



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Estudio de *Rhynchostele cervantesii* (La Llave & Lex.) Soto-Arenas & Salazar
(ORCHIDACEAE) *in situ e in vitro*.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGA PRESENTA:
MANZANO HERNANDEZ PAOLA CECILIA



Directora de Tesis:

M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

Proyecto PAPIME Pe206113 y Pe207715

CIUDAD DE MEXICO, MARZO 2017



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.

El presente trabajo de tesis se realizó bajo la dirección de la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales en la Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z).

Apoyado y financiado por los proyectos PAPIME con clave Pe206113 y Pe207715

In Memoriam M. en C. Amadeo Barba Álvarez



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **MANZANO HERNANDEZ PAOLA CECILIA**, con número de cuenta **306189070**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **07 de marzo de 2017** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. MARÍA SOCORRO OROZCO ALMANZA

VOCAL M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES

SECRETARIO Dr. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ

SUPLENTE Biól. JUAN ROMERO ARREDONDO

SUPLENTE M. en C. GENARO MONTAÑO ARIAS

El título de la tesis que presenta es: **Estudio de *Rhynchostele cervantesii* (La Llave & Lex.) Soto-Arenas & Salazar (Orchidaceae) in situ e in vitro.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
 Ciudad de México, a 23 de enero de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
 DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
 M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
 JEFE DE CARRERA

*Me alejé de las
luces, de la gran
ciudad,
Me alejé de la
contaminación y su
pulular,
Llegue a un
inmenso bosque, abrí
mis alas
Y me eche a volar.*



Manzano Hernandez Paola Cecilia

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y permitir mi formación académica.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, mi *alma máter* y mi segundo hogar.

A la unidad de Investigación en Biología Vegetal por permitirme la realización de esta investigación.

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, directora de tesis, no solo por sus aportaciones en esta investigación, sino por el gran apoyo, la confianza, comprensión, por las alegrías y tristezas compartidas; Por ser más que maestra, amiga y sobre todo mi madre académica.

A los miembros del jurado por su tiempo, dedicación y aportaciones para mejorar este trabajo.

Dra. María Socorro Orozco Almanza

M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

Dr. Carlos Castillejos Cruz

Biol. Juan Romero Arredondo

M. en C. Genaro Montaña Arias

Mil gracias.

Al Dr. Carlos Castillejos Cruz por sus grandes enseñanzas, consejos y sobre todo por su colaboración en esta investigación en la determinación de especies.

Al Biol. Marco Antonio Hernandez Muñoz por su ayuda, aportación y colaboración en la determinación de hongos y líquenes.

A los maestros que creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente durante toda mi formación académica, porque de ellos aprendí a realizar con dedicación cada investigación y dar lo mejor de mí. Gracias a ustedes: Biol. Luis Samuel Campos Lince, Dra. Alejandrina Graciela Ávila Ortiz, Biol. Marco Antonio Hernandez Muñoz, Dra. Elia Roldan Reyes, M. C. Raúl Zavala Chavero, Dr. Manuel Feria Ortiz, M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, Dr. Carlos Castillejos Cruz, Dra. Hortensia Rosas Acevedo, Dr. Arturo Eduardo Cano Flores, Biol. Elvia García Santos, Dr. Jorge Alberto Gutiérrez Gallegos, Dr. Guillermo Blancas, M. en C. Ernesto Vallejo Mendoza, Biol. María de los Ángeles Galván Villanueva, Dr. Adolfo Jiménez Peña, M en C. Bárbara Susana Luna Rosales y M. en C. Amadeo Barba Álvarez[†]

A mis compañeros de laboratorio Irving, Héctor, Alejandra, Bernardo, Yadira, Lizbeth, Daryl, Karen, Karla, por hacer tan amena la estancia, compartir su conocimiento y sobre todo compartir su amistad.

A mis compañeros y amigos de generación Erick, Abel, Laura, Memo, Yasmin, Ángel "logan", Paola, Abimael, Yode, Paty, Ilse, Brenda, Joss, Sayuri, Gaby, Ángel, Vic, Lizbeth, Lili, Arantxa, Fidel, Cesar, Paty "fideos", David, y demás que hicieron tan grato y ameno el recorrido durante este aprendizaje a lo largo de la carrera. A mis amigos a temporales Fer, Abel, Wendy, Araceli, Héctor, Sayri, Yetzu, Aron, Ricardo, Jossimar, April, Fernando, Enrique, Alan, Noé, Aldo, Osvaldo, Alina, Amadeo, Isa's, Sebastián, Flor, Cristina, Noemí por compartir su tiempo, sus vivencias y hacer tan divertidos los momentos en la facultad. A mis amigos de mucho tiempo atrás, Noemí, Alma, Humberto, Omar, Nancy, Ismael, Armando, Isaac, Leo, David "Epilo", Raymundo, Eva, Jorge por las vivencias y aventuras compartidas. A mis nuevos amigos, Nataly, Bere, Ethel, Gaby, Liz, Fátima, Mago, Manuel, Liz bb, Trini, Zule por compartir esas amenas charlas en el museo.

A mis primas Perla y Claudia por ser mi ejemplo y darme ánimos a continuar.

A tí, Enrique Jiménez por la paciencia, dedicación, amor, aportación, y comprensión durante este momento.
Te amo gracias por ser parte de mi vida.

DEDICATORIA

A mis padres, Hilda y Edmundo por permitirme cumplir mis sueños, por estar presentes, por su paciencia, su comprensión y su apoyo incondicional, los amo.

A mis Hermanos Jonathan, Eric y Maximiliano.

A mi familia.

Al M. en C. Amadeo Barba Álvarez†



Por mostrarme el fascinante mundo de las orquídeas, compartir su pasión hacia este grupo vegetal y por formarme como Orquideóloga y no como Orquideófila. Por sus grandes consejos, su apoyo y confianza incondicional, por su gran apoyo en la realización de este trabajo, por los momentos compartidos en campo, por todo eso y más...

¡Siempre estará con nosotros!



ÍNDICE



Abreviaturas.....	V
Índice de figuras.....	VI
Índice de cuadros.....	XII
RESUMEN.....	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	2
2.- MARCO TEÓRICO.....	3
2.1.- GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS.....	3
2.1.1.- Clasificación y Distribución.....	3
2.1.2.- Características de la Familia Orchidaceae.....	4
• Patrones de Crecimiento.....	4
• Morfología.....	5
○ Raíces.....	5
○ Tallos.....	6
○ Hojas.....	6
○ Flores.....	7
• Polinización.....	8
○ Frutos.....	8
○ Semillas.....	9
• Ciclo de Vida.....	9
2.2.- ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS.....	10
2.2.1.- Tipos de áreas naturales protegidas.....	10
2.2.2.- Parques Nacionales.....	11
• Parque Nacional “El Tepozteco”.....	11
○ Decreto.....	11
○ Ubicación.....	13
○ Problemática.....	13
2.3.- CONSERVACIÓN.....	14
2.3.1.- Conservación <i>in situ</i>	14
2.3.2.- Orquídeas <i>in situ</i>	15
2.4.- CULTIVO DE TEJIDOS O PROPAGACIÓN <i>in vitro</i>	16
2.4.1.- Micropropagación.....	16
2.4.2.- Breve historia del cultivo de tejidos vegetales.....	16

2.5.- MICROPROPAGACIÓN <i>in vitro</i> DE ORQUÍDEAS.....	20
2.5.1.- Germinación Simbiótica.....	20
2.5.2.- Germinación Asimbiótica.....	20
2.6.- MEDIOS DE CULTIVO.....	21
2.6.1.- Sales inorgánicas.....	21
2.6.2.- Compuestos orgánicos.....	22
• Carbohidratos.....	22
• Vitaminas.....	22
• Reguladores de crecimiento.....	22
○ Auxinas.....	23
○ Citocininas.....	23
○ Giberelinas.....	23
• Preparaciones naturales complejas.....	23
○ Pulpa de Plátano.....	23
• Materiales inertes.....	24
○ Agar gel.....	24
○ Carbón activado.....	24
2.7- EL GÉNERO <i>Rhynchostele</i>	24
2.7.1.- <i>Rhynchostele cervantesii</i>	25
• Sinonimias.....	25
• Clasificación Taxonómica.....	25
• Descripción Botánica.....	26
• Distribución Geográfica.....	26
• Estado de Conservación.....	26
3.- ANTECEDENTES.....	27
3.1.- Estudios sobre <i>Rhynchostele cervantesii</i>	27
3.2.- Bases para la realización de este Estudio.....	28
4.- JUSTIFICCIÓN.....	29
5.- HIPÓTESIS.....	30
5.1.- <i>In situ</i>	30
5.2.- <i>In vitro</i>	30
6.- OBJETIVOS.....	31
6.1.- Objetivo General.....	31
6.2.- Objetivos Particulares.....	31

7.- MATERIAL Y MÉTODO	32
7.1.- <i>In situ</i>	32
7.1.1.- Zona de muestreo.....	32
7.1.2.- Muestreo y ubicación de ejemplares de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	33
7.1.3.- Análisis (Densidad poblacional).....	34
7.1.4.- Registro de Floración.....	35
7.1.5.- Recolecta de Material Biológico.....	35
7.2.- <i>In vitro</i>	36
7.2.1.- Propagación sexual.....	36
• Evaluación de viabilidad.....	36
• Medio de cultivo.....	36
7.2.2.- Cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>R. cervantesii</i> asimbióticamente.....	37
• Inducción de la germinación con fitohormonas.....	38
• Evaluación.....	39
7.2.3.- Propagación Asexual.....	40
• Cultivo <i>in vitro</i> de segmentos de hoja de <i>R. cervantesii</i>	40
• Pruebas de desinfestación.....	40
• Siembra de segmentos de hoja.....	41
7.2.4.- Análisis Estadístico.....	41
8.- RESULTADOS	42
8.1.- <i>In situ</i>	42
8.1.1.- Ubicación y caracterización de <i>Rhynchostele cervantesii</i> y sus forofitos.....	42
8.1.2.- Vegetación acompañante, competitiva y/o asociada	46
8.1.3.- Floración.....	53
8.1.4.- Recolecta de Material Biológico.....	57
8.2.- <i>In vitro</i>	58
8.2.1.- Propagación sexual.....	58
• Evaluación de viabilidad.....	58
• Porcentaje de germinación.....	59
• Índice de desarrollo.....	64
• Desarrollo ontogénico.....	68
8.2.2.- Propagación Asexual.....	73
• Pruebas de desinfestación.....	73
• Siembra de segmentos de hoja.....	73
9.- DISCUSIÓN	74
10.- CONCLUSIONES	84
11.- BIBLIOGRAFÍA	85

12.- ANEXOS.....	95
12.1.- Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog.....	95
12.2.- Reguladores de crecimiento vegetal.....	96
12.3.- Listado de vegetación.....	97
12.4.- Análisis Estadístico.....	99
12.5.- Para reflexionar.....	103
12.6.- Protocolo de cultivo <i>in vitro</i> para <i>Rhyncholele cervantesii</i>	104



ABREVIATURAS



2,4-D	Acido clorofenoxiacético
2iP	N ⁶ Dimetil alil aminopurina
AG3	Acido Giberelico 3
AIA	Acido Indolacético
AIB	Acido Indobutírico
ANA	Ácido Naftalenacético
ANP	Área Natural Protegida
Art	Artículo
BA	Bencil Aminopurina
BMM	Bosque Mesófilo de Montaña
CBCh	Corredor Biológico Chichinautzin
CONANP	Comisión Nacional de áreas protegidas
CPA	Acido Clorofenoxiacético
DAP	Diámetro a la Altura de Pecho
ENT	Eje neovolcánico transversal
GA ³	Acido Giberelico
ID	Índice de desarrollo
K	Cinetina (N ⁶ furfuril aminopurina)
KM	Kao & Michayluk
MS	Murashige y Skoog
N ⁶	4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil
NOM	Norma Oficial Mexicana
PLB	Protocorm-Like Bodies (cuerpos parecidos a protocormos)
PNET	Parque Nacional El Tepozteco
T	Tratamiento
TTC	Cloruro Trifenil Tetrazolio
SCO	Sociedad Colombiana de Orquideología
VW	Vacin y Went



ÍNDICE DE FIGURAS



1. Litografía de <i>R. cervantesii</i>	1
2. Árbol filogenético de la familia Orchidaceae, muestra las relaciones entre las distintas subfamilias.....	3
3. Tipo de crecimiento más común presente en las orquídeas.....	4
4. Patrones de Crecimiento en Orquídeas.....	4
5. Adaptaciones Morfológicas en la familia Orchidaceae.....	5
6. Crecimiento de raíces en un ejemplar cultivado de <i>Laelia</i> sp.....	5
7. Diferencia morfológica de los tallos que presenta la familia Orchidaceae.....	6
8. Diferentes tipos de hojas presentes en la familia Orchidaceae.....	6
9. Diversidad de Inflorescencias en las Orquídeas.....	7
10. Morfología Floral de la familia Orchidaceae.....	7
11. Polinización de Orquídea por colibríes.....	8
12. Capsulas de Orquídea.....	8
13. Semillas de Orquídea.....	9
14. Ciclo de vida de una orquídea epífita (<i>Laelia</i>), modificado.....	9
15. Diagrama del Parque Nacional “El Tepozteco”.....	11
16. Mapa del Corredor Biológico Chichinautzin, Área de Protección de Flora y Fauna silvestre.	13
17. Área de protección dentro del Parque Nacional el Tepozteco.....	14
18. Forofito in situ con presencia de la Orquídea <i>Stellis retusa</i>	15
19. Elementos químicos presentes en los medios de cultivo.....	21
20. Especies presentes en el género <i>Rhynchostele</i>	24
21. Ejemplar de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	25
22. Lamina descriptiva de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	26
23. Distribución de <i>Rhynchostele cervantesii</i> y <i>R. áptera</i>	26
24. Portada de la revista Orquídea.....	27
25. Portada de tesis, investigación centrada en <i>Rhynchostele cervantesii</i>	27
26. Zona de muestreo dentro del Parque Nacional “El Tepozteco”.....	32
27. Determinación de cuadrantes.....	33

28. Elección de cuadrantes para muestreo.....	33
29. Asignación de número a cada forofito.....	33
30. Medición de perímetro del forofito para obtener DAP.....	33
31. Conteo de individuos presentes por forofito de <i>R. cervantesii</i>	33
32. Elección de individuos de menor y mayor tamaño para cuantificar altura, diámetro y otros aspectos.....	33
33. Registro de ubicación de los individuos localizados.....	34
34. Formatos de registro.....	34
35. Vegetación acompañante a <i>Rhynchostele cervantesii</i>	34
36. Determinación de vegetación competitiva.....	34
37. Prensado y herborizado.....	34
38. Marcaje de forofitos.....	34
39. Registro de floración.....	35
40. Polinización manual.....	35
41. Materiales empleados para la evaluación de viabilidad.....	36
42. Semillas de <i>Barkeria uniflora</i> teñidas con TTC.....	36
43. Preparación del medio de cultivo.....	36
44. Materiales para la elaboración de sobres con semillas.....	37
45. Sobres para semillas.....	37
46. Semillas de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	37
47. Desinfestación en campana de flujo laminar.....	37
48. protocolo para la inducción de la germinación.....	38
49. AG3.....	38
50. ANA.....	38
51. K.....	38
52. Incubación.....	39
53. Selección de hojas de <i>Rhynchostele cervantesii</i> para regeneración <i>in vitro</i>	40
54. Protocolo de desinfestación para hojas de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	40
55. Realización de cortes en hojas de <i>R. cervantesii</i> en campana de flujo laminar.....	41
56. Incubación de segmentos de hoja.....	41
57. Distribución geográfica de los forofitos con presencia de <i>R. cervantesii</i> en la zona de muestreo.....	42

58. Algunos de los forofitos con presencia de <i>R. cervantesii</i> registrados en los diferentes cuadrantes.....	43
59. Individuos de <i>R. cervantesii</i> en diferentes estadios.....	44
60. Individuos de <i>R. cervantesii</i> con diferencias en altura y diámetro.....	44
61. Orientación cardinal a la cual se dirigen los individuos coloniales de <i>R. cervantesii</i>	45
62. Protocormo de <i>R. cervantesii</i> desarrollándose in situ. Fotografía de A. Barba A.....	45
63. Plántula de <i>R. cervantesii</i> desarrollándose in situ. Fotografía de A. Barba A.....	45
64. Vegetación acompañante (<i>Agave aff. horrida</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 38.....	46
65. Vegetación acompañante suculentas (<i>Sedum frutescens</i>).....	46
66. Vegetación asociada (<i>Polypodium madrense</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 53.....	46
67. Vegetación acompañante Orchidaceae (<i>Stellis retusa</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 34.....	46
68. Vegetación acompañante Orchidaceae (<i>Epidendrum anisatum</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 2.....	47
69. Vegetación asociada, <i>Polypodium madrense</i> , <i>Echeveria gibbiflora</i> y <i>Stellis retusa</i> de <i>R. cervantesii</i> . Fotografía de A. Barba A.....	47
70. Vegetación acompañante (<i>Echeveria gibbiflora</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 53.....	47
71. Vegetación acompañante (<i>Heliocereus elegantissimus</i>) de <i>R. cervantesii</i>	47
72. Vegetación acompañante (<i>Tillandsia prodigiosa</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 41.....	47
73. Vegetación acompañante (<i>Heliocereus elegantissimus</i> , <i>Sedum frutescens</i> y musgo) de <i>R. cervantesii</i>	48
74. Vegetación acompañante (Musgo y enredadera) de colonias de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 66.....	48
75. Vegetación asociada y acompañante de <i>R. cervantesii</i> helechos y la orquídea <i>Prostachea rhombilabia</i>	48
76. Orquídea <i>Rhynchostele áptera</i> especie acompañante a <i>R. cervantesii</i> en la zona de muestreo.....	48
77. Vegetación asociada Liquen (<i>Sticta fuliginosa</i>) de <i>R. cervantesii</i> . Fotografía de A. Barba A.....	49
78. Vegetación asociada Liquen (<i>Flavopunctelia praesignis</i>) de <i>R. cervantesii</i>	49
79. Vegetación asociada Liquen (<i>Usnea</i> sp.) de <i>R. cervantesii</i> . Fotografía de A. Barba A.....	49
80. Vegetación asociada Liquen (<i>Cladonia</i> sp., <i>Parmotrema</i> sp.) y musgos de <i>R. cervantesii</i>	49
81. Vegetación asociada Líquenes (<i>Flavoparmelia</i> sp., <i>Flavopunctelia praesignis</i> y <i>Usnea</i> sp.) de <i>R. cervantesii</i> . Fotografía de A. Barba A.....	49
82. <i>R. cervantesii</i> con un liquen (<i>Cladonia</i> sp.) competitivo.....	50
83. Colonia de <i>R. cervantesii</i> con líquenes (<i>Flavopunctelia praesignis</i>) como vegetación competitiva.....	50

84. Vegetación competitiva (<i>Hypotrachyna</i> sp. y <i>Tillandsia makoyana</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 51.....	50
85. Vegetación acompañante y competitiva (musgo) de Colonias de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 24.....	50
86. Colonia de <i>R. cervantesii</i> donde se aprecia el número de pseudobulbos y la su vegetación competitiva.....	50
87. Vegetación competitiva (líquenes, musgo y helechos) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 50.....	50
88. Colonia de <i>R. cervantesii</i> rodeado de vegetación competitiva liquen (<i>Ramalina</i> sp. y <i>Hypogymnia</i> sp.) y crasulácea (<i>Echeveria gibbiflora</i>) en el forofito No. 56.....	51
89. Helechos (<i>Polypodium madrense</i> , <i>Pleopeltis crassinervata</i> y <i>Pleopeltis polylepis</i>) presentes como vegetación acompañante y como competitiva.....	51
90. Vegetación competitiva y asociada (<i>Polypodium martensii</i> , <i>Heliocereus elegantissimus</i> , <i>Echeveria gibbiflora</i> , entre otros) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 46.....	51
91. Vegetación competitiva y asociada (<i>Lobaria</i> sp., <i>Heterodermia</i> sp., <i>Parmotrema</i> sp., <i>Polypodium madrense</i> y <i>Pleopeltis polylepis</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 40.....	51
92. Colonias de <i>R. cervantesii</i> con vegetación acompañante y competitiva en el forofito No. 72.....	51
93. Vegetación acompañante y competitiva (<i>Flavopunctelia praesignis</i> y <i>Polypodium madrense</i>) de <i>R. cervantesii</i> en el forofito No. 36.....	51
94. Vegetación acompañante y competitiva (<i>Polypodium madrense</i>) de <i>R. cervantesii</i> . Fotografía de A. Barba A.....	52
95. Vegetación acompañante y competitiva (<i>Flavopunctelia praesignis</i> , <i>Heterodermia</i> sp. y <i>Polypodium madrense</i>) de <i>R. cervantesii</i>	52
96. Vegetación acompañante y competitiva (<i>Flavopunctelia praesignis</i> , <i>Polypodium madrense</i> y <i>Sedum frutescens</i>) de <i>R. cervantesii</i>	52
97. Diferencia de estratos y composición vegetal presente en el cuadrante H. Fotografías de A. Barba A.....	53
98. Desarrollo floral <i>in situ</i>	53
99. Planta de <i>R. cervantesii</i> <i>in situ</i> con colores rosados durante la floración (variedad membranácea).....	54
100. Planta de <i>R. cervantesii</i> con tonalidades amarillas.....	54
101. Planta de <i>R. cervantesii</i> con bordes de labelo liso (típico).....	54
102. Planta de <i>R. cervantesii</i> con bordes del labelo crenados.....	54
103. Planta de <i>R. cervantesii</i> con bordes del labelo crenados.....	54
104. Plantas de <i>R. cervantesii</i> con variaciones presentes en el mismo forofito.....	55
105. Polinización manual <i>in situ</i>	56

106. Polinios de <i>R. cervantesii</i>	56
107. Flores sin columna y pétalos causados por herbivoría.....	57
108. Flores devoradas por insectos.....	57
109. Flores totalmente devoradas por insectos.....	57
110. Semilla de <i>R. cervantesii</i> . Cada cuadrícula representa 1mm.....	58
111. Pigmentación de los embriones de <i>R. cervantesii</i> en las diferentes evaluaciones.....	58
112. Porcentaje de germinación primera siembra, Abril-2013.....	59
113. Proceso de germinación y formación de protocormos en los medios de cultivo (T16).....	59
114. Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en los diferentes tratamientos independientemente a los días de evaluación en la segunda siembra.....	60
115. Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en los días de cultivo independientemente a los tratamientos en la segunda siembra.....	60
116. Porcentaje de germinación segunda siembra, febrero-2014.....	61
117. Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en los diferentes tratamientos independientemente a los días de evaluación en la tercera siembra.....	62
118. Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en los días de cultivo independientemente a los tratamientos en la tercera siembra.....	62
119. Porcentaje de germinación tercera siembra, Abril-2015.....	63
120. Índice de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en los diferentes tratamientos independientemente a los días de evaluación en la segunda siembra.....	64
121. Índice de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en los días de cultivo independientemente a los tratamientos en la segunda siembra.	64
122. Porcentaje de los estadios alcanzados por tratamiento a los 180 días de cultivo en la segunda siembra (febrero 2014).....	65
123. Índice de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en los diferentes tratamientos independientemente a los días de evaluación en la tercera siembra.....	66
124. Índice de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en los días de cultivo independientemente a los tratamientos en la tercera siembra.....	66
125. Porcentaje de los estadios alcanzados por tratamiento a los 180 días de cultivo en la tercera siembra (Abril 2015).....	67
126. Estadios del desarrollo <i>in vitro</i> de <i>R. cervantesii</i>	68
127. Estadio 1.....	69
128. Estadio 2.....	69
129. Estadio 3.....	69

130. Estadio 4.....	70
131. Estadio 5.....	70
132. Estadio 6.....	70
133. Estadio 7.....	71
134. Estadio 8.....	71
135. Estadio 9.....	71
136. Desarrollo gradual de <i>R. cervantesii</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	72
137. Segmentos de hoja de <i>R. cervantesii</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	73
138. Segmentos de hoja de <i>R. cervantesii</i> con presencia de contaminación bajo condiciones <i>in vitro</i>	73
139. Distribución de orquídeas epifitas en un bosque lluvioso de África occidental.....	74
140. Fases del ciclo anual de crecimiento y reproducción de <i>R. cervantesii</i>	75
141. Vendedor de orquídeas, Michoacán.....	77
142. Variedades florales en <i>R. cervantesii</i>	78
143. Reguladores del crecimiento vegetal sugeridos para la especie <i>R. cervantesii</i> . Fragmento.....	80
144. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas que generalmente son requeridas durante la morfogénesis <i>in vitro</i> . Modificado.....	81
145. <i>Guarianthe aurantiaca</i>	82
146. <i>Laelia speciosa</i>	82
147. <i>Epidendrum radicans</i>	82
148. <i>Barkeria uniflora</i>	82
149. <i>Rhynchostele cervantesii</i>	82
150. Protocolo de desinfestación empleado para segmentos nodales de <i>Epidendrum</i> sp.....	83



ÍNDICE DE CUADROS



1. Áreas naturales protegidas (federales) presentes en México y categorización.....	10
2. Cronología histórica del cultivo de tejidos vegetales.....	16
3. Estudios realizados en géneros de la Subtribu Oncidiinae.....	28
4. Composición de la vegetación por cuadrante.....	42
5. Datos generales de los cuadrantes.....	43
6. Datos sobre las colonias de <i>Rhynchostele cervantesii</i> localizadas.....	45
7. Densidad poblacional de <i>Rhynchostele cervantesii</i> por cuadrante.....	45
8. Vegetación acompañante a <i>Rhynchostele cervantesii</i>	46
9. Vegetación competitiva y/o asociada a <i>Rhynchostele cervantesii</i>	50
10. Registro de floración.....	53
11. Evaluación de viabilidad.....	58
12. Prueba, tiempo de exposición al desinfectante.....	73



RESUMEN



Rhynchostele cervantesii, orquídea endémica de México, se distribuye desde Nayarit hasta Oaxaca. La información acerca de su ecología, como son sus relaciones con otros grupos vegetales e inclusive su desarrollo es escaso. Es por ello que el presente estudio se realizó para aportar información acerca de su biología *in situ* e *in vitro*. Para conocer las relaciones *in situ* en las que habita esta especie se determinaron los diversos taxones que acompañan, se asocian y compiten con esta orquídea; así como, estableciendo la disposición de *R. cervantesii* en función del forofito que lo hospeda; además de, registrar el estadio fenológico de las colonias establecidas. La zona de estudio fue un área de transición vegetal ubicada en el municipio de Tepoztlán, en el estado de Morelos, dentro del Parque Nacional el Tepozteco.

Se muestrearon un total de 74 forofitos, de 1.5 a 15 m de altura, ubicados en cuatro cuadrantes de 100 m² cada uno. En estos forofitos se registraron aproximadamente 1,500 ejemplares coloniales de *R. cervantesii* con uno y hasta 50 pseudobulbos en diferentes estadios de desarrollo (plántulas, juveniles y adultos). El 71% de los ejemplares registrados estaban en estado vegetativo y el 29% en reproductivo. Los ejemplares tenían una cobertura de 1 a 25 cm de diámetro sobre el forofito, con una orientación NE o SE y con una ubicación sobre el forofito desde 0.5 a 8 m sobre el nivel del suelo. Se registran musgos, helechos, líquenes, bromeliáceas, crasuláceas, cactáceas, agaves e incluso otras orquídeas como vegetación acompañante. De éstos, seis especies se encontraron asociados o compitiendo directamente con *R. cervantesii*.

Para aportar información sobre la germinación, el desarrollo ontogénico y el potencial morfogénico de tejido somático de esta especie, se realizó, bajo condiciones *in vitro* el cultivo de semillas (propagación sexual) y tejido de hoja (propagación asexual) en el medio Murashige & Skoog (MS) modificado al 50% de su concentración en sales basales y adicionado con 30 g de Sacarosa, 20 g de papilla de plátano Gerber®, 5 g de Agar, 1 g de Carbón activado, 0.1 mgL⁻¹ Ácido Giberélico (AG₃) y Ácido Naftalenacético (ANA) y Cinetina (K) en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mgL⁻¹ para cada una de ellas. Se indujo el 50% de la germinación de semillas, con alta viabilidad, en el medio MS modificado y adicionado con 0.1 mgL⁻¹ AG₃ + 1 mgL⁻¹ ANA + 0.1 mgL⁻¹ K (T₁₄), a partir del día 77 y manteniéndose con ese porcentaje hasta los 104 días de cultivo, sin la realización de subcultivos a medio fresco, en una primer prueba. Al realizar la siembra de semillas, con baja viabilidad, se obtuvo un porcentaje de germinación del 25% en los tratamientos adicionados con 0.1 mgL⁻¹ AG₃, 0.5 mgL⁻¹ K, 0, y 0.1 mgL⁻¹ ANA, sin la realización de subcultivos a medio fresco, en una segunda prueba. Finalmente al realizar el protocolo establecido, de alta viabilidad y subcultivos a medio fresco, sin reguladores del crecimiento vegetal, se obtuvo el 58% de germinación, en el T₀ o testigo, dicho medio carece de reguladores del crecimiento vegetal. Además, se describe el desarrollo ontogénico en condiciones *in vitro*, por primera vez, para la especie *R. cervantesii*, el cual presenta nueve estadios y se establece el tiempo en el que se alcanza cada uno de ellos. Obteniendo plántulas completas a los 520 días de cultivo.

La propagación asexual del tejido de hoja resultó inadecuada; ya que, presentaron un alto grado de contaminación bajo condiciones *in vitro* a pesar del protocolo de desinfección realizado ya que provenían de condiciones *in situ*.



Llamativas, misteriosas y complicadas, las orquídeas siempre nos han mantenido intrigados, pero ahora que su hábitat silvestre esta en grave peligro, nos interesan más que nunca.

The Smithsonian Magazine otoño 1985 (tomado de: A.A.O. Asociación Altaverapacense de Orquídeología. 1993).



1.- INTRODUCCIÓN



Los seres vivos constituyen el objeto de estudio de las ciencias biológicas, ya sea para conocer su estructura y su fisiología, para saber qué papel desempeñan en su hábitat, cuál es su distribución geográfica o cuál su composición genética. Existen miles de especies que conforman el universo de estudio de la biología, incluso muchas de ellas que todavía no han sido descubiertas y cada una cuenta con características propias (Pulido-Esparza, 2004).

La familia Orchidaceae incluye aproximadamente 800 géneros y alrededor de 20000 especies; se pueden encontrar en todo el mundo, aunque su presencia es más importante en el cinturón tropical del planeta, en donde se encuentra el 56 % (Espejo-Serna *et al.*, 2002). En México, las orquídeas se ubican al sur del trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y del Golfo, en altitudes que pueden rebasar los 3 500 m. (Soto-Arenas, 1988; Espejo-Serna & López-Ferrari, 1998; Hágsater *et al.* 2005; Duarte, 2014). Se considera la más evolucionada dentro del reino vegetal, ya que presenta una gran complejidad y especialización morfológica e interactiva con sus polinizadores, lo anterior es el resultado de numerosas adaptaciones estructurales y funcionales. A si mismo existen muy diversas formas de vida, que desde el punto de vista ecológico, sus integrantes son componentes de importancia en diversos tipos de vegetación (Espejo-Serna *et al.*, 2002).

Las orquídeas han sido de las plantas más admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones, se sabe que los chinos, cultivaron algunas especies del género *Cymbidium*; también los griegos las conocían pues fue Teofrasto, discípulo de Aristóteles, quien les dio el nombre de Orquídeas (Orchis= testículo) debido a la forma de los pseudobulbos (Suarez, 2004). Presentan problemas serios para su propagación en forma natural debido a que la mayor parte de las semillas están escasamente diferenciadas (Pierik, 1990). Dado su alto valor hortícola, comercial y por las características ecológicas que presentan, las especies y sus poblaciones son vulnerables; por la destrucción y transformación de sus hábitats, el crecimiento urbano desordenado y su tráfico ilegal, así como por sus bajas tasas de crecimiento, el ciclo de vida (largo en algunas especies) y su escaso reclutamiento de individuos (Sarmiento & Romero, 2000). Lo que está ocasionando la pérdida de esta maravillosa diversidad y que varias especies se encuentren consideradas en peligro de extinción (Hágsater, et al., 2005).

De acuerdo con Seaton y Ramsay (2005), los métodos aplicados de cultivo *in vitro* han tenido un considerable efecto en la conservación de orquídeas, debido a que, las orquídeas pueden multiplicarse en grandes cantidades, con el propósito de cultivarlas, reintroducirlas o comercializarlas. A demás las plantas cultivadas en el laboratorio llegan a ser más sanas y más vigorosas que aquellas recolectadas en la naturaleza.

La presente investigación tuvo como finalidad realizar el estudio en condiciones *in situ* e *in vitro* de la especie *Rhynchostele cervantesii*, especie endémica del país y considerada en la categoría de Amenaza por la NOM-059-SEMARNAT-2010 de protección al medio ambiente, para conocer las interacciones con otras comunidades vegetales en su hábitat, así como establecer un protocolo de germinación y desarrollo bajo condiciones *in vitro* eficiente de manera sexual y asexual para contribuir a la conservación y disminuir la sobreexplotación de esta especie.



2.- MARCO TEÓRICO



2.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas ocupan el tercer lugar a nivel nacional en lo referente a las familias de plantas con mayor diversidad taxonómica, superadas sólo por Asteraceae y Fabaceae (Villaseñor, 2003; Hágsater et al., 2005, Citado en Salazar, 2009); así mismo, constituyen la quinta familia de fanerógamas con mayor número de especies en la Cuenca de México y las 60 especies registradas hasta el momento representan aproximadamente 3% de la flora de la región (Rzedowski y Calderón, 1989; citado en Salazar, 2009).

2.1.1 Clasificación y Distribución

Diversos estudios recientes han mostrado que las orquídeas forman un grupo natural, es decir, que incluye todos los

descendientes de un ancestro común (Cameron y Chase, 1999) y forman parte de un grupo mayor, el orden Asparagales (Chase *et al.*, 1995; Dressler y Chase, 1995).

La clasificación interna de la familia ha sido debatida durante siglos (Rasmussen, 1999). La clasificación se ha basado en características morfológicas, en especial de la flor. Sin embargo, muchas orquídeas que tienen una morfología floral similar no están cercanamente relacionadas; por ejemplo, diferentes especies que utilizan el mismo polinizador pueden tener flores de forma, tamaño y color similares.

En la actualidad se reconocen tres linajes principales dentro de las orquídeas, consideradas de manera formal como subfamilias, de acuerdo con su orden de aparición en el árbol evolutivo de la familia, estas son Apostasioideae, Orchidoideae y Epidendroideae (Chase *et al.*, 2015). Se distribuyen en todos los continentes (excepto la Antártida) pero su mayor diversidad se concentra en regiones tropicales (Salazar, 2009).

La flora de orquídeas en México comprende 1 260 especies, y 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005), agrupadas en esta nueva clasificación (fig. 2) de las cuales alrededor del 40% son endémicas (Soto-Arenas, 1996; citado por Salazar, 2009). La mayoría están concentradas en selvas tropicales lluviosas y húmedas, situadas entre los 914 a 2 740 metros sobre el nivel del mar (Imes, 1997).

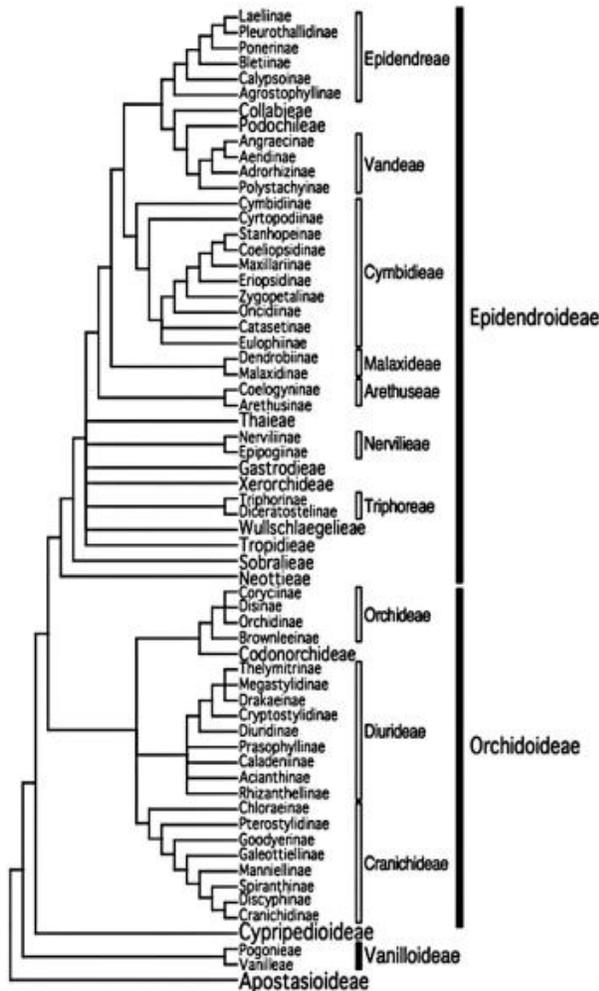


Figura 2. Árbol filogenético de la familia Orchidaceae, muestra las relaciones entre las distintas subfamilias (Chase *et al.* 2015)

2.1.2 Características de la familia Orchidaceae

Existen numerosos y diferentes tipos de orquídeas, clasificadas atendiendo al modo en que prosperan y sobreviven, al tipo de sustrato que necesitan y también a las diferentes condiciones que necesitan para vivir (Rittershausen y Rittershausen, 2010).

En la actualidad se acepta la siguiente clasificación: Epifitas, Terrestres y Litófilas (figura 3).

- Epifitas. Son plantas que se establecen sobre las ramas y troncos de los árboles, sus raíces no penetran la corteza del árbol, por lo que no le hacen daño, sólo crecen sobre el tronco o la rama del árbol que las soporta. Las orquídeas obtienen su alimento del aire, el agua de lluvia y de los desechos de la corteza de los árboles
- Terrestres. Crecen a nivel del suelo, del cual toman parte de los nutrientes que necesitan, también los obtienen del agua y del aire. Su hábitat son praderas y pastizales e incluso pueden crecer en matorrales
- Litófilas o rupícolas. Crecen sobre las rocas que les dan el soporte para su desarrollo, representa un estado intermedio entre una planta terrestre y una epífita (Téllez, 2011).

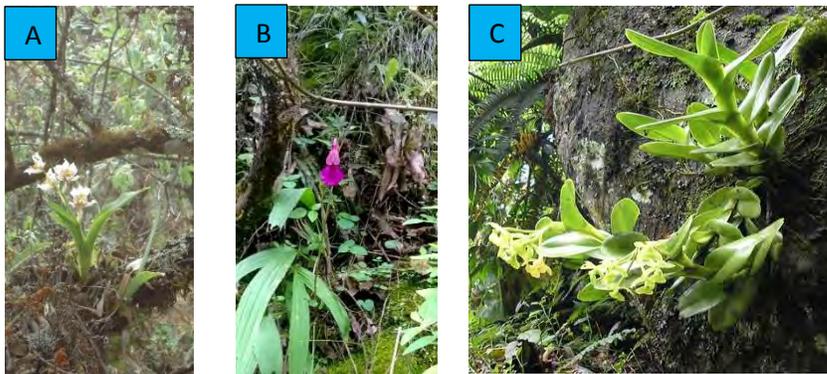


Figura 3. Tipo de crecimiento más común presente en las orquídeas.
A) Epífita B) Terrestre C) Litófilo

Patrones de crecimiento

Las orquídeas son plantas herbáceas con una estructura básica similar a la de muchas monocotiledóneas. Están constituidas por vástagos organizados en uno o dos tipos de crecimientos (Hágsater *et al*, 2005):

- Simpodial (fig. 4A). Las orquídeas que crecen en forma simpodial, lo hacen hacia los lados, en los que uno de los brotes terminales muere y continúa el crecimiento con la aparición de nuevos brotes. Éstas siempre tienen pseudobulbos
- Monopodial (fig. 4B). Se llama monopodiales a las orquídeas que crecen a partir de un sólo punto y se van desarrollando cada año, añadiendo hojas y creciendo un tallo en proporción. No tienen pseudobulbos ni rizoma y sus raíces normalmente son aéreas (frecuentemente colgantes), por esta razón las especies adaptadas a periodos de sequía, tienen hojas abultadas que les sirven como reserva. (CONAFOR, 2011).

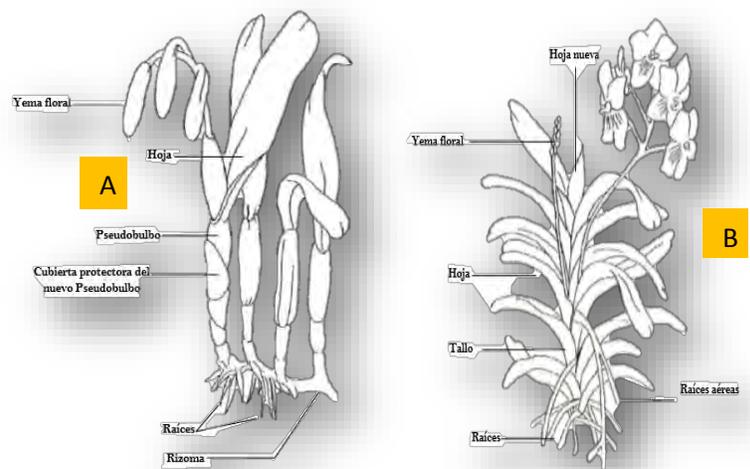


Figura 4. Patrones de Crecimiento en Orquídeas
A) Crecimiento simpodial, B) Crecimiento Monopodial
Tomado de Imes (1997)

Morfología

Tanto las plantas monopodiales como las simpodiales están constituidas por unidades funcionales completas, llamadas módulos o metámeras, que se repiten. La estructura modular (fig. 5), es sumamente plástica, permitiendo a las plantas “explotar” de muchas maneras el hábitat (Hágsater *et al*, 2005).

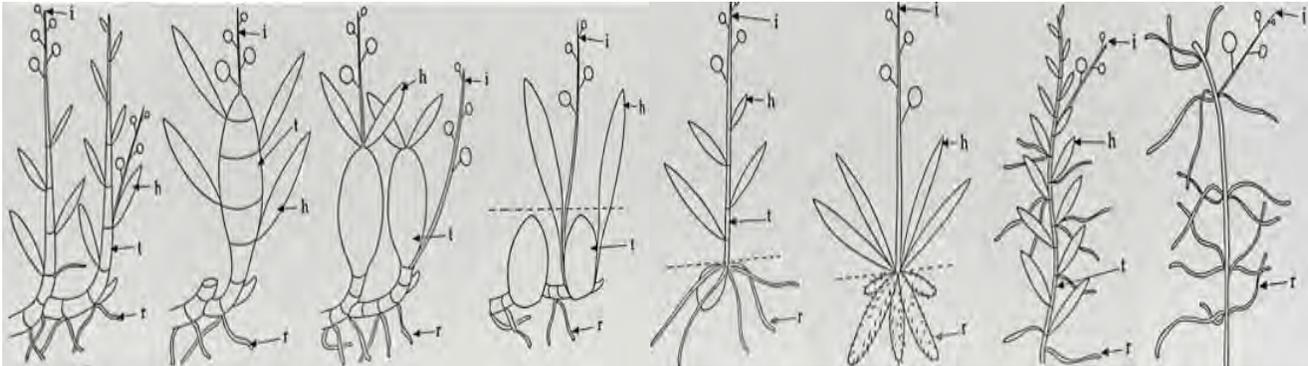


Figura 5. Adaptaciones Morfológicas en la familia Orchidaceae. i) Inflorescencia, h) hojas, r) raíces, t) tallo; tomado de: García, 2009

Raíces.

