Obtención de material genético	22
8.3.2. Aislamiento de ADN	23
8.3.3. Sistema de marcadores tipo RAPDs	23
8.3.4. Análisis de agrupamiento	24
8.3.5. Análisis de ordenación	25
8.3.6. Análisis estadísticos de variabilidad genética	25
8.3.7. Estimación de flujo génico	27
8.4. Establecimiento de condiciones de preservación de semillas	28
8.4.1. Método de detección de viabilidad	27
8.4.2. Germinación de semillas	29
8.4.3. Crecimiento de las semillas	30
IX. Resultados	31
9.1. Resultados de distribución regional	31
9.1.1. Distribución regional	31
9.1.2. Soportes donde crece <i>L. albida</i> en el Valle de Zapotitlán	33
9.1.3. Categoría etnobotánica y usos	33
9.1.4. Sitios de colecta de <i>L. albida</i>	36
9.2. Resultados genéticos	37
9.2.1. Detección de polimorfismos	37
9.2.2. Conformación de grupos	38
9.2.3. Análisis de coordenadas principales (PCO)	39
9.2.4. Análisis de varianza molecular (AMOVA)	42
9.2.5. Índice de Shannon	42
9.2.6. Heterocigocidad dentro de las poblaciones de los huertos y dentro de poblaciones silvestres de <i>L. albida</i>	43
9.2.7. Estructura genética y Flujo génico	44
9.3. Resultados de la calidad de las semillas en condiciones de almacenamiento	46
9.3.1. Viabilidad	46
9.3.2. Porcentaje e índice de germinación	46
9.3.3. Crecimiento de los embriones	46
X. Discusión de resultados	50
10.1. Distribución regional	50
10.2. Variabilidad genética	50
10.3. Estructuración de poblaciones	53
10.4. Flujo génico	55
10.5. Viabilidad, germinación y crecimiento de semillas en condiciones de almacenamiento	56



XI. Conclusiones	60
XII. Perspectivas de de investigación	61
BIBLIOGRAFÍA	63
APENDICES	
I. Perspectivas conservación de <i>L. albida</i>	74
II. Propuesta de inclusión de la población de <i>L. albida</i> en la MER	77
ANEXOS	82



ABREVIATURAS

AC	Acatepec
ADN	Acido desoxirribonucleico
AGM	Agua Mezquite
AMOVA	Análisis Moléculas de varianza
CHA	Cerro la Hierba Sitio A
CHB	Cerro la Hierba Sitio B
CHP	Cerro de la Hierba Sitio Peñas
CG	Cerro Gordo
Φ_{ST}, G_{ST}	F estadística de Wright parámetro de diversidad genética
KC	Medio de cultivo Knudson C
LRM	Los Reyes Metzontla
MER	Método de evaluación de riesgo de extinción de especies silvestres de México.
NOM	Norma Oficial Mexicana
PCA	Análisis de componentes principales
PRIMERS	Decanucleotidos, cebadores
PSM	Plan de San Miguel
RAPD	Amplificación al azar del ADN polimórfico
SJR	San Juan Raya
SM	San Martín
TC	Terreno Coronelas
TCM	Terreno Coronelas Malla
TTC	2-3-5 Cloruro de trifenetetrazolio



RESUMEN

Cuando la utilidad de un recurso biótico es regida tanto por sus características biológicas como por el entorno cultural, es importante emprender estrategias para la conservación de estos recursos. Un cuidado especial se requiere cuando los recursos son sometidos a colectas intensivas de individuos silvestres y/o a la perturbación del hábitat, particularmente, si éstos son endémicos de nuestro país. Tal es el caso de una población de la orquídea *Laelia albida*, conocida comúnmente como "monjita blanca", que tiene un uso tradicional en la festividad religiosa de "Todos Santos" en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Por una sobreexplotación y por cambios en el hábitat se han incluido otras especies del género *Laelia* en la NOM 059-ECOL-1994. Un estudio acerca de la situación actual de la monjita blanca, pudiera servir como un modelo natural para tratar de explicar la extinción de las especies o poblaciones. Ante esta situación, se realizó una investigación para: a) conocer la distribución regional, b) detectar la variación genética utilizando marcadores moleculares tipo RAPD y c) preservar la especie.

Para conocerse la distribución regional de *L. albida* en el Valle de Zapotitlán se recabó información ecológica, de herbario y la proporcionada por los pobladores y con esto se elaboró un mapa de distribución regional. Se aplicaron encuestas etnobotánicas para indagar sobre el grado de manejo de *L. albida*. Se aisló ADN de hojas jóvenes de 53 individuos y se seleccionaron 10 decanucleótidos (primers) de 25 explorados. Las distancias y relación genéticas se detectaron con el índice de Jaccard, UPGMA y PCO. La distribución de la variabilidad genética se determinó con el índice de Shannon (H_c) (G_{ST}) y AMOVA (Φ_{ST}). La preservación de la especie se efectuó a través del almacenamiento de semillas a 4°C evaluando constantemente la viabilidad con 2-3-5 TTC y la germinación, en 2 versiones del medio de cultivo Knudson C (SIGMA 4128 y 4003) de dos lotes de semillas.

La distribución regional encontrada de *L. albida* correspondió a la zona suroeste del poblado de Zapotitlán y el grado de manejo individual a la categoría de silvestre-trasplantado-fomentado. Se obtuvieron 202 loci polimórficos de los RAPDs, con el índice de Jaccard y UPGMA se obtuvo una $r = 0.85$, se detectó que la variabilidad genética es escasa indicada por $\Phi_{ST} = 0.303$ y $G_{ST} = 0.563$ y que el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de las poblaciones [$V(B)$] = 69.65%, (H_c) = 43.7% que entre las poblaciones [$V(A)$] = 30.35%, (H_c) = 56.2%. Estos datos sugieren que, la población se encuentra en un proceso de estructuración indicado también por el bajo flujo génico $N_e m = 0.48$. Por otra parte, se detectó una buena calidad en los dos lotes de semillas preservadas a 4°C indicada por la existencia de una viabilidad y germinación superior al 70% y crecimiento de los embriones. El medio de cultivo KC 4003 y KC 4003 suplementado con almidón de papa permitieron el mejor porcentaje de germinación y aparición de las etapas de crecimiento respectivamente.

La divergencia que existe en la población de *L. albida* tanto en su estructura espacial y genética es promovida probablemente por la manipulación del recurso y el deterioro del hábitat. Con base a esto, se requiere que se planifiquen y establezcan medidas de conservación principalmente *in situ* a fin de convertirla en un recurso sustentable y poder evitar la pérdida del germoplasma silvestre. Por otro lado se establecieron las condiciones de conservación *ex situ* de semillas pudiendo disponer de material para futuras investigaciones de propagación y reintroducción. Finalmente se propone la inclusión en la categoría de amenazada a la población de *L. albida* con respecto a la aplicación de los criterios del Método de Evaluación de Riesgo de Extinción de Especies Silvestres de México (MER) de SEMARNAT.



ABSTRACT

When the use of biotic plant resources are under the influence of either its biological characteristics, as by the cultural environment, it will be important to develop conservation strategies for these resources. Special care is required when wild resources are overexploited, particularly, if they are endemic. This scenario is the case of a population of the orchid *Laelia albida*, common name "monjita blanca". In Zapotitlán Salinas Valley, Puebla, *L. albida* has a traditional use in the religious festivity of "Todos Santos" in November. Several overexploitation and habitat changes scenarios have been evident in other species of this genera, and for this reason they are now under law protection (NOM 059-ECOL-1994). A study about the present situation of the *L. albida*, could serve as a natural model to explain the extinction of the species or populations. Therefore, the present work was done in order to: a) to know its distribution, b) to detect its genetic variation by using RAPD molecular markers and c) to preserve the species.

A *L. albida* distribution map in Zapotitlán Valley, was obtained by ecological, herb and the information provided by the people. Ethnobotanical surveys were applied to investigate the degree of manipulation of *L. albida*. DNA was isolated of youngest leaves from 53 individuals and 10 primers were selected from 25 analyzed. Genetic distances and relation were analyzed with Jaccard's index, UPGMA and PCO. The distribution of the genetic variability was determined with Shannon's index (H_e) (G_{ST}) and AMOVA (Φ_{ST}). The species seeds were preserved by storage at 4°C two different seeds lots, and constantly evaluating the viability with 2-3-5 TTC and the germination using two versions of Knudson C culture media (4128 and 4003).

The regional distribution of *L. albida* found, corresponds to the southwestern zone of Zapotitlán, and are considered in the wild-transplanted-fomented category. 202 polymorphic loci were obtained from the RAPD analysis. A low genetic variability was detected as it was indicated by $\Phi_{ST} = 0,303$ and $G_{ST} = 0,563$. A greater variation was found within populations $V(B) = 69,65\%$, (H_e) = 43,7 % than between populations $V(A) = 30,35\%$, (H_e) = 56,2 %. These data suggest that the population is structured, also this was indicated by a low genetic flow $N_e m = 0,48$. On the other hand, a good preservation quality in both lots of seeds at 4°C was detected indicated by the presence of viability and a germination rate greater than 70 % and embryos growth. The culture medias KC 4003 and KC 4003 supplemented with potato starch, allowed the best percentage of germination and the better reach of the growth stages respectively.

The differences in spatial and genetic structure of the population in *L. albida*, is probably promoted by its manipulation and by habitat disturbance. Due to this, it is required the planning and establishment of *in situ* conservation measures, in order to made it a sustainable resource and to avoid the loss of it germplasm in the wild. On the other hand, the *ex-situ* seeds conservation conditions established were able to obtain material to future investigations of propagation and re-introduction. Finally, in the present work we proposed the inclusion of the population of *L. albida* in the category of threatened species populations, after the application of the Risk Extinction Evaluation Method for Wild Species from Mexico (MER) from SEMARNAT.

I. INTRODUCCIÓN

La constante interacción de factores negativos como los cambios climáticos y edáficos, la explotación forestal excesiva, el desmonte para fines agrícolas y/o ganaderos y la urbanización, en conjunto, han acelerado la pérdida de la biodiversidad. Uno de los grupos de plantas cuyo hábitat está en continuo deterioro, es la familia Orchidaceae las que, por la singularidad y belleza de sus flores son susceptibles de sufrir sobreexplotación o saqueo. Como consecuencia de esa vulnerabilidad, varias especies de orquídeas mexicanas se encuentran en los listados de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, la cual categoriza a las especies con respecto a su riesgo de extinción. Por lo antes indicado, actualmente, existe gran auge de la planeación de estrategias de conservación hacia esta familia por parte de especialistas y el interés es mayor cuando las especies son endémicas, además, que al crear prácticas alternas del potencial de aprovechamiento de los recursos se promueve el uso y manejo racional de estos en el entorno cultural en que se ubican y que finalmente es conocimiento tradicional hacia los recursos que también se conservan.

Una disciplina que fundamenta las decisiones de conservación de los recursos naturales es el estudio de la genética de poblaciones, en la que se tiene como punto principal la descripción de los niveles de diversidad genética que se presentan dentro y entre las poblaciones naturales, ya que se puede entender cómo las poblaciones perseveran adaptándose y evolucionando (Schmitt *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 1997; Eguiarte y Piñero, 1990), por lo que es muy importante mantener su diversidad genética original o silvestre, para asegurar la existencia misma de estas, pues la pérdida de la variación genética puede reducir la capacidad de las poblaciones a adaptarse a cambios en el ambiente (Hamilton, 1982, citado por Sharma *et al.*, 2000). Existen varios factores que reducen la variación genética y uno de estos es por la manipulación y subsecuente domesticación de las especies (Sun y Wong, 2001; Sun, 1997; Chan y Sun, 1997; Casas *et al.*, 1997).



Los niveles de variación genética en las poblaciones, de plantas cultivadas como silvestres, son detectados con la aplicación de sistemas de marcadores moleculares (Ayad, 1997; Chakraborty y Bogemans, 1997; Mackill *et al.*, 1996; Maugehan *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1995; Adams y Adams, 1991). El potencial benéfico de usar técnicas moleculares da la probabilidad de realizar proyectos individuales de conservación de recursos genéticos, incrementando el uso de diferentes metodologías actualmente disponibles como la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD), el análisis de ésta técnica proporciona información sustancial de la variación genética total de las poblaciones y se puede determinar cuáles ameritan ser conservadas y coleccionadas en bancos de germoplasma (Del Río *et al.*, 2001; Xu, R-Q *et al.*, 2000; Ayad, 1997; Jahuar, 1996; Adams y Adams, 1991). Además, es una técnica práctica y eficiente, por lo que puede ser herramienta útil en la conservación de diferentes especies, incluidas las orquídeas (Guadagnuolo *et al.*, 2001; Sun y Wong, 2001; Sharma *et al.*, 2000; Wong y Sun, 1999, Ayad, 1997; Jauhar, 1996; Kang Fu Yu *et al.*, 1993).

Dentro de la orquideoflora mexicana se reportan 144 géneros y 11 son endémicos, entre estos, se encuentra el género *Laelia* que incluye especies bellas y con un uso tradicional arraigado en varios grupos étnicos (Halbinger y Soto, 1997; Soto, 1988). Una de estas especies es *Laelia albida*, la cual presenta una amplia distribución, por lo que no parecería estar en riesgo, creciendo en ambientes templados, sin embargo en algunos sitios de Sinaloa, Oaxaca y Puebla crece en ambientes contrastantes siendo de características semiáridas, además se ha detectado que las poblaciones silvestres han disminuido a causa de las colectas intensivas y la perturbación del hábitat y que por causas similares dos especies de *Laelias* están enlistadas en la NOM-059-ECOL-1994. Por lo que se decidió estudiar la variación genética de una población de *L. albida* que crece en el valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, para tratar de entender su adaptación a los ambientes semiáridos y como un modelo natural para tratar de explicar el proceso de desaparición de las poblaciones. Todo esto con la finalidad de aportar información encaminada a la creación de estrategias eficaces de conservación y manejo sostenible de un recurso dentro de un valle donde el conocimiento tradicional es substancial también para el diseño de estas estrategias.



II. ANTECEDENTES

Diversos estudios encaminados a la conservación de orquídeas han abordado la ecología, morfofisiología, la germinación simbiótica y asimbiótica y en mucho menor grado la variación genética de especies terrestres y epífitas (la mayoría de interés comercial) de Norteamérica, Europa y Australia.

Muchas especies de orquídeas han sido exitosamente cultivadas *in vitro* a partir de la formulación de un medio de cultivo por Knudson (1922) quien logró la germinación masiva de un híbrido y de especies en forma asimbiótica demostrando que compuestos como los minerales y sobre todo azúcares estimulaban la germinación. También se han desarrollado estudios sobre germinación asimbiótica empleando diversos medios, tales como, Murashige y Sookg, Vacin-Went, Thomale, Thompson, etc., con o sin complementos como agua de coco, plátano, fitohormonas y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, contribuyendo al conocimiento de la morfofisiología de la germinación en orquídeas (Takahashi *et al.*, 2001; Shoushtari *et al.*, 1994; Hoshi, 1994; Pritchard, 1993; Rublo *et al.*, 1993; García, 1993; De Pauw y Remphrey, 1992; Seaton y Hailes, 1989; Pierik *et al.*, 1988; Yam y Weatherhead, 1988; Sharma y Tandon, 1987; Van Waes y Debergh, 1986; Harrison y Arditti, 1978).

Se han realizado investigaciones en las cuales el uso de marcadores moleculares en orquídeas inciden en estudios filogenéticos, de identificación taxonómica y de caracteres introducidos a variedades con resistencia a plagas y patógenos. También mediante el uso de marcadores moleculares como los ITS 1 e ITS 2 se identifican los polinizadores específicos de algunas especies de orquídeas (Widmer *et al.*, 2000). Los estudios de variación genética con fines de conservación de especies de orquídeas, son escasos y en ellos se ha hecho uso de marcadores como RFLPs, isoenzimas y RAPDs (Hedré *et al.*, 2001; Szalanski *et al.*, 2001; Sun y Wong, 2001; Sharma *et al.*, 2000; Alexandersson y Agren, 2000; Wong y Sun, 1999; Arft y Ranker, 1998; Arduino, 1995; Sun, 1997; Case, 1994).



En nuestro país, casi no hay estudios que aborden la variabilidad genética en la conservación de orquídeas. Cibrian (2000) encontró gran divergencia genética entre las poblaciones de *Vanilla planifolia* y poca variación genética en poblaciones silvestres, por lo que señala que es urgente desarrollar métodos de conservación *ex situ* como los bancos genéticos de campo a través de plantaciones o huertos semilleros, el almacenamiento de tejidos como callos o células en suspensión y la crioconservación de semillas, así como desarrollar programas de mejoramiento genético en las plantaciones. Soto (2001) menciona la necesidad de preservar la diversidad de las especies de orquídeas en su hábitat natural y de una alternativa de propagación *ex situ* de viveristas y campesinos con fines de mejoramiento hortícola, para disminuir la presión hacia las plantas silvestres y señala que la inclusión de especies en los listados de riesgo de extinción desalentarían la utilización del recurso de una manera sostenible.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. VARIACIÓN GENÉTICA

Se entiende por variación genética a las diferencias en la constitución genética de los individuos de una población. La extensión y distribución de la variación genética, en una población, es el resultado de la interacción entre las denominadas “fuerzas evolutivas”: mutación, migración, selección y deriva génica. La mutación y la migración (flujo génico) tienden a incrementar la variación genética, mientras que la selección y la deriva génica la disminuyen. (Navarro, 1999; Eguiarte y Piñero, 1990).

Cuando en una población ocurren cambios sistemáticos en las frecuencias génicas por efecto de las distintas fuerzas evolutivas, se produce una diferenciación genética entre varias poblaciones o en una población, por lo tanto se dice que se altera la estructura genética poblacional y una población estructurada puede evolucionar de manera distinta respecto a una no estructurada. En la mayoría de las poblaciones estructuradas no existe el apareamiento al azar, es decir, se produce endogamia, porque algunas subpoblaciones se aparean con las más cercanas, por lo tanto la población se subdivide en grupos genéticamente más parecidos entre sí. La estructura genética



poblacional se ve afectada por el tamaño, el número y la edad de los individuos efectivos que contiene cada población (Hartl y Clark, 1989. Citado por Navarro *et al.*, 1999).

3.2. DETECCIÓN DE VARIACIÓN GENÉTICA

La aplicación y el análisis de marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética proporcionan información de la cantidad y distribución de variación genética en las poblaciones (Ayad, 1997; Jauhar, 1996). Desde hace dos décadas, los marcadores moleculares han sido herramienta fundamental, ya que se han utilizado para establecer filogenias, identidad de genes (introgresión a nuevas variedades), determinación de similitud entre individuos consanguíneos y mapeo genómico de plantas (Vekemans y Jacquemart, 1997). También proporcionan una visión de los patrones de reproducción en las poblaciones vegetales y de los mecanismos de pre y postpolinización que contribuyen en estos patrones (Cruzan, 1998). Por lo tanto el grado y tipo de variación depende de la parte del genoma en estudio con respecto al tipo de marcadores moleculares. Es así, que se han desarrollado varios métodos como el uso de isoenzimas, el uso de enzimas de restricción o los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las isoenzimas fueron los primeros marcadores moleculares usados para la estimación de variación, los polimorfismos son el resultado a partir de cambios en la secuencia codificante de la proteína. No obstante solo revelan una parte de la variación en secuencias conservadas de ADN. Los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP's) se basan en las diferencias de fragmentos largos obtenidos de la digestión de ADN con endonucleasas denominadas enzimas de restricción, los polimorfismos son debidos a la presencia o ausencia de los sitios de restricción en el genoma de los individuos comparados. Los RFLP's se han utilizado en la elaboración de mapas genómicos, en el establecimiento de vinculación de características, el desarrollo de árboles filogenéticos, y la tipificación de cromosomas. Sin embargo la detección de RFLP's con southern blott es laborioso y el procedimiento requiere radioactividad. Las isoenzimas y RFLP's tienen la ventaja de ser fenotípicamente neutrales y codominantes (Hartl, 1999; Vekemans y Jacquemart, 1997)



Los métodos basados en la PCR, detectan variación codificante y no codificante del genoma de las especies en estudio. Un primer método es el que ha sido utilizado para analizar sitios polimórficos de restricción, eventos de delección e inserción, secuencias de repetidos en tandem y bases por sustitución a partir de secuencias de polimorfismos amplificados (ASP) (Vekemans y Jacquemart, 1997; Kan Fu Yu *et al.*, 1993). Una segunda técnica se refiere a los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) que combina PCR y análisis de fragmentos de restricción para detectar polimorfismos cerca de sitios de enzimas de restricción, con esta técnica se detectan múltiples loci polimórficos y son útiles para generar huellas genéticas o para mapeo, la desventaja es que son de costo elevado (Simpson, 1997). Una tercera técnica se refiere al sistema molecular de Amplificación al Azar del ADN Polimórfico (RAPD) el cual ofrece ventajas en la velocidad y simplicidad en la frecuencia de identificación de polimorfismos. (Guadagnuolo *et al.*, 2001; Ayad 1997; Jauhar 1996; Nembory y Ford-Lloyd, 1992).

3.3. MARCADORES MOLECULARES TIPO RAPD

Los RAPD's detectan mejor los niveles de variación dentro de las poblaciones en comparación con isoenzimas, por que los marcadores RAPD detectan diversidad fenotípica, más que diversidad alélica y enfatizan más las diferencias entre poblaciones (Vekemans y Jacquemart, 1997; Kan Fu Yu *et al.*, 1993).

Los RAPD's son una variación de la PCR, fundamentada en el mecanismo molecular de la replicación del ADN desarrollada por Williams *et al.* (1990). Se basa en la acción de la enzima ADN polimerasa amplificando segmentos aleatorios del ADN templado a partir de primers con secuencias conocidas cortas de 10 nucleótidos, un solo primer funciona para la amplificación de ambas cadenas de ADN (Ayad, 1997; Jauhar, 1996; Lynch y Milligan, 1994; Kang Fu Yu *et al.*, 1993).

