



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

BIOLOGÍA DE POBLACIONES DE *Laelia speciosa* (HBK) Schltr.
(ORCHIDACEAE) PARA SU MANEJO Y CONSERVACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A

IRENE ÁVILA DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Foto: A. Gómez

Laelia speciosa, epífita que como muchas orquídeas mexicanas, se encuentra en riesgo, ¿que hacer?

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Dr. Gabriel Ávila Galinzoga y Sra. Emma Díaz Vargas, con profundo amor y agradecimiento por ser como han sido siempre, ¡los mejores padres del mundo!

A MIS HERMANOS:

Beatriz, Gabriel, Victor, Emma, Héctor, Marcela y Liz, con mucho cariño, por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A MIS HIJOS:

Juan Leonardo, Irenita y Montse, con gran alegría y amor ilimitado, por ser esas grandes personas que representan el motor principal de mi vida.

A la memoria de la Sra. TERESA MEUNIER, con gran agradecimiento y cariño, por su amistad y enseñarme el amor a las orquídeas.

A DANIEL ZAVALA MALDONADO, por su siempre amable trato y amor, ¡gracias!

AGRADECIMIENTOS

Hago patente mi sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones ya que sin ellas no habría sido posible la realización del presente trabajo:

De manera muy especial y con admiración, agradezco al Dr. KEN OYAMA, asesor de este trabajo, por su invaluable apoyo y confianza que siempre me brindó, ¡gracias por todo!

A los Drs. Miguel Martínez Ramos y José G. García Franco, de mi comité tutorial, con su siempre buena disposición, acertadas sugerencias durante el desarrollo de la investigación, así como por la revisión del manuscrito y observaciones.

A los Doctores Daniel Piñero D., Mauricio Quesada A., a las Doctoras Ana E. Mendoza O., Magda Carvajal M. y María Alicia González M., miembros del jurado y por sus valiosos comentarios al trabajo.

Al Dr. Rafael Salgado G. por asesorarme y permitirme trabajar en su laboratorio la parte de germinación y propagación *in vitro* de *L. speciosa*. Al Mat. Carlos Gómez por su valiosa ayuda con los análisis estadísticos de los capítulos 4 y 5.

A Rosaura Luna R. y Aurea Cortés P. por sus valiosas enseñanzas y su amistad, que en momentos difíciles han sido importantes para mi.

A mis compañeros Miguel A. Pérez P., Nidia Pérez, Antonio González, Euler Pedraza, Rafael Valencia, Dolores Valencia G., Ma. Luisa Herrera, Margarita Guzmán y Diana Medina, por su colaboración en el presente estudio. A los demás compañeros y amigos: Ana y Juan, Selene, Ermilo, Erasto, Enrique, Pablo, Dolores, Víctor y a la Sra. Lolita, ¡todos ellos, con su buen ánimo, hacen del laboratorio de genética y molecular un lugar tan especial!

A M. Angel Soto por hacerme saber de la existencia el CIEco en Morelia y animarme a hacer la genética de poblaciones de *Laelia*.

A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron en este proyecto y no se mencionan particularmente.

Mi reconocimiento a la UNAM por permitirme estar este tiempo en sus aulas, en el cual crecí profesional y personalmente. A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por darme la oportunidad de llevar a cabo este posgrado.

Esta investigación fue apoyada por el Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza (FMCN, proyecto A 1-99/130), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEMARNAT-CONACYT, proyecto 2002-C01-0544) y una beca doctoral de CONACYT (reg. 130249).

ÍNDICE

i RESUMEN GENERAL.....	i
ii INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
iii OBJETIVO GENERAL.....	5
iv SISTEMA DE ESTUDIO.....	5
Capítulo 1: CONSECUENCIAS GENÉTICAS DEL MANEJO EN POBLACIONES DE PLANTAS.....	8
Capítulo 2: CONSERVATION GENETICS OF AN ENDEMIC AND ENDANGERED EPIPHYTIC <i>Laelia speciosa</i> (ORCHIDACEAE)	51
Capítulo 3: SISTEMA DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCTIVO FEMENINO DE LA EPÍFITA AMENAZADA <i>Laelia speciosa</i> (ORCHIDACEAE).....	58
Capítulo 4: ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA ÓPTIMO DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS <i>in vitro</i> DE <i>Laelia speciosa</i> (HBK) Schltr. (ORCHIDACEAE).....	86
Capítulo 5: RECOGNIZING FUNGAL ENDOPHYTES CARRIED IN SEEDS OF EPIPHYTIC ORCHID <i>Laelia speciosa</i> AND ITS SYMBIOTIC RELATIONSHIP.....	121
DISCUSIÓN GENERAL.....	152
REFERENCIAS GENERALES.....	158

i RESUMEN GENERAL

En el presente estudio doctoral se muestra un modelo de investigación para especies de plantas amenazadas, para su manejo y conservación. Esta tesis se encuentra estructurada en 5 capítulos precedidos por una serie de apartados sobre los antecedentes generales del proyecto así como el planteamiento del objetivo general y la descripción de la especie en estudio. El objetivo general fue evaluar la diversidad y estructura genética de poblaciones representativas de *Laelia speciosa* (HBK) Schl, así como su sistema de apareamiento, éxito reproductivo, la germinación y su desarrollo *in vitro*; para proponer estrategias de manejo sustentable. El contenido de los capítulos se resume a continuación:

En el capítulo 1 se presenta una revisión de la literatura, sobre las consecuencias genéticas del manejo en poblaciones de plantas; en el que se analizan como las perturbaciones humanas, en particular la fragmentación y la extracción han disminuido los tamaños poblacionales y con esto en muchos casos afectado los niveles de diversidad y la estructura genética de las poblaciones. También se revisa el efecto del disturbio en procesos ecológicos como la polinización y el sistema reproductivo; por lo general negativo, aumentando el riesgo de extinción de las especies

En el capítulo 2 se presenta un estudio sobre la genética de la conservación de *Laelia speciosa*, con el uso de isoenzimas (16 loci y 11 sistemas enzimáticos) se estima la diversidad y estructura genéticas de nueve poblaciones, distribuidas a través de su rango geográfico. Los resultados indican altos niveles de diversidad genética ($P = 76\%$, $A = 3.34$, $H_O = 0.302$, $H_E = 0.382$) y moderados niveles de endogamia ($f = 0.216$; 95 % , $CI = 0.029 - 0.381$). Se observan bajos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones ($\theta_p = 0.040$), sin embargo, se encuentra una correlación significativa entre las distancias geográficas y las genéticas entre ellas (Prueba de Mantel: $r^2 = 0.43$; $P < 0.05$). Las localizadas dentro del mismo rango montañoso-Sierra Madre Occidental, Eje Neovolcánico o Sierra Madre Oriental- tienen una mayor similitud genética. Se encontraron alelos privados y raros en diversas poblaciones, por lo que un manejo apropiado requiere la protección y mantenimiento de la diversidad genética en todo el rango de distribución.

En el capítulo 3 se estudió el sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino de *L. speciosa*. El conocimiento de la biología reproductiva, de la ecología y la genética de poblaciones, es esencial para planear estrategias adecuadas de conservación. Se llevaron a cabo pruebas de

polinización y se determinó la tasa de producción de frutos (*fruit set*) por autogamia espontánea, endocruzamiento, exocruzamiento y polinización abiertas, así como la viabilidad de semillas y la proporción de germinación *in vitro* en cada uno de los tratamientos. Con endocruzamiento, se registra significativamente menor fructificación (0.15 ± 0.035) que con exocruzamiento (0.80 ± 0.053). Se observa un bajo índice de auto-compatibilidad ($SCI = 0.18$), mayor viabilidad de semillas en el tratamiento de exocruzamiento y en polinización abierta que en el de endocruzamiento, así como un alto valor de la tasa de exocruzamiento ($t = 0.709$) y de la multilocus de exocruzamiento ($tm = 0.995$). Los resultados indican que *L. speciosa* es una especie predominantemente exógama pero con la capacidad de producir semillas viables por endocruzamiento, lo cual puede ser una ventaja adaptativa, apoyando la hipótesis de “aseguramiento reproductivo”. *L. speciosa* es dependiente de polinizadores para su reproducción sexual. El éxito reproductivo femenino (0.29 ± 0.058) indica limitación de polinizadores, como en otras especies de orquídeas tropicales. Se considera que un manejo adecuado debe favorecer la polinización cruzada e incrementar los tamaños poblacionales.

En la investigación sobre el establecimiento de un sistema óptimo de germinación y desarrollo de plántulas *in vitro* de *L. speciosa* para colaborar en su conservación (capítulo 4), se estudió el efecto de la benciladenina, madurez de la cápsula, luz y diversos medios de cultivo sobre su germinación y primeros estados de desarrollo *in vitro*, y se determinó un medio óptimo de subcultivo de plántulas *in vitro* para la especie en estudio. Semillas de cápsulas de *L. speciosa* colectadas 4, 7 y 9 meses después de su polinización artificial, fueron germinadas en medios Murashige y Skoog (MS) con 30 g l^{-1} de sacarosa y diferentes concentraciones (0.0, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 mg l^{-1}) de BA, bajo condiciones de luz (fotoperiodo de 16 hrs luz, $130 \mu\text{E/m seg}^2$) o de oscuridad constante. El mayor porcentaje de germinación (100%) se registra en semillas maduras con 0.1 mg l^{-1} de BA con luz los 30 días de efectuada la siembra y de desarrollo de plántulas (60%) a los 90 días, en semillas maduras en MS sin BA y cultivos expuestos a la luz. Se registra un desarrollo *in vitro* significativamente mayor en las plántulas de *L. speciosa* en los medios MS y $\frac{1}{2}$ MS, que el registrado en el medio Knudson C y otros probados. Con un barrido hormonal, se determinó que el medio MS suplementado con 30 g l^{-1} de sacarosa, 0.5 mg l^{-1} de ANA y 0.1 mg l^{-1} de GA_3 es un medio óptimo para el subcultivo de plántulas de *L. speciosa*. Se reporta la producción de brotes o estructuras protocórmicas (PLBs) y callo como una alternativa de reproducción asexual.

En la siguiente sección, se da a conocer la presencia de hongos endófitos en las semillas de *L. speciosa* y su relación simbiote (capítulo 5) a través del estudio de la germinación y primeros estados de desarrollo *in vitro* en relación a la colonización de tales hongos. Su relación simbiote fue probada a través de la observación de los hongos endófitos en semillas de cápsulas con diferente madurez, en semillas provenientes de diferentes poblaciones distantes y con un experimento con fungicidas. La colonización fungal fue dependiente de la madurez de las semillas, se determinó la presencia de hongos endófitos en todas las semillas observadas de diferentes poblaciones. Los fungicidas inhibieron significativamente el desarrollo de los hongos y también de *L. speciosa*. Se observó un mismo patrón en cuanto a la morfología de las hifas y pelotones, por lo cual se sugiere que existe una relación específica entre *L. speciosa* y los hongos simbiotes. Es de gran relevancia el que *L. speciosa* y otras especies de orquídeas epífitas lleven en sus semillas hongos endófitos simbiotes, ya que estos pueden conferirles importantes ventajas ecológicas para la germinación y establecimiento en esos hábitats tan extremos. Se ha considerado que las semillas de las orquídeas están libres de hongos endófitos y que el contacto inicial entre los hongos micorrícicos y las semillas de orquídeas, es fortuita y azarosa. Esta investigación es el primer reporte en la literatura de la existencia de hongos endófitos en las semillas de la familia Orchidaceae.

Finalmente, se presenta un apartado en donde se desarrolla una discusión general de este proyecto de investigación y se presenta un modelo conceptual sobre el manejo de orquídeas epífitas con base a los resultados obtenidos.

ii INTRODUCCIÓN GENERAL

Aun cuando las plantas desempeñan un papel esencial en el funcionamiento de los ecosistemas, son el grupo biológico con el mayor número de taxa reportados en las listas de las especies raras y amenazadas (Ellstrand y Elam, 1993). Se estima que cerca del 25% de las 250 000 especies de plantas vasculares en el mundo, se extinguirán en los próximos 40 años (Raven, 1987).

En México existen entre 22 000 y 30 000 especies de plantas vasculares (Rzedowski, 1991), de las cuales aproximadamente el 15% se encuentran en peligro de extinción (Vovides, 1995), estando registradas en alguna categoría de riesgo 989 especies en la norma oficial vigente NOM-059-ECOL-2001. La causa principal de este problema es la perturbación y destrucción de las comunidades naturales por el creciente impacto de las actividades humanas sobre los ecosistemas. Aunque éste es un problema mundial, sin duda adquiere especial relevancia en las regiones tropicales.

En el caso particular de México se presenta una alta tasa de deforestación. La reportada durante la década de 1980 era de 1.29%, equivalente a 668 000 ha al año, donde se perdían 167 000 ha en bosques templados y 501 000 ha en las selvas (Toledo, 1988). Recientemente se han estimado tasas del 2.0 % para las selvas tropicales (Masera *et al.* 1997).

Entre las plantas vasculares, la familia Orchidaceae es uno de los taxa más vulnerables, debido básicamente a: 1) la destrucción y/o transformación de sus hábitats; 2) la extracción de plantas de las poblaciones silvestres dado su valor hortícola y comercial, y 3) las características ecológicas que presentan las especies, como son por lo general tasas de crecimiento muy bajas y ciclos de vida largos, además de que para muchas especies es muy escaso el reclutamiento de nuevos individuos a las poblaciones.

Se considera que dicha familia es una de las más diversas morfológicamente y con mayor número de especies en el mundo –25 000– (Dressler, 1990). La flora orquideológica de México comprende más de 1 200 especies conocidas (Hágsater *et al.*, 2005).

Actualmente 180 especies de orquídeas han sido incluidas en alguna de las categorías de riesgo en la NOM-059-ECOL-2001. Dentro de este grupo se registra a *Laelia speciosa* como especie amenazada y endémica de México, la cual es una epífita que ha sido muy colectada por su alto valor ornamental y cultural. Cada año se venden miles de flores en carreteras y mercados del sur y centro de México –cada una con un segmento de la planta portadora o bien la planta completa–, las cuales generalmente están destinadas a morir por el maltrato que se les da y la falta de conocimiento acerca de su cultivo (Hernández, 1992; Salazar- Chávez, 1996; Halbinger y Soto, 1997; I. Ávila-Díaz, obs. pers.). También sus pseudobulbos son utilizados para la obtención de mucílago, el cual, mezclado con la médula de la caña de maíz, permite obtener una pasta para la elaboración de imágenes religiosas (Miranda, 1997; Hágsater et al., 2005; Artesanos, com. pers.). Es tradicional que en algunas localidades se utilizan grandes cantidades de flores –con segmentos o plantas completas– para la celebración de fiestas religiosas. Por lo tanto, las poblaciones naturales se han visto seriamente afectadas, principalmente por la extracción masiva de la que son objeto, así como por la destrucción de los bosques y hábitats en donde viven (Ávila, 1996).

Estudios demográficos de *L. speciosa* en poblaciones con diferentes niveles de extracción, han demostrado que las sujetas a mayor disturbio tienen una tasa de crecimiento poblacional menor ($\gamma < 1$) que aquellas más conservadas ($\gamma = 1$) (Hernández, 1992, Pérez-Perez, 2003). Si la disminución de sus poblaciones continúa, muchas de ellas serán exterminadas en el futuro próximo (Halbinger y Soto, 1997; Pérez- Perez, 2003).

El éxito en la conservación de la biodiversidad, depende en gran medida de la información científica disponible, así como también del grado de comunicación entre los científicos y con quienes manejan los recursos (Soulé, 1986; Schemske *et al.*, 1994), por lo cual, se deben conjuntar diversos enfoques y estudios que integren información básica y aplicada (Cibrián, 1999).

En ese sentido, se planteó la realización del proyecto “Manejo Sustentable de *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter (Orchidaceae)”, el cuál fue aprobado por el Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza. En él se abordan aspectos como: 1) el estudio de su dinámica de poblaciones; 2) la estimación de la variación y estructura genética de sus poblaciones; 3) el

estudio de la germinación y de los primeros estados de desarrollo *in vitro* para su propagación; 4) el implementar un programa de educación ambiental; 5) el cultivar plantas micropropagadas por parte de comunidades humanas locales en base a la información generada, y 6) el rehabilitar poblaciones de *L. speciosa* afectadas por su manejo, en conjunto con las mismas comunidades. La ejecución del proyecto se ha realizado con la participación de varios investigadores y se espera integrar la información generada en las diferentes áreas para plantear alternativas de manejo y colaborar a la conservación de *L. speciosa*.

Esta investigación doctoral forma parte del proyecto y comprende cinco capítulos.

En el 1, se presenta una revisión bibliográfica sobre las consecuencias genéticas del manejo en poblaciones de plantas. Una primera versión de esta revisión de literatura fue presentada en el XV Congreso Mexicano de Botánica. El capítulo es un marco conceptual para los siguientes y se encuentra en revisión para será publicado como parte del libro “Estudios y perspectivas en el manejo de recursos naturales y conservación de sistemas vegetales” editado por el Dr. Miguel Martínez Ramos.

El capítulo 2: “Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae)”, se refiere a una investigación en la que se estima la variación y estructura genética de *L. speciosa* a través de su rango de distribución geográfica. La variación genética está relacionada con el potencial evolutivo de las especies y la comprensión de cómo es repartida entre las poblaciones, es fundamental para el establecimiento de estrategias efectivas de manejo y de conservación (Hamrick y Godt, 1990; Frankham, 1995).

Es conocido que los sistemas reproductivos desempeñan un papel crucial en la composición de las poblaciones, al determinar las frecuencias genotípicas en las siguientes generaciones. También afectan factores como el flujo de genes y la selección (Perez y Piñero, 1997; Wong y Sun, 1999), por lo que están íntimamente relacionados con la variación y estructura genética de las poblaciones. Por tal motivo, se consideró importante el estudio del sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino de *L. speciosa*, el cual se presenta en el capítulo 3.

El estudio *in vitro* sobre el efecto de diversos factores en la germinación y etapas iniciales del desarrollo de *L. speciosa* que se muestra en el capítulo 4, es importante para establecer un

sistema de propagación óptimo, con el que se pretende producir plantas para su cultivo y venta por parte de comunidades humanas locales y la posible reintroducción por las mismas, como alternativa de manejo sustentable.

Por otro lado, dicho estudio también permitió entender algunos factores importantes en la germinación y establecimiento de orquídeas epífitas, como es el caso del descubrimiento de hongos endófitos presentes en sus semillas aún antes de la dehiscencia de las cápsulas, lo cual es reportado por primera vez en la familia Orchidaceae. Esto se presenta en el capítulo 5.

L. speciosa es un modelo de estudio particularmente interesante por su hábito epífito obligado y por su capacidad de tolerar periodos prolongados de severa sequía, así como otras condiciones ambientales muy desfavorables, las cuales seguramente han ejercido una presión particular en la evolución de estas plantas, razón por lo que su estudio puede ser una contribución a la teoría ecológica y genética de las plantas epífitas.

iii OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad y estructura genética de poblaciones representativas de *Laelia speciosa* (HBK) Schl, así como su sistema de apareamiento, éxito reproductivo, la germinación y su desarrollo *in vitro*; a partir de lo cual, proponer estrategias de manejo sustentable.

iv SISTEMA DE ESTUDIO

Características generales

El género *Laelia* fue establecido en 1831 por John Lindley en base a *Laelia grandiflora*, actualmente conocida como *L. speciosa*, especie tipo del género. Es uno de los 43 géneros que constituyen la subtribu Laeliinae (Dressler, 1993), grupo característicos de orquídeas Americanas. Actualmente se reconocen dos grupos diferentes y discretos: las Laelias Mexicanas y las Laelias Brasileñas, consideradas descendientes de diferentes linajes, a pesar de que comparten una estructura floral similar (Halbinger y Soto, 1997).