Las raíces (fig. 6) de las orquídeas son simples o ramificadas, carnosas y con un diámetro aproximado de entre 1 y 10 mm, dependiendo de la especie. En las especies terrestres las raíces son iguales a la de cualquier otra planta: alargada y ramificada, cubierta con pelos absorbentes; sin embargo en las epífitas presentan las raíces aéreas colgando o unidas a la corteza de los troncos. Su organización anatómica consiste en un cilindro vascular central rodeado de una endodermis, envuelta a su vez por la corteza; esta última constituye la mayor parte del volumen de la raíz y se encuentra delimitada hacia fuera por la exodermis, formada por algunas células de pared gruesa e impermeable y otras de pared delgada que permiten el paso de agua del exterior hacia la corteza. La porción más externa de la raíz es la epidermis, que suele formar un tejido esponjoso constituido por células que al madurar mueren y pierden el citoplasma, quedando solo sus paredes parcialmente engrosadas. Está cubierta de células muertas, llamada “velamen”, puede tener entre una y ocho células de grosor y es lo que le confiere el aspecto blanquecino característico a muchas raíces de orquídeas epífitas. Las raíces se encuentran asociadas con hongos conocidos como micorrizas, simbiosis que es importante para el desarrollo y nutrición de los dos organismos. Además de este tipo de raíces, cuya función es absorber agua y nutrientes y fijar la planta al sustrato, algunas orquídeas epífitas producen un tipo diferente que consiste en raicillas muy delgadas y rígidas que crecen verticalmente hacia arriba y contribuyen a enriquecer el sustrato de la planta al capturar hojarasca y otros detritos orgánicos (Hágsater *et al*, 2005; Téllez, 2011).



Figura 6. Crecimiento de raíces en un ejemplar cultivado de *Laelia* sp.

Tallos.

La estructura básica del tallo de las orquídeas es comparable a una caña o carrizo y está formado por segmentos o entrenudos delimitados por nudos o anillos cicatrizales donde originalmente se insertaban las hojas, vainas o escamas foliares (Hágsater *et al*, 2005).

Existe una gran variedad de tallos (fig. 7), desarrollados como respuestas adaptativas a los diferentes medios donde habitan las orquídeas: hay tallos aéreos, que crecen hacia arriba o colgando hacia abajo (Téllez, 2011).

Los pseudobulbos son tallos aéreos notablemente engrosados. Están presentes en muchas orquídeas epifitas y algunas terrestres o rupícolas. Sus contrapartes subterráneas son los cormos, característicos de varios grupos de orquídeas terrestres. Ambos tipos de tallos engrosados constituyen almacenes de agua y sustancias de reserva, como almidón, que son utilizados al menos en parte para sustentar la producción de flores y frutos y el desarrollo de nuevos vástagos (Hágsater *et al*, 2005).

Hojas.

Las hojas de algunas orquídeas presentan modificaciones y funciones particulares (fig. 8), además de las funciones básicas que desempeñan, como lo es la transpiración, el intercambio gaseoso y la producción de nutrientes mediante fotosíntesis. En las orquídeas también varían mucho en forma, tamaño, grosor o textura, características que pueden indicar el lugar o el ambiente de procedencia de las plantas. Si las condiciones climáticas son secas, las hojas son de consistencia carnosa o suculenta y actúan como estructura de reserva para sobrevivir los periodos largos de sequía (Hágsater *et al*, 2005; Téllez, 2011).



Figura 8. Diferentes tipos de hojas presentes en la familia Orchidaceae; tomadas de: <https://tillandsias.wordpress.com>



Figura 7. Diferencia morfológica de los tallos que presenta la familia Orchidaceae; tomadas de: <https://tillandsias.wordpress.com>

Las hojas suculentas representan una inversión importante de recursos para la planta y por lo general son funcionales durante varios años. Una estrategia alternativa es la producción de hojas delgadas, relativamente poco costosas, que mueren y caen al final de cada temporada de crecimiento (Hágsater *et al*, 2005).

Para soportar largos períodos de insolación, las hojas, por lo general, son duras y alargadas y no presentan pseudobulbos. Si el ambiente es mayormente sombreado, las hojas cuentan con una gran superficie que les permite captar la luz, mientras que en ambientes siempre húmedos las plantas no necesitan almacenar agua por lo que las hojas son delgadas. La forma de las hojas va desde oval, casi redonda, hasta un perfil con forma de lanza (lanceolada) o casi lineal (Téllez, 2011).



Figura 9. Diversidad de Inflorescencias en las Orquídeas; tomadas de: <https://tillandsias.wordpress.com>

Flores

Las flores de las orquídeas (fig. 9), son generalmente la parte más atractiva de la planta y en ellas se encuentran las características principales que las unifican como grupo. Las formas que adquieren han dado pie a un sinnúmero de nombres como toritos, zapatillas, bailarinas, ranas, cisnes, arañas, mariposas y micos entre otros (García, 2009). Generalmente las flores se agrupan en espigas o racimos, aunque existen especies que presentan una sola flor. Las inflorescencias muestran pocas o muchas flores distribuidas de manera densa o laxa, cuyo conjunto presenta forma cónica, cilíndrica u ovoide (Velasco y Pino, 2008).

A pesar de que su estructura es muy similar a la de otras, como los lirios, las iris y las azucenas, poseen las siguientes características distintivas (fig. 10):

- Tienen simetría bilateral.
- Presentan una fusión, al menos parcial, entre los filamentos de los estambres y el estilo para construir

una estructura única que incluye los órganos sexuales masculinos y femeninos, llamada columna o ginostemo.

- La mayoría posee un solo estambre fértil, debido a la supresión de los estambres en un lado de la flor.
- Uno de los pétalos, el opuesto a los estambres, suele ser diferente de los otros dos (en cuanto a tamaño, forma, coloración, entre otras características), llamado labio o labelo y es, por lo general la parte más vistosa de la flor. Tiene la función de atraer, guiar o servir como plataforma de aterrizaje a los polinizadores.
- Presentan un fenómeno denominado “resupinación”, el cual es un cambio de posición del labelo, el cual ocurre en la antesis de la flor.
- El polen presenta algún grado de agregación y en la mayoría es liberado en unidades formadas por cuatro granos (“tétradas”) que a su vez constituyen cuerpos más o menos solidos llamados polinios.
- Con excepción de las orquídeas Apostasioides y Cypripedioides, la columna presenta un “róstelo”, es una parte no receptiva del lóbulo medio del estigma que separa los polinios de la superficie fértil del estigma e interviene en la dispersión de aquellos.

Las flores de orquídea por lo general son hermafroditas y portan tanto órganos sexuales masculinos como femeninos. Sin embargo, hay algunos casos en que estos están separados ya sea por tiempo o en el espacio (Hágsater *et al*, 2005).

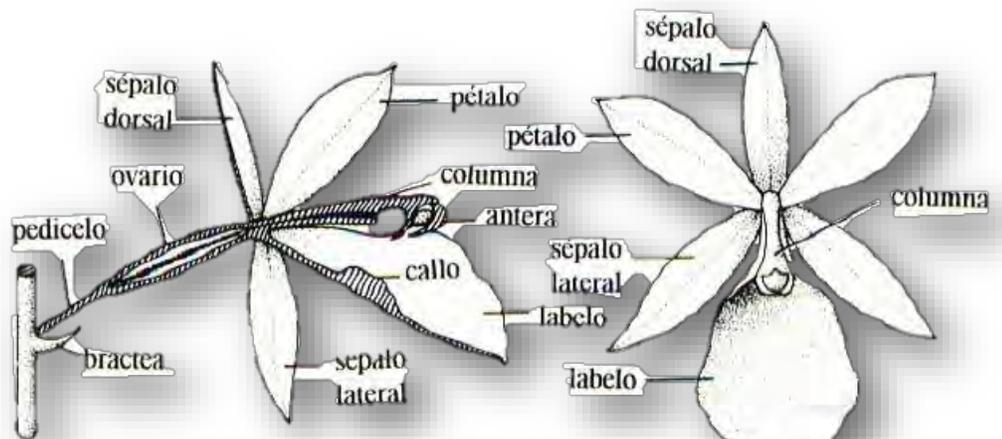


Figura 10. Morfología Floral de la familia Orchidaceae Tomado de: Dressler (1993)



Figura 11. Polinización de Orquídea por colibríes
tomado de: <https://tillandsias.wordpress.com>

Polinización.

En la naturaleza cada flor es el resultado de un proceso evolutivo y la única razón de su existencia es facilitar el proceso de polinización; las orquídeas son, posiblemente las plantas que despliegan los mecanismos más complejos y asombrosos que se conozcan (García, 2009).

Las orquídeas tienen como finalidad efectuar la polinización cruzada, es decir, la transferencia de polen entre la antera de una flor y el estigma de otra de la misma especie. Todas las orquídeas que no se auto-polinizan son polinizadas por animales, sobre todo insectos como abejas y avispas, diversas clases de moscas y mariposas diurnas y nocturnas, además de aves como los colibríes (fig. 11). Las flores presentan conjuntos de atributos relacionados con la atracción y guía del polinizador, conocidos como síndromes de polinización (Hágsater *et al*, 2005). Su polinización es tan especializada que generalmente existe un polinizador para cada especie de orquídea, de tal forma que si este no estuviera o ya no existiera en la naturaleza, es probable que también la orquídea lo haga. Las estrategias de atracción para estos animales se encuentran en las mismas flores y en las posibles recompensas que ofrecen como néctar, ceras y aceites. También lo son la forma, su tamaño, el color de los sépalos, pétalos y labelo y las fragancias que emiten (García, 2009).

Frutos (cápsulas).

Después de la polinización y fecundación de los óvulos, el ovario inicia su crecimiento en grosor y longitud hasta quedar convertido en un fruto, también llamado cápsula (fig. 12), dehiscente, lo que significa que en la maduración (cuando su color cambia de verde a amarillo) se abre por sus costillas y a través de dicha abertura libera las semillas. La maduración depende de la especie (entre cuatro y 12 meses). Sus formas también son muy variadas, de acuerdo a las especies (Téllez, 2011).



Figura 12. Cápsulas de Orquídea. Tomadas de:
<https://tillandsias.wordpress.com>

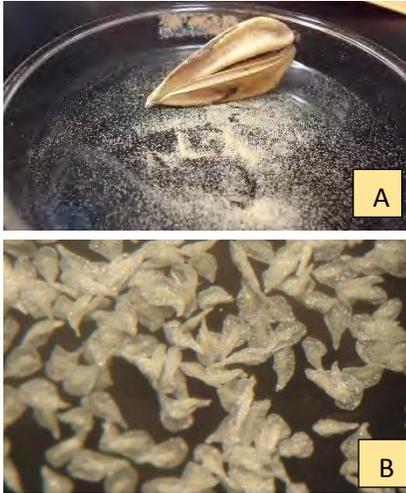


Figura 13. Semillas de Orquídea

- A) semillas obtenidas de una capsula madura.
 B) vista en microscopio estereoscopio de semillas de orquídea

2.1.2.3.2 Semillas.

Las semillas de estas plantas son consideradas entre las más simples por no contar con endospermo y estar constituidas por un embrión cubierto por una o dos capas de células (Ortega-Larrocea, 2009). Es decir, las orquídeas contienen pocos nutrientes almacenados que le permitan al embrión sobrevivir por largo tiempo; En el medio ambiente la germinación ocurre cuando el alimento necesario es recibido mediante una simbiosis entre la semilla y un hongo de la especie *Rhizoctonia*. El hongo extrae nutrientes de la materia orgánica vegetal en descomposición y elimina azúcares, estos pasan a la semilla por pequeños tubos de micelio que penetran la capa externa de ésta. La ausencia de reservas alimenticias hace que en su medio natural, de las muchas semillas contenidas en la cápsula (fig. 13), solo se desarrollen unas pocas plantas y además el almacenamiento de las semillas sea posible por periodos cortos (SCO: Sociedad Colombiana de Orquideología, 1965).

Ciclo de vida (fig. 14).

Las semillas de orquídea tropicales epifitas tienden a germinar en la luz, mientras que las semillas de orquídeas terrestres germinan en la oscuridad, (la luz en muchos casos inhibe la germinación). Los primeros signos de germinación se aprecian cuando la semilla se embebe de agua y comienza a hincharse, seguido del cambio en el color de la semilla (puede parecer de color paja y posteriormente ponerse verde, ya que comenzará a producir la clorofila). A diferencia de una semilla común (en el que se desarrollara la raíz y las hojas en el momento de la germinación), las semillas de orquídea se convertirá en una minúscula bola verde de células llamado "Protocormo". Cuando el protocormo crece, aparecen finas raíces (parecidos a pelos) absorbentes en la superficie inferior; y una vez que ha acumulado suficiente materia orgánica, un primer brote emerge en la superficie superior. Esto, a su vez es seguido por las primeras hojas y raíces. La germinación de orquídeas terrestre sigue una ruta similar, con la diferencia de que las semillas germinan en la oscuridad. Su desarrollo es más lento. Los protocormo son de color crema y a menudo desarrollan muchos rizoides. (Seaton y Ramsay, 2005).



Figura 14. Ciclo de vida de una orquídea epífita (*Laelia*), modificado. Tomado de Seaton y Ramsay (2005)

2.2. AREAS NATURALES PROTEGIDAS

Las áreas naturales protegidas (ANP) son porciones del territorio de los estados, municipios o localidades cuyos recursos naturales (bosques, selvas, lagos, ríos, etc.) no están muy dañados, por lo que es importante cuidarlos y conservarlos (Paz-Salinas y Cuevas, 2006). En la actualidad, la integridad de los ecosistemas que conforman este patrimonio se ve amenazada por diversos problemas derivados de los asentamientos humanos irregulares, así como la falta de ordenamiento y regulación en el cambio de uso de suelo (Ruiz y Arellano, 2015). En México, como en muchos otros países, la política de conservación del gobierno está enfocada a conservar y proteger los diferentes ecosistemas. Una forma de hacerlo es crear ANP; así se establecen normas para usar el territorio y sus recursos, lo que no quiere decir que se prohíba su uso y aprovechamiento, sino que este debe hacerse de manera planificada. También pueden ser una herramienta muy importante para los pueblos que viven dentro de ellas, porque protegen su patrimonio natural y cultural (Paz-Salinas y Cuevas, 2006). Sin embargo, la tala ilegal de árboles y la extracción comercial clandestina de recursos vegetales, en muchos casos endémica, así como la ocurrencia de incendios forestales ocasionados por factores antropogénicos (Ruiz y Arellano, 2015), provocan la pérdida de diversidad en estas zonas.

2.2.1 Tipos de áreas naturales protegidas

Según lo establece el Art. 46 de la Ley general del Equilibrio Ecológico y la protección al ambiente, hay ocho tipos distintos de áreas naturales protegidas (Paz-Salinas y Cuevas, 2006):

- Reservas de la Biosfera
- Parques Nacionales
- Monumentos Naturales
- Áreas de Protección de Recursos Naturales
- Áreas de Protección de Flora y Fauna
- Santuarios
- Parques y Reservas Estatales
- Zonas de Preservación Ecológica de los Centros de Población.

De estos, los seis primeros son administrados por el gobierno federal; y los dos últimos por los gobiernos estatales. Cada uno es diferente según su objetivo de creación (Paz-Salinas y Cuevas, 2006). La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas administra actualmente 176 áreas naturales de carácter federal (cuadro 1), que representan más de 25 394 779 hectáreas y están divididas en nueve regiones en el país (CONANP, 2015).

Cuadro 1. Áreas naturales protegidas (federales) presentes en México y categorización (tomado de: <http://www.conanp.gob.mx/> en 2012)

Número de Áreas Naturales Protegidas	Categoría	Superficie en hectáreas	Porcentaje de la superficie del territorio nacional
41	Reservas de la Biosfera	12 652 787	6.44
67	Parques Nacionales	1 445 301	0.74
5	Monumentos Naturales	16 268	0.01
8	Áreas de Protección de Recursos Naturales	4 440 078	2.26
36	Áreas de Protección de Flora y Fauna	6 684 771	3.40
18	Santuarios	146 254	0.07

2.2.2 Parques Nacionales

Los parques nacionales son lugares destinados a la conservación de la biodiversidad, en los que el público puede disfrutar de actividades de esparcimiento y recreación. Estos parques brindan, además, servicios importantes para las persona, ya que contribuyen a mejorar su calidad de vida y conforman un factor indispensable en los procesos de equilibrio y limpieza del medio ambiente. Al estar considerados como áreas naturales protegidas, estos espacios territoriales tienen como función principal la preservación de recursos naturales de valor especial, o bien de ecosistemas representativos a nivel local, regional, nacional e incluso internacionalmente. Los parques nacionales ocupan, desde hace ya varias décadas, un lugar primordial dentro del movimiento conservacionista mundial. Para la creación de este tipo de áreas es importante la definición de políticas específicas de manejo y aprovechamiento de recursos naturales, así como el establecimiento de estrategias integrales para su funcionamiento (Cueto, 2006).

Parque Nacional “El Tepozteco” (PNET), (fig. 15).

“El Tepozteco”, nombre que deriva directamente del vocablo náhuatl “Tepoztecatl”, mismo nombre que se aplicaba a un héroe fantástico, a un semidiós de la obscura teogonía tlahuica, conocido también por 'Ometochtli' (dos conejos), genio del pulque, de la borrachera. Era el Baco y el Hércules, el Marte y el Teseo de aquellos pueblos desprendidos (Sosa, 1959 citado por Vargues-Márquez, 1997).

Es un lugar de interés geológico, dentro de sus límites hay elevaciones formadas por una serie de estratos o capas que se fueron formando en distintas emisiones volcánicas de frágil consistencia y que, los años y la lluvia han erosionado, dándole formas extrañas y caprichosas, dignas de admirarse. Los cerros presentan paredes verticales donde se aprecian claramente las capas que los forman; desde estas elevaciones que rodean el valle de Tepoztlán se goza de maravillosas vistas de este Valle y del de Cuernavaca (Ruiz y Arellano, 2015). En el noroeste del parque se disfruta de un clima templado y frío con abundantes arboles de pino, oyamel y encino; en el sur, al pie de la serranía, el clima y la vegetación subtropical ofrecen un marco muy agradable para las actividades al aire libre. Sobre la elevación llamada Tlahuiltepec o “Cerro que alumbra” fue construido el famoso templo prehispánico del Tepozteco en honor a Tepoztécatl, dios del pulque y también de la fecundidad y la cosecha (Ruiz y Arellano, 2015).

Decreto

Decreto que declara Parque Nacional “el Tepozteco” los terrenos que rodean el poblado de Tepoztlán, Morelos. Al margen un sello con el escudo nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.-Presidencia de la Republica LAZARO CARDENAS, Presidente Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, a sus habitantes Sabed: Que en uso de las facultades que me otorgan los artículos 22 y 41 de la Ley Forestal, de 5 de abril

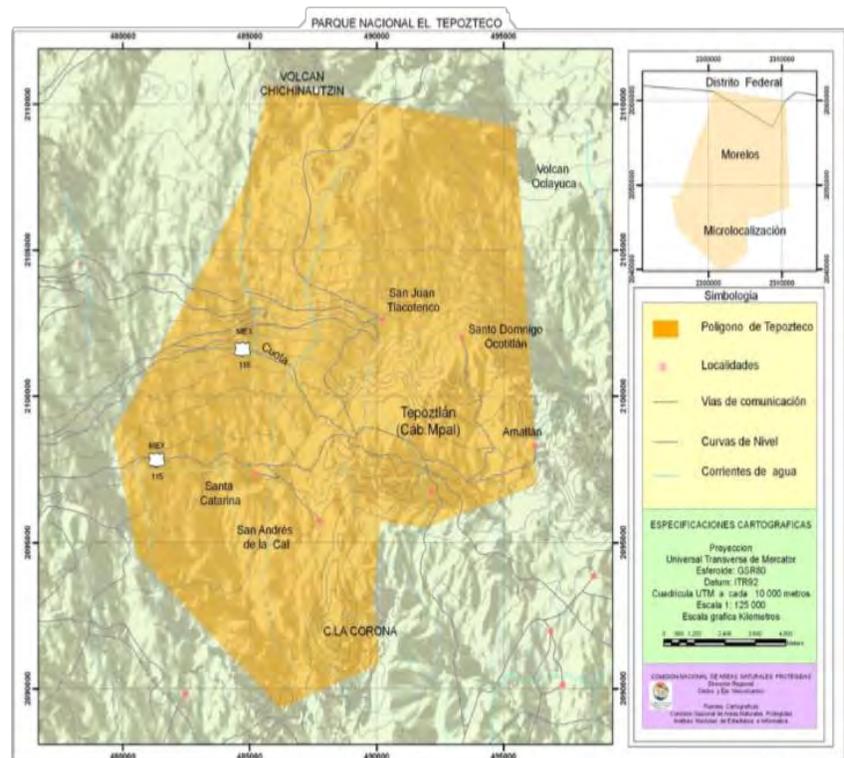


Figura 15. Diagrama del Parque Nacional “El Tepozteco” tomado de CONANP, 2008

de 1926, y atendiendo lo dispuesto por los artículos 39, 47 y 48 del Reglamento de dicha ley, y **CONSIDERANDO**, que la Sierra de Tepoztlán en el Estado de Morelos, constituye una región de excepcional belleza, que su propia conformación dio origen al precioso valle donde tiene su asiento el pueblo de Tepoztlán, lugar de interés no solo por los panoramas que allí se dominan, así como desde las partes más elevadas de dicha serranía, sino también por haber constituido en la antigüedad, la sede de una de las civilizaciones más asombrosas de su tiempo, que las leyendas atribuyen a la sabiduría de Tepoztécatl u Ometochtli, personaje fabuloso que dio a los tepoztecos la primacía sobre grandes señoríos y llevo la fama de su pueblo hasta las regiones apartadas de Chiapas y Guatemala, y los llevo a la realización de obras asombrosas, entre las que aún se conserva la pirámide de Tepoztlán, situada en la cumbre más elevada del cerro de Tepoztlán; **CONSIDERANDO**, que las regiones de mayor interés en la historia antigua de nuestro pueblo, merece atención especial, conservando sus bellezas naturales, para lo cual deben protegerse los bosques fomentando el desarrollo de la vegetación arbórea en los lugares deforestados, para constituir así un centro de atracción donde el turismo encuentre un amplio campo de estudio y de observación en la historia de nuestro pueblo antiguo, de la que nuestra civilización actual no desconoce sus méritos y ha logrado conservar sus joyas arqueológicas de mayor interés: **CONSIDERANDO**, que aparte de la conservación de las bellezas naturales, es necesario dar una atención especial a la protección de los terrenos que por la acción de los agentes naturales han quedado expuestos a la degradación de sus llanuras situadas en las partes bajas, y cuya acción pone en peligro también el régimen hidráulico de las corrientes de agua, todo lo cual adquiere una importancia especial en la región de Tepoztlán, he tenido a bien expedir el siguiente **DECRETO**:

ARTICULO PRIMERO. Se declara Parque Nacional, con el nombre de “El Tepozteco”, los terrenos que rodean al pueblo de Tepoztlán, Estado de Morelos, destinándolos a la conservación perpetua de la Fauna y Flora silvestres, así como para la protección de las joyas arqueológicas de la comarca.

ARTICULO SEGUNDO. El parque nacional a que se refiere el artículo anterior, comprenderá los terrenos situados dentro de los limites siguientes: Partiendo de la cumbre del cerro de Chichinautzin, hacia el Este, hasta llegar a la cumbre del cerro de Chihuacuilot o Zoanquillo; de este lugar, hacia el Sur, hasta la cumbre del cerro de La Mina, de donde con dirección general al Suroeste, se tocan los puntos conocidos con los nombres de cerro del Ahorcado, Ojuelos, cerro de Los Gañanes, cerro Barrica de Plata y Mojonera de Acolapa; de ese lugar con dirección al Noroeste y pasando por la mojonera de Las Balderas, se llega al cerro de La Herradura, de cuyo lugar, en dirección al Noreste se toca la mojonera de La Paz y Metusco, terminando los linderos en la cumbre del cerro de Chichinautzin, que se tomó como punto de partida.

ARTICULO TERCERO. El Departamento Forestal y de Caza y Pesca tendrá a su cuidado la administración del parque y la conservación de los terrenos forestales comprendidos en el mismo, ya sean de particulares, comunales o ejidales, proporcionando las facilidades de explotación dentro de las normas que garanticen la perpetua conservación de su vegetación forestal y la restauración artificial en casos necesarios, manteniendo la actual belleza de los paisajes y proporcionando a los vecinos de los pueblos las ventajas y compensaciones consiguientes al desarrollo del turismo: con esos fines, el mismo de departamento forestal y de Caza y de Pesca, con la cooperación de las autoridades municipales de Tepoztlán y representantes de las comunidades indígenas de la región, constituirán el Comité de Mejoras del Parque Nacional a que se refiere el presente decreto.

Transitorio: ARTICULO UNICO: El presente decreto entrara en vigor tres días después de su publicación en el “Diario Oficial” de la Federación.

En cumplimiento de lo dispuesto por la fracción I del artículo 89 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, y para su debida publicación y observancia, promulgo el presente Decreto en la residencia del Poder Ejecutivo Federal, en la ciudad de México, Distrito Federal, a los trece días del mes de enero de mil novecientos treinta y siete.- L. Cárdenas.- Rubrica.- El jefe del Departamento Forestal y de Caza y Pesca, Miguel A. de Quevedo.- Rubrica.- Al C. Lic. Silvestre Guerrero, Secretario de Gobernación.- Presente. Decreto publicado en el Diario Oficial de la Federación el 22 de enero de 1937 (Paz-Salinas y Cuevas, 2006; Vargas-Márquez y Escobar, 2000).

Ubicación

El PNET tiene una extensión territorial de 23,286 Ha, se ubica en la zona norte del estado de Morelos Comprendida entre los 18° 53' 20" y 19° 05' 30" de latitud N y los 99° 02' y 99° 12' 55" de longitud O con un rango altitudinal que va de los 1 380 a los 3 350 m. Entre los municipios de Cuernavaca, Yautepec, Tlalnepantla y la mayor parte de la superficie de Tepoztlán, en el estado de Morelos; y la delegación Milpa Alta al sur del Distrito Federal. (CONANP, 2008). Junto con el Parque Nacional Lagunas de Zempoala conforman el Corredor Biológico Chichinautzin (CBCh). Dicho Corredor (fig. 16), se encuentra dentro de la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico Transversal (ENT) en donde convergen las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical del continente americano (CONANP, 2008). Las regiones biológicas del ENT y la Sierra Madre del Sur son zonas de gran importancia en México.

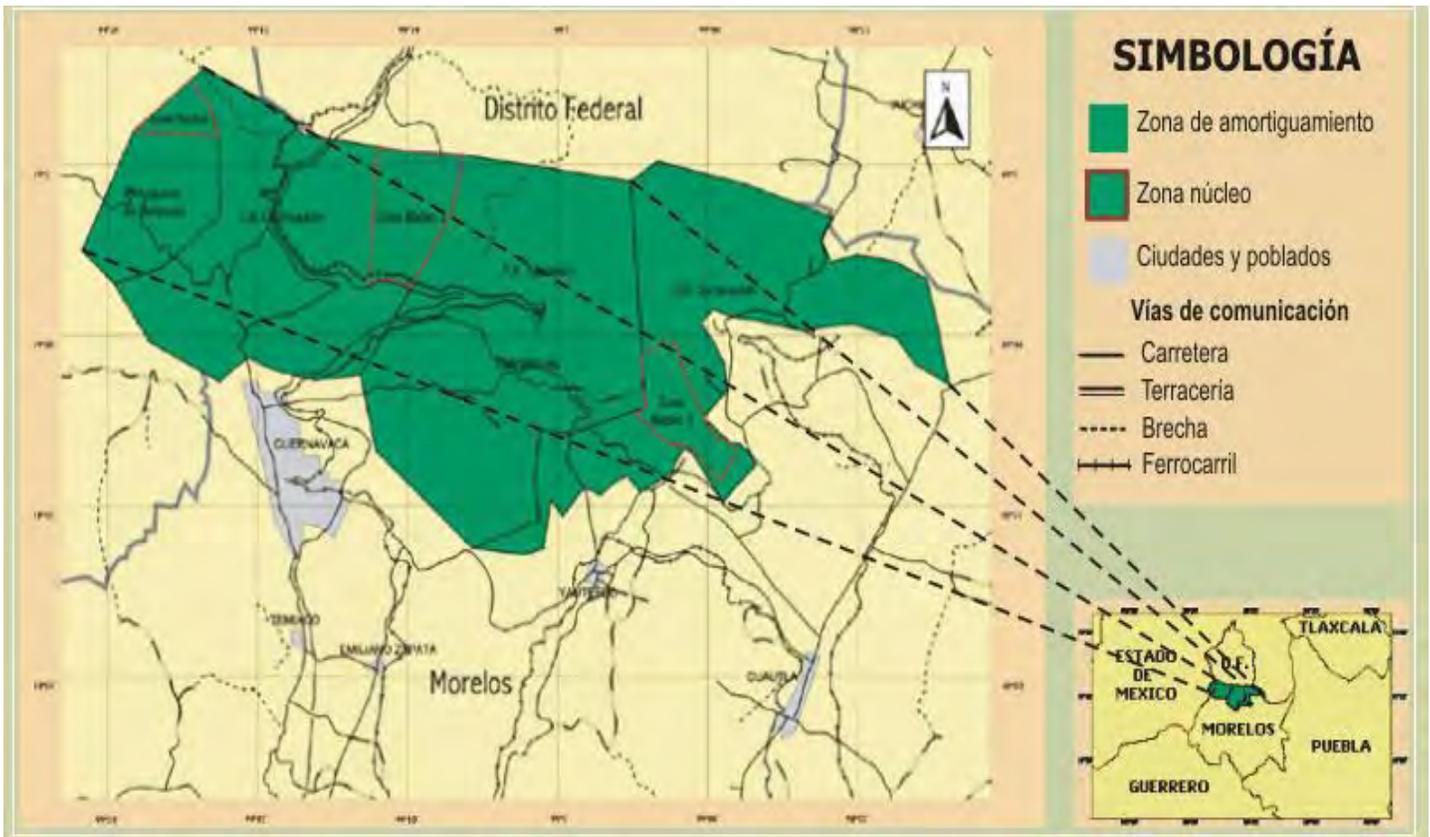


Figura 16. Mapa del Corredor Biológico Chichinautzin, Área de Protección de Flora y Fauna Silvestre. Tomado de: http://chichinautzin.conanp.gob.mx/donde_estamos/mapa_cobio.htm

Problemática

Estas regiones conforman uno de los principales centros de endemismo y biodiversidad de algunos organismos; tales como mamíferos, reptiles, y grupos vegetales (Rzedowski 1991). El CBCh sirve de barrera a la conurbación de las manchas urbanas del norte de Morelos y sur del Distrito Federal, y establece la continuidad de los procesos ecológicos y evolutivos de la biota, además de proteger la zona intermedia entre los Parques Nacionales Lagunas de Zempoala y El Tepozteco (INE, 2000; citado por Vega *et al*, 2008) es, además, una importante zona de recarga de acuíferos del estado de Morelos. Actualmente el CBCh es amenazado por el cambio del uso de suelo, la venta de tierras, incendios forestales, la cacería furtiva, la deforestación y la venta ilegal de tierra de monte y roca volcánica (CONANP, 2008).

2.3.- CONSERVACION

La conservación es una disciplina dedicada a la preservación, rescate, manutención, estudio y utilización del patrimonio que representa la biodiversidad. La conservación puede realizarse en dos modalidades: *in situ* y *ex situ*. Estas dos modalidades son complementarias y permiten garantizar la conservación del patrimonio genético de las especies y sus poblaciones, en el mediano y largo plazo (Pezoa, 2001).

El Convenio sobre la Diversidad Biológica, define que la conservación *in situ* “es la conservación, manutención y recuperación de poblaciones viables en sistemas dinámicos y evolutivos del hábitat original o, en el caso de especies cultivadas, en el entorno en que hayan desarrollado sus características” y la conservación *ex situ* se define como “la conservación de muestras genéticamente representativas de las especies o cultivos, que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de sus hábitats naturales o lugares de cultivo, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas” (Frankel y Soulé 1992 citado por: Pezoa, 2001).

2.3.1. Conservación *in situ*

A menudo, las actividades de conservación *in situ* se encuentran con problemas de aplicación derivados de la necesidad de establecer marcos legales de protección de las áreas y hábitats pertinentes, de conflictos de interés con otras actividades humanas, y de falta de una asignación continuada y a largo plazo de recursos económicos a las instituciones encargadas de las tareas de conservación. A esto cabe añadir, en numerosas ocasiones, la falta de una información básica sobre la biología de las especies a conservar (Iriondo, 2001).



Figura 17. Área de protección dentro del Parque Nacional el Tepozteco

La participación de las comunidades locales en la conservación *in situ*, es el modelo que se promueve a nivel internacional, debido a su dominio sobre los territorios y a los conocimientos tradicionales que mantienen en torno al uso y manejo de los recursos naturales. Al entregar el rol de la conservación a las comunidades junto a la capacitación sobre el uso sustentable de la biodiversidad, se entregan invaluable oportunidades de desarrollo socioeconómico a las comunidades, las cuales en general, tienen elevados índices de extrema pobreza y marginalidad social (Hoyt 1988; citado por Pezoa, 2001). Por otra parte, la conservación *in situ* de especies amenazadas implica una

adecuada protección y gestión de sus ecosistemas. Existe un gran número de modelos de protección de espacios naturales en donde la actividad humana queda condicionada o restringida en mayor o menor medida (fig. 17). No obstante, frecuentemente la simple restricción de la actividad humana en el entorno no resulta suficiente para asegurar la supervivencia de las especies a conservar. (Iriondo, 2001). Sin embargo, esta modalidad enfrenta serios problemas.

En México, la única estrategia para este tipo de conservación es a través de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (Arriaga *et al.*, 2000; citado por Téllez 2011).

2.3.2. Orquídeas *in situ*



Figura 18. Forofito *in situ* con presencia de la Orquídea *Stellis retusa*.

Una característica de la mayoría de estos sitios (bosques, selvas y otros ecosistemas en los que se desarrollan las orquídeas epífitas), es la falta de regeneración de los árboles y quizá la mitad de las orquídeas se encuentran en situaciones muy precarias, sobre los árboles ya secos o con pocos años de vida (fig. 18). Debido a esta situación, las orquídeas no tienen mucho futuro, sus árboles de soporte dejan de existir y la orquídea cae al suelo y muere. Además, aunque tuviera la posibilidad de atraer un polinizador adecuado, no tendría otros árboles cercanos donde pudieran aterrizar las semillas para iniciar la colonización de un nuevo sustrato (Damon, 2010). Además, en nuestro país, la mala organización, la extracción, la invasión de zonas núcleo, los incendios forestales, los problemas de límites, la tendencia de la tierra en estas áreas de conservación y la escasa vigilancia y resguardo son algunos de los problemas que hacen que la conservación *in situ* de orquídeas en las áreas naturales protegidas no sea exitosa (Télez, 2011).

La conservación *in situ* es la estrategia ideal o deseable para la conservación de especies, ya que implica la conservación de los ecosistemas, y la conservación de especies amenazadas en sus hábitats naturales, y constituye la manera más apropiada de enfocar la problemática de la forma más lógica y el método más económico de que forma parte (Gómez-Campo, 1985 citado por: Menchaca y Moreno, 2011).

conservación de especies amenazadas, ya que se considera que conservar una entidad biológica es dentro del ecosistema del

Soto *et al.*, (2007; citado por Télez, 2011) hacen un análisis interesante del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas, en el que encontraron que de las 151 áreas naturales protegidas decretadas por el gobierno mexicano, solamente 43 incluían especies de orquídeas con alguna categoría de riesgo; de esa lista, 15 son reservas de la biosfera, 19 parques nacionales, cuatro monumentos naturales y cinco áreas para la protección de flora y fauna.

Las orquídeas representan la cúspide de procesos evolutivos y ecológicos dentro del reino de las plantas, ya que han desarrollado un amplio potencial evolutivo para su adaptación que si bien les ha permitido aprovechar un recurso y ocupar ciertos nichos, también las hace ser muy vulnerables ante los cambios en su ambiente, de la cual son objeto a través de la colecta indiscriminada; destrucción, modificación y fragmentación de su hábitat, estas características provocan bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales así como el establecimiento de asociaciones con polinizadores, micorrizas y con otros organismos que son a veces tan específicas y complejas. (IUCN/SSC 1996; Ospina 1996; citado por Ramos, 2007).

2.4.- CULTIVO DE TEJIDOS O PROPAGACION *In vitro*

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín “en vidrio”), abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas (Abdelnour-Esquivel, 1994). Los inóculos pueden ser ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street, 1977; citado por Hurtado y Merino, 1987). Podemos definir el cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con las cuales podemos ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénicos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio (Abdelnour-Esquivel, 1994).

Al igual que en otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre propagada *in vitro* son clones, es decir, son copias genéticamente idénticas entre ellas e idénticas a la planta madre. En plantas propagadas por semilla (Propagación sexual), la descendencia no es clonal, ya que cada semilla tiene su propia base genética que resulta de la mezcla de ambos progenitores, por lo tanto, cada individuo es único (Abdelnour-Esquivel, 1994)

El cultivo de tejidos puede utilizarse para diversos propósitos como son: la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma. (Abdelnour-Esquivel, 1994).

2.4.1. Micropropagación

La micropropagación es la técnica que ha logrado rápida aceptación en la industria y se está practicando tanto en especies hortícolas como en ornamentales y aun en leñosas. Según Abdelnour-Esquivel (1994), esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación. Entre ellas se pueden citar:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempo económicamente costeable.
- Mayor control sanitario del material que se propaga.
- Facilidad de transportar el material *in vitro* de un sitio a otro.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos

2.4.2.- Breve historia del cultivo de tejidos vegetales

Desde hace más de cien años, las investigaciones de fisiología vegetal han utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales (Navarro y Vera, 1987). A continuación se muestra una cronología de estas investigaciones.

Cuadro 2. Cronología histórica del cultivo de tejidos vegetales. (Navarro y Vera, 1987)

Año	Acontecimiento
1860- 1861	Sacks & Knops observan que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas y preparan una solución nutritiva.
1878	Vochting estudio la polaridad en la formación de nuevas yemas y raíces de yemas axilares en <i>Salix</i> .
1898	Haberlandt realiza un intento de cultivo de células aisladas de tres géneros de monocotiledóneas sin obtener éxito.
1902	Haberlandt declara que los cultivos posteriores deben encausarse hacia el estudio de las condiciones bajo las cuales las células se aisladas “sufren” división, pues decía que si las células son Totipotentes sería posible modificar su ambiente y nutrición.
1902	Winkler critica los trabajos de Haberlandt por no haber elegido el tejido adecuado y el medio de cultivo era simple.

1922	Haberlandt y Kotte cultivan ápices radiculares de chícharo y maíz en un medio enriquecido con sales inorgánicas, glucosa, peptona, asparagina y varios aminoácidos.
1922	Robbins enriquece el medio de cultivo con glucosa, agar y sales inorgánicas para el cultivo de ápices radiculares de varias especies.
1922	Kotte reporta trabajos desafortunados de células aisladas.
1922	Robbins reporta trabajos desafortunados de células aisladas.
1929	Schwecker reporta trabajos desafortunados de células aisladas.
1931	Schitterer reporta trabajos desafortunados de células aisladas.
1931 y 1933	Pfleiffer reporta trabajos desafortunados de células aisladas.
1933	La Rue reporta trabajos desafortunados de células aisladas.
1934	White obtuvo un crecimiento activo de ápices de raíz de tomate en un medio líquido conteniendo sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa. Posterior a ello demostró que el extracto de levadura puede sustituirse por tres vitaminas del grupo B: Tiamina, Piridoxina y Niacina.
1934	Gautheret reporta en cultivos de cambium de <i>Salix capraea</i> y <i>Populus nigra</i> un desarrollo semejante al crecimiento de algas en un medio solidificado de Knop adicionado de glucosa y cisteína hidrociorada.
1936	Robbins estudio el efecto de los microelementos inorgánicos y señaló que el Zinc, Manganeso y Boro son necesarios para el cultivo de ápices radiculares.
1937	White descubre la importancia de la vitamina B para el crecimiento de las raíces.
1937	Went y Thimann descubren la auxina AIA (Ácido Indolacético).
1937	Gautheret estudia el efecto de los factores ambientales del desarrollo vegetal en sus medios de cultivo.
1937-1938	Nobecourt obtiene proliferación celular en cultivo de raíces de zanahoria y es el primero en obtener callosidades con crecimiento limitado.
1938	Gautheret cultiva raíces de zanahoria pero modifica el medio de Nobecourt en la glucosa, vitamina B (Tiamina), Cisteína hidrociorada y AIA.
1939	Nobecourt y Gautheret reportan un crecimiento indefinido en tejido de raíz donde observan la formación de callosidades sembradas en un medio sólido, al igual que White; que al transferir a medio fresco seguían proliferando.
1941	Van Oberbeek, Concklin y Blakeslee utilizan la leche de coco para el cultivo de embriones de cocos y <i>Datura</i> observando resultados semejantes.
1948	Caplin y Steward dieron a conocer el efecto que ejerce la leche de coco en combinación con 2-4 D; además con ella condujeron a la identificación de otra clase de hormona vegetal y demostraron nuevamente la totipotencialidad de células somáticas del cuerpo de la planta.
1952	Morel y Martin son los primeros en obtener plantas libres de virus en <i>Dalia</i> a partir de meristemos apicales de tallo.
1954	Muir, Hidebrandt y Riker transfieren segmentos de tejido de callo a medio líquido en agitación y tienen éxito al obtener cultivos en suspensión.
1954	Skoog identifica la 6-furfurilaminopurina (cinetina) observando la habilidad de este regulador del crecimiento vegetal para iniciar la división celular.
1957	Skoog y Miller usando combinaciones de auxinas y cinetina, controlaron más detalladamente la formación de brotes y raíces en cultivos de callos del Tabaco.
1958	Muir con la técnica nodriza y crecimiento en microcámaras, aisló y describió las características de los clones celulares aislados.
1960	Cocking reporto la liberación de protoplastos.
1962	Murashige y Skoog desarrollan un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco.
1963	White organiza el primer congreso internacional de cultivo de tejidos en la universidad de Pennsylvania.
1966	Guha y Maheshwari obtienen las primeras plantas haploides de <i>Datura innoxia</i> .
1967	Bourgin y Nitsch reportan la producción de plantas haploides de <i>Nicotiana tabacum</i> y <i>Nicotiana sylvestris</i> .
1970	Nagata y Takebe demostraron que los protoplastos aislados del mesófilo de hoja de tabaco pueden regenerar su pared y posteriormente dividirse y formar nuevas colonias de células.
1970	Power y Cocking reportaron la formación de hebras finas o papilas con un aparente desarrollo en la superficie del protoplasto después de exponerlos a los efectos del nitrato de sodio por una hora.
1970	Keller, Harvey, Gamborg y Eveleigh llevaron a cabo el aislamiento y cultivo de protoplastos de soya en un medio de cultivo en suspensión.
1970	Kao, Keller y Miller observaron la regeneración y división de la pared de los protoplastos de soya derivados del cultivo de células en suspensión.
1970	Kameya y Ninata realizaron el primer cultivo de polen de angiospermas con varias especies de <i>Brassica</i> utilizando medio líquido que contenía 10 al 15% de sacarosa y 10% de leche de coco.