La ausencia de la amplificación de un fragmento de RAPD puede ser debido a cambios en los sitios de alineación del primer con el ADN templado ocasionados por delección o inserción de nucleótidos y otro tipo de mutaciones que dan lugar a los



polimorfismos (Jauhar, 1996). En la técnica se requiere del ADN que se desee amplificar, una enzima termoestable: la *Taq polimerasa*, originalmente aislada a partir de bacterias que viven en manantiales de agua caliente (*Thermus aquaticus*), $MgCl_2$ como cofactor de la enzima, primers y nucleótidos libres (Otero *et al.*, 1997; Kang Fu Yu *et al.*, 1993; Nembury y Ford-Lloyd, 1992)

Cada ciclo de amplificación pasa por tres cambios de temperatura: 1) La doble hélice de ADN se desnaturaliza a $94^\circ C$. 2) A $37^\circ C$ se efectúa la alineación de los primers a uno o varios sitios de la cadena desnaturalizada. 3) Se eleva la temperatura a $72^\circ C$ donde la polimerasa alarga las nuevas hebras de ADN a partir de los primers, uniendo nucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Se dispone entonces de dos nuevas copias del fragmento. En el ciclo siguiente estas nuevas hebras servirán de molde para la polimerasa. De este modo se obtienen 2^n fragmentos después de n ciclos. Por lo tanto el aumento del número de moléculas es exponencial (Otero *et al.*, 1997; Jauhar, 1996; Kang Fu Yu *et al.*, 1993; Nembury y Ford-Lloyd, 1992).

Los productos de la amplificación son separados por electroforesis en geles de agarosa, y revelados con bromuro de etidio. Teóricamente los productos individuales representan un alelo por locus (Allnutt *et al.*, 1999). Las mutaciones que inhiben el alineamiento del primer o que de alguna forma previenen la amplificación son detectadas por la ausencia de fragmentos amplificables de ADN, la secuencia corta del primer es susceptible de identificar regiones de la cromatina que están presentes en un solo cromosoma de un par homólogo, debido a esto, los marcadores RAPD son dominantes porque solamente el alelo + (banda presente) es suficiente para permitir la amplificación por lo tanto no se puede distinguir con el análisis de estos marcadores entre el genotipo homocigoto $+/+$ del genotipo heterocigoto $+/-$ (Piepho, 2001; Hartl, 1999; Jauhar, 1996). Por la misma naturaleza de los RAPD's Lynch y Milligan (1994) mencionan que se requieren muestrear más individuos y loci, recientemente Krauss (2000) ha demostrado que el número de individuos no necesariamente debe ser grande si se obtienen muchos loci o bandas.



Las ventajas de los análisis con RAPD's, es que revelan altos niveles de polimorfismo dentro y entre poblaciones de especies en comparación con RFLP's o isoenzimas, no requieren conocimiento previo de la secuencia de ADN, el número de loci que pueden ser examinados es ilimitado y además no requieren de pruebas radioactivas (Reiter *et al.*, 1992; Van Heusden y Bachmann, 1992).

Se han detectado problemas prácticos como la presencia de bandas erróneas o artefactos, la reproducibilidad de los resultados y la comigración de bandas (Raboam *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1998). Estas desventajas pueden disminuirse, en primer lugar, verificando que el contenido de G + C de los primers no sea mayor del 60%, evitando alineaciones del primer con segmentos que no son 100% homólogos. La reproducibilidad y confiabilidad de los resultados puede obtenerse si se establecen de manera precisa cada una de las condiciones, tanto de la reacción de amplificación como de la electroforesis (Raboam *et al.*, 1999; Nembury y Ford-Lloyd, 1992).

3.4. SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN EN PLANTAS

En las plantas, las formas de vida, la distribución geográfica, los mecanismos de dispersión de las semillas y polen, así como los sistemas de reproducción también determinan los niveles de diversidad en las poblaciones. La constitución genética dentro y entre poblaciones propagadas asexualmente tiende a permanecer constante e igual a la de los progenitores, las plantas perennes tienden a presentar mayor variación que las anuales, especies ampliamente distribuidas deben tener mayor variación que especies de distribución restringida, especies amenazadas deben tener menor variación que especies no amenazadas (Cibrian, 2000; Frankham, 1996; Eguiarte y Piñero, 1990).

Los eventos de reproducción sexual son conducidos por el comportamiento de los polinizadores y los procesos de pre y post-polinización. La composición genética de las semillas producidas depende de la composición del polen y de la acción de los procesos de post-polinización. (Cruzan, 1998). El flujo génico vía polen y dispersión de semillas, son lo mayores contribuyentes de diferenciación genética (Loveless y Hamrick, 1984). De esta manera, el flujo génico puede causar un cambio adaptativo potencial en



la frecuencia de genes y teóricamente está inversamente relacionado con el grado de estructura que se desarrolla en la población, contrariamente a lo que puede ocurrir en la reproducción asexual en la que no existe el flujo génico, pues ésta se realiza por división vegetativa, producción de brotes vegetativos, apomixis, etc. (Cruzan, 1998) (Hartl y Clark, 1989; Slatkin y Barton, 1989. Citados por Montalvo, 1997).

3.5. PLANTAS CULTIVADAS Y DOMESTICADAS

A largo plazo, la variación genética de las poblaciones naturales de plantas se reduce por los efectos de cualquier tipo de manipulación, que por su utilidad el hombre percibe como recursos, porque afecta la distribución geográfica de las poblaciones de las especies y se promueve la generación de nuevas poblaciones sobre las que la selección natural operará de manera tal vez un tanto diferente que con las poblaciones silvestres y se favorecerán plantas cada vez más adaptadas a las condiciones de los nuevos hábitats (Casas *et al.*, 1997; Villalobos, 1994; Koerdell *et al.*, 1979).

En términos etnobotánicos, no es lo mismo hablar de una planta domesticada y una cultivada. Una planta cultivada no se modifica genéticamente como una domesticada debido a que cultivar significa llevar a cabo actividades involucradas en el cuidado de la planta tales como arar y fertilizar el suelo donde crece, deshierbar a su alrededor para disminuir la competencia, regarla, protegerla, etc. Una planta domesticada es aquella que el hombre ha modificado genéticamente (sometida a selección tradicional) a través de largos procesos, la ha llevado a su medio ambiente para que le sea de alguna utilidad y la cual dependerá enteramente de él para su subsistencia (Casas y Caballero, 1995; Villalobos, 1994), sin embargo, ambas actividades reducen la variación genética presente en una población.

La domesticación es el proceso entendido como la respuesta genética de las plantas al tratamiento o manejo diseñado por el hombre para adecuarse a sus necesidades y preferencias (selección artificial) en donde la subsistencia de las plantas dependerá completamente del hombre. Existen pues una serie de condiciones necesarias para domesticar a una planta lo cual requiere de mucho tiempo, es decir, es resultado de un

proceso evolutivo en donde las relaciones hombre-planta han sido graduales, continuas y cada vez más estrechas (Casas y Caballero, 1995; Gary, 1995; Given y Harris, 1994).

3.6. SISTEMAS DE CONSERVACIÓN

En el contexto del manejo de conservación los marcadores moleculares han sido usados para integrar información genética de especies de plantas en peligro de extinción, así como los niveles y distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones naturales (Hamrick *et al.*, 1991).

La genética de la conservación ha expandido sus alcances a tal grado que las técnicas moleculares, entre ellas los RAPD's, son utilizadas para priorizar poblaciones que serán enlistadas y protegidas y que se pueden coleccionar en bancos de germoplasma (Golstein *et al.*, 2000; Nembory y Ford- Lloyd, 1992; Eguiarte y Piñero, 1990). Es importante considerar aspectos sistemáticos, ecológicos y evolutivos que permitan jerarquizar y establecer prioridades para que las metas de protección y manejo puedan ser alcanzadas efectivamente. Esto es, desde entender la historia de vida, sistemas reproductivos, migraciones, jerarquías, interacciones con otras especies, evaluación de los niveles de variación, tamaños efectivos de la población hasta distribución geográfica (Golstein *et al.*, 2000; Bowen, 1999; Nembory y Ford- Lloyd, 1992; Eguiarte y Piñero, 1990).

Petit *et al.* (1998) proponen que la prioridad de conservación se enfoque en medidas de riqueza alélica, mencionan que la contribución de cada población a la diversidad total puede ser repartida en dos componentes, el primero esta relacionado con el nivel de diversidad de la población y el segundo con su divergencia de las otras poblaciones, por lo tanto la singularidad de una población (composición alélica) puede ser tan importante como lo es su nivel de diversidad.

A fin de mantener la variabilidad genética de una especie, es fundamental la conservación *in situ* donde los organismos continúan los procesos de adaptación y evolución en condiciones naturales. Existen también sistemas de conservación *ex situ*



donde como el término lo indica, la finalidad es preservar, es decir, que pasan a un medio distinto de aquel en el cual evolucionaron, como en los bancos de germoplasma y jardines botánicos o sitios ecoturísticos (Ortega, 1992; Eguiarte y Piñero, 1990).

Una parte esencial de sistemas *ex situ* como los bancos de semillas o almacenamiento a largo plazo a bajas temperaturas y con una humedad relativa del ambiente de 45%, es la ejecución de pruebas cuantitativas de germinación y crecimiento, las cuales establecen la viabilidad y longevidad de una muestra de semillas y aportar así conocimiento respecto su capacidad de sobrevivencia. Condiciones idóneas de este tipo de conservación permiten minimizar el envejecimiento, evitar la destrucción del material por factores bióticos y abióticos, disminuir la pérdida de viabilidad y disponer de material para la reproducción e investigación de germoplasma silvestre. (Way *et al.*, 2000; Linington y Pritchard, 2000; Shoushtari *et al.*, 1994; Ortega, 1992; Moreno, 1984).

Otro sistema *ex situ* es el cultivo de tejidos vegetales, el cual se basa en la totipotencialidad celular para la generación de plantas completas a partir de una sola célula, se utilizan técnicas que controlan relativamente los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos de los tejidos (Kozai *et al.*, 1997; Rojas 1995; Abdelnour y Vicent, 1994; Pierik, 1990). En este sistema el mantenimiento de células, tejidos u órganos ocurre en envases de vidrio (*in vitro*) en un medio artificial nutritivo que minimiza el crecimiento de la plántula o tejidos. (Kishi y Takaji, 1997; Shoushtari *et al.*, 1994; Rublo *et al.*, 1993). El material biológico puede preservarse en forma de plántulas obtenidas a través de semillas y explantes meristemáticos, estos últimos son tejidos de crecimiento que permiten una estabilidad genética en los cultivos. (Abdelnour y Vicent, 1994; Pierik, 1990).

La importancia económica y sociocultural de las especies, contribuyen también a la conservación de un recurso. Información de la diversidad genética y el vínculo dentro y entre especies cultivadas es esencial para la eficiente utilización de colecciones de los



recursos genéticos vegetales silvestres (Chan y Sun, 1997) y coadyuva al manejo y sustentabilidad de los recursos renovables.

IV. BIOLOGÍA DE LAS ORQUÍDEAS

4.1. GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

La familia Orchidaceae pertenece a la clase de las monocotiledóneas. La estructura floral de las orquídeas es el resultado de largos periodos de evolución, por lo que las flores se han adaptado a través de la selección natural a sus agentes polinizadores que son en gran medida específicos, entre estos se encuentran las abejas y las avispas, esto aunado a las características morfológicas como la fusión de estructuras masculinas y femeninas, constituyen rasgos que ayudan a evitar la autopolinización en algunos de los grupos más avanzados dentro de la familia de las orquídeas (Luna y Barba, 1995; Arditti, 1992; Dressler, 1981).

El arreglo de las flores consiste en tres partes externas llamadas sépalos y tres internas o pétalos. Los dos pétalos superiores son idénticos, mientras que el inferior que es el labelo suele tener su propia forma y coloración, con crestas adornadas, rebordes, flecos, cuernos u otros rasgos. De esta forma se constituye la gran diversidad de flores y coloridos que muchas especies de orquídeas presentan y por ello se han vuelto altamente vulnerables ante la comercialización humana (Dressler, 1985). Las orquídeas tienen dos patrones de crecimiento, el simpodial y el monopodial. El más común es el crecimiento simpodial, que tiene varios tallos o pseudobulbos que brotan de un rizoma, que, a su vez, es un tallo modificado, cada año, se origina un tallo nuevo. Las plantas monopodiales tienen un único tallo principal que no origina otros nuevos desde su base, pero que va añadiendo hojas nuevas hacia arriba. Muchas especies de orquídeas son terrestres (enraizadas en la tierra), otras epífitas (que crecen sobre los tallos de otras plantas) y el resto litófitas (que crecen en la superficie de una roca) (Dressler, 1985). El ciclo de vida de las orquídeas es lento, tardando varios años para desarrollar una planta, madurar y llegar a florecer y durante los primeros años la planta es vulnerable a factores bióticos y abióticos (Arditti y Abdul, 2000; Pierik *et al.*, 1988; Dressler, 1981).



4.2. GERMINACIÓN Y VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEA

Las semillas de orquídeas miden 0.05-6.0 mm y se producen en gran cantidad, son relativamente indiferenciadas, sin cotiledones y con escasa reserva alimenticia (sin endospermo). En su ambiente natural para efectuar el proceso de germinación requieren una simbiosis micorrizógena, sin embargo, estas semillas contienen una inclusión aceitosa que puede ser suficiente para la respiración pero no para desarrollarse (Arditti y Abdul, 2000; Luna, 1982). Harrison y Arditti (1978) mencionan que las semillas al carecer de cotiledones y endospermo no tienen la capacidad de convertir estos lípidos en carbohidratos lo que explica el requerimiento de una fuente exógena de carbohidratos en ellas. Este carácter fue tomado en cuenta por Knudson, desarrollando en 1922 un medio de cultivo asimbiótico relativamente sencillo en el que incorporó sacarosa como fuente de carbono y que permitió la germinación asimbiótica.

La germinación de las orquídeas, como en otras especies, marca la transición del estado del embrión latente a una forma metabólicamente activa en donde se producen eventos como el aumento de la tasa de respiración, la síntesis de enzimas y ácidos nucleicos, la división celular e hidratación de proteínas, estos eventos dependen de la luz, el agua y la temperatura. El proceso de germinación se inicia con la imbibición (movimiento del agua al interior del embrión), produciendo un aumento de volumen que rompe la testa al formarse una estructura esférica denominado protocormo. A partir del agregado de células, del protocormo se puede distinguir un meristemo, el vástago en la parte superior, y por otro lado los rizoides (Shoushtari *et al.*, 1994; Pritchard, 1993; García, 1993; Arditti, 1992; Van Waes y Derbergh, 1986).

La viabilidad en las semillas se define como la capacidad potencial que tienen estas para germinar y formar plántulas normales, las semillas viables en condiciones adecuadas que no germinan se dice que están latentes y esta latencia puede deberse a inmadurez fisiológica del embrión, impermeabilidad de la testa a la entrada de agua o gases, requerimientos específicos de luz o temperatura, o bien a la presencia de sustancias inhibitorias de la germinación. (Shoushtari *et al.*, 1994; Seaton y Hailes, 1989; Bewley y Black, 1983; Van Waes y Derbergh, 1986; Moreno, 1984). En las semillas de



orquídeas puede determinarse la viabilidad utilizando el método de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) modificado por Van Waes y Derbergh (1986).

V. IMPORTANCIA DEL GENERO *Laelia* EN MÉXICO.

Este género cuenta con un total de 11 especies y es endémico de nuestro país, encontrándose en una gran variedad de nichos ecológicos (Halbinger, 1993). Tradicionalmente, especies como *L. albida*, *L. anceps*, *L. gouldiana*, *L. autumnalis* y *L. furfuracea*, han sido cultivadas y apreciadas por los distintos grupos humanos de México y sus flores han sido utilizadas durante siglos como ofrendas en las festividades de “Día Muertos”. De allí, los nombres comunes de algunas especies: “calaverita”, “lirio de todos santos”, “flor de muerto”, “flor de las ánimas, etc. Otras especies que florecen en distintos meses del año, se relacionan con otras festividades populares tales como el “Día de las Madres”, el de la “Virgen de Guadalupe” y fiestas patronales de los pueblos. En varias de nuestras ciudades, se venden en los mercados flores silvestres de *Laelias*, generalmente a precios muy bajos (Halbinger y Soto, 1997). Además de su importancia ornamental, antiguamente se extraía, de este grupo de plantas, un mucilago de cualidades adhesivas utilizado en el arte plumario prehispánico y la confección de figuras religiosas de caña (Martínez, 1970).

De esta forma, la percepción de los usos de las plantas, como las costumbres y el significado de las palabras, ocurren de acuerdo con las necesidades de los grupos culturales. Las interacciones hombre-planta se dan, entre otras, con las especies de utilidad ornamental, dándose en algunas el elemento mágico-religioso, como con las *Laelias* de México. La desaparición de los recursos vegetales silvestres por lo tanto conlleva también a la desaparición de las tradiciones ligadas a ellos (Bassols, 1982; Koerdell *et al.*, 1979).



5.1. IMPORTANCIA DE *Laelia albida* (Bateman ex Lindley)

5.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

5.1.1.1. DESCRIPCIÓN

Laelia albida (Fig. 1), es una planta epífita, y escasamente litófito. Las raíces son cilíndricas de color café pálido, tienen un grosor de 1.5-2.3 mm. El Rizoma es corto y comprimido dorsoventralmente. Los pseudobulbos son ovoides con 4 internodos. Las hojas son lineares, acuminadas y coriáceas, miden 7-27 x 0.9-2.2 cm, de 1-3 hojas por pseudobulbo. La inflorescencia mide de 10-90 cm de altura, presenta varios internodos pequeños y ostenta un racimo de 5-12 flores. Las flores son pequeñas con un diámetro de 2.5-4 cm, poseen una recia fragancia dulce, la textura es fuerte y duran abiertas en la planta de 10-15 días. Los sépalos son lanceolados, ambos son de color blanco o cremoso y los pétalos son ovoides o rómbicos. El labelo tiene 3 lóbulos ligeramente ondulados, es cremoso, rosado o rosa fuerte. La columna es blanquecina con 3 quillas paralelas de color amarillo y en la parte ventral tiene rayas púrpura. Los polinios son 8 y de color amarillo, tienen forma rectangular. La cápsula es dehiscente, pequeña con 3 quillas sobresalientes, mide de 2-3.5 cm. La época de floración comprende de septiembre a diciembre (Halbinger y Soto, 1997; Halbinger, 1993).

5.1.1.2. HÁBITAT

Las plantas crecen sobre árboles, preferentemente encinos y juniperos, incluso sobre yucas, y algunas veces sobre rocas, a altitudes de 1400-2300 m.s.n.m. En bosques de pino (*Pinus herrerae*, *P. teocote*), encino (*Quercus magnolifolia*, *Q. scytophylla*, *Q. elliptica*) y juniperus en lugares abiertos, secos y caducifolios (Halbinger, 1993).



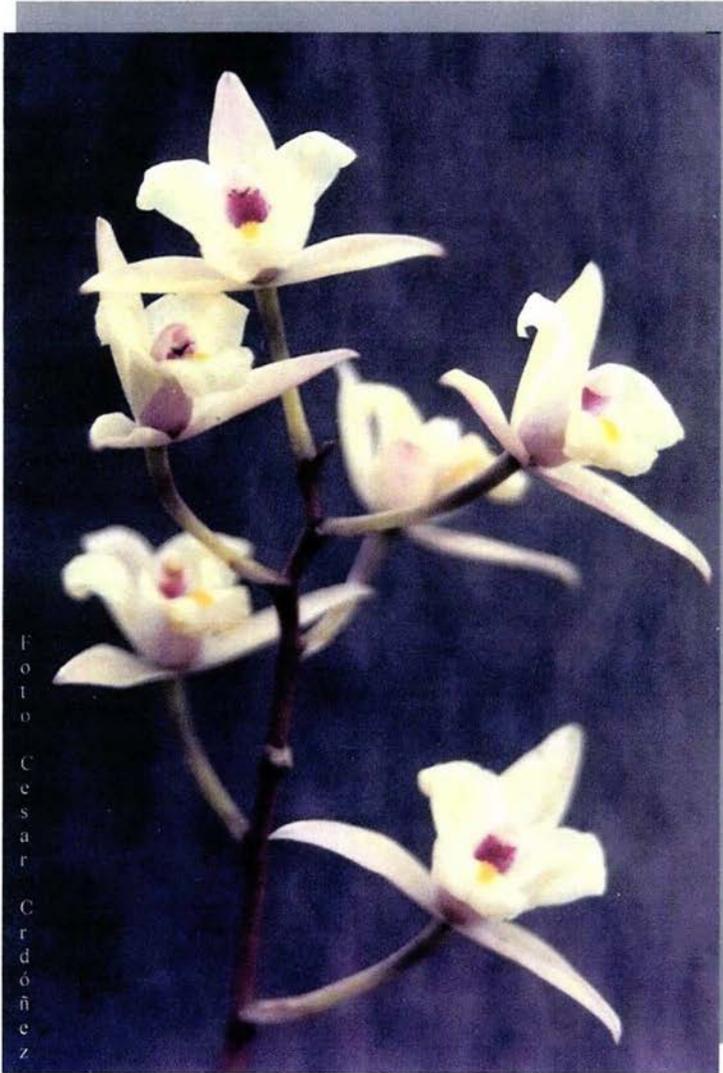


Figura 1. Inflorescencia de *Laelia albida*

5.1.1.3. DISTRIBUCIÓN

L. albida es una especie endémica de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre del Sur. Habita un territorio sumamente extenso, ya que se ha encontrado en Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Puebla (Fig.2). Se encuentra registrada para Valle de Tehuacán- Cuicatlán (Halbinger y Soto, 1997; Halbinger, 1993)



Figura 2. Distribución geográfica de *Laelia albida*

5.1.2. PROBLEMÁTICA

Dentro de la Reserva de la Biosfera “Valle de Tehuacán-Cuicatlán” considerada como un centro de megadiversidad y endemismo a nivel mundial, se incluyen a siete grupos étnicos indígenas que ejercen diferentes formas de uso y manejo sobre la riqueza de recursos vegetales (Casas *et al.*, 2001), en la porción occidental de la Reserva se ubica el Valle de Zapotitlán Salinas, en el que se encuentran alrededor de 15 especies de ¹orquídeas (epífitas y terrestres) (Dávila *et al.*, 1993). La especie *Laelia albida*, conocida comúnmente como "monjita blanca", tiene un significado cultural importante entre el grupo étnico siendo utilizada como planta de ornato y ceremonial en las festividades de Todos Santos. Pese a la protección que pueda brindarse a una especie localizada en una reserva, el uso tradicional ha promovido colectas intensivas de este recurso vegetal, una

^(P*) endémica en peligro de extinción



parte de estas colectas, se encuentran en huertos familiares y/o rancherías como planta recolectada y semicultivada. Al mismo tiempo, otros factores influyen en la reducción de las poblaciones silvestres como son: el desprendimiento natural de las plantas de sustratos rocosos o arbóreos, la formación escasa de semillas (observación personal) y la perturbación del hábitat ocasionada por aridificación natural y por efecto de actividades como agricultura de temporal, pastoreo y deforestación (Valiente-Banuet *et al.*, 2000; 1995,).