L. speciosa se considera como una de las especies más hermosas del género, y quizás una de las más sobresalientes de todas las orquídeas. Las plantas son epífitas, con seudobulbos globulares a ovoides, con una hoja rígida terminal. La inflorescencia mide de 15 a 25 cm de longitud, con 1 a 2 flores grandes, de 10-16 cm de diámetro, de color pálido a rosa-lila oscuro o coloración purpurina. Los sépalos son lanceolados y los pétalos del doble de ancho, el labelo es blanco en el centro y su lóbulo medio redondeado, rosa- lila en los bordes, con un patrón de puntos y líneas púrpura-magenta (Fig 1). Las flores tienen una fragancia delicada, semejante a la de las violetas (Halbinger y Soto, 1997).

Distribución

Es endémica de México, crece en bosques de la Sierra Madre Oriental, Occidental, el eje Volcánico Transversal y de la parte sur de la Altiplanicie Central. *L. speciosa* puede encontrarse en un área extensa en México, en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas (Halbinger y Soto, 1997)

Hábitat

Es una de las orquídeas epífitas de México más tolerantes a la sequía, crece principalmente sobre encinos (casi siempre sobre *Quercus deserticola*, algunas veces sobre *Q. laeta*) en bosques abiertos, deciduos, en una altitud de 1440 a 2500 metros. Soportan severas sequías de diciembre a junio y toleran temperaturas de menos de 0°C por periodos cortos. La precipitación anual de los bosques en donde habita es de 700 a 1000 mm (Soto, 1990; Halbinger y Soto, 1997; I. Ávila-Díaz, obs. pers.).

Variación

Se observa una gran variación, en tamaño, forma y coloración de las flores, también en los patrones de ornamentación en el labelo. Existen formas de color totalmente blanco, las cuales son muy raras y apreciadas. Las flores semi-albas con tonos delicados, así como las flores de color intenso y contrastante son también muy solicitadas (Halbinger y Soto, 1997). Cinco grupos de coloración se han reconocido en esta especie: 1) rosa-lila, como el tipo más común en el campo; 2) lila-magenta, más oscura de lo normal, generalmente con un patrón de ornamentación contrastante en el labelo; 3) lila muy pálido con tonos delicados en el labelo; 4) albas, blancas con solamente el callo ligeramente amarillo y 5) semialbas, con los tépalos blancos y un diseño rosa muy pálido sobre el labelo (Halbinger y Soto, 1997).

Densidad y patrón de distribución

Aunque existen localidades con un gran número de individuos, algunos sitios han sido explotados intensamente, de tal forma que las plantas casi se han extinguido localmente (Halbinger y Soto, 1997; Ávila obs. pers.). En la Cuenca del Lago de Pátzcuaro, se reportan diferentes densidades promedio en las poblaciones de *L. speciosa*, que van de 0.34 a 2.74 individuos por m² en sitios con diferente grado de extracción (Hernández, 1992) y en la población cerro “El Olvido”, Mpio. de Tzintzuntzan, Mich. en promedio 48 individuos por árbol (Pérez-Pérez, 2003); en “Las Huertas”, Mpio de Indaparapeo, se observan 0.82 individuos por m², los que representan 26 individuos en promedio por hospedero (*Q. deserticola*) (Parra y Ávila-Díaz, dat. no pub.).

El patrón de distribución espacial de la orquídea sobre su hospedero, es agrupado. La preferencia por los niveles centrales (ramas) protegidos y menos expuestos a la desecación probablemente se deba a que la humedad juega un papel importante en su establecimiento (Hernández, 1992, Parra y Ávila- Díaz, dat. no pub.).

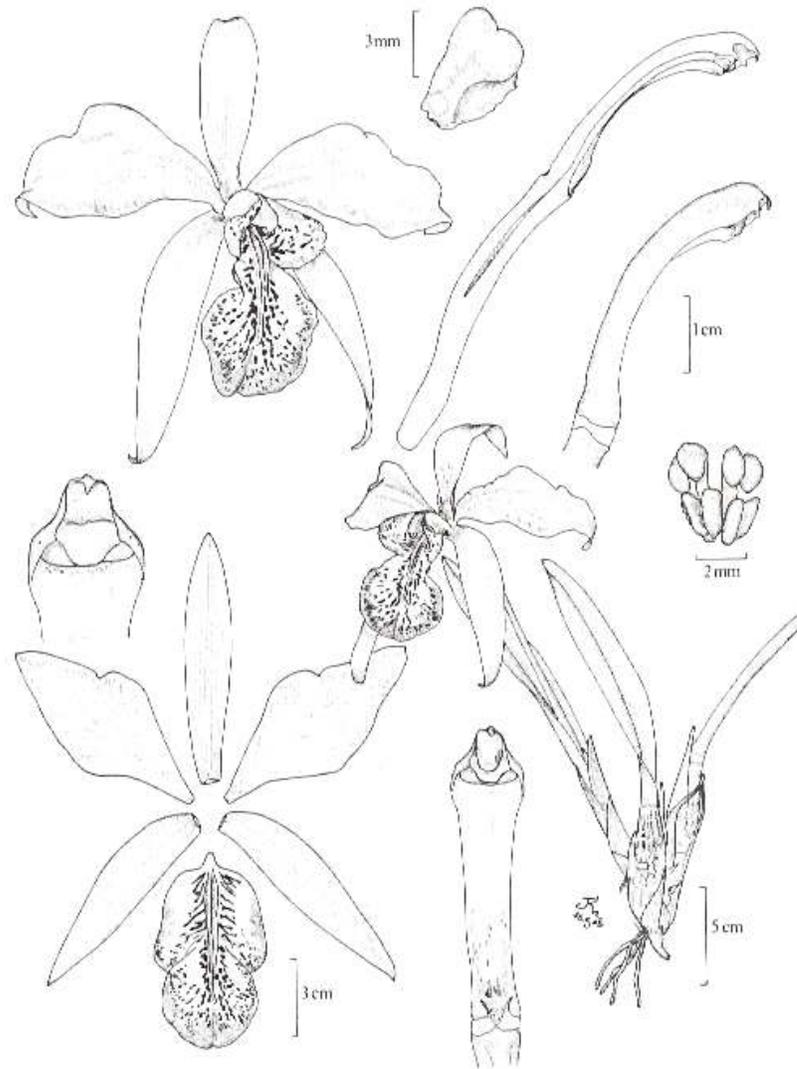


Fig.1. *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. M. Soto 5663. Dibujo: R. Jiménez, utilizado con permiso

CAPÍTULO 1

CONSECUENCIAS GENÉTICAS DEL MANEJO EN POBLACIONES DE PLANTAS

IRENE ÁVILA DÍAZ, MIGUEL ANGEL PÉREZ-PÉREZ Y KEN OYAMA

NOTA: Este capítulo está en revisión para ser publicado como parte del libro “Estudios y perspectivas en el manejo de recursos naturales y conservación de sistemas vegetales”, el cual será editado por el Dr. Miguel Martínez Ramos. El formato, como es la literatura citada, es de acuerdo a los requerimientos de dicho libro.

1. El manejo de los recursos naturales por lo general ha ocasionado un deterioro a las poblaciones. Se considera que procesos genéticos como la endogamia, la deriva génica y el flujo de genes han sido afectados, con esto la diversidad y estructura genética de poblaciones; aumentando el riesgo de extinción

2. A través de una revisión de literatura, se analizan las consecuencias genéticas de la disminución del tamaño poblacional como una forma de ilustrar los efectos de la extracción y la fragmentación en las poblaciones naturales. Para esto se presentan los patrones de diversidad y estructura genética generales, de especies endémicas o raras como indicadores de especies con densidades poblacionales bajas, y una comparación entre especies raras y sus congéneres de amplia distribución.

3. Se analiza el efecto de la actividad humana –en lo particular de la fragmentación y la extracción– en la diversidad y estructura genética de las poblaciones de plantas, el cual por lo regular ha sido negativo; sin embargo, algunos estudios empíricos no encuentran consecuencias genéticas significativas.

4. Se revisan los efectos de la actividad humana en procesos ecológicos como los procesos de polinización y éxito reproductivo, encontrando que generalmente la reproducción sexual es afectada negativamente, debido a una disminución de la eficiencia de la polinización. Con esas interacciones bióticas se ilustra la estrecha relación que existe entre los efectos del disturbio, factores ecológicos y procesos genéticos

5. Se analizan las diversas consecuencias genéticas del manejo de recursos, teniendo un efecto ya sea negativo, neutro o positivo sobre la diversidad genética

6. Como posibles perspectivas de estudio, se considera útil llevar a cabo estudios a largo plazo bajo diferentes condiciones de manejo, que evalúen su impacto en el el flujo génico y la diversidad y estructura genética de las poblaciones; así como también estudios que incluyan especies con características de vida contrastantes.

1 Introducción

La biodiversidad en el planeta se está perdiendo rápidamente como una consecuencia directa o indirecta de la actividad humana. Un número no determinado de especies se ha extinguido recientemente, mientras que muchas otras se encuentran en riesgo, al reducirse sus tamaños poblacionales (Vida, G. 1994; Frankham, 1995).

Entre los factores más importantes que contribuyen a la pérdida de la biodiversidad se encuentran la pérdida del hábitat, la introducción de especies exóticas agresivas, la extracción de los recursos y la degradación y contaminación ambiental. Típicamente, esos factores reducen los tamaños poblacionales haciendo que los organismos sean más susceptibles a efectos estocásticos ambientales, catastróficos, demográficos y genéticos (Frankham, 1995; Ledig, 1992; Brown, 1992).

La conservación de la biodiversidad debe de visualizarse tanto en los niveles de organización biológica, como de los procesos involucrados en el mantenimiento de la biodiversidad. En términos de niveles de organización, se considera que la biodiversidad debe conservarse a nivel genético, de especies y de ecosistemas (Frankham, 1995; Bowen, 1999). Los procesos involucrados en el origen y mantenimiento de la biodiversidad, requieren de la identificación y protección de especies ubicadas en las diversas ramas de la historia filogenética de las mismas, el mantenimiento de los sistemas naturales que soportan la vida de los organismos y la continuación de la adaptabilidad de los organismos en medios ambientes cambiantes (Bowen, 1999).

Es muy importante el mantenimiento de los acervos genéticos de las poblaciones naturales de una misma especie a lo largo de su distribución geográfica, ya que esa variación total proporciona la habilidad a las poblaciones para adaptarse a cambios de las condiciones del medio ambiente y determina el potencial evolutivo de una especie y por lo tanto, su permanencia a largo plazo (Hamrick et al., 1991; Vida, 1994; Hamrick y Godt, 1996; Sun, 1996). Es evidente que la destrucción de los ecosistemas naturales reduce esta variación y con la fragmentación y el aislamiento entre los remanentes naturales se rompen la cohesión y los procesos naturales de esta evolución.

Se puede analizar también la importancia de conocer, mantener y manejar los niveles de diversidad genética de las poblaciones y especies, en el contexto de las comunidades naturales. Las poblaciones de las especies que componen una comunidad natural, no se encuentran aisladas, sino que forman complejas redes bióticas, las cuales han evolucionado juntas por largos periodos de tiempo. La introducción de especies nuevas, la desaparición de especies y los cambios drásticos del medio ambiente han ocurrido más acentuadamente en la actualidad y los efectos de estos fenómenos no se han investigado con detalle, pero sin duda la alteración de los niveles de la diversidad genética de las poblaciones naturales pueden estar asociados a un colapso en el funcionamiento parcial o total de las comunidades naturales (Vida, 1994).

La diversidad y estructura genética de las poblaciones, están determinadas por factores históricos, ecológicos y genéticos (Figura 1). La transformación del paisaje por efectos climáticos y geológicos, como la deriva continental, las glaciaciones y el vulcanismo, son los que determinan los escenarios finales en donde las interacciones de los organismos se tejen para conformar una comunidad natural. La composición de estas comunidades naturales esta determinada a su vez por la evolución de los distintos linajes y sus respectivas historias evolutivas de especiación y extinción.

A una escala de tiempo más corta, los procesos de colonización y extinción local definen los ajustes finos de la existencia de ciertas especies y la eliminación de otras. Dentro de estos escenarios históricos, ocurren procesos ecológicos que determinan el tamaño poblacional y la amplitud geográfica de las especies en cada localidad. Las características de las historias de vida de los organismos, sus formas de vida, sus sistemas reproductivos y los procesos asociados a ellos como son los mecanismos de dispersión, influyen en gran medida en la diversidad y estructura genética de las poblaciones naturales (Hamrick y Godt, 1990; Schaal, 1998).

A un nivel más intrínseco, los procesos genéticos como la mutación, la recombinación y el flujo génico, definen la generación y estructuración de la diversidad genética presente en las poblaciones. También la fijación de las distintas variantes a lo largo de la distribución espacial de las especies o estructuración genética esta regulada por los procesos de deriva génica, selección natural y endogamia.

Dado el fuerte impacto de las diversas actividades antropocéntricas que prácticamente han alterado todos los sistemas naturales, ha sido necesaria la creación de nuevas disciplinas que investigan directamente problemas y preguntas relacionadas con la biología de la conservación de las especies y los ecosistemas naturales. La ***Genética de la Conservación*** es la teoría y la práctica de la genética para la preservación de las especies como entidades dinámicas capaces de evolucionar para enfrentar los cambios del medio ambiente y minimizar su riesgo de extinción. Comprende diversas actividades, como: a) manejo genético de poblaciones pequeñas para maximizar la retención de la diversidad genética y minimizar la endogamia, b) Resolver incertidumbres taxonómicas y delinear unidades de manejo y c) Usar análisis genéticos moleculares para entender la biología de las especies. Otros temas de interés de la genética de la conservación son: la adaptación genética en cautiverio y su efecto sobre el éxito en la reintroducción, la depresión exogámica, el efecto de la fragmentación de poblaciones, reducción del flujo génico y la introgresión en la diversidad genética (Frankham, 1995; Frankham et al., 2000).

En algunos casos, las poblaciones y especies se extinguen en periodos de tiempo cortos, debido a principalmente a factores ecológicos (p.ej. destrucción del hábitat, cambios drásticos en el medio ambiente) (Schemske et al., 1994; Haig, 1998). No obstante, el estudio de los factores genéticos y el uso de herramientas moleculares, pueden ser útiles para planear el mantenimiento a largo plazo de la diversidad genética y para clarificar aspectos demográficos y ecológicos importantes en la rehabilitación de especies (Haig, 1998; Bowen, 1999). El conocer los niveles de diversidad genética dentro y entre poblaciones, ayuda a definir prioridades, reducir costos y optimizar decisiones de manejo (Qamaruz et al., 1998).

El manejo de recursos naturales incluye los aspectos de: a) aprovechamiento a través de la extracción de recursos, así como también con la domesticación y cultivo de plantas, b) conservación *in situ* y *ex situ*, c) control en el caso de algunas plantas (e.g. malezas) y d) restauración, incluyendo la reintroducción de organismos y otras prácticas de manejo para la rehabilitación de las poblaciones. Sin embargo, el manejo de recursos silvestres por lo general solo incluye su aprovechamiento a través de la extracción de los recursos, sin tomar en consideración los demás aspectos, por lo cual muchas de las poblaciones silvestres se han visto afectadas negativamente.

El efecto que tenga la extracción sobre los procesos ecológicos y genéticos dependerá tanto de las características intrínsecas de los organismos, como de las características del manejo extractivo que se efectúe, tales como la intensidad, la frecuencia y la extensión.

En la literatura son escasos y dispersos los trabajos que evalúan el efecto del manejo en la diversidad o estructura genética de las poblaciones, por lo que en este capítulo se revisan diferentes fenómenos y procesos relacionados con la diversidad genética de las poblaciones y como se espera que serán modificados con el manejo de recursos. También se revisan algunos efectos del manejo sobre procesos ecológicos, de tal forma que en periodos de tiempo cortos afectan la viabilidad de las poblaciones. Finalmente se resalta la importancia de efectuar estudios interdisciplinarios para plantear estrategias adecuadas de manejo.

2 Conceptos básicos de procesos genéticos más afectados con el manejo de recursos

2.1 Endogamia—Es el resultado de la reproducción entre individuos emparentados. Durante la recombinación se lleva a cabo una reorganización de los alelos en los genotipos, de tal forma que en una población en la cual existe endogamia, la frecuencia de homocigotos se incrementa y la frecuencia de heterocigotos disminuye, con respecto a las proporciones esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg (Ridley, 1996; Hedrick, 2000).

El ***coeficiente de endogamia*** f , se define como la probabilidad de que dos alelos homólogos en un individuo sean idénticos por descendencia.

$$f = 1 - \frac{H}{2pq}$$

En donde:

f — coeficiente de endogamia, H – heterocigosidad, p - frecuencia del alelo A , q – frecuencia del alelo a

Con esta ecuación se observa que f es una función de la proporción de la heterocigosidad. Con endogamia, $H < 2pq$ y por lo tanto $f > 0$, si $f = 1$, es el máximo valor que puede tener f y solo se tienen homocigos. Si $f = 0$, los genotipos se encuentran en las proporciones esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

La endogamia tiene el efecto de incrementar la frecuencia de homócigos, lo cual en muchos casos incrementa la incidencia de homócigos con alelos recesivos deletéreos, ocasionando una menor adecuación por incidencia de enfermedades o menor capacidad adaptativa. Esta disminución en la adecuación debida a la endogamia, se conoce como ***depresión por endogamia***, la cual al parecer es un fenómeno universal.

2.2 Deriva génica—La deriva génica es un proceso en el cual existen cambios debidos al azar en las frecuencias alélicas (con la misma adecuación) entre generaciones a través del tiempo, lo que significa que aún en ausencia de selección existen cambios en esas frecuencias (Ridley, 1996; Hartl y Clark, 1997). La tasa de cambio de las frecuencias alélicas por deriva, depende del tamaño de la población y por ello es más notoria en poblaciones pequeñas.

Tamaño de la población y tamaño efectivo de la población. Se considera que el tamaño de la población (N) determina el efecto de la deriva génica sobre las frecuencias alélicas. En sentido ecológico, N puede medirse contando el número total de individuos o el número de individuos adultos en un área. Sin embargo, desde un punto de vista evolutivo, lo importante es el número de individuos reproductivos y más en particular, su contribución genética a la siguiente generación, sugiriéndose el concepto de tamaño efectivo de la población (N_e), el cual está influido por diversos factores, que son importantes considerar en el manejo de recursos. Tales factores son: la proporción de sexos de los individuos reproductivos, las fluctuaciones del número de individuos reproductivos en diferentes generaciones, el tipo de reproducción y la fertilidad variable (Hedrick, 2000).

2.3. Flujo de genes—En la mayoría de las especies, las poblaciones están subdivididas en unidades más pequeñas debido a factores geográficos, ecológicos o de comportamiento. El movimiento entre esos grupos o subpoblaciones a través de gametos, propágulos e individuos, que resulta en intercambio genético, es el proceso conocido como ***flujo de genes o flujo génico*** (Neigel, 1997; Hedrick, 2000). Cuando la cantidad de flujo génico entre grupos es alta, tiene el efecto de homogeneizar la variación genética entre los grupos. Cuando el flujo génico es bajo, la deriva génica, la reproducción no al azar, la selección y mutación pueden ocasionar diferenciación genética entre los grupos o subpoblaciones. Esas diferencias en la variación genética entre sus partes constituyentes es lo que se conoce como ***estructura genética*** (Caja 1).