1970	Nitsch y Nitsch mencionaron que antes de realizar el cultivo de anteras es importante conocer el estado de desarrollo de los granos de polen.
1970	Ihle y Dune demostraron la presencia de un inhibidor de la germinación en embriones inmaduros de algodón.
1970	Norstog reporto que la cinetina induce la formación de embriones adventicios en el cultivo de embriones de cebada.
1970	Gamborg y Shylok demostraron que el crecimiento de células de avena puede ser mayor con amonio que con nitrato.
1970	Mackenzie y Street encontraron una dependencia en la producción de etileno en el cultivo de células de sicomoro bajo el suministro de 2,4-D.
1970	Rajo y Mann demostraron que la edad fisiológica del inoculo es el factor que ejerce influencia en la mayor formación de órganos.
1970	Zenhteler y Guzowska cultivaron gametofitos femeninos de <i>Taxus baccata</i> , los cuales indujeron la formación de callosidades utilizando el medio de White modificado.
1970	Smith y Murashige aislaron meristemos apicales de <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Nicotiana glauca</i> , <i>Tropaeus majus</i> y <i>Coleus blumei</i> ; los inoculos eran únicamente los domos apicales sin primordios de hoja. Con sus resultados concluyeron que en las angiospermas el desarrollo adecuado de los meristemos no requiere de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.
1970	Dasgopta y Colaboradores utilizaron el cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Sorghum vulgare</i> para propagar el nematodo <i>Holoplolaimus indicus</i> , determinando la embriología y ciclo de vida de este.
1971	Takebe, Labid y Melchers realizaron aislamientos de protoplastos del mesófilo de las hojas de tabaco en un medio semisólido demostrando que los protoplastos pueden cultivarse y regenerar plántulas.
1971	La Rue y Gamborg establecieron un modelo en el cultivo de células de varias especies para la producción de etileno.
1971	Davey, Fowler y Street obtuvieron tres clones de <i>Atropa belladonna</i> var. lutea diferenciados en intervalos de crecimiento, requerimientos nutricionales, estructura celular y pigmentos cloroplásticos contenidos en el crecimiento de células en suspensión.
1972	Carlson, Smith y Dearing utilizando el medio de Nagata y Takebe lograron obtener un híbrido entre las especies <i>Nicotiana langsdorfii</i> y <i>N. glauca</i> mediante la utilización protoplastos aislados del mesófilo de las hojas.
1972	Kameya y Uchinia descubrieron una medida de cloruro de potasio y cloruro de calcio más apropiada que el manitol para el aislamiento de protoplastos de raíces de zanahoria, obteniendo embriones a partir de estos.
1972	Withers y Cocking aclararon los mecanismos con que se sucede la fusión espontanea.
1972	Bhojwana y Cocking obtuvieron protoplastos de tétradas de polen, utilizando "helicasa" liofilizada.
1972	Grambow, Kao, Miller y Gamborg encontraron que los protoplastos obtenidos de cultivo de células de zanahoria en suspensión tuvieron el potencial para la formación de embriones, los cuales crecieron y proliferaron, obteniendo plántulas a partir de ellos.
1972	Sharp, Raskin y Sommer aislaron microsporas de tomate en un medio de cultivo líquido, las cuales se mantuvieron en un cultivo nodriza de anteras de la misma.
1972	Nitsch realizo experimentos con <i>Datura</i> , <i>Nicotiana</i> y otros géneros, demostrando que los extractos preparados de cultivo de anteras contenían estructuras con desarrollo multicelular que podían inducir embriogénesis cuando se adiciona al medio usado.
1973	Tuesink trabajo con protoplastos de avena utilizo manitol y sacarosa diluidos en agua destilada como estabilizador osmótico, las membranas formaron interconexiones que provocaron estallidos pero con una mezcla de cloruro de calcio y de potasio las membranas se rompieron pero no se desintegraron.
1973	Power indujo la germinación de polen y subsecuentemente la digestión del tubo polínico con tratamientos de macerozama y celulosa.
1973	Melchers y Labib aprovecharon los mutantes con efecto en el color de las hojas para identificar a los mutantes clorofilodeficientes.
1973	Reinert menciona que una causa de la declinación de la expresión morfogénica pueden ser los cambios de la fisiología de los cultivos.
1973	Street sugiere que las técnicas de selección de mutantes pueden proveer mucha información para estudios de diferenciación celular y para explotar los potenciales biosintéticos de células.
1973	Maliga, Brenovits y Marton reportaron la producción de plantas resistentes a estreptomycin a partir de callos haploides de tabaco.
1973	Carlson aisló líneas de células haploides de tabaco resistentes al metionín sulfóxido.
1973	Nitsch y Norreel incorporaron al medio un extracto de anteras embriogénicas para estimular la división del polen aislado, sin embargo este no fue suficiente para inducir el desarrollo.
1974	Meyer descubrió que una combinación de cloruro de potasio y sulfato de magnesio dio resultados reproducibles en el aislamiento de protoplastos del tabaco.

1974	Binding llega a la conclusión de que bajo condiciones alcalinas y en presencia de sales de calcio se favorece la fusión de protoplastos.
1974	Eriksson, Bonnett, Glimelius y Wallin mencionan que el cultivo de protoplastos puede producir etileno, el cual es considerado un inhibidor de la división celular.
1974	Uchimiya y Murashige reportaron que las células que se mantienen en cultivo son más apropiadas para el aislamiento de protoplastos.
1974	Kao y Michayluk realizaron la fusión de protoplastos y la inserción de macromoléculas y organelos con tratamientos de polietilén glicol.
1974	Melchers y Labid aislaron protoplastos del mesófilo de dos haploides clorofilodeficientes, sensibles a la luz, de variedades de <i>Nicotiana tabacum</i> obteniendo la fusión de células somáticas con la segregación de los dos tipos mutantes.
1974	Nakamura y Colaboradores mediante la utilización del cultivo de haploides, redujeron el desarrollo de nuevas variedades de tabaco de seis a dos años.
1974	Murashige, Serpa y Jones por medio del uso de yemas apicales como inóculos iniciales, obtuvieron un método para la multiplicación masiva de <i>Gerbera jamesonii</i> .
1974	Earle y Langhans a partir de yemas apicales de crisantemo obtuvieron plantas completas, creciendo en un medio básico MS, con diferentes niveles de cinetina, ANA y AG ₃ ; con esta técnica se obtuvieron plantas libres de virus y además, la multiplicación masiva de crisantemo
1975	Michayluk y Kao utilizaron diferentes azúcares y alcoholes de azúcar como estabilizadores osmóticos, con ellos sugirieron que la utilización de un estabilizador osmótico debe causar un decremento gradual en el potencial osmótico del medio, lo cual es un avance para la reducción de la osmolaridad en los cultivos continuos de regeneración celular.
1975	Marton y Maliga demostraron que la resistencia adquirida mediante la utilización de la técnica de cultivo <i>in vitro</i> no persiste en la regeneración de plantas, porque está controlada por un factor mendeliano simple.
1975	Dix y Street aislaron líneas con tolerancia persistente a sales de cultivos de <i>Nicotiana sylvestris</i> y <i>Capsicum annuum</i> .
1975	Stephens y Wood utilizaron el cultivo de protoplastos en la investigación de la muerte de células vegetales asociadas con la pudrición blanca.
1975	Dale realizo estudios de dimorfismo natural con anteras de cebada, en los que concluye que el origen de los callos de polen solo era de los granos tipo "S", poco frecuentes.
1976	Potrycus y Colaboradores ensayaron varios métodos para aislar y cultivar protoplastos a partir del mesófilo de hojas de trigo, maíz, cebada y centeno; en ningún caso lograron la división celular de los protoplastos aislados.
1976	Seibert menciona que los beneficios potenciales del uso del cultivo de yemas apicales se han demostrado eficazmente en la conservación criogénica de germoplasma.
1976	Dix y Street aislaron líneas celulares de <i>Nicotiana sylvestris</i> y <i>Capsicum annuum</i> resistentes a bajas temperaturas, tratándolas con etilmetionín sulfonato, obteniendo un incremento en el número de colonias que se recobraron después de la selección al frío como resultado del mutágeno.
1976	Osborne sugirió que el gradiente de auxinas y etileno se puede ajustar entre las células.
1976	Dunwell realizó un estudio comparativo del medio ambiente con la inducción y desarrollo de embriones en cultivo de anteras de <i>Nicotiana tabacum</i> .
1977	Izhar y Power demostraron las diferencias entre especies, líneas e híbridos de <i>Petunia</i> con respecto a su potencial, al desarrollarse en un medio con combinaciones de fitohormonas específicas.
1977	Narayanawamy analizo dos investigaciones de cultivos de tejidos y obtuvo las consideraciones siguientes: La superficie de cultivo del inoculo es importante en la determinación del potencial de regeneración; La edad fisiológica del inoculo es un factor importante y ejerce influencia en la formación de órganos.
1977	Mattoo y Lieberman sugirieron que el sistema de la síntesis de etileno puede localizarse como un complejo en la pared celular y la membrana.
1978	Melchers, Sacristán y Holder obtuvieron híbridos somáticos de plantas por la fusión de protoplastos de tomate y papa.
1978	Bajaj realizo experimentos con anteras las cuales no mostraron signos visuales de sobrevivencia en dos o tres meses de cultivo; sin embargo, ocasionalmente se localizaron callosidades o polen multinucleado.
1978	Barlass y Skene describieron un método para la propagación <i>in vitro</i> de vid a partir de yemas apicales.
1979	Bajaj menciona que los métodos criogénicos ayudan a preservar líneas clonales de plantas propagadas vegetativamente en un periodo de tiempo largo.
1979	Knauss y Knauss sugirieron que uno de los problemas de mayores consecuencias en el cultivo de tejidos vegetales es la contaminación bacteriana que se presenta en las etapas de multiplicación y/o enraizamiento; menciona que no es conveniente el uso de la gentamicina en cultivos de células vegetales.
1980	Dougal y Whitten almacenaron cultivos de zanahoria a -140 °C, observando que después de colocarlos en condiciones ambientales adecuadas producen la misma cantidad de antocianinas que los cultivos no almacenados.

1980	Dhar, Patel y Shah observaron que la detección citoquímica del ácido ascórbico en el cultivo de yemas radiculares de maíz muestra que la división celular hay acumulación de ácido ascórbico.
1980	De Boucaud menciona que las plantas de tabaco obtenidas del cultivo de protoplastos en suspensión facilitan considerablemente las investigaciones de los niveles de ploidía de las células
1980	Novak realizo estudios de los callos derivados del cultivo de embriones haploides de cebada después de cruzarlos; el tejido del callo era citológicamente heterogéneo y contenía células haploides, diploides y poliploides.
1981	Raghavan menciona que los granos uninucleados de polen del cultivo de segmentos de anteras de <i>Hyoscyamus niger</i> , el desarrollo gametofítico y embriogénico normal se debe a la activación de la transcripción y a un tipo de información del ARN.
1982	Lakshmi, Vaidyanathan y Ramakrishnan hablan de la aplicación del cultivo de tejidos vegetales en el mejoramiento de árboles de importancia económica.
1983	Christianson y Warnick realizaron el cultivo de hoja de <i>Convolvulus arvensis</i> , el cual produce yemas vegetativas, que fueron cultivadas en un medio con sales de Murashige/Skoog, sacarosa, vitaminas y 0.05 mg/l de ácido indol 3-acético (AIA), más 7.0 mg/l de 2- isopentil adenina. El control de la organogénesis por el balance de auxinas-citocininas puede ocurrir entre el tiempo de competencia y el tiempo determinado por el desarrollo de yemas (o raíces). No pudo conocerse si el control es un fenómeno simple o múltiple.

2.5.- MICROPROPAGACIÓN *In Vitro* DE ORQUÍDEAS.

La propagación y cultivo de las orquídeas fue revolucionado después del descubrimiento de Knudson (1922) en donde las semillas pudieron ser germinadas en un medio simple con azúcar. Este trabajo demostró que la germinación de semillas de orquídeas en condiciones *in vitro* era posible sin la asociación con hongos. Posteriormente, el mismo autor propuso una nueva solución con la adición de nutrientes para la germinación de semillas de orquídeas en 1946. A partir de este momento muchas orquídeas se han regenerado y propagado a partir de segmentos de hoja (Murthy y Pyati, 2001), segmentos nodales de plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro* y nudos florales (Chen *et al.*, 2002), ápices (Saiprasad y Polisetty, 2003), rizomas (Martin, 2003) y micro secciones apicales (Lakshmanan *et al.*, 1995). Hay dos tipos básicos de germinación *in vitro* simbiótica y no simbiótica.

2.5.1.- Germinación simbiótica.

En la germinación simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña porción del hongo micorrizico apropiado. El hongo crece en el medio, coloniza a las semillas en proceso de germinación y se origina una relación simbiótica que se espera alimente al protocormo hasta que este produzca hojas y se vuelva autotrófico. Esta técnica es ampliamente usada para la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas. Tiene la ventaja de usar un medio simple y como resultado las plantas micorrizadas suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones. Sin embargo, la desventaja es que se necesita seleccionar el tipo de hongo micorriza adecuado para que se origine la simbiosis y prevenir parasitismo y la consecuente muerte de las semillas. Se ha realizado poca investigación sobre la relación del hongo micorriza con las orquídeas tropicales, y por lo tanto no se dispone del hongo micorriza apropiado (McKendrick, 2000).

2.5.1.2.- Germinación asimbiótica.

La germinación asimbiótica es usualmente usada en la propagación de orquídeas tropicales, las mismas que tienden a crecer fácilmente en comparación con sus parientes de zonas templadas. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo (McKendrick, 2000).

2.6.- MEDIOS DE CULTIVO

Los medios nutritivos empleados en los cultivos de tejidos fueron establecidos a partir de las exigencias internas de las plantas, con modificaciones para atender las necesidades específicas *in vitro* (Sánchez-Roldán, 2009). Así mismo varios compuestos son adicionados para suplir las necesidades metabólicas, energéticas y estructurales de la célula ya que las mismas vías bioquímicas básicas que operan en las plantas son mantenidas en los cultivos *in vitro* (Stancato, *et al.*, 2008). Para la germinación de semillas de orquídeas se reportan en la literatura algunos medios de uso generalizado como Knudson C, MS, Hutner, Dalla Rosa y Laneri, VW, Lindemann y KM, (Duarte, 2014). Sin embargo, los requerimientos pueden ser muy diversos, incluso en especies del mismo género. El medio de cultivo es el que confiere al material vegetal los nutrimentos necesarios para su desarrollo, se define por sus propiedades químicas y físicas (Vidalie, 1976). Los ingredientes de un medio de cultivo pueden clasificarse en los siguientes elementos básicos (Esquievel y Escalant, 1994):

- a) Sales inorgánicas
- b) Compuestos orgánicos
- c) Preparaciones naturales complejas
- d) Materiales inerte

2.6.1.- Sales inorgánicas

Las sales inorgánicas se definen en forma precisa en cada uno de los medios de cultivo y está dada tanto por macroelementos como por microelementos (fig. 19). Los macroelementos o mejor conocidos como macronutrientes se utilizan en grandes cantidades para producir el cuerpo vegetal y para llevar a cabo procesos fisiológicos primordiales. Los microelementos o micronutrientes suelen ser cofactores necesarios para las enzimas y por tanto la planta los recicla. Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular. Las plantas contienen 60 elementos químicos o más, pero se cree que solo 17 de ellos son realmente esenciales (Nabors, 2006; Duarte, 2014). La fig. 19 muestra los elementos empleados en los medios de cultivo *in vitro*.

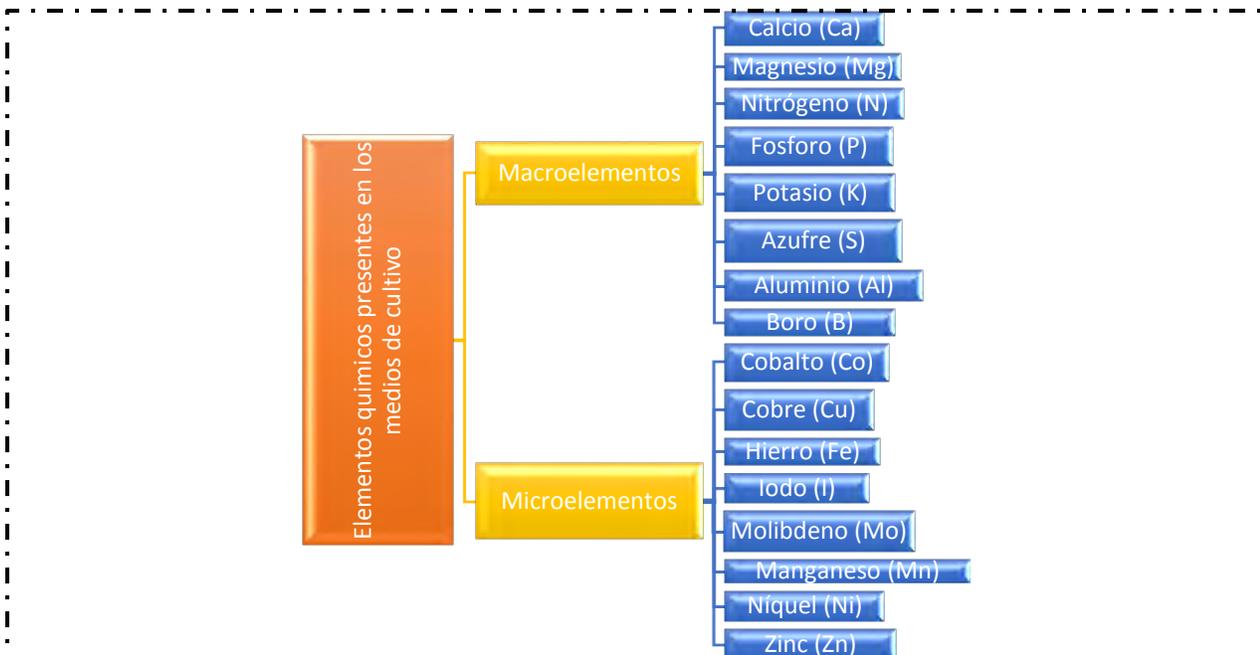


Figura 19. Elementos químicos presentes en los medios de cultivo *in vitro*

2.6.2.- Compuestos orgánicos

La principal característica de los compuestos orgánicos es que, contienen carbono. Estos compuestos fueron señalados como orgánicos porque se creía que solo podían ser formados por organismos vivos. Dentro de esta clase de compuestos se encuentran los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Nabors, 2006). Los compuestos orgánicos mayormente empleados en el cultivo *in vitro* pueden clasificarse en tres grupos: Carbohidratos, vitaminas y reguladores de crecimiento.

Carbohidratos

Los carbohidratos además de ser una fuente de carbono y energía para el embrión, son el estímulo disparador para su desarrollo morfogénico durante la germinación (Luna-Rosales y Barba-Álvarez, 1993). Es importante señalar que en general se habla de carbohidratos sin señalar la importancia del tipo, los requerimientos temporales de los mismos (Arditti y Ernst 1984, citado por Duarte, 2014), y la concentración de éstos en el medio, estos factores pueden afectar el crecimiento heterotrófico de los cultivos, debido a que el azúcar es la única fuente de carbono y energía para el crecimiento (Kubota y Toyoki, 1991, citado por Duarte, 2014).

Vitaminas

Miller y Erston (2010, citado por Muñoz-Barrionuevo, 2011), señalan que las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios para la realización del metabolismo normal de ciertos organismos vivos, asemejándose a las enzimas u hormonas que el organismo necesita en cantidades relativamente mínimas para su normal crecimiento y desarrollo.

De las vitaminas empleadas, la tiamina (B1), es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Por eso, sin esta vitamina las células vivas no pueden realizar sus funciones vitales siendo utilizada en 0,4 mg/l. La riboflavina (B2), es necesaria para el crecimiento de las raíces y funciona reduciendo la cantidad de auxina del sistema radicular. La niacina (B12), desempeña un papel importante en la respiración porque es un componente de las coenzimas I y II, que son grupos portadores de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación. Finalmente el ácido ascórbico (vitamina C), interviene en los sistemas de oxidación de la célula y establece potenciales favorables de oxidación- reducción. Se emplean cristales de ácido ascórbico (vitamina C) para reducir los taninos oxidados *in vitro* o en la superficie de frutos recién cortados (Muñoz-Barrionuevo, 2011).

Reguladores de Crecimiento

Went y Thimann definieron a las hormonas del crecimiento como “sustancias que siendo producidas en una parte de un organismo son transferidas a otra y en ésta influyen un proceso fisiológico específico”. En sentido estricto, las sustancias del crecimiento extraídas de los tejidos vegetales y las sustancias sintéticas con efectos reguladores no pueden ser llamadas hormonas. Por lo anterior, fue creado el término “regulador del crecimiento vegetal”, que define a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Barba-Álvarez, 1987). Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales:

1. Promotores del crecimiento: Auxinas, Citocininas y Giberelinas.
2. Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
3. Etileno.

De estos, los más empleados en el cultivo de tejidos vegetales son los promotores del crecimiento.

Auxinas

Las hormonas vegetales más importantes son las auxinas, éstas se sintetizan en las yemas apicales de los tallos y pasan desde allí a otras partes de la planta, donde puede tanto estimular el crecimiento como inhibirlo. En los tallos, por ejemplo, la auxina favorece el alargamiento de las células y la diferenciación del tejido vascular, mientras que en las raíces inhibe el crecimiento en la parte central y favorece la formación de raíces adventicias. También retrasa la abscisión o caída de flores, frutos y hojas (Parra, 2007; citado por Muñoz-Barrionuevo, 2011). Otra propiedad importante es que el tejido donde se encuentra en concentración suficientemente alta, se convierte en el punto de atracción de nutrientes; el tejido rico en auxinas es también el lugar de atracción para otras hormonas como las giberelinas (Jankiewicz y Acosta-Zamudio, 2003).

Barba-Álvarez (1987), mencionan que las auxinas se usan en una concentración de 0,1 a 10,0 mg/l. Las principales auxinas utilizadas para la preparación de medios de cultivo son: ácido 3-indolacético (AIA) (muy termolábil), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 4-clorofenoxiacético (CPA), ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Tordón).

Citocininas

Las citocininas se sintetizan en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas. El transporte en la planta es por vía acropétala, desde el ápice de la raíz hasta los tallos, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema, sus funciones: estimulan la división celular y el crecimiento, inhiben el desarrollo de raíces laterales, rompen la latencia de las yemas axilares, promueven la organogénesis en los callos celulares, retrasan la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales, promueven la expansión celular en cotiledones y hojas, promueven el desarrollo de los cloroplastos (Parra, 2007; citado por Muñoz-Barrionuevo, 2011).

Barba-Álvarez (1987), mencionan que las citocininas se usan en una concentración de 0,03 a 30,0 mg/l. Principales auxinas utilizadas para la preparación de medios de cultivo: N⁶ bencil aminopurina (BA), N⁶ dimetil alil aminopurina (2iP), N⁶ furfúril aminopurina (cinetina), N⁶ (4-hidroxi, 3- metil, 2-butenil), adenina (zeatina).

Giberelinas

Las giberelinas forman un grupo muy numeroso de los compuestos hormonales y que a medida que pasa el tiempo dicha cantidad aumenta; están presentes en plantas, hongos, algas y bacterias. Los principales órganos de síntesis son las partes apicales de las raíces y también las hojas más jóvenes, otra fuente de síntesis lo constituyen los nudos del tallo y las semillas en desarrollo; las giberelinas cumplen diversas funciones en combinación con otras hormonas, su nivel está en correlación con la intensidad del alargamiento celular, en hojas estimulan la respiración, en semillas tienen un papel importante en el proceso de salida del periodo de latencia y en la germinación. El ácido giberélico (GA₃) es el más empleado y sea usado en gran escala, en combinación con otras giberelinas o auxinas (Grochowska y Mejía-Muñoz, 2003).

Preparaciones naturales complejas

Para enriquecer los medios de cultivo, se utiliza una gran variedad de sustancias de composición indefinida, entre las cuales destacan: extracto de malta. Agua de coco, harina o pulpa de banano, caseína hidrolizada y pulpas de tomate, piña y naranja (Lydiane, 1996; citado por Paredes-Sandoval, 2012).

Pulpa de plátano.

El plátano es un ingrediente popular y en ocasiones la formulación puede ser adquirida con proveedores comerciales. Sus propiedades no se ven afectadas por el autoclave, se describen diversos resultados en la literatura en cuanto a si el plátano inhibe o no la germinación, la presencia de plátano sin duda tiene un impacto negativo sobre la germinación

de algunas especies, pero no es posible hacer generalizaciones. El plátano se utiliza rutinariamente para el crecimiento y desarrollo de plántulas, puede emplearse fresco, maduro o inclusive papillas para bebe, si se toma esta última opción se recomienda que la papilla no presente azúcares añadidas (Hicks, 2000).

Materiales inertes

Los materiales inertes o geles húmedos actúan como agentes de soporte, entre ellos están: el agar-agar, gelrite, phytigel, entre otros; y el carbón activado que en bajas concentraciones actúan contrarrestando efectos negativos que producen algunas sustancias liberadas en el medio como los fenoles (Esquievel y Escalant, 1994).

Agar

El agar es un derivado de un alga marina, que se obtiene en forma de píldora y que se usa como agente gelificante en la mayor parte de los medios de cultivo. Aunque se trata de un producto natural, se lava y purifica durante su elaboración, de manera que prácticamente no contiene materiales tóxicos. El agar es un polisacárido con una elevada masa molecular, lo que proporciona su capacidad para gelificar los medios, resulta con facilidad el componente más caro de los medios de cultivo (Pierik, 1990).

Carbón activado

El Carbón activado es un agente antioxidante, que influye en todo proceso del cultivo, así como en la aclimatización exitosa de las plantas. El carbón activado se caracteriza por una alta proporción de área-peso, esto le confiere alta adsorción de sustancias; provee aireación y adsorbe el etileno, además adsorber e inactiva el 5-hidroximetilfurfural, inhibe compuestos fenólicos y carboxílicos producidos por los cultivos (Arditti y Ernst 1993).

2.7.- EL GÉNERO *Rhynchostele*.



Rhynchostele pertenece a la subfamilia Epidendroideae, tribu Cymbidieae y subtribu Oncidiinae de acuerdo a su actual clasificación (Chase *et al.*, 2015). En este género se enlistan 17 especies (fig. 20) con crecimiento simpodico. Se distribuyen desde el centro de México hasta Costa Rica (Téllez, 2011). Están relacionadas con *Oncidium*, *Odontoglossum* y *Amparoa*. Anteriormente fueron incluidas en los dos primeros géneros mencionado. Tienen pseudobulbos ovados y algo aplanados, coronados con hasta tres hojas de textura fina. La mayoría de las especies de este género tienen flores vistosas y coloridas en tallos cortos o largos (Rodd y Bryant, 2009).

Figura 20. Especies presentes en el género *Rhynchostele*

Los estudios realizados para el grupo de orquídeas antes mencionado son pocos, los primeros son aquellos que hablan sobre la taxonomía de la especie y los cambios de nombre que ha tenido este conjunto: pasando por los géneros *Oncidium*, *Odontoglossum*, *Lemboglossum* y finalmente *Rhynchostele*. A continuación se enlistan dichas investigaciones.

- El Género *Odontoglossum* en México escrito por Federico Halbinger en 1971.
- El Complejo *Oncidiglossum confusum* escrito por Robert L. Dressler Y Norris H. Williams en 1975.
- *Odontoglossum* y Géneros Afines en México y Centroamérica escrito por Federico Halbinger en 1982.
- *Cymbiglossum*, *Ticoglossum* y *Rhynchostele*, tres géneros derivados de *Odontoglossum* en México y Centroamérica escrito por Federico Halbinger en 1983.
- *Lemboglossum*, un nuevo nombre para el complejo *Odontoglossum cervantesii* escrito por Federico Halbinger en 1984.
- Nomenclatural Changes in *Rhynchostele*, *Mesoglossum*, and *Lemboglossum* (ORCHIDACEAE, ONCIDIINAE) escrito por Miguel Ángel Soto Arenas, Gerardo A. Salazar y Alicia Rojas en 1993.

Posterior a ello no se realiza ningún estudio acerca del género, sino hasta 2011 en “Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México” una investigación realizada por Téllez Velasco en donde se muestra la distribución potencial del género en cuanto a tipo de suelo, clima, Áreas Naturales Protegidas y Áreas terrestres Prioritarias.

2.7.1.- *Rhynchostele cervantesii*

Descubierta en 1824 por La Llave & Lexarza y nombrada en honor del botánico Dr. Vicente Cervantes. Abunda en ciertas regiones de bosques templados o fríos sobre encinos. Se llama vulgarmente “Tigrillo” o “Mariposa Blanca” (Lapiner, 1973)

Sinonimias (Kew, 2015):

Odontoglossum cervantesii
Oncidium cervantesii
Lemboglossum cervantesii
Amparoa cervantesii

Clasificación Taxonómica

Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Cymbidieae
Subtribu: Oncidiinae
Género: *Rhynchostele*
Especie: *R. cervantesii* (fig. 21).



Figura 21. Ejemplar de *Rhynchostele cervantesii*

Descripción Botánica.

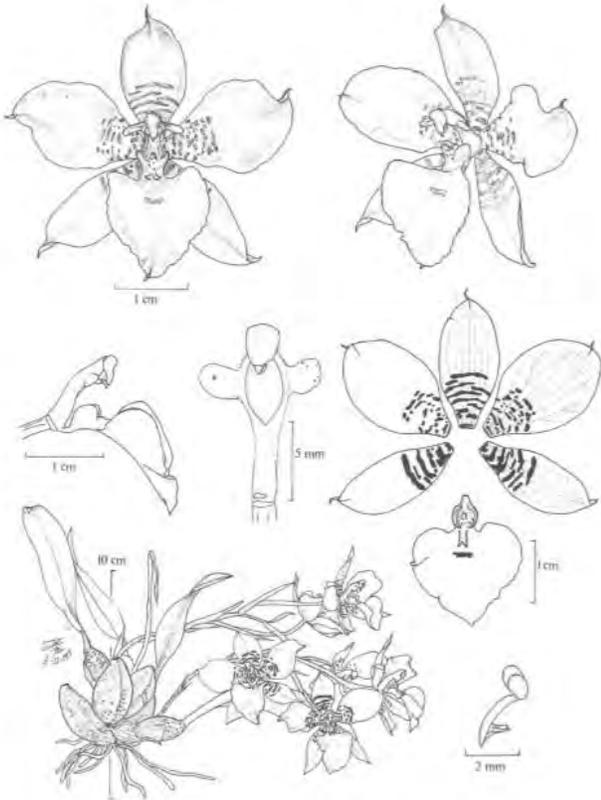


Figura 22. Lamina descriptiva de *Rhynchostele cervantesii* tomado de: Espejo-Serna et al., 2002

Es una orquídea epífita (fig. 22) de hasta 25(30) cm de alto con los pseudobulbos ovoides, algo comprimidos, de 2.5 a 5 cm de largo, verde oscuros, a veces con manchas de color marrón distribuidas irregularmente en su superficie, con una hoja apical, lanceolada a elíptica. Flores de 3 a 4 cm de diámetro, blancas o a veces levemente rosadas, con bandas y/o puntos de color pardo a pardo-rojizo arregladas en círculos concéntricos alrededor del centro de la flor y con la columna alada en el ápice. Inflorescencia originándose del pseudobulbo maduro, arqueado-péndula, con hasta siete flores (Espejo-Serna *et al.*, 2002) Su época de floración es en invierno. Habita en bosques mesófilo y de encino-pino (Jiménez, *et al.*, 1998).

De acuerdo a su ciclo de vida y analizadas para un sólo individuo, se tiene que un nuevo pseudobulbo se desarrolla en un lapso de 4-6 meses, la inflorescencia en unos 3 meses, la duración de las flores oscila desde unas horas hasta casi dos meses, según hayan sido o no polinizadas y dependiendo de los factores ambientales a los que hayan sido expuestas. Ocurrida la polinización, el desarrollo de las cápsulas se inicia y concluye en un lapso de 6 meses. Concluido el desarrollo de la cápsula, ésta es capaz de liberar unas 25,000 semillas (Aguirre-León, 1977).

Distribución Geográfica

La distribución de *R. cervantesii* (fig. 23), abarca desde Nayarit a Oaxaca, es endémica de México. Algunos reportes han mencionado su existencia en Guatemala, pero no se conocen ejemplares colectados en ese país. Tampoco ha sido registrada en Chiapas, por lo que el Istmo de Tehuantepec parece ser su 'barrera natural' (Aguirre-León, 1977).

Estado de Conservación.

Se le considera amenazada en la Norma Oficial Mexicana 059-ECOL-2010 de protección al ambiente (Jiménez, *et al.*, 1998).

De acuerdo a Espejo-Serna y colaboradores (2002) *Rhynchostele cervantesii* se encuentra registrada en los municipios de Cuernavaca, Huitzilac y Tepoztlán dentro del Parque Nacional El Tepozteco (PNET) en un intervalo altitudinal de los 1400 a los 3000 msnm.



Figura 23. Distribución de *Rhynchostele cervantesii* y *R. áptera* (tomada de: Flora del Bajío y Regiones Adyacentes)



3.- ANTECEDENTES



3.1 Estudios sobre *Rhynchostele cervantesii*.

Los estudios realizados con *Rhynchostele cervantesii* disminuyen; si apuntamos a las condiciones *in situ* el primero en describir el ciclo de vida de esta especie es Ernesto Aguirre en 1977 (fig. 24), y recientemente en 2015, se publica “A novel seed baiting technique for the epiphytic orchid *Rhynchostele cervantesii*, a means to acquire mycorrhizal fungi from protocorms” donde Cruz-Higareda y colaboradores describen la técnica para aislar hongos micorrízicos *in situ*.

Además de estos estudios que son de carácter taxonómico o ecológico, existe la posibilidad de emplear técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro*, donde se pueden generar las condiciones adecuadas para la germinación y crecimiento de plantas de orquídea. Sin embargo, no se encuentra documentada en su totalidad la información sobre este tipo de propagación para esta orquídea.

En cuanto a los estudios *in vitro* realizados con la especie *R. cervantesii* pueden mencionarse los siguientes:

- Propagación y conservación *in vitro* de siete orquídeas mexicanas en riesgo de extinción publicación de Salgado Garciglia y colaboradores realizada en 2012.



Figura 24. Portada de la revista Orquídea. En ella se encuentra la descripción realizada por Aguirre-León en 1977.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Desarrollo de una trampa *in situ* para el Aislamiento
Micorrízico de Una Orquídea Epífita del Parque
Nacional el Tepozteco.**

TESIS PROFESIONAL
para obtener el título de
BIOLOGO
Área

Investigación en Biología Vegetal

- Desarrollo de una trampa *in situ* para el aislamiento micorrízico de una orquídea epífita del Parque Nacional el Tepozteco, Tesis escrita por Cruz-Higareda en 2014 (fig. 25).

En ellos solo se hace mención de la utilización de la especie; sin embargo, no se muestran la totalidad de los resultados; considerando esto, es necesario basarnos en estudios realizados con otras especies afines a ella.

Figura 25. Portada de tesis, investigación centrada en *Rhynchostele cervantesii*.

3.2.- Bases para la realización de este Estudio.

A continuación se muestra un listado de algunos géneros de la subtribu Oncidiinae con los que se han realizado estudios para conocer aspectos de su biología en condiciones *in vitro*.

Cuadro 3. Estudios realizados en géneros de la Subtribu Oncidiinae

Género	Estudio	Fuente
<i>Aspasia</i>	Comportamiento <i>in vitro</i> de <i>Aspasia variegata</i>	Paiva Neto, <i>et al</i> , 2013
<i>Brassia</i>	Propagación <i>in vitro</i> de la orquídea <i>Brassia verrucosa</i> Bateman ex. Lindl	Flores-Escobar, <i>et al</i> , 2011
<i>Comparettia</i>	Propagación <i>in vitro</i> de semillas de la orquídea <i>Comparettia falcata</i> Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas	Chávez <i>et al</i> , 2015
<i>Cuitlauzina</i>	Multiplicación <i>in vitro</i> de la orquídea <i>Cuitlauzina pendula</i> Lex.	Pineda-Lemus, 2008
<i>Cyrtorchilum</i>	Evaluación de medios de cultivo para la germinación “ <i>in vitro</i> ” de las orquídeas <i>Cyrtorchilum macranthum</i> ...	Muñoz-Barrionuevo, 2011
<i>Gomesa</i>	Aislamiento e identificación de hongos micorrizicos rizoctoides asociados a tres especies de orquídeas epifitas neotropicales de Brasil (<i>Gomesa crispa</i>)	Liparini, <i>et al</i> , 2005a
<i>Helcia</i>	Caracterización morfológica de semillas y del proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para la conservación en el banco de germoplasma de la UTPL (<i>Helcia sanguinolenta</i>)	Pazmiño, 2011
<i>Odontoglossum</i>	Germinación asimbiótica de <i>Odontoglossum gloriosum</i> RCHB. F. (ORCHIDACEAE) bajo condiciones <i>in vitro</i>	Pedroza-Manrique y Mican-Gutierrez, 2006
<i>Oncidium</i>	Propagación <i>in vitro</i> de <i>Oncidium taka</i> Inducción de la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Oncidium flexuosum</i> (Orchidaceae) con hongos micorrizicos rizoctonoides Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Oncidium baueri</i> (Orchidaceae) en diferentes concentraciones de macronutrientes y sacarosa Determinación de los protocolos para cultivo <i>in vitro</i> de las especies <i>Epidendrum schistochilum</i> y <i>Oncidium cultratum</i>	Mahbubur Rahman, <i>et al</i> , 2005 Liparini, <i>et al</i> , 2005b Sorace, 2008 Paredes-Sandoval, 2012
<i>Rhynchostele</i>	Influencias de tres niveles de agua de coco en la germinación <i>in vitro</i> de <i>Rhynchostele bictoniensis</i> (Bateman) Soto & Salazar, en medio de cultivo Knudson C	Bertolini, <i>et al</i> , 2013
<i>Rossioglossum</i>	Quelato de hierro y agua de coco en la germinación <i>in vitro</i> de <i>Rossioglossum grande</i> (Orchidaceae)	Bertolini, <i>et al</i> , 2014
<i>Tolumnia</i>	Variación en germinación simbiótica entre semillas de <i>Tolumnia variegata</i> y entre hongos micorrizicos Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas (<i>Tolumnia variegata</i>)	Otero, Bayman & Ackerman, 2003 Otero & Bayman, 2009
<i>Trichocentrum</i>	Propagación <i>in vitro</i> y establecimiento en invernadero de las orquídeas <i>Trichocentrum carthagenense</i> (Jacq.)Sw. y <i>Laelia eyermaniana</i> Rchb. f., para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable Propagación <i>in vitro</i> de <i>Trichocentrum stramineum</i> Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México	Francisco-Nava, 2008 Flores-Escobar, <i>et al</i> , 2008
<i>Zygotates</i>	<i>Zygotates alleniana</i> (Orchidaceae: Epidendroidae: Cymbidieae: Oncidiinae): estructura floral relacionada con la polinización	Gomiz, Torretta & Aliscioni, 2014.



4.- JUSTIFICACIÓN



Antes de que la mayor parte de los Parques Nacionales fueran declarados como tales, ya existían grupos humanos habitando y utilizando legalmente sus recursos, por lo que la mayor parte de ellos se han visto como zonas de usos múltiples. Actualmente estos sitios son de carácter un tanto restringido; albergan muchas especies vegetales y animales de gran importancia científica como lo son las Orquídeas, de las cuales algunas son endémicas y/o se encuentran en peligro de extinción como resultado directo o indirecto de las actividades antropogénicas que incluyen la recolección, destrucción y degradación del hábitat, pérdida del polinizador, entre otros. Además el desarrollo de la humanidad se ha hecho en detrimento de la naturaleza, provocando en concreto la desaparición de muchas especies silvestres. Los bosques se han ido destruyendo poco a poco para permitir el desarrollo de las actividades agrícolas, la industrialización y la urbanización. Actualmente no quedan más que pequeñas muestras de los bosques primarios. El gran potencial de pérdida de especies de orquídeas ocurre en los trópicos, donde la diversidad de especies de orquídeas es elevada, mientras que su estudio es mínimo (Vargas-Márquez, 1997; Batty *et al.*, 2002; Cribb *et al.*, 2003; Zettler *et al.*, 2003; Bellone, 2006). En el caso de *Rhynchostele cervantesii* existe poca información acerca de su biología, sus relaciones con otras comunidades e inclusive su desarrollo, ya que al tratarse de una especie endémica y considerada en la categoría de Amenazada por la NOM-059 de SEMARNAT es de importancia contribuir al estudio de su biología, es por ello que se propuso el siguiente proyecto de investigación. Con la cual se pretende ampliar el conocimiento sobre la especie en condiciones *in situ* e *in vitro*, lo cual permitirá crear un protocolo adecuado de cultivo el cual podrá considerarse para futuras reintroducciones en zonas prioritarias de conservación.



5.- HIPÓTESIS



5.1.- *In situ*.

Considerando el tipo de vegetación existente en el Parque Nacional “El Tepozteco” y en especial la zona de estudio (la cual comprende una vegetación de transición entre bosque de encino-pino y matorral xerófilo) se espera encontrar y registrar diversos organismos epífitos relacionándose con la orquídea *Rhynchostele cervantesii* de manera acompañante, asociada y/o competitiva sobre el mismo forofito.

5.2.- *In vitro*.

Adicionando reguladores del crecimiento vegetal a un medio de cultivo es posible acelerar la germinación de semillas y promover la desdiferenciación de tejido de hoja de la especie *Rhynchostele cervantesii* para describir su desarrollo en condiciones *in vitro* mediante vías de reproducción sexual y asexual.



6.- OBJETIVOS



6.1.- OBJETIVO GENERAL

- Contribuir con información sobre la biología de la especie *Rhynchostele cervantesii* (Orchidaceae) en condiciones *in situ* e *in vitro*.

6.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

IN SITU

- ❖ Caracterizar los forofitos sobre los cuales se establece *R. cervantesii*.
- ❖ Determinar el estadio fenológico *in situ* de las colonias de *R. cervantesii*.
- ❖ Reconocer y cuantificar los diferentes grupos vegetales que se desarrollan en el mismo forofito que *R. cervantesii*.
- ❖ Describir durante la floración de *R. cervantesii* la producción de flores y cápsulas en la población.

IN VITRO

- ❖ Realizar el cultivo *in vitro* de semillas de *R. cervantesii* asimbióticamente (propagación sexual) con reguladores del crecimiento vegetal para inducir la germinación.
- ❖ Realizar el cultivo *in vitro* de tejido somático de *R. cervantesii* (propagación asexual).
- ❖ Describir la ontogenia de *R. cervantesii* en condiciones *in vitro*.
- ❖ Cuantificar el porcentaje de germinación e Índice de desarrollo de *R. cervantesii* bajo condiciones *in vitro*.
- ❖ Aportar mayor información biológica acerca de la especie durante su germinación asimbiótica.
- ❖ Establecer un protocolo de manejo para el cultivo *in vitro* por semillas y hojas.



7.- MATERIAL Y MÉTODO



7.1.- *IN SITU*

7.1.1.- Zona de estudio.