L. albida es una especie endémica de México con una amplia distribución desde Sinaloa hasta Oaxaca y Puebla por lo que no parecería estar en riesgo; sin embargo, por un proceso similar al descrito antes, especies del mismo género como *L. gouldiana* (P*) en el estado de Hidalgo y *L. anceps sbsp. Dawsoni f. chilapensis* (P*) en el estado de Guerrero, han desaparecido de la naturaleza y se encuentran en los listados de la Norma Oficial Mexicana, NOM-059-ECOL-1994, que categoriza a las especies con respecto a su riesgo de extinción. Un estudio acerca de la situación actual de *L. albida* en el valle de Zapotitlán, permitiría explicar lo acontecido a las otras especies y aportar información a fin de evitar la pérdida de germoplasma silvestre y de un recurso potencialmente económico.

Además, considerando que las poblaciones de *L. albida* dentro del Valle de Zapotitlán crecen en ambientes semiáridos que contrastan, con los ambientes generalmente templados de otras poblaciones del resto de su distribución en el país, resulta importante conocer su diversidad genética y estructura poblacional bajo estas condiciones. Esto es de gran relevancia ya que los genomas de las especies vivientes como lo señala Ehrlich y Ehrlich (1981), son archivos de información genética que han acumulado patrones de desarrollo y de ciclos de vida, además que existen porciones en su genoma que no se expresan, pero que está demostrado que son la base del proceso de preadaptación o exaptación (Eguiarte y Piñero, 1990). El conocimiento generado de este trabajo de investigación forma parte del fundamento teórico para el diseño y planificación de estrategias de conservación de esta especie, contemplado en el proyecto DGAPA IN220599 intitulado: "Estudio piloto encaminado a la conservación de *Laelia*

albida (Orchidaceae) en la Reserva de la Biosfera, Valle de Tehuacán- Cuicatlán: Una propuesta metodológica”, desarrollado en la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos de la FES-Iztacala.



VI. OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar la variación genética de la población de la orquídea *Laelia albida* en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla y desarrollar métodos de conservación *ex situ*.

PARTICULARES:

- 1- Determinar la distribución regional y uso de la especie en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.
- 2- Detectar y analizar la variación genética utilizando el sistema de marcadores moleculares de Amplificación al Azar del ADN Polimórfico (RAPD).
- 3- Establecer condiciones de preservación de semillas de *L. albida* y determinar la viabilidad, la germinación y el crecimiento de la especie *in vitro*.

VII. HIPÓTESIS

Las poblaciones de *L. albida* mantenidas en las zonas habitadas mostrarán menor variabilidad genética que las todavía existentes dentro de comunidades vegetales silvestres.

VIII. METODOLOGÍA

8.1. ÁREA DE ESTUDIO

El Valle de Zapotitlán Salinas se localiza dentro de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán entre la parte sureste del estado de Puebla y noroeste del estado de Oaxaca, entre los paralelos 18° 07' 18'' y 18° 26' 00'' de latitud Norte y los meridianos 97° 19' 25'' y 97° 39' 06'' de longitud Oeste (Villaseñor, *et. al.*, 1990). Fisiográficamente el Valle de Zapotitlán pertenece al área denominada Mixteca Oaxaqueña (INE, 1997). Prácticamente todo el Valle es recorrido por numerosos arroyos intermitentes que bajan en varias direcciones hacia el Río Zapotitlán (Ramírez, 1996). Los tipos de clima predominante según la clasificación de Köppen modificado por García, 1973 son: C (wo) (w) clima templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 18° C; Shw (w) clima semicálido con lluvias en verano y sequía a lo largo del año, temperatura media anual de 22° C; Bskw (w) clima semiseco templado con lluvias en verano y escasez a lo largo del año, temperatura media anual 18° C (Sec. de Gob. Puebla, 1988. Citado por Ramírez, 1996). Los suelos son someros y pedregosos y pueden corresponder a cambisoles cálcicos, xerosoles cálcicos o litosoles (Zavala, 1982). La flora de este lugar esta compuesta por entre 2,700 y 3,000 especies de plantas vasculares, de las cuales aproximadamente el 30% son endémicas de la región (Dávila *et. al.*, 1993; www.tehuacán.com, 2001).

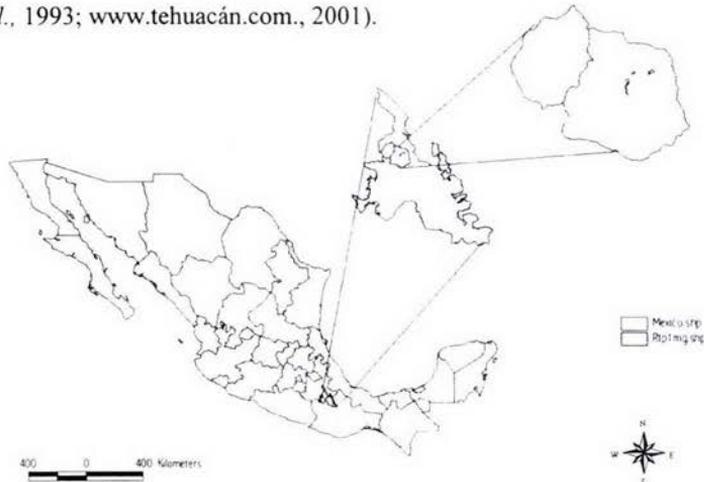


Figura 3. El Valle de Zapotitlán Salinas se ubica al sureste del estado de Puebla.

8.2. DISTRIBUCIÓN REGIONAL

8.2.1. TRABAJO DE GABINETE: Se inició con la búsqueda de ejemplares en los siguientes herbarios: MEXU en Ciudad Universitaria, CHAPA en el Colegio de Posgraduados, CHAP en la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Chapingo, ENCB en el Colegio de Ciencias Biológicas del IPN, FESZA en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza e IZTA en la FES Iztacala y se recopiló información de la biología de la especie (Anexo 1).

8.2.2. TRABAJO DE CAMPO: Como se desconocían los sitios o localidades donde crece *Laelia albida* en el Valle de Zapotitlán y para desarrollar de manera apropiada la investigación se elaboraron y entregaron cartas solicitando el apoyo y colaboración de las autoridades locales, así como de los pobladores que poseen el recurso biológico, para lo cual, se efectuaron diversas salidas al campo, en el transcurso de un año, donde se logró entrevistar a las autoridades del Valle de Zapotitlán Salinas y otros municipios y rancherías de la reserva. Para recabar la información necesaria para complementar y corroborar la adquirida de datos bibliográficos se aplicaron encuestas etnobotánicas abiertas a pobladores para indagar: 1) ubicación de ejemplares de *L. albida* en su forma silvestre y semicultivada, 2) determinar el grado de manejo de este recurso vegetal (Anexo 2). Una vez reunida dicha información se elaboró un mapa de distribución regional.

8.3. DETECCIÓN DE VARIACIÓN GENÉTICA

8.3.1. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO: De los sitios localizados en el Valle, se realizaron los muestreos tomando un individuo de cada colonia de *L. albida* encontrada en los diferentes soportes arbóreos y rocosos, para evitar muestrear posibles clones, se colectaron las hojas jóvenes y se congelaron en nitrógeno líquido, para su uso posterior en el laboratorio. Y se colectaron frutos para el cultivo *in vitro* de diferentes sitios



8.3.2. AISLAMIENTO DE ADN. Se aisló ADN con el método de Dellaporta (1983) con las modificaciones señaladas en el anexo 3. Este método es similar al empleado por Lim *et al.* (1997) para especies de orquídeas, la diferencia es que se utiliza RNAsa y con Dellaporta no es necesario. Se corroboró la integridad del ADN por electroforesis, en geles de agarosa al 0.8% a 100 mV 40 min., a partir de una alícuota de 1 y 2 μ l y se corrieron en buffer Tris 0.089M, Acido bórico 0.089M y EDTA 0.002M (TBE) 0.5X. Los geles contenían 2 μ l de bromuro de etidio [10 mg/ml] y se visualizaron con luz ultravioleta. Las imágenes fueron almacenadas en un digitalizador de imágenes, con el programa AlphaMager utilizando el digitalizador Multimage™ Light Cabinet.

Se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer lambda 2S, a una absorbancia de 260 nm, también se cuantificó la cantidad de contaminantes como fenoles a 320 nm. Para obtener la concentración de ADN se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu M}{\mu l} = (A_{260} - A_{320}) (50)$$

Donde A260 y A320 representan las lecturas a estas absorbancias y 50 es el coeficiente de extinción Molar del ADN de doble cadena.

8.3.3. SISTEMA DE MARCADORES TIPO RAPD'S

En la técnica de RAPD se utilizaron 25 diferentes primers de la serie Operon Technologies, seleccionando los que presentaron un bandeo consistente. La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 25 μ l y se preparó de la manera siguiente: dNTP's 100mM c/u, MgCl₂ 50 mM, 10XPCR buffer, 1 U de Taq Polimerasa GIBCO BRL y 100-300 ng de ADN (Anexo 4).

La amplificación se realizó en un Termociclador de ADN PCR Gene System 9700 programado a 40 ciclos, cada uno con: 1' a 94 °C, 1' a 37 °C, 1' a 72 °C. Se inició la corrida con 2' a 94 °C y se finalizó con 15' a 72 °C. Los productos de la amplificación



fueron visualizados en geles de agarosa 1.2% con 4 μ l de bromuro de etidio [10mg/ml] bajo luz UV, para estimar el peso molecular de los polimorfismos amplificados se utilizó una escalera estándar de una kilo base (Kb) y las imágenes se almacenaron en el digitalizador como se menciona arriba.

8.3.4. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

Los polimorfismos fueron visualizados a nivel de individuos con datos binarios de presencia-ausencia y las bandas con el mismo peso molecular y movilidad en diferentes individuos fueron tratadas como fragmentos idénticos. En la matriz de datos, la presencia de una banda fue codificada como **1** correspondiendo al alelo dominante (+/+), (+/-) y la ausencia de la banda como **0** correspondiendo al alelo recesivo.

Con los patrones de bandas polimórficas se construyeron matrices de presencia-ausencia y se utilizó el índice de **Jaccard** para producir una matriz de similitud entre pares de individuos calculando las distancias genéticas de la siguiente forma:

$$J = a / (n - d)$$

Donde **a** = es el número de bandas presentes en ambos individuos, **d** = es el número de bandas ausentes en ambos individuos y **n** = es el total de bandas registradas (ausencias y presencias) (Chan y Sun, 1997).

Con la matriz de similitud de Jaccard se realizó un dendrograma por análisis de ligamiento promedio aritmético no ponderado (UPGMA), para revelar las afinidades genéticas. El número de grupos significativos en el dendrograma se determinó con la prueba del mejor corte (Best Cut) sobre 1000 permutaciones (Strauss, 1982).

Para analizar la distorsión y confiabilidad de los dendrogramas generados, se realizó una prueba no paramétrica de Mantel (Manly, 1997), construyendo una matriz cofenética, en la que se comparan la matriz 1 y la matriz 2 y después de 1000 permutaciones se obtiene un coeficiente de correlación (**r**) de la representación de los datos en el dendrograma e indica que los resultados no son producto del azar cuando la (**r**) es cercano a 1.

8.3.5. ANÁLISIS DE ORDENACIÓN

La dispersión gráfica de las distancias genéticas entre los individuos se realizó con el análisis de coordenadas principales (PCO) con red de tendido mínimo (MST) en gráficas bidimensionales y tridimensionales. Con éste análisis se representan las relaciones genéticas de las poblaciones. Se utilizó el programa NTSYS pc (versión 2) para determinar el índice de Jaccard, UPGMA, punto de corte y PCO

8.3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Al analizar los datos obtenidos con RAPD, se deben de tener en cuenta dos supuestos importantes: 1) que los alelos marcados para diferentes loci no comigran a la misma posición en el gel (Lynch y Milligan, 1994) y 2) cada uno de los marcadores representa un locus mendeliano en el cual el marcador visible, el alelo dominante, esta en equilibrio de Hardy-Weinber con un alelo recesivo, donde las frecuencias genotípicas siguen una distribución binomial $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$, indicando que en una población equilibrada las frecuencias tanto de los genes como de los genotipos permanecen constantes en una población reproductiva en que los apareamientos se efectúan al azar y en donde no operan las fuerzas evolutivas que hagan cambiar las frecuencias de genes (Lynch y Milligan, 1994; Gardner, 1989).

Otro método para evaluar la diversidad genética con RAPDS's, que requiere los mismos supuestos, es el análisis de varianza molecular AMOVA, mediante el cual la estructura genética es evaluada y cuantificada por medio de las Φ_{ST} pareadas, es decir, se divide la variación entre individuos y entre poblaciones considerando los fenotipos RAPD de cada individuo como un genotipo diferente. La Φ_{ST} , es un parámetro similar a la F_{ST} de Wright (1951) y es utilizado para caracterizar la estructura genética entre y dentro de las poblaciones, definiéndola como la cantidad de consanguinidad causada por las diferencias en las frecuencias génicas entre las poblaciones (Slatkin, 1989). Este método estima índices de fijación similares a los obtenidos con datos codominantes comparables a los estimadores obtenidos con enzimas usando el método de Weir y Cockerham (1984) y con datos moleculares de RFLPs, secuencias de ADN o microsatélites (Excoffier *et al.* 1992). Los componentes de la varianza son deducidos a



partir de las distancias métricas entre los fragmentos obtenidos de RAPDs estimados como:

$$E = N[1 - 2N_{XY} / 2N]$$

Donde N_{XY} es el número de bandas compartidas por X y Y y N es el número total de marcadores polimórficos (Huff *et al.*, 1993. Citado por Bouzat, 2001). Los niveles de significancia de la varianza fueron observados después de 1000 permutaciones.

Una alternativa en que se puede estimar la heterocigocidad esperada (H_e) es el índice de Shannon, que es relativamente insensible para los efectos de sesgo causados por la incapacidad de detectar loci heterocigotos. El índice de Shannon es muy aplicable con diferentes marcadores moleculares incluyendo isoenzimas (Levin, 1997; Brown y Weir, 1983), rADN (King y Schaal, 1989; Gustafsson y Gustafsson, 1994), AFLPs (Travis *et al.*, 1996) y RAPD's (Chalmers *et al.*, 1992; Monaghan y Halloran, 1996; Martín *et al.*, 1997; Wolf *et al.*, 1997) para la estimación de diversidad genética en las plantas (Citados por Bussell, 1999).

Con el índice de Shannon se estima la diversidad por cada primer y se puede hacer la comparación de los niveles de diversidad detectada por los diferentes primers entendiendo como fenotipos o haplotipos a las frecuencias obtenidas.

El índice de Shannon por cada locus de RAPD fue calculado por cada población como:

$$H'j = -\sum p_i \log_2 p_i$$

Donde p_i es la frecuencia de la presencia o ausencia de los productos de RAPD en la población. El promedio de la diversidad de todas las poblaciones fue calculado por cada locus como:

$$H'pop = 1/n \sum H'j$$

Donde n es el número de poblaciones.

La diversidad de las especies fue calculada por cada locus como:

$$H'sp = -\sum p_s \text{Log}_2 p_s.$$

Donde p_s es la frecuencia de la presencia o ausencia de los productos de RAPD del total de los individuos. Así que por cada locus, el componente de diversidad dentro de las poblaciones es H'_{pop}/H'_{sp} y el componente entre las poblaciones es $(H'_{sp} - H'_{pop})/H'_{sp}$. Este último es equivalente a la G_{ST} , y tanto ésta como Φ_{ST} son parámetros de diversidad comparables a la F_{ST} de Wright (1951) que provee de una estimación relativa del grado de variación entre cada localidad (Busell, 1999)

El calculo de H'_j y H'_{sp} es basado en \log_2 , pero también se ha sido usado \ln . Logaritmo en base 2 proporciona un máximo de diversidad por locus de 1 cuando los datos son binarios como en RAPDs $p(1) = p(0) = 0.5$. Por lo tanto la distribución de los valores posibles de H'_j y H'_{sp} es simétrico (Bussell, 1999).

La variación genética se estima como la proporción de individuos heterocigos. La mayor variación se tiene cuando la frecuencia de heterocigos esperada (H_e) en la población es de 1 (Navarro 1999; Eguiarte y Piñero, 1990).

8.3.7. ESTIMACIÓN DE FLUJO GÉNICO

El flujo génico se define como la transferencia de material genético entre las poblaciones como resultado del movimiento de individuos y/o sus gametos. Se estimó de forma indirecta de acuerdo al modelo propuesto por Crow y Aoki (1984) para un número finito de islas (n - modelo de islas) donde la equivalente multialélica de Φ_{ST} es definida como:

$$\Phi_{ST} = 1 / 4 N_e m a + 1$$

Donde $a = [n/(n-1)]^2$ y n es el número de subpoblaciones, a partir de esto se calculó la $N_e m$:

$$N_e m = 1/4a (1/\Phi_{ST} - 1)$$

Donde $N_e = N^\circ$ efectivo de la población, $m = N^\circ$ de emigrantes por generación.

Teóricamente si una G_{ST} y Φ_{ST} son iguales a 1 indican afinidad genética y sus



valores son inversamente proporcionales a la cantidad de flujo génico. Cuando N_m es mayor a 1 se debe esperar poca diferenciación entre las poblaciones.

8.4. ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE PRESERVACIÓN DE SEMILLAS

Para cumplir con el tercer objetivo de la presente investigación, se trabajó con muestras de frutos maduros de *L. albida* que se mantuvieron a 4° C durante el transcurso de la investigación en bolsas de papel dentro de frascos cerrados y que al término de ésta los lotes de semillas alcanzaron 1 (Lote 1) y 2 (Lote 2) años de almacenamiento. El lote 1 fue colectado en marzo de 1999 y el lote 2 en marzo del 2000. Se monitorearon y evaluaron los parámetros de viabilidad, germinación y crecimiento de ambos lotes cada mes a lo largo de 11 meses.

8.4.1 MÉTODO DE DETECCIÓN DE VIABILIDAD

La prueba de viabilidad se efectuó mediante la exposición de las semillas con la sal de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) con aproximadamente 10 mg de semillas como muestra representativa, las semillas previamente fueron pretratadas a través de la inmersión en agua destilada por 24 horas a temperatura ambiente, adaptando este procedimiento de Moreno (1984).

Las semillas se colocaron en viales pequeños con 1 ml de TTC al 1%, se mantuvieron en oscuridad envueltos en papel aluminio y se incubaron a 30°C ± 2°C. Después de 24 horas, se realizó la lectura en microscopio óptico Nikon 115, dispersando las semillas en un portaobjetos. Las semillas fueron examinadas de acuerdo a la reacción de color (formazan) mostrado por el embrión clasificándolas en tres categorías:

- 1) Testa café y embrión blanco o amarillo
- 2) Testa incolora y embrión blanco o amarillo
- 3) Testa incolora y embrión completamente coloreado de rojo o rojo-rosado.

La categoría tres fue la definitiva para determinar el porcentaje de embriones viables, se realizaron 5 repeticiones de 100 semillas cada una en cada uno de los lotes (Van Waes y Debergh, 1986; Moreno, 1984).

8.4.2. GERMINACIÓN DE SEMILLAS

La germinación asimbiótica de los dos lotes de semillas en los medios de cultivo se llevó a cabo de la siguiente forma:

- 1) Preparación de dos versiones del medio de cultivo Knudson C (SIGMA 4128 y 4003) (Anexo 5) con 22 g/L y 21.6/L respectivamente, 20g/L de sacarosa, 2.5g/L gelrite, esterilización en autoclave a 121°C 15 min. Se vertió aproximadamente 25 ml del medio en cajas Petri de vidrio.
- 2) Desinfestación de las semillas previamente con hipoclorito de sodio al 5% 5 min.
- 3) Inoculación mensual de los dos lotes de semillas en las 2 versiones del medio de cultivo Knudson C en campanas de flujo laminar en condiciones asépticas
- 4) Los cultivos se mantuvieron a un fotoperiodo de 16 hrs luz – 8 de oscuridad y a 24°C \pm 2°C.

IZT.

Los cultivos fueron observados constantemente hasta que los embriones se tomaron verdes lo cual define la primera señal de germinación. Posteriormente las placas fueron examinadas en microscopio estereoscópico dividiendo la caja petri en cuadrantes y evaluando cada semana un promedio de 500 semillas por cada lote y por cada uno de los medios.