Se han propuesto diferentes modelos de flujo génico, como son: continente – isla, islas de Wrigth, modelo escalonado, aislamiento por distancia, modelos de metapoblaciones, modelos de coalescencia, modelos de loci altamente mutantes, modelos para genomas de organelos (Caja 2).

En el caso de especies muy manejadas, incluyendo las que se extraen mucho, se predice que se ocasionará una inestabilidad demográfica o heterogeneidad entre las poblaciones, lo cual puede causar una pérdida de la correlación entre la diferenciación de las poblaciones (F_{ST}) y el número de migrantes (N_m).

3 Consecuencias genéticas de la disminución del tamaño poblacional

En general el manejo extractivo conlleva a una disminución en el tamaño de las poblaciones de plantas, en lo particular del tamaño efectivo de la población, con lo cual se sugiere que los procesos de deriva génica y endogamia se incrementan, ocasionando una erosión genética (Figura 2). Con la intención de apoyar esta idea, se analizan los patrones de diversidad y estructura genética generales, así como de especies endémicas o raras como indicadores de especies con densidades poblacionales bajas, también se revisa una comparación de los niveles de diversidad genética de especies endémicas y sus congéneres de amplia distribución.

3.1 Análisis de patrones generales de diversidad y estructura genética en plantas—Como ya se mencionó, la diversidad y la estructura genética de las poblaciones de plantas se ha relacionado con diversos factores ecológicos y atributos de historia de vida (Hamrick y Godt, 1990; Hamrick y Godt, 1996; Hooper y Haufler, 1997). En este capítulo, nos es relevante la amplitud geográfica de las especies en relación a los niveles de variación genética. Se ha documentado que a groso modo, las especies endémicas tienden a poseer menor diversidad genética que las especies de amplia distribución (Cuadro 1) (Hamrick y Godt, 1996).

3.2 Variación y estructura genética en especies endémicas y en especies raras—Se han reportado niveles bajos de variación genética en especies endémicas y en especies raras, incluso en algunos casos se registra una ausencia completa de variación genética, p.ej., con aloenzimas se han reportado valores de $P = 0$, $H_O = 0$ en algunas orquídeas terrestres como *Cephalanthera damasonium* Druce (Scacchi et al., 1991); *Cypripedium arietinum* R. Br. (Case, 1994); *Spiranthes hongkongensis* S. Y. Hu & G. Barretto (Sun, 1996); y *Zeuxine strateumatica* (L.)

Schltr. (Sun, 1997). Este fenómeno se explica por posibles cuellos de botella con los que fue eliminada la variación genética en poblaciones ancestrales y también por su tipo de reproducción autógena y en el caso de *Z. strateumatica*, apomíctica.

En otras especies que son endémicas, se reportan niveles bajos de variación genética como en el caso del árbol *Fitzroya cupressoides* I. M. Johnst., el cual es una conífera que habita en los bosques subantárticos sudamericanos, se registran valores de $P = 23\%$ y $H_E = 0.077$, aproximadamente de la mitad de los niveles típicos publicados para otras gimnospermas ($P = 53\%$ y $H = 0.155$) (Premoli et al., 2000).

Existen algunas excepciones del patrón general de poca variación genética en plantas endémicas y en raras, p. ej. en *Abronia macrocarpa* L. A. Galloway, que es una herbácea endémica de Texas, EUA, se registran altos valores de diversidad genética ($P = 53.17\%$, $A = 1.83$, $H_E = 0.197$) en comparación con los reportados en otras plantas con semilla ($P = 34.2\%$, $A = 1.53$ y $H_E = 0.113$) probablemente por su origen relictual asociado con poliploidia ancestral, así como por su sistema de reproducción exógama, su alta densidad poblacional y número efectivo de población (N_e de 500 a 8000) (Williamson et al., 1999).

En *Pinus rzedowskii* Madrigal & M. Caballero que es una especie endémica de la Sierra Madre del Sur, en el estado de Michoacán, México, también se reportan valores altos de diversidad genética ($P = 46.8$, $A = 1.8$ y $H_E = 0.219$). Sin embargo, a nivel de esta especie es posible observar que las poblaciones de mayor tamaño presentan mayores valores de diversidad genética que las poblaciones más pequeñas (Delgado et al., 1999).

Se considera que los valores diferenciales de variación genética encontrados en plantas raras o en endémicas, responden a diferentes factores históricos, ecológicos y genéticos que en particular han operado para esas poblaciones.

3.3 Comparación de especies raras y sus congéneres de amplia distribución—Diversos trabajos han identificado efectos significativos de la amplitud geográfica sobre la diversidad genética (Hamrick y Godt, 1990). Una limitación potencial de tales trabajos es que los taxa incluidos son tratados como muestras independientes, ignorando sus relaciones filogenéticas, por lo cual, se sugiere realizar comparaciones congénicas (Harvey y Pagel, 1991).

Al analizar los patrones de variación genética de 101 especies incluyendo raras y sus congéneres de amplia distribución, Gitzendanner y Soltis, (2000), encuentran que para todos los estadísticos de diversidad estudiados (P , A , H_O y H_T), las especies raras presentan niveles significativamente más bajos de diversidad genética que sus congéneres de amplia distribución. Es interesante señalar que para todas las medidas estudiadas, la diversidad de las especies raras está significativa y positivamente correlacionada con la diversidad de sus congéneres de amplia distribución.

Existen en la literatura otros ejemplos en los que también se muestra una menor diversidad genética en especies de distribución restringida que en especies congénéricas con una distribución amplia, e.g. En la orquídea *Cypripedium kentuckiense* C. F. Reed (rara) se registran valores menores de diversidad genética ($P = 25\%$, $A = 1.33$, $H_O = 0.045$) que en *Cypripedium parviflorum* var *pubescens* (Willd.) O. W. Knight, (ampliamente distribuida) con una mayor diversidad genética ($P = 83.3\%$, $A = 2.83$, $H_O = 0.166$) (Case et al., 1998). También en *Gymnadenia odoratissima* (L.) Rich. (rara), con 5 loci de microsatélites, se reportan menores niveles de variación ($H_{EL} = 0.3 - 0.7$) que en su congénere *G. conopsea* (L.) R. Br. (común) ($H_{EL} = 0.6 - 0.8$) (Gustafsson y Sjögren-Gulve, 2002) (Figura 3).

A nivel intraespecífico también se ha encontrado en general una relación entre el tamaño poblacional y los niveles de diversidad genética, e.g. En *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames la proporción de loci polimórficos (P) y el número promedio de alelos por locus (A) o por locus polimórfico (A_P) presentan una correlación positiva con el tamaño poblacional ($R^2 = 0.942$, $p = 0.001$; $R^2 = 0.932$, $p = 0.002$ y $R^2 = 0.923$, $P = 0.002$ respectivamente) (Sun, 1996). En *Anacamptis palustris* (Jacq.) R. M. Bateman, Pridgeon & M. W. Chase, se observa también este patrón entre el tamaño poblacional y la diversidad genética (Cozzolino et al., 2003).

4 Efecto de la actividad humana en la diversidad y estructura genética de las poblaciones de plantas.

La actividad humana ha ocasionado por lo general la reducción de los tamaños poblacionales con la transformación de hábitats naturales en áreas agrícolas y urbanas, su fragmentación y alteración, el manejo a través de la extracción de las especies, el cambio de la estructura demográfica de las poblaciones, la degradación del medioambiente con contaminantes

atmosféricos y del suelo, la introducción de plagas, enfermedades y competidoras exóticas, así como domesticado y seleccionado especies. Todas estas actividades han impactado la diversidad de las especies, y también han afectado los procesos evolutivos de selección, flujo génico, endogamia, deriva génica y mutación, con lo cuál se predice que se han modificado la diversidad y estructura genética de las poblaciones de plantas (Ledig, 1992; Brown, 1992). Algunas de estas acciones son históricas, la mayoría se han acentuado actualmente y algunas, como el calentamiento global, se proyectan a futuro (Ledig, 1992).

Dentro del contexto de manejo de recursos naturales y conservación de sistemas vegetales, se revisan en particular los efectos de la extracción y la fragmentación, en la diversidad y estructura genética.

Teóricamente, los cambios en las poblaciones asociados a la extracción y la fragmentación, con la disminución del tamaño de las poblaciones, van a ocasionar una erosión de la variación genética y un incremento en la diferenciación de sus poblaciones, debido a un incremento en la deriva génica, mayor endogamia y reducción en el flujo génico. Como se indica en la Figura 4, la extracción y la fragmentación, pueden ser de tal intensidad, que incluso extinguen poblaciones locales, ocasionando que las poblaciones remanentes queden más distantes, con lo cual se disminuye el flujo génico, ocasionando un mayor aislamiento de estas poblaciones y endogamia en las mismas.

Se predice que los cambios en las poblaciones asociados a la degradación del hábitat, pueden afectar la viabilidad de las poblaciones a corto y a largo plazo. A corto plazo, aquellas poblaciones de plantas bajo disturbio, se espera que sufran un incremento en la susceptibilidad a plagas y enfermedades, una pérdida de alelos de incompatibilidad y la fijación de alelos deletéreos. A largo plazo, la pérdida de variación genética, se espera que reduzca la habilidad de las poblaciones a responder a presiones de selección cambiantes (Lowe et al., 2005).

Sin embargo, en estudios empíricos no siempre se confirma la teoría, se sugiere que las características de historia de vida en particular de algunas especies (sistema reproductivo, longevidad, mecanismos de dispersión de polen y semillas) pueden ayudar a mitigar la pérdida de variación genética en condiciones de disturbio (Bacles et al., 2005; Lowe et al., 2005). La mayor parte de estudios que emplean medidas de diversidad genética, no han encontrado

consecuencias significativas en estos parámetros, pero si en los niveles de endogamia en la progenie, en el éxito reproductivo y en la adecuación (Ledig, 1992; Keller y Waller, 2002; Lowe et al., 2005).

Los niveles de depresión por endogamia varían a través de los taxa, las poblaciones y las condiciones del medio ambiente, sin embargo, se considera que ocurre con frecuencia en la naturaleza y puede afectar fuertemente la viabilidad tanto de los individuos como de las poblaciones (Keller y Waller, 2002; Wallace, 2003; Lowe et al., 2005). La respuesta de las poblaciones en términos de viabilidad, depende de la composición de la variación genética. En especies de ciclo de vida largo, históricamente con exocruzamiento, como los árboles neotropicales, se espera que tengan altos niveles de variación genética, incluyendo alelos recesivos deletéreos que son enmascarados en múltiples loci heterocigos, sin embargo, al aumentar la endogamia, y con esto los homocigos, se esperan efectos negativos en la adecuación (Lowe et al., 2005).

Muchas especies tropicales han sido sobreexplotadas y se han modificado grandemente sus rangos de distribución originales, p.ej. *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn. Sin embargo en su hábitat permanecen individuos de tamaño no comercial, pudiendo probablemente restablecerse en parte sus poblaciones.

Si la extracción es selectiva, como en muchos casos sucede, puede tener un impacto en la genética, ya que en general se extraen los ejemplares de mejor calidad (p.ej. *Pinus strobus* L.) dejándose los de menor calidad, siendo estos últimos los que regeneran la población.

Por otro lado, la fragmentación, en general, conlleva a una pérdida local de especies. La literatura muestra que en el bosque tropical perennifolio los fragmentos aislados presentan una reducción en la riqueza de especies en relación a áreas de bosque continuo y fragmentos pequeños tienen menos especies que fragmentos grandes (Turner, 1996).

En otros hábitats, como es el caso de las montañas Adirondack, New York, también se ha encontrado que los fragmentos de área pequeña tienen menor cantidad de especies de plantas árticas - alpinas que fragmentos de un área mayor (Ledig, 1992) (Fig 5). La extinción local se incrementa debido a fenómenos demográficos estocásticos y a que la probabilidad de

reemplazamiento por migración disminuye, ya que un número menor de dispersantes encuentran a un fragmento pequeño que a uno grande. Bajo tales circunstancias, se predice que las plantas pioneras o malezas invasoras, se verán favorecidas e incrementarán su ocurrencia.

Algunos ejemplos que han mostrado como lo predice la teoría, que con la fragmentación, a nivel poblacional hay una tendencia a disminuir la variación genética, son el árbol *Eucalyptus albens* Miq., las herbáceas *Salvia pratensis* L., *Scabiosa columbaria* L., *Gentiana pneumonanthe* L., y *Viola pubescens* Aiton (Young et al., 1996; Culley y Grubb, 2003), en las cuales se observa una correlación positiva y significativa entre el tamaño de las poblaciones remanentes y la diversidad genética como se ilustra en la Fig. 6, para las cuatro primeras especies. En algunos árboles tropicales también se ha encontrado que la fragmentación del bosque puede ocasionar cambios en la estructura genética de las poblaciones remanentes, ya que el número de genotipos disminuye con respecto a las poblaciones originales por la pérdida de individuos reproductivos y por una mayor probabilidad de aparearse con individuos emparentados (Nason y Hamrick, 1997; Nason et al., 1997).

En *Anacamptis palustris*, orquídea de zonas costeras del Mediterráneo cuyas poblaciones han sido fuertemente fragmentadas y aisladas, también se aprecia con un locus de microsatélite de cloroplasto, una correlación positiva de la diversidad genética con el tamaño poblacional (Fig. 7). Además, al estimar la diversidad observada, la esperada y con el análisis del número de haplotipos y sus distribuciones de frecuencia, se evidencian cuellos de botella en las poblaciones más pequeñas, lo cual se considera una consecuencia de cambios antropogénicos (Cozzolino et al., 2003).

En muchas otras especies, como se indicó anteriormente, no se registra una menor diversidad genética en las poblaciones remanentes más pequeñas en relación a poblaciones remanentes más grandes, sin embargo, otros atributos pueden verse afectados, e.g. en *Samanea saman* (Jacq.) Merr., que es un árbol de bosque tropical seco, resultó comparable la diversidad genética (H_e) en árboles aislados y en árboles de poblaciones continuas, sin embargo, la tasa de autofecundación efectiva y el coeficiente de endogamia, fue ligeramente mayor en árboles aislados que en los de poblaciones continuas. También se registró una mayor similitud genética en la progenie de árboles aislados dentro y entre frutos. Por otro lado, las semillas producidas

por árboles en poblaciones continuas tuvieron mayor posibilidad de germinar y producir mayor área foliar y biomasa que las plántulas de la progenie de árboles aislados; por lo que la fragmentación de bosques tropicales secos en este caso, afecta procesos genéticos y el vigor de la progenie de *S. saman*, lo que puede tener un efecto significativo en la permanencia a largo plazo de sus poblaciones y en la regeneración del bosque (Cascante et al., 2002).

En *Laelia speciosa* (HBK) Schltr., la cual es una orquídea endémica de México cuyas poblaciones se encuentran declinando principalmente por la destrucción de su hábitat y la fuerte extracción a la que ha estado sujeta, con un estudio realizado con 16 loci de aloenzimas, se registran altos valores promedio de diversidad genética en nueve poblaciones a través de su rango de distribución geográfica ($P = 76.4\%$, $A = 3.34$, $H_O = 0.302$, $H_E = 0.382$) (Ávila y Oyama, 2007), mayores a los reportados por Hamrick y Godt (1990) para especies de plantas monocotiledóneas ($P = 59.20$, $A = 2.38$, $H_E = 0.181$), de especies herbáceas perennes ($P = 39.60$, $A = 1.42$, $H_E = 0.205$), plantas con un amplio rango de distribución geográfica ($P = 58.90$, $A = 2.29$, $H_E = 0.202$), plantas con semillas dispersadas por el viento ($P = 55.4$, $A = 2.10$, $H_E = 0.144$) y de aquellas con reproducción sexual ($P = 51.60$, $A = 2.00$, $H_E = 0.151$). La alta variación genética encontrada en *L. speciosa* puede explicarse por el tipo de reproducción predominantemente exógama (Ávila-Díaz et al., dat. no publ.), también, como es el caso de las demás orquídeas, por su alta producción de semillas pequeñas dispersadas por el viento, favoreciendo el flujo génico entre sus poblaciones (Dressler, 1981; Murren y Ellison, 1998; Trapnell y Hamrick, 2004; Trapnell et al., 2004). Adicionalmente, su hábito de vida perenne, su amplio rango de distribución geográfica y grandes tamaños poblacionales en el pasado reciente, podrían explicar también su alta diversidad genética (Ávila y Oyama, 2007).

Es interesante hacer notar que incluso en aquellas poblaciones más extraídas y con el hábitat más alterado, también se registran altos valores de diversidad genética. Al llevar a cabo un análisis con una submuestra de las poblaciones a lo largo de su distribución geográfica, con tres poblaciones bien conservadas (Grado de conservación 3) y con tres poblaciones en las que ha sido fuertemente alterado su hábitat y sujetas a una alta extracción (grado de conservación 1), se encuentra que no existen diferencias significativas entre heterocigosidad observada ni esperada (prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.05$) ni entre el número de alelos por loci (prueba de Wilcoxon, $p = 0.05$) entre los dos grupos de poblaciones, las bien conservadas y las alteradas

(Cuadro 2). Se considera que las consecuencias genéticas del manejo aún no se reflejan en los parámetros genéticos, ya que es posible que el número de generaciones que han pasado desde que inició la fuerte alteración de su hábitat o extracción sean pocas para detectar los efectos en la variación y estructura genética en aquellas poblaciones más alteradas en comparación con las que se encuentran en bosques continuos, de tal forma que no se observan diferencias en heterocigosidad, ya que probablemente las plantas que fueron muestreadas para este estudio, han estado presentes antes del disturbio humano, por lo que los resultados pueden no revelar la variación genética de las nuevas plántulas ni las tasas actuales de diferenciación sino más bien la estructura genética preexistente. Ejemplos de otras especies que se han visto reducidos sus tamaños poblacionales recientemente por actividades antropocéntricas y en las que también se registran altos valores de diversidad genética son: *Pterostylis aff. picta* NG & ML (Sharma et al., 2003), *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Gustafsson, 2000), *Caryocar brasiliense* St. Hil. (Collevatti et al., 2001).

5 Efecto de la actividad humana en procesos ecológicos

Otro efecto de la actividad humana a través de la fragmentación del hábitat y disminución de los tamaños poblacionales con la extracción de recursos vegetales, se da sobre aquellos procesos ecológicos que sustentan la biodiversidad y función de los ecosistemas, como son la polinización, el éxito reproductivo, la dispersión de semillas, la germinación o sobrevivencia de plántulas y su establecimiento, así como los niveles de herbivoría de las poblaciones remanentes (Thompson, 1996; Cane y Tepedino, 2001; Aguilar R., 2006). En los bosques tropicales, estos procesos, pueden ser particularmente susceptibles a la transformación del paisaje, ya que muchas especies de plantas tropicales tienen baja densidad, sistema de auto-incompatibilidad y altas tasas de exogamia (Cascante et al., 2002), requiriendo en general de animales para su polinización y dispersión de semillas (Bawa y Hadley, 1990; Bullock, 1995).