El muestreo se realizó en un área de transición vegetal entre bosque de encino-pino y matorral xerófilo (fig. 26), de aproximadamente 4 ha dentro del Parque Nacional “El Tepozteco”. El cual muestra periodos de neblina en la temporada de alta humedad.



Figura 26. Zona de muestreo dentro del Parque Nacional “El Tepozteco“

7.1.2.- Muestreo y ubicación de ejemplares de *Rhynchostele cervantesii*.

Se inspeccionó una zona para determinar cuadrantes. Con ayuda de mapas topográficos (fig. 27) y el programa Google Earth se determinaron cuadrantes y se eligieron cuatro (fig. 28), en cada uno se procedió a buscar árboles con individuos de *Rhynchostele cervantesii*.

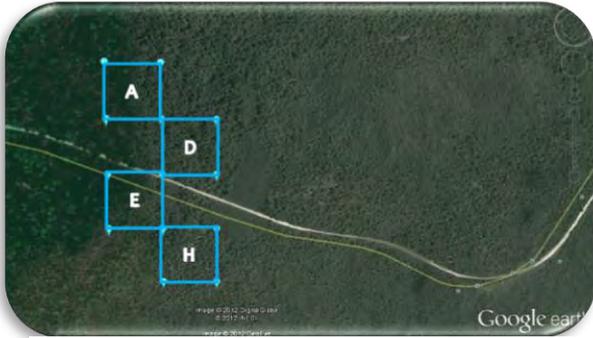


Figura 28. Elección de cuadrantes para muestreo.



Figura 27. Determinación de cuadrantes.

Una vez ubicados en cada cuadrante se registró: la composición de la vegetación (el porcentaje de organismos arbustivos, herbáceos y arbóreos); posteriormente, se asignó un número a cada uno de los forofitos (fig. 29) para tomar las coordenadas geográficas con ayuda de un GPS y estimar la altura mediante su aproximación, además se obtuvo el diámetro a la altura del pecho (DAP) de cada forofito (fig. 30) mediante la medición del perímetro con una cinta métrica; el cálculo para transformar a diámetro es el siguiente: $D = P/\pi$ donde D es el diámetro, P el perímetro o circunferencia y π es la constante 3.14159226; también, se contabilizaron los individuos coloniales presentes



Figura 29. Asignación de número a cada forofito.

de *Rhynchostele cervantesii* en cada uno de los forofitos (fig. 31). Y de ellos se seleccionaron individuos coloniales de mayor y menor tamaño (fig. 32) para cuantificar el número de pseudobulbos, altura y diámetro de la colonia ocupado sobre el forofito.



Figura 30. Medición de perímetro del forofito para obtener DAP.



Figura 32. Elección de individuos de menor y mayor tamaño para cuantificar altura, diámetro y otros aspectos.



Figura 31. Conteo de individuos presentes por forofito de *R. cervantesii*.



Figura 33. Registro de ubicación de los individuos localizados.

Del mismo modo se estableció la distribución sobre el forofito (ramas, troncos u horquetas); también, se observó y registro la orientación de la mayoría de los individuos, con ayuda de una brújula; así como, su estadio fenológico (Plántulas, juveniles y adultos) y la altura mínima y máxima sobre el nivel del suelo en la que se encuentran ubicados los individuos coloniales (fig. 33). Todos estos datos se anotaron en un formato de registro (fig. 34).



Figura 34. Formatos de registro.

Conjuntamente se observó la totalidad del forofito (fig. 35) para determinar los grupos vegetales acompañantes y/o competitivos (se consideraron competitivos aquellos ejemplares vegetales que se encuentran a no más de 10 cm de diámetro (fig. 36), de cada

uno de los individuos de *R. cervantesii*. Además se colectaron muestras para el herborizado (fig. 37) y determinación de los forofitos, así como de la vegetación acompañante y competitiva.

De los que no se obtuvo muestra, se procedió a fotografiar para así tener su registro y crear una fototeca. Finalmente Se colocó una marca en cada uno de los forofitos para monitorearlos en años posteriores (fig. 38).



Figura 36. Determinación de vegetación competitiva



Figura 35. Vegetación acompañante a *Rhynchostele cervantesii* sobre el mismo



Figura 37. Prensado y herborizado



Figura 38. Marcaje de forofitos

7.1.3.- Análisis (Densidad poblacional)

Finalmente los datos obtenidos fueron analizados para obtener: densidad poblacional de *Rhynchostele cervantesii* mediante la siguiente formula $D = N/A$, donde D es la densidad, N es el número de individuos y A un área determinada. Así como para determinar su patrón de distribución, el forofito preferido y sus especies asociadas y/o competitivas dentro de esta zona de muestreo.

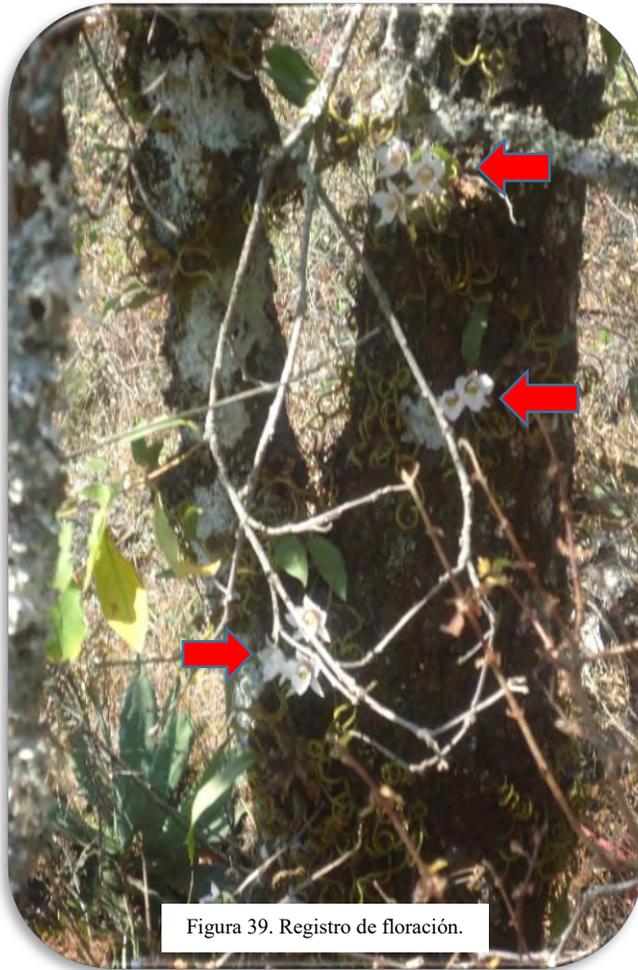


Figura 39. Registro de floración.

7.1.4.- Registro de Floración.

Se eligió uno de los cuadrantes registrados para cuantificar el número de plantas en floración de *Rhynchostele cervantesii* por forofito muestreado (fig. 39), de cada uno de los ejemplares en floración se registró la presencia y cantidad de escapos florales, botones o flores abiertas en cada uno de los individuos coloniales.

Se seleccionaron seis flores entre las diversas colonias, para efectuar polinización manual (fig. 40) de acuerdo al manual de procedimientos de Luna y Barba (2011), estas flores se encontraban a una altura no mayor de 1.6 m sobre el nivel del suelo, para monitorear su desarrollo mensualmente (enero a marzo). Realizando el registro fotográfico de los ejemplares observados.



Figura 40. Polinización manual.

7.1.5.- Recolecta de material biológico.

Se colectaron tres ejemplares adultos con apariencia sana de *R. cervantesii* con hojas jóvenes y cápsulas.

7.2.- IN VITRO

7.2.1.- Propagación Sexual.



Figura 41. Materiales empleados para la evaluación de viabilidad.

Evaluación de viabilidad. Se evaluó la viabilidad de las semillas antes de la siembra *in vitro*, para ello se empleó la técnica de Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC) la cual se realizó de acuerdo al manual de procedimientos descrito por Luna y Barba (2013). El cual consiste en la elaboración de sobres de papel filtro (fig. 41), los cuales contenían semillas que fueron colocadas en la solución TTC al 1% e incubados en obscuridad durante 72 horas.

Posterior a este tiempo se enjuagan con agua destilada y observan en el microscopio estereoscópico para revisar su coloración (fig. 42) y así obtener el porcentaje de embriones viables.

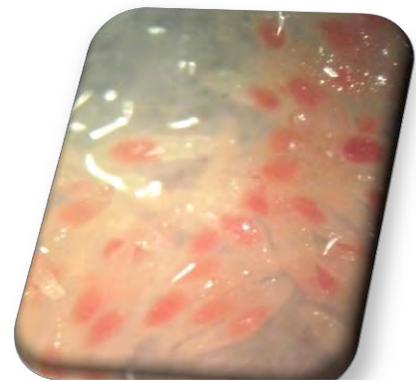


Figura 42. Semillas de *Barkeria uniflora* teñidas con TTC.

Medio de Cultivo. Se empleó el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) (Anexo 1) modificado al 50% de su concentración en sales basales y adicionado con 30 g de Sacarosa, 20 g de papilla de plátano Gerber®, 5 g de Agar, 1 g de Carbón activado disueltos en 1000 ml de agua destilada (fig. 43), siguiendo el manual de procedimientos de Luna y Barba (2011) y esterilizado a 1.5 kg/cm² durante 15 minutos en el autoclave de acuerdo al manual de procedimientos de Luna y Barba (2012).

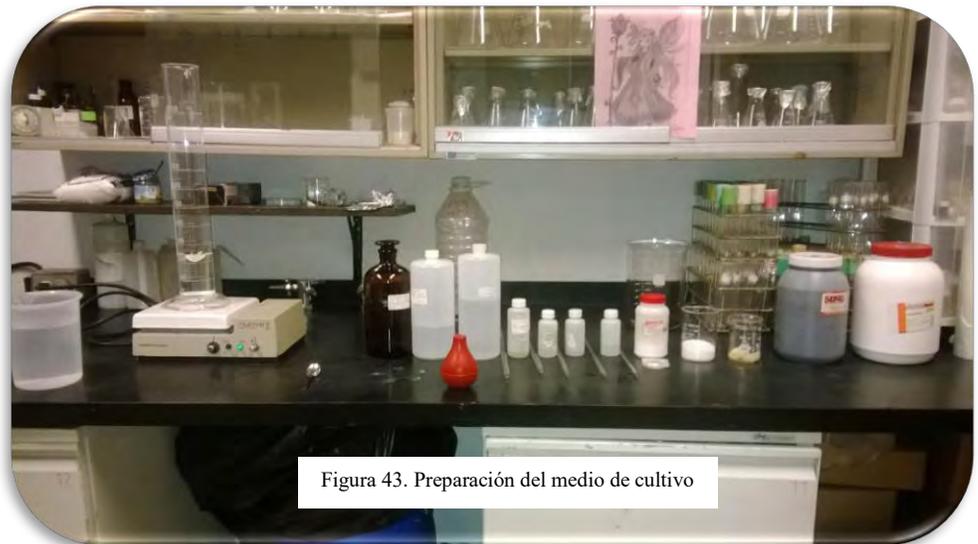


Figura 43. Preparación del medio de cultivo

7.2.2.- Cultivo *in vitro* de semillas de *R. cervantesii* asimbióticamente.

Empleando el medio de cultivo antes descrito se procedió a la siembra asimbiótica mediante la técnica de sobres de papel filtro. Para ello fue necesario cortar círculos de papel filtro los cuales fueron doblados a manera de sobre y en ellos se colocaran semillas de la especie (aproximadamente 200) con ayuda de una aguja de disección. Posteriormente, los sobres se aseguraron con un clip metálico para evitar que se abrieran durante la desinfección (fig. 44 a 46).



Figura 44. Materiales para la elaboración de sobres con semillas



Figura 45. Sobre para semillas



Figura 46. Semillas de *Rhynchostele cervantesii*.

Desinfección. La desinfección se realizó en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar (fig. 47). Los sobres se desinfectaron con etanol al 70% y se mantuvieron en agitación durante 5 minutos. Seguido de 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% de cloro activo, adicionado con una gota de jabón líquido Salvo® para romper la tensión superficial; posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril para eliminar la solución jabonosa como lo describe Luna y Barba (2013) en su manual de procedimientos.



Figura 47. Desinfección en campana de flujo laminar

Siembra. Se realizó, de acuerdo al manual de procedimientos “Siembra *in vitro* en flujo laminar” descrito por Luna y Barba (2013), en el medio MS antes descrito, para ello se retiró el clip con ayuda de las pinzas, los sobres se introdujeron en el recipiente con el medio de cultivo y se abrieron para que las semillas se encontraran expuestas. Los recipientes de cultivo con semillas se mantuvieron en la cámara de incubación a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 de oscuridad y una intensidad lumínica de 3 350 Lux.

Inducción de la germinación con fitohormonas. Se realizó la siembra de semillas, establecido por Barba y colaboradores (2001), en el medio MS descrito anteriormente y adicionado con 0.1 mgL^{-1} de Ácido Giberelico (AG3); Además, se utilizaron dos reguladores del crecimiento experimentales: Ácido Naftalenacetico (ANA) y Cinetina (K) en concentración 0.1 , 0.5 y 1 mgL^{-1} cada una de ellas, como se muestra en el cuadro siguiente.

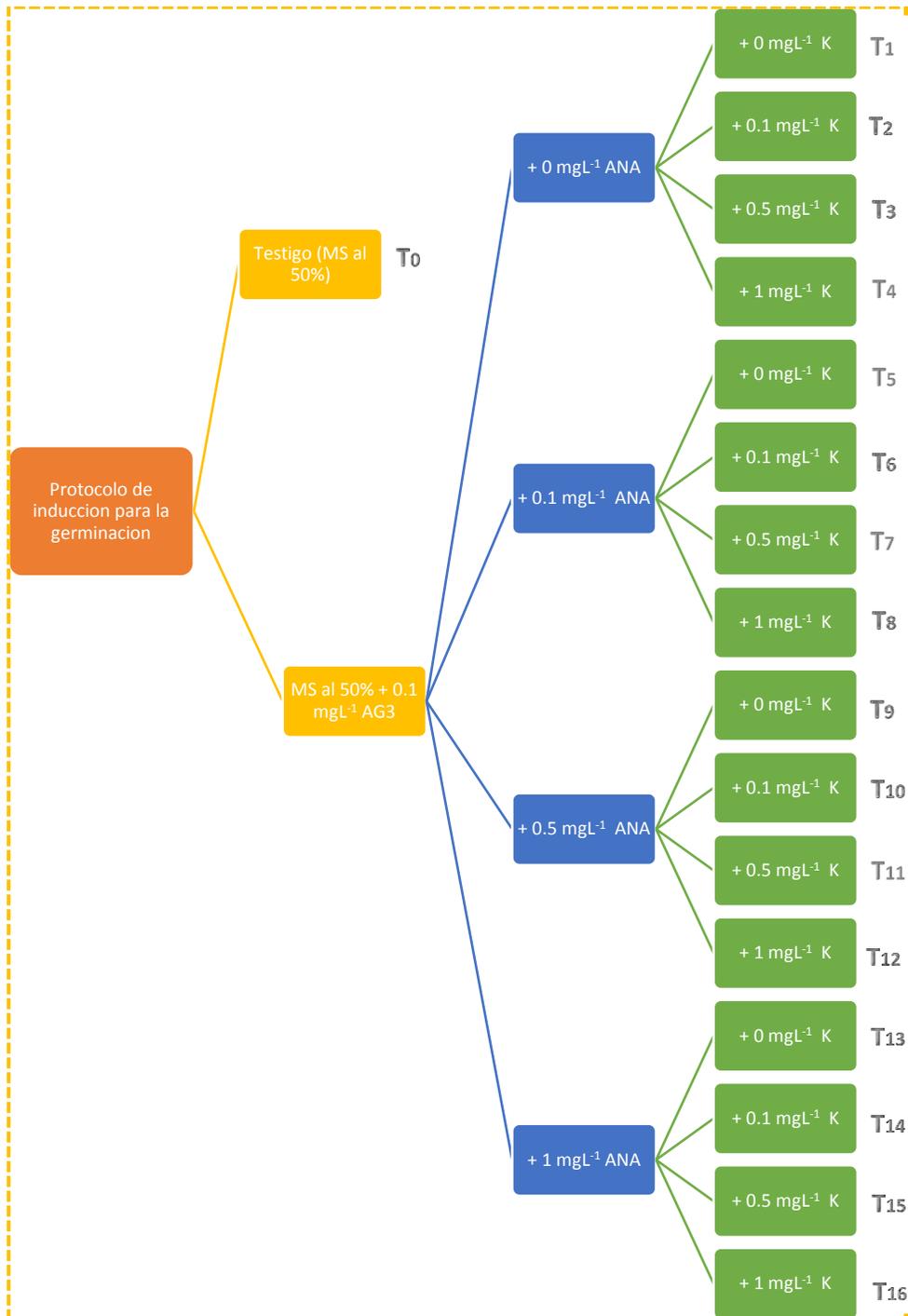


Figura 48. Protocolo de inducción para la germinación



Figura 49. AG3

Resultando un total de 16 tratamientos y el testigo, cada uno con tres repeticiones.



Figura 50. ANA



Figura 51. K

Anexo 2. Preración de reguladores del crecimiento vegetal.

Incubación. Una vez sembradas las semillas, estas se incubaron a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 de oscuridad a una intensidad lumínica de 3350 Lux (fig. 52).

Subcultivos. Después de 40 días de inducción para la germinación con fitohormonas se realizó un subcultivo a medio fresco MS al 50% sin reguladores del crecimiento vegetal y subsecuentemente a los 80, 120 y 160 días.



Figura 52. Incubación

Evaluación. Se observaron y registraron las semillas por tratamiento quincenalmente hasta los 180 días de cultivo. El porcentaje de germinación se evaluó considerando como semilla germinada la tercera etapa descrita en 2005 por Seaton y Ramsey, como embrión hinchado rompiendo la testa (ver figura 14). El índice de desarrollo se obtuvo mediante la siguiente fórmula: $ID = \sum_{x=1}^{x=8} (e_x/e)(x)(100)$; donde x es el valor del estadio ontogénico, e_x es el número de individuos registrados en ese estadio ontogénico y e es el total de individuos de la muestra. Además, se registra, el desarrollo ontogenético tomando como referencia las etapas descritas por Seaton y Ramsey (2005).

7.2.3.- Propagación Asexual.

Cultivo *in vitro* de segmentos de hoja de *R. cervantesii*. Se seleccionaron hojas jóvenes (fig. 53) y libres de patógenos visibles.



Figura 53. Selección de hojas de *Rhynchostele cervantesii* para regeneración *in vitro*.

Pruebas de desinfección. Se realizó la desinfección del material colectado (hojas), de acuerdo al manual de procedimientos elaborado por Barba y Luna (2013) para la desinfección de cápsulas y semillas, empleando hipoclorito de sodio al 0.5% de cloro activo adicionado con una gota de jabón líquido Vel Rosita® en seis diferentes tiempos de exposición al desinfectante (fig. 54), con 6 repeticiones. De acuerdo a estos resultados, se empleó el de mayor eficacia, considerando el tiempo de exposición, para continuar con la siembra y los tratamientos experimentales.

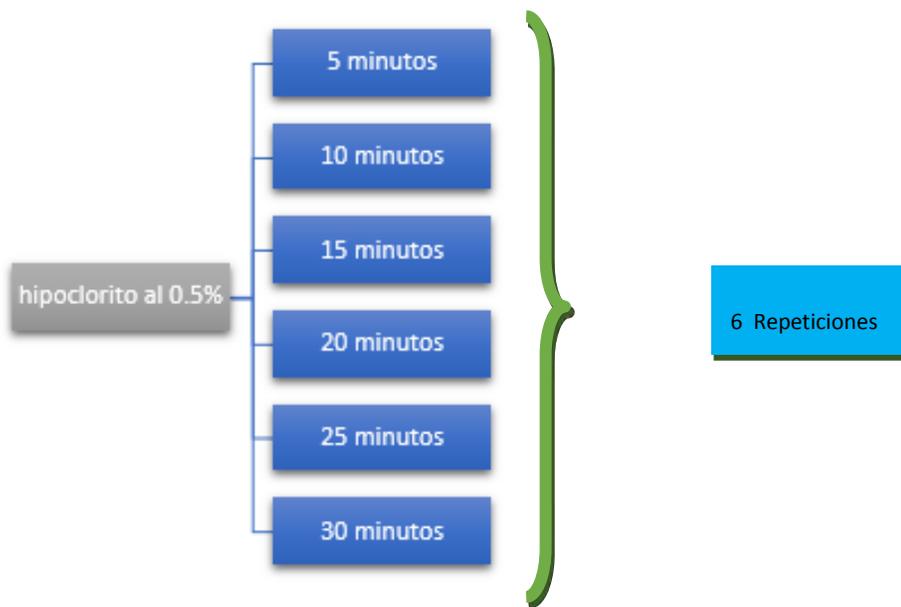


Figura 54. Protocolo de desinfección para hojas de *Rhynchostele cervantesii*.

Siembra. Después de la desinfección se cortaron segmentos de hoja de 1 cm² aproximadamente (fig. 55) y se sembraron 10 inóculos por tratamiento, en medio MS al 50% de su concentración adicionado con reguladores del crecimiento (como se describió para la inducción de la germinación).



Figura 55. Realización de cortes en hojas de *R. cervantesii* en cámara de flujo laminar.

Incubación. Una vez sembrados, se incubaron a 25±2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 de oscuridad a una intensidad lumínica de 3 350 Lux.

Evaluación. Se observó semanalmente la respuesta morfogénica del tejido de hoja (fig. 56), durante 90 días de incubación con la finalidad de registrar la dediferenciación del tejido y la regeneración del mismo en nuevas plántulas, callo o cuerpos parecidos a protocormos (PLB's por sus siglas en ingles).

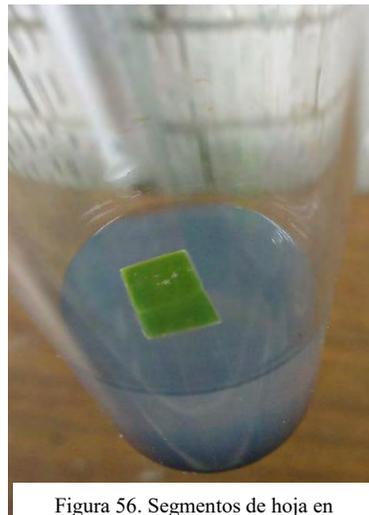


Figura 56. Segmentos de hoja en cultivo *in vitro*.

7.2.4.- Análisis estadístico.

Finalmente se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), empleando el programa estadístico computarizado Statgraphics Centurión XVI, para notar las diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos, tanto de la propagación sexual (porcentaje de germinación e índice de desarrollo), y asexual desarrollada *in vitro*.



8.- RESULTADOS



8.1.- *IN SITU*

Se realizaron cuatro muestreos, uno por cuadrante, en el año 2012 durante los meses de septiembre a noviembre. El cuadro 4 muestra la variación en cuanto a la composición de la vegetación en cada cuadrante.

Cuadro 4. Composición de la vegetación por cuadrante			
Cuadrante	Estratos		
	Arbóreo (%)	Arbustivo (%)	Herbáceo (%)
A	30-60	30-40	10-30
D	40	30	30
E	40	20-30	20-40
H	30-40	20-40	30-50

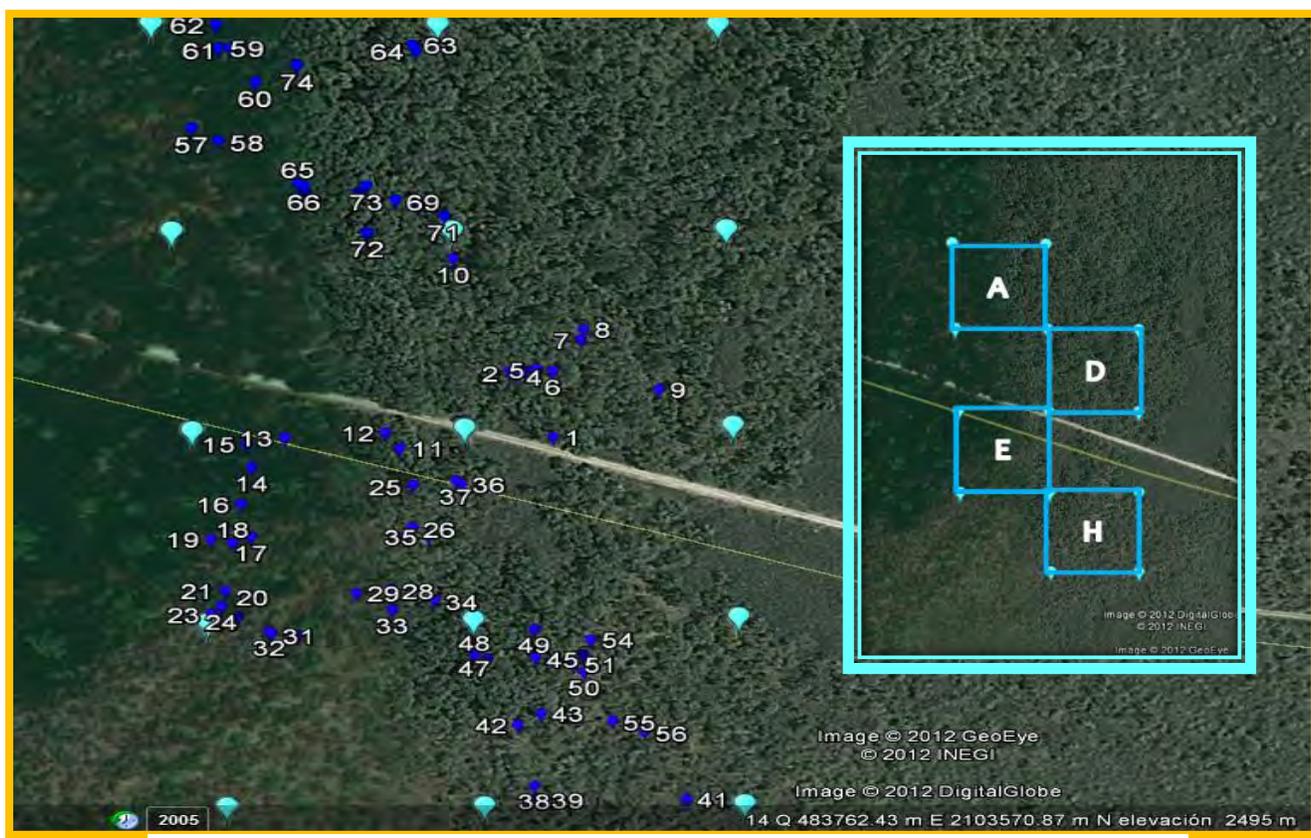


Figura 57. Distribución geográfica de los forofitos con presencia de *R. cervantesii* en la zona de muestreo.

8.1.1.- Ubicación y caracterización de *Rhynchostele cervantesii* y sus forofitos

Se georreferencio un total de 74 forofitos con la presencia de la orquídea *Rhynchostele cervantesii* (fig. 57). Estos forofitos pertenecen a las especies: *Clethra mexicana* (90.45 %), *Comarostaphylis discolor* (1.35 %), *Monnina ciliolata* (1.35 %), *Buddleia perfoliata* (1.35 %) y *Buddleia parviflora* (1.35 %); el 4.05 % restante no logró identificarse; dichos forofitos se distribuyen desde los 2 473 y hasta los 2 525 metros sobre el nivel del mar de altitud.

En el cuadro 5 se observa la fecha de muestreo y el número de forofitos registrados, así como el rango altitudinal y los forofitos registrados por cuadrante.

Cuadro 5. Datos generales de los cuadrantes.					
Cuadrante	Fecha de muestreo	Forofitos registrados	Forofito		Rango altitudinal (m.s.n.m.)
			<i>Clethra mexicana</i>	Otra especie	
D	6-7/Sep/12	10	9	1	2 488 - 2 507
E	27-28/Sep/12	27	25	2	2 474 - 2 513
H	18-19/Oct/12	19	17	2	2 468 - 2 486
A	8-9/Nov/12	18	16	2	2 493 - 2 525

Los forofitos presentan una gran variabilidad (fig. 58) en cuanto a los parámetros registrados, el forofito con menor altura es de 1.5 m con un diámetro a la altura de pecho (DAP) de 4.9 cm y de 15 m el de mayor longitud con un DAP de 56.5 cm.



Figura 58. Algunos de los forofitos con presencia de *R. cervantesii* registrados en los diferentes cuadrantes. Fotografías de A. Barba A.

En cada uno de los forofitos se encontraron individuos coloniales de *R. cervantesii* (fig. 59) en estadios de plántula, juvenil y adulto, de las cuales el 71% se observó en estado vegetativo con brotes y el 29% restante, presentó desarrollo de escapo floral.



Figura 59. Individuos de *R. cervantesii* en diferentes estadios: a) adulto con brotes, b) juvenil con brote, c) adulto, d) adulto con crecimiento de escapo floral, e) plántula.

Los individuos coloniales presentaban un tamaño de entre 3 a 25 cm de altura, estos se encontraron sobre el tronco, horquetas y ramas del forofito a una altura desde los 0.5 m hasta los 8 m sobre el nivel del suelo, ocupando una superficie desde 1 cm y hasta 25 cm de diámetro (fig. 60).



Figura 60. Individuos de *R. cervantesii* con diferencias en altura y diámetro.

El cuadro 6 muestra el rango de algunos parámetros registrados para los individuos coloniales de *Rhynchostele cervantesii* en cada uno de los cuadrantes.

Cuadro 6. Datos sobre las colonias de <i>Rhynchostele cervantesii</i> localizadas.										
Cuadrante	# de individuos coloniales	Superficie ocupada sobre el forofito (cm)	Altura máxima aprox. (cm)	Altura sobre el nivel del suelo (m)	Estadio fenológico (Aprox.) por individuo			Ubicación en el forofito por individuo		
					Plántulas	Juveniles	Adultos	Tronco	Rama	Horqueta
D	122	1 - 25	2 - 30	0.5 - 6	17	35	70	102	20	0
E	362	2 - 30	2 - 25	0.3 - 8	36	84	242	214	135	13
H	335	1 - 35	1 - 20	0.5 - 5	23	79	233	170	160	5
A	257	2 - 25	1 - 20	0.2 - 8	18	92	147	171	81	5

La orientación preferencial de estos individuos sobre su forofito se da hacia el suroeste y noroeste; sin embargo, no es un patrón estándar para todas las colonias, puesto que se observaron algunos dirigirse a cualquier punto cardinal (fig. 61).

El cuadro 7 muestra la densidad poblacional obtenida para los individuos coloniales registrados por cuadrante.

Cuadro 7. Densidad poblacional de <i>Rhynchostele cervantesii</i> por cuadrante		
Cuadrante	# de individuos coloniales	Densidad
D	122	0.122
E	362	0.362
H	335	0.335
A	257	0.257



Figura 61. Orientación cardinal a la cual se dirigen los individuos coloniales de *R. cervantesii*.

Además de los registros anteriores, se observan y determinan estadios de desarrollo, no descritos, para la especie *R. cervantesii* en condiciones *in situ* (figs. 62 y 63).



Figura 62. Protocormo de *R. cervantesii* desarrollándose *in situ*.
Fotografía de A. Barba A.

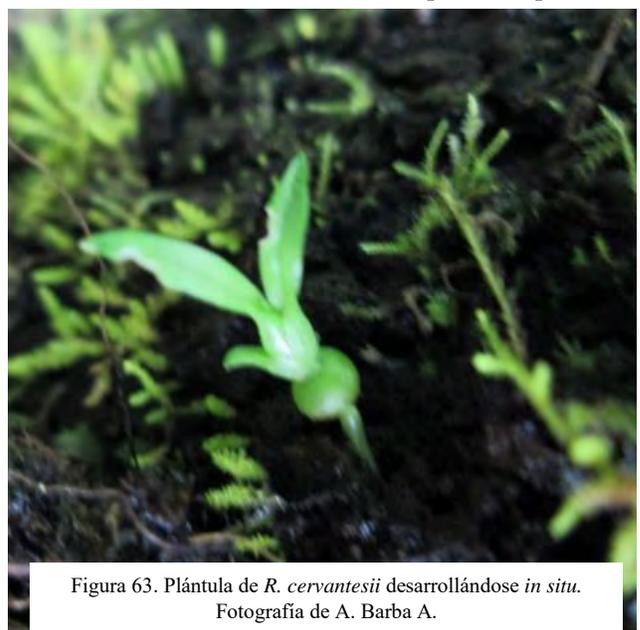


Figura 63. Plántula de *R. cervantesii* desarrollándose *in situ*.
Fotografía de A. Barba A.

8.1.2.- Vegetación acompañante, competitiva y/o asociada

En cada uno de los forofitos, además de ubicar la presencia de la especie *Rhynchostele cervantesii*, se registraron las especies vegetales pertenecientes a otras familias (fig. 64 a 81), considerando como acompañantes a todas aquellas que comparten el mismo forofito con la especie en estudio. El cuadro 8 muestra los grupos de organismos registrados y la división vegetal a la que pertenecen.

Cuadro 8. Vegetación acompañante a <i>Rhynchostele cervantesii</i>		
División	Grupo de Organismos	Tipos
	Líquenes	5
Briophyta	Musgos	3
Pteridophyta	Helechos	5
Magnoliophyta	Bromeliaceae	2
	Crasulaceae	2
	Cactaceae	1
	Agavaceae	2
	Orchidaceae	5



Figura 64. Vegetación acompañante (*Agave aff. horrida*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 38.



Figura 65. Vegetación acompañante suculentas (*Sedum frutescens*).

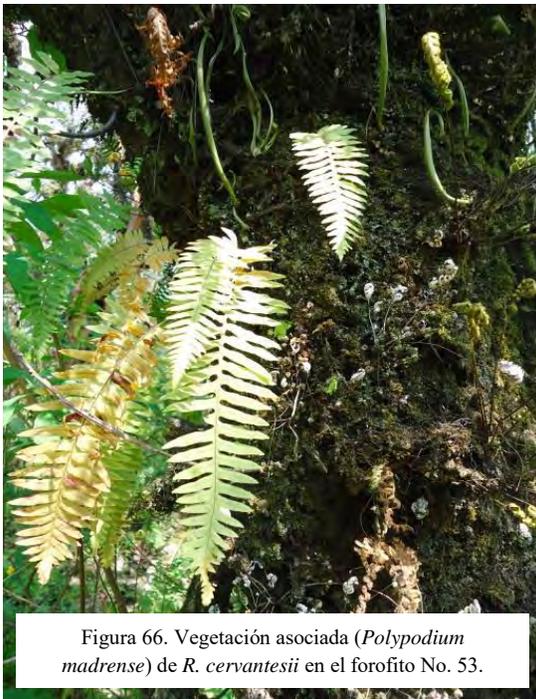


Figura 66. Vegetación asociada (*Polypodium madrense*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 53.



Figura 67. Vegetación acompañante Orchidaceae (*Stellis retusa*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 34.



Figura 68. Vegetación acompañante Orchidaceae (*Epidendrum anisatum*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 26

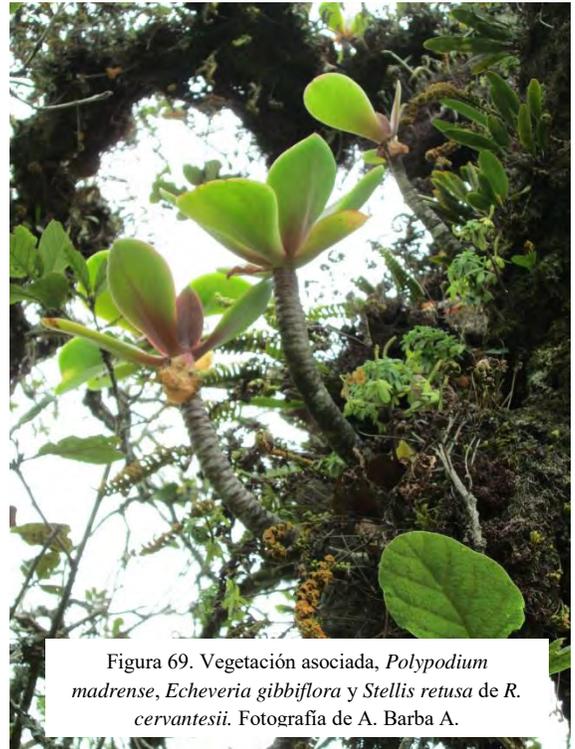


Figura 69. Vegetación asociada, *Polypodium madrense*, *Echeveria gibbiflora* y *Stelis retusa* de *R. cervantesii*. Fotografía de A. Barba A.



Figura 70. Vegetación acompañante (*Echeveria gibbiflora*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 53.



Figura 71. Vegetación acompañante (*Heliocereus elegantissimus*) de *R. cervantesii*.

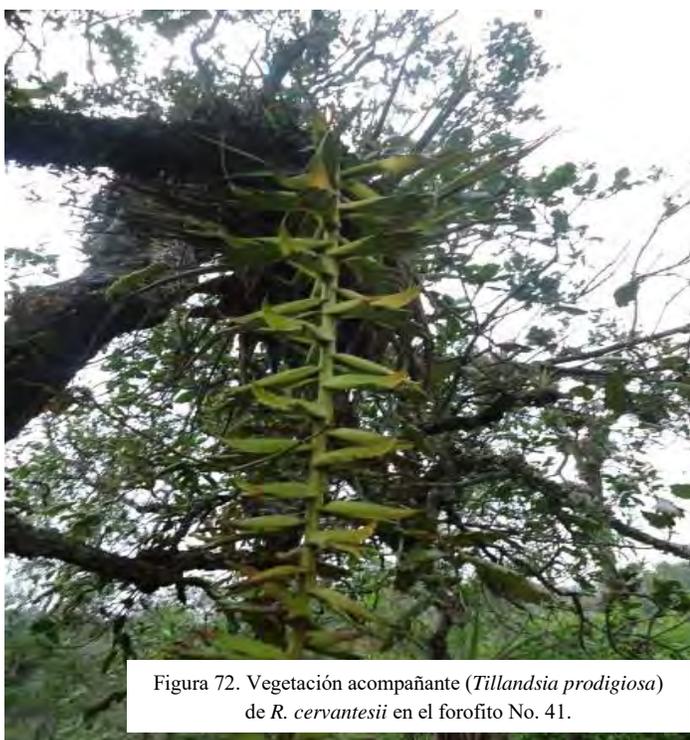


Figura 72. Vegetación acompañante (*Tillandsia prodigiosa*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 41.



Figura 73. Vegetación acompañante (*Heliocereus elegantissimus*, *Sedum frutescens* y musgo) de *R. cervantesii*.



Figura 74. Vegetación acompañante (Musgo y enredadera) de colonias de *R. cervantesii* en el forofito No. 66.



Figura 76. Orquídea *Rhynchostele áptera* especie acompañante a *R. cervantesii* en la zona de muestreo.



Figura 75. Vegetación asociada y acompañante de *R. cervantesii*, helechos y la orquídea *Prosthechea rhombilabia*



Figura 77. Vegetación asociada Liquen (*Sticta fuliginosa.*) de *R. cervantesii*. Fotografía de A. Barba A.



Figura 78. Vegetación asociada Liquen (*Flavopunctelia praesignis*) de *R. cervantesii*.

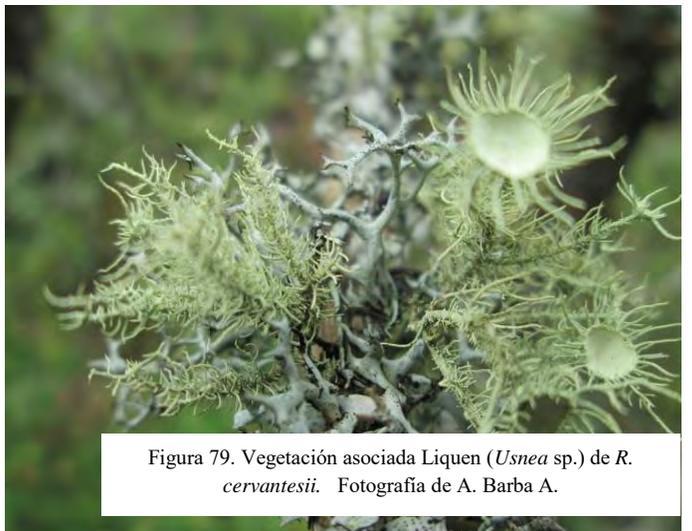


Figura 79. Vegetación asociada Liquen (*Usnea* sp.) de *R. cervantesii*. Fotografía de A. Barba A.



Figura 80. Vegetación asociada Liqueños (*Cladonia* sp., *Parmotrema* sp.) y musgos de *R. cervantesii*.



Figura 81. Vegetación asociada Liqueños (*Flavoparmelia* sp., *Flavopunctelia praesignis* y *Usnea* sp.) de *R. cervantesii*. Fotografía de A. Barba A.

Las especies competitivas fueron consideradas aquellas que se encontraron a no más de 10 cm de la orquídea *Rhynchostele cervantesii* sobre el mismo forofito (figs. 82 a 96). El cuadro 9 muestra los grupos de organismos registrados y la división vegetal a la que pertenecen.

Cuadro 9. Vegetación competitiva y/o asociada a <i>Rhynchostele cervantesii</i>		
División	Grupo de organismos	Tipos
	Líquenes	5
Briophyta	Musgos	2
Pteridophyta	Helechos	2
Magnoliophyta	Bromeliaceae	1
	Crasulaceae	1
	Orchidaceae	1



Figura 82. *R. cervantesii* con un líquen (*Cladonia* sp.) competitivo.



Figura 83. Colonia de *R. cervantesii* con líquenes (*Flavopunctelia praesignis*) como vegetación competitiva.



Figura 84. Vegetación competitiva (*Hypotrachyna* sp. y *Tillandsia makoyana*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 51.



Figura 85. Vegetación acompañante y competitiva (musgo) de Colonias de *R. cervantesii* en el forofito No. 24.



Figura 86. Colonia de *R. cervantesii* donde se aprecia el número de pseudobulbos y la su vegetación competitiva.



Figura 87. Vegetación competitiva (líquenes, musgo y helechos) de *R. cervantesii* en el forofito No. 50.



Figura 88. Colonia de *R. cervantesii* rodeado de vegetación competitiva liquen (*Ramalina* sp. y *Hypogymnia* sp.).



Figura 89. Helechos (*Polypodium madrense*, *Pleopeltis crassinervata* y *Pleopeltis polylepis*) presentes como vegetación acompañante y como competitiva.



Figura 90. Vegetación competitiva y asociada (*Polypodium martensii*, *Heliocereus elegantissimus*, *Echeveria gibbiflora*, entre otros) de *R. cervantesii* en el forofito No. 46.



Figura 91. Vegetación competitiva y asociada (*Lobaria* sp., *Heterodermia* sp., *Parmotrema* sp., *Polypodium madrense* y *Pleopeltis polylepis*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 40.

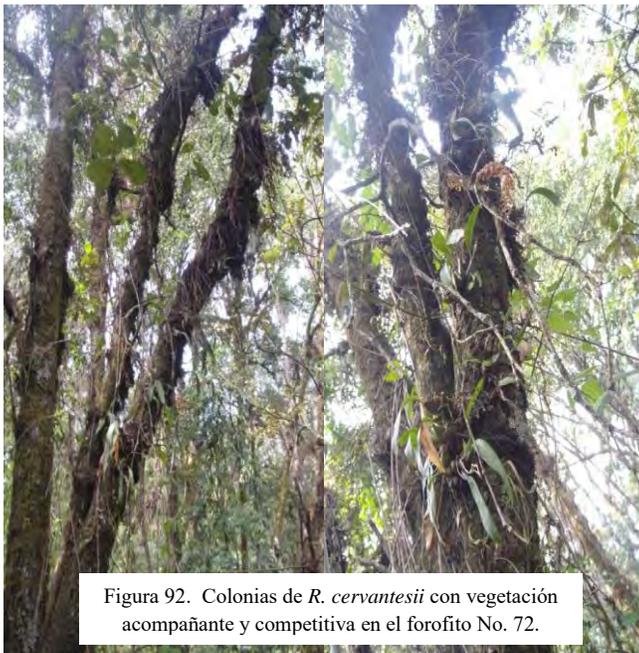


Figura 92. Colonias de *R. cervantesii* con vegetación acompañante y competitiva en el forofito No. 72.