Se obtuvo el porcentaje de germinación con las ecuaciones basadas en Pierik *et al.* (1988): $100(b+c+d)/a+b+c+d$ y el índice de germinación dividiendo $(1b+2c+3d)10/a+b+c+d$, donde las etapas del proceso de germinación son:

- 0 (a) semillas con embrión sin germinar;
- 1 (b) semillas con embrión en imbibición;



U.N.A.M. CAMPUS



- 2 (c) semillas con embrión rompiendo la testa y
- 3 (d) embriones fuera de la testa denominados protocormos

Se realizó un análisis estadístico de varianza factorial (Días, Lote, Mes y Medio) tanto para la variable germinación como índice de germinación. Como sólo se contó con una repetición por combinación de tratamiento, la múltiple interacción (Días x Lote x Mes x Medio) fue utilizada en lugar del cuadrado medio del error, ya que se comprobó que esta no existía.

8.4.3. CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS

Se empleó el medio de cultivo Knudson C (SIGMA 4128 y 4003) adicionado con 40 g/L de pulpa de papa cada uno y de igual forma como los incisos 1, 2 y 4.

Se dividieron en cuadrantes las cajas petri y se evaluaron 100 semillas por cada versión del medio de cultivo El crecimiento de las plántulas se determinó en porcentajes con la frecuencia de aparición de las categorías según Harrison y Arditti, (1978) multiplicando el número total de categorías por 100:

- 1) semillas sin germinar,
- 2) semillas hinchadas,
- 3) protocormos,
- 4) plántulas con una hoja,
- 5) plántulas con dos hojas y
- 6) plántulas con rizoides

IX. RESULTADOS

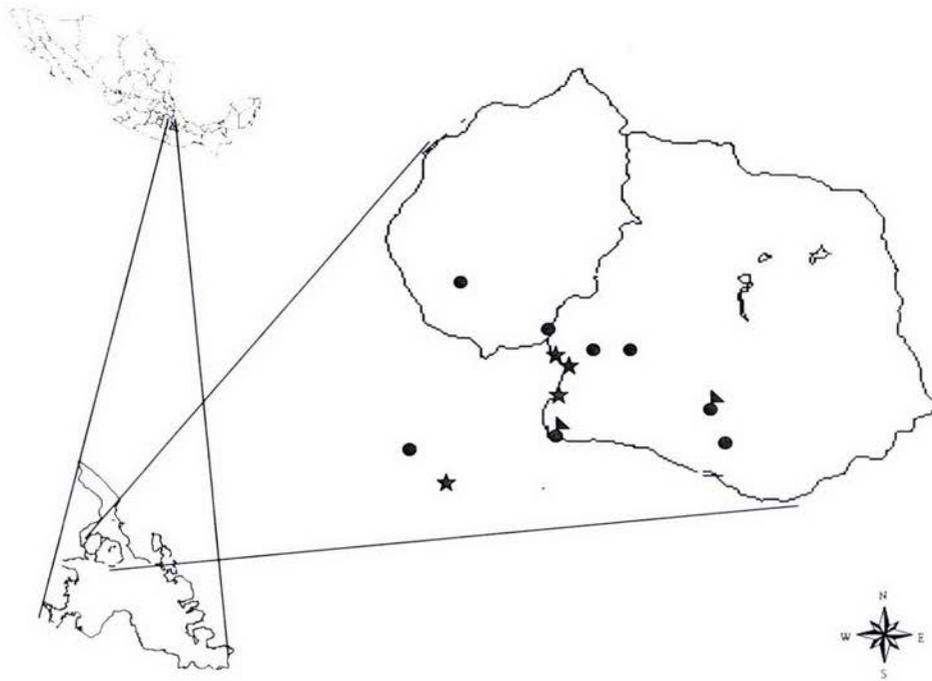
9.1. RESULTADOS DE DISTRIBUCIÓN REGIONAL

9.1.1. DISTRIBUCIÓN REGIONAL

Con el objetivo de conocer la distribución regional de *Laelia albida* se recopiló e integró información bibliográfica y de herbarios, además de la recabada por comunicación directa con los pobladores del Valle de Zapotitlán.

La distribución encontrada correspondió a la zona ubicada al Suroeste del poblado de Zapotitlán (Fig. 4), ya que aquí las condiciones ambientales imperantes de menor aridez, parecen favorecer el establecimiento de la especie a diferencia de las condiciones prevalecientes al Norte del Valle, que son aún más áridas. Se encontraron en un rango de altitud de 1600-2200 m.s.n.m. correspondiendo a las altitudes reportadas por Halbinger y Soto (1997).

De los doce sitios donde se localizó a la especie, ocho correspondieron a sitios con individuos semicultivados dentro de los huertos familiares, es decir, en ambientes transformados como señala Paredes (2001) y cuatro a sitios con individuos silvestres, es decir en ambientes naturales. Cabe mencionar, que estos últimos, se encontraron a mayor altitud, entre los 2100-2220 m.s.n.m.



- ▲ Sitios localizados por datos de herbario.
- Sitios de colecta de material semicultivado
- ★ Sitios ubicados por datos etnobotánicos de material silvestre

Figura 4. Mapa de distribución regional de *Laelia albida* en el Valle de Zapotitlán.



9.1.2. SOPORTES DONDE CRECE *L. albida* EN EL VALLE DE ZAPOTITLÁN

Información basada en ejemplares de herbario indicaron que *L. albida* en el Valle crece sobre árboles (forma de vida epífita) de mezquite (*Prosopis laevigata*) y de zapote blanco (*Casimiroa edulis*). Una aportación de esta investigación, es que *L. albida* también se encontró creciendo sobre otros árboles y probablemente la diversificación de estos soportes le ha ayudado a sobrevivir en las condiciones de semiáridéz de la región (Cuadro 1).

Cuadro 1. Soportes que habita *L. albida* tanto en forma semicultivada como silvestre.

Soportes	Nombre científico
Amate	(<i>Ficus</i> spp.)
* Encino	(<i>Quercus</i> spp)
Palo verde	(<i>Cercidium praecox</i>)
Pirul	(<i>Schinus molle</i>)
* Sotol	(<i>Dasyllirion</i> spp)
* Sotolín	(<i>Beucarnea gracilis</i>)
Tempesquistle	(<i>Bumelia laetevirens</i>)
Xoconostle	(<i>Stenocereus stellatus</i>)
* Litófito (sobre rocas)	

*Soportes de individuos silvestres

9.1.3. CATEGORÍA ETNOBOTÁNICA Y USOS

Los especialistas etnobotánicos han propuesto categorías a las prácticas de manejo tradicional de las plantas. Estas categorías se basan en los tratamientos que los lugareños dan a las plantas que perciben como recursos (Casas y Caballero, 1995).

En el caso de *L. albida*, el grado de manejo individual corresponde a la categoría de silvestre trasplantado-fomentado (Casas y Caballero, 1995), debido a que la gente de la región trasplanta los propágulos o “camotitos” o “melcuatitos” (pseudobulbos), llevándolos de los lugares donde crecen silvestres a sus huertos; una vez instalados en

ellos, las plantas no reciben ningún cuidado especial, ni ningún tipo de manejo y sólo eventualmente se lleva a cabo un intercambio de material. Sin embargo la formación de grandes colonias de monjita blanca de aproximadamente de 60 años, propicia ocasionalmente el desprendimiento de estas y en extremo, la caída del árbol (Observación personal). Estas orquídeas se pierden al no ser reubicadas en otros soportes y con ello su aporte a la variación de la especie. Así, desde el punto de vista etnobotánico, los huertos familiares también son una forma de manejo integral de la vegetación.

Los pobladores señalaron que los antecesores residentes en el Valle, empleaban las flores en la medicina tradicional popular como un remedio de malestares auditivos y el "camotito", era consumido como fruta fresca. Estos usos en la actualidad se encuentran relegados, prevaleciendo más los usos ornamental y ceremonial en las festividades religiosas de Todos Santos celebradas los días 1 y 2 de noviembre (Fig.4 y 5) colocándolas en los altares y en los panteones. También se llegan a emplear las inflorescencias en las fiestas navideñas adornando los nacimientos del día 25 de diciembre.

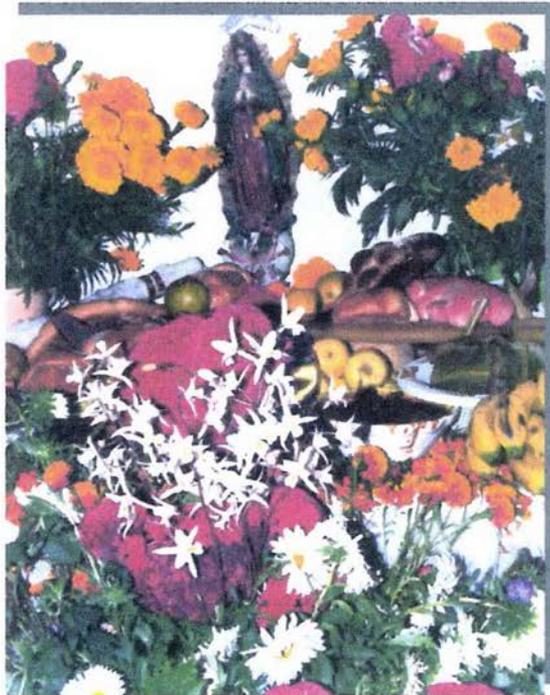
También se detectó que los pobladores desconocen si la "monjita blanca" forma semillas y hacen una especie de selección de las flores, escogiendo las más grandes y/o bonitas para que duren más tiempo en el empleo que le dan.

Una actividad dentro del manejo de la "monjita blanca" por los pobladores es la venta a menudeo de ramos de aproximadamente 20 inflorescencias, las cuales se recolectan tanto de poblaciones silvestres como de huertos provenientes de las comunidades y/o rancherías de algunos sitios visitados hacia el poblado de Zapotitlán. Además, se recopiló información de la existencia de vendimia de flores de "monjita blanca" en el mercado de la ciudad de Tehuacán provenientes de lugares por el rumbo de Coxcatlán. Puebla.





Fig. 4 a)



b)

Figura 4. a) y b). Utilización de las inflorescencias de *L. albida* ("monjita blanca") en ofrendas religiosas.



9.1.4. SITIOS DE COLECTA DE *L. albida*

Una vez elaborado el mapa de distribución regional (Fig. 4) y de haber ubicado 4 sitios con individuos silvestres y 8 sitios con individuos trasplantados fomentados, se colectó un total de 60 individuos y por problemas técnicos solo se pudieron analizar 53, de los cuales 20 fueron silvestres y 33 trasplantados-fomentados (Cuadro.2).

Cuadro 2. Sitios de colecta de individuos trasplantados-fomentados y silvestres (*).

SITIOS	ALTURA M.S.N.M.	Nº INDIVIDUOS
Terreno Cooperativa (TC)	1770	4
Terreno Cooperativa malla (TCM)	1780	7
Acatepec (AC)	2020	7
Los Reyes Metzontla (LRM)	1800	5
Agua Mezquite (AGM)	1780	3
San Juan Raya (SJR)	1730	2
San Martín (SM)	1670	2
Plan de San Miguel (PSM)	2000	3
Cerro de la Yerba (CHA) *	2100	5
“ “ (CHB) *	2220	7
Cerro de la Yerba peñas (CHP) *	2170	3
Cerro Gordo (CG) *	2190	5

9.2. RESULTADOS GENÉTICOS

9.2.1. DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS

De un total de 53 individuos o fenotipos RAPD se obtuvieron 202 bandas polimórficas de los 10 primers seleccionados en la población de *L. albida*. El mayor número de bandas polimórficas se observó con el primer J13 en contraste con el primer A13 (Cuadro. 3).

Cuadro 3. Número y rango de peso molecular de bandas polimórficas generadas de los 10 primers.

Primer	Secuencia	Bandas polimórficas	Rango de peso molecular
A 04	5' AATCGGGCTG 3'	24	338 - 2980.
A 10	5'GTGATCGCAG 3'	21	394 - 2764.
A 13	5'CAGCACCCAC 3'	14	821 - 2426.
C 07	5'GTCCCGACGA 3'	18	311 - 1675.
C 08	5'TGGACCGGTG 3'	17	266 - 1697.
E 14	5'TGCGGCTGAG 3'	22	381 - 2951.
G 10	5'AGGGCCGTCT 3	16	588 - 1763.
G 18	5'GGTCATGTG 3'	20	380 - 2043.
J 07	5'CCTCTCGACA 3	23	384 - 2081.
J 13	5'CCACACTACC 3'	28	403 - 1800.

Los polimorfismos amplificados de los individuos son observados como la ausencia o presencia de las bandas en las imágenes digitalizadas (Fig. 6).

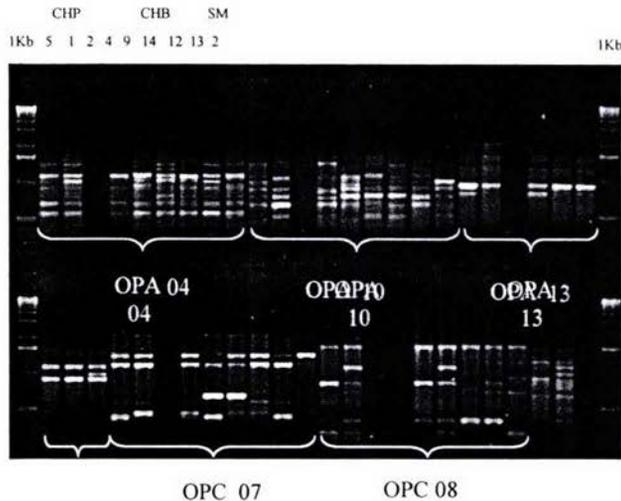


Figura 6. Detección de polimorfismos en 7 individuos de sitios silvestres del cerro de la Yerba (CHP y CHB) y en un individuo fomentado de San Martín (SM), empleando tres primers de la serie OPA y dos de la serie OPC. El orden de los individuos es igual para cada primer, el individuo CHP 2 no amplificó en ningún primer. La escalera estandar de peso molecular de 1Kb se encuentra a los extremos.

9.2.2. CONFORMACIÓN DE GRUPOS

En el dendrograma (Fig.7) se puede observar una agrupación definida de los individuos de cada sitio, tanto de sitios silvestres- trasplantados- fomentados como de sitios silvestres. Dentro de los sitios silvestres- trasplantados- fomentados, el sitio LRM presenta las distancias de similitud más cercanas. El sitio silvestre CHP y algunos individuos del sitio CHB también silvestre, conforman una agrupación más alejada del Cerro de la Yerba (CH), esto es debido posiblemente a que se encontraron al otro extremo del cerro y a que los individuos del sitio CHP son de vida litófito, al igual que los individuos de Cerro Gordo (CG), estos factores pudieran contribuir a que se agrupen como una población diferente. Se observa que las agrupaciones en el dendrograma son significativas a partir del punto de corte $t=0.36$ hacia 1.

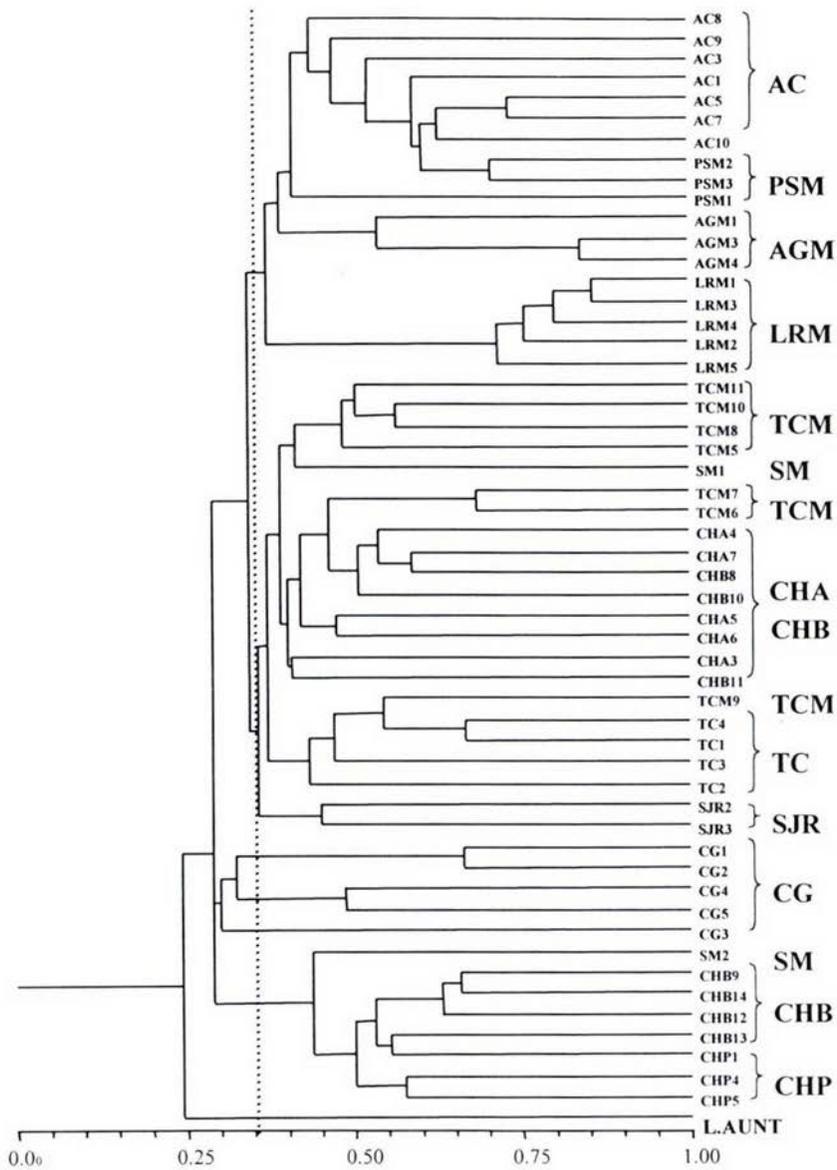


Figura 7. Dendrograma obtenido del análisis del agrupamiento UPGMA ($r = 0.85$) con 10 primer's. Donde AC= Acatepec, PSM=Plan de San Miguel, LRM= Los Reyes Metzontla, AGM= Agua Mezquite, SJR= San Juan Raya, SM= San Martín, TC= Terreno Coronelas, TCM= Terreno Coronelas (malla), son sitios con poblaciones silvestres -trasplantadas-fomentadas; CHA (sitio A), CHB (sitio B) y CHP(peñas) = Cerro de la Yerba y CG= Cerro Gordo, son sitios con poblaciones silvestres; Launt=*Laelia auntumnalis* especie del mismo género utilizado como individuo externo. Punto de corte $t = 0.036$. $P < 0.0001$.

9.2.3. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCO)

Con el PCO se detectó que los contribuyentes del 80 % de variación genética es dado por el porcentaje acumulado de 79 componentes en la población de *L. albida* (Cuadro. 4).

Cuadro 4. Componentes de variación con PCO.

Componente	Eigenvalor	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado
1	15.787	9.113	9.113
2	8.396	4.846	13.959
3	6.419	3.705	17.664
4	5.184	2.992	20.657
5	4.322	2.495	23.152
"	"	"	"
51	0.881	0.509	69.499
52	0.848	0.489	69.989
53	0.844	0.487	70.476
54	0.821	0.474	70.951
65	0.652	0.376	75.511
66	0.641	0.370	75.881
68	0.611	0.353	76.599
"	"	"	"
77	0.533	0.308	79.543
78	0.527	0.305	79.848
79	0.524	0.303	80.151

En la figura 8, se aprecia el ordenamiento espacial en tres dimensiones de las distancias genéticas con red de tendido mínimo (MST) de los individuos de cada sitio y se puede corroborar la agrupación que existe entre los individuos de cada sitio silvestre-trasplantado-fomentado y sitios silvestres, además se observa que los individuos silvestres conforman un grupo casi central dentro de la representación gráfica (indicados con los triángulos negros), los individuos de K y L son de los sitios CHB y CHP que en esta representación salen del resto de los individuos silvestres al igual que el dendrograma. Los individuos D, pertenecientes al sitio silvestre-trasplantado-fomentado LRM están más alejados genéticamente de todos los demás sitios.