Se considera que la fragmentación puede cambiar sustancialmente la composición y estructura de la vegetación, ya que es detrimental para algunas especies pero benéfica para otras, algunas veces con repercusiones importantes en los organismos interactuantes (Cane y Tepedino, 2001; Ghazoul y Shaanker, 2004a; Ghazoul J., 2004). El disturbio favorece plantas que son menos dependientes de animales mutualistas para su reproducción como aquellas que son

autógamas, polinizadas o dispersadas pasivamente o por el viento y puede reducir poblaciones de plantas exógamas obligadas, polinizadas o dispersadas por animales (Ghazoul y Shaanker, 2004a; Ghazoul y Shaanker, 2004b). Las actividades antropocéntricas al modificar el hábitat pueden alterar tanto la diversidad (Cane, 2001), como la abundancia (Eguiarte y Búrquez, 1988; Parra-Tabla et al., 2000; Cane, 2001) y el comportamiento de agentes polinizadores y dispersores (Cane y Tepedino, 2001; Ghazoul y Shaanker, 2004a) dado que se reduce la densidad del recurso potencial de alimento de dichos agentes, se incrementa la distancia entre esos recursos, se pierden hábitats para anidación y refugios de sus depredadores (Aizen y Feinsinger, 1994).

En una variedad de ambientes, con plantas con diferentes características de historia de vida, aisladas o en poblaciones fragmentadas, se ha mostrado genéricamente que la reproducción sexual es afectada negativamente, observándose una reducción en el éxito reproductivo, debido a una disminución en la eficiencia de la polinización (Cunningham, 2000; Ghazoul y Shaanker, 2004a; Johnson et al., 2004; Aguilar et al., 2006). El efecto negativo de la fragmentación es variable entre las diferentes especies y al parecer, está correlacionado con su sistema de apareamiento, el cual expresa el grado de dependencia de sus polinizadores (Aguilar et al., 2006). Por ejemplo en *Gerbera aurantiaca* Sch. Bip, la cual es una herbácea perenne, autoincompatible cuyas poblaciones han sido fuertemente fragmentadas y aisladas en el sur de África, se registra una menor abundancia de su polinizador *Eriesthis vulpina* Burmeister en poblaciones remanentes pequeñas que en las grandes, como se muestra en la Fig. 9. También se registra para la misma especie un menor número promedio de semillas por capítulo en poblaciones pequeñas (Johnson et al., 2004).

En *Manfreda brachystachya* (Cav.) Rose, una Agavácea que crece en el centro de México, se observó una reducción (75%) en la fecundidad entre los años 1982 y 1985, explicada por un descenso en las poblaciones de su polinizador más importante, el murciélago nectarívoro *Leptonycteris sanborni* Hoffmeister (Eguiarte y Búrquez, 1988).

Al estudiar el éxito de la polinización de *Oncidium ascendens* Lindl. en dos fragmentos de bosque tropical seco, uno bien conservado de aproximadamente 10has, en contraste con otro sitio perturbado de aproximadamente 1ha, se encuentra que la remoción de polinias se

incrementa en 3 años de observación un 7% en el sitio conservado, mientras que en el sitio perturbado disminuye en 5%, sugiriéndose una menor actividad de polinizadores en el sitio perturbado (Fig. 10^a). En el sitio conservado, la producción de frutos permaneció relativamente constante, mientras que en el sitio perturbado disminuyó como consecuencia de la disponibilidad diferencial de polinizadores (Fig. 10b) (Parra-Tabla, et al., 2000).

Los efectos de la fragmentación sobre los polinizadores, el éxito reproductivo de las plantas y los patrones de su sistema reproductivo pueden ser variables, e.g., en diversas especies de *Ceiba* (Bombacaceae), las cuales son polinizadas por murciélagos, se encuentra que el efecto de la fragmentación varía entre las especies estudiadas, probablemente por las diferencias en los patrones de floración, el comportamiento de forrajeo de los polinizadores y los sistemas de incompatibilidad de las plantas (Quesada et al., 2004)

En el caso de *L. speciosa*, contrario a lo que se esperaría, se encuentra un mayor número de frutos, en un sitio perturbado que en uno conservado, atribuyéndose esto tal vez a que se ve afectada la actividad de los polinizadores, sugiriéndose que por un lado *Apis mellifera* L. puede estar participando en la polinización (Medina, 2004), lo cual coincide con lo reportado en otras plantas de sitios perturbados (Dick et al., 2003, Johnson et al., 2004) y por otro lado, existen plantas invasoras que constituyen otra fuente potencial de alimento para los polinizadores, modificando su actividad.

Debe tomarse en consideración que los procesos de polinización y dispersión, además de ser afectados directamente por el disturbio, también son influenciados por muchos otros factores físicos y ecológicos correlacionados, como lo es el efecto de borde debido a la fragmentación, la creación de claros por el disturbio, cambios en la composición de la vegetación, e incremento en la abundancia de las especies invasoras. De esta manera, las respuestas en la polinización o dispersión al disturbio y fragmentación, son complejas y específicas de cada caso particular (Ghazoul y Shaanker, 2004b).

6 Consecuencias genéticas del manejo de poblaciones de plantas

Por lo regular, el manejo de poblaciones de plantas es de tipo extractivo, ocasionando un efecto negativo en la diversidad genética y viabilidad, ya que disminuye el tamaño de la

población, en particular, el tamaño efectivo de la población, así como también el flujo génico. Con esto, se contempla que los procesos de endogamia y deriva génica se ven incrementados, por lo que se teóricamente se predice que se ocasionará a largo plazo una erosión genética, disminuyendo su potencial evolutivo y a más corto plazo, una disminución de la adecuación de los organismos, poniendo en riesgo la viabilidad de las poblaciones. Cabe hacer notar que el manejo extractivo puede ser tal, que altere de manera importante los procesos ecológicos, como son disminuciones drásticas en el tamaño de la población, la fecundidad, reclutamiento, entre otros, siendo en este caso el efecto negativo de tal magnitud, que se ponga en riesgo a las poblaciones en un tiempo corto, como es el caso de muchas poblaciones de plantas que son utilizadas con fines medicinales, ornamentales y otros.

El efecto del manejo de poblaciones de plantas puede ser nulo (0), si este es de tal forma que se mantengan los tamaños efectivos de la población y el flujo génico, conservando la diversidad genética, manteniendo la adecuación de los organismos y el potencial evolutivo de las especies a largo plazo, con esto la viabilidad de las poblaciones. Si el manejo tampoco altera los procesos ecológicos, también se favorece la viabilidad de las poblaciones.

Si el manejo es tal que tome en cuenta la conservación, restauración, probablemente el cultivo de recursos vegetales, su efecto sobre la diversidad genética puede ser positivo (+) dado que se puede incrementar el tamaño efectivo de la población y el flujo génico, (e.g. pueden llevarse a cabo polinizaciones artificiales adecuadas). Con una mayor variación genética y una mayor adecuación de los organismos, se permitirá una mayor viabilidad de las poblaciones. Por otro lado, con el manejo, se pueden favorecer procesos ecológicos que también favorezcan la viabilidad de las poblaciones.

Es importante resaltar que altos niveles de flujo génico pueden ayudar a amortiguar la pérdida de variación genética, permitiendo la viabilidad de las poblaciones a largo plazo. En este contexto, los fragmentos de bosque, poblaciones y árboles aislados pueden ser importantes para permitir el flujo génico entre fragmentos, proporcionando una conectividad y favoreciendo la variabilidad en las poblaciones.

7 Conclusiones

1. Es importante incorporar análisis genéticos para el manejo de recursos vegetales.
2. Las consecuencias genéticas del manejo de recursos vegetales dependen de las características de los organismos y el tipo de manejo, considerándose teóricamente, que con el manejo extractivo y reducción de los tamaños poblacionales que por lo general se lleva a cabo, se está afectando la variación y estructura genética de las poblaciones de plantas, aunque muchos de los estudios empíricos no encuentran consecuencias genéticas significativas en cuanto a heterocigosidad y polimorfismo en poblaciones degradadas, probablemente porque la pérdida de variación, es un proceso lento, que puede llevar décadas o siglos después de varias generaciones; sin embargo, otros aspectos en la progenie, como endogamia y adecuación se han visto seriamente afectados, inmediatamente después del disturbio.
3. Procesos ecológicos que sustentan la biodiversidad y función de los ecosistemas, como la polinización y el éxito reproductivo de las poblaciones remanentes, se han visto afectados negativamente con la alteración del medio.
4. Es importante resaltar la relación entre los factores genéticos, ecológicos e históricos en la viabilidad de las poblaciones, considerando necesario llevar a cabo estudios interdisciplinarios que sean la base para implementar un manejo sustentable de los recursos.

8 Perspectivas

- Llevar a cabo estudios bajo diferentes condiciones de manejo, para evaluar el impacto de este, en la diversidad y estructura genética de las poblaciones, tomando en consideración estructura de edades.
- Llevar a cabo estudios a largo plazo, que evalúen la variación y estructura genética antes y después del disturbio, considerando un gran número de individuos o réplicas.
- Realizar estudios en los que se incluyan especies con características de historia de vida contrastantes, dentro del mismo sitio de estudio de tal forma que se incluyan poblaciones de diferente tamaño, aislamiento y duración del impacto.
- Evaluar el flujo génico actual, bajo diferentes condiciones de disturbio.

- Implementar más estudios para entender las consecuencias de los cambios de los procesos ecológicos como la polinización, el éxito reproductivo, la dispersión de semillas, la germinación y establecimiento de plántulas, así como los niveles de herbivoría en hábitats alterados y fragmentados, tanto de especies raras como de especies comunes, para detectar las especies y procesos más susceptibles al disturbio.

Se considera que la información generada con la investigación propuesta, es fundamental para un manejo adecuado de los recursos vegetales, que permita la conservación de la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas en el futuro próximo.

LITERATURA CITADA

Aguilar, R., L. Ashworth, L. Galetto y M. A. Aizen. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters* 9: (en prensa) xxx-xxx.

Aizen, M. A., P. Feinsinger. 1994. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral Honey bees in Argentine "Chaco Serrano". *Ecological Applications*. 4: 378-392.

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

Bawa, K. S., M. Hadley. 1990. Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants. Parthenon. Paris.

Bacles, C. F. E., J. Burczyk, A. J. Lowe y R. A. Ennos. 2005. Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. *Evolution*. 59: 979-990.

Bowen, B. W. 1999. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* 8: 5-10. Brown, A. H. D. 1992. Human impact on plant gene pools and sampling for their conservation. *Oikos* 63: 109-118.

Bullock, S. H. 1995. Plant reproduction in neotropical dry forest. En: Bullock S. H., H. Mooney y E. Medina [eds.], 277-303. *Seasonally Dry Tropical Forest*. Cambridge University Press. Cambridge.

Case, M. A. 1994. Extensive variation in the levels of genetic diversity and degree of relatedness among five species of *Cypripedium* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 81: 175–184.

Case, M. A., H. T. Mlodozieniec, L.E. Wallace y T.W. Weldy. 1998. Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky lady's slipper: *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 1779 – 1786.

Cane, J. H. 2001. Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? *Conservation Ecology* 5 (1):3. [online] URL: [http:// www.consecol.org/vol5/iss1/art3](http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3).

Cane, J. H. y J. V. Tepedino. 2001. Causes and extent of declines among native North American invertebrate pollinators: detection, evidence and consequences. *Conservation Ecology* 5:1. [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art1>.

Cascante, A., M. Quesada, J. J. Lobo y E. A. Fuchs. 2002. Effects of Dry Tropical Forest Fragmentation on the Reproductive Success and Genetic Structure of the Tree *Samanea saman*. *Conservation Biology* 16: 137- 147.

Collevatti, R. G., D. Grattapaglia y J. D. Hay. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 349 - 356

Cozzolino, S, M. E. Noce, A. Musacchio y A. Widmer. 2003. Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 90: 1681-1687.

Culley, T. M. y T. C. Grubb, 2003. Genetic effects of habitat fragmentation in *Viola pubescens* (Violaceae), a perennial herb with chasmogamous and cleistogamous flowers. *Molecular Ecology* 12: 2919-2930.

- Cunningham, S. A. 2000. Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proc. R. Soc. Lond.* 267: 1149-1152.
- Delgado, P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser y E. R. Alvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 85: 669-676.
- Dressler, R. L. 1981. The Orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Eguiarte, L. E., A. Búrquez. 1988. Reducción en la fecundidad de *Manfreda brachystachya* (Cav.) Rose, una agavácea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. *Boletín de la Sociedad Mexicana de México* 48: 147-149.
- Ellstrand, N. C. y D. R. Elam. 1993. Population Genetic Consequences of small Population size: Implications for plant Conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Frankham, R. 1995. Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 302-327.
- Frankham, R., J.D. Ballou y D.A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ghazoul, J. 2004. Alien Abduction: Disruption of Native Plant-Pollinator Interactions by Invasive Species. *Biotrópica* 36:156-164.
- Ghazoul, J. y R. U. Shaanker, 2004a. Sex in Space: Pollination among Spatially Isolated Plants. *Biotropica*.36: 128-130.
- Ghazoul, J. y R. U. Shaanker, 2004b. Sex in Space: A Synthesis. *Biotrópica* 36: 180-183
- Gitzendanner, A. M. y S. P. Soltis. 2000. Patterns of Genetic Variation in rare and Widespread Plant Congeners. *American Journal of Botany*. 87: 783-792.

Gustafsson, S. 2000. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology* 9: 1863–1872

Gustafsson, S. y P. Sjögren-Gulve. 2002. Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. *Conservation Genetics* 3: 225-234.

Haig, S. M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413-425.

Hamrick, J. L. y M. J. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. En A.H.D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kalher y B. S. Weir [eds.], *Plant population genetics, breeding and genetic resources*, 43-63. Sinauer, Sunderland, MA.

Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, D. A. Murawski and M. D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology. In D. A. Falk and K. E. Holsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, 75–86. Center for Plant Conservation, Oxford University Press, Oxford, UK.

Hamrick, J. L. y M. J. Godt. 1996. Conservation Genetics of Endemic Plant Species. En J. C. Avise y J. L. Hamrick [eds.], *Conservation Genetics*, 281-303. Chapman and Hall, New York.

Hartl, D. L. y A. G. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. Sinauer, Sunderland, MA.

Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachussets.

Hooper, E. A. y C. H. Haufler. 1997. Genetic diversity and breeding system in a group of neotropical epiphytic ferns (*Pleopeltis*; Polypodiaceae). *American Journal of Botany*. 84: 1664 - 1674.

Johnson, S. D., C. L. Collin, H. J. Wissman; E. Halvarsson y J. Ågren. 2004. Factors Contributing to Variation in Seed Production among Remnant Populations of the Endangered Daisy *Gerbera aurantiaca*. *Biotrópica* 36 (2): 148-155.

Keller, L. F. y D. M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 230-241.

Ledig, F. T. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63: 87-108.

Lowe, A. J., D. Boshier, M. Ward, C. F. E. Bacles y C. Navarro. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273.

Qamaruz-Zaman, F., M. F. Fay, J. S. Parker, y M. W. Chase. 1998. Molecular techniques employed in the assessment of genetic diversity: A review focusing on orchid conservation. *Lindleyana* 13(4): 259-283.

Quesada, M, K. E. Stoner, J. A. Lobo, Y. Herrerías-Diego, C. G. Palacios, M. A. Mungía Rosas, K. A. O. Salazar y V. Rosas-Guerrero. 2004. Effects of Forest Fragmentation on Pollinator Activity and Consequences for Plant Reproductive Success and Mating Patterns in Bat-pollinated Bombacaceous Trees. *Biotrópica* 36(2): 131-138.

Medina, N. D. 2004. Éxito reproductivo en dos poblaciones de *Laelia speciosa* (Lex.) Schltr. (Orchidaceae) en Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Murren, C. J y A. M. Ellison. 1998. Seed dispersal characteristics of *Brassavola nodosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 675–680.

Nason, J. D. y J. L. Hamrick. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. *Journal of Heredity* 88: 264-276.

Neigel, J. E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 105- 28

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

Premoli, A. C., T. Kitzberger, y T. T. Veblen. 2000. Conservation genetics of the endangered conifer *Fitzroya cupressoides* in Chile and Argentina. *Conservation Genetics*, 1: 57-66.

Raven, P. 1987. The scope of the plant conservation problem world-wide. En: Bramwell, D., Hamann, O. Heywood, V. y Synge, H. [eds.], *Botanic Gardens and the World Conservation Strategy*, 19-29. Academic Press, London.

Raymond, M. L., y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.

Ridley, M. 1996. *Evolution*. Blackwell Science. Cambridge, Massachusetts.

Riebesell, J. F. 1982. Arctic–alpine plants on mountaintops: agreement with island biogeography theory. *The American Naturalist* 119: 657-674

Sharma, I. K., D. L. Jones y C. J. French. 2003. Unusually high genetic variability revealed through allozymic polymorphism of an endemic and endangered Australian orchid, *Pterostylis aff. Picta* (Orchidaceae) *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 513-526.

Scacchi, R. G., G. De Angelis y R. M. Corbo. 1991. Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 176: 53-61.

Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher y W. A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.

Schmidt, K y Jensen, K. 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant Populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. *American Journal of Botany* 87: 678-689.

Schemske, D. W., B. C. Husband, M. H. Ruckelshaus, C. Goodwillie, I. M. Parker, y J. G. Bishop. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*, 75: 584-606.

Sork, V. L., J. Nason, D. R. Campbell, and J. F. Fernández. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 219-224.

Sun, M. 1996. Effects of Population Size, Matting System, and Evolutionary origin on Genetic Diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. *Conservation Biology* 10: 785-795.

Sun, M. 1997. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. *American journal of botany* 84: 224-232.

Trapnell, D. W. y J. L. Hamrick. 2004. Partitioning nuclear and chloroplast variation at multiple spatial scales in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 2655–2666.

Trapnell, D. W., J. L. Hamrick y J. D. Nason. 2004. Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 1111–1118.

Turner, I. M. 1996. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* 33: 200- 209.

Thompson, J. N. 1996. Evolutionary ecology and the conservation of biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 11. 300-303.

Vida, G. 1994. Global issues of genetic diversity. En : V. Loeschcke, J. Tomiuk y S.K. Jain [eds.], *Conservation Genetics*, 9-19. Birkhäuser Verlag, Basel.

Young, A., T. Boyle, y T. Brown. 1996. The Population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 413-418.

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

Williamson, S. P. y R. C. Werth. 1999. Levels and patterns of Genetics variation in the endangered species *Abronia macrocarpa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany*, 86: 293-301.

Amplitud geográfica	P especie	H_E especie	P población	H_E población	G_{ST}
Endémica	40.0 c	0.096 c	26.3 c	0.063 c	0.248 a
Distribución restringida	45.1 b, c	0.137 b	30.6 b,c	0.105 b	0.242 a
Regional	52.9 a, b	0.150 b	36.4 a,b	0.118 b	0.216 a
Amplia distribución	58.9 a	0.202 a	43.0 a	0.159 a	0.210 a

Cuadro 1. Valores promedio de diversidad y estructura genética para especies de plantas clasificadas por su amplitud geográfica. P es el porcentaje de loci polimórficos, H_E es el nivel de heterocigosidad esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg y G_{ST} es la proporción de la diversidad total encontrada entre poblaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas (Tomado de Hamrick y Godt, 1996).

Población	Grado de conservación	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>H_E</i>	<i>H_O</i>
Bolaños, Jal.	3	75.0	3.43	0.371	0.271
Mazamitla, Jal.	3	75.0	3.74	0.431	0.358
Xichú, Guanajuato	3	75.0	3.30	0.370	0.313
Promedio más conserva		75	3.49	0.391	0.314
Amole, Durango	1	68.8	3.18	0.333	0.263
La Lobera, Jal.	1	75.0	3.13	0.361	0.316
Tula, Tamaulipas	1	81.3	3.31	0.395	0.292
Promedio más alteradas		75	3.21	0.363	0.290

Cuadro 2. Parámetros genéticos en *Laelia speciosa* de poblaciones contrastantes, con un grado de conservación mayor (3) y otras con hábitat alterados (1) (tomado de Ávila y Oyama, 2007).