Figura 93. Vegetación acompañante y competitiva (*Flavopunctelia praesignis* y *Polypodium madrense*) de *R. cervantesii* en el forofito No. 36.



Figura 94. Vegetación acompañante y competitiva (*Polypodium madrense*) de *R. cervantesii*. Fotografía de A. Barba A.



Figura 95. Vegetación acompañante y competitiva (*Flavopunctelia praesignis*, *Heterodermia* sp. y *Polypodium madrense*) de *R. cervantesii*.



Figura 96. Vegetación acompañante y competitiva (*Flavopunctelia praesignis*, *Polypodium madrense* y *Sedum frutescens*) de *R. cervantesii*.

En el Anexo 3 se muestra el listado de las especies determinadas, como vegetación acompañante, competitiva y/o asociada.

8.1.3.-Floración

El registro de floración se llevó a cabo mensualmente, eligiendo el cuadrante “H” para ello; dado su fácil acceso a cada uno de los forofitos (fig. 97).



Figura 97. Diferencia de estratos y composición vegetal presente en el cuadrante H.

Fotografías de A. Barba A.

Durante los meses de febrero a abril del año 2013, se realizó una visita de dos días por mes para observar el desarrollo de escapos y botones florares (fig. 98). En los 19 forofitos registrados meses antes con 335 individuos de la especie *Rhynchostele cervantesii*, se apreció la floración de 239 individuos. El cuadro 10 muestra el registro mensual de las colonias y la fase de desarrollo en el que se encontraron.

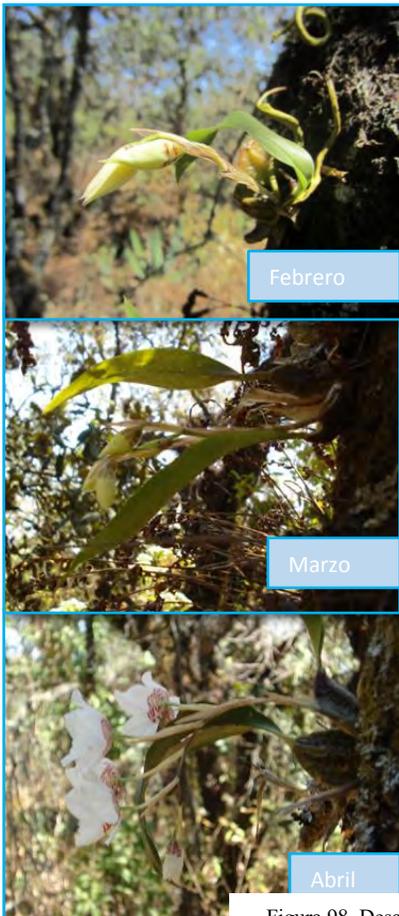


Figura 98. Desarrollo floral *in situ*

Cuadro 10. Registro de floración				
Registro	Características	Febrero (2013)	Marzo (2013)	Abril (2013)
Por individuo colonial	A Con escapo, sin botones	4	2	0
	B Con escapo, con botones	17	4	0
	C Con flores (en antesis)	94	91	18
	D Combinación A+B	2	0	0
	E Combinación B+C	5	2	0
Por toda la comunidad	F Frutos recién formados	0	3	5
	G Frutos inmaduros	0	3	0
	H Frutos maduros	0	1	1
	I Flores polinizadas	9	4	2
Total de Plantas adultas		122	99	18

Se registra la presencia de variedades en la especie *Rhynchostele cervantesii* (fig. 99 a 104) en esta zona de muestreo.



Figura 99. Planta de *R. cervantesii* in situ con colores rosados durante la floración (variedad membranacea).



Figura 100. Planta de *R. cervantesii* con tonalidades amarillas.



Figura 101. Planta de *R. cervantesii* con bordes de labelo liso (típico).



Figura 102. Planta de *R. cervantesii* con bordes del labelo crenados.

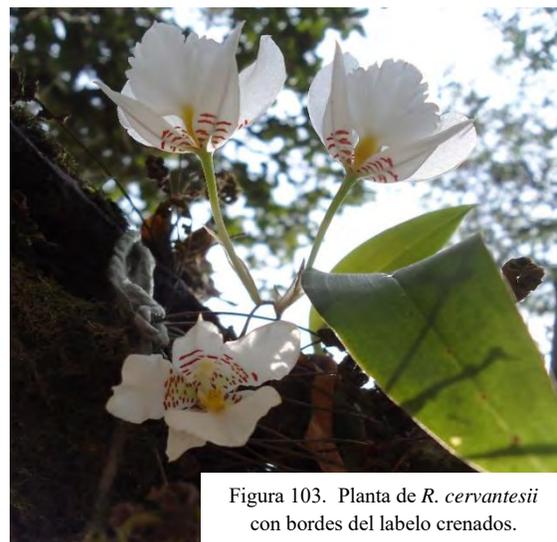


Figura 103. Planta de *R. cervantesii* con bordes del labelo crenados.



Figura 104. Plantas de *R. cervantesii* con variaciones presentes en el mismo forofito.

Al realizar la polinización manual (fig. 105), se logró caracterizar los polinios, los cuales presentan una coloración amarilla, se presentan en un par de sacos y tienen un tamaño aproximado de 0.2 mm x 0.5 mm (fig. 106).



Figura 105. Polinización manual *in situ*.

La mayor floración (densidad floral) se observó en el mes de Marzo. Se desarrollan de 2 a 5 flores por inflorescencia.

La polinización manual no fue totalmente exitosa, solo se observó la formación de siete capsulas de quince intentos realizados por esta técnica (Polinización manual cruzada) y se observó la formación de dos capsulas más, de manera natural.



Figura 106. Polinios de *R. cervantesii*.

Sin embargo, se aprecia un severo caso de herbivoría Floral (figs. 107 a 109), en la población muestreada lo que limita la polinización y formación de nuevos frutos de manera natural.



8.1.4.- Recolecta de Material Biológico

Se recolectaron tres individuos de la especie, de apariencia sana con presencia de cápsulas en diferentes meses. Los cuales se mantuvieron en cultivo tradicional para continuar el monitoreo de la formación y maduración de cápsulas para su posterior uso.

8.2.- IN VITRO

8.2.1.-Propagacion sexual.

Se emplearon semillas provenientes de cápsulas, las cuales se dejaron madurar en condiciones de invernadero hasta su apertura en el mes de marzo de 2013. La siembra se llevó a cabo en tres ocasiones, la primera en abril de 2013, la segunda en febrero de 2014 y la tercera en abril de 2015 con una cápsula nueva colectada ese año.

Evaluación de viabilidad.

La evaluación de la viabilidad se llevó a cabo al momento de la apertura de las cápsulas, las cuales se emplearon para la primera siembra efectuada en abril de 2013. Las semillas sobrantes se almacenaron para su conservación en refrigeración y después de siete meses se repitió esta evaluación para emplear las semillas nuevamente en febrero de 2014 (fig. 110 y 111). El cuadro 11 muestra la fecha de colecta de las cápsulas y el porcentaje de viabilidad obtenido al momento de la apertura y después de haber sido almacenadas.

Cuadro 11. Evaluación de viabilidad			
Capsula	Fecha de colecta dd-mes-año	Evaluación	
		1 ^a 08-04-13	2 ^a 14-10-14
1	08-10-12	82 %	45%
2	14-02-13	82.5 %	35%
3	07-03-13	72.5 %	12.5% *
		79%	40%

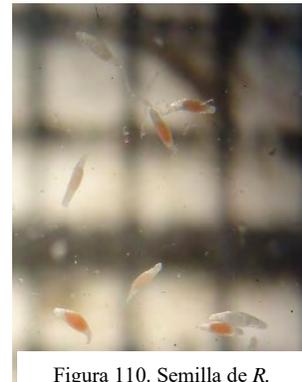


Figura 110. Semilla de *R. cervantesii*. Cada cuadrícula representa 1mm.

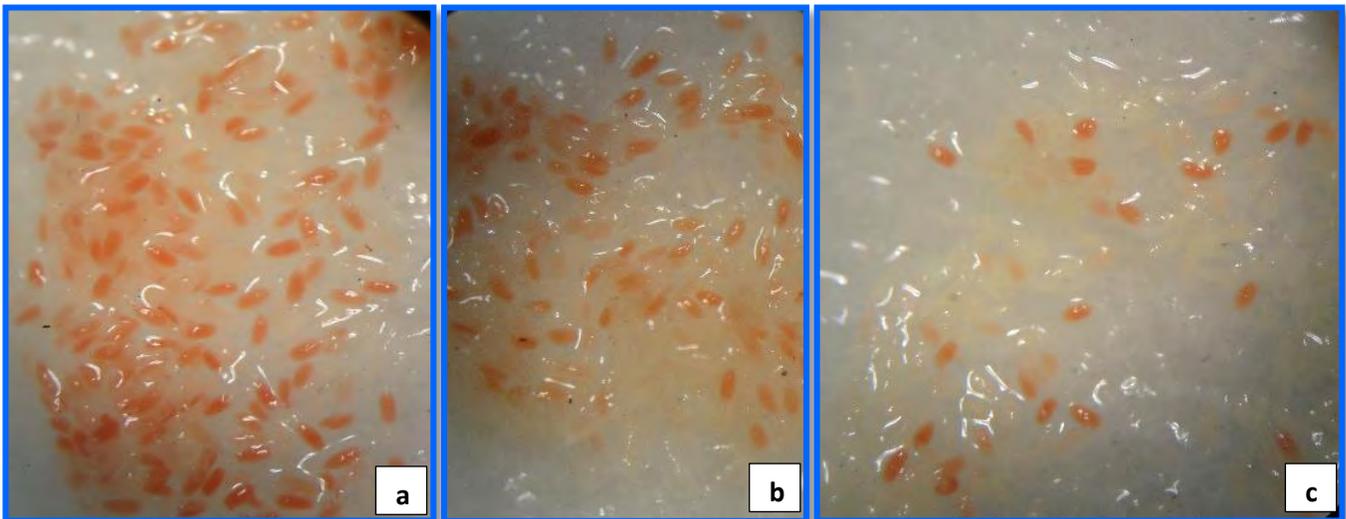


Figura 111. Pigmentación de los embriones de *R. cervantesii* en las diferentes evaluaciones. A) muestra de semillas de la cápsula dos al momento de la apertura y primera evaluación, b) muestra de semillas de la cápsula tres al momento de la apertura y primera evaluación. c) muestra de semillas de la cápsula dos en la segunda evaluación de viabilidad almacenadas durante siete meses.

La cápsula empleada en la tercera siembra (abril 2015), presentó un 75% de viabilidad.

Porcentaje de germinación

Se realizó una primera siembra de semillas en abril de 2013 y se concluyó su registro antes del tiempo establecido (180 días), debido a la contaminación lo que provocó la pérdida de algunos de los tratamientos; por lo cual, simplemente se cuantificó el porcentaje de germinación hasta el día 104 de cultivo, sin la realización de subcultivos a medio fresco.

La figura 112 muestra el máximo punto de germinación, que fue de un 50%, inducido con el estímulo de 0.1 mgL^{-1} AG3 + 1 mgL^{-1} ANA + 0.1 mgL^{-1} K (T14), a partir del día 77 y manteniéndose con ese porcentaje a los 104 días de cultivo. La germinación de las semillas se inicia a partir del tercer día en todos los tratamientos y continúa incrementándose en la mayoría de los tratamientos pero sin rebasar el 50% de germinación hasta los 104 días de cultivo.

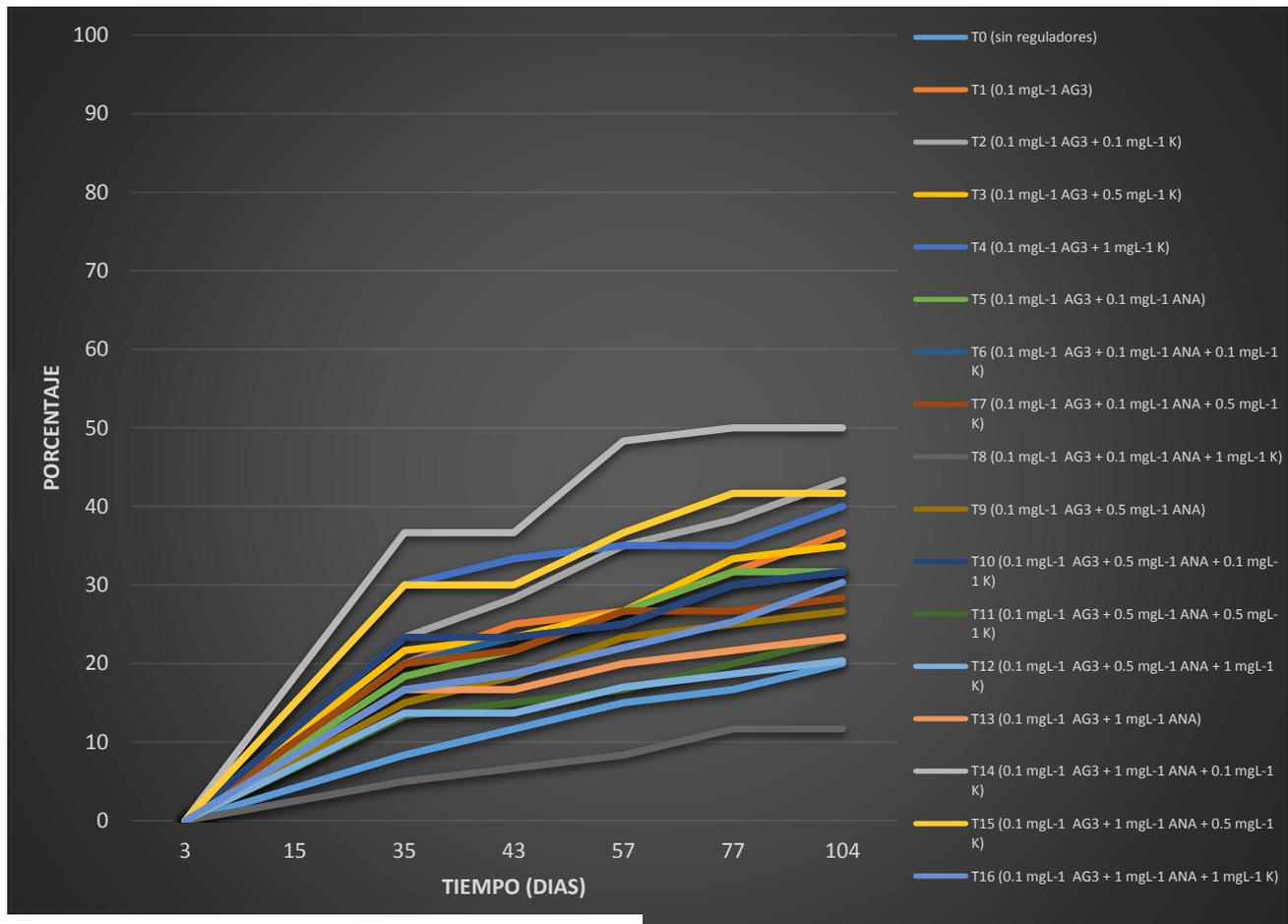


Figura 112. Porcentaje de germinación primera siembra, Abril-2013.

El material biológico de los tratamientos, de esta primera siembra de semillas, se perdió después de los 104 días de cultivo por contaminación, excepto las semillas en el T16 que registró 30.3% de germinación (fig. 113). Con este material biológico se continuó el monitoreo del proceso de germinación para realizar la descripción del desarrollo ontogénico del embrión durante los meses posteriores.



Figura 113. Proceso de germinación y formación de protocormos en los medios de cultivo (T16).

En febrero de 2014 se replicó la siembra de semillas, pero estas presentaban baja viabilidad (40%), y para evitar la pérdida del material biológico por contaminación se decidió mantenerlos sin subcultivos a medio fresco hasta transcurridos los 180 días de evaluación. Durante la germinación de *Rhynchostele cervantesii* existieron diferencias significativas (p-valor= 0.0) entre los tratamientos y entre los días de cultivo y no existieron diferencias significativas (p-valor= 0.0502) en sus interacciones (Anexo 12.4.1).

Al comparar las medias de los porcentajes de germinación obtenidos para cada tratamiento, independiente al tiempo de cultivo (Anexo 12.4.2), se observa que existen diferencias estadísticas entre ellos, la figura 114 muestra el porcentaje de germinación obtenido para cada uno de los tratamientos; sin embargo, el mayor porcentaje de germinación obtenido fue de 25% en los tratamientos T3 y T7 resultando iguales estadísticamente entre ellos y diferentes a todos los demás; ambos tratamientos contienen 0.1 mgL⁻¹ AG3, 0.5 mgL⁻¹ K, 0, y 0.1 mgL⁻¹ ANA respectivamente. El menor porcentaje obtenido fue en el tratamiento T6 el cual contiene 0.1 mgL⁻¹ AG3, 0.1 mgL⁻¹ ANA y 0.1 mgL⁻¹ K.

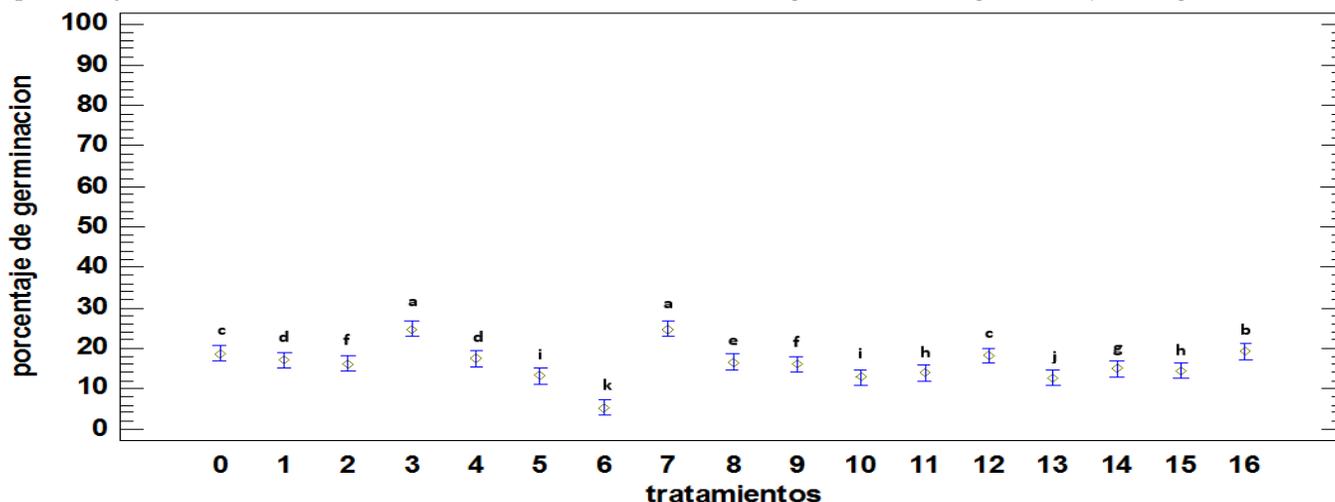


Figura 114. Germinación asimbiótica *in vitro* de *Rhynchostele cervantesii* en los diferentes tratamientos independientemente a los días de evaluación en la segunda siembra.

La figura 115 muestra el proceso de germinación a lo largo del tiempo de evaluación, independientemente de los tratamientos (Anexo 12.4.3). Este proceso comienza a los 30 días de cultivo con 6% de germinación y continuó incrementándose hasta el día 124 con un máximo de 23%, este valor se mantuvo a los 160 días y hasta el final de la evaluación, a los 180 días, resultando iguales estadísticamente entre ellos y diferentes a los demás.

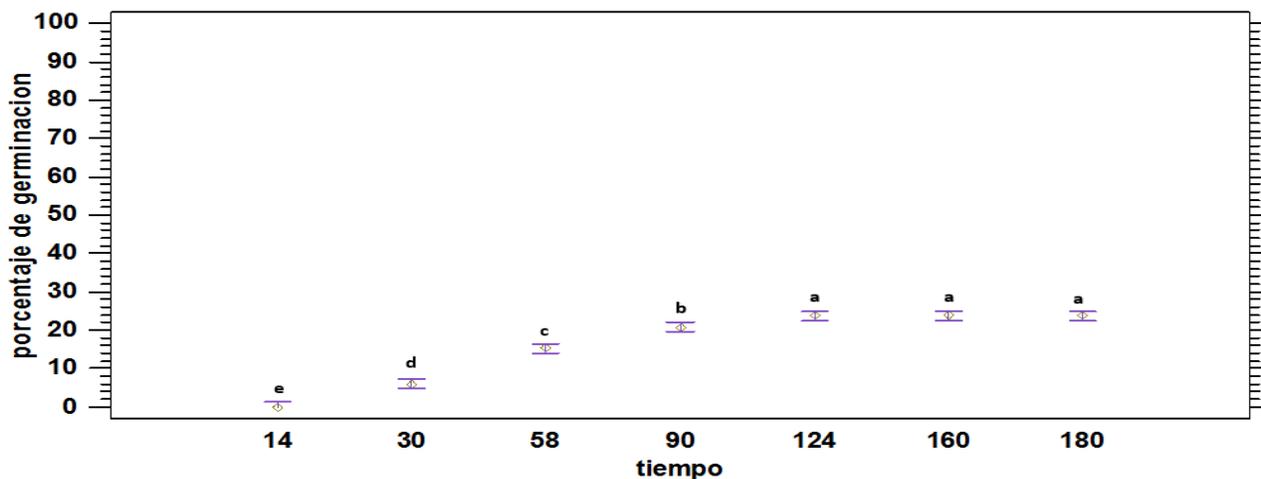


Figura 115. Germinación asimbiótica *in vitro* de *Rhynchostele cervantesii* en los días de cultivo independientemente a los tratamientos en la segunda siembra.

Sin embargo, al graficar los porcentajes de germinación para cada tratamiento a través del tiempo se observa, en la figura 116, que el máximo porcentaje de germinación se obtiene a partir de los 124 días de cultivo en T₃ (0.1 mgL⁻¹ AG₃ +0.5 mgL⁻¹ K) con 37% y el mínimo en el T₆ (0.1 mgL⁻¹ AG₃ +0.1 mgL⁻¹ ANA +0.1 mgL⁻¹ K) con 6.6% a partir de los 58 días de cultivo, ambos porcentajes se mantienen así hasta el último día de cultivo, 180.

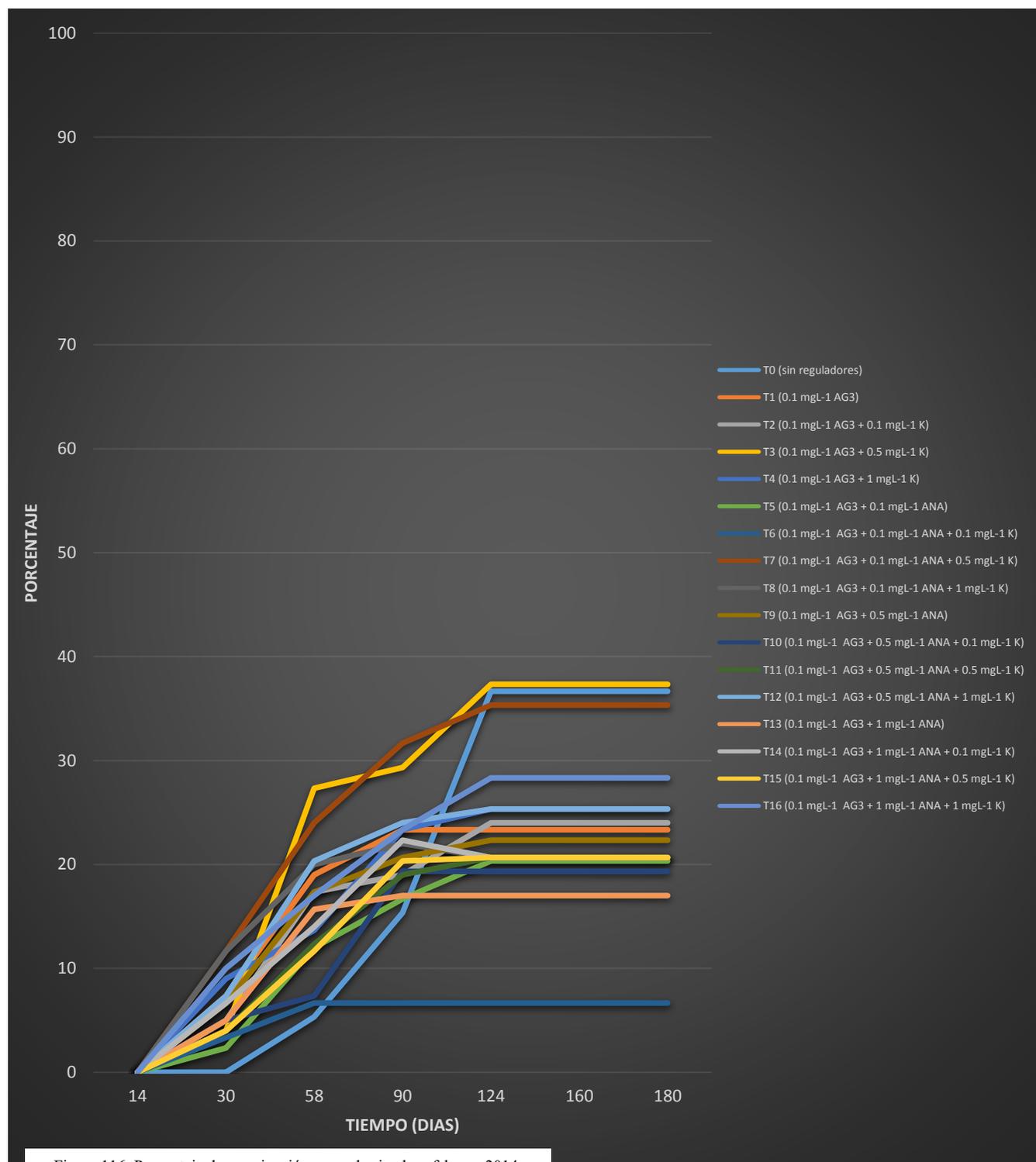


Figura 116. Porcentaje de germinación segunda siembra, febrero-2014.

Finalmente, se replicó una tercera siembra en marzo de 2015, empleando una cápsula recién colectada y siguiendo el protocolo de subcultivos a medio fresco cada cuarenta días. Durante la germinación de las semillas, de este lote, de *R. cervantesii* existieron diferencias significativas (p-valor= 0.0) entre los tratamientos y entre los días de cultivo y no existieron diferencias significativas (p-valor= 0.0438) en sus interacciones (Anexo 12.4.4).

Al comparar las medias de los porcentajes de germinación obtenidos para cada tratamiento, independiente al tiempo de cultivo (Anexo 12.4.5), se comprueba que existen diferencias estadísticas entre ellos, la figura 117 muestra que el mayor porcentaje de germinación es del 58%, el cual se obtuvo en el T0 o testigo, dicho medio carece de reguladores del crecimiento vegetal; mientras que, el menor porcentaje obtenido fue del 21% en el T5 (0.1 mgL⁻¹ de AG3 y 0.1 mgL⁻¹ ANA).

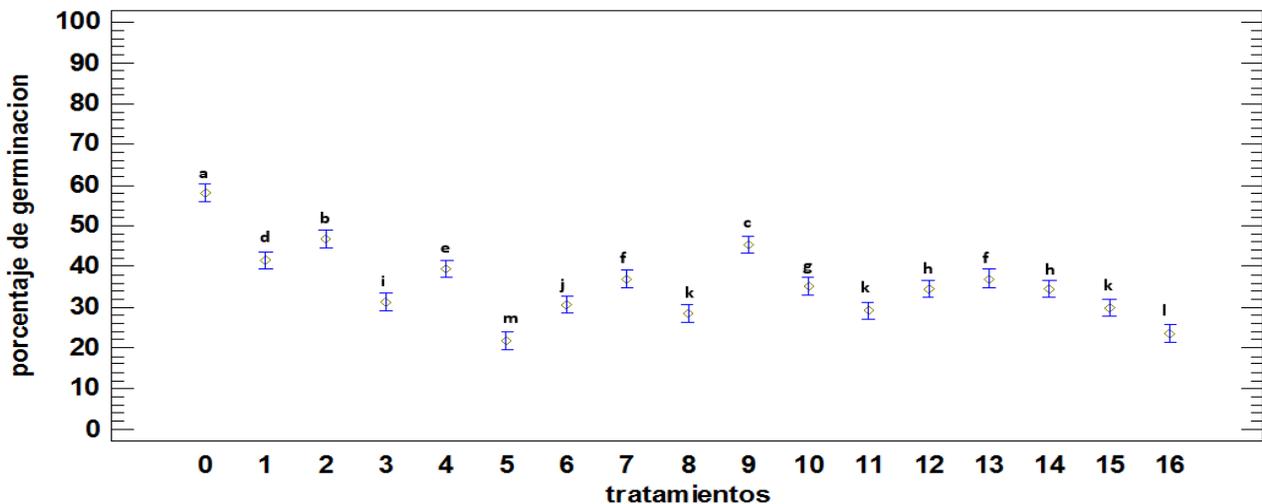


Figura 117. Germinación asimbiótica *in vitro* de *Rhynchosstele cervantesii* en los diferentes tratamientos independientemente a los días de evaluación en la tercera siembra.

La figura 118 muestra el proceso de germinación a lo largo del tiempo de evaluación, independientemente de los tratamientos (Anexo 12.4.6). La germinación inicia a los 61 días de cultivo, con un incremento significativo del día 30 al 61 con el 41% de germinación, el cual se mantiene hasta el día 75 de cultivo resultando ambos tiempos estadísticamente iguales; mientras que, para el día 91 existe un aumento insignificante en la germinación, resultando ser el máximo porcentaje alcanzado con 46% a partir de este tiempo de cultivo y hasta el final de la evaluación, sin mostrar diferencias significativas.

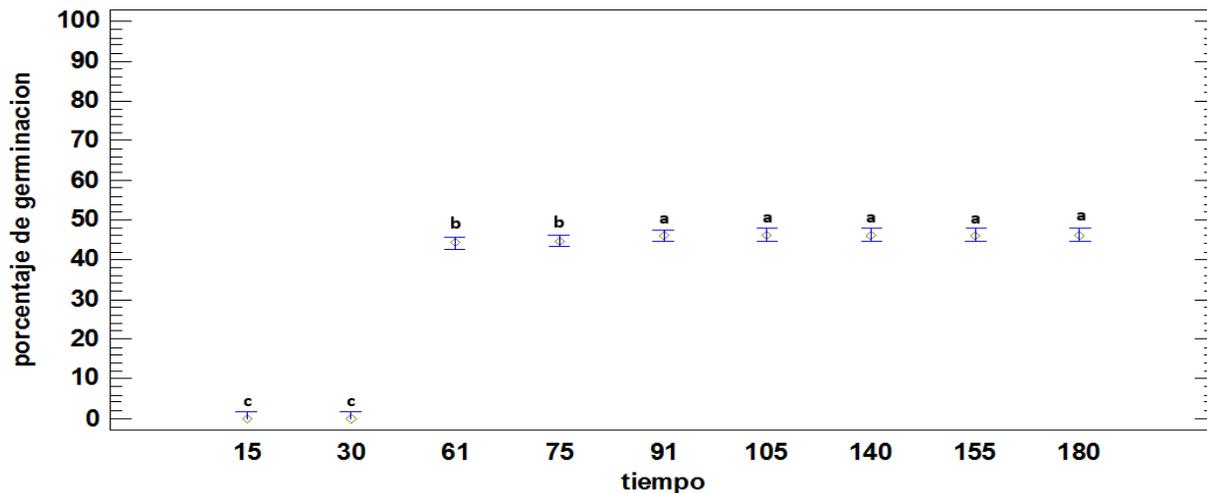


Figura 118. Germinación asimbiótica *in vitro* de *Rhynchosstele cervantesii* en los días de cultivo independientemente a los tratamientos en la tercera siembra.

La germinación para cada tratamiento a través del tiempo se observa, en la figura 119, el máximo porcentaje de germinación se obtiene en el T₀ o testigo (sin reguladores del crecimiento vegetal), con 75 % a los 105 días de cultivo y el mínimo en el T₅ (0.1 mgL⁻¹ AG₃ y 0.1 mgL⁻¹ ANA) con 28 % a los 61 días de cultivo, sin mayor incremento en ambos tratamientos.

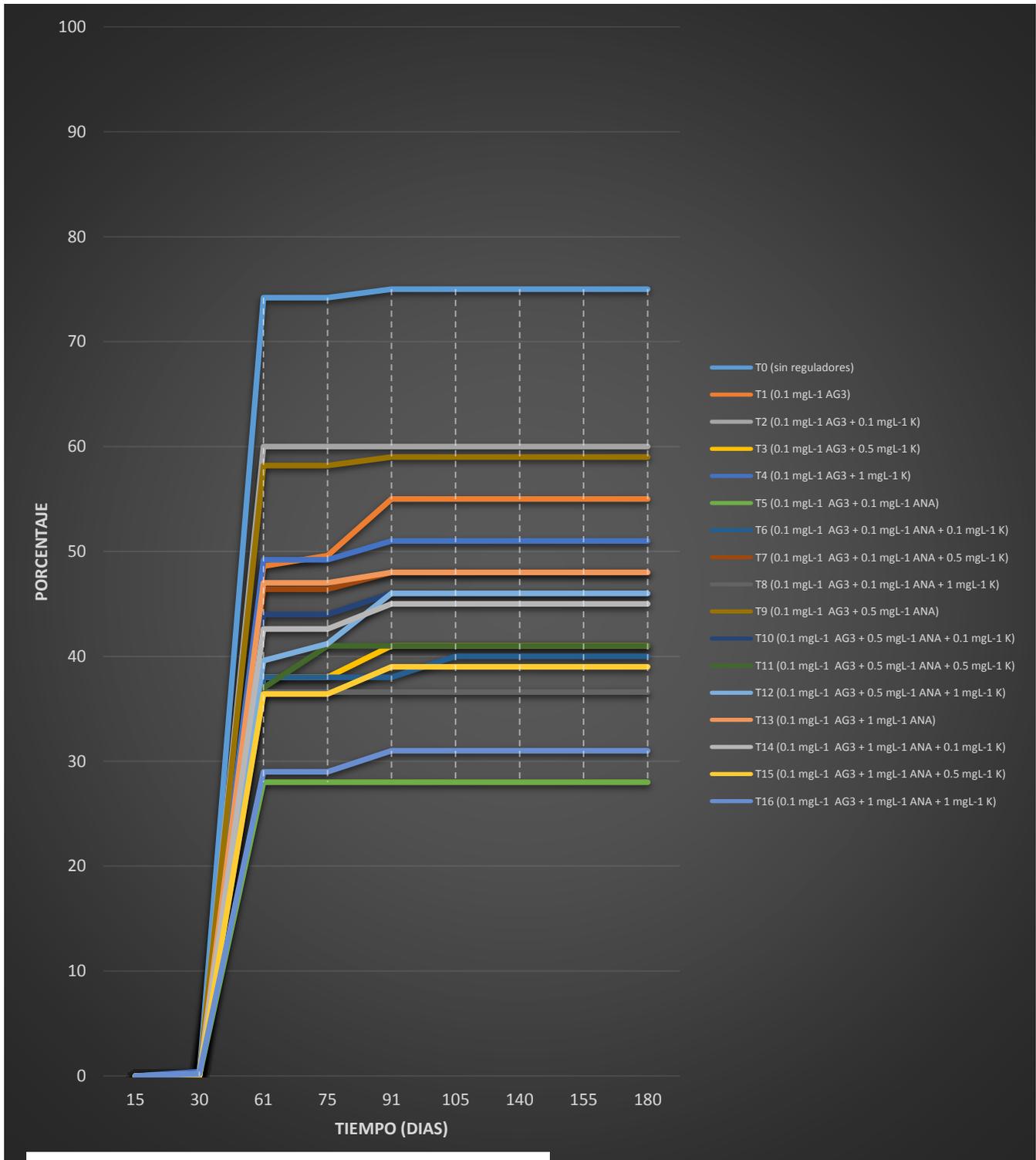


Figura 119. Porcentaje de germinación tercera siembra, Abril-2015.

Índice de desarrollo

Los datos obtenidos en la segunda y tercera siembra fueron procesados, por separado, para evaluar el índice de desarrollo de los embriones de *R. cervantesii* durante su proceso de germinación.

El índice de desarrollo obtenido para las semillas de la segunda siembra, con fecha de febrero de 2014, resultó estadísticamente significativo (p -valor= 0.00) entre los tratamientos, entre los días de cultivo y en sus interacciones (Anexo 12.4.7).

La figura 120 muestra el índice de desarrollo promedio alcanzado en todos los tratamientos independientemente al tiempo de cultivo (Anexo 12.4.8), para la segunda siembra, donde el mayor índice alcanzado, con un valor de 202, fue en el T7 (0.1 mgL⁻¹ AG₃, 0.1 mgL⁻¹ ANA y 0.5 mgL⁻¹ K), y es diferente estadísticamente al resto de los tratamientos. Los tratamientos en donde se obtuvo el menor índice de desarrollo de los embriones fueron el T₀ (sin reguladores del crecimiento vegetal) y el T₆ (0.1 mgL⁻¹ AG₃, 0.1 mgL⁻¹ ANA y 0.1 mgL⁻¹ K), con un valor de 170, ambos tratamientos estadísticamente iguales.

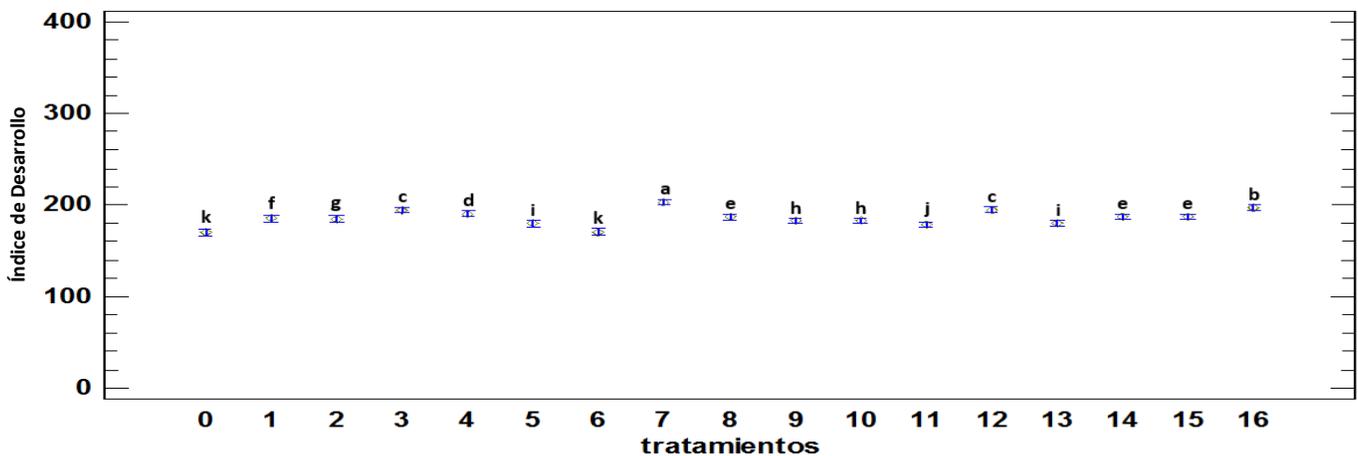


Figura 120. Índice de desarrollo *in vitro* de *Rhynchosstele cervantesii* en los diferentes tratamientos independientemente a los días de evaluación en la segunda siembra.

La figura 121 muestra el tiempo de cultivo en el que se alcanza el mayor índice de desarrollo con un valor de 206, independientemente de los tratamientos (Anexo 12.4.9), alcanzando el segundo estadio de desarrollo o embrión hinchado a los 124 días y manteniéndose en ese mismo estadio hasta los 180 días, tiempo final de la evaluación.

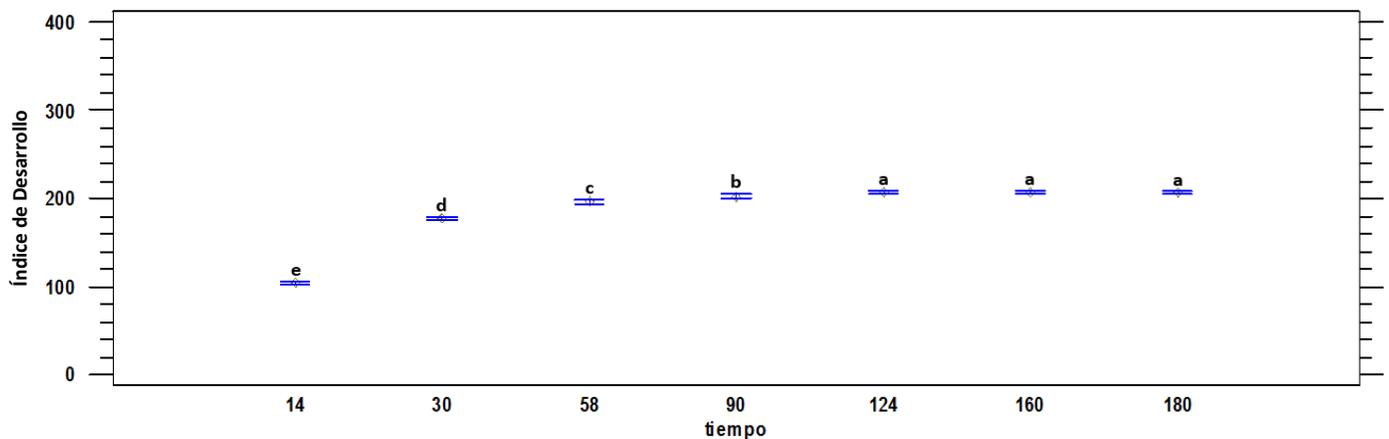


Figura 121. Índice de desarrollo *in vitro* de *Rhynchosstele cervantesii* en los días de cultivo independientemente a los tratamientos en la segunda siembra.

Al evaluar el porcentaje de los distintos estadios de desarrollo presentes en cada uno de los tratamientos experimentales al final del cultivo (180 días), el desarrollo de los embriones, utilizados en la segunda siembra, fue mas allá del segundo estadio, logrando alcanzar el cuarto y quinto estadio de desarrollo, que corresponden a los estadios de protocormo y protocormo con primordio foliar respectivamente. La figura 122 muestra los estadios alcanzados en cada uno de los tratamientos, donde se puede distinguir que en todos los tratamientos se desarrollo el estadio cinco o protocormo con primordio foliar en mayor o menor porcentaje; sin embargo, es en el T16 donde se induce el mayor porcentaje, con 5%, de dicho estadio.