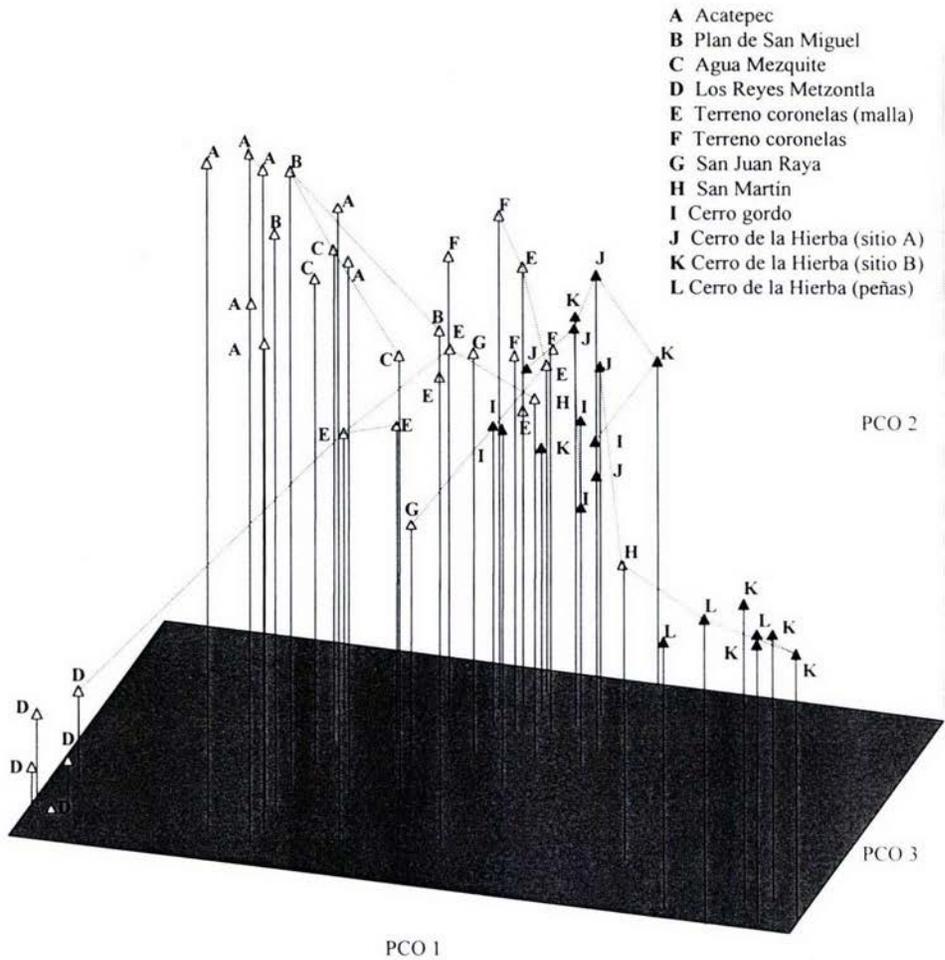


Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCO), los triángulos negros pertenecen a individuos silvestres y los triángulos blancos a individuos trasplantados-fomentados de *L. albida*. Solo se señalan las líneas principales que unen a una población de otra.



9.2.5. ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA)

Es importante señalar que se entiende por poblaciones a los sitios de colecta de *L. albida* y cuando se habla de la especie es de la población en el Valle de Zapotitlán Salinas. Con el AMOVA el grado de confiabilidad fue de $P < 0.0001$. Es así que se detectó que existe un mayor porcentaje de la cantidad y distribución de la variación genética dentro de las poblaciones [V(A)] que entre las poblaciones [V(B)]. La Φ_{ST} que se obtuvo de la población es como resultado de las diferencias en las frecuencias génicas entre las poblaciones, este valor es mayor que 0 y aunque no es tan cercano a 1 (afinidad genética), como lo explica Lynch y Milligan (1994) indica el grado de consanguinidad que existe en una población (Cuadro.5). Estos datos corroboran la conformación de los grupos definidos que se observaron en el dendrograma y en el PCO.

Cuadro 5. Diversidad genética de *L. albida* con el análisis de varianza molecular (AMOVA) en dos niveles.

Componentes de variación	gl	Varianza total	% de varianza total	Φ_{st}	P
V(A)	11	9.24163763070	(30.35%)		
V(B)	41	21.20871080100	(69.65%)		
Total	52			0.303	
					$p < 0.0001$

gl: grados de libertad; Φ_{st} : Phi estadística similar a la F_{ST} de Wright (1951); V(A): varianza entre las poblaciones; V(B): varianza dentro de las poblaciones.

9.2.6. ÍNDICE DE SHANNON

La heterocigocidad esperada que se detectó para las poblaciones de *L. albida* no fue mayor de 1, lo que está indicando que la cantidad de heterocigos en las poblaciones de *L. albida* es baja, tal y como se aprecia en los valores promedio de (H_{pop}/H_{sp}) y ya que como señalan Navarro (1999) y Eguiarte y Piñero, (1990) la variación genética es determinada como la proporción de individuos heterocigos. Estos datos están indicando que la mayor cantidad y distribución de la variación genética en las poblaciones de *L. albida* es relativamente mayor entre ellas que dentro de ellas. El promedio total de (H_{sp} -

H_{pop}/H_{sp}) define también la estructura genética en la población indicado como G_{ST} y el valor para la población de *L. albida* es de **0.563** (Cuadro.6).

Cuadro 6. Diversidad genética de la población de *L. albida* estimada con el Índice de Shannon a partir de 10 primers.

Primer	H' ^j										H_{pop}/H_{sp}		$(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$			
	AC	PSM	AGM	LRM	TCM	TC	SM	SJR	CHA	CHB	CG	CHP		H_{pop}	H_{sp}	
OPA 04	5.908	3.812	4.340	0.258	7.468	5.745	4.000	1.500	3.806	4.533	5.179	1.950	4.041	8.070	0.501	0.499
OPA 10	5.660	3.786	0.780	0.464	3.957	3.123	2.500	3.000	5.157	5.635	5.472	3.007	3.545	8.452	0.419	0.581
OPA 13	1.666	2.617	2.730	2.244	2.413	1.623	3.000	2.500	3.587	3.026	3.601	0.918	2.494	4.785	0.521	0.479
OPC 07	5.314	3.560	0.390	2.566	5.177	2.311	3.000	1.000	4.521	4.358	3.397	1.308	3.075	6.970	0.441	0.559
OPC 08	4.740	0.528	0.528	1.186	4.580	4.123	2.500	3.000	2.708	3.460	4.584	1.837	2.814	6.319	0.445	0.555
OPE 14	1.530	2.893	0.528	4.879	7.667	5.056	3.000	1.000	5.496	5.574	7.356	2.478	3.955	8.701	0.455	0.545
OPG 10	3.529	2.365	0.000	0.000	3.243	3.311	3.500	1.000	3.108	5.824	3.064	2.478	2.618	5.831	0.449	0.551
OPG 18	4.397	2.365	4.453	0.464	6.744	3.745	3.000	3.000	6.161	5.872	4.410	2.227	3.903	8.369	0.466	0.534
OPJ 07	3.337	1.698	3.925	0.000	5.064	1.623	3.000	2.000	5.115	5.764	2.686	2.365	3.048	7.938	0.384	0.616
OPJ 13	1.033	3.950	1.447	0.529	3.113	1.623	2.000	1.000	2.999	7.912	6.281	3.535	2.952	8.729	0.338	0.662
Promedio	3.711	2.757	1.912	1.259	4.943	3.228	2.950	1.900	4.266	5.196	4.603	2.210	3.245	7.416	0.437	0.563
G_{ST}																0.563

H'^j cada una de las 11 poblaciones (sitios de colecta)

H_{pop} : diversidad dentro de las poblaciones; H_{sp} : diversidad dentro de las especies; H_{pop}/H_{sp} : proporción de diversidad dentro de las especies; $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ y $1-H_{pop}/H_{sp}$ (este último basado en Bussell, 1999): proporción de diversidad entre poblaciones.

G_{ST} : parámetro de diversidad análoga a la F_{ST} de wright (1951).

9.2.7. HETEROCIGOCIDAD DE LAS POBLACIONES DENTRO DE LOS HUERTOS Y DE POBLACIONES SILVESTRES DE *L. albida*

La heterocigocidad dentro de las poblaciones silvestres (H_{pop}) es mayor que dentro de las poblaciones silvestres-trasplantadas-fomentadas, mediante el índice de Shannon (Cuadro. 7). Este resultado aprueba la hipótesis de que existe mayor variación genética en las poblaciones silvestres que en las poblaciones mantenidas dentro de zonas habitadas, es decir, en los huertos familiares.



Cuadro 7. Heterocigocidad de las poblaciones de *L. albida*.

Primer	Poblaciones trasplantadas-fomentadas									Poblaciones silvestres				
	AC	PSM	AGM	LRM	TCM	TC	SM	SJR	H _{pop}	CHA	CHB	CG	CHP	H _{pop}
OPA 04	5.908	3.812	4.340	0.258	7.468	5.745	4.000	1.500	4.129	3.806	4.533	5.179	1.950	3.867
OPA 10	5.660	3.786	0.780	0.464	3.957	3.123	2.500	3.000	2.909	5.157	5.635	5.472	3.007	4.818
OPA 13	1.666	2.617	2.730	2.244	2.413	1.623	3.000	2.500	2.349	3.587	3.026	3.601	0.918	2.783
OPC 07	5.314	3.560	0.390	2.566	5.177	2.311	3.000	1.000	2.915	4.521	4.358	3.397	1.308	3.396
OPC 08	4.740	0.528	0.528	1.186	4.580	4.123	2.500	3.000	2.648	2.708	3.460	4.584	1.837	3.147
OPE 14	1.530	2.893	0.528	4.879	7.667	5.056	3.000	1.000	3.319	5.496	5.574	7.356	2.478	5.226
OPG 10	3.529	2.365	0.000	0.000	3.243	3.311	3.500	1.000	2.118	3.108	5.824	3.064	2.478	3.619
OPG 18	4.397	2.365	4.453	0.464	6.744	3.745	3.000	3.000	3.521	6.161	5.872	4.410	2.227	4.668
OPJ 07	3.337	1.698	3.925	0.000	5.064	1.623	3.000	2.000	2.581	5.115	5.764	2.686	2.365	3.982
OPJ 13	1.033	3.950	1.447	0.529	3.113	1.623	2.000	1.000	1.837	2.999	7.912	6.281	3.535	5.182
Promedio	2.833									4.069				

H_{pop}: diversidad dentro de las poblaciones trasplantadas-fomentadas y dentro de las poblaciones silvestres

9.2.8. ESTRUCTURA GENÉTICA Y FLUJO GÉNICO

Los niveles de variación genética entre y dentro de las poblaciones en *L. albida* son muy similares tanto con el AMOVA como con el índice de Shannon. El grado de consanguinidad en una población resulta en la estimación de la estructura genética de la misma mediante los valores obtenidos con los parámetros de Φ_{ST} y G_{ST} , que en la población de *L. albida* los valores obtenidos para estos parámetros mayores que 0 están indicando que no es una población que se encuentre en equilibrio de Hardy-Weinberg. Una Φ_{ST} o G_{ST} igual a 1 indican la afinidad genética entre poblaciones y sus valores son inversamente proporcionales a la cantidad de flujo génico. Por lo tanto, en la población de *L. albida* se está dando un proceso de estructuración, esto se infiere por el bajo flujo génico estimado para la población de *L. albida*. Al no darse un intercambio de material genético de los individuos entre poblaciones, da como resultado que exista una gran divergencia entre las poblaciones de esta especie (Cuadro. 8).



Cuadro 8. Comparación de diversidad mediante AMOVA e Índice de Shannon y estimación de flujo génico

V(A)	V(B)	H_{pop}/H_{sp}	$1-H_{pop}/H_{sp}$	Φ_{ST}	G_{ST}	$N_e m$
30.35%	69.65%	43.7%	56.3%	0.303	0.563	0.48

V(A): diversidad entre poblaciones; V(B) diversidad dentro de poblaciones; H_{pop}/H_{sp} : proporción de diversidad dentro de las poblaciones; $1-H_{pop}/H_{sp}$: proporción de diversidad entre las poblaciones; Φ_{ST} y G_{ST} : estructura genética; $N_e m$: Flujo génico, $N_e = N^\circ$ efectivo de la población, $m = N^\circ$ de emigrantes por generación



9.3. RESULTADOS DE LA CALIDAD DE LAS SEMILLAS EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

9.3.1. VIABILIDAD

Los porcentajes de viabilidad obtenidos con el método de TTC adaptado de Moreno (1984) de los dos lotes de semillas almacenadas a 4°C se muestran en la fig. 9, se observa que los valores para el lote 1 (1 año de almacenamiento) estuvieron en un rango de 90-98% y para el lote 2 (2 años de almacenamiento) de 78-88% en el transcurso de 11 meses de evaluación. Las desviaciones estándar (*S*) correspondieron a 0.44 -1 y 0.44 -1.87 respectivamente.

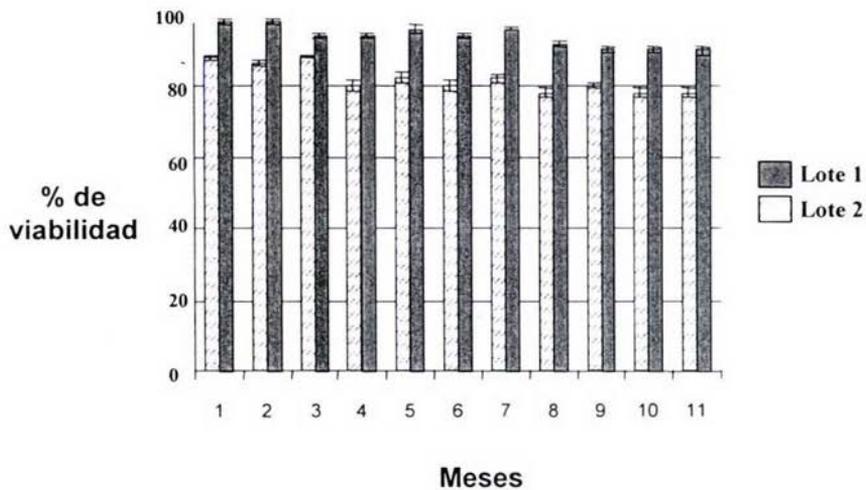


Figura 9. Porcentaje de viabilidad en dos lotes de semillas en el transcurso de 11 meses, las barras indican la desviación estándar.

9.3.2. PORCENTAJE E ÍNDICE DE GERMINACIÓN

En ambos lotes se observó que los embriones se tornaron verdes al sexto día de ocurrida la siembra de las semillas en los medios de cultivo y se obtuvo el máximo de



semillas germinadas a los 25 días. Los porcentajes de germinación para el lote 1 fueron entre 80-90% y para el lote 2 de 70-80% en el transcurso de los 11 meses de evaluación.

De acuerdo con Pierik *et al* (1988) el índice de germinación es el parámetro que indica con precisión el comportamiento de germinación en semillas de orquídeas, ya que la probabilidad de formar plántulas es alta al presentarse índices de 9-14 indicados por la frecuencia de las etapas de embriones rompiendo la testa y de la formación de protocormos (estructura esférica). En base a esto, se observan las diferencias significativas obtenidas con el análisis de varianza factorial en cuanto a los lotes de semillas de ($p=0$), en que a partir del sexto mes se aprecia con mayor claridad que en el lote 1 los valores de índice de germinación son más elevados que en el lote 2 el cual tiene 2 años de colecta (Fig.10), conjuntado los datos de viabilidad y germinación, se puede apreciar el posible inicio de un proceso de envejecimiento de las semillas para el lote 2 pues el potencial de formar plántulas fue menor en comparación con el lote 1, así como su viabilidad fue 10% menor en comparación al lote 1.

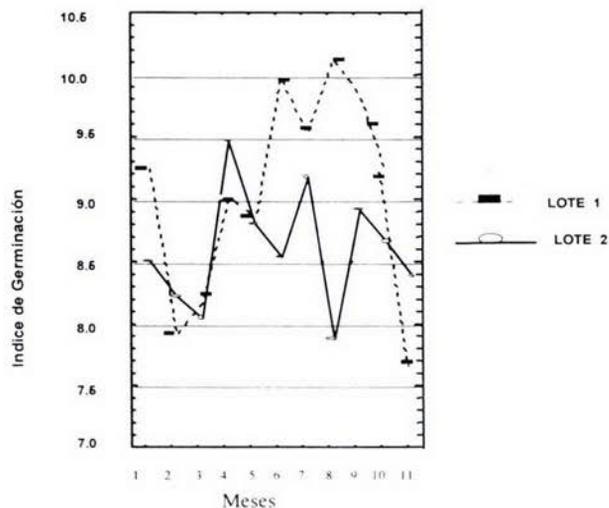


Figura 10. Diferencias estadísticas con respecto al índice de germinación en los dos lotes de semillas.



Se encontraron diferencias significativas también con respecto a los índices de germinación, en los dos medios de cultivo ($p=0.000013$). Desde un inicio el medio KC 4003 (SIGMA) permitió en 15 días la pronta aparición de embriones aumentados de volumen (proceso de imbibición), reportando índices de 8-10 y el desarrollo de los embriones hasta el estadio de protocormo fue mayor a los 25 días con índices de 9-13 a diferencia del medio KC 4128 (SIGMA) ($p=0.000019$) (Fig. 11). Las diferencias pudieran deberse a las concentraciones molares de elementos minerales, particularmente el medio KC 4003 (SIGMA) tiene doble concentración molar que el medio KC 4128 (SIGMA) y pudiese ser un elemento útil en la asimilación de carbohidratos por los embriones.

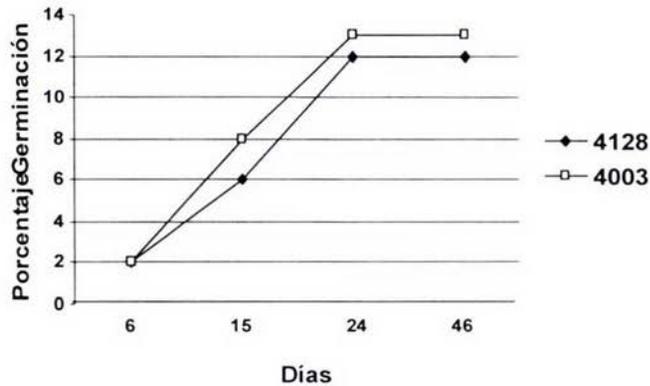


Figura 11. Diferencias significativas en los dos medios de cultivo con respecto a los índices de germinación.

9.3.3. CRECIMIENTO DE LOS EMBRIONES

Ninguna de las dos versiones probadas del medio de cultivo Knudson C (4128 y 4003 SIGMA) permitió la sobrevivencia de las plántulas, por lo que se emplearon medios KC alternativos (4128 y 4003) complementados con pulpa de papa que permitieran el desarrollo de las otras etapas de crecimiento. Como resultado se observó claramente que los medios enriquecidos con pulpa de papa permitieron el desarrollo de las etapas de crecimiento indicados por los porcentajes de aparición gradual a partir del día 34 de los protocormos, al día 73 de plántulas con una hoja y a los 106 días de cultivo

la formación de plántula con hojas y rizoides, en contraste con los medios no enriquecidos en que se observó una mortandad de los embriones a partir de los 45 días, Esta respuesta a los medios enriquecidos, posiblemente es debido al complejo orgánico rico en almidones que ofreció el extracto de papa, los cuales son una fuente de azúcares importantes para embriones carentes de reservas alimenticias característicos de las semillas de orquídeas. (Fig. 14).

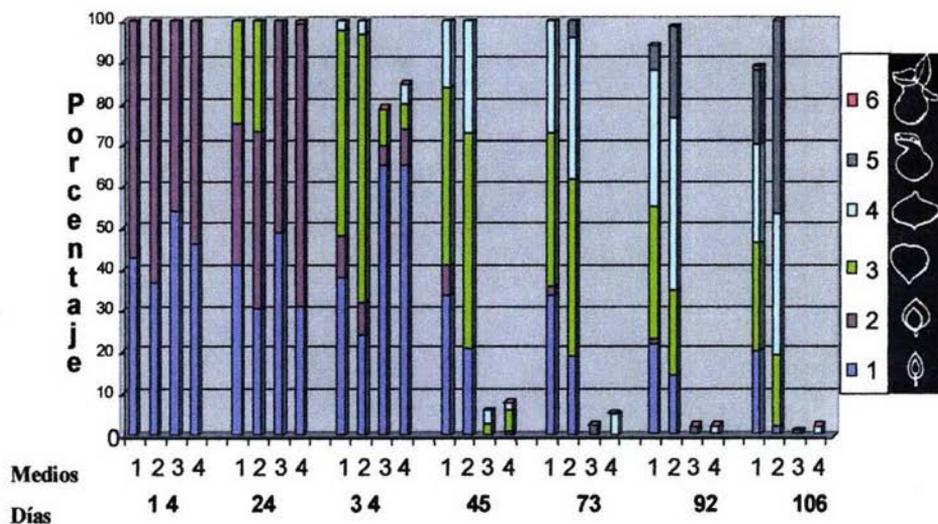


Figura 14. Porcentajes de aparición de etapas de desarrollo de *L. albida* indicados en el recuadro en cuatro medios de cultivo. Etapas: 1) semillas sin germinar, 2) semillas hinchadas, 3) protocormos, 4) plántulas con una hoja, 5) plántulas con dos hojas y 6) plántulas con rizoides. Medios de cultivo: 1= KC 4128+ papa, 2=KC 4003+ papa, 3= KC 4128, 4= KC 4003.

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1. DISTRIBUCIÓN REGIONAL

La distribución regional de *Laelia albida* en el valle de Zapotitlán Salinas correspondió a la zona Suroeste del poblado de Zapotitlán (Fig. 3), la cual es relativamente menos árida con respecto al norte del poblado. Con datos basados en sistemas computarizados de modelaje bioclimático (Comunicación personal de Dr. Oswaldo Téllez) esta zona presenta en promedio 2°C menos, por lo que probablemente, este sea uno de los factores que contribuyan a que la distribución regional de *L. albida* se encuentre en la zona a la que los pobladores de la región denominan la “árida alta”, debido a que se “siente menos calor” y puede atribuirse que dichas condiciones ambientales sean más propicias para que habite la especie. Además, el hecho de que crezca en diversos soportes (Cuadro 2) tanto de forma silvestre como en los huertos de forma silvestre-trasplantada-fomentada y el que para los individuos silvestres predomine el tipo de vida litófito (sobre rocas o peñascos), sea otro de los factores que contribuyan a la adaptación de la especie a las condiciones semiáridas de la región.

10.2. VARIABILIDAD GENÉTICA

Los individuos dentro de las poblaciones de *L. albida* se encuentran más relacionados entre sí que al comparar individuos entre diferentes poblaciones, ya que se pueden apreciar las agrupaciones que se forman de estos tanto en el dendrograma (UPGMA) (Fig.7) como en el PCO (Fig.8). Por ejemplo se observa una clara agrupación en los individuos del sitio Acatepec y una gran divergencia entre los individuos de este sitio con los del sitio Los Reyes Mezontla o de estos con los del sitio Cerro Gordo. Esta forma en que se distribuye la diversidad dentro y entre poblaciones se corroboró con el análisis de AMOVA, detectándose que la mayor variación genética se encuentra dentro de las poblaciones que entre las poblaciones de *L. albida* donde $[V(B)] = 69.65\%$ y $[V(A)] = 30.35\%$ respectivamente. Sin embargo, con el índice de Shannon se obtuvo que la proporción de diversidad dentro de las poblaciones (H_{pop}/ H_{sp}) fue de 0.437 y la proporción de diversidad entre poblaciones ($H_{sp} - H_{pop}/ H_{sp}$) fue de 0.562.