Caja 1. Parámetros más comunes para estudiar estructura genética.

F_{ST} = Varianza estandarizada interpoblacional en frecuencias alélicas, indica la diferenciación genética que existe entre las poblaciones:

$$(\sigma_p^2 / \bar{p}i(1 - \bar{p}i))$$

Donde:

σ_p^2 es la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones y $\bar{p}i$ es la frecuencia promedio del alelo i th. Los valores de F_{ST} son calculados para loci y alelos individuales.

G_{ST} = Es la proporción de la diversidad genética total que ocurre entre poblaciones, (D_{ST}/H_T , donde D_{ST} es la diversidad genética entre poblaciones; $D_{ST} = H_T - H_S$, donde H_S es la heterocigosidad promedio dentro de las poblaciones y $H_T = 1 - \sum p_i^2$). G_{ST} puede también calcularse para cada locus.

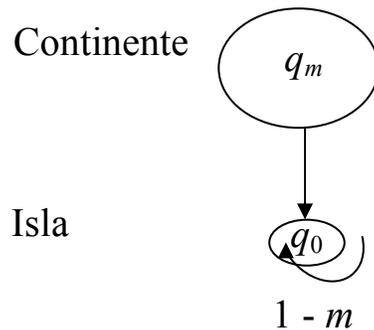
I y D son valores que por lo regular se presentan en una matriz de identidad o de distancia, en la que cada elemento representa una comparación entre poblaciones o especies.

I = Identidad genética o valor de similitud (genética $\sum x_i y_i / (\sum x_i^2 \sum y_i^2)^{0.5}$ (Nei, 1972), donde y_i y x_i son las frecuencias de los i th alelos en las poblaciones y y x . Para poblaciones que no comparten alelos, $I = 0.0$, mientras que para poblaciones con frecuencias alélicas idénticas, $I = 1.0$.

D = Distancia genética ($-\log_e I$).

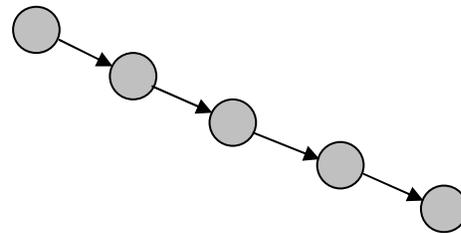
Caja 2. Modelos de flujo génico

Modelo Continente-Isla, presupone un flujo génico unidireccional como el que ocurre de un continente a una población de una isla. De esta manera, si la frecuencia de un alelo A es menor en la isla, con el movimiento de migrantes, se incrementará tal frecuencia y si es mayor, su frecuencia disminuirá.

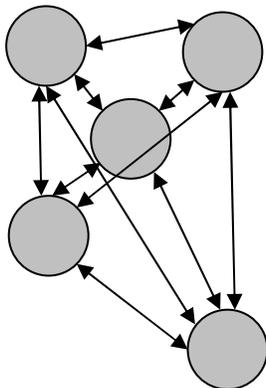


(Tomado de Hedrick, 2000)

Modelo escalonado “stepping stone”, el cual propone que la migración ocurre solamente entre poblaciones vecinas. Las subpoblaciones pueden ser ordenadas en una o más dimensiones. Aunque el flujo génico directo ocurre solamente entre subpoblaciones vecinas, el efecto escalonado permite que ocurra flujo génico entre subpoblaciones que no son vecinas, a través de aquéllas que las conectan.

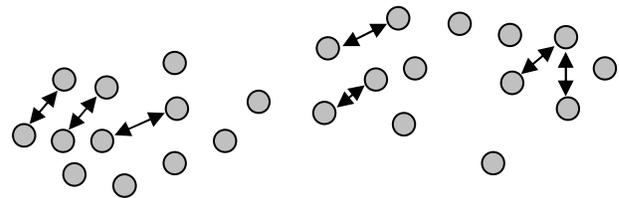


Modelo de Islas de Wright, asume que hay muchas subpoblaciones finitas que son la fuente y reservorio de migrantes. En este modelo el número efectivo de migrantes $N_e m$, se estima a partir de los estadísticos F para un conjunto de n poblaciones.



(Tomado de Sork *et al.*, 1999)

Modelo de aislamiento por distancia, el cual presupone que el flujo génico se lleva a cabo entre los individuos más cercanos y no así con individuos más alejados de la población



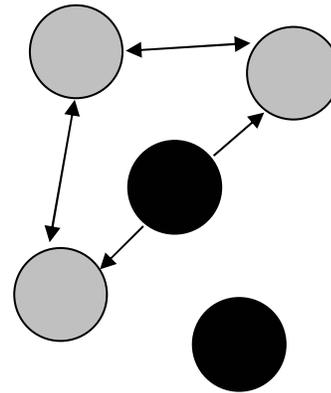
(Tomado de Hedrick, 2000)

Modelos de coalescencia. Los datos de secuencias de nucleótidos en genética de poblaciones han sido acompañados por el desarrollo de modelos genealógicos o de coalescencia, los cuales han permitido probar nuevas hipótesis evolutivas así como la estimación de parámetros de genética de poblaciones. Dos clases de información en una genealogía de secuencias de ADN pueden ser usadas para estimar flujo génico. Primero, la longitud de las ramas que conectan las secuencias en un árbol genealógico, las cuales corresponden a los tiempos de coalescencia. Segundo, el orden relativo de las ramas en el árbol, las cuales corresponden a el orden de los eventos de coalescencia, constituyen las relaciones cladísticas de las secuencias.

Modelos para genomas de organelos.

Se han desarrollado modelos específicos para genética de poblaciones de genomas de organelos (mtADN y cpADN) (Ennos, 1994; Petit, *et al*, 1993; Takahata, 1985). Esos modelos indican que las tasas de flujo génico y de deriva génica dependen de la dispersión de la estructura que los transmite (polen o semilla), del tipo de transmisión de los genomas de organelos (materna, paterna o biparental) y del tamaño efectivo de población de tales genomas. Se predice que genomas de organelos están sujetos a una mayor deriva génica que los genomas nucleares, por su naturaleza haploide y transmisión uniparental que puede reducir el tamaño efectivo de población. Una reducción en flujo génico también es esperada para genomas de organelos con una herencia materna en plantas porque movimientos tanto de la semilla como del polen,

Modelos de metapoblaciones, los cuales asumen un conjunto de poblaciones interconectadas a través del flujo génico, pero dominadas por la dinámica de extinción y colonización.



Los círculos sombreados representan poblaciones extintas. (Tomado de Sork *et al.*, 1999).

resultan en flujo génico de genes nucleares, mientras que solamente la dispersión de semillas resulta en flujo génico de genes con herencia materna.

Caja 3. Parámetros más comunes para medir diversidad genética

Se han utilizado diferentes medidas para evaluar la diversidad genética con marcadores para un solo gen (como aloenzimas). Tales parámetros pueden estimar la diversidad genética a nivel de las especies o de las poblaciones. A nivel de las especies, se estima la diversidad genética total en la especie y a nivel de población, se refiere a los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones, dependiendo de cómo la variación es distribuida. Entre los parámetros más comunes se tienen:

P : Porcentaje de loci polimórficos, considerándose un loci polimórfico, si el alelo más común no se presenta en más del 95% o 99% de los individuos.

A : Número promedio de alelos por locus (incluye loci monomórficos como polimórficos).

A_p : Número promedio de alelos por locus polimórfico.

A_e : Número efectivo de alelos por locus ($1 / \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del alelo i th).

H_o : Heterocigosidad observada, es la proporción de loci heterócigos observados por individuo.

H_e- Heterocigosidad esperada o proporción esperada de loci heterócigos por individuo en una población con apareamientos al azar. $H = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del alelo i th). Esta medida es una función de la proporción de loci polimórficos, el número de alelos por locus polimórfico y frecuencias alélicas. Este parámetro también se llama diversidad genética, y es probablemente la medida más utilizada.

En los parámetros a nivel de especie se escribe un subíndice s y aquellos a nivel de población una p.

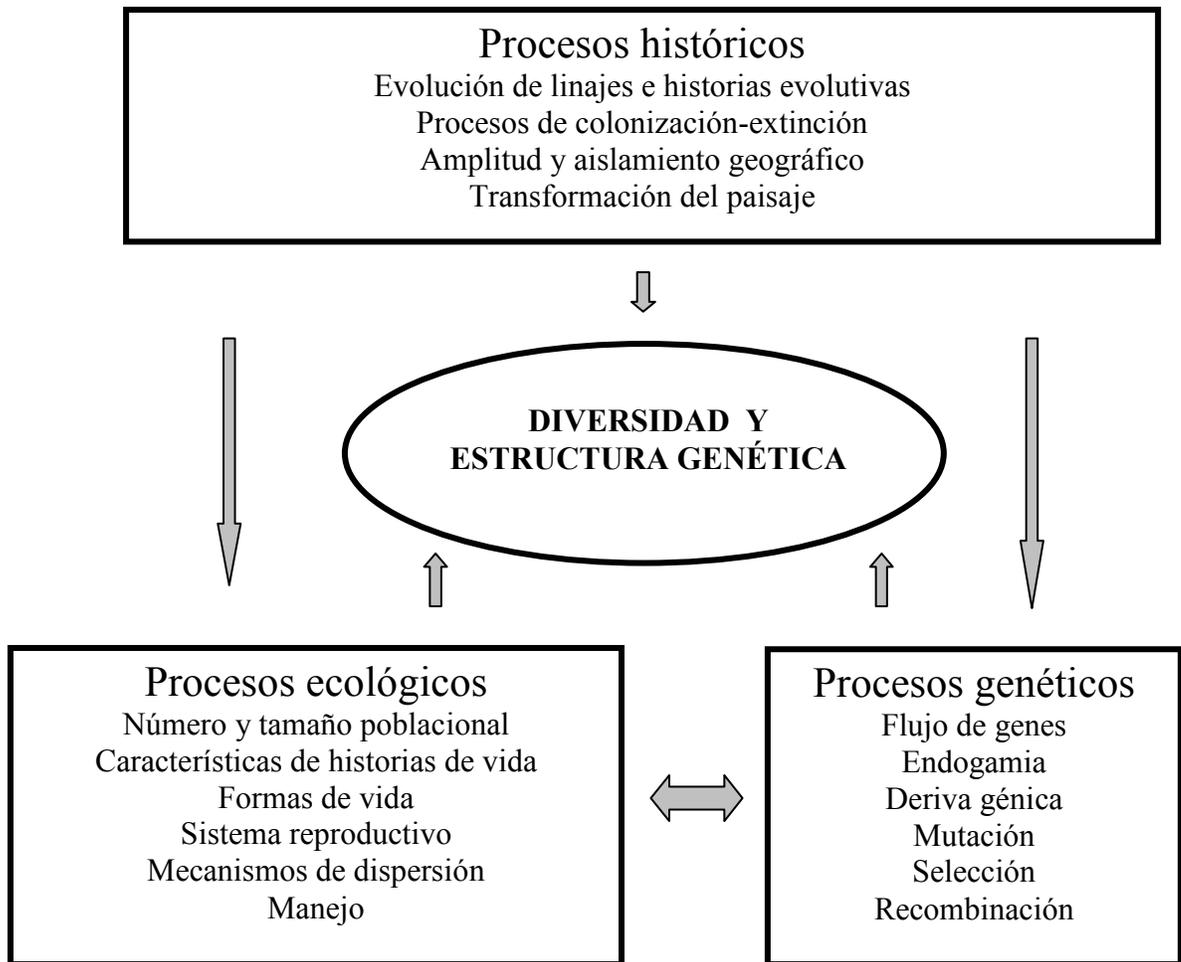


Figura 1. Procesos históricos, ecológicos y genéticos que determinan la estructura y diversidad genética.

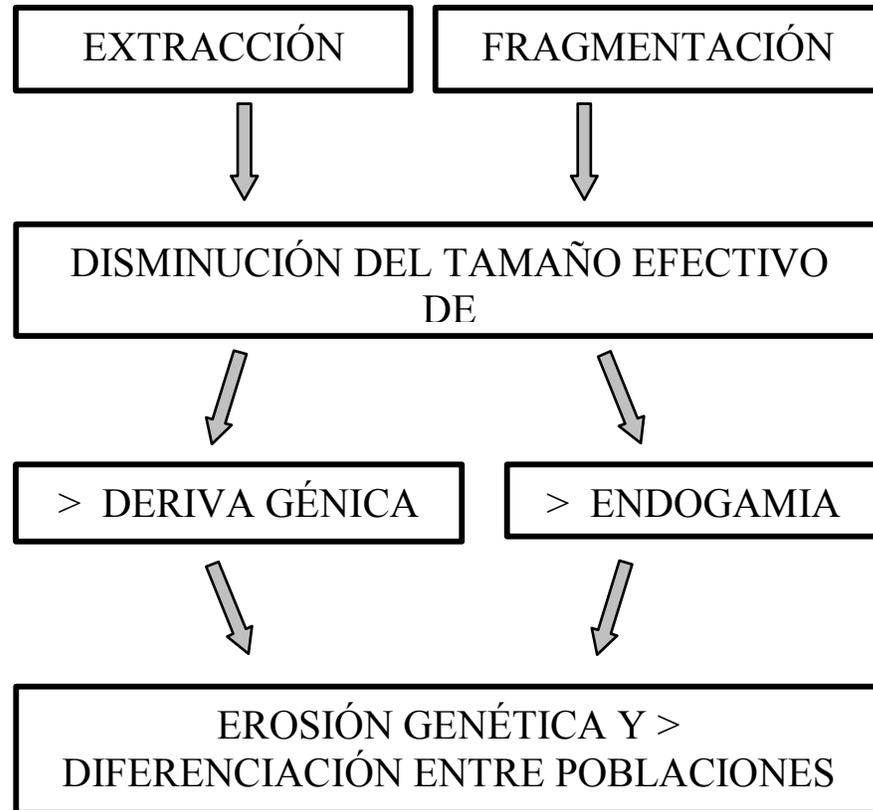


Figura 2. Efecto sugerido de la extracción y fragmentación sobre la diversidad genética, al disminuir el tamaño efectivo de las poblaciones e incrementarse los procesos de deriva génica y endogamia.

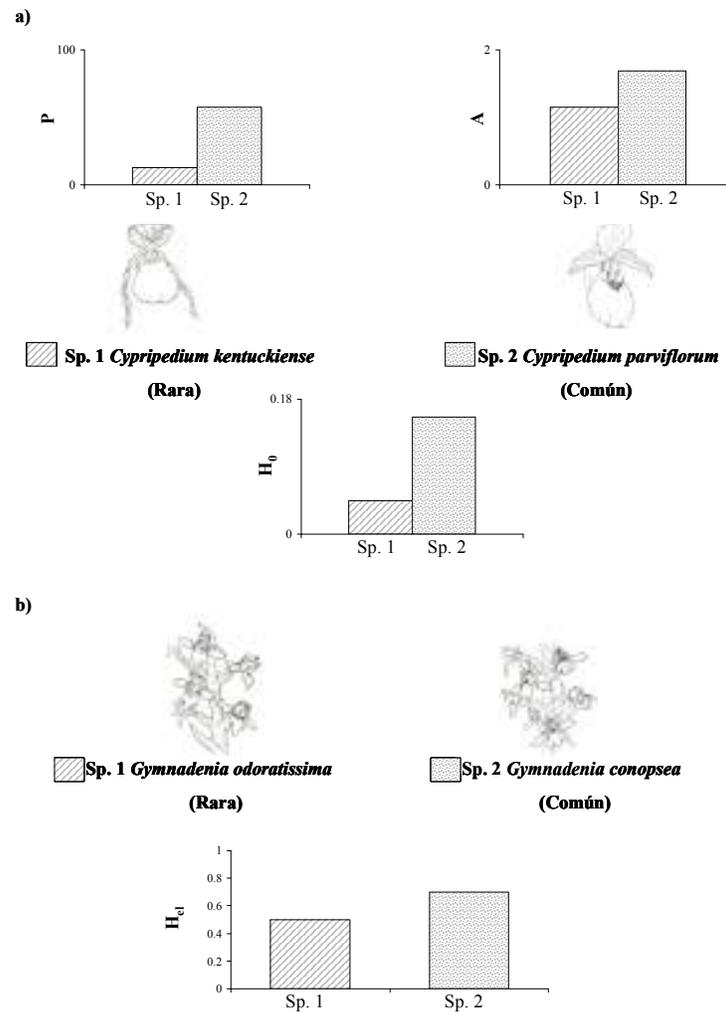


Figura 3. a) Niveles de variación genética en *Cypripedium kentuckiense* (rara) y *Cypripedium parviflorum* var *pubescens* (común), donde P - Polimorfismo, A - No de alelos y H_o - Heterocigosidad observada (gráfica elaborada con datos de Case *et al.* 1998). b) Variación genética y grado de subestructuración de las poblaciones en *Gymnadenia odoratissima* (rara) y *Gymnadenia conopsea* (común) (gráfica elaborada con datos de Gustafsson y Sjögren-Gulve, 2002). Dibujos: Ávila-Díaz I.

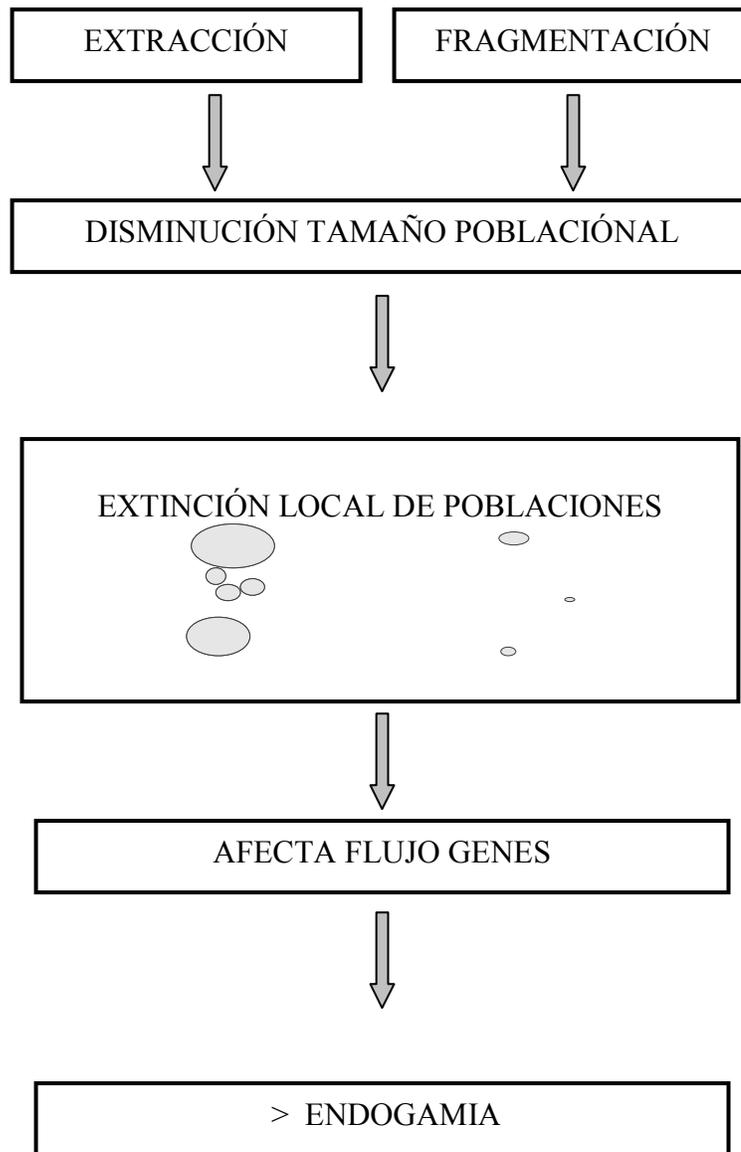


Figura 4. Efecto de la extracción y la fragmentación en el flujo génico.