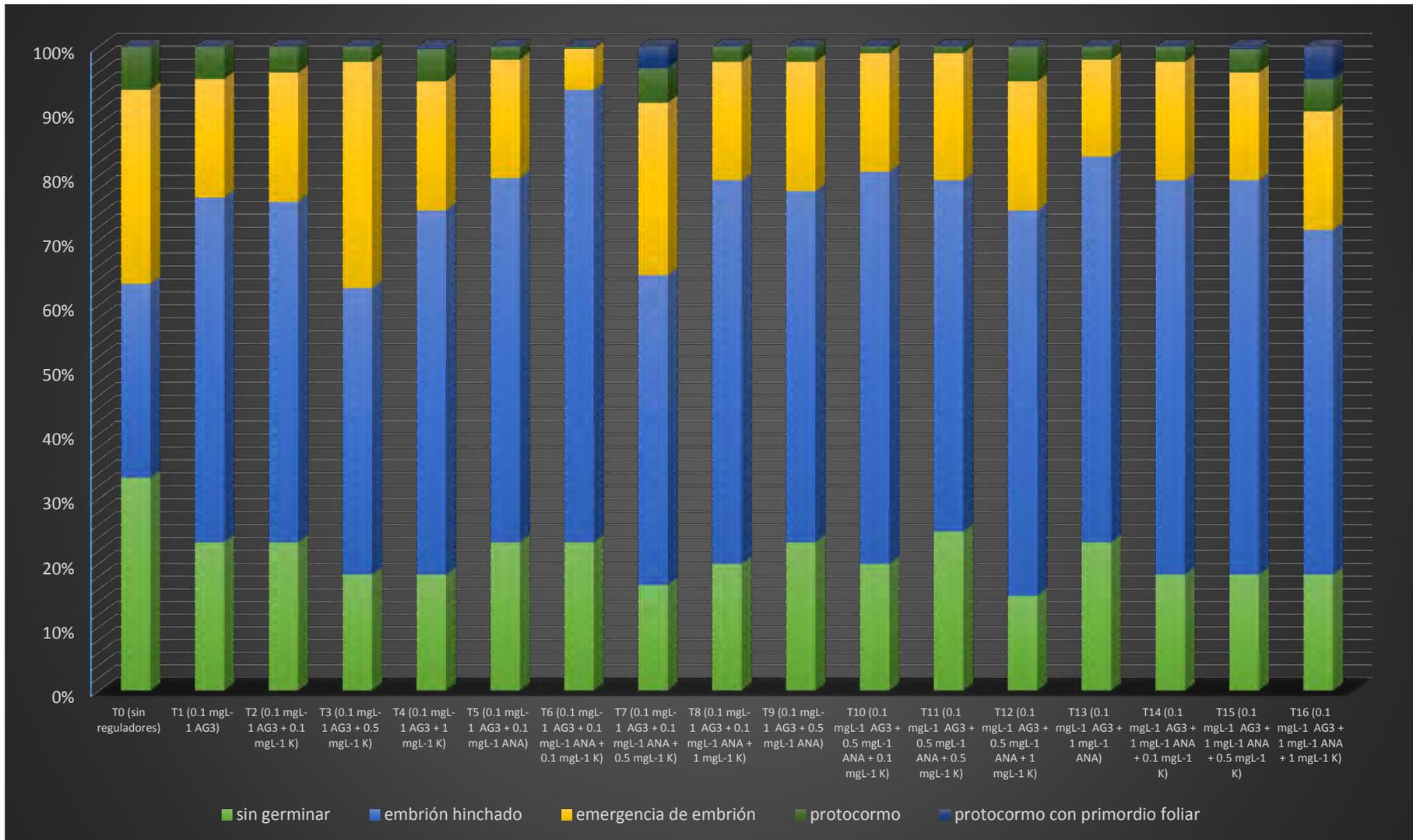


Figura 122. Porcentaje de los estadios alcanzados por tratamiento a los 180 días de cultivo en la segunda siembra (febrero 2014).

El índice de desarrollo obtenido para las semillas de la tercera siembra, con fecha de marzo de 2015, resultó estadísticamente significativo (p -valor= 0.00) entre los tratamientos, entre los días de cultivo y en sus interacciones (Anexo 12.4.10).

La figura 123 muestra el índice de desarrollo promedio alcanzado en todos los tratamientos independientemente al tiempo de cultivo (Anexo 12.4.11), para la tercera siembra, donde el mayor índice fue en el T0 o testigo (sin reguladores del crecimiento vegetal), con un valor de 233, resultando ser diferente estadísticamente al resto de los tratamientos, y los tratamientos donde se induce el menor desarrollo de los embriones, durante su germinación con un valor de 175, fueron en el T5 (0.1 mgL⁻¹ AG3+0.1 mgL⁻¹ ANA y en el T16 (0.1 mgL⁻¹ AG3 + 1 mgL⁻¹ ANA + 1 mgL⁻¹ K) ambos estadísticamente iguales.

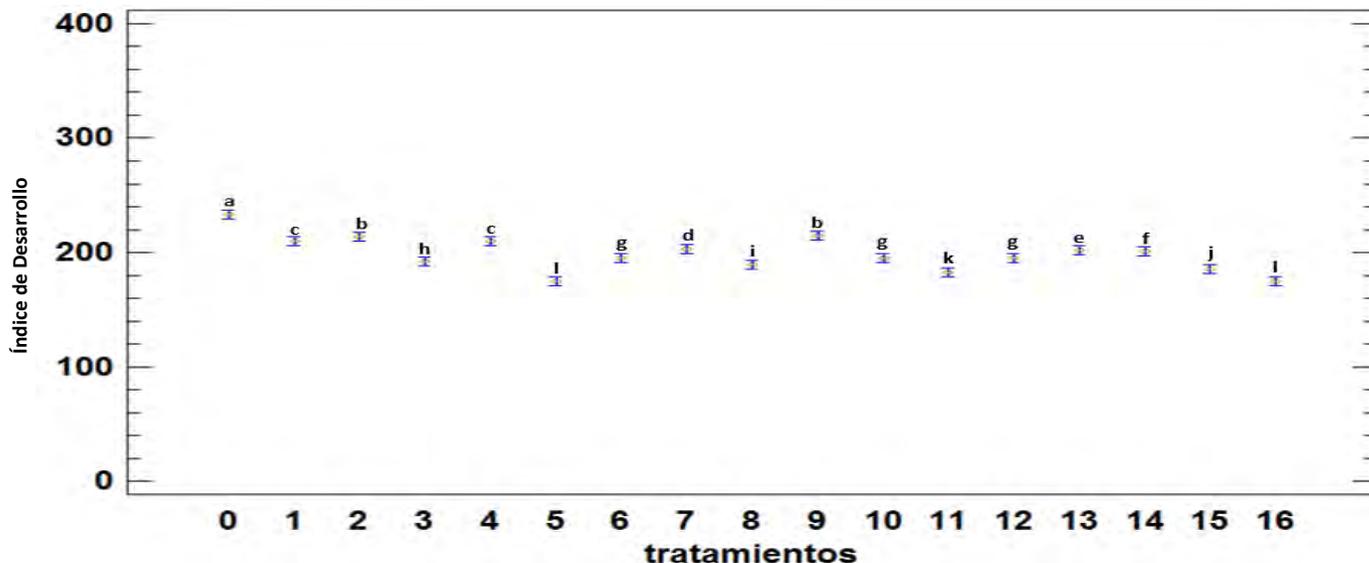


Figura123. Índice de desarrollo *in vitro* de *Rhynchostele cervantesii* en los diferentes tratamientos independientemente a los días de evaluación en la tercera siembra.

La figura 124 muestra el tiempo de cultivo en el que se alcanza el mayor índice de desarrollo con un valor de 226, independientemente de los tratamientos (Anexo 12.4.12), a los 91 días de cultivo, sin ningún incremento significativo durante los siguientes días y a los 180 días, tiempo final del cultivo.

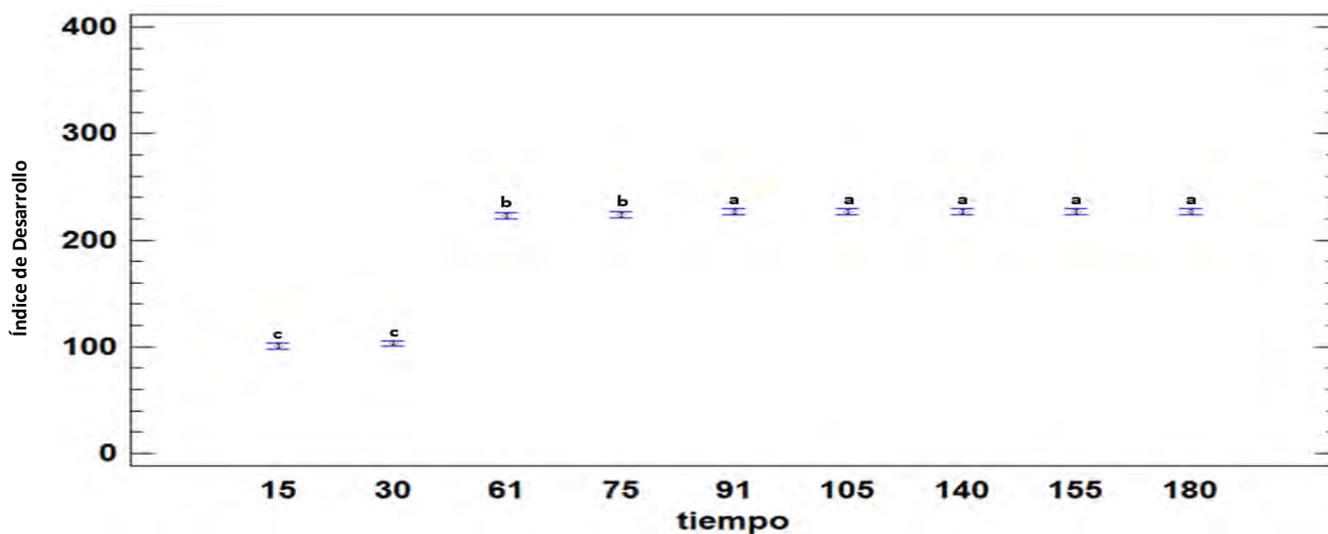


Figura 124. Índice de desarrollo *in vitro* de *Rhynchostele cervantesii* en los días de cultivo independientemente a los tratamientos en la tercera siembra.

Al evaluar el porcentaje de los distintos estadios de desarrollo presentes en cada uno de los tratamientos experimentales al final del cultivo (180 días) el desarrollo de los embriones, utilizados en la tercera siembra, fue mas allá del segundo estadio, logrando alcanzar el cuarto y quinto estadio de desarrollo, que corresponden a los estadios de protocormo y protocormo con primordio foliar respectivamente. La figura 125 muestra los estadios alcanzados en cada uno de los tratamientos, donde se puede distinguir que en todos los tratamientos se desarrollo el estadio de protocormo o estadio cuatro; sin embargo, solo en siete de los tratamientos (T4, T6, T7, T10, T12, T13 y T16) se observa el desarrollo de protocormo con primordio foliar o estadio cinco, y el mayor porcentaje fue de 1% en el T7.

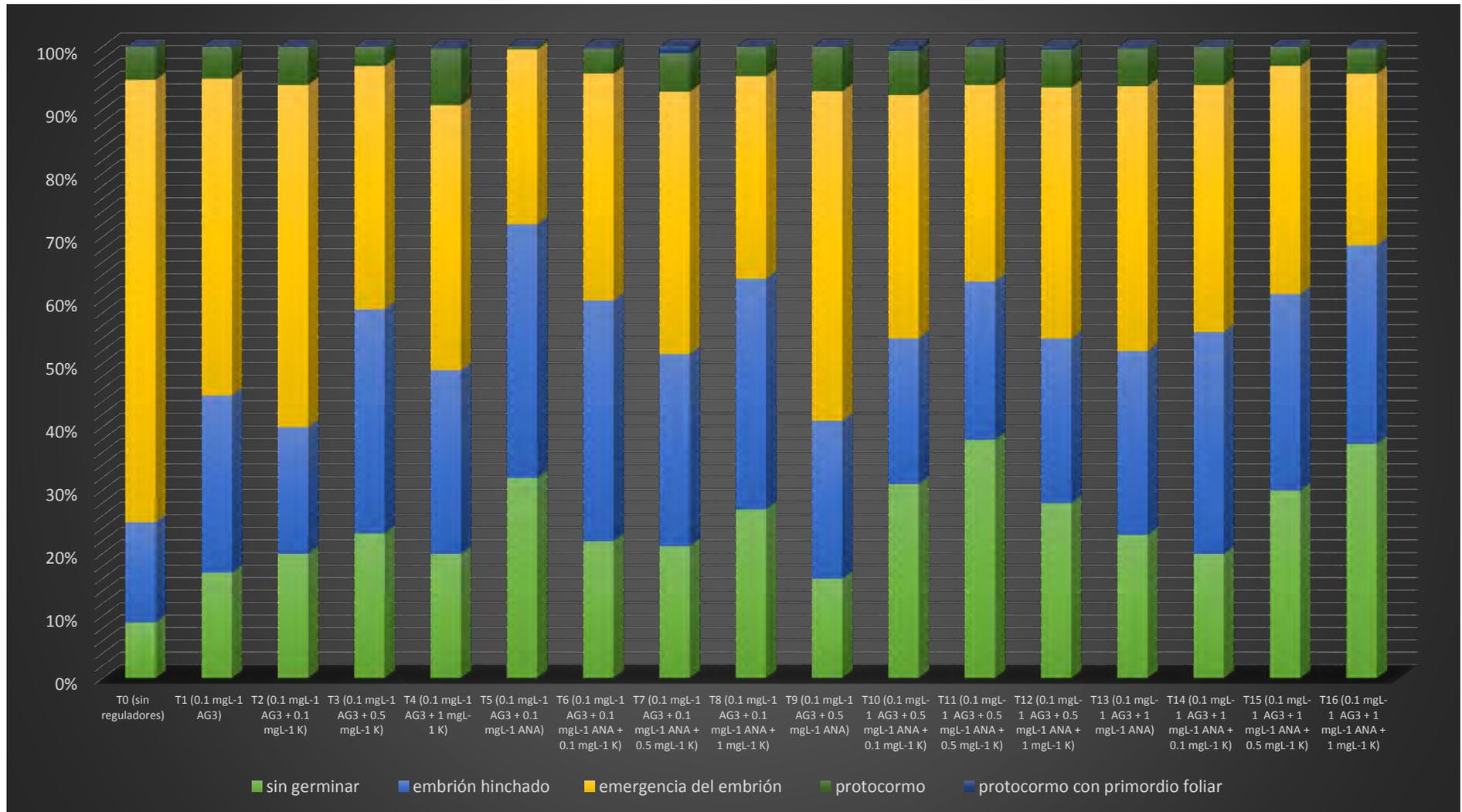


Figura 125. Porcentaje de los estadios alcanzados por tratamiento a los 180 días de cultivo en la tercera siembra (Abril 2015).

Desarrollo ontogénico

En el desarrollo ontogénico de *Rhynchostele* se describen los estadios observados y el tiempo en el que se alcanza dicho estadio; siguiendo lo establecido y descrito por Seaton y Ramsay (2005) para especies epífitas (fig. 126).

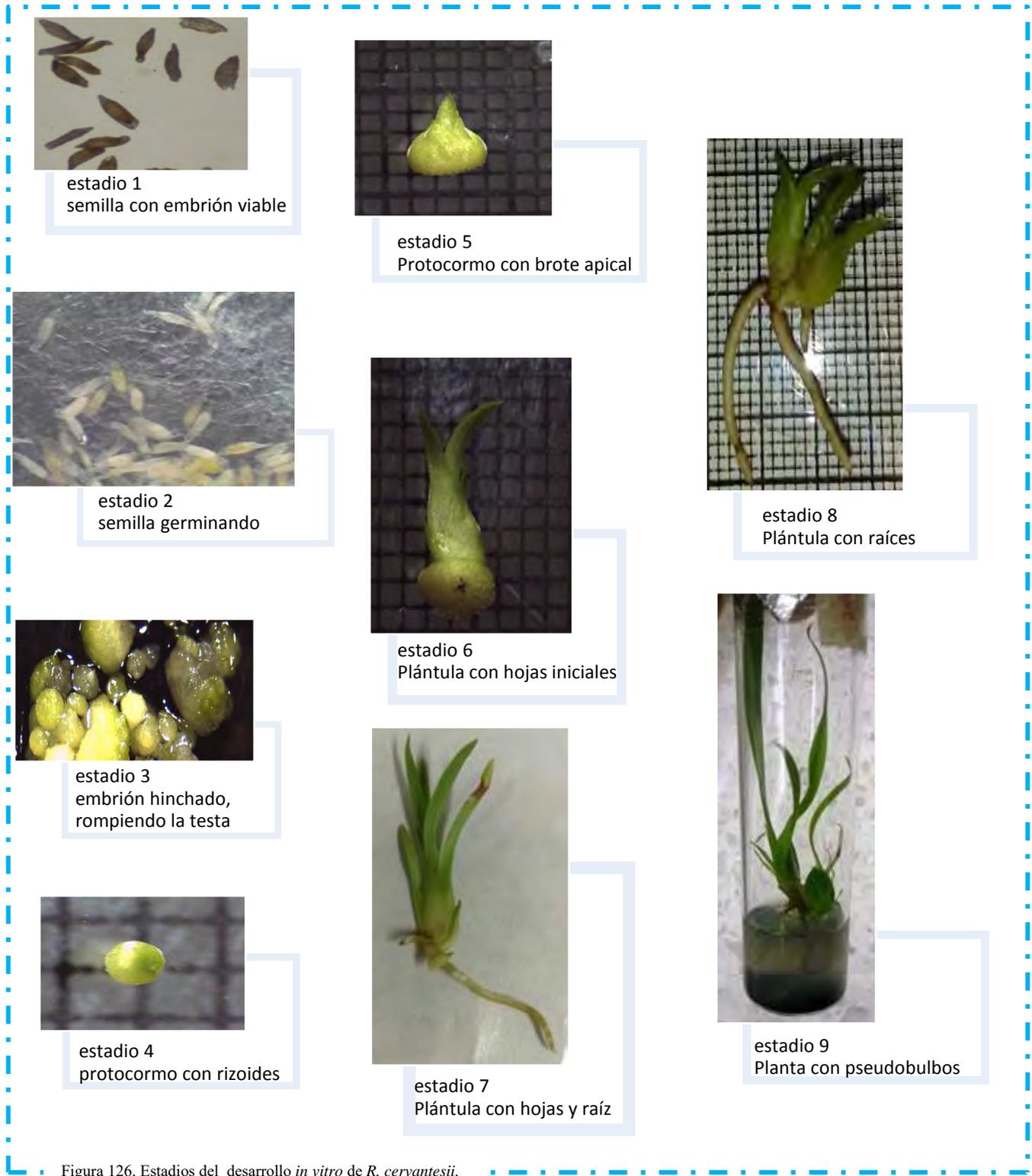


Figura 126. Estadios del desarrollo *in vitro* de *R. cervantesii*.

Estadio 1

Semilla con embrión viable.

El estadio número uno es notorio desde la liberación de las semillas de la cápsula, sin embargo, al ser semillas de un tamaño pequeño es necesario realizar una observación a través de un microscopio estereoscópico, en la figura 127 se aprecia la presencia (al centro), de semillas viables; estas contienen en su interior el embrión de la especie y una semilla no viable o vana es aquella que se observa vacía.



Figura 127. Estadio 1.

Estadio 2

Semilla germinando.

El segundo estadio (fig. 128), es el de semilla germinando, dicho proceso comienza con la imbibición de agua por parte del embrión, en la especie *R. cervantesii* comienza a los quince días y se mantiene hasta los 124 días después de realizada la siembra en un medio asimbiótico. Sin embargo, el proceso de germinación no culmina después de este tiempo.



Figura 128. Estadio 2.

Estadio 3

Embrión hinchado, rompiendo la testa.

El tercer estadio es aquel en donde el embrión alcanza un volumen mayor al de la testa por lo que ésta termina rompiéndose para permitir el mayor crecimiento del embrión, dicho proceso no logró ser observado en los medios de cultivo evaluados, sin embargo en la figura 129 se aprecia el crecimiento celular del embrión fuera de la testa, estadio anterior a diferenciarse, dicho estadio puede determinarse entre los 124 y 150 días de desarrollo bajo condiciones *in vitro*.

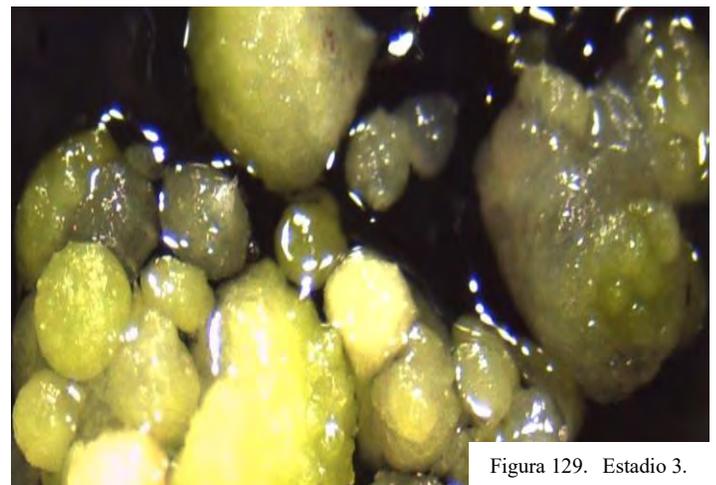


Figura 129. Estadio 3.

Estadio 4

Protocormo con rizoides.



Figura 130. Estadio 4

La forma esférica que toma el embrión recibe el nombre de protocormo, este es un estadio que probablemente se desarrolle a causa de un ambiente desfavorable en condiciones *in situ*, en el cual el embrión almacena suficientes suministros para continuar con su desarrollo posterior; en condiciones *in vitro* la especie *R. cervantesii* alcanza esta fase de desarrollo a los 150 días y conserva esta forma hasta los 240 días de cultivo. En la figura 130 se observa la presencia de pequeños rizoides encargados de la absorción de nutrimentos y la forma esférica es casi perfecta, además se aprecia una pequeña invaginación, en la parte apical, donde se localiza el tejido meristemático y a partir del cual, se desarrollará un primordio foliar.

Estadio 5

Protocormo con brote apical.



Figura 131. Estadio 5

Después de 240 días de cultivo comienza a desarrollarse un brote apical o mejor conocido como primordio foliar, este crecimiento dará origen a la primera hoja de la nueva plántula, sin embargo, aún no puede darse esta denominación ya que no se han desarrollado todas las estructuras necesarias para hacerlo, así que este embrión tiene que seguir desarrollándose bajo condiciones *in vitro*. En la figura 131 se aprecia el estadio número cinco; donde el brote apical surge del protocormo, y existe la presencia de rizoides, esta fase aun es de dimensiones menores a un centímetro (4 mm).

Estadio 6

Plántula con hojas iniciales.

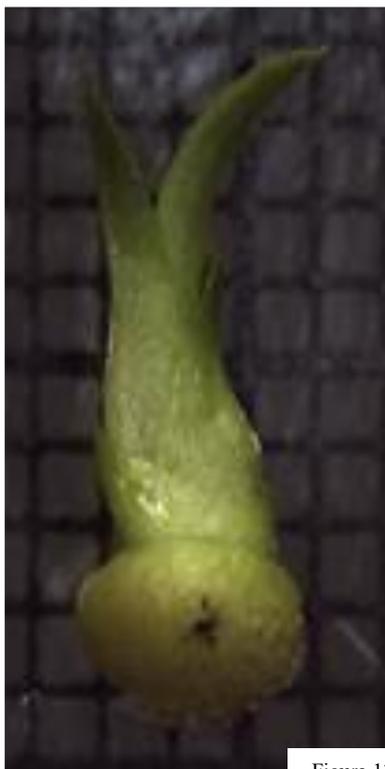


Figura 132. Estadio 6

Posterior a 310 días se puede apreciar el crecimiento de un par de hojas iniciales, considerando así el sexto estadio para la especie, el tamaño promedio es de 2 cm, en la figura 115 se puede apreciar la presencia de este par de hojas y en la parte basal se mantiene lo que se denomina “reminiscencia del protocormo” en la cual prevalecen aun pequeños rizoides de absorción.



Figura 133. Estadio 7.

Estadio 7

Plántula con hojas y raíz.

Transcurridos 390 días de cultivo *in vitro*, podemos observar una verdadera plántula, está ya presenta hojas y su primera raíz. En la figura 133 se aprecia el crecimiento de la primera raíz verdadera y más de un par de hojas, logrando así llamarla plántula después de un largo tiempo de desarrollo en condiciones de laboratorio.

Estadio 8

Plántula con raíces.

El estadio ocho es el de plántula con raíces, en él se presenta el desarrollo de más raíces, las cuales ayudarán a la absorción de nutrimentos y a la mejor adherencia sobre el sustrato de crecimiento; sin embargo, en condiciones *in vitro*, estas alcanzan un mayor volumen y tamaño ya que el sustrato no es totalmente sólido y se encuentran libres en el interior del medio de cultivo, este estadio es alcanzado a los 435 días. En la figura 134 puede observarse el crecimiento de varias raíces.



Figura 134. Estadio 8.

Estadio 9

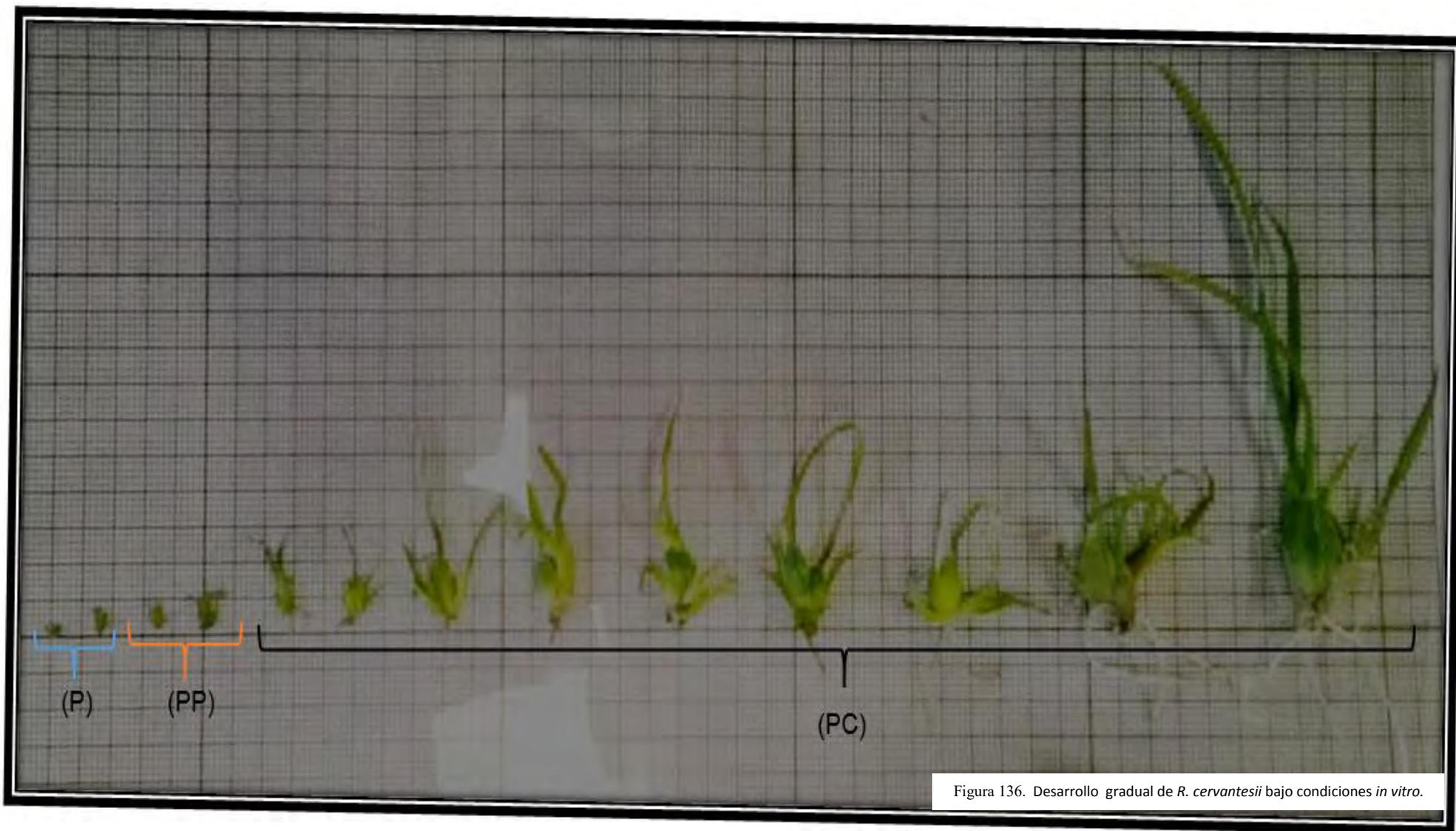
Planta con pseudobulbos.

Transcurridos 520 días de cultivo, los pequeños tallos logran engrosarse y tomar la forma ovoide comprimida de un pseudobulbo, se puede decir que en esta etapa ya se obtiene una plántula con las características de la especie y de una planta adulta, solamente que ella sigue siendo de un menor tamaño y lista para seguir desarrollándose, en la figura 135

puede apreciarse el crecimiento de un par de pseudobulbos los cuales aumentarán de tamaño y darán origen a nuevos brotes para el crecimiento de la plántula de *Rhynchostele cervantesii*.



Figura 135. Estadio 9.



En la figura 136 se observa el desarrollo gradual, así como el tamaño que alcanza la especie *Rhynchostele cervantesii* en los estadios de desarrollo posteriores a la formación del protocormo bajo condiciones *in vitro* en el medio MS al 50% de concentración (P-Protocormo, PP- Plántula con primordio foliar, PC-Plántula completa).

Propagación asexual

El cultivo *in vitro* de segmentos de hoja se llevó a cabo en dos partes durante febrero de 2013. En la primera parte se evaluó el tiempo a la exposición al desinfectante resultando lo siguiente:

Tiempo de exposición (minutos)	Numero de repeticiones	Porcentaje de contaminación
5	10	90%
10	10	70%
15	10	50%
20	10	10%
25	10	10%
30	10	20%

Obteniendo una mayor efectividad en los tratamientos expuestos a 20 y 25 minutos al desinfectante.



Figura 137. Segmentos de hoja de *R. cervantesii* bajo condiciones *in vitro*.

En la segunda parte se efectuó la siembra de segmentos de hoja en medio de cultivo con reguladores del crecimiento vegetal. Para ello se decidió realizar una desinfección durante 25 minutos en hipoclorito de sodio al 10 % y 5 minutos en etanol al 70% posterior a ello se realizó la siembra (fig. 137). Sin embargo, esta fase no logró completarse y evaluarse durante el tiempo establecido (90 días) y solo se evaluó durante treinta días, debido a que los tejidos de hoja comenzaron a oxidarse después de este tiempo; y en algunos otros tratamientos se registró el crecimiento de hifas (fig. 138) provenientes de los tejidos conductores de la hoja (venas principales), y con ello se perdió la totalidad de tratamientos.



Figura 138. Segmentos de hoja de *R. cervantesii* con presencia de contaminación bajo condiciones *in vitro*.



9.-DISCUSIÓN



El CBCh constituye un ANP con gran riqueza de hábitats relacionados directamente con su situación geográfica, climática y geológica, comprendiendo una variación altitudinal bastante marcada. Las condiciones ambientales hacen posible el establecimiento de una amplia gama de comunidades vegetales que albergan una considerable riqueza. Siendo además un área con una marcada heterogeneidad topográfica, geológica y climática lo que genera una amplia gama de condiciones ecológicas y da lugar a una notable diversidad de hábitats y por consiguiente, de especies (Pulido-Esparza, *et al.*, 2009), lo que permite el establecimiento de especies endémicas como lo es la orquídea *Rhynchostele cervantesii*. De acuerdo a la composición vegetal registrada para cada cuadrante, podemos sugerir que el PNET presenta un fragmento del típico Bosque Mesófilo de Montaña (BMM), ya que de acuerdo con Tejeda-Sartorius y Téllez-Velasco (2015) este tipo de bosques presentan una composición biótica híbrida y densa, así como un clima templado con humedad elevada y con niebla con mucha frecuencia, lo que concuerda con los eventos registrados a lo largo del muestreo, además se menciona que la riqueza florística de los BMM corresponde a las epifitas en un 32%, seguida de los arbustos y las hierbas en un 24%, y los árboles en un 18%, lo cual corresponde con el registro de epifitas muestreadas, así como del porcentaje vegetal de distribución registrado para cada cuadrante. Sin embargo en sentido más estricto Hagsater y colaboradores (2005), ubican al pedregal de Chichinautzin, en lo que denominan un Bosque Mesofítico de Barrancas, el cual se encuentra dentro de su clasificación de bosques de niebla; el anterior se denomina así, por ser una comunidad que se intercala en el mismo piso altitudinal de los encinares y pinares, generalmente entre los 1 400 y 2 300 m de altitud, pero en condiciones mesoclimáticas más húmedas, dadas por el abrigo y la menor insolación de una barranca. Durante el verano y otoño las condiciones son muy húmedas y con neblina, el resto del año el bosque puede experimentar algo de sequía, esto último concuerda con lo observado durante los meses de muestreo.

De acuerdo con la descripción realizada por Espejo-Serna y colaboradores (2002), *Rhynchostele cervantesii* aún se distribuye y puede observarse en el municipio de Tepoztlán, entre el rango altitudinal registrado por el mismo, que va desde los 1 400 y hasta los 3 000 msnm.

En relación a la descripción de los forofito, la mayor parte se encuentra representada por la especie *Clethra mexicana*, que como lo menciona González-Villarreal (1996) son árboles o arbustos propios en su mayoría de los BMM, así como de los bosques de encino y de coníferas más húmedos.

Además, si se considera la distribución vertical descrita por Johansson (1974), el cual zonifica en cinco estratos a los forofitos de acuerdo a la ubicación de las epifitas (fig. 139), se acordaría que las especies registradas corresponden al estrato C y D, tal como lo describe el autor para todas las epifitas, sin embargo la orquídea *R. cervantesii* presenta una distribución vertical en los estratos B y C en la zona de muestreo, lo cual se relaciona a que los forofitos registrados no presentan una altura mayor a quince metros y que no presentan ramificaciones por encontrarse en un derrame volcánico, además a que el diámetro de los mismo no supera los 60 cm. de DAP.

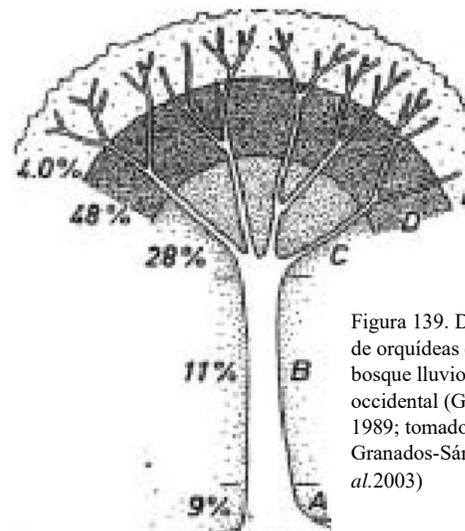


Figura 139. Distribución de orquídeas epifitas en un bosque lluvioso de África occidental (Goh y Kluge, 1989; tomado de Granados-Sánchez *et al.* 2003)

El sistema de Johansson está basado en zonas preestablecidas según la ramificación del forófito y no por la distribución de las epífitas, por lo que se considera artificial. Cuando se estudian forófitos de alturas mayores en los que se amplían las zonas y cambian las condiciones microclimáticas, el mismo no permite establecer asociaciones específicas de epífitas por zonas (Richards, 1996). Los microhábitats son más favorecidos hacia arriba en relación con la iluminación, pero más desfavorables respecto a la disponibilidad de agua. Al mismo tiempo disminuye el contenido de CO₂ hacia los estratos medios donde el follaje es más denso, para reajustarse al valor de la atmósfera solo en la región de las copas (Vareschi, 1992).

Los individuos de la especie *Rhynchostele cervantesii* presentaron una gran variabilidad fenológica, así como un gran número de representantes; sin embargo, como lo menciona Sanford (1968), en las epífitas vasculares es muy común el modo de crecimiento clonal, por lo que un parche o colonia, espacialmente independiente, puede ser considerado como un individuo, tal como se planteó en este estudio. De acuerdo a los parámetros registrados en campo, las fases de desarrollo coinciden con lo descrito por Aguirre-León (1977), el cual menciona que en el ciclo de crecimiento anual de *R. cervantesii* (fig. 140), pueden distinguirse las etapas de crecimiento vegetativo, el cual va de marzo a la segunda mitad del mes de septiembre, que coincide con el periodo de lluvias de verano; el crecimiento de inflorescencias que inicia posterior al crecimiento vegetativo culminando con la apertura floral, esta puede iniciar en noviembre y se prolongan hasta la mitad del mes de abril; la formación de capsulas sucede del mes de noviembre y hasta octubre ocurre la maduración de las mismas; y finalmente la dispersión de semillas que inicia en abril y termina aproximadamente en octubre. Debido a la larga duración de estas fases, es frecuente observar individuos de una misma población en diversas etapas, tal como ocurre en la zona de muestreo dentro del PNT.

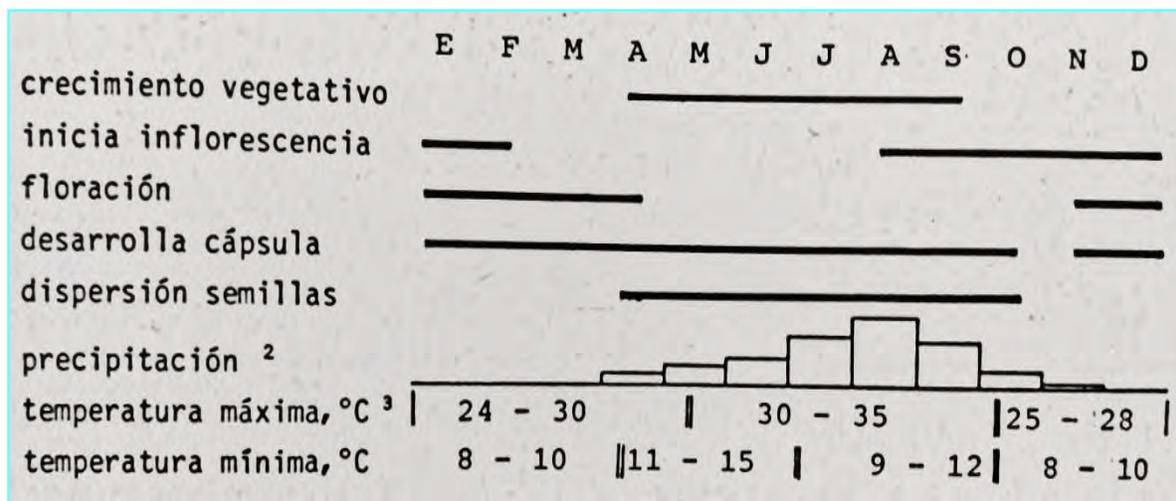


Figura 140. Fases del ciclo anual de crecimiento y reproducción de *R. cervantesii*. Tomado de Aguirre-León (1977).

Los parámetros relacionados con la estructura de la población, como lo es la altura, el diámetro, el número de pseudobulbos, la disposición sobre el forofito y la orientación de los individuos, se realiza por primera vez para esta especie, usualmente estos datos suelen recopilarse cuando el individuo será colectado para formar parte de una colección o ingresarse a un herbario; sin embargo, en este estudio se consideró realizar el registro de estos parámetros para una amplia cantidad de individuos, los cuales se conservan *in situ* para posterior monitoreo. Las orquídeas viven en un delicado balance con los otros organismos del ambiente (Placencia-Carrera, 2010) y es por ello que se realizó el registro de otras especies de epífitas que comparten el forofito, con la finalidad de asociar a éstas como un beneficio o competencia sobre los individuos de la especie *R. cervantesii*; ya que, se considera que las epífitas conforman pequeños ecosistemas dentro de los bosques tropicales, además contribuyen notablemente a la compartimentación del hábitat, aumentando la disponibilidad de recursos tróficos y estructurales; además, de incidir en el balance hídrico y recambio de nutrientes, incrementando la productividad en el ecosistema (Lowman y Nadkarni, 1995; Armbruster *et al.*, 2002 citado por Cuéllar-Araujo, 2008).

Las epifitas no sólo extraen una amplia variedad de nutrientes, sino que son protagonistas en la economía de nutrientes y energía de muchas comunidades forestales del trópico. Nutricionalmente son diversas dentro de un mismo hospedero o forofito, pues en él se alimentan de distintas fuentes de materia, casi todas de origen orgánico, a diferencia de la flora terrestre. Los nutrimentos entran a los estratos tanto por aire como por tierra. Los iones edáficos están disponibles después de ser transportados por la transpiración del vegetal. Su consumo, depende del sitio de colocación de los desechos animales (Granados-Sánchez *et al.* 2004); por lo que, la posición de la orquídea *Rhyncostele cervantesii*, sobre los forofitos en el PNET, puede considerarse estratégica ya que recibe un mayor aporte de nutrimentos.

Cuello (1998) revisa metodologías precedentes para estimar parámetros ecológicos de epifitas vasculares como riqueza, abundancia, cobertura, tipos ecológicos, distribución espacial en el forofito y el tamaño de muestra, en bosques montanos. Él sugiere la combinación de varios métodos de observación para asegurar la correcta identificación de las especies, como son, el uso de los parches para el conteo de individuos y de la cobertura epifítica como medida de abundancia y el registro de la identidad de los forofitos, como coincide en este estudio. Por otro lado, los aspectos registrados en la literatura hablan de la composición de las comunidades de epifitas vasculares en los bosques pluviales tropicales continentales (Nadkarni y Ferrell-Ingram, 1992); así también, se encuentran trabajos en diversas áreas naturales o países de América Central y América del Sur (Todzia, 1986; Aguirre-León, 1992; Wolf, 1993; Ingram *et al.*, 1996; Ibisch, 1996; Ibisch *et al.*, 1996; Engwald *et al.*, 2000; Freiberg y Freiberg, 2000; Hechavarria *et al.*, 2002; Benavides *et al.*, 2005); así como, registros en donde se incluye a la familia Orchidaceae (Linares, 1999; Anaselvam y Parthasarathy, 2000; Acebey y Krömer, 2001; Pichardo 2011; Frasco-Pérez, 2016) en donde se muestran la dinámica, distribución, preferencias de sustrato y microhábitats en bosques pluviales de diferentes localidades (Bennet, 1986; ter Steege y Cornelissen, 1989; Bøgh, 1992; Fontoura, 1995; Hietz y Hietz-Seifert, 1995; Nadkarni *et al.*, 1995; Zotz, 1997; Rudolph *et al.*, 1998; citado por Cuéllar-Araujo, 2008) y en forofitos específicos dentro del bosque (van Leeerdam *et al.*, 1990; Freiberg, 1996; Zotz, 1997; Valle *et al.*, 2004; Zotz y Vollrath, 2002, 2003; Hernández-Rosas y Carlsen, 2003; citado por Cuéllar-Araujo, 2008). Sin embargo, en este estudio no puede aplicarse ninguno de estas metodologías, dado el hecho que estas se realizan sin tener un punto objetivo en el análisis y se busca registrar por completo el cuadrante o transecto seleccionado, para así obtener un registro de la totalidad de la vegetación existente, al contrario de cómo se planteó en la metodología del presente trabajo, en la cual solo si existía la presencia de la orquídea *R. cervantesii* en el forofito, se procedía a tomar todos los demás datos de registro. No obstante los mencionados esfuerzos en la estandarización de los métodos de muestreo se limitan a los bosques pluviales y montanos. En ningún caso, se incluyen las formaciones vegetales xerofíticas o de transición, por lo que las metodologías planteadas requieren de adecuaciones (Cuéllar-Araujo, 2008).