Con el uso de análisis multivariados con marcadores RAPDs como el PCO se proporciona un análisis de la similitud o disimilitud genética y por lo tanto de las agrupaciones de las muestras como señalan Sangwan *et al.* (2001) y Semagn *et al.* (2001). Por lo tanto se puede apreciar en *L. albida* que los sitios que presentan mayor agrupación pertenecen a los individuos silvestres-trasplantados-fomentados dentro de los huertos. Estos datos de algún modo confirman la información etnobotánica acerca del intercambio de propágulos entre algunos huertos y sugieren la probable ruta de sus colonias desde sitios silvestres como los de Cerro la Yerba hacia Terreno Coronelas o hacia San Juan Raya.

La estimación de la variabilidad genética en la población de *L. albida* del Valle de Zapotitlán con el análisis de varianza molecular (AMOVA) y el índice de Shannon fue de $\Phi_{ST} = 0.303$ y $G_{ST} = 0.558$ respectivamente, estos valores son similares al la $G_{ST} = 0.395$ reportada para la orquídea *Goodyera procera* e indican que la variabilidad genética en la población es escasa. Las especies con autofecundación se caracterizan por tener niveles de diferenciación genética cercanas a $\Phi_{ST} = 1$ (afinidad genética) y una relativa uniformidad dentro de las poblaciones, mientras que en las especies con entrecruzamiento tienden a ser más diversas dentro de las poblaciones y con poca diferenciación genética entre las poblaciones. (Hamrick y Godt, 1996. citado por Bussell, 1999). Aunque la mayoría de las especies de orquídeas son autocompatibles, la estructura floral favorece la polinización cruzada, además esta estructura en las flores esta adaptada de tal forma que no ocurra autopolinización en algunos grupos de orquídeas. Esto ha generado una amplia diversidad donde es posible que algunas especies sean autógamas, otras nunca lo sean y otras puedan serlo o no dependiendo de las condiciones oscilantes del ambiente en que habitan (Luna y Barba, 1995). Los valores de variabilidad genética en *L. albida* son comparables a los reportados para especies de plantas con autogamia o autofertilización $G_{ST} = 0.329$ en plantas perennes, $G_{ST} = 0.433$, $G_{ST} = 0.523$ en plantas anuales, que para los valores de especies con entrecruzamientos $G_{ST} = 0.024$, $F_{ST} = 0.250$, $\Phi_{ST} = 0.186$, $G_{ST} = 0.118$, estos valores están basados en sondeos realizados por Godt y Hamrick, (1996) y por Bussell (1999) este último comparó la estimación de diversidad genética como la G_{ST} , F_{ST} , y Φ_{ST} a



partir de datos de RAPDs con métodos de análisis como el índice de Shannon y el AMOVA de varias investigaciones realizadas en diversas plantas. Tanto G_{ST} , como Φ_{ST} son parámetros de medición de diversidad genética comparables a la F_{ST} de Wright (1951).

Frankham (1996) menciona que la información genética de una población propagada asexualmente tiende a permanecer constante e igual a la de los progenitores, en el caso de *L. albida* existe la posibilidad de encontrar individuos clonales en una colonia de orquídeas los cuales son promovidos por la reproducción vegetativa a partir de yemas basales de los pseudobulbos. Lo anterior da lugar a otra posible respuesta de la baja variación genética encontrada para la población de *L. albida* del Valle de Zapotitlán ya que como señala Wong y Sun (1999) esta puede ser debida a la presencia de numerosas flores en una sola inflorescencia por lo que se facilita la polinización geitonogámica y autogámica, por lo tanto la ocurrencia de endogamia es probable. Es importante mencionar que los muestreos se realizaron tomando una hoja de un pseudobulbo de cada colonia de *L. albida* encontrada en los diferentes soportes para evitar muestrear posibles clones.

El manejo etnobotánico del trasplante de propágulos (pseudobulbos) de sitios silvestres a los huertos familiares, que se da en la población *L. albida*, puede a largo plazo causar cambios en ésta. Uno de estos cambios pueden ser sobre la deriva génica, ya que se ha encontrado en otras investigaciones que especies de plantas con algún tipo de manejo etnobotánico, a largo plazo pueden alterar la estructura espacial y genética de las poblaciones, (Cibrian, 2000; Chan y Sun, 1997). Para *L. albida* se detectó una heterocigocidad relativamente mayor en los individuos silvestres que en los individuos silvestres- trasplantados -fomentados en los huertos (Cuadro 5), esto es debido a que los individuos silvestres no están bajo una presión antropogénica como los individuos fomentados los que a pesar de que no presentan algún tipo de manejo individual o integral dentro de los huertos, se corrobora el hecho de que cualquier tipo de manipulación de los recursos vegetales, a largo plazo, tiene diversos efectos sobre estos como son: la disminución de la variación genética, cambios en la distribución geográfica



de las poblaciones de las especies y además se operan cambios en los sistemas de reproducción (Cibrian, 2000; Chan y Sun, 1997; Casas *et al.*, 1997; Aldrich *et al.* 1992; Abo-elwafa *et al.* 1995). Chan y Sun (1997) mencionan que una mayor variabilidad genética en los individuos silvestres favorece su supervivencia bajo condiciones naturales y encontró en otros estudios que las especies silvestres mantienen generalmente un nivel más alto de polimorfismo comparado a las especies cultivadas. Para el caso de *L. albida* en el Valle de Zapotitlán los resultados obtenidos muestran un efecto muy similar.

Al establecerse nuevas poblaciones por intervención del hombre, se estará promoviendo que la selección natural opere en ellas de manera diferente que con las poblaciones silvestres (Alcorn, 1984; Casas *et al.*, 1996). En el caso de especies trasplantadas, si los propágulos son derivados continuamente de poblaciones presentes en algún tipo de hábitat particular como en el caso de huertos, se estarán favoreciendo plantas cada vez más adaptadas a las condiciones de dicho hábitat como en el caso de *L. albida*. Un ejemplo de los efectos producidos en las poblaciones de plantas por actividades humanas en tres especies de orquídeas: *Eulophia sinensis*, *Spiranthes hongkongensis* y *Zeuxine strateumatica*, es proporcionado por Sun y Wong (2001) y Sun (1997). Estos efectos actúan sobre: 1) los niveles y organización de la variación genética en las poblaciones, 2) la diferenciación local de las poblaciones, 3) los sistemas de reproducción asociados con los procesos de colonización. Se encontró que la falta de diversidad entre las poblaciones de estas especies es ocasionado por el efecto fundador y el restringido número de individuos en las poblaciones asociados a la deriva génica. En la población de *L. albida* se ha encontrado que la variación genética es escasa, que existe una relativa divergencia entre las poblaciones silvestres de las poblaciones trasplantadas-fomentadas en los huertos y que existe una tendencia a existir solo reproducción asexual en las poblaciones de los huertos.

10.3. ESTRUCTURACIÓN DE LAS POBLACIONES

Los sistemas de reproducción y la dispersión de polen y semillas son factores que influyen fuertemente en la estructura genética de las poblaciones naturales de plantas



(Hamrick y Godt, 1989; Falk y Holsinger, 1991; Giles *et al.*, 1998). La divergencia que existe entre las poblaciones de *L. albida* sugiere una tendencia a la estructuración de la población en el valle de Zapotitlán, además que los individuos de los huertos se están aislando de los individuos silvestres. Esta estructuración puede ser como resultado de una selección artificial, aunque no muy estricta, que propicie que los agentes polinizadores de *L. albida* no fluctúen en altitudes menores a las que se presentan en las poblaciones silvestres, esto es debido a que no se detectó flujo génico significativo para la población de *L. albida* (Cuadro 8). Este tipo de estructuración es comparable al modelo de piedras de paso (stepping-stone) de Slatkin (1989) en el que la migración se da exclusivamente entre subpoblaciones vecinas o adyacentes, es decir que no existe el apareamiento al azar y se puede originar la endogamia.

Teóricamente el nivel de diferenciación genética entre poblaciones, y entre parches dentro de poblaciones, debe ser más bajo en especies no compensadoras de néctar que en plantas compensadoras de néctar, esto es porque los entrecruzamientos en las poblaciones cercanas son menos frecuentes y la dispersión del polen es a más distancia que en especies compensadoras de néctar (Alexandersson y Agren, 2000; Peakall y Beattie, 1996). En la población de *L. albida* ocurre al contrario ya que las flores de esta especie no son compensadoras de néctar, pero sus flores emanan un fuerte aroma dulce lo que posiblemente atrae por engaño a los agentes polinizadores; Sin embargo, para poder corroborar este hecho se hace necesario emprender estudios más específicos del proceso de polinización en esta especie.

El proceso de estructuración genética en *L. albida* es posible que se deba también a que las semillas al dispersarse por viento tengan dificultades para germinar y producir nuevos individuos por su misma naturaleza, es decir, por la falta de endospermo y encontrar las condiciones ambientales adecuadas para germinar y su asociación simbiótica con el hongo específico para esta especie como sucede con las orquídeas *Cypripedium calceolus* var. *Pubescens* y *Epipactis helleborine*.

10.4. FLUJO GÉNICO

En la población de *L. albida* se observó que se produce una gran cantidad de inflorescencias con varias flores en una colonia y la fructificación es algo similar que probablemente es originada por polinización geitonogámica o por polinización cruzada pero con las poblaciones más cercanas, debido a que en *L. albida* el valor de flujo génico fue de $N_e m = 0.48$ obtenido a partir de la Φ_{ST} del AMOVA, el cual es un valor cercano al de *Goodyera procera* $N_e m = 0.221$, ambos valores son más bajos comparados a los niveles reportados para *Orchis longicornu* $N_e m = 3.7$, *Orchis papilionacea* $N_e m = 5.9$, *Orchis morio* $N_e m = 4.0$ y *Pterostylis gibbosa* $N_e m = 6.51$. Sharma *et al.*, (2000) señala que el alto flujo obtenido en *P. gibbosa* es debido a una gran transferencia de genes en las poblaciones por los agentes polinizadores que recorren grandes distancias y por la dispersión por viento de las semillas en áreas grandes. Considera que los vientos en verano influyen considerablemente al dispersar a grandes distancias a las semillas y por supuesto encuentran las condiciones idóneas para germinar.

Considerando que la respuesta que todo ser vivo presenta ante una situación adversa en el ambiente es dado en gran parte por la variación genética y que una pérdida de esta variación puede reducir la capacidad de las poblaciones a adaptarse a cambios en el ambiente, se deduce que en la población de *L. albida* del Valle de Zapotitlán puede estar reduciendo esta capacidad al detectar que los niveles de variación genética son bajos en la población y el consecuente proceso de estructuración de la población. Por lo que es necesario iniciar con el diseño y planeación de estrategias de conservación hacia esta población en el Valle, sobre todo de germoplasma silvestre y de un trabajo conjunto entre la investigación científica y el conocimiento tradicional de los propietarios del recurso mediante la sensibilización y la planeación de medidas alternativas de aprovechamiento, uso y manejo sostenible (Apéndice I y II)



10.5. VIABILIDAD, GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE SEMILLAS EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.

Los porcentajes de viabilidad de las semillas tanto para el lote 1(1 año de almacenamiento) como para el lote 2 (2 años de almacenamiento) de *L. albida* (Fig. 9) se mantuvieron en un rango de 90-98% y 78-88% respectivamente. Estos porcentajes son más altos comparados a los reportados por Ortiz (2001), para semillas de esta misma especie. Ambos experimentos se realizaron en forma paralela, en el caso de Ortiz, las semillas se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, fotoperíodo, variando sólo en el uso de un desecante que colocaban en el recipiente donde se almacenaba la semilla. Por lo que se concluyó que la diferencia en estos resultados, se debió principalmente al uso de desecante, más que por la temperatura de almacenamiento. Esta temperatura de 4 °C es comparable a lo que reporta Roberts (1983) quien sostiene que muchas semillas pueden conservar su viabilidad si se almacenan a una temperatura en un rango de 0 a 5° C. Los valores de viabilidad coinciden con los hallados por Seaton y Hailes (1989) quienes encontraron un 60% de viabilidad en semillas de *Cattleya aurantiaca* con un almacenamiento a 5° C y con un contenido de humedad de 5 - 6 %, es importante mencionar que en el presente estudio no se realizaron mediciones del contenido de humedad, sin embargo se podría inferir que el contenido de humedad en las semillas de *L. albida* humedad osciló entre estos porcentajes sugerido por los porcentajes de viabilidad encontrados. Algunos autores mencionan que la viabilidad de las semillas aumenta con condiciones apropiadas de almacenamiento pues se hacen más lentos los procesos de la respiración y otros procesos metabólicos sin causar daño al embrión, señalan también que dentro de los factores que influyen en el almacenamiento de semillas se encuentra el contenido bajo de humedad de la semilla, el tipo de semilla (ortodoxa, recalcitrante o intermedia), la disponibilidad de oxígeno en el almacén, el tipo de almacenamiento y 6) la condición de la semilla al inicio del almacenamiento (Way *et al.*, 2000; Boeken y Gutterman, 1990; Seaton y Hailes, 1989; Ellis y Roberts, 1980). Se puede suponer que, por las respuestas observadas de las semillas de *L. albida* en las condiciones de almacenamiento, corresponden al tipo ortodoxas ya que dentro de las características de este tipo de

semillas es que son de tamaño pequeño y con un contenido de humedad de 5 a 10% de su peso fresco. El almacenamiento en ambos lotes de semillas correspondió al tipo seco que se refiere al almacenamiento en cuartos especiales a bajas temperaturas entre 0°C a 6°C en envases cerrados, este es uno de los tipos de almacenamiento que incrementa la longevidad en las semillas al disminuir la respiración de las semillas porque se controla el contenido de humedad inicial y evita intercambios de humedad con el ambiente (Hong *et al.*, 1998; Dickie *et al.*, 1990).

Cuando las muestras de semillas se encuentran almacenadas por tiempos prolongados es importante realizar un monitoreo constante de los parámetros de germinación y viabilidad como señalan Linington y Pritchard (2000). Por esto en la evaluación de las semillas de *L. albida* se obtuvo que los porcentajes de germinación para el lote 1, fueron entre 80-90% y para el lote 2 de 70-80% en el transcurso de 11 meses. Pierik *et al.* (1988) mencionan que el índice de germinación es el parámetro que indica con precisión el comportamiento de germinación de las semillas, menciona que evaluar la germinación en semillas de orquídeas es complejo, pues mientras algunos autores evalúan la germinación cuando los embriones empiezan a tornarse verdes y otros cuando empiezan a formarse los protocormos, ellos idearon unas ecuaciones en base a la frecuencia de las etapas de germinación desde cuando el embrión empieza a fotosintetizar, aumenta su volumen por efecto de imbibición, rompe la testa y emerge el protocormo, de esta forma, se consideran todas las etapas y señala que cuando los índices de germinación se encuentran por arriba de 9 indican una probabilidad alta de desarrollar plántulas a mayor frecuencia de embriones rompiendo la testa y de protocormos, por lo tanto se puede apreciar en la figura 10, que existieron diferencias significativas con respecto a los índices de germinación tanto en los lotes de semillas ($p=0.000000$) como en los dos medios de cultivo Knudson C (SIGMA 4128 y 4003) ($p=0.000013$) (Fig. 11). Se observa un relativo decremento de la viabilidad e índice de germinación (Fig. 9, 10) de las semillas del lote 2 a partir del sexto mes de evaluación, esto probablemente está indicando el inicio de un proceso de envejecimiento en dicho lote, que puede ser causado por cambios que ocurren en los tejidos o células del embrión por las circunstancias de almacenamiento o bien por el envejecimiento natural



de las semillas como señalan Bewley y Black (1994). Las diferencias significativas en los medios de cultivo pudieran deberse a las concentraciones molares de elementos minerales, particularmente el medio KC 4003 contiene doble concentración molar de calcio a diferencia de KC 4128, este mineral es incluido en el medio de cultivo como cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o como nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y dentro de las características que tiene el calcio es que facilita el movimiento de los carbohidratos y aminoácidos por toda la planta y promueve el desarrollo de la raíz, por lo que, las semillas de orquídeas al carecer de endospermo y requerir una fuente exógena de carbohidratos, se pueden favorecer aún más con el calcio para poder asimilarlos.

Por otro lado, como ninguna de las dos versiones del medio Knudson C permitió la sobrevivencia de las plántulas, aún con la adición de sacarosa en el medio, se empleó un medio KC alternativo (4128 y 4003 SIGMA) enriquecido con pulpa de papa que permitiera el desarrollo de las otras etapas de crecimiento, la papa como aditivo orgánico se ha empleado en varias especies de orquídeas para incrementar el tamaño del protocormo y el desarrollo de plántulas (Arditti y Ernest, 1984, Islam *et al.*, 2000). Yam y Weatherhead (1988) mencionan que un tejido cultivado *in vitro* puede gradualmente perder su pigmentación verde y tiene que depender de otras fuentes externas de carbono para sobrevivir y que una estructura verde y bien organizada puede mostrar un mejor crecimiento y proliferación por la adición de estos. Con el medio KC suplementado con papa en las semillas de *L. albida*, se obtuvo un gran desarrollo de las etapas de germinación y crecimiento, obteniendo la categoría 6 de plántulas con hojas y rizoides a los 106 días de cultivo, esto puede ser debido al complejo orgánico rico en almidones que ofreció la pulpa de papa, los cuales son una fuente de azúcares importantes para embriones carentes de reservas alimenticias característicos de las semillas de orquídeas (Fig. 14). La mayor cantidad de almidones se encuentran en la corteza y medula externa de la papa (Parsons, 1982), estas estructuras fueron las que se maceraron y emplearon en el medio de cultivo y que posiblemente asimilaron las semillas en cultivo. Es muy evidente que a partir del día 45 en los medios que no tenían ningún suplemento orgánico hubo una mortandad de los embriones, a diferencia de los dos medios suplementados con papa en que gradualmente hubo una aparición de las subsecuentes etapas de

crecimiento. Este es un resultado comparado al trabajo pionero de Harrison y Arditti, (1978) con *Cattleya aurantiaca* en donde observó que la categoría 6 (plántula con rizoide) se formaba al día 100 de cultivo cuando adicionaba sacarosa al medio y que no obtenía crecimiento alguno de los embriones en un medio KC sin sacarosa, sin embargo para las semillas de *L. albida* la sacarosa no fue suficiente fuente de carbohidrato, por lo que requirió aún más de una fuente exógena de azúcares.

IZT.

Aún sin que existiera una correlación positiva entre viabilidad y germinación los porcentajes de ambos parámetros fueron superiores al 70%, este monitoreo en las muestras de semillas de *L. albida* demuestra que la calidad de las mismas no se afectó en este transcurso del tiempo. Se puede por lo tanto, asumir que las condiciones de almacenamiento fueron convenientes para los dos lotes de semillas de *L. albida* que se mantuvieron a 4°C en bolsas de papel dentro de un frasco de vidrio cerrado, sin la presencia de un desecante, al menos por dos años de almacenamiento.



U.N.A.M. CAMPUS



XI. CONCLUSIONES

- ◆ La distribución regional de la población de *L. albida* corresponde a la parte suroeste del poblado de Zapotitlán de las Salinas.
- ◆ Se localizaron cuatro sitios con individuos silvestres y ocho sitios con individuos semicultivados.
- ◆ Etnobotánicamente, el grado de manejo individual de *L. albida* es silvestre-trasplantado-fomentado.
- ◆ Además del uso ornamental, se encontraron otros usos antiguos como comestible y medicinal de los pseudobulbos y medicinal de la flor.
- ◆ La variabilidad genética de la población de *L. albida* es escasa indicado por $\Phi_{ST} = 0.303$ y $G_{ST} = 0.558$.
- ◆ La heterocigocidad es mayor dentro de las poblaciones silvestres (sitios de colecta) (4.069) que entre las silvestres-trasplantadas-fomentadas (2.833).
- ◆ La población presenta un proceso de estructuración dado el bajo flujo génico obtenido $N_e m = 0.48$.
- ◆ El inicio del establecimiento de preservación de las semillas fue idóneo a 4°C indicado por el comportamiento de las semillas en viabilidad, germinación (por arriba del 70% en ambos parámetros) y crecimiento (desarrollo hasta plántula con rizoides en 106 días).
- ◆ En el medio de cultivo KC 4003 se obtuvieron los índices de germinación (9-13) más altos.
- ◆ El medio de cultivo KC 4003 adicionado con pulpa de papa permitió el desarrollo de las plántulas.

XII. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN (61)

El presente trabajo sienta las bases de futuros proyectos de investigación que abordan diferentes aspectos de la biología, conservación y manejo de la especie *L. albida*, como los que se mencionan abajo.

La continuación de estudios etnobotánicos dirigidos hacia la obtención de índices de importancia, del uso antiguo, etc., con la aplicación de análisis estadísticos, permitirán dentro el contexto del manejo, la ubicación de importancia de esta especie con respecto a otras especies vegetales de la zona, a fin de diseñar estrategias de conservación y manejo.

La determinación de la diversidad genética de otras poblaciones de la especie a lo largo de su distribución en el país, aportarían información importante para esclarecer las diferencias genéticas entre las poblaciones de esta especie.

El conocimiento de la ecología de la polinización proporcionaría información del comportamiento de los polinizadores y de los procesos de post-polinización. Además, la realización de estudios sobre la variación temporal y espacial de esta especie, como señalan Gillman y Dodd (1998) permitirían complementar información para las acciones de conservación.