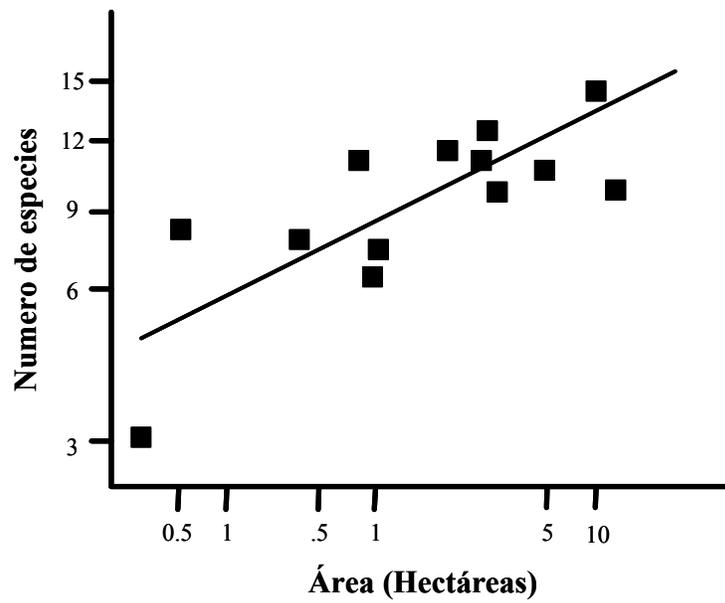


Figura 5. Relación especies-área para especies de plantas árticas – alpinas en las montañas de Adirondack, NY (después de Riebesell, 1982). Los fragmentos más pequeños tienen menor número de especies que áreas más grandes.

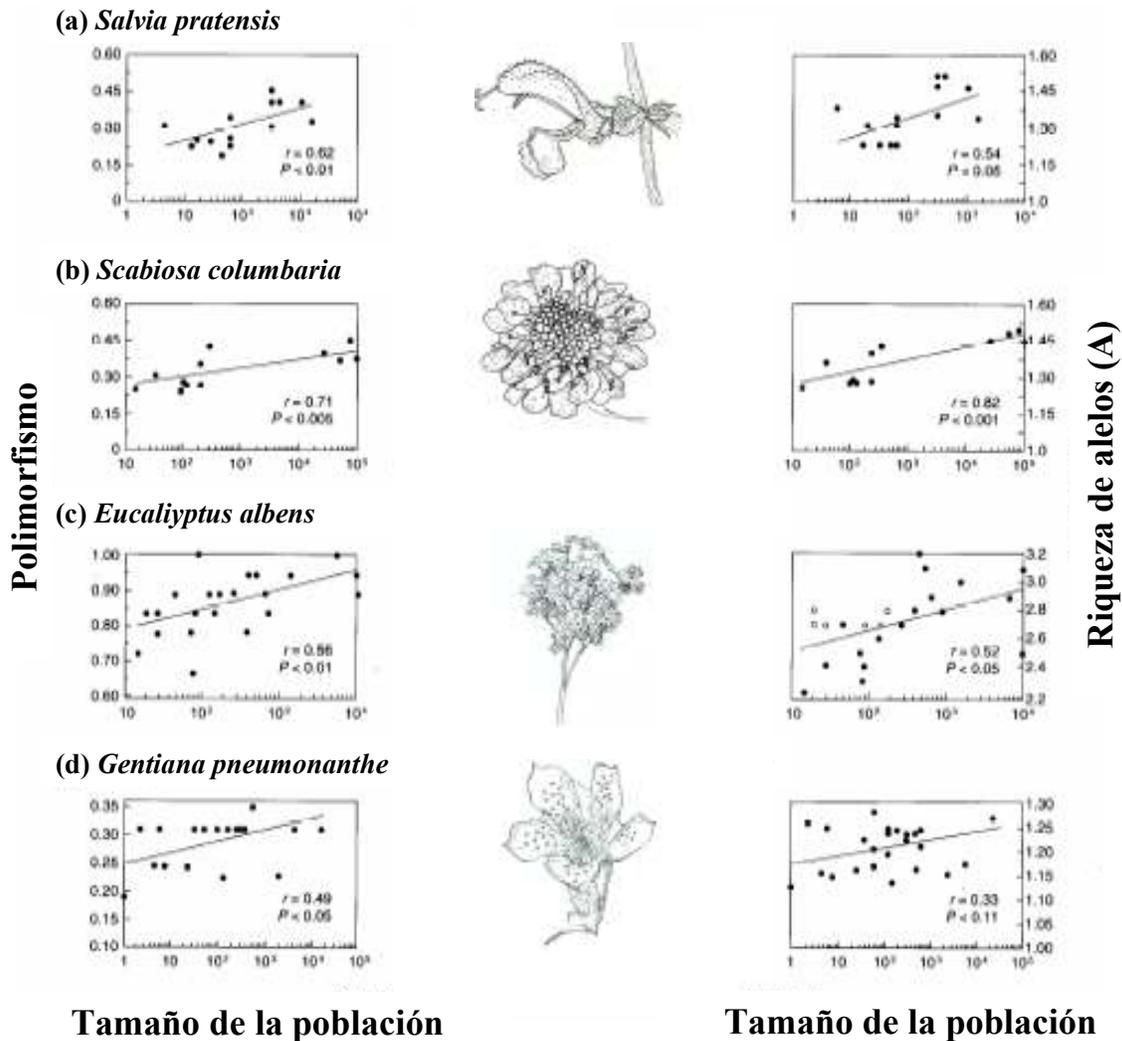


Figura 6. Relaciones entre el tamaño de la población reproductiva (escala logarítmica) y la variación genética, para poblaciones remanentes de: a) *Salvia pratensis*, b) *Sacabiosa columbaria* c) *Eucalyptus albens* y d) *Gentiana pneumonanthe*. P es el % de loci polimórficos, A es el número promedio de alelos por locus y H es la heterocigosidad (Después de Young et al., 1996). Dibujos: I. Ávila-Díaz.

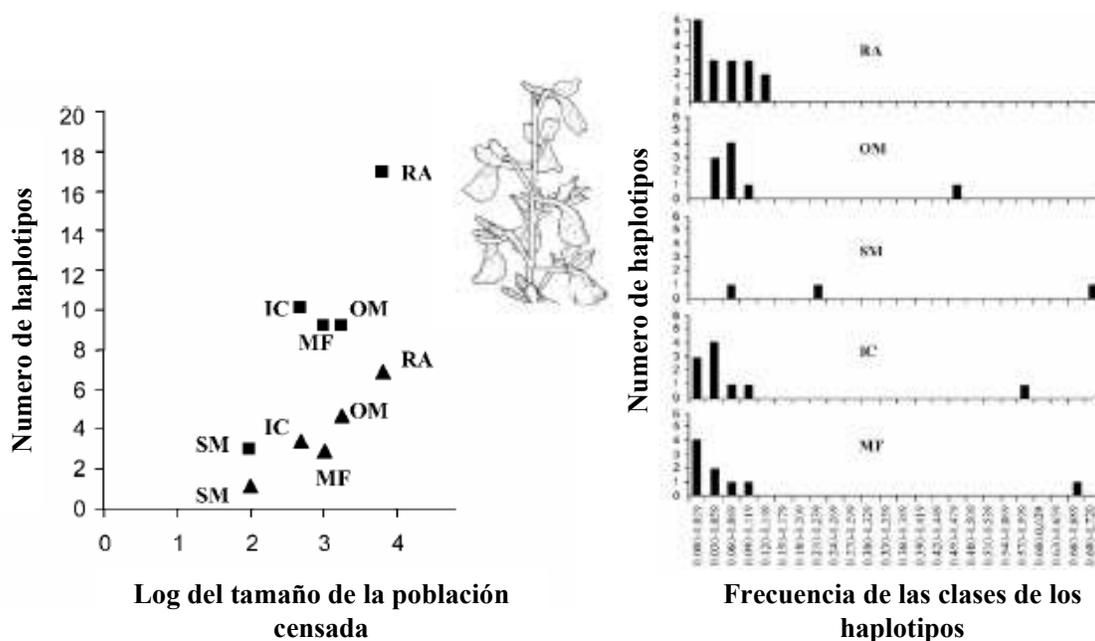


Figura 7. a) Relación entre el número de haplotipos y tamaño poblacional en escala logarítmica para cinco poblaciones de *Anacamptis palustris* en Italia: RA, Rabean (con aprox. 5000 individuos); OM, Orsi Mangelli (con aprox. 1500 individuos); SM, Santa Margherita (con aprox. 100 individuos); MF, Monfalcone (con aprox. 1000 individuos) y IC, Isoladi Cona (con aprox. 500 individuos). El número de haplotipos observado se indica por cuadros y el número de haplotipos inferidos para un tamaño de muestra igual a 10 individuos, se indica por triángulos. b) Distribuciones de frecuencia de haplotipos observados en las mismas poblaciones de *A. palustris*. Nótese que aquellas poblaciones más pequeñas, tienen un haplotipo con una mayor frecuencia, lo cual es característico de poblaciones que han sufrido cuellos de botella (Después de Cozzolino et al., 2003)

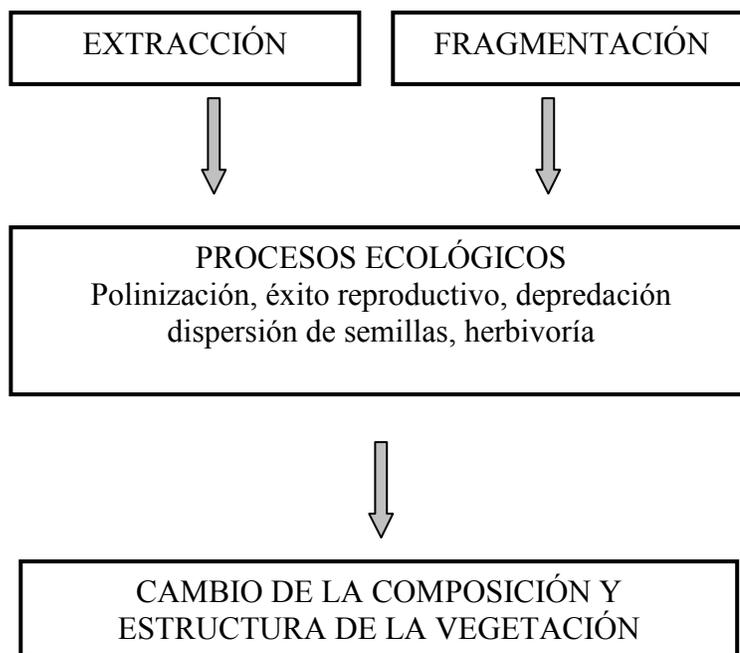


Figura 8. Efecto de la extracción y fragmentación en procesos ecológicos que sustentan la biodiversidad y función de los ecosistemas, lo cual puede ocasionar un cambio en la composición y estructura de la vegetación.

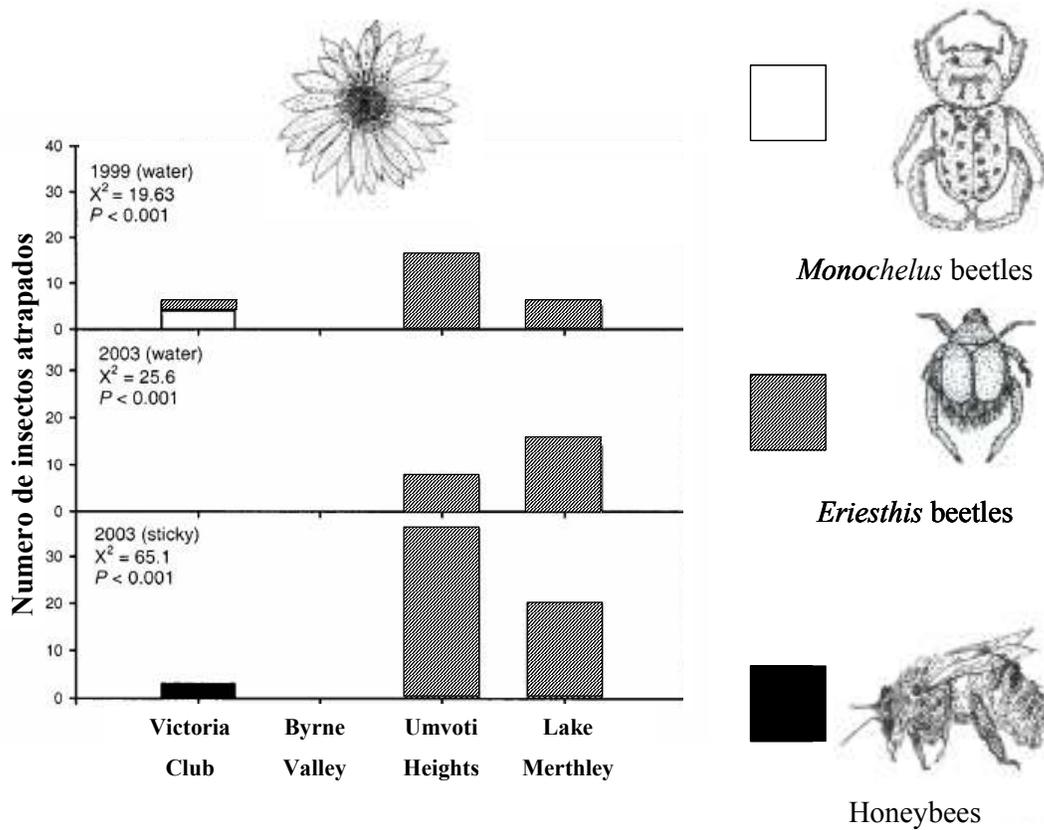


Figura 9. Número de individuos de insectos capturados en trampas de color rojo colocadas en poblaciones de *Gerbera aurantiaca*. Victoria Club: con 75 clones en hábitat altamente perturbado; Byrne Valley: con 300 clones en bosque y plantaciones de pino; Umvoti Heights: con 445 clones y Lake Merthley con 5475 clones, ambas poblaciones en plantaciones de pino (Después de Johnson *et al*, 2004). Dibujos: I. Ávila-Díaz.

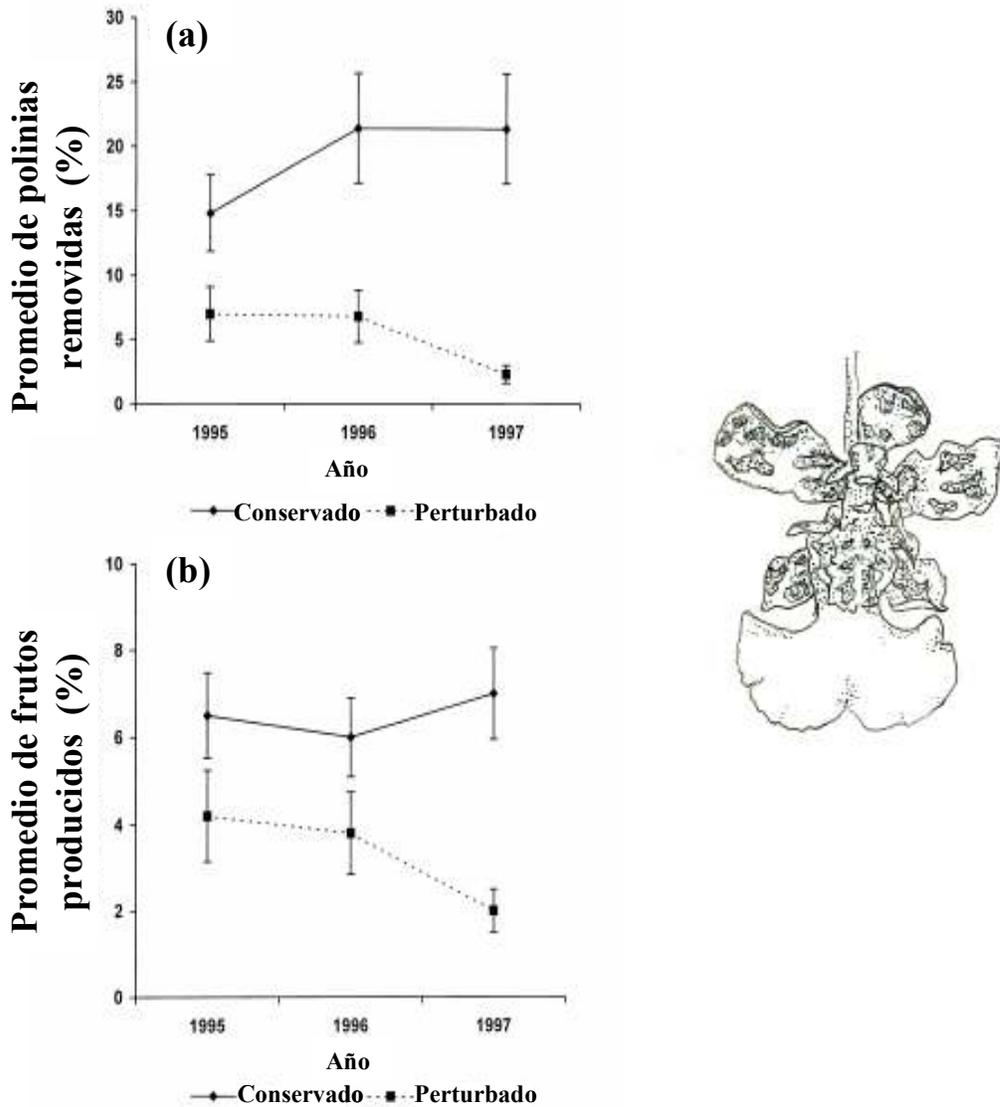


Figura 10. a) Éxito reproductivo masculino (remoción de polinias) y b) éxito reproductivo femenino (producción de frutos) en *Oncidium ascendens* durante tres años consecutivos. Líneas continuas y discontinuas indican el hábitat bien conservado y el alterado, respectivamente. (Tomada de Parra-Tabla, *et al.*, 2000). Dibujo: I. Ávila-Díaz.

CAPÍTULO 2**CONSERVATION GENETICS OF AN ENDEMIC AND ENDANGERED
EPIPHYTIC *LAELIA SPECIOSA* (ORCHIDACEAE)**

IRENE ÁVILA DÍAZ AND KEN OYAMA

NOTA: Este capítulo fue publicado en febrero del 2007 en la revista *American Journal of Botany* y se anexa como un sobretiro.