Retomando el registro de la vegetación epifita registrada como asociada y/o competitiva a *R. cervantesii*, este estudio es el primero en considerar esta asociación/competición con dicha orquídea, dado su importancia en el país, considerada endémica y ubica en la categoría de Amenazada en la NOM- 059-SEMARNAT-2010, resulta de importancia considerar estos datos para futuros programas de restauración o reintroducción de esta orquídea, pues se propone la búsqueda de condiciones iguales o similares para que resulte exitoso. Y que no solo se realicen estudios de la distribución potencial basados en los datos de colecta, llámense coordenadas geográficas, existentes en bases de datos de los herbarios nacionales; puesto que, se excluyen algunas regiones al elaborar los mapas potenciales de distribución.

Haciendo referencia a los estadios de desarrollo registrados *in situ*, se propone una asociación entre los líquenes y briofitos que crecen a no más de 10 cm de *R. cervantesii*, en el proceso de germinación, puesto que las epífitas suelen tener asociaciones con cianobacterias, líquenes y briofitos que favorecen la retención de humedad, crean depósitos de humus y promueven el enriquecimiento de sustratos propicios para la germinación de las semillas, así como la fijación de elementos esenciales como el nitrógeno (Bøgh, 1992; Kernan y Fowler, 1995; Hernández-Rosas, 2004; citado por Cuéllar-Araujo, 2008) y no solo considerar factores físicos; si bien, es sabido que el crecimiento de las epífitas en el dosel usualmente está determinado por la heterogeneidad de la superficie de la corteza del forófito, la estructura del dosel y las fluctuaciones climáticas, entre otros parámetros que influyen en el establecimiento exitoso de estas plantas.

El posterior desarrollo de las epífitas en los diferentes estratos y zonas del árbol dependerá de la interacción entre los mecanismos morfofisiológicos que presenten las semillas, de la capacidad para competir por determinados recursos y la de adaptarse a la heterogeneidad del medio (Zotz y Andrade, 2002). Por lo cual resulta importante conocer a las demás especies vegetales que comparten el forófito y crean este microambiente propicio para su crecimiento y permanencia en los ecosistemas naturales. Además, cabe resaltar que una característica de la mayoría de los sitios donde persisten las orquídeas, es la falta de regeneración de los árboles y quizá la mitad de las orquídeas se encuentran

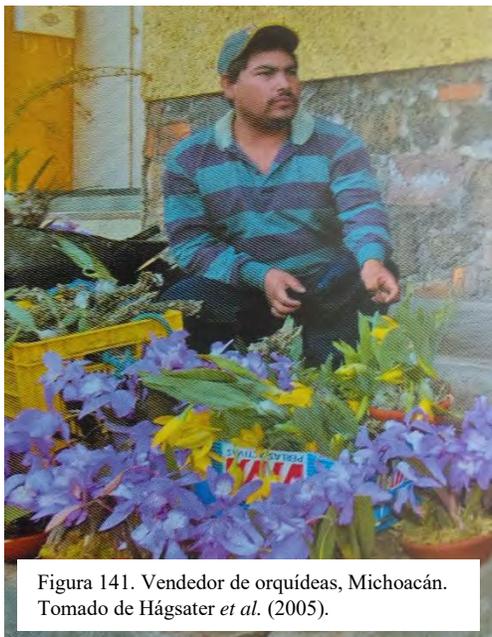


Figura 141. Vendedor de orquídeas, Michoacán.
Tomado de Hågsater *et al.* (2005).

en situaciones muy precarias habitando árboles ya secos o con pocos años de vida; por lo tanto, las orquídeas no tienen mucho futuro, ya que sus árboles de soporte dejan de existir y la orquídea cae al suelo y muere (Damon, 2006a). Por lo que es de vital importancia crear planes de manejo adecuados a las zonas de protección y reconocerlas como un recurso sostenible, debido a que las orquídeas son muy específicas en cuanto a sus requerimientos ecológicos y son muy vulnerables a las alteraciones causadas por el hombre (Salazar-Casas *et al.*, 2007). Muchos estudios comprueban que después de una perturbación, la regeneración del bosque es muy lenta y pasaran varias décadas hasta que un árbol alcance su madurez y el doble de tiempo para que las orquídeas se restablezcan (Nadkarni, 2000). Aunado a la alteración y fragmentación del hábitat, así como a la belleza de las orquídeas, muchas poblaciones silvestres son objeto de la extracción ilegal de ejemplares reproductores para satisfacer la demanda comercial existente (fig. 141), principalmente de aquellos ejemplares con características sobresalientes, ya que son muy solicitadas a pesar del alto costo que algunos individuos llegan a alcanzar (Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007).

R. cervantesii suele venderse en los mercados locales durante su época de floración, en los meses de abril-mayo, sin importar que esta sea una especie amenazada. Hågsater y colaboradores (2005) sugiere, que lejos de imponer limitaciones legales al cultivo de especies en peligro de extinción, debe fomentarse la propagación y el cultivo del mayor número de especies por el mayor número de individuos y viveros ya sean estos comerciales, tecnificado o rústicos. Sin embargo, menciona también que la estrategia más importante es la conservación *in situ* ya que esta permite mantener la variación genética de las especies, así como las interacciones con otros organismos y la capacidad de seguir evolucionando.

La conservación fuera del hábitat debe ser vista como una estrategia complementaria de la conservación *in situ* y llevarse a cabo como una última opción y cuando no existen posibilidades para la permanencia de una especie en su medio natural (Hågsater *et al.*, 2005).

De acuerdo a los registros obtenidos la floración de *R. cervantesii* es abundante y concuerda con la descripción botánica que se describe (Aguirre-León, 1977; Mcvaugh, R. 1985; Espejo-Serna, 2008), desarrollando de 4 a 5 flores entre los meses de noviembre a abril, pero destacando entre febrero y marzo cuando se aprecia el mayor número de flores en antesis; además, se logró apreciar la variedad de formas y colores que describe Aguirre-León (1977), como variedades o subespecies (fig. 142) nombradas así, de acuerdo a las primeras observaciones realizadas por Lexarza, Lindley y Veitch; sin embargo, como lo sigue mencionando Aguirre: la inspección de diversas poblaciones permite determinar que la escasez de algunas de las supuestas variedades es relativa y que pueden ser halladas junto a plantas de características “normales” y aun “intermedias” tal como sucede en la población muestreada en este estudio; y tal como lo asevera, *Rhynchostele cervantesii* se considera como una sola entidad taxonómica, confirmado por el herbario AMO (Com. Pers. Jiménez-Machorro, R. 2014).

El proceso de herbivoría registrado durante la floración, impide la formación de nuevos frutos, lo que a largo plazo provocará la pérdida de recombinación genética entre la población y la fragmentación de la comunidad. Johnson y Bond (1992) mencionan que el proceso de fragmentación afecta el número de polinizadores y sus visitas, además de alterar la estructura de la vegetación y elimina forofitos.

Naturalmente los principales polinizadores de la Familia Orchidaceae está representado por insectos como abejas y avispas, así como diversas clases de moscas y mariposas tanto diurnas como nocturnas, además de aves como los colibríes (Sarmiento & Romero, 2000). Sin embargo, para la especie *R. cervantesii* no se conoce al polinizador específico, por lo que esto limita aún más el conocimiento general del comportamiento de la especie en estudio. Aun con ello, se logra la formación de algunas cápsulas, que lograrán la formación de una gran cantidad de semillas, pero como lo mencionan Philip & Nainar (1988), solo el 1-2% de estas semillas lograrán germinar en condiciones *in situ*. Por lo que debe considerarse una estrategia de conservación y manejo sobre la especie, así como el uso de herramientas biotecnológicas, ya que esto permitirá la permanencia de la Orquídea *R. cervantesii* en esta zona de estudio, puesto que, la organización eficiente de programas de reintroducción, conservación y manejo de orquídeas en la naturaleza requiere del conocimiento detallado de las estrategias reproductivas de estas especies en su hábitat natural (Clements *et al.*, 1986; Pereira *et al.*, 2003).

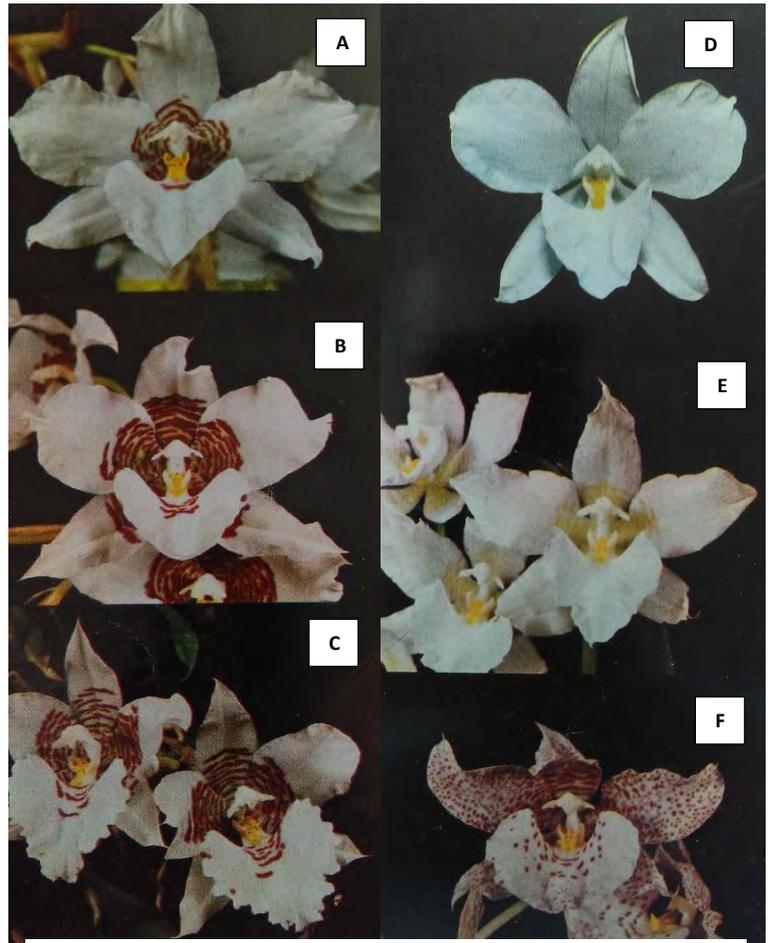


Figura 142. Variedades florales en *R. cervantesii*; A) "alba", B) "semi-alba", C) "punctatissimum", D) "típico", E) "membranaceum", F) "decorum".
Fotos: Hågsater; tomado de Aguirre-León (1977).

La viabilidad de las semillas en la especie *R. cervantesii* fue alta, de acuerdo con las evaluaciones de viabilidad realizadas (79% y 75%), puesto que se trataba de germoplasma recién colectado. Se menciona que las semillas de orquídea pueden permanecer viables por largos periodos de tiempo, si son almacenadas a una temperatura de entre 4-8°C, (Arditti, 1992). Sin embargo, las semillas de *R. cervantesii*, son la excepción, ya que después de un periodo de siete meses la viabilidad disminuyó 39% (de 79% paso a 40%), aun cuando se conservaron bajo las condiciones antes mencionadas; sin embargo, puede considerarse que están en un rango normal de conservación, pues como lo menciona Arditti (1967), la longevidad de las semillas de orquídeas es altamente variable. Ya que algunas pueden perder su viabilidad en tan solo nueve meses, algunas otras en solo dos meses o menos si se mantienen en condiciones ambientales (Humphreys, 1960; Brummitt, 1962; Hey, 1963; citado por Suarez-Quijada, 2006).

Habitualmente, cuando se evalúan las condiciones de germinación es importante tener en cuenta la viabilidad de las semillas en estudio, lo que permite brindar un estimado de la proporción de semillas que no germinará, como consecuencia de condiciones desfavorables causadas por la falta de viabilidad (Muñoz & Jiménez, 2008). Además, los medios de cultivo para germinación asimbiótica son ricos en azúcares y nutrientes, y en ocasiones, las plántulas tardan meses para establecerse. Esta combinación pone las plántulas susceptibles a la contaminación fúngica (Otero & Bayman, 2009), tal como ocurrió en la primera siembra experimental de esta investigación, pues se trataba de semillas fuera de la cápsula.

Hay que tener siempre presente que la respuesta de las semillas a las condiciones *in vitro* será muy diferente a la respuesta a las condiciones naturales. En la naturaleza, las orquídeas epífitas viven en condiciones muy deficientes de nutrimentos y los medios de cultivo tendrán una concentración muy por arriba de las concentraciones encontradas en el medio natural (Damon, *et al*, 2004). Por lo que es importante conocer dichas interacciones en su ambiente natural, pues como lo menciona Frei (1973, citado por Damon, *et al*, 2004), la situación en la naturaleza es muy compleja y poco estudiada e involucra muchos factores ambientales y, además de los hongos micorrízicos, posiblemente se ven implicados otros organismos más, como los líquenes y musgos; es por ello que hay que interpretar dichas interacciones, para sugerir el medio artificial adecuado para la germinación en condiciones *in vitro*.

El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) ha sido probado en la germinación y crecimiento de muchas especies de orquídeas con resultados óptimos gracias a su contenido de sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, lo que brinda un alto grado de nitrógeno y potasio, necesarios para la nutrición. Muchas investigaciones recurren a este medio de cultivo para obtener buenos resultados (Salazar-Rojas & Mata, 2003; Mahbubur-Rahman *et al*. 2005; Manrique *et al*. 2005; Ávila & Salgado-Garciglia, 2006; Pedroza-Manrique & Mican-Gutierrez, 2006; Tinoco & Mata, 2007; Flores-Escobar *et al*, 2008; Francisco-Nava, 2008; Sorace *et al*. 2008; Flores-Escobar *et al*. 2011; Muñoz-Barrionuevo, 2011; Pazmiño, 2011; Paredes-Sandoval, 2012; Paiva-Neto *et al*, 2013). Se debe mencionar que el cultivo *in vitro* de semillas de orquídeas es favorecido con la adición de suplementos orgánicos (Flores-Escobar *et al*, 2011; Salazar-Mercado & Cancino, 2012) y fitohormonas (Salgado-Garciglia, *et al*, 2012) al medio de cultivo (Malgren, 2006; Arditti, 2008; Pedroza, 2009; Cancino y Salazar, 2011, citado por Salazar-Mercado, 2012). Es por ello que se tomó la decisión de usar este medio nutritivo para la especie *R. cervantesii*, dada su efectividad y uso frecuente para otros géneros de orquídeas.

Sin embargo, cabe resaltar que la germinación no solo es influenciada por el medio de cultivo, sino también por la madurez y calidad de las semillas (Lo *et al*, 2004; Yam y Arditti, 2009, citado por Salazar-Mercado, 2012). Por lo que, en la siembra realizada en 2014, el porcentaje de germinación disminuyó, dado que se trabajó con semillas con baja viabilidad; lo cual se refleja en los resultados obtenidos. De igual manera, la frecuencia de subcultivos, promueve un mayor índice de contaminación y una mayor pérdida de germoplasma empleado *in vitro*, dado el diminuto tamaño de las semillas de orquídeas, tal como ocurrió en la tercera siembra de esta investigación; si bien, es sugerido realizar subcultivos a medio fresco cada 40-45 días, para la especie *R. cervantesii* estos deben realizarse después de la formación de protocormos.

Los métodos de cultivo *in vitro* son utilizados con éxito para la conservación y propagación de especies de orquídeas en peligro de extinción y de importancia medicinal (Deb y Pongener, 2011; Stewart y Kane, 2006; Lo *et al.*, 2004 citado por Salazar-Mercado, 2012); y considerando que *R. cervantesii* es una especie en estatus de amenaza (NOM-059-SEMARNAT-2010) se debe experimentar la combinación de nutrientes en condiciones estériles (Arditti 1992). Sólo cuando estos métodos fallan, los orquicultores retoman las técnicas de germinación de semillas usando los simbiontes naturales (Bernard 1899 citado por Otero & Bayman, 2009). Por otra parte, encontrar antecedentes en la literatura sobre los resultados de intentos previos para propagar cada especie de orquídea en diferentes medios de cultivo es mínimo; sin embargo, existe información sobre algunas especies de valor comercial. La única opción ha sido aplicar métodos reportados en la literatura para la propagación de especies de orquídeas del mismo género, aun cuando se sabe que las diferencias entre especies puedan ser marcadas (Damon *et al.*, 2004); tal como se realizó en este estudio, ya que existe poca información sobre la germinación y desarrollo del género *Rhynchostele* y, la que se encuentra disponible, suele ser incompleta o dada a conocer de manera verbal sin resultados contrastantes.

La adición de reguladores del crecimiento vegetal al medio de cultivo, en algunos casos promueve la mayor proliferación de tejidos o acorta el tiempo de germinación en algunas especies de orquídeas, en este estudio la adición de auxinas, citocininas y giberelinas se llevó a cabo con la finalidad de reducir el tiempo de germinación y desarrollo de la especie *R. cervantesii*. Salgado-Garciglia y colaboradores (2012), realizaron la adición de estos tres reguladores (ANA, BA y GA₃) para el desarrollo, la multiplicación de protocormos y la regeneración de plántulas utilizando diversas concentraciones y combinaciones para cada caso; obteniendo la germinación entre los 30 y 60 días, al igual que en esta investigación; sin embargo, cabe resaltar que el medio de cultivo empleado es el MS en una concentración distinta de sales basales (50% y no al 100% como lo reporta esta investigación) y adicionado con 0.1 mgL⁻¹ AG3 + 1 mgL⁻¹ ANA + 0.1 mgL⁻¹ K. Pues se menciona que la respuesta a los reguladores de crecimiento vegetal dependerá a su vez de la composición mineral y orgánica del medio de cultivo (Suarez-Quijada, 2006). Del mismo modo debe influir la adición de carbón activado pues como lo menciona Rodríguez y colaboradores (2007) el carbón activado también puede adsorber las hormonas vegetales y las vitaminas, lo que explica por qué en ocasiones puede ser inhibidor del crecimiento.

Sin embargo, la adición al medio de cultivo de carbón activado es un método que ha sido empleado por una gran cantidad de autores (Thompson, 1980; Singh, 1993; George, 1996; Pérez, 1998; Tisserat y Jones, 1999; Yang *et al.*, 1999; McKendrick, 2000 citado por Rodríguez *et al.*, 2007) y se ha demostrado que influye positivamente en la germinación y el crecimiento de las orquídeas sobre todo de aquellas que son propensas a la fenolización. Además, las auxinas y citocininas son los reguladores más importantes (fig. 143), pues promueven el crecimiento y la morfogénesis en el cultivo de órganos y tejidos (George & Sherrington, 1984, citado por Suarez-Quijada, 2006).

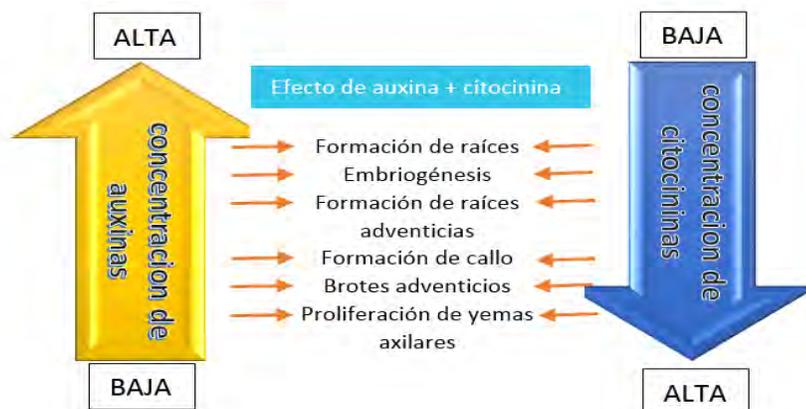


Figura 143. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas que generalmente son requeridas durante la morfogénesis *in vitro*. Modificado de Suarez-Quijada, 2006.

Además, cabe resaltar que se aprecia un alto número de germinación en el tratamiento que no contiene reguladores de crecimiento vegetal, en la tercera siembra de esta investigación, esto se debe a que el medio de cultivo contiene 20 gL^{-1} de pulpa de plátano, ya que en algunas especies de orquídeas, se ha observado que, la adición de complejos orgánicos como: el extracto de plátano, el agua de coco y de sustancias como el carbón activado al medio, mejoran la germinación de las semillas, así como el crecimiento y desarrollo de las plántulas formadas *in vitro* (Arditti y Ernst 1984; Butcher y Marlow, 1989; Rubluo *et al*, 1989, Kerbauy, 1991; Flores-Escobar *et al*, 2011; Salazar-Mercado & Cancino, 2012).

El Índice de Desarrollo (ID) es un indicador que refleja el estadio ontogénico de los embriones durante el proceso de germinación de las semillas, se calcula con la sumatoria de los porcentajes obtenidos a partir del número de individuos registrados en cada estadio ontogénico entre el total de individuos en la muestra y multiplicado por el valor del estadio ontogénico (Rodríguez-Farfán, 2013), el ID es reportado por primera vez por Harrison & Arditti (1978) para la especie *Guarianthe aurantiaca* (fig. 145), otros estudios reportan el ID, el cual se encuentra entre los valores de 100 a 400 para orquídeas de las especies *Laelia speciosa* (fig. 146), *Epidendrum radicans* (fig. 147) y *Barkeria uniflora* (fig. 148) (Velázquez-Vergara, 1997; Neyra & Rosas, 1998; Buentello & Sanchez, 1998; Cortes-Sánchez, 2006; Rodríguez-Farfán, 2013; Duarte, 2014), coincidiendo con lo obtenido en esta investigación. Este ID aporta conocimiento sobre el desarrollo de la especie *R. cervantesii*, en condiciones *in vitro*.



Figura 144. *Guarianthe aurantiaca*



Figura 146. *Epidendrum radicans*

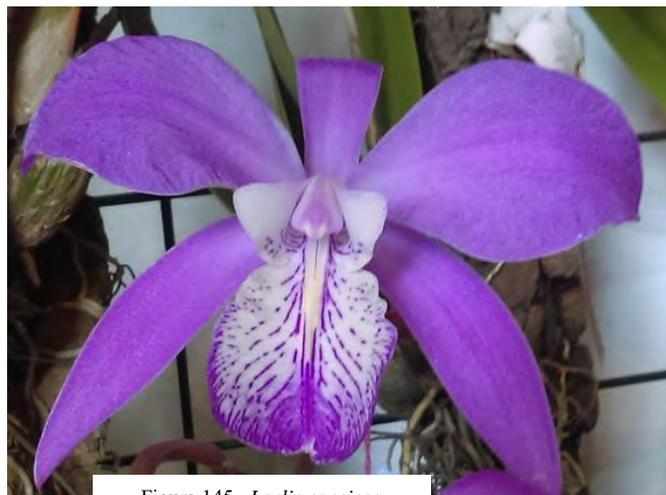


Figura 145. *Laelia speciosa*

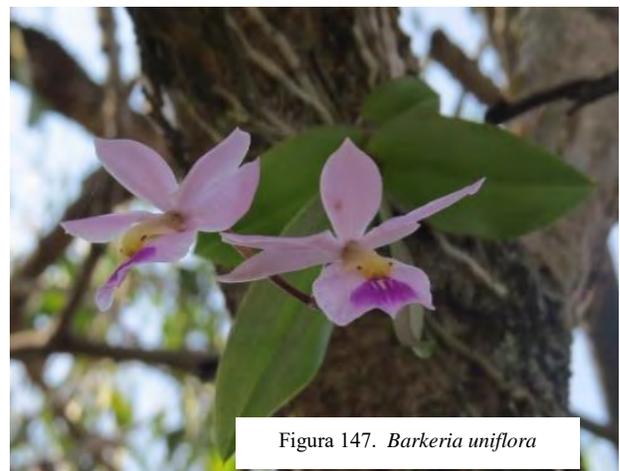


Figura 147. *Barkeria uniflora*

Al comparar los resultados obtenidos por Salgado-Garciglia y colaboradores (2012), para inducir el desarrollo, se puede notar que la proporción empleada de los reguladores de crecimiento es similar en ambas investigaciones; ellos muestran (fig. 48) que esta respuesta se induce, en la especie *R. cervantesii*, al utilizar siempre una mayor concentración de citocinina (BA) que de auxina (ANA) y giberelina (GA₃).

Medio de cultivo (MS, ANA/BA/GA ₃ mg/l)			
Orquídea	Desarrollo	Multiplicación de protocormos	Regeneración de plántulas
<i>R. cervantesii</i>	0/0.5/0	0.1/0.5/0.1	0.1/0.1/0.1

Figura 148. Reguladores de crecimiento vegetal sugerido para la especie *R. cervantesii*. Fragmento, tomado de Salgado-Garciglia *et al.* 2012

En la presente investigación, la adición de reguladores de crecimiento vegetal en proporción 0.1 mgL⁻¹ AG3 + 0.5 mgL⁻¹ K + 0 mgL⁻¹ ANA y 0.1 mgL⁻¹ AG3 + 0.5 mgL⁻¹ K + 0.1 mgL⁻¹ ANA, promueve la formación de estadios de desarrollo más avanzados; al igual que, si se emplea la misma concentración de citocinina (K) y de auxina (ANA) (0.1 mgL⁻¹ AG3 + 1 mgL⁻¹ K + 1 mgL⁻¹ ANA). Y como se menciona, algunos reguladores del crecimiento pueden funcionar solamente (o parcialmente) con la presencia de auxinas o en otros casos pueden no ser activos. La investigación realizada por Jankiewicz & Acosta-Zamudio (2003) acerca de la influencia de las citocininas y las giberelinas sobre la actividad del cambium en plantas jóvenes de manzano en estado de latencia muestran que la giberelina sola, es muy poco activa y bajo su influencia el cambium que está formando solamente por el parénquima del xilema sin vasos y traqueidas. En cambio, cuando se suplementa auxina con citocinina, o auxina con giberelina o auxina, citocinina y giberelina, la actividad del cambium es activado fuertemente, y el xilema que se forma es casi normal. Manrique y colaboradores (2005) y Coello y colaboradores (2010) encontraron que el AG₃ puede acelerar la germinación y el crecimiento de las orquídeas. Mientras que las auxinas pueden inducir la formación de raíces y las citocininas se han empleado en orquídeas principalmente para mantener cultivos de tejidos vegetales, mejorar la producción de plántulas a partir de tejido calloso, inducir la floración e incrementar el número de brotes laterales (Arditti, 1992). Existen diversos reportes en los cuales se ha logrado acelerar el desarrollo de algunas especies adicionando bajas concentraciones de auxinas, en ellos se logra la formación de PLB's (Protocorm-Like Bodies) principalmente (Kerbaui, 1991; Kubota & Toyoki, 1991; Abu *et al.*, 2005; Tirado *et al.*, 2005; Suarez-Quijada *et al.*, 2007; Pedroza, 2009; Nambiar *et al.*, 2012)

La descripción ontogénica se realiza completa por primera vez, para esta especie, en condiciones *in vitro*. Habitualmente los estudios *in vitro* muestran las fases de desarrollo final o inicial o la aparición de PLB's en un determinado tiempo para diferentes especies (Oliva & Arditti, 1984; Lee & Lee, 2003; Park *et al.*, 2003; Shimura & Koda, 2004; Kauth *et al.*, 2006; Vandrame *et al.*, 2007; Billard *et al.*, 2014); para la especie *R. cervantesii* se determinó el tiempo en el que aparece cada estadio y se realizó la descripción de cada uno, basados en el propuesto por Seaton y Ramsay (2005), coincidiendo en todos los estadios. Según Ishii y colaboradores (1998), los protocormos son un órgano único en las orquídeas y son la primera estructura que se forma durante el desarrollo del embrión de las semillas. Posterior a ello, aparecen las primeras hojas y finalmente las raíces. La formación de pseudobulbos en las plántulas obtenidas, resulta una respuesta favorable para su posterior sobrevivencia en condiciones *ex vitro*, debido a que estas estructuras permiten el almacenamiento de nutrientes y agua y por consiguiente pueden soportar mayores condiciones de sequía (Suarez-Quijada, 2006); esto se logró en la propagación *in vitro* de *R. cervantesii* (fig. 149).



Figura 149. *R. cervantesii* en condiciones *in vitro*.

SUBSTANCIAS QUÍMICAS	PROTOCOLO DE DESINFESTACIÓN			
	I	II	III	IV
Jabón Líquido (fuera de cámara) Inmersión	50ml/l por 30 minutos			
Tween [®]20 (fuera de cámara) Inmersión	5ml/l por 10 minutos	10ml/l por 15 minutos	10ml/l por 15 minutos	15ml/l por 20 minutos
NaOCl (fuera de cámara) Inmersión	5ml/l por 10 minutos	10ml/l por 5 minutos	5ml/l por 5 minutos	-----
Captan [®]80%DF (fuera de cámara) Inmersión	-----	1g/l por 5 minutos	1g/l por 5 minutos	1g/l por 5 minutos
Alcohol 70° (dentro de cámara) Inmersión	1 minuto	1 minuto	1 minuto	1 minuto
Peróxido de hidrógeno (dentro de cámara) Inmersión	-----	-----	-----	1 minuto
Lavados con agua destilada estéril (dentro de cámara) Enjuague	2 lavados de 2 minutos cada uno	2 lavados de 2 minutos cada uno	2 lavados de 2 minutos cada uno	3 lavados de 2 minutos cada uno

Figura 150. Protocolo de desinfestación empleado para segmentos nodales de *Epidendrum* sp. (Fragmento). Tomado de Placencia-Carrera, 2010.

uso de técnicas de desinfestación. Los desinfestantes más utilizados en este tipo de cultivos además del etanol, son el hipoclorito de calcio, el peróxido de hidrogeno y el cloruro de mercurio, los dos primeros se emplean en concentraciones de 1 a 3 %, en tiempos de 10 a 20 minutos, el etanol se utiliza de 1 a 2 minutos y generalmente al 70% y en combinación con otros desinfestantes, mientras que el cloruro de mercurio se emplea en dosis bajas de 0.1% en tiempos de 1 a 3 minutos por su toxicidad (Dodds & Roberts, 1995; Jiménez, 1998 citado por Suarez-Quijada, 2006).

Placencia-Carrera (2010) plantea un protocolo de desinfestación para segmentos nodales de la orquídea *Epidendrum* sp. (fig. 150), el cual muestra ser efectivo en la mayoría de sus tratamientos, a diferencia de lo obtenido en esta investigación, pues *R. cervantesii* no presenta el mismo tipo de crecimiento y los tejidos son más delicados, por lo que emplear más de un desinfestante puede resultar nocivo para esta especie, ya que al exponer los tejidos de hoja en etanol en un tiempo prolongado (más de 30 minutos), este tejido comenzaba a adelgazarse y fragmentarse.

Se sugiere realizar un cultivo a partir de material generado en condiciones *in vitro* o, bien cultivar la especie por un periodo aproximado de un año con la aplicación de fungicidas sistémicos periódicos; sin embargo, no se conoce cuál sería la respuesta a este cultivo ya que se menciona que la especie *R. cervantesii* no resiste las condiciones de cultivo en invernadero más de dos años y las plantas llegan a perecer (Com. Pers. Jiménez-Machorro, R. 2013).

La propagación asexual en condiciones *in vitro* es una técnica empleada para la obtención de clones que ayuden a conservar una variedad o un atributo de algunas especies en particular; sin embargo, con esta práctica se pierde la variabilidad genética de los individuos, lo que provoca no poder integrar estas nuevas plantas al medio ambiente; en ocasiones el explante empleado proviene de un cultivo *in vitro* realizado a partir de semillas, raíces, segmentos de protocormos, hojas, yemas florales, polen, entre otras partes de la planta, por lo que el éxito en la regeneración de plántulas es amplio; sin embargo, cuando se busca realizar esta práctica con segmentos de una planta que se encuentra en condiciones ambientales, las probabilidades disminuyen drásticamente, tal como ocurrió con la orquídea *R. cervantesii* pues el tejido empleado presentó una alta contaminación en cultivo *in vitro*, a pesar del



10.- CONCLUSIONES



In situ

- * Setenta y cuatro forofitos hospedan a la orquídea *Rhynchostele cervantesii* dentro de las 4 Ha muestreadas del Parque Nacional El Tepozteco.
- * La orquídea *R. cervantesii* carece de una especificidad de forofito, la hospedan especies como *Clethra mexicana*, *Comarostaphylis discolor*, *Monnina ciliolata*, *Buddleia perfoliata*, *Buddleia parviflora* entre otros.
- * Los forofitos que albergan a *R. cervantesii* presentan gran diversidad en los parámetros de altura y DAP.
- * Los individuos coloniales, que conforman la población de *R. cervantesii*, presentan una heterogeneidad de estadios de desarrollo (plántula, juvenil, adulta), de altura y superficie ocupada sobre el forofito.
- * *R. cervantesii* se ubica en el forofito principalmente sobre el tronco, secundariamente sobre las ramas y escasamente en las horquetas.
- * Esta especie se orienta cardinalmente a cualquier punto pero principalmente hacia el NO y NE.
- * El estadio de protocormo y plántula con reminiscencia del protocormo se observa por primera vez *in situ* y se registra fotográficamente
- * La vegetación que comparte, se asocia o compite con la especie *Rhynchostele cervantesii* en el forofito pertenecen a líquenes, musgos, helechos, bromelias, crasuláceas y otras especies de orquídeas. Las cactáceas y agaváceas solo lo comparten.
- * Existe una sincronía floral en la población, 239 individuos en floración, del cuadrante “H” muestreado. Sin embargo, es escasa la generación de cápsulas para la regeneración de la población.

In vitro

- * La viabilidad de las semillas al momento de la apertura de las cápsulas colectadas de *R. cervantesii* es alta (79%) y después de siete meses de ser almacenadas en refrigeración, para su conservación, la viabilidad baja considerablemente (40%).
- * A mayor tiempo de almacenamiento de las semillas, aun bajo condiciones de refrigeración, menor es el porcentaje de viabilidad; esta especie no podría almacenarse a largo plazo (no más de dos años), en bancos de semillas.
- * El proceso de germinación asimbiótico *in vitro* de las semillas de *R. cervantesii* se inicia a los 30 días y alcanza su máximo porcentaje entre los 90 y 120 días de cultivo en el medio MS modificado.
- * La germinación de la especie *R. cervantesii* *in vitro* se induce un 50% cuando las semillas presentan alta viabilidad en el medio de cultivo MS modificado y adicionado con 0.1 mgL⁻¹ AG3 + 1 mgL⁻¹ ANA + 0.1 mgL⁻¹ K sin subcultivos; y cuando las semillas presentan baja viabilidad se induce el 25% de la germinación, en el mismo medio de cultivo y adicionado con 0.1 mgL⁻¹ AG3, 0.5 mgL⁻¹ K, 0, y 0.1 mgL⁻¹ ANA sin subcultivos.
- * La germinación de las semillas se induce en un 58% si presentan alta viabilidad; sin o con la exposición a los reguladores del crecimiento vegetal durante 40 días y subcultivos a medio MS modificado sin reguladores.
- * El porcentaje de germinación es directamente proporcional al porcentaje de viabilidad que presenten las semillas de *R. cervantesii*
- * Se describen nueve estadios del desarrollo ontogénico en condiciones *in vitro*, para la especie *R. cervantesii* que culminan a los 520 días con el desarrollo de plántulas completas.
- * La propagación asexual bajo condiciones *in vitro* a través de inóculos de hoja no fue exitosa a causa de la alta contaminación y oxidación del tejido.
- * Se establece un protocolo de manejo para el cultivo *in vitro* de semillas de *R. cervantesii*.



11.- BIBLIOGRAFIA



- ☞ A.A.O. Asociación Altaverapacense de Orquideología. (1993). Las orquídeas, guía práctica para su cultivo. 2da edición, Cobán, Altaverapaz, Guatemala.
- ☞ Abdelnour-Esquivel, A. (1994). Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. (en línea) disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/REPDO/A6525E/A6525E.PDF> (2015, Julio).
- ☞ Abu, R. Md., Rahman M., Obaidul M., Azad-ud-doula A., Ichihashi S. (2005). Effects of Carbohydrates on callus growth and callus derived plantlet regeneration in *Doritaenopsis* Orchid. *Biotechnology* 4 (2): 126-131.
- ☞ Acebey, A. y Krömer, T. (2001). Diversidad y distribución vertical de epífitas en los alrededores del campamento río Eslabón y de la laguna Chalalan, Parque Nacional Madidi, Dpto. La Paz, Bolivia. *Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica* 3(1/2): 104-123.
- ☞ Aguirre-León, E. (1992). Vascular epiphytes of México: a preliminar inventory. *Selbyana* 13: 72-76.
- ☞ Aguirre-León, E. (1977). *Odontoglossum cervantesii*. *Orquídea Méx.* Vol. 6 No. 10: 295-307.
- ☞ Annaselvam, J. y Parthasarathy, N. (2000). Diversity and distribution of herbaceous vascular epiphytes in a tropical evergreen forest at Varagalaiar, Western Ghats, India. *Biodiversity and conservation* 10: 317-329.
- ☞ Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33: 1-82.
- ☞ Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- ☞ Arditti, J. & Ernst, R. (1984). Physiology of germinating orchid seeds. pp. 177-222. In: Arditti, J. (ed.). *Orchid biology: Reviews and perspectives, III*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- ☞ Arditti, J. y Ernst, R. (1993). *Micropropagation of Orchids*. Ed John Wiley and sons, Inc. New York. USA.
- ☞ Ávila D., I y Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas* No. 8: 138-149
- ☞ Barba-Álvarez, A. (1987). Reguladores del crecimiento vegetal. Compilado de Hurtado, D.; Merino, M. (1987). *Cultivo de tejidos vegetales*. México, Trillas.
- ☞ Barba-Álvarez, A., Luna-Rosales, B. S. y Romero-Arredondo, J. (2001). *Micropropagación de plantas*. Trillas. México. D.F.
- ☞ Batty A.L., Dixon K.W., Brundett M. y Sivasithamparam K. (2002). *Orchid conservation and mycorrhizal associations*. Microorganism in plant conservation and biodiversity. Kluwer Academic Publishers.
- ☞ Bellone, R. (2006). *Orquídeas. Guía del aficionado*. Ediciones Omega, Barcelona, España.
- ☞ Benavides, A.M., A.J. Duque, J.F. Duivenvoorden, A. Vasco y R. Callejas. 2005. A first quantitative census of vascular epiphytes in rain forests of Colombian Amazonia. *Biodiv. Conserv.* 14: 739-758.
- ☞ Bertolini V., Damon A., Valle Mora J., Rojas Velázquez A. N. (2013). Influencias de tres niveles de agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rhynchostele bictoniensis* (Bateman) Soto-Arenas & Salazar, en medio de cultivo Knudson C. *LANKESTERIANA* 13(1-2), Agosto 2013. Universidad de Costa Rica.
- ☞ Bertolini V., Damon A., Rojas Velázquez A. N. (2014). Quelato de hierro y agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). (en línea) Disponible en: http://www.researchgate.net/profile/Anne_Damon/publication/272168261_Quelato_de_hierro_y_agua_de_coco_en_la_germinacin_in_vitro_de_Rossioglossum_grande_%28Orchidaceae%29/links/54dd02620cf28a3d93f88a36.pdf (2015, Enero).
- ☞ Billard, C. E., Barsanti, M. V. y Lallana, V. H. (2014). Cultivo *in vitro* y aclimatación de plantas de *Polystachya concreta* (Orchidaceae). *Rev. FABICIB* vol. 18: 95 a 106.

- ☞ Buentello V., B. y Sánchez H., S. G. (1998). Efecto del estímulo por sacarosa y manitol al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) schltr. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- ☞ Butcher, D. y Marlow, S. A. (1989). Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. pp. 8-13. In: Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management (H. W. Pritchard, ed.). Cambridge Univ. Press.
- ☞ Cameron, K.M. y M.W. Chase. (1999). "Nuclear 18S rDNA sequences of Orchidaceae confirm the subfamilial status and circumscription of Vanilloideae". En: K.L Wilson y D.A Morrison (eds.). Monocots: Systematic and Evolution. CSIRO Press, Melbourne, Australia. pp. 457-464.
- ☞ Chase M.W., Cameron K.M., Freudenstein J.V., Pridgeon A.M., Salazar G., Van Den Berg C., Schuiteman A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society, 2015, 177, 151-174.
- ☞ Chase, M.W.; M.R. Duvall; H.G Hills; J.G. Conson; A.V. Cox; L.E. Eguiarte; J.T. Hortwall; M.F. Fay; R.L. Caddick; K.M. Cameron y S. Hoot. (1995). "Molecular phylogenetics of Liliaceae". En: P.J. Rudall; P.J. Cribb; D.F. Cutler y C.J. Humphries (eds.). Monocotyledons: Systematics and Evolution. Royal Botanic Gardens, Kew. England. pp. 109-137.
- ☞ Chávez H. K., Mosquera-Espinosa A. T., Otero Ospina J. T. (2015). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. (en línea). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976> (2015, febrero).
- ☞ Chen, T. Y., Chen J. T., Chang, W. C. (2002). Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38:595-597.
- ☞ Clements, M. A.; Muir, H. & Cribb, P. J. (1986). A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bull.*, 41:437-445.
- ☞ Coello, C.; Miceli, C.; Orantes, C.; Dendooven, L.; y Gutiérrez, A. (2010). Plant growth regulators optimization for in vitro cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W. E. Higgins. *Gayana Bot.* 67(1):19 - 26.
- ☞ CONAFOR. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. México. (en línea) Disponible en: http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF. (2014, septiembre).
- ☞ CONANP (2008). Anteproyecto. Programa de manejo. Parque Nacional el Tepozteco. (en línea). Disponible en: <http://www.conanp.gob.mx/anp/consulta/Anteproyecto16may08.pdf> (2014, noviembre).
- ☞ CONANP (2012). Áreas naturales protegidas. (en línea). Disponible en: <http://www.conanp.gob.mx/> (2012, diciembre).
- ☞ CONANP (2015). Áreas naturales protegidas. (en línea). Disponible en: <http://www.conanp.gob.mx/regionales/> (2015, julio).
- ☞ Cortes-Sánchez, C. X. (2006). Efecto del estímulo por fructuosa durante el proceso de germinación de semillas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) schltr. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- ☞ Cribb, P. J., Keel, S. P., Dixon, K. W. y Barrett R. L. (2003). *Orchid conservation a global perspective*. Orchid conservation. Natural History Publications (Borneo) Kota Kinabalu, Sabah.
- ✓ Corredor Biológico Chichinautzin (2012). http://chichinautzin.conanp.gob.mx/donde_estamos/mapa_cobio.htm

- ☞ Cuéllar-Araújo, N. (2008). Ecología de epifitas vasculares en dos formaciones vegetales de la reserva ecológica Siboney-juticí, Santiago de Cuba. Tesis en opción al Título de Maestro en Ciencias Botánicas, Mención Sistemática de Plantas Superiores, Ciudad de la Habana, Cuba. (en línea). Disponible en: ftp://169.158.189.34/pub/PROYECTOS/Cambio%20Climatico/tesis/Tesis%20de%20Maestr%C3%ADa%20Nilia%20Cu%C3%A9llar_UO.pdf (2016, enero).
- ☞ Cuello, N.L. (1998). A review of sampling procedures for the study of vascular epiphytic species diversity in Neotropical montane forests. Herbario Universitario PORT, Programa de Recursos Naturales Renovables, UNELLEZ-Guanare, Venezuela. 11 p.
- ☞ Cueto Mujica, F., (2006). Los Parques Nacionales en México y Canadá: Una Visión General, Revista Mexicana de estudios Canadienses (nueva época), número 012, otoño-invierno, Culiacán, México, p.p.75-88.
- ☞ Cruz-Higareda, J.B. (2014). Desarrollo de una trampa in situ para el aislamiento micorrízicos de una orquídea epífita del Parque Nacional el Tepozteco. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- ☞ Cruz-Higareda, J. B. Luna-Rosales B. S., Barba-Álvarez A. (2015). A novel seed baiting technique for the epiphytic orchid *Rhynchostele cervantesii*, a means to acquire mycorrhizal fungi from protocorms. LANKESTERIANA 15(1): 67–76. Universidad de Costa Rica.
- ☞ Damon, A., Aguilar-Guerreo, E., Rivera, L., Nikolaeva, V. (2004). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 10(2): 195-203.
- ☞ Damon, A. (2006). Soconusco has a chance to rediscover and protect its disappearing orchids. IUCN. Orchid specialist group. Orchid conservation News 8: 6-13.
- ☞ Damon, A. (2010). El Rescate, la conservación y el cultivo de orquídeas: una alternativa más hacia el desarrollo de las comunidades rurales del Soconusco. Departamento de Conservación de la Biodiversidad ECOSUR, Tapachula, Chiapas.
- ☞ Dressler, R. L. y N. H. Williams. (1975). El Complejo *Oncidiglossum confusum*. Orquídea Méx. 4(11) p.p. 332-344.
- ☞ Dressler, R. L. (1993). Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland. Oregón.
- ☞ Dressler, R.L. y M.W. Chase. (1995). "Whence the orchids?" En: P.J. Rudall; P.J. Cribb; D.F. Cutler y C.J. Humphries (eds.). Monocotyledons: Systematics and Evolution, Royal Botanic Gardens, Kew. England. pp. 217-226.
- ☞ Duarte S., I. J. (2014). Germinación *in vitro* de *Barkeria uniflora* Lex. Dressler & Halbinger, una orquídea endémica de México. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- ☞ Engwald, S., Schmit-Neuerburg, V., Barthlott, W. (2000). Epiphytes in rain forests of Venezuela - diversity and dynamics of a biocenosis. En Breckle, S.W., B. Schweizer, U. Arndt (Eds.): Results of worldwide ecological studies. Proceedings of the 1st Symposium by the A.F.W Schimper Foundation - from H. and E. Walter - Hoheneim, Oktober 1998.- Stuttgart-Hohenheim, Verlag Günter Heimbach. 425-434 pp.
- ☞ Espejo-Serna, A. y López-Ferrari, A. R. (1998). Las monocotiledóneas mexicanas una sinopsis florística 1. Lista de referencia parte VII. Orchidaceae I. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Consejo Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México, D. F. 90 pp.
- ☞ Espejo-Serna, A., García Cruz, J., López Ferrari, A.R., Jiménez Machorro R., Sánchez Saldaña, L. (2002). Orquídeas del estado de Morelos, Herbario AMO, UAM-Iztapalapa, México, DF. pp. 264-265.