El establecimiento de crioconservación de semillas, micropropagación y reintroducción de material al hábitat natural, permitirían ejecutar de manera consistente planes de conservación. Por otro lado, contar con material disponible para el uso en huertos o invernaderos, es una acción indispensable para su aprovechamiento.

El fomento de conservación *in situ* mediante la sensibilización, uso y manejo racional de los depositarios del recurso. Además del inicio de la capacitación técnica a los pobladores para la creación de invernaderos regionales y/o intercambio de material entre los huertos, la elaboración de un plan para la obtención de híbridos entre los



genotipos más variables y la practica de métodos hortícolas. Con la finalidad de poder convertir este recurso natural en un recurso económico a futuro

La retroalimentación entre el conocimiento popular y tradicional de las comunidades rurales con la investigación científica.



BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, E. A y E. J. Vincent. 1994. Conceptos Básicos de Cultivo de Vegetales. CATIE.
- Abo-elwafa, A. F y M. T. Shimada. 1995. Intra and inter-specific variations in Lens revealed by RAPD markers. *Theoretical Applied Genetic*, 90: 335-340.
- Adams, R. P y J.E. Adams. 1991. Conservation of plant genes DNA banking and in vitro biotechnology. Academic Press. INC. New York.
- Alcorn, J. B. 1984. Huastec mayan ethnobotany. University of Texas Press Austin, Texas. 982 p.
- Aldrich, P. R; J. Doebley; K. F. Schertz y A. Stee. 1992. Patterns of allozyme variation in cultivated and wild *Sorghum bicolor*. *Theoretical Applied Genetic*, 85: 451-460.
- Alexandersson R y J. Agren. 2000. Genetic structure in the nonrewarding, bumblebee-pollinated orchid *Calypso bulbosa*. *Heredity*, 85: 401-409.
- Allnut, T. R; A. C. Newton; A. Lara; A. Premoli; J. J. Armesto; R. Vergara y M. Gardner. 1999. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (Alerce) a threatened South American conifer. *Molecular Ecology*, 8 (6): 975- 987.
- Amos, B y A. R. Hoezel. 1992. Applications of molecular genetics techniques to the conservation of small populations. *Biological Conservation*, 61: 133-144.
- Arditti, J y A.K.G. Abdul. 2000. Numerical and physical proprieties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytology*, 145: 367-421.
- Arditti, J. R. 1992. Fundamentals of orchid Biology. John Wiley & Sons. USA
- Arditti, J y R. Ernest. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. Pp. 177-222. in J. Arditti (ed.), Orchid biology: Reviews and perspectives, III. Cornell University. Press. Ithaca, New York.
- Arduino, P. R. C; W. Rossi; B. Corrias y L. Bullini. 1995. Genetic variation in orchis papilionaceae (Orchidaceae) from the central mediterranean region: Taxonomic inferences at the intraspecific level. *Plant Systematics and Evolution*, 194: 9-23.
- Arft, A. M y T. A. Ranker. 1998. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis*. *American Journal of Botany*, 85: 1110-1222.
- Ayad, W.G. 1997. Molecular genetics techniques for plant genetics resources.
- Bewley, J. D y M. Black. 1983. Seeds- physiology of development and germination. Plenum Press. USA. 367 p.

- Bassols, S. L. 1982. Geografía, subdesarrollo y regionalización. Nuestro tiempo, México, D.F. Turrialba, Costa Rica.
- Becker, J; M. Vos P Kuiper; F. Salami y M. Huen. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular Genetic*, 249: 65-73.
- Bidwell, R. G. S. 1979. Fisiología Vegetal. AG editor. México D.F.
- Boeken, B y Y. Gutterman. 1990. The effect of temperature on seed germination in three common plants of different habitats in the Central Negev desert of Israel. *Journal and Environment*, 18: 175-184.
- Bowen, W. B. 1999. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology*, 8: 5-10.
- Bonnin, I; T. Huguet; M. Gherardi; J. M. Proserpi y I. Olivieri. 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany*, 83 (7): 843-855.
- Bouzat, J. L. 2001. The population structure of the greater rhea *Rhea americana* in an agricultural landscape. *Biological Conservation*, 99:227-284.
- Bussell, J. D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst population of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, 8: 775-789.
- Casas, A; A. Valiente-Banuet; J. L. Viveros; J. Caballero; L. Cortés; P. Dávila; R. Lira e I. Rodríguez. 2001. Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán valley, México. *Economic Botany*, 55 (1): 129-166.
- Casas, A. 1997. Evolutionary trends in *Stenocereus stellatus* (Pfeiffer) Riccobono under domestication. Inglaterra, The University of Reading.
- Casas, A y J. Caballero. 1996. Traditional management and morfological variation in *Leucaena esculenta* (Moc. Et. Sessé ex A. DC) Benth. (Leguminosae: Mimosoideae) in the Mixtec region of Guerrero, México. *Economic Botany*, 50: 167-181.
- Casas, A y J. Caballero. 1995. Domesticación de plantas y orígenes de la agricultura en Mesoamérica. *Ciencias*, 40:36-45.
- Case, M. A. 1994. Extensive variation in the levels of genetic diversity and degree of relatedness among five species of *Cypripedium* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 81 (2): 175-184.
- Chakaborty, R y J. Bogemans. 1997. Determination of relatedness of different ecotypes of *Aster tripolium* germplasm by RAPD analysis. *Belg.J.Bot*, 83: 51-57.

- Chan, K. F y M. Sun. 1997. Genetic diversity and relationship detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theoretical Applied Genetic*, 95: 865-873.
- Cheng-Kur-Ta y Chou-T.W. 1997. Identification of some *Anoectochilus* sp with RAPD markers. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 35 (1): 18-25.
- Cruzan, B. M. 1998. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology*, 79 (2): 400-412.
- Cibrian, J. A. 2000. Variación genética de *Vainilla planifolia* en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Crow, J. F y K. Aoki. 1984. Group selection for a polygenetic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 81: 6073-6077.
- Dávila, P; J. Villaseñor; R. R. A. Medina; A. Salinas; J. Sánchez-Ken y P. Tenorio. 1993. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Listados florísticos de México X. Instituto de Biología UNAM, México D.F.
- Dellaporta, S. L; J. Wood y J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: versión II. *Plant Molecular. Biological Reporter*, 1: 19-21.
- De Pauw, M. A y W. R. Remphrey. 1992. In vitro of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media and cold treatment. *Canadian Journal of Botany*, 71: 879-885.
- Del Rio, A. H; Bamberg, J. B; Huaman, Z; Salas, A; Vega, S. E. 2001. Association of ecogeographical variables and RAPD marker variation in wild potato populations of the USA. *Crop Science*, 41(3): 870-878.
- Diario Oficial de la Federación. Lunes 16 de octubre del 2000, México D. F.
- Diario Oficial de la Federación. Lunes 16 de Mayo de 1994, No. 10, México D. F.
- Dickie, J. B; R. H. Ellis; H.L. Kraak; K. Ryder y P.B. Tompsett. 1990. Temperatura and seed storage longevity. *Annals of Botany*, 65: 197-204.
- Dressler, R.L. 1985. The orchids: natural history and classification. Harvard University. Press.
- Dressler, R. L. 1981. "The orchids". Harvard. University. Press. England.
- Ehrlich, P y A. Ehrlich. 1981. Extinction: the causes and consequences of the disappearance of species. Ballantine Book. New York.

- Eguiarte. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. Ciencias. UNAM. 35-61p.
- Eguiarte, E. L y D. Piñero 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias*. 4: 34-47.
- Ellis, R. H y E. H. Roberts. 1980. Towards a rational basis for testing seed quality. In seed production. Hebblethwaite. Betterworth, London. 605-635 p.
- Excoffier, S. P. E y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA restriction data. *Genetics*, 131: 179-191.
- Falk, D. A y K. E. Holsinger. 1991. Genetics and conservation of rare plants. Oxford University. Press. 283 p.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10 (6): 1500-1508.
- García, H. J. L. 1993. Germinación asimbiótica de semillas de orquídea in vitro (*Catasetum* sp). Tesis licenciatura. FES, Cuautitlán. UNAM.
- Gardner, E.J. 1989. Principios de genética. Ed. Limusa, México, D. F. 693 p.
- Gary, J. M. 1995. Ethnobotany a methods manual. Chapman & Hall. London.
- Gillman, M. P. y M. E. Dodd. 1998. The variability of orchid population size. Orchid population biology, conservation and challenges. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 65-74.
- Giles, B. E; E. Lundvist y J. Goudet. 1998. Restricted gene flow and subpopulation differentiation in *Silene dioica*. *Heredity*, 80: 715-723.
- Given, R. D, y W. Harris. 1994. Techniques and methods of ethnobotany. Lincoln, Canterbury, New Zealand. Commonwealth. Secretariat.
- Godt, M. J y J. L. Hamrick. 1996. Genetic structure of two endangered pitcher plants, *Sarracenia jonessii* and *Sarracenia oreophila* (Sarraceniaceae). *American Journal of Botany*, 83: 1016-1023.
- Goldstein, P. Z; R. Desalle; G. Amato y A. P. Vogler. 2000. Conservation genetics at the species boundary. *Conservation Biology*, 14 (1): 120-131.
- Guadagnuolo, R; D. S. Banchi y F. Felber. 2001. Specific genetic markers for wheat, spelt, and four wild relatives: comparison of isozymes, RAPDs, and wheat microsatellites. *Genome*, 44 (4): 610-621.

- Halbinger, F. y M. A. Soto. 1997. Laelias de México. México D.F. Asociación Mexicana de Orquideología A. C. 1-71p.
- Halbinger, F. 1993. Laelias de México. Ed. M. Soto. Asociación Mexicana de Orquideología A. C. 71 p.
- Hamrick, J. L; M. J. W. Godt. 1995. Conservation genetic of endemic species. In J. C. Avise and J. L. Hamrick (eds), Conservation genetics, 281-304. Chapman and Hall, new York, NY.
- Hamrick, J. L; M. J. W. Godt; D. A. Murawski y M. D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity implications for conservation biology. Oxford University Press, New York Oxford. 75-86 p.
- Hamrick, J. L y M. L. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. Plan population genetics, breeding and genetics resources. Sinauer Associates, sunderland. 43-63 p.
- Harrison, C. R. y J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Bot. Gaz*, 139 (2): 180-189.
- Hartl, D. 1999. A primer of population genetics. 3ª Ed. ISBN.
- Hedrén, M; M. F. Fay y M. W. Chase. 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae).
- Hilu, K. W y H. T. Stalker. 1995. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis sect. Arachis* (Fabaceae): evidence from RAPDs. *Plant Sistematics and evolution*. 198: 167-178.
- Hong, T.D; N. E. Jenkins; R. H: Ellis y D. Moore. 1998. Limits to the negative logarithmic relationships between moisture content and longevity in conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Annals of Botany*, 81: 625-623.
- Ichuhashi, S. 1989. Seed germination of *Ponerorchis graminifolia*. *Lindleyana*, 4 (4): 161.163.
- INE-SEMARNAP. 1997. Reserva de la Biosfera Tehuacan-Cuicatlán, Puebla. México, D.F.
- Islam, O. M ; S. Matsui y S. Ichihashi. 2000. Effects of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. *Lindleyana*, 15(2): 81-88.
- Jauhar, P. P. 1996. Methods of genome analysis in plant. CRC. Press. New York, London.



- Kang Fu Yu; A. Van Deynze y K. P. Pauls, 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Methods in plant molecular biology and biotechnology. CRC. Press. London. 287-300p.
- Kishi, F y K. Takaji. 1997. Efficient method for the preservation and regeneration of orchid protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae*, 68: 149-156.
- Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz*, 73: 1-25.
- Koerdell, M. M; X. E. Hernández; A. Barrera; J. Caballero. 1979. La Etnobotánica: Tres puntos de vista y una perspectiva. INIREB, Xalapa, Ver.
- Kozai, T; C. Kubota y R. B. Jeong. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 51: 49-56.
- Krauss, S.L. 2000. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, 9: 1241-1245.
- Light, M. H. S y Mac CONAILL. 1998. Factors affecting germinable seed yield in *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Willd) Correl and *Epipactis helleborine* (L) Crantz (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126: 3-26.
- Linnington, H. S y W. H. Pritchard. 2000. Gene banks. Encyclopedia of Biodiversity. Levin S. Academic. Press. 23p.
- Lim, S. H.; C. F. Liew; C. N. Lim; Y. H. Lee y C. J. Goh. 1997. A simple and efficient method of DNA isolation from orchids and hybrids. *Biologia Plantarum*, 41 (2): 313-316.
- Loveless, M. D y J. L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Ann. Rev. Ecol. Syst*, 15: 65-95.
- Luna, R. B. S. 1982. Propagación in vitro de *Laelia anceps* var. *alba*. Tesis Licenciatura. FES, Cuatitlán. UNAM.
- Luna, R. S y A. A. Barba. 1995. Ecología general de las orquídeas. *Boletín de investigación*. 2 (1): 10-16.
- Lynch, M y B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99.
- Mackill, D; E. Zhang; E. Redona y P. Colowit. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*, 39: 969-977.

- Maughan, P; M. Shagay Maroof, G, Buss y G. Hustis. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet*, 93: 392-401.
- Manly, B. F. J. 1997. Randomization, Bootstrap and Montecarlo methods in biology. Chapman & Hall, UK.
- Martínez, C. F. 1970. Pegamentos, gomas y resinas en el México prehispánico. México, D. F. Resistol, S. A. 69 p.
- Martínez, P A. 1991. Propagación masiva in vitro y recuperación de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Montalvo, M. A; G.S. Conard; T.M. Conkle y D.P. Hodgskiss. 1997. Population structure, genetic diversity and clone formation in *Quercus chrysolepis* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 84 (11): 1553-1564.
- Moreno, M E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM.
- Mostafa K T; A. Osama; E. El-Kholi; M. V. Hildgate; D. F. McMichael y R. E. Munn. 1992. The World Environment 1972-1992: Two decades of Challenge. Chapman and Hall. pp 884.
- Navarro, Q. A. R. 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave sunsimplex* (Trel.) en el desierto sonorense a partir de RAPDs. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Neiland, M. R. M y C. C. Wilcock. 1998. Fruit set, nectar reward and rarity in the orchidaceae. *American Journal of Botany*, 85 (12): 1657-1671.
- Newbury, H. J y B.V.Ford-Lloyd. 1992. The use of RAPD for assesing variation in plants. *Plan Growth Regulation*. 36: 1-9.
- Núñez-farfán, J y L. E. Eguiarte. 1999. La evolución biológica. Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. Conabio. 455 p.
- Ortega, P.R. 1992. Conservación por bancos de germoplasma. Apuntes para el curso de Recursos fitogenéticos para profesores de la UACH. Mimeógrafo. UACH.
- Ortiz, M. M. V. 2001. Viabilidad de las semillas de tres especies de orquídeas del Valle de Tehuacán, Puebla, bajo condiciones de almacenamiento. Tesis de Licenciatura. Fes Iztacala. UNAM.
- Otero, A. a. M. de la Cruz y K. Oyama. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. México*. 60: 85-117.

- Parsons, D. B. 1982. Manuales para educación agropecuaria. Papas: producción vegetal. Trillas. México.
- Paredes, F. M. 2001. Contribución al estudio etnobotánico de la flora útil de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. 109 p.
- Peakall, R.; P. E. Smouse y D. R. Huff. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of *Dioecious buffalograss* Buchloë dactyloides. 4: 135-147.
- Pérez, T.; J. Albormoz y A. Dguez. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, 7:1347-1357.
- Petit, J.R.; E.A. Mousadik y O. Pons. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation biology*, 12 (4): 844-855.
- Piepho, H. P. 2001. Exploiting quantitative information in the analysis of dominant markers. *Theoretical Applied Genetic*, 103: 462-468.
- Pierik R L. 1990. Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. Mundi Prensa, Madrid.
- Pierik, R. L. M.; P. A. Sprenkels; B. Van der Harst y Q. C. Van der Meys. 1988. Seed Germination and Further Development of Plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. in vitro. *Scientia Horticulturae*, 34: 139-153.
- Pritchard, H.W. 1993. Orchid seed storage: historical perspective current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana*, 14: 89-104.
- Rabouam, C.; A.M. Comes; V. Bretagnolle; F.J. Humbert; G. Periquets y Y. Bigots. 1999. Features on DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology*, 8: 493-503.
- Ramírez, H. 1996. Contribución al conocimiento de la flora medicinal de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias. UNAM.
- Ramsay M. M. y J. Stewart. 1998. Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. Orchid population biology: conservation and challenges. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126: 173-181
- Reiter R.S.; J. G. K. Feldmann; J. A. Rafalski; S. V. Tingey y P. A. Scolnik. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Proceedings of the National Academy of Science. USA. 89: 1477-1481.
- Roberts, E.H. 1983. Predicting the storage life of seed. *Seed Science and Technology*, 1: 499-514.



- Rojas, A. M. 1995. Estudios sobre la germinación de cactáceas del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Rublo, A. V; A. P. Chávez y O. V. Martínez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. *Biological conservation*, 63: 163-169.
- Sangwan, N; U. Yadav; R. Sangwan. 2001. Molecular analysis of genetic diversity in elite Indian cultivars of essential oil trade types of aromatic grasses (*Cymbopogon* species) *Plant Cell Reports*, 20 (5): 437-444.
- Schmitt, J; S. A. Dudley y M. Pigliucci. 1999. Manipulative approaches to testing adaptive plasticity: phytochrome-mediated shade-avoidance responses in plants. *The American Naturalist*, 154:543-553.
- Seaton P T y Hailes N S J. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. *Modern Methods in Orchid Conservation: the role of Physiology, Ecology and Management*. Pritchard (ed). Cambridge University, Press.
- Semagn, K; A. Bjornstad; B. Stedje y E. Bekele. 2000. Comparison of multivariate methods for the análisis of genetic resources and adaptation in *Phytolacca dodecandra* using RAPD. *Theoretical Applied Genetic*, 101: 1145-1154.
- Sharma, S. K y J. S. Tandon. 1987. Asimbiotic seed germination and seedling development in *Coelogyne punctulata* and *Aerides multiflorum*. Department Bot. School Life. North-Eastern Hill University Shillong, Meghalaya.
- Sharma, K. J; A. M. Clements y L. D. Jones. 2000. Observation of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 651-663.
- Shoushtari, B. D; R. Heydari; G. L. Johnson y J. Arditti. 1994. Germination and viability staining of orchid seeds following prolonged storage. *Lindleyana*, 9 (2): 77-84.
- Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. México*. 60: 119-122.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural population. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393-430.
- Slatkin, M. 1989. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236:787-792.
- Soto, A. M; E. Hagsater y G. A. Salazar. 2001. La conservación de las orquídeas de México. Simposio conferenciado en el XV Congreso Mexicano de Botánica en Querétaro. Querétaro. pp. 56.



- Soto, A. M. A. 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. *Orquidea*, 11: 233-277.
- Strauss, R. E. 1982. Statistical significance of species clusters in association analysis. *Ecology*, 63: 634-639.
- Szalanski, L. A.; G. Steinauer; R. Bischof y J. Petersen. 2001. Origin and conservation genetics of the threatened ute ladies' tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 88: 177-180.
- Sun, M y K. C Wong. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using rapid and allozyme markers. *American Journal of Botany*, 88 (12): 2180-2188.
- Sun M. 1997. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. *American Journal of Botany*, 84 (2): 224-232.
- Takahashi, K; I. Ogiwara y N, Hakoda. 2000. Seed germination of *Habenaria (Pecteilis) radiata* (Orchidaceae:) *in vitro*. *Lindleyana*, 15 (1): 59-63.
- Valiente-Banuet A; P. Dávila; M. C. Arizmendi; A. Rojas y A.Casas. 1995. Bases Ecológicas del Desarrollo Sustentable en zonas Áridas: El caso de los bosques de cactáceas columnares en el Valle de Tehuacán y Baja California Sur, México. Memorias del IV Curso sobre desertificación y desarrollo sustentable. PNUMA, FAO. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México, pp. 20-36.
- Valiente-Banuet, A; A. Casas; A. Alcántara; P. Dávila; N. F. Hernández; M. C. Arizmendi; J. L. Villaseñor y J. O. Ramírez. 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 67: 24-74.
- Van heusden, A. W y K. Bachmann. 1992. Genotype relationships in *Microseris elegans* (Asteraceae, Lactuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Plant Systematic and Evolution*, 179: 221-233.
- Van Waes, J. M y P. C. Debergh. 1986. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Plant. Physiol*, 66: 435-442.
- Vekemans, X y A. L. Jacquemart. 1997. Perspectives on the use of molecular markers in plant population biology. *Belg. Journ. Bot.* 129 (2): 91-100.
- Villalobos, C. G. 1994. Plantas comestibles en dos comunidades de la Sierra Norte de Puebla: Xochitlán de Vicente Suárez y Zapotitlán de Méndez. Tesis de Maestría. FES. Zaragoza. UNAM.



- Villaseñor, J. L.; P. Dávila y F. Chiang. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Bol. Soc. Bot. México*, 50: 135-149.
- Way, M.; W. Pitchard; J. Terry; C. Wood; P. Dávila; R. Lira; E. Aguirre; C. Flores; A. Ocampo; J. Cuevas; A. López; M. Rivas; E. Cedillo y P. Vera. 2000. Métodos y Técnicas para la colecta y conservación de germoplasma vegetal en las zonas áridas de México. Curso-Taller Internacional. 20-28 septiembre. 56pp.
- Weir, B. S y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.
- Widmer, A.; S. Cozzolino; G. Pellegrino; M. Soliva y A. Dafni. 2000. Molecular analysis of orchid pollinaria and pollinaria-remains found on insects. *Molecular Ecology*, 9: 1911-1914.
- Williams, J. G. W.; A. R. Kubelik; K. J.; J. A. Rafalski y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Wong, C. K y M. Sun. 1999. Reproducible biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 86 (10):1406-1413.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15:323-354.
- Xu, R-Q; Tomooka, N; Vaughan, D.A; Doi, K. 2000. The vigna angularis complex: Genetic variation and relationships revealed by RAPD analysis, and their implications for in situ conservation and domestication. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47 (2): 123-134.
- Yam, T. M y M. A. Weatherhead. 1988. Germination and seedling development of some Hong Kong orchids. *Lindleyana*, 3 (3): 156-160.
- Zavala, H. 1982. Estudio ecológico en el Valle semiárido de Zapotitlán, Puebla. *Biótica*, 1: 88-117.