CONSERVATION GENETICS OF AN ENDEMIC AND ENDANGERED EPIPHYTIC *LAELIA SPECIOSA* (ORCHIDACEAE)¹

IRENE ÁVILA-DÍAZ^{2,3,4} AND KEN OYAMA²

²Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, 58190 Morelia, Michoacán, México; and ³Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Edif. R planta baja, Ciudad Universitaria, 58040 Morelia, Michoacán, México

We used isozymes (16 loci in 11 enzymatic systems) from *Laelia speciosa*, an endemic and endangered epiphytic orchid of Mexico, to assess the genetic diversity and population genetic structure in nine populations distributed along its geographic range, as well as to detect those populations that are genetically unique and therefore deserve high-priority protection. On average, the genetic diversity was high (percentage of polymorphic loci, $P_p = 76\%$, mean number of alleles per locus, $A = 3.34$, the average observed heterozygosity $H_o = 0.302$, the average expected heterozygosity $H_e = 0.382$). Moderate levels of inbreeding ($f = 0.216$, 95% confidence interval = 0.029–0.381) were found. Low levels of genetic differentiation were observed among populations ($\theta_p = 0.040$); however, there was a significant correlation between geographic and genetic distances among the populations (Mantel test: $r^2 = 0.43$, $P < 0.05$). Populations located within the same mountain range were genetically more similar. Private alleles were found, so proper management requires protection and maintenance of genetic diversity throughout its range. In case of reintroduction, we suggest using individuals propagated from seeds from as many capsules as possible, from close populations. An ex situ conservation strategy also is proposed.

Key words: conservation genetics; epiphytic orchids; isozymes; *Laelia speciosa*; Mexico; Orchidaceae.

Studies on conservation genetics of endangered plant species are necessary to establish management plans to preserve biodiversity. The maintenance of genetic diversity within and among populations of plant species is a critical issue for a long-term conservation program (Oyama, 1993; Haig, 1998; Bowen, 1999). In theory, a high level of population genetic diversity in a species allows it to better adapt to environmental changes and determines its evolutionary capacity (Hamrick et al., 1991; Frankham, 1995; Hamrick and Godt, 1996). Theoretical and field studies have shown that a positive correlation exists among the levels of genetic diversity and fitness in both plants and animals (Barret and Kohn, 1991; Oostermeijer et al., 1995; Sun, 1996; Fischer and Matthies, 1998; Groom, 1998; Schmidt and Jensen, 2000). For endangered species, the identification of unique genotypes is an important step to define units of conservation and evolutionary importance (Qamaruz-Zaman et al., 1998).

Destruction, modification, and fragmentation of natural forests, as well as illegal extraction of orchids, have had a strong influence in their local extinction (Salazar-Chávez, 1996). In fact, the family Orchidaceae is one of the best examples in which species have been driven to extinction as a

result of human activities (Salazar-Chávez, 1996; Hågsater et al., 2005).

In genetic studies of orchid species, genetic diversity has varied from very low to very high. Outcrossing species have a greater genetic diversity than selfers or apomictics (Scacchi et al., 1991; Sun, 1996, 1997; Sun and Wong, 2001; Wallace, 2004), widespread species in general have higher levels of variation than endemic species with a narrow geographic range (Scacchi et al., 1991; Case et al., 1998; Borba et al., 2001a), and usually, larger populations have more diversity (Scacchi and De Angelis, 1989; Sun, 1996; Gustafsson, 2000; Cozzolino et al., 2003). Composition and dynamics of founding populations also have been related with genetic diversity; if the founder population contains few individuals, then it will be genetically depauperate, but multiple founder populations and/or large, diverse founding populations will have high levels of diversity (Squirrel et al., 2001).

Recently, there has been more emphasis on genetic studies to develop strategies for conservation of orchid species. These studies have been useful to resolve taxonomic uncertainties, to select candidate populations of wild species to be given priority for conservation, and to propose other in situ and ex situ management strategies (Case et al., 1998; Wong and Sun, 1999; Szalanski et al., 2001; Sharma et al., 2003). Also, researchers have evaluated the effects of human activities on the diversity and genetic structure of orchids, discovering in some cases a negative effect (Cozzolino et al., 2003), but others have not been able to detect strong effects on genetic variation (Gustafsson, 2000; Wallace, 2002; Murren, 2003; Sharma et al., 2003).

Most of the genetic studies on orchids have focused on terrestrial plants. In contrast, despite the high species diversity and ecological importance of epiphytic species, they have received relatively less attention, probably because of difficulties in accessing the canopy and the metapopulation structure of canopy plants (Ackerman and Ward, 1999; Murren, 2003;

¹ Manuscript received 7 June 2006; revision accepted 21 November 2006.

The authors thank A. González Rodríguez and A. C. Cortés-Palomec for comments on preliminary drafts of this manuscript; two anonymous reviewers for helpful suggestions; J. Serrato-R., O. Muñoz-Serrato, and M.A. Pérez-Pérez for field assistance; R. Luna, N. Pérez, L. Herrera-Arroyo, G. Guerrero-Pacheco, and A. Valencia for technical assistance; and Monica McGloin for her help with English. This research was supported by Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza (FMCN, project A 1-99/130) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEMARNAT-CONACYT, project 2002-C01-0544); I.A.-D. was sponsored by doctoral scholarships from CONACYT (reg. 130249) and DGEP-UNAM (project 202392).

⁴ Author for correspondence (e-mail: iavila@oikos.unam.mx)

Trapnell and Hamrick, 2004, 2005; Trapnell et al., 2004). Epiphytic species might have a different pattern of genetic structure because of the particular ecological characteristics of this habitat. The few studies in epiphytic orchids have shown that these plants in general harbor high genetic diversity and low population structure. Probably a high genetic diversity can be an adaptive advantage for epiphytic plants that live in that discontinuous and changing habitat.

In this study, an endemic and endangered epiphytic Mexican orchid, *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae), was chosen to assess its population genetic diversity and structure throughout its geographic distribution. Additionally, we want to detect those populations that are genetically unique and therefore deserve high-priority protection. Thousands of plants of *L. speciosa* are harvested each year from their habitat to be sold in the streets and markets in Mexico City and several other cities and towns in Mexico. The plants are grown in home gardens for the beauty of flowers, which do not last when cut, and they are also used in religious ceremonies (Salazar-Chávez, 1996; Halbinger and Soto, 1997; I. Ávila-Díaz, personal observation). This massive harvesting has caused local extinctions, but fortunately, large populations can still be found in some localities (Halbinger and Soto, 1997; I. Ávila-Díaz, personal observation). Demographic studies of *L. speciosa* in populations with different levels of disturbance have shown that disturbed populations are more prone to extinction than are less disturbed ones (Hernández-Apolinar, 1992; Pérez-Pérez, 2003). Thus, if this illegal traffic continues, many populations will be exterminated in the near future (Halbinger and Soto, 1997; Pérez-Pérez, 2003).

This work is part of a larger project that involves the study of other aspects of the biology of *L. speciosa*, as well as work with local civilian communities to establish a sustainable management program for this orchid.

MATERIALS AND METHODS

Plant species and study sites—*Laelia speciosa* is a long-lived perennial epiphyte with globular or ovoid pseudobulbs (inflated stem tissues), which carry one stiff, terminal leaf. The inflorescence is 15–25 cm in length, which bears 1–3 large, pale to dark pink-lilac to purplish flowers, 10–16 cm in diameter (Halbinger and Soto, 1997). The flowers are primarily outcrossing, but they are also capable of selfing (I. Ávila-Díaz and K. Oyama, unpublished data). Flowers are pollinated by bumblebee queens of *Bombus pennsylvanicus sonororus* Say and *B. ephippiatus* Say (Medina, 2004).

The plants grow on oak species, particularly on *Quercus deserticola* Trel. in open, deciduous forests, from 1440 to 2500 m a.s.l. (Halbinger and Soto, 1997). *Laelia speciosa* is an endemic species of the central part of Mexico that includes oak forests of the Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, the southern part of the Altiplanicie Mexicana (Mexican Plateau), and the Eje Neovolcánico Transversal (Trans-Mexican Volcanic Belt) (Halbinger and Soto, 1997).

Nine different populations of *L. speciosa* were sampled throughout its geographic range (Fig. 1). In each population, 50 reproductive individuals (each from a different host tree) were sampled, except for one site (Lobera, Jalisco; LOJ) in which only 17 individuals were collected because that was the total number of support trees found. From each individual cluster, 3–5 pseudobulbs were collected and transported to a shade house where they were cultivated and maintained for 2 years under similar conditions until used for electrophoresis. This was done to reduce the effects that different environments can have on differential protein expression (Wendel and Weeden, 1989).

Isozyme electrophoresis—Sections of fresh, young roots were crushed in 0.3 mL grinding buffer (0.168 g citric acid monohydrate, 0.403 g L-histidine, 1.232 g saccharose, and 1 mL dimethyl sulfoxide with distilled water added to

40 mL) (Izquierdo, 1995). The extracts were adsorbed onto Whatman no. 3 filter paper and then applied to a starch gel 12% w/v (Starch Art Co., Smithville, Texas, USA). We tested different buffer systems and obtained the best resolution for more enzymes with three systems: (1) C system modified from Stuber et al. (1988): electrode buffer pH 8.3 with 0.19 M boric acid, 0.04 M lithium hydroxide and gel buffer: 9:1 Trizma base (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) buffer pH 8.3 and electrode buffer; (2) D system modified from Stuber et al. (1988): electrode buffer pH 6.5 with 0.070 M L-histidine, 0.007 M citric acid monohydrate and gel buffer: 1 : 4 electrode buffer and distilled water; (3) Mitton system (Mitton et al., 1979): electrode buffer pH 7.5 with 0.031 M sodium hydroxide, 0.295 M boric acid and gel buffer: 0.015 M Trizma base, 0.295 M citric acid monohydrate.

Standard electrophoresis was performed until the inner marker (bromophenol blue) reached 6 to 7 cm from the application site using the following running conditions: systems C and D: 30 mA; Mitton system: 225 V. Eleven enzymatic systems with 16 loci were well resolved with the following buffer systems: glutamate oxaloacetate transaminase (*Got2*), leucine aminopeptidase (*Lap1*, *Lap2*), and esterase (*Est2*) with buffer C system; malate dehydrogenase (*Mdh1*, *Mdh3*), phosphoglucosomutase (*Pgm3*, *Pgm4*), phosphoglucosomerase (*Pgi2*, *Pgi3*), isocitrate dehydrogenase (*Idh1*, *Idh2*), and 6-phosphogluconate dehydrogenase (*Pgd2*) with buffer D system; and cathodic peroxidase (*Cpx1*), diaphorase (*Dia2*), and menadione reductase (*Mnr3*) with the Mitton buffer system.

The staining recipes were modified from Wendel and Weeden (1989) and Luna-Reyes and Oyama (2005). Enzymatic systems with more than one locus were numbered in ascending order from the locus with more mobility. The alleles were numbered according to their mobility relative to the alleles of standard individuals present in all gels in each system.

Data analysis—The following indices of genetic variation were computed: percentage of polymorphic loci (P_p), mean number of alleles per locus (A), and the average observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested using an exact test with a Monte Carlo method. F statistics according to Weir and Cockerham (1984) were estimated. The fixation indices, f (equivalent to F_{IS}) and F (equivalent to F_{IT}) were calculated for each polymorphic locus for the total population (including all sites) and averaged over all loci. Excess of homozygosity is indicated by statistically significant positive values of f and F . Li and Horvitz's (1953) χ^2 statistic was used to test whether f and F values per locus were significantly different from zero. As an indicator of the degree of differentiation among populations, F_{ST} (unbiased estimate θ) was calculated. The θ values may indicate from equal ($\theta = 0$) up to entirely different ($\theta = 1$) allele frequencies among populations. Significance of θ per locus was determined by $\chi^2 = 2N\theta(k-1)$, $df = (k-1)(s-1)$ where N is the sample size, k is the number of alleles, and s = number of subpopulations (Workman and Niswander, 1970). Bootstrapping over loci was performed using 1000 replicates to generate 95% confidence intervals (CIs). Also Nei's (1978) unbiased genetic distance was calculated, and genetic differentiation between pairwise populations was illustrated in an UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) dendrogram (Sneath and Sokal, 1973). Heterogeneity in allele frequencies among populations was tested by exact test (Raymond and Rousset, 1995). Populations were geo-referenced and pairwise geographic distances were calculated with the ArcView program (ESRI, 1996). Correlation between genetic distance and Euclidean distance between population pairs was assessed and statistically evaluated by Mantel's test with 1000 permutations. Analyses were carried out by using the TFPGA computer program (Miller, 1997). Distribution of private and rare alleles were illustrated with Venn diagrams.

RESULTS

Genetic variability—Using 11 enzymatic systems, we obtained 16 loci with a total of 77 alleles (Appendix). Several loci were monomorphic in some of the populations, while others were polymorphic in all populations, with at least six alleles present in six of the loci. *Pgi2* and *Pgi3* were the most polymorphic, with nine alleles each. The populations had moderate to high levels of genetic variability: percentage of polymorphic loci (P_p) ranged from 68.8% to 81.3%; the mean number of alleles per locus (A) was between 3.13 and 3.74; the

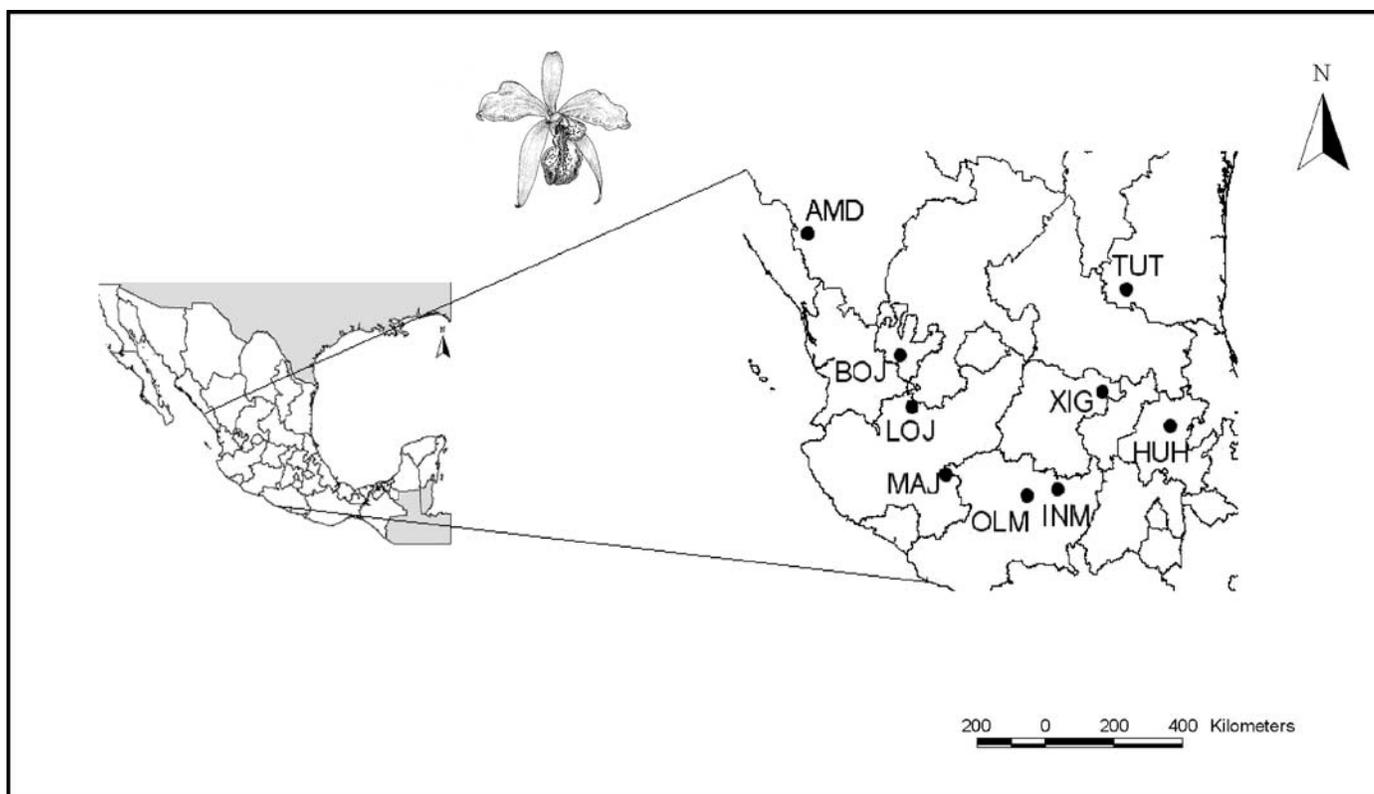


Fig. 1. Location of Mexican populations of *Laelia speciosa* studied. AMD, Amole, Durango; BOJ, Bolaños, Jalisco; LOJ, Lobera, Jalisco; MAJ, Mazamitla, Jalisco; OLM, Olvido, Michoacán; INM, Indaparapeo, Michoacán; HUH, Hualula, Hidalgo; XIG, Xichú, Guanajuato; and TUT, Tula, Tamaulipas. Drawing of *L. speciosa* flower was created by Rolando Jimenez, used here with permission.

observed heterozygosity (H_O) varied from 0.263 to 0.358, and the mean expected heterozygosity (H_E) ranged from 0.333 to 0.431 (Table 1).

About 81% of the polymorphic loci significantly deviated from HWE, and the f (F_{IS}) and F (F_{IT}) values for each locus ranged from -0.320 to 0.727 and from -0.316 to 0.738 , respectively. The f (F_{IS}) and F (F_{IT}) values of 11 loci were significantly different from zero ($P < 0.01$) (Table 2). The average of f (F_{IS}) was 0.216 (95% CI = 0.029 – 0.381) and F (F_{IT}) was 0.247 (95% CI = 0.058 – 0.406) over all loci, and both were significantly different from zero ($P < 0.001$). The total

population (including all sites studied) significantly deviated from HWE in at least five of the polymorphic loci (Table 2).

Genetic structure—*Laelia speciosa* had low but significant genetic differentiation among populations ($\theta = 0.040$, $P < 0.001$), indicating detectable allelic frequency differences among sites. Nei's (1978) unbiased genetic distance ranged from 0.007 between the OLM (Olvido, Michoacán) and INM (Indaparapeo, Michoacán) populations to 0.064 between the XIG (Xichú, Guanajuato) and AMD (Amole, Durango) populations (Table 3). The UPGMA dendrogram was partially congruent with the location of populations according to the

TABLE 1. Genetic variability at 16 allozyme loci in nine populations of *Laelia speciosa*.

Population site	Abbreviation	N	A	P_p^a	H_E	H_O
Olvido, Michoacán	OLM	47.00	3.62	81.3	0.395	0.315
Indaparapeo, Michoacán	INM	35.19	3.14	75.0	0.370	0.311
Mazamitla, Jalisco	MAJ	36.63	3.74	75.0	0.431	0.358
Amole, Durango	AMD	42.25	3.18	68.8	0.333	0.263
Bolaños, Jalisco	BOJ	34.13	3.43	75.0	0.371	0.271
Lobera, Jalisco	LOJ	16.81	3.13	75.0	0.361	0.316
Tula, Tamaulipas	TUT	34.56	3.31	81.3	0.395	0.292
Xichú, Guanajuato	XIG	32.25	3.30	75.0	0.370	0.313
Hualula, Hidalgo	HUH	30.31	3.19	81.3	0.408	0.278
Population mean	—	34.34	3.34	76.4	0.382	0.302

Note: N = mean sample size; A = mean number of alleles per locus; P_p = proportion of polymorphic loci; H_E = expected mean heterozygosity per locus; H_O = observed heterozygosity per locus.

^a A locus was considered polymorphic if the frequency of the most common allele did not exceed 0.95.

TABLE 2. *F* statistics for *Laelia speciosa* based on 16 loci from nine populations studied throughout its range of distribution in Mexico.