- ☞ Esquivel, A y Escalant, J. (1994). Conceptos básicos del Cultivo de tejidos Vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba.
- ☞ Flores-Escobar G., Legarías-Solano J. P., Gil-Vásquez I., Colinas-León M. T. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo Serie Horticultura 14(3): 347-353.
- ☞ Flores-Escobar G., Gil-Vásquez I., Colinas-León M.T., Mata-Rosas M. (2011). Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* BATEMAN ex. LINDL Revista Chapingo. Serie Horticultura, vol. 17, núm. 1, pp. 5-8, Universidad Autónoma Chapingo México.
- ☞ Flores-Palacios, A. y Valencia-Díaz, S. (2007). Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. Biological conservation 136(3): 372-387.
- ☞ Francisco-Nava, J. J. (2008). Propagación *in vitro* y establecimiento en invernadero de las orquídeas *Trichocentrum carthagenense* (Jacq.) Sw. y *Laelia ayermaniana* Rchb. para su conservación y aprovechamiento sustentable. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México.
- ☞ Frasco-Pérez, F. M. (2016). Diversidad y distribución vertical de epifitas vasculares en forofitos aislados de *Ceiba pentandra* (Malvaceae) en una selva mediana subcaducifolia del sur de México. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- ☞ García M. (2009) Las orquídeas del Estado de México. Secretaria de Medio Ambiente. Gobierno del Estado de México. Toluca. México.
- ☞ Granados-Sánchez, D., López-Ríos, G. F., Hernández-García, M. A., Sánchez-González, A. (2004). Ecología de las plantas epifitas. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 9(2): 101-111.
- ☞ Gomiz N. E., Torretta J.P. & Aliscioni S.S. (2014). *Zygostates alleniana* (Orchidaceae: Epidendroideae: Cymbidieae: Oncidiinae): estructura floral relacionada con la polinización. Anales del Jardín Botánico de Madrid 71(1).
- ☞ Grochowska M. y Mejía-Muñoz, J. M. (2003). Giberelinas. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas Propiedades y acción, trabajo colectivo bajo la redacción de Leszek S. Jankiewicz universidad autónoma de Chapingo departamento de fitotecnia instituto de horticultura ediciones mundiprensa México DF. Madrid Barcelona México.
- ☞ Hágsater E., M. Á. Soto Arenas, G. A. Salazar C., R. Jiménez M., M. A. López R. y R. L. Dressler. (2005). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín México, DF.
- ☞ Halbinger, F. (1971). El género *Odontoglossum* en México, Orquídea Méx. Vol. 1 No. 5 p.p. 3- 10.
- ☞ Halbinger, F. (1982). *Odontoglossum* y Géneros Afines en México y Centroamérica. Orquídea Méx. vol. 8 No.2 p.p. 155- 282.
- ☞ Halbinger, F. (1983). *Cymbyglossum*, *Ticoglossum* y *Rhynchostele*, Tres Géneros Derivados de *Odontoglossum* en México y Centroamérica. Orquídea Méx. Vol. 9 No 1 p.p. 1- 12.
- ☞ Halbinger, F. (1984) *Lemboglossum*, un nuevo nombre para el complejo *Odontoglossum cervantesii*. Orquídea Méx. Vol. 9 p.p. 347-350.
- ☞ Harrison, C. R. & Arditti, J. (1978). Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). Botanical Gazette, 138(1): 211-214.
- ☞ Hechavarria, L, Oviedo, R. y Holst, B. K. (2002). Epiphytic Angiosperms of Cuba. Selbyana 23 (2): 224-244.
- ☞ Hicks, J. (2000). Asymbiotic Technique of Orchid Seed Germination. Orchid Seedbank Project. United States of America.
- ☞ Hurtado, D.; Merino, M. (1987). Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas.

- ☞ Ibsch, P.L. (1996). Neotropische Epiphytendiversität–das Beispiel Bolivien. Archiv Naturwissenschaftlicher. Dissertationen, Band 1. Martina Galunder Verlag, Wiehl. 357 pp.
- ☞ Ibsch, P.L., Boegner, A., Nieder, J. y Barthlott, W. (1996). How diverse are Neotropical epiphytes? An analysis based on the Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Perú. *Ecotropica* 2: 13-28.
- ☞ Ingram, S.W., Ferrel-Ingram, K. y Nadkarni, N. M. (1996). Floristic composition of vascular epiphytes in a cloud forest, Monteverde, Costa Rica. *Selbyana* 17: 88-103.
- ☞ Imes R. (1997). Orquídeas, Breve guía de estudio e identificación. Zandrera Zariquiey S.A. Barcelona.
- ☞ Iriondo A., J. M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* Vol. 16(1).
- ☞ Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. & Tanaka, M. (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 17: 446-450.
- ☞ Jankiewicz, L.S. y Acosta-Zamudio, C. (2003). Auxinas. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas Propiedades y acción, trabajo colectivo bajo la redacción de Leszek S. Jankiewicz universidad autónoma de Chapingo departamento de fitotecnia instituto de horticultura ediciones mundi-prensa México DF. Madrid Barcelona México.
- ☞ Jiménez, M. R., S. L. Sánchez y J. García-Cruz. (1998). Familia Orchidaceae. Tribu Maxillarieae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 67: 83.
- ☞ Johansson, D. R. (1974). Ecology of vascular epiphytes in west african rain forest. *Acta Phytogeografica Suecica*. (en línea). disponible en: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:565496/FULLTEXT01.pdf> (2016, enero).
- ☞ Kauth, P. J., Vendrame, W. A. & Kane, M. E. (2006). In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 91-102
- ☞ Kerbauy, G. B. (1991). *In vitro* conversion of *Cattleya* root tip cell into protocorm-like bodies. *J. Plant Physiol.* 138: 248-251.
- ☞ Kew. (2013). *Rhynchostele cervantesii*. www.Apps.kew.org/wcsp/namedetail.do?name_id=137603.
- ☞ Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*. 73:1- 25.
- ☞ Kubota, C. & Toyoki, K. (1991). Effects of initial amount of sugar in the médium on the growth of *Cymbidium* PLB *in vitro*. *Hortscience* 26 (69).
- ☞ Lakshmanan P, Loh CS, Goh CJ (1995) An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid Aranda Deborah using thin section culture. *Plant Cell Reports*. 14: 510- 514
- ☞ Lapiner, J. M. (1973). Orquídeas michoacanas. Comisión forestal del estado de Michoacán (CFEM). Serie técnica. No. 4. 2da edición. Época. México.
- ☞ Lee, Y. y Lee, N. (2003). Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39: 475-479.
- ☞ Linares, E. L. (1999). Diversidad y Distribución de las epifitas vasculares en un gradiente altitudinal en San Francisco, Cundinamarca. *Rev. Acad. Colomb. Cienc: Vol. XXIII, suplemento especial.* (en línea). Disponible en: http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_23/supl/133-139.pdf (2016, febrero).
- ☞ Liparini P. O., Megumi Kasuya M. C., Lima Rollemberg C., Montandon Chaer G. (2005a). Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epifitas neotropicais no brasil. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:191-197.
- ☞ Liparini P. O., Megumi Kasuya M.C., Lima Rollemberg C., Chaer Borges A. (2005b). Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizotonióides. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:199-206.
- ☞ Luna-Rosales, B. S. y Barba-Álvarez, A. (1993). Estudio morfogénico de la semilla de *Laelia speciosa* (H.B.K.) SCHLTR durante su germinación asimbiótica *in vitro*. En V encuentro Latinoamericano de Orquideología. Octubre, 19-25 pp.

- ☞ Luna-Rosales, B. S. y Barba-Álvarez, A. (2011). Manual de procedimientos, Preparación del Medio de Cultivo Murashige y Skoog (MS) con Soluciones Concentradas de Sales Basales. Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV). FES Zaragoza.
- ☞ Luna-Rosales, B.S. y Barba-Álvarez, A. (2012). Manual de procedimientos, Esterilización en autoclave horizontal de material y equipo. Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV). FES Zaragoza.
- ☞ Luna-Rosales, B.S. y Barba-Álvarez, A. (2013). Manual de procedimientos, Evaluación de la viabilidad de semillas de orquídea. Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV). FES Zaragoza.
- ☞ Luna-Rosales, B.S. y Barba-Álvarez, A. (2013). Manual de procedimientos, Desinfestación de Material Biológico (Semillas y Capsulas). Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV). FES Zaragoza.
- ☞ Luna-Rosales, B.S. y Barba-Álvarez, A. (2013). Manual de procedimientos, Siembra *in vitro* en Flujo Laminar. Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV). FES Zaragoza.
- ☞ Mahbubur Rahman S.M., Shahidul Islam Md., Kumar Sen P., Begum F. (2005). *In vitro* propagation of *Oncidium taka*. Biotechnology 4(3): 225-229.
- ☞ Manrique, J.; Fernández, C.; y Suárez, A. (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Compantia falcata* seeds under *in vitro* conditions. Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 41: 838-843.
- ☞ Martin K. P. (2003) Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsa malabarica* (Reichb. F.) J.D. Hook., and endangered orchid. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 39: 322-326.
- ☞ Mcvaugh, R. 1985. Orchidaceae. Pp. 1-363, en: Anderson, W. R. (ed.). Flora Novo-Galiciana: a descriptive account of the vascular plants of Western México, vol. 16. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- ☞ McKendrick, S. (2000). Manual para la Germinación *in vitro* de Orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. (en línea). Disponible en: [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf) (2015, agosto).
- ☞ Menchaca G., R. A. y Moreno M., D. (2011). Conservación de Orquídeas una tarea de todos. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- ☞ Muñoz-Barrionuevo M. I. (2011). Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de las orquídeas *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* Rehb.F. Tesis de licenciatura. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.
- ☞ Muñoz, M. y Jiménez, V. (2008). Capsule development, *in vitro* germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium*, and *P. pearcei*. Lankesteriana 8(2): 23-31.
- ☞ Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- ☞ Murthy, H. N. y Pyati, A. N. (2001) Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro* Cell. Dev. Biol.- Plant 37:223-226, Marzo-Abril.
- ☞ Nabors, M.W. (2006). Introducción a la botánica. Pearson educación, S.A., Madrid, España.
- ☞ Nadkarni, N.M. y Ferrell-Ingram, K. (1992). A bibliography of biological literature on epiphytes: an update. Selbyana 13: 3-24.
- ☞ Nadkarni, N.M. (2000). Colonization of stripped branch surfaces by epiphytes in a lower montane cloud forest, Monteverde, Costa Rica, Biotropica 32:358-363.
- ☞ Nambiar N., Tee C. S., Maziah M. (2012). Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm like bodies in *Dendrobium* Alya Pink. Plant Omics Journal 5 (1): 10-18.
- ☞ Navarro U., S. y Vera E., R. (1987). Historia del cultivo de tejidos vegetales. Compilado de Hurtado, D.; Merino, M. (1987). Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas.

- ☞ Neyra M., M. C. y Rosas A., H. (1998). Efecto del estímulo por fructuosa y glucosa al inicio de la germinación de semillas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) schltr. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- ☞ NOM-059-SEMARNAT- 2010 de Protección al Medio Ambiente. (2010) (en línea) Disponible en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- ☞ Oliva, A. P. y Arditti, J. (1984). Seed germination of north american orchids. II Native california and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes*. Bot. Gaz. 145(4): 495-501.
- ☞ Ortega-Larrocea M. P., Martínez Palacios, A., Chávez Ávila V. M. (2009). Conservación y propagación de orquídeas. (en línea) Disponible en: http://www.repsa.unam.mx/documentos/Ortega-Larrocea_et_al_2009_conservacion_y_propagacion.pdf. (2014, 10 de septiembre).
- ☞ Otero J. T., Bayman P., y Ackerman J.D. (2003) Variación en germinación simbiótica entre semillas de *Tolumnia variegata* y entre hongos micorrízicos. LANKESTERIANA 7: 145. Universidad de Costa Rica.
- ☞ Otero J. T. y Bayman P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. Acta Agronómica. 58 (4) 2009, p 270-276.
- ☞ Paiva Netto V.B., Oliveira Campos G., Galdi Boaretto A., Rezende Zuffo M.C., Aguiar Torrezan M., Benetão J. (2013). *In vitro* behaviour of *Aspasia variegata*, an epiphytic orchid from the Brazilian Cerrado. *Ciencia Rural*, Santa Maria, 43(12):2178-2184.
- ☞ Paredes-Sandoval E. F. (2012). Determinación de protocolos para cultivo *in vitro* de las especies *Epidendrum schistochilum* y *Oncidium cultratum*. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana. Quito. Ecuador.
- ☞ Park, S. Y., Murthy H. N., Paek, K. Y. (2003). Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. Plant Science 164: 919-923.
- ☞ Paz-Salinas M. F. y Cuevas L. (2006) Las áreas naturales protegidas del norte de Morelos. Centro Regional de Investigaciones Multidisciplinarias, UNAM. Cuernavaca, Morelos, México.
- ☞ Pazmiño R. E. (2011). Caracterización morfológica de semillas y del proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para la conservación en el banco de germoplasma de la UTPL. Trabajo de graduación, modalidad Sistema Tutorial. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- ☞ Pedroza, J. 2009. The effect of activated charcoal, indol acetic acid (IAA) and benzylaminopurine (BAP) on *Epidendrum elongatum* Jacq protocormlike body (PLB) development *in vitro* conditions. Rev. Colomb. Biotecnol. 6(1):17 - 32.
- ☞ Pedroza-Manrique J. y Mican-Gutierrez Y., (2006). Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* RCHB.F. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 42: 543-547
- ☞ Pereira, O. L.; Rollemberg, C. L. & Kasuya, M. C. M. (2003). Association des mycorrhizies dans les orchidees, perspectives d'utilisation dans les programmes de propagation symbiotique. Orchidees, 55:24-27.
- ☞ Pezoa, A. (2001). Estrategias de Conservación de la Diversidad Biológica. Libro Rojo de la Flora Nativa y de los Sitios Prioritarios para su Conservación: Región de Coquimbo. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 18: 273-280.
- ☞ Philip, V. J. y Nainar, A. Z. (1988). Structural changes during the *in vitro* germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Ann. Bot. 61: 139-145.
- ☞ Pichardo R., A. M. (2011). Diversidad de la familia orchidaceae en las sierras Triqui-Mixteca del estado de Oaxaca. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- ☞ Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Versión española de Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.

- ☞ Pineda-Lemus U. (2008). Multiplicación *in vitro* de la orquídea *Cuitlauzina pendula* Lex. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán. (en línea). Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/13582427/multiplicacion-in-vitro-de-la-orquidea-cuitlauzina-pendula-lex> (2015, febrero).
- ☞ Placencia-Carrera, M. C. (2010). Efecto de dos fitohormonas en la fase de introducción de la orquídea *Epidendrum sp* bajo condiciones *in vitro*. Tesis de grado, Facultad de ingenierías en ciencias agropecuarias y ambientales, Universidad Técnica del Norte. (en línea). Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/144/2/03%20AGP%2097%20TESIS.pdf>. (2016, septiembre).
- ☞ Pulido-Esparza, V. A. (2004). Diagnóstico de la riqueza de especies y del nivel de endemismos de las monocotiledóneas del corredor biológico Chichinautzin. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.
- ☞ Pulido-Esparza, V. A., Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A. R. (2009). Monocotiledóneas nativas del Corredor Biológico Chichinautzin. *Acta Botánica Mexicana* 86:9-38.
- ☞ Rasmussen, F. N. (1999). "The development of orchid classification". En: A.M. Pridgeon; P. J. Cribb; M.W. Chase y F. N. Rasmussen (eds.). *Genera Orchidacearum Vol.1: General introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. pp. 3-12. Oxford University Press, Oxford.
- ☞ Richards, P. W. 1996. *The tropical rain forest an ecological study*. 2nd Ed. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- ☞ Rittershausen B. y Rittershausen W. (2010). *Orquídeas, Guía práctica completa*. Libsa. Alcobendas, Madrid.
- ☞ Rodd, T. y Bryant, G. (2009) *Guía de árboles y plantas de jardín*, ediciones Omega, Barcelona, España, pp. 852, 877.
- ☞ Rodríguez, L., González, R., Alvarado, K., Telles, E. (2007). Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres. *Biotecnología Vegetal* Vol. 7, No. 3: 139-142.
- ☞ Rodríguez-Farfán, A. B. (2013). Inducción de la germinación *in vitro* de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES-ZARAGOZA. México. 68 pp.
- ☞ Rubluo, A., Chávez, V., y Martínez, A. (1989). *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural hábitat. *Lindleyana* 4 (2): 68-73.
- ☞ Ruiz B., H. y Arellano M., J. (2015) *Instrumentos y estrategias. Áreas Naturales Protegidas*. (en línea). Disponible en: <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap8/05%20Areas%20naturales%20protegidas.pdf> (2015, Julio).
- ☞ Rzedowski, J. (1991). El endemismo de la flora fanerogámica mexicana: una apreciación analítica preliminar. *Acta Botánica Mexicana*, 15:47-64.
- ☞ Salazar G. (2009). *Orquídeas*. (en línea) Disponible en: http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salazar/orquideas_pedregal.pdf. (2014, 11 septiembre).
- ☞ Salazar-Casas, W., Rivera-Coto, G., y Corrales-Moreira, G. (2007). Comparación de los problemas fitosanitarios en orquídeas de poblaciones silvestres y de cultivo, como evaluación de riesgos de plagas o epidemias. *Lankesteriana* 7(1-2): 362-267.
- ☞ Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica*. 61 (1): 69-78.
- ☞ Salazar-Mercado, S. A. y Cancino, G. O. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV No. 1: 53-59

- ☞ Salazar-Rojas, V. M. y Mata R., M. (2003). Micropropagación y Conservación de orquídeas mexicanas en el Jardín Botánico Clavijero. *LANKESTERIANA* 7: 151-153. 2003.
- ☞ Salgado-Garciglia R., Hernández-García A., Ávila-Díaz I. (2012). Propagación y conservación de siete orquídeas mexicanas en riesgo de extinción. En: Conservación de Orquídeas en México. María de los Ángeles Aída Téllez Velazco (Compiladora y editora) UNAM. México, D.F. 155-159.
- ☞ Sanford, W. W. (1968). Distribution of epiphytic orchids in semideciduos tropical forest in Southern Nigeria. *J. Ecol.* 56: 697-705.
- ☞ Sarmiento, M. P. y Romero, C. G. (2000). Orquídeas mexicanas, Grupo Editorial Miguel Ángel Porrúa, México.
- ☞ Seaton P. y Ramsay M. (2005). *Growing Orchids from Seed*. Royal Botanic Gardens. Kew.
- ☞ SCO: Sociedad Colombina de Orquideología. (1965). Cultivo de orquídeas. Sociedad Colombina de Orquideología. Medellín. Colombia.
- ☞ Shimura, H. y Koda, Y. (2004). Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebutunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 273-276,
- ☞ Sorace M., Faria R.T., Damasceno C.V., Gomes G. P., Muñoz Barbosa C., Nesello Viera F. G., Lopes da Silva G. Assari Takahashi L. S., Schinitzer J.A. (2008). Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 29, n. 4, p. 775-782.
- ☞ Soto-Arenas, M. A. (1988). Listado actualizado de las orquídeas de Mexico. *Orquídea Méx.* Vol. 11 p.p. 233-277.
- ☞ Soto-Arenas, Miguel, A. Salazar, Gerardo y Rojas, Alicia (1993). Nomenclatural Changes in *Rhynchostele*, *Mesoglossum*, and *Lemboglossum* (ORCHIDACEAE, ONCIDIINAE) *Orquídea. Méx.* Vol. 13 No. 1 p.p. 145-152.
- ☞ Stancato G., Ferreira A. M., Cangiani F. A. (2008). Crescimento de Orquídeas Epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. Centro de Suelos y Recursos agroambientales, Instituto Agronomico, Campinas. Bragança Campinas Brasil. (en línea). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90867106> (2015, 20 Agosto).
- ☞ Suarez, O. G. (2004). Algunas Orquídeas de Oaxaca. Instituto Estatal de Ecología de Oaxaca. México.
- ☞ Suarez-Quijada, I. (2006). Regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Wither, (ORCHIDACEAE), especie endémica de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- ☞ Suarez-Quijada, I., Hernandez-Altamirano, M., Chávez-Ávila, V. M., Sandoval-Zapotitla, E., Martínez-Palacios, A. (2007). Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Wither (Orchidaceae). *LANKESTERIANA* 7 (1-2): 388-393.
- ☞ Tejeda-Sartorius, O. y Téllez-Velasco. M. A. A. (2015). El bosque mesófilo de montaña y sus orquídeas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- ☞ Téllez Velasco M. A. A. (2011). Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- ☞ Téllez Velasco, M. A. A. (2011a). Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. *UACH*. pp. 36-55, 104-119.
- ✓ Tillandsias (2010). Láminas botánicas de orquídeas. <https://tillandsias.wordpress.com/category/orquideas/page/2/>
- ☞ Tinoco J., M. S. & Mata R., M. (2007). adquisición de competencia para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleyaxesbetts* (ORCHIDACEAE). *LANKESTERIANA* 7(1-2): 404-418.

- ☞ Tirado, J. M., Naranjo, E. J., Atehortúa, L. (2005). Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA". Rev Colom de Biotec Vol. VII No. 1: 25-31.
- ☞ Todzia, C. (1986). Growth habit, host tree species, and density of hemiepiphytes on Barro Colorado, Panamá. Biotropica 18: 22-27.
- ☞ Vandrame, W. A., Carvalho, V. S. & Dias, J. M. M. (2007). *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. Scientia Horticultuae 114: 188-193.
- ☞ Vareschi, V. 1992. Ecología de la vegetación tropical (con especial atención a investigaciones en Venezuela). Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales. Rafalet, C. A. 484 pp.
- ☞ Vargas-Márquez, F. (1997). Parques Nacionales de México. Vols I y II. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAP, México.
- ☞ Vargas-Márquez, F., Escobar, S. (2000). Áreas Naturales protegidas de México con decretos federales (1899-2000). Instituto de Ecología-SEMARNAT, México, D.F.
- ☞ Vega G., A., López-García, J., Manzo D., L. L. (2008). Análisis espectral y visual de vegetación y uso del suelo con imágenes Landsat ETM+ con apoyo de fotografías aéreas digitales en el Corredor Biológico Chichinautzin, Morelos, México. Invest. Geog no. 67. México. (en línea). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-46112008000300005&script=sci_arttext (2015, Julio).
- ☞ Velasco, O., L. y Pino D., G. (2008). Orquídeas del parque natural sierra de grazalema. 2da edición. Consejería de medio ambiente. Junta de Andalucía. 270. (en línea) disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural._Uso_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpa/orquideas_grazalema/03_orquideas.pdf. (2015, febrero).
- ☞ Velázquez-Vergara, R. (1997). Efecto de sacarosa, glucosa y fructuosa sobre la germinación de las semillas, el desarrollo y el crecimiento de plántulas de *Laelia speciosa* (H.B.K.) schltr. cultivadas *in vitro*. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
- ☞ Vidalie H. (1976). Cultivo *in vitro*. Ed. Científica S. A. de C. V. México.
- ☞ Wolf, J.H.D. (1993). Epiphyte communities of tropical montane rainforests in the northern Andes. Phytocoenologia 22: 1-103.
- ☞ Zettler L. W., Sharma J., y Rasmussen, H. N. (2003). *Mycorrhizal diversity. Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo) Kota Kinabalu, Sabah.
- ☞ Zotz, G., Andrade, J. (2002). La ecología y fisiología de las epífitas y hemiepífitas. En: Ecología y conservación de bosques neotropicales. Editorial Libro universitario Regional. Costa Rica.



12.- ANEXOS



Anexo 12.1 Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (1962).

Componentes	Compuestos	mg/L ⁻¹
Macronutrientes	(NH ₄)NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
	CaCl ₂	440
Micronutrientes	MnSO ₄ * H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8.6
	H ₃ BO	6.2
	KI	0.83
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.025
	FeSO ₄ * 7H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA	37.3
Vitaminas	Tiamina	0.4
	Niacina	0.5
	Piridoxina	0.1
Inositol	Myo-inositol	100
Carbohidrato	Sacarosa	30000
Material de Soporte	Agar gel	5000

Anexo 12.2 Reguladores de crecimiento vegetal.

Regulador de crecimiento	Abreviación	Peso molecular	Solvente
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D	221.0	Etanol 95%
Ácido 3-indolacético	AIA	175.2	1N NaOH- Etanol 95%
Ácido 3-indolbutírico	AIB	203.2	1N NaOH- Etanol 95%
Ácido naftalenacético	ANA	186.2	1N NaOH- Etanol 95%
Adenina	A	189.1	H ₂ O
Sulfato de adenina	AS	404.4	H ₂ O
6-Bencilaminopurina	BAP	225.2	1N NaOH
2-isopenteniladenina	2-IP	203.3	1N NaOH
Kinetina	Kin	215.2	1N NaOH
Zeatina	Z	219.2	1N NaOH- Etanol 95%
Ácido giberélico	AG	346.4	Etanol
Ácido abscísico	ABA	264.3	1N NaOH

Preparación de solución Stock.

1. Cada regulador de crecimiento se prepara por separado.
2. Pese 10 mg del regulador de crecimiento a preparar en un vaso de precipitados de 10 ml y disolver con una o dos gotas del solvente específico y adicionar 5 ml de agua destilada. Ver cuadro anterior.
3. En un matraz aforado de 50 ml, agregue 25 ml de agua destilada y adicione la solución del regulador de crecimiento. Para aforar a 30 ml.
4. Transfiera la solución de cada regulador de crecimiento a una botella ámbar para su almacenamiento.
5. Rotule con el nombre de la solución, concentración, fecha y nombre de la persona que lo preparó.

Anexo 12.3 Listado de vegetación.

Forofitos

Clenthraceae

- *Clethra mexicana* DC.

Ericaceae

- *Comarostaphylis discolor* (Schltdl & Cham.) Small.

Polygalaceae

- *Monnina ciliolata* Seseé & Moc. ex DC.

Scrophulariaceae

- *Buddleia parviflora* Kunth.
- *Buddleia perfoliata* Kunth.

Vegetación acompañante, competitiva y/o asociada

Líquenes

Cladoniaceae

- *Cladonia* sp. Hill ex P. Browne.

Lobariaceae

- *Lobaria* sp. (Schreb.) Hoffm.
- *Sticta beauvoisii* Delise
- *Sticta fuliginosa* (Hoffm.) Ach.

Physciaceae

- *Heterodermia* sp. Trevis.

Parmeliaceae

- *Flavoparmelia* sp. Hale.
- *Flavopunctelia praesignis* (Nyl.) Hale.
- *Hypogymnia* sp. (Nyl.) Nyl.
- *Hypotrachyna* aff. *revoluta* (Flörke) Hale.
- *Parmotrema* sp. A. Massal.
- *Usnea* sp. Dill. ex Adans.

Ramalinaceae

- *Ramalina* sp. Ach.

Xylariaceae

- *Daldinia* sp. Ces. & De Not.

Helechos

Aspleniaceae

- *Asplenium cuspidatum* Lam.

Dennstaedtiaceae

- *Dennstaedtia punctilobula* (Kunze) Moore.

Polypodiaceae

- *Polypodium madrense* J. Sm.
- *Polypodium subpetiolatum* Hook.
- *Polypodium polypodioides* (L.) Watt.
- *Polypodium martensii* Mett.
- *Polypodium remotum* Desv.
- *Pleopeltis crassinervata* (Fée) T. Moore.
- *Pleopeltis polylepis* (Roem. ex Kunze) T. Moore.

Agavoideae

- *Agave aff. horrida* Lem. ex Jacobi.

Begoniaceae

- *Begonia gracilis* Kunth.

Bromeliaceae

- *Tillandsia makoyana* Baker
- *Tillandsia prodigiosa* (Lem.) Baker

Cactaceae

- *Heliocereus elegantissimus* Britton & Rose.

Crasulaceae

- *Echeveria gibbiflora* Lindl.
- *Sedum frutescens* Rose

Orchidaceae

- *Epidendrum anisatum* La Llave & Lex.
- *Rhynchostele aptera* (La Llave & Lex.) Soto Arenas & Salazar.
- *Prosthechea rhombilabia* (S. Rosillo) W.E. Higgins.
- *Prosthechea pringlei* (Rolfe) W. E. Higgins.
- *Stellis retusa*

Piperaceae

- *Peperomia campylotropa* A. W. Hill.
- *Peperomia quadrifolia* (L.) Kunth.

Urticaceae

- *Urtica urens* L

Anexo 12.4 Análisis Estadístico.

12.4.1 Análisis de Varianza, Porcentajes de Germinación de *Rhynchosstele cervantesii* (siembra 2014)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:tratamientos	6983.73	16	436.483	11.05	0.0000
B:tiempo	28493.2	6	4748.87	120.18	0.0000
INTERACCIONES					
AB	4980.24	96	51.8775	1.31	0.0502
RESIDUOS	9404.67	238	39.5154		
TOTAL (CORREGIDO)	49861.8	356			

12.4.2 Prueba de Múltiples Rangos, Porcentaje de Germinación por tratamientos (siembra 2014).

tratamientos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
6	21	5.2381	1.37175	x
13	21	12.6667	1.37175	x
10	21	12.8095	1.37175	xx
5	21	13.1429	1.37175	xx
11	21	13.9048	1.37175	xxx
15	21	14.0	1.37175	xxx
14	21	15.0	1.37175	xxxx
9	21	15.9524	1.37175	xxxxx
2	21	16.1905	1.37175	xxxxx
8	21	16.5238	1.37175	xxxx
1	21	17.0952	1.37175	xxx
4	21	17.4286	1.37175	xxx
12	21	18.2381	1.37175	xx
0	21	18.6667	1.37175	xx
16	21	19.3333	1.37175	x
3	21	24.6667	1.37175	x
7	21	24.7619	1.37175	x

12.4.3 Pruebas de Múltiples Rangos, Porcentaje de germinación por tiempo (siembra 2014).

tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
14	51	0	0.880234	x
30	51	6.05882	0.880234	x
58	51	15.3529	0.880234	x
90	51	20.7843	0.880234	x
160	51	23.7647	0.880234	x
180	51	23.7647	0.880234	x
124	51	23.7647	0.880234	x

12.4.4 Análisis de Varianza para porcentajes de germinación de *R. cervantesii* (siembra 2015).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:tratamientos	57891.4	16	3618.21	34.10	0.0000
B:tiempo	276143.	8	34517.8	325.36	0.0000
INTERACCIONES					
AB	17012.9	128	132.913	1.25	0.0438
RESIDUOS					
TOTAL (CORREGIDO)	415975.	764			

12.4.5 Prueba de Múltiples Rangos, porcentaje de germinación por tratamientos (siembra 2015).

tratamientos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5	45	21.7778	1.53545	x
16	45	23.6889	1.53545	x
8	45	28.5778	1.53545	x
11	45	29.2222	1.53545	x
15	45	29.7556	1.53545	x
6	45	30.5556	1.53545	xx
3	45	31.2222	1.53545	xxx
14	45	34.4889	1.53545	xxx
12	45	34.5333	1.53545	xxx
10	45	35.3333	1.53545	xxx
7	45	36.9778	1.53545	xx
13	45	37.1111	1.53545	xx
4	45	39.3111	1.53545	xx
1	45	41.4667	1.53545	xx
9	45	45.4889	1.53545	xx
2	45	46.6667	1.53545	x
0	45	58.1778	1.53545	x

12.4.6 Pruebas de Múltiples Rangos, Porcentaje de germinación por tiempo (siembra 2015).

tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
15	85	0	1.1172	x
30	85	0.0588235	1.1172	x
61	85	44.2824	1.1172	x
75	85	44.6706	1.1172	x
91	85	46.0941	1.1172	x
105	85	46.2118	1.1172	x
180	85	46.2118	1.1172	x
155	85	46.2118	1.1172	x
140	85	46.2118	1.1172	x

12.4.7 Análisis de Varianza, Índice de Desarrollo de *R. cervantesii* (siembra 2014).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:tratamientos	25601.9	16	1600.12	14.82	0.0000
B:tiempo	432314.	6	72052.3	667.12	0.0000
INTERACCIONES					
AB	24227.4	96	252.369	2.34	0.0000
RESIDUOS	25705.3	238	108.006		
TOTAL (CORREGIDO)	507849.	356			

12.4.8 Prueba de Múltiples Rangos, Índice de Desarrollo por tratamientos (siembra 2014).

tratamientos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	21	169.714	2.26785	x
6	21	170.905	2.26785	x
11	21	178.857	2.26785	x
5	21	179.571	2.26785	xx
13	21	180.095	2.26785	xx
10	21	183.095	2.26785	xxx
9	21	183.333	2.26785	xxx
2	21	185.0	2.26785	xxxx
1	21	185.286	2.26785	xxx
8	21	186.714	2.26785	xx
15	21	186.952	2.26785	xx
14	21	187.0	2.26785	xx
4	21	190.619	2.26785	xx
3	21	194.095	2.26785	xx
12	21	194.857	2.26785	xx
16	21	197.476	2.26785	xx
7	21	202.857	2.26785	x

12.4.9 Pruebas de Múltiples Rangos, Índice de Desarrollo por tiempo (siembra 2014).

tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
14	51	103.902	1.45525	x
30	51	177.235	1.45525	x
58	51	195.804	1.45525	x
90	51	202.51	1.45525	x
124	51	206.706	1.45525	x
160	51	206.725	1.45525	x
180	51	206.824	1.45525	x

12.4.10 Análisis de Varianza, Índice de Desarrollo de *R. cervantesii* (siembra 2015).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:tratamientos	165831.	16	10364.5	29.37	0.0000
B:tiempo	2.0361E6	8	254512.	721.19	0.0000
INTERACCIONES					
AB	46811.6	128	365.716	1.04	0.3859
RESIDUOS					
TOTAL (CORREGIDO)	2.46472E6	764			

12.4.11 Prueba de Múltiples Rangos, Índice de Desarrollo por tratamientos (siembra 2015).

tratamientos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
16	45	174.8	2.80043	x
5	45	175.067	2.80043	x
11	45	182.2	2.80043	xx
15	45	185.756	2.80043	xx
8	45	189.689	2.80043	xxx
3	45	192.089	2.80043	xx
12	45	194.822	2.80043	xx
10	45	194.822	2.80043	xx
6	45	194.956	2.80043	xx
14	45	201.133	2.80043	xx
13	45	202.0	2.80043	xxx
7	45	203.356	2.80043	xx
1	45	209.444	2.80043	xx
4	45	209.467	2.80043	xx
2	45	213.844	2.80043	x
9	45	215.044	2.80043	x
0	45	233.089	2.80043	x

12.4.12 Pruebas de Múltiples Rangos, Índice de Desarrollo por tiempo (siembra 2015).

tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
15	85	100.553	2.03761	x
30	85	103.165	2.03761	x
61	85	223.024	2.03761	x
75	85	223.412	2.03761	x
91	85	226.706	2.03761	x
140	85	227.024	2.03761	x
105	85	227.024	2.03761	x
180	85	227.024	2.03761	x
155	85	227.024	2.03761	x

ANEXO 12.5 Para reflexionar.

Hay momentos en que podemos pensar que buscar, cultivar, y tener orquídeas en nuestra casa, no deja de ser más que un escape a la realidad; una entretenición un tanto inútil.

Lejos de ello, en primer lugar, ni el más inteligente de los seres humanos, puede, sin más juzgar, afirmar si algo es útil o no lo es. La cuestión es que muchas veces no estamos en capacidad de prever las consecuencias que tiene, ya sea un entretenimiento o una ocupación. Por lo tanto, lo primero que debemos pensar, en cuanto a lo que tantos momentos gratos nos ha dado, es si es o no cierto lo que manifestamos inicialmente.

Buscar orquídeas: Que experiencia tan interesante es internarse en la montaña a buscar orquídeas; este es un placer que en ninguna ciudad del mundo podemos obtener. El solo caminar en la región del bosque húmedo; el respirar ese aire tan puro que a ningún precio se puede comprar; el admirar el paisaje de multitonales verdes y cafés rojizos, de pinares, liquidámbar, y cedros; esa felicidad incomparable cuando localizamos en una rama o tronco de un árbol una *Lycaste*, *Cattleya* o miniatura que desconocíamos; esa elevación del alma por el contacto directo con la naturaleza y tantas maravillas de Dios!

Si ese buscar fuera una causa inútil..... ¡Viva la inutilidad!

Cultivar orquídeas y tenerlas en casa: El trato diario con nuestras preciadas plantitas; el preocuparse por ellas, el regarlas, ponerles abono cuando es necesario, podarlas y, si sabemos, fertilizarlas, nos proporciona no solamente hábitos de disciplina, orden y limpieza, sino la oportunidad de dar y recibir nuestro amor; además de la emoción sin par al obtener, cuando vemos que está próximo a reventar un botón o cuando vemos que se ha salvado la que estaba casi seca.

Si cultivarlas y tenerlas en casa fuera inútil..... ¡que viva la inutilidad!

Escape a la realidad: Nadie es más realista de lo que acontece en nuestros bosques y el medio ambiente, que los que nos internamos en la montaña. Somos testigos fieles y desinteresados; que amamos la naturaleza de nuestras selvas tropicales donde anidan y florecen nuestras flores predilectas, las orquídeas. Si a cambiar de la monotonía de la vida citadina, apartarnos del humo y del smog, tener momentos de grato esparcimiento en compañía de tantas personas que tienen y disfrutan nuestros mismos intereses; y sobre todo renovar nuestra vida espiritual con ilusiones, esperanzas, alegrías y recuerdos, si todo ello fuera inútil..... ¡Que viva la inutilidad!

Un punto de vista sobre los que amamos a las orquídeas por Agustín Estrada Monroy Colaborador A.A.O. Guatemala 1992 (*Las Orquídeas, guía práctica para su cultivo*, 1993).

ANEXO 12.6 Protocolo de cultivo *in vitro* para *Rhynchostele cervantesii* a partir de semillas.

Las cápsulas de la especie *R. cervantesii* pueden colectarse en los meses de noviembre a marzo antes de su apertura.

Las semillas pueden trabajarse ya sea inmaduras (de noviembre a marzo) o maduras (de marzo a junio).

Si se decide trabajar con semillas inmaduras el tratamiento de desinfestación consistirá en: lavar la cápsula con jabón y un cepillo y enjuagarse al chorro de agua, posterior a ello, y en condiciones asépticas, la capsula deberá estar en contacto con el desinfestante (hipoclorito de sodio al 0.5% v/v adicionado con una gota de jabón líquido) durante 10 minutos, y enjuagar con agua destilada estéril hasta eliminar la solución desinfestante, una vez concluida esta, la cápsula deberá ser sumergida en etanol al 70% y ser flameada con el mechero, (dejar que la flama se extinga por si sola) para realizar un corte y poder liberar y dejar expuestas las semillas dentro de una caja Petri estéril.

Si en caso contrario, se trabaja con semillas maduras y fuera de la capsula, deberán fabricarse sobres de papel filtro (los necesarios) para colocar en su interior una pequeña muestra de las semillas con ayuda de una aguja de disección, asegurar el sobre con un clip y someterlos al procedimiento de desinfestación; para ello será necesario sumergir los sobres en agua destilada estéril y eliminar con ayuda de una varilla de vidrio el aire que se encuentre contenido en dichos sobres, posterior a ello, y en condiciones asépticas, los sobres deberá estar en contacto con etanol al 70 % durante 5 minutos y posteriormente al desinfestante (hipoclorito de sodio al 0.5% v/v adicionado con una gota de jabón líquido) durante 10 minutos, y enjuagar con agua destilada estéril hasta eliminar la solución desinfestante, una vez concluida esta etapa, sobre una caja Petri retirar con ayuda de las pinzas el clip de cada sobre para colocar cada uno de los sobres en un recipiente con el medio de cultivo.

El medio de cultivo para inducir la germinación es el medio MS al 50% de su concentración en sales basales y modificado con 30 g de Sacarosa, 20 g de papilla de plátano Gerber®, 5 g de Agar, 1 g de Carbón activado disueltos en 1000 ml de agua destilada. Después de sesenta días deberá subcultivarse al mismo medio modificado y adicionado con 0.1 mgL^{-1} AG3 + 1 mgL^{-1} ANA + 0.1 mgL^{-1} K y permanecer durante 45 días en el para inducir el desarrollo a partir de los protocormos y posteriormente realizar subcultivos a medio fresco sin reguladores de crecimiento cada cuarenta días para obtener plántulas completas en un lapso aproximado de 415 días.