APÉNDICE I

PERSPECTIVAS DE CONSERVACIÓN DE *L. albida*

El conservar los recursos naturales es una cuestión inquietante desde el punto de vista de qué es lo que hay que conservar, dónde, cómo y cuándo hay que conservar.

Bowen (1999) menciona que existe polémica entre si lo que se preserva son genes, especies o ecosistemas desde el punto de vista de investigadores moleculares, sistemáticos y ecólogos y señala que cada uno en su campo de acción proporciona información suficiente que amerite ser prioridad para conservar porqué finalmente lo que se protege es la vida y concluye que la vida se encuentra en el pasado, en el presente y en el futuro. Por otro lado Goldstein *et al.*, (2000) mencionan que con un buen análisis de datos genéticos se puede maximizar el potencial de conservación de una población. El criterio genético puede ser el valor de una población en particular que merece ser priorizada para conservar, esto es porque no todas las poblaciones de una especie son capaces de responder adaptativamente en un futuro a las condiciones ambientales de igual forma como lo señala Petit *et al.*, (1998). Como la última meta de la conservación es asegurar la continuidad de la sobrevivencia de las poblaciones y mantener su potencial evolutivo (Hamrick y Godt, 1995), una prioridad en la genética de la conservación es basarse en los niveles de diversidad genética y en el grado de diferenciación genética entre las poblaciones (Coates y Sokolowski, 1992. citados por Szalanski *et al.*, 2001). Petit *et al.*, (1998) proponen que además de basarse en la cantidad y distribución de la diversidad genética, en el número promedio de alelos por locus, en el porcentaje de loci polimórficos y en el déficit de heterocigocidad en las poblaciones, se considere también en medidas de la riqueza alélica y sostiene que la composición alélica de una población es igual de importante como es su patrón de diversidad para propósitos de conservación.

Los niveles y distribución de diversidad genética en las poblaciones de los recursos vegetales también pueden ser usados para el muestreo de las colecciones del germoplasma ya que se puede preservar solamente una porción del archivo genético



silvestre que represente a la diversidad total de las poblaciones o bien indican que poblaciones ameriten ser colectadas para que los procedimientos de mantenimiento subsecuentes usados para la regeneración del material genético preservado o multiplicación no se agoten rápidamente. Además, mediante estudios moleculares es posible detectar algún daño en el ADN. (Adams y Adams, 1991) ocasionado por el almacenamiento prolongado por ejemplo de una muestra de semillas. Los marcadores moleculares son también una herramienta útil para evaluar la estabilidad genética de los genotipos preservados por cultivo *in vitro* (Otero *et al.*, 1997).

Considerando varios de los aspectos tratados anteriormente y en vista de que se detectaron niveles bajos de variación genética y un proceso de estructuración para la población de *L. albida* del Valle de Zapotitlán se sugiere que deben iniciarse estrategias de conservación. En particular por conservar el germoplasma silvestre, ya que los datos genéticos indican que existen más polimorfismos en las poblaciones silvestres que en las poblaciones dentro de los huertos. Para ello, un primer paso es iniciar con la conservación *in situ*, ya que los pobladores de la región interactúan con *L. albida* y la forma en que se lograría es sensibilizando a los habitantes, estableciendo un sistema de trabajo conjunto entre la investigación científica y el uso práctico y racional de los pobladores para que en un futuro este recurso natural pudiera convertirse en un recurso económico con la creación de estrategias alternas de restauración y producción hortícola a través de invernaderos regionales, viveros, etc., con la finalidad de proveerles de capacitación y asesoría técnica para el manejo de un recurso sostenible.

Una forma sencilla de acercarse a un público interesado en conservar sus recursos, pero sin conocimientos técnicos especializados implica la elaboración de material de difusión como trípticos, carteles, etc. Este material debe ser atractivo visualmente, que reúna información clara de la investigación e incluya el conocimiento ancestral de los pobladores. Otras actividades de difusión se constituyen de exposiciones y pláticas tanto a escuelas de diferente nivel académico, desde primaria hasta bachillerato y al público en general de la región. La temática principal de los seminarios sería inculcar una nueva forma de relacionarse con sus recursos e inculcarles la



responsabilidad de ser depositarios y usuarios de esa riqueza biológica. De esta forma se vislumbra sólo el principio de un largo camino hacia la conservación de nuestros recursos biológicos y riqueza cultural.

Por otro lado, se empezó a establecer las condiciones de conservación *ex situ* mediante el uso de metodologías *in vitro* con la preservación de 2 lotes de semillas de *L. albida* a 4° C. Los datos se discutieron en los apartados IX y X.

APÉNDICE II

PROPUESTA DE INCLUSIÓN EN LA MER DE LA POBLACIÓN DE *L. albida*

Para determinar en que categoría de riesgo de la NOM ECOL 059 podría ubicarse como especie a *L. albida* sería basándose en el Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres (MER), sin embargo, como la distribución de esta especie es muy amplia se hace necesario investigar la diversidad genética de las otras poblaciones a lo largo de su distribución en el país. No obstante, dentro de los criterios de la MER, también pueden evaluarse poblaciones y se procedió a aplicarlos a la población de *L. albida* en el valle de Zapotitlán.

Varios de los criterios de evaluación se cumplen con la información generada de la presente investigación abarcando los siguientes puntos:

1) Todo tipo de uso, manejo o afectación, actual o potencial, ejercidos por el hombre y las consecuencias que tendrán dichas actividades, en los plazos corto, mediano y largo. Para el caso de *L. albida* de Zapotitlán, el manejo *in situ* y *ex situ* que a largo plazo puede alterar la estructura genética y espacial de las poblaciones silvestres como las de los huertos.

2) Considera las posibles acciones de manejo que se hubiesen realizado o se realicen sobre la especie o población; contempla los usos tradicionales o la relevancia cultural o económica que presenta dicha especie o población. *L. albida* tiene un uso tradicional muy arraigado en las festividades de Todos Santos, además que representa un ingreso económico de algunas de las comunidades o rancherías que efectúan la venta a menudeo de las inflorescencias. Este criterio es de relevancia por el hecho de que si desaparece un recurso útil puede desaparecer también las culturas ligadas a estos recursos.



3) Mapa del área de distribución geográfica de la especie o población con la máxima precisión que permitan los datos y que especifique resolución y escala. En el caso de *L. albida* se refiere a la distribución regional encontrada en el Valle de Zapotitlán, y que se puede decir que equivaldría aproximadamente al 15% considerando los 484.77 km² de superficie que presenta el Valle de Zapotitlán.

3) Considera los factores reales y potenciales de riesgo que producen la disminución de los tamaños de poblaciones, entre estos se mencionan los siguientes:

▪ De las colectas intensivas de individuos silvestres, del desprendimiento natural de las plantas, y de las características en las orquideas como el encontrar los simbiontes micorrizógenos para germinar y los polinizadores específicos, así como las condiciones idóneas para su establecimiento en condiciones naturales.

▪ Del número de poblaciones viables, sin mostrar una exhaustiva investigación se determinó que algunas de las poblaciones de *L. albida* (sitios de colecta) de los huertos no presentaron frutos con semillas viables.

▪ De las áreas de distribución, se observa en el mapa de distribución que los sitios con poblaciones silvestres son escasos.

▪ De deterioro genético, para el caso de *L. albida* se detecta que la población presenta una variabilidad genética escasa, por lo tanto un proceso de estructuración y el aislamiento genético de las poblaciones silvestres de las poblaciones de los huertos.

▪ De los factores que causan el deterioro o modificación del hábitat; los antecedentes del estado de la especie o en su caso de la población y su hábitat; así como los efectos de las medidas de protección en caso de haber sido aplicadas éstas. En los habitats naturales de *L. albida* existe perturbación ocasionada por aridificación natural y por efecto antropogénico como las actividades de pastoreo.

Un antecedente muy importante es que especies como *Laelia gouldiana* (P*) del estado de Hidalgo y *Laelia anceps* sbsp. *Dawsoni* f. *chilapensis* (P*) del estado de Guerrero, pasaron por un proceso similar a algunos de los puntos evaluados anteriormente y actualmente han desaparecido aparentemente de la naturaleza y ya se encuentran en los listados de la NOM 059-ECOL-1994. Por lo que el estudio de *L. albida* sirve como un modelo natural que ayude a explicar los procesos de desaparición de las especies o en este caso de las poblaciones.

El Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER) unifica los criterios de decisión sobre las categorías de riesgo y permite usar información específica que fundamente esa decisión. Se basa en cuatro variables o criterios independientes:

- A.- Amplitud de la distribución del taxón en México
- B.- Estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón
- C.- Vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón
- D.- Impacto de la actividad humana sobre el taxón

Cada una de estas variables implica una gradación de estados que puede cuantificarse mediante la asignación de valores numéricos convencionales, los cuales se establecen en orden ascendente con respecto al riesgo. La integración de estas variables se establece mediante la suma de los valores asignados de manera independiente. Una especie o población cuya suma total se sitúe entre 12 y 14 puntos, será considerada como en peligro de extinción. Aquélla cuya suma total de puntos se halle entre 10 y 11 se considerará como amenazada.

Criterio A. Amplitud de la distribución del taxón en México. Es el tamaño relativo del ámbito de distribución natural actual en México; considera cuatro gradaciones:

I. muy restringida = 4. Se aplica tanto para especies microendémicas como para especies principalmente extralimitales con escasa distribución en México (menor a 5% del territorio nacional).

II. restringida = 3. Incluye especies principalmente extralimitales y algunas endémicas (entre el 5% y el 15% del territorio nacional).

III. medianamente restringida o amplia = 2. Incluye aquellas especies cuyo ámbito de distribución es mayor que el 15%, pero menor que el 40% del territorio nacional.

IV. ampliamente distribuidas o muy amplias = 1. Incluye aquellas especies cuyo ámbito de distribución es mayor que el 40% del territorio nacional.

Criterio B. Estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón. Es el conjunto actual estimado de efectos del hábitat particular, con respecto a los requerimientos conocidos para el desarrollo natural del taxón que se analiza, en términos de las condiciones físicas, biológicas y antrópicas. No determina la calidad de un hábitat en general. Cuando una especie sea de distribución muy amplia, se hará una estimación integral del efecto de la calidad del hábitat para todo su ámbito. Considera tres valores:

I. hostil o muy limitante = 3

II. intermedio o limitante = 2

III. propicio o poco limitante = 1

Criterio C. Vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón. Es el conjunto de factores relacionados con la historia o forma de vida propios del taxón, que lo hacen vulnerable. Dependiendo de la disponibilidad de información específica, algunos ejemplos de tales factores pueden ser: estrategia reproductiva, parámetros demográficos más relevantes, historia de vida, fenología, intervalos de tolerancia, parámetros fisicoquímicos, aspectos alimentarios, variabilidad genética, grado de especialización, tasa de reclutamiento.



efecto nodriza, entre otros. El MER considera tres gradaciones numéricas de vulnerabilidad:

- I. vulnerabilidad alta = 3
- II. vulnerabilidad media = 2
- III. vulnerabilidad baja = 1

Criterio D. Impacto de la actividad humana sobre el taxón. Es una estimación numérica de la magnitud del impacto y la tendencia que genera la influencia humana sobre el taxón que se analiza. Considera aspectos como la presión por asentamientos humanos, fragmentación del hábitat, contaminación, uso, comercio, tráfico, cambio del uso de suelo, introducción de especies exóticas, realización de obras de infraestructura, entre otros. Se asignan tres posibilidades:

- I. alto impacto = 4
- I. impacto medio = 3
- II. bajo impacto = 2

Al realizar el ejercicio en la población de *L. albida* de Valle de Zapotitlán Salinas tenemos que:

$$A = 2, B = 3, C = 3, D = 3$$

La suma total da un valor de 11 puntos por lo que se sitúa en la categoría de amenazada de acuerdo al puntaje realizado por la MER.

La categoría denominada amenazada, se refiere a aquella especie, o poblaciones de la misma, que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazos, si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones. (Esta categoría coincide parcialmente con la categoría vulnerable de la clasificación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, UICN).



ANEXO 1. Listado de ejemplares herborizados de *Laelia albidia*

ESTADO	MUNICIPIO	LOCALIDAD	HALLADA EN	COORDENADAS LON (W) LAT (N)
PUEBLA	ZAPOTTILAN	ACATEPEC	EPIFITA EN <i>Casimiroa edulis</i> (ZAPOTE BLANCO)	97 35 (W) 18 14 (N) 2000m.s.n.m.
PUEBLA	CALTEPEC	CERRO EL GAVILAN AL SE DE CALTEPEC	MATORRAL ESPINOSO EPIFITA DE <i>Prosopis laevigata</i> (MEZQUITE)	97 32 (W) 18 14(N) 2300m.s.n.m.
PUEBLA	CALTEPEC	RINCÓN DE LA HIERBA AL SE DE LA MESA CHICA AL W DE CALTEPEC	MATORRAL ESPINOZO EPIFITA DE <i>Prosopis laevigata</i> (MEZQUITE)	97 32 (W) 18 10(N) 2120m.s.n.m.
PUEBLA	CALTEPEC	CERRO DEL MUERTO AL SW DE SAN SIMOS TLACUILOTEPEC		97 30 (W) 18 40 (N) 1900m.s.n.m.
OAXACA	ZAPOQUILA	CERRO CHICAMOLE AL N DE GUADALUPE DE MEMBRILLOS	ENCINAR RUPICOLA	2300m.s.n.m.
OAXACA	ZAPOQUILA RIO GRANDE	AL E DE ZAPOQUILA	ENCINAR ABIERTO	97 34 (W) 18 08 (N) 2100m.s.n.m.
OAXACA	SAN SEBASTIÁN COXTILAN	DISTRITO MIAHUATLAN 4 km AL SE DE SN SEBASTIAN	QUERCUS	97 49 (W) 16 11 (N) 950 m.s.n.m.
OAXACA	ZAPOQUILA GUADALUPE MEMBRILLOS	HUAJUAPAN	ENCINAR ALTERADO	2100m.s.n.m.
OAXACA	CALTEPEC	CERRO CHICAMOLE AL E DE MEMBRILLOS	ENCINO -MATORRAL ESPINOSO	97 33 (W) 18 08 (N) 2400m.s.n.m.
OAXACA	SAN SEBASTIÁN TECOMOXTLAHUACA	SABINO 3 km DE SAN SEBASTIAN TECOMOXTLAHUACA CARRITERA A SN MARTIN DURAZNOS	ENCINO CON JUNIPERUS Y PALMAS	98 93 (W) 17 19 (N)
OAXACA	SAN JUAN MINTEPEC JUNTLAHUACA	LOMAS YUCHA CUANSSHII	BOSQUE DE QUERCUS	1900m.s.n.m.

OAXACA	SAN ANTONIO ABAD COXTLAHUACA	A 1 km AL N DE SN ANTONIO ABAD BRECHA A AZTATLA	ENCINAR PERTURBADO	
OAXACA	CUAUTEPEC	LOMA PACHONA 1 km AL O DE CUAUTEPEC CARRETERA CHAZUMBA OAXACA HUAJUAPAN DE LEON	MATORRAL ESCLEROFILO CON JUNIPERUS Y <i>brachia rigida</i>	91 41 (W) 18 02 (N) 1040m.s.n.m.
OAXACA	REYES ETILA	2 Km AL W DE ETILA	HUERTO FAMILIAR	1640 m.s.n.m.
OAXACA	SANTO DOMINGO TOMALTEPEC	2.5 km AL N DE STO DOMINGO		1620 m.s.n.m.
OAXACA	MIHUATLAN	Km 100 DE LA CARRETERA PUERTO ANGEL		
OAXACA	SANTIAGO CHAZUMBA	PARQUE EL HIGO		97 43 (W) 18 11(N)
OAXACA	ZIMATLAN	PARQUE LA CANTERA CAMINO A SAN PEDRO EL ALTO		2100m.s.n.m.
OAXACA	TEQUITEPEC	Km 71 CARRETERA HUAJUAPAN-TEHUACAN	MATERIAL CULTIVADO	97 41 (W) 18 09 (N)
OAXACA	DTO.TEOTITLAN	AL S-O DE TECOMAVACA X LA CARRETERA 131 Y 261 km. AL O x TERRACERIA A STA.Ma IXCATLAN	MATORRAL ALTO SUBINERME	97 08 (W) 17 51 (N)
OAXACA	SAN JUAN MIXTEPEC	JUXTLAHUACA YUCUTHSE'E	BOSQUE DE PINO QUERCUS	97 35(W) 18 07 (N)9 2240m.s.n.m.
OAXACA	ZAPOQUILA	CERRO GATO AL N DE MEMBRILLOS	ENCINAR ABIERTO PRIMARIO ENTRE ROCAS	

ANEXO 1. CONTINUACION

ANEXO 2

ENCUESTA ETNOBOTÁNICA

Se aplicaron a personas en un rango de edades de 30-60 años, fueron de carácter abierto y de observación, es decir, se hacia en base a estas preguntas, sin que se les aplicaran como cuestionarios.

¿Como reconoce (describe) que es una orquídea, no es igual a las otras flores?

¿De donde trajo el "camotito" (pseudobulbo)?

¿En donde ha visto que crecen las plantas y en cuales árboles, alguno es mejor que otro, cual?

¿Cuando tiene flor, como es la flor, escoge las más bonitas o grandes o porque escoge esta (s)?

¿Salen o da semillas las plantas, como son las semillas, se las ha visto?

¿Tiene o da fruto la planta?

¿Para que utilizan la orquídea?

¿Desde cuando utilizan la planta, antes tenia otro uso o sigue siendo el mismo?

¿Que otras partes de la planta son utilizadas?

¿Cuando cortan la flor dejan la planta y vuelve a dar flores?

¿No utilizan las hojas para algún remedio?

¿En que mes cortan la flor?

¿Vende las flores y si la vende , donde la vende y quienes se la compran?



ANEXO 3

EXTRACCION DE ADN DELLAPORTA

1. Pulverizar 1g de tejido con nitrógeno líquido
2. 5ml de buffer de extracción
3. Añadir muestra (1g de tejido vegetal)
4. Agregar 340 µl de SDS al 20%
5. Incubar 10 min. en baño de agua corriente a 65 °C
6. 1.67 ml. De acetato de potasio 5M
7. 20 min. en hielo, o en el refrigerador a -20°C
8. Centrifugar a 6500 r.p.m. durante 30 min
9. Pasar el sobrenadante a otro tubo con 3.5 ml de isopropanol frio
10. Incubar 30 min. a -20°C
11. Centrifugar a 6500 r.p.m. 30 min.
12. Secar con papel
13. Resuspender la pastilla en 1ml de agua esteril. Dividir 500 µl en 2 tubos eppendorf
14. Agregar 500 µl de fenol-cloroformo
15. Agitar por inversión intermitente, se deja de 3 a 5 min. Se vuelve a agitar antes de centrifugar
16. Centrifugar a 14000 r.p.m. 30 min.
17. Se recobra la fase superior (acuosa), sin traer la fase inferior (fenólica)
18. Agregar 50 µl de acetato de sodio 3M
19. Añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto frio
20. Incubar a 20°C 1hr
21. Centrifugar a 14000 r.p.m. 30 min.
22. Lavar con etanol al 70%
23. Secar con papel
24. Resuspender la pastilla en 100 µl de agua estéril
25. Conservar a 4°C

BUFFER DE EXTRACCIÓN Y REACTIVOS UTILIZADOS

BUFFER DE EXTRACCIÓN

TRIS 100 mM pH8
 Edta 50 mM pH8
 NaCl 500 mM
 Mercaptoetanol 10 mM

Acetato de sodio 3M
 Etanol absoluto frio
 Etanol al 70% frio
 Agua desionizada estéril

SDS 20%
 Acetato de potasio 5M
 Isopropanol
 Fenol-Cloroformo Alcohol isoamilico
 (25:24:1) pH 7.2

TBE 1X
 Trisma base 0.089M
 Acido bórico 0.089M
 EDTA 0.002M



ANEXO 4

MEZCLA DE REACCION

Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración final
ADN templado	2	100-300 ng
Agua desionizada	17	
10XPCR Buffer	2.5	
MgCl ₂ (50mM)	0.75	1.5mM
dNTP mezcla	2.0	200 μ M c/ u
Taq polimerasa 5U/ μ l	0.2	1 U
Primer	1	0.8 μ M
Total	25 μ l	

ANEXO 5

MEDIO DE CULTIVO KNUDSON C (SIGMA mg/L)

COMPONENTES	KC 4003	KC 4128
Nitrato de amonio		500.0
Sulfato de amonio	500.0	500.0
Ácido bórico	0.056	
Nitrato de calcio	694.4	347.2
Sulfato cuprico 6H ₂ O	0.0624	
Sulfato ferroso 7H ₂ O	25.0	25.0
Sulfato de magnesio	122.125	122.125
Sulfato de manganeso H ₂ O	5.682	5.682
Trióxido de molibdeno	0.016	
Cloruro de potasio		250.0
Fosfato de potasio monobásico	250.0	250.0
Sulfato de zinc 7 H ₂ O	0.331	
Sacarosa	20.000	20.000
g/L	21.6	22.0