Loci	<i>F</i>	<i>f</i>	θ_p
<i>Got2</i>	0.354**	0.308**	0.067**
<i>Lap1</i>	0.666**	0.666**	0.000 ns
<i>Lap2</i>	0.378**	0.311**	0.097**
<i>Mdh1</i>	-0.002 ns	-0.020 ns	0.017 ns
<i>Mdh3</i>	-0.037 ns	-0.082 ns	0.042**
<i>Pgm3</i>	0.079 ns	0.069 ns	0.011 ns
<i>Pgm4</i>	0.407**	0.402**	0.009 ns
<i>Pgi2</i>	0.307**	0.283**	0.033**
<i>Pgi3</i>	0.232**	0.209**	0.029**
<i>Idh1</i>	-0.316**	-0.320**	0.003 ns
<i>Idh2</i>	0.428**	0.395**	0.056**
<i>6Pgd2</i>	0.001 ns	-0.051 ns	0.049**
<i>Cpx1</i>	0.097 ns	0.086 ns	0.012 ns
<i>Mnr3</i>	0.536**	0.512**	0.049**
<i>Est2</i>	0.738**	0.727**	0.042**
<i>Dia2</i>	-0.133*	-0.193**	0.050**
Mean	0.247**	0.216**	0.040**
SD	0.0994	0.0995	0.0107
95% CI	0.058–0.406	0.029–0.381	0.022–0.059

Note: ***P* < 0.001; **P* < 0.01; CI = confidence interval.

mountain ranges in Mexico (Fig. 2). The AMD population, the northernmost population studied, was the most different from all populations, as clearly shown in Fig. 2. The two populations in the Sierra Madre Oriental (Tula, Tamaulipas [TUT] and Hualula, Hidalgo [HUH]) formed a group, while the populations from Eje Neovolcánico Transversal in the state of Michoacán (OLM, INM) formed another group, next to MAJ (Mazamitla, Jalisco) from the same mountain range.

The populations XIG from Sierra Madre Oriental and LOJ from Sierra Madre Occidental are more similar to the populations from the Eje Neovolcánico Transversal. The population BOJ (Bolaños, Jalisco) is the second most distinct population.

There was a positive significant correlation between pairwise genetic distance and euclidean distance between sites (Fig. 3; Mantel's test, $r^2 = 0.43$; $P < 0.05$).

Private alleles—Ten private alleles were found in *L. speciosa* (Fig. 4, Appendix); allele 1 of *Mdh1* in three individuals in population AMD; allele 6 of *Idh1* in two individuals, allele 6 of *Idh2* in two individuals, and allele 6 of *Lap2* in one individual in MAJ; allele 1 of *Dia2* in four individuals in OLM; allele 8 of *Pgi2* in three individuals and

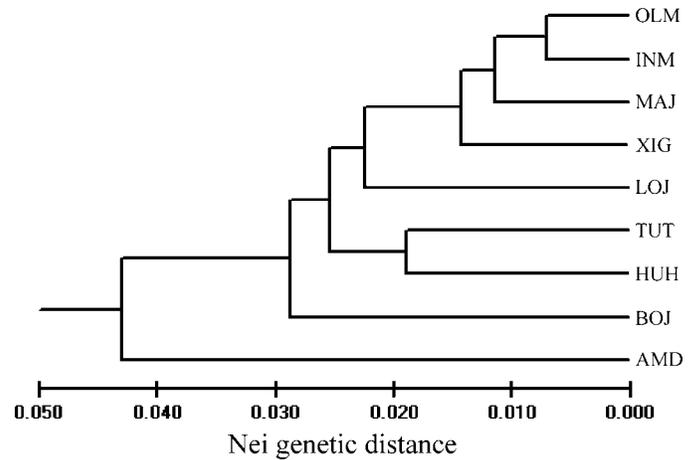


Fig. 2. UPGMA dendrogram of the relationships among the nine populations of *Laelia speciosa* sampled. The x-axis shows Nei's (1978) genetic distances among populations. See Table 1 for population names.

allele 8 of *Pgi3* in nine individuals in TUT; allele 2 of *6Pgd* in four individuals, allele 3 of *Mdh1* in two individuals, and allele 5 of *Mdh3* in one individual in HUH. There were also rare alleles shared between two populations: allele 5 of *Idh2* and allele 3 of *Mdh3* in MAJ and BOJ populations; allele 1 of *Pgi2* and allele 1 of *Pgi3* in OLM and XIG; allele 1 of *Lap1* and allele 2 of *Mdh3* in XIG and HUH; and allele 1 of *Idh1* in TUT and HUH.

DISCUSSION

Genetic variability—Our results on the genetic diversity of populations of *L. speciosa* suggest that this orchid has higher levels of genetic variation ($P_p = 76.4\%$, $A = 3.34$, $H_E = 0.382$) than those reported for monocots ($P_p = 59.20\%$, $A = 2.38$, $H_E = 0.181$), long-lived perennial herbaceous species ($P_p = 39.60\%$, $A = 1.42$, $H_E = 0.205$), plants with wide geographic range ($P_p = 58.90\%$, $A = 2.29$, $H_E = 0.202$), plants with seeds dispersed by wind ($P_p = 55.4\%$, $A = 2.10$, $H_E = 0.144$), plants with sexual reproduction ($P_p = 51.60\%$, $A = 2.00$, $H_E = 0.151$) (Hamrick and Godt, 1990), and terrestrial orchids (Scacchi and De Agelis, 1989; Case, 1993; Sun, 1996; Sharma et al., 2003). Our values, however, were within those found for epiphytic and rupicolous orchids, which in general have high genetic diversity (Ackerman and Ward, 1999; Bush et al., 1999;

TABLE 3. Matrix of mean Nei's (1978) unbiased genetic distances (below diagonal) and geographic distances (above diagonal) between nine populations of *Laelia speciosa*.

Population	OLM	INM	MAJ	AMD	BOJ	LOJ	TUT	XIG	HUH
OLM		60	162	630	350	272	414	235	301
INM	0.007		218	664	388	317	381	195	243
MAJ	0.009	0.015		505	230	137	480	335	440
AMD	0.035	0.025	0.057		280	368	620	631	776
BOJ	0.018	0.031	0.024	0.041		94	452	394	534
LOJ	0.015	0.021	0.032	0.040	0.040		461	365	496
TUT	0.019	0.017	0.024	0.052	0.027	0.021		145	258
XIG	0.009	0.015	0.020	0.064	0.029	0.022	0.025		145
HUH	0.027	0.015	0.025	0.030	0.033	0.037	0.019	0.046	

Note: See Table 1 for full names of populations.

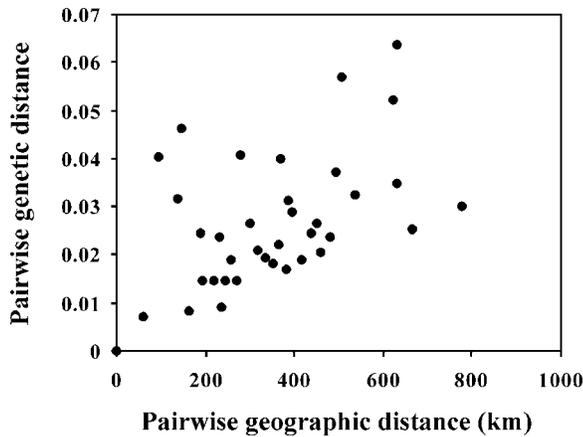


Fig. 3. Correlation between geographic distance (km) and Nei's (1978) pairwise genetic distance among populations using Mantel's test ($r^2 = 0.43$, $P = 0.04$).

Borba et al., 2001a; Murren, 2003; Trapnell and Hamrick, 2004; Trapnell et al., 2004). This pattern is also observed in other common epiphytic plants such as bromeliads (Soltis et al., 1987; González-Astorga et al., 2004), ferns (Ranker, 1992; Hooper and Haufler, 1997), and bryophytes (Akiyama, 1994; Snäll et al., 2004).

The high genetic diversity of *L. speciosa* can be explained in different ways. It is primarily an outcrossing plant, although it is also capable of selfing (I. Ávila-Díaz and K. Oyama, unpublished data) similarly to what has been reported for many other orchids (Borba et al., 2001b; Wallace, 2003; Trapnell and Hamrick, 2005; Tremblay et al., 2005; Torres, 2006), favoring the increase of genetic variation in their populations. Orchids produce thousands of tiny seeds dispersed by wind that colonize new sites enhancing gene flow between populations (Dressler, 1981; Murren and Ellison, 1998; Trapnell and Hamrick, 2004; Trapnell et al., 2004). Additionally, its high level of genetic diversity could be related to its large geographic distribution and the fact that different generations can be found at a particular time due to its long-lived perennial habit, leading to the sampling of multi-aged populations.

Plants distributed in forest canopies follow different life history strategies compared with terrestrial plants, which might be reflected in their population structure. Recent studies considering epiphytic plants as metapopulations have shown that population substructure can occur at the level of individual trees (Trapnell et al., 2004). At this level, inbreeding depression by mating between relatives and low distance gene flow can occur. The combination of both outcrossing and selfing reproduction in the same individual may offer an advantage to the individual by ensuring the production of offspring even under adverse environmental conditions or in colonization events when there is variable pollinator availability (Kalisz et al., 1999, 2004; Vogler and Kalisz, 2001; Kalisz and Vogler, 2003). The relative proportion of these two modes of reproduction is species dependent, and Benzing (1978) has even suggested that obligate epiphytes would be characterized by increased autogamy to ensure high seed set. This mixed breeding system is present in *L. speciosa* (I. Ávila-Díaz and K. Oyama, unpublished data), a species in which even though outcrossing is the most common mechanism to produce seeds, autogamy and mating between relatives could exist, explaining

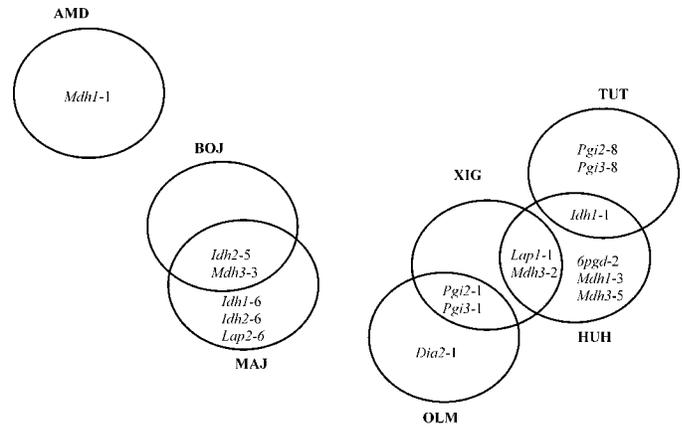


Fig. 4. Distribution of private and rare alleles in populations of *Laelia speciosa* distributed along its geographic range, Mexico. See Fig. 1 for names and locations of the populations.

the moderate levels of f (F_{IS}) (0.216). The proportion of flowers successfully producing fruits in *L. speciosa* has been reported between 4.97% and 15.15% in populations with different degrees of disturbance (Medina, 2004). These values correspond to those found in other orchid species in which, within a season, few flowering individuals produce fruits contributing to the seed pool, which is particularly true in populations of tropical orchids (Tremblay and Ackerman, 2001; Tremblay et al., 2005). The small number of individuals that successfully produce fruits per year and the fact that only some plants achieve reproductive success over many years (I. Ávila-Díaz, personal observation) translate into a greater chance of mating among relatives, as reported for *Catasetum viridiflavum* Hooker (Murren, 2003).

Genetically variable outcrossing species whose population sizes have been recently reduced may be affected more severely by genetic drift and inbreeding than those species that historically have been considered rare (Kay, 1993). Those effects would tend to accelerate the extinction of populations that have been strongly extracted from their habitat, as in the case of *L. speciosa* and many other epiphytic orchid species, which despite having high genetic variation could be endangered.

Genetic structure—In general, *L. speciosa* had a lower θ (F_{ST}) value among its populations than those reported for terrestrial orchids (Alexandersson and Ågren, 2000; Tremblay et al., 2005) and a slightly lower value than that reported for epiphytic orchids (Murren, 2003; Trapnell and Hamrick, 2004). It has been suggested that common epiphytic plants have low population structure in comparison to terrestrial plants, possibly related to the effective wind dispersal of spores and seeds from the canopy habitat (Akiyama, 1994; Murren and Ellison, 1998; Bush et al., 1999; Trapnell and Hamrick, 2004; Trapnell et al., 2004) or to the behavior of the pollinator, leading to long-distance pollen movement (Alexandersson and Ågren, 2000; Trapnell and Hamrick, 2005). In the particular case of *L. speciosa*, the pollinators are bumblebee queens of *Bombus pennsylvanicus sonorous* and *B. ephippiatus* (Medina, 2004).

Gene flow in *L. speciosa* is limited because of the great distance between the populations (in our study, the greatest

Euclidean distance between two of the populations studied was 776 km) as shown by a positive linear relationship between genetic and geographic distances between sites. This event has been interpreted as a result of regional equilibrium between gene flow and drift (Hutchinson and Templeton, 1999). Such isolation by distance also explains why the populations differ genetically, as shown by exact testing for population differentiation (Raymond and Rousset, 1995). The isolation of the populations restricted by gene flow can be natural or a direct consequence of human activities such as forest fragmentation and massive extraction of plants leading to local extinction.

The UPGMA analysis shows an interesting pattern among the populations studied. Populations from the Eje Neovolcánico Transversal are the closest populations and the most similar genetically. It is possible those populations have had the same origin and still could maintain some levels of gene flow among them. Populations from Sierra Madre Oriental are different and isolated from those of Sierra Madre Occidental by the central Mexican Plateau, a very dry area, that restricts gene flow between populations from these mountain ranges. The most distinct population was the one from Durango (AMD), which is located in the limits of the northernmost distribution area of the species. The LOJ population, from the Sierra Madre Occidental, is more similar genetically to the populations from the Eje Neovolcánico Transversal. This population is the smallest sampled and is relatively close (approximately 5 km) to that mountain range, hence the possibility that its origin is due to the natural or human dispersion from the same populations native to the Eje Neovolcánico Transversal.

Private and rare alleles—The discovery of 10 private alleles in some populations of *L. speciosa* adds weight to the distinctness of populations, and the alleles may represent unique evolutionary trajectories, as proposed for other rare plants (Arft and Ranker, 1998). Some authors have argued that private or rare alleles are of adaptive or evolutionary significance, perhaps representing possible loci of adaptive value, that is, a reservoir for adaptation to unusual conditions (Huenneke, 1991; Torres et al., 2003), so the evaluation of the significance of individual populations can be based on both levels of allelic richness and distinctiveness (Petit et al., 1998).

A certain pattern of rare alleles is also observed in relation to the geographic distribution of the orchid, with populations growing in the same mountain range sharing one or more alleles between them. The populations from Sierra Madre Oriental and Sierra Madre Occidental are naturally isolated from each other because the Mexican Plateau between them is not favorable for the growing of *Quercus deserticola*, the main host of the orchid. The Eje Neovolcánico Transversal acts as a corridor connecting the populations from both mountain ranges, as shown by the alleles that are shared between the populations in this mountain range and the ones in the sierras.

Implications for conservation—We emphasize that populations of *L. speciosa* maintain high levels of genetic diversity throughout its range with low genetic differentiation. This is interesting, considering that the populations sampled have been affected by forest fragmentation and different levels of removal of individual plants and flowers by local people. Therefore, the impact of human activities on the genetic diversity is not quite clear yet, but perhaps it will become more evident in future generations.

When flowers are harvested, the recruitment of new individuals by seed is reduced, as shown by lower rates of population growth in intensively collected sites compared with those of pristine populations (Hernández-Apolinar, 1992; Pérez-Pérez, 2003). However, on many occasions the vegetative structures of individual orchids remain in place, perhaps serving as a genetic reservoir of the species. These populations could, in time, face problems associated with low recruitment.

Because of the high levels of genetic diversity and the genetic structure found, we suggest that when considering restoration strategies, particularly for reintroduction, it is important to restore with individuals propagated in vitro from seeds from as many capsules as possible and from populations close to the area where the reintroduction needs to take place to maintain the natural structure found in the field.

Because private and rare alleles are present in most of the populations, proper management involves protection and maintenance of genetic diversity throughout the range of *L. speciosa* for in situ conservation. We also suggest an ex situ conservation strategy with the collection of seeds and propagation of individuals from all populations.

A multidisciplinary project on *L. speciosa* that includes biological studies (e.g., demography, breeding system, in vitro propagation, seedling establishment, and relationship with mycorrhizal fungi) as well as work with people in local communities (e.g., environmental education programs, orchid propagation programs) is needed to reach a sustainable management of this orchid species. Other immediate actions are also necessary to preserve the habitat of this orchid throughout its geographic range and to enhance regulations and acts to reduce their illegal removal from the wild.

LITERATURE CITED

- ACKERMAN, J. D., AND S. WARD. 1999. Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? *Systematic Botany* 24: 282–291.
- AKIYAMA, H. 1994. Allozyme variability within and among populations of the epiphytic moss *Leucodon* (Leucodontaceae: Musci). *American Journal of Botany* 81: 1280–1287.
- ALEXANDERSSON, R., AND J. ÅGREN. 2000. Genetic structure in the nonrewarding, bumblebee-pollinated orchid *Calypso bulbosa*. *Heredity* 85: 401–409.
- ARFT, A. M., AND T. A. RANKER. 1998. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis*. *American Journal of Botany* 85: 110–122.
- BARRET, S. C. H., AND J. K. KOHN. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In D. A. Falk and K. E. Holsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, 3–30. Oxford University Press, Oxford, UK.
- BENZING, D. H. 1978. The life history of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae) and the rarity of extreme epiphytism among the angiosperms. *Selbyana* 2: 325–327.
- BORBA, E. L., J. M. FELIX, V. N. SOLFERINI, AND J. SEMIR. 2001a. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419–428.
- BORBA, E. L., S. SEMIR, AND G. J. SHEPHERD. 2001b. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88: 89–99.
- BOWEN, B. W. 1999. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* 8: S5–S10.
- BUSH, S. P., W. E. KUTZ, AND J. M. ANDERTON. 1999. RAPD variation in temperate populations of the epiphytic orchid *Epidendrum conop-*

- seum* and the epiphytic fern *Pleopeltis polypodioides*. *Selbyana* 20: 120–124.
- CASE, M. A. 1993. High levels of allozyme variation within *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) and low levels of divergence among its varieties. *Systematic Botany* 18: 663–677.
- CASE, M. A., H. T. MLODOZENIEC, L. E. WALLACE, AND T. W. WELDY. 1998. Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky lady's slipper: *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 1779–1786.
- COZZOLINO, S., D. CAFASSO, G. PELLEGRINO, A. MUSACCHIO, AND A. WIDMER. 2003. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Molecular Ecology* 12: 2783–2792.
- DRESSLER, R. L. 1981. The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- [ESRI] ENVIRONMENTAL SYSTEMS RESEARCH INSTITUTE. 1996. Arc View program, version 3.2a. Website <http://www.esri.com/>.
- FISCHER, M., AND D. MATTHIES. 1998. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany* 85: 811–819.
- FRANKHAM, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Reviews Genetics* 29: 305–327.
- GONZÁLEZ-ASTORGA, J., A. CRUZ-ANGÓN, A. FLORE-PALACIOS, AND A. P. VOVIDES. 2004. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 94: 545–551.
- GROOM, M. J. 1998. Allee effects limit population viability of an annual plant. *American Naturalist* 151: 487–496.
- GUSTAFSSON, S. 2000. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology* 9: 1863–1872.
- HÁGSATER, E., M. Á. SOTO ARENAS, G. A. SALAZAR CHÁVEZ, R. JIMENEZ MACHORRO, M. A. LÓPEZ ROSAS, AND R. L. DRESSLER. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, Mexico City, Mexico.
- HAIG, M. S. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413–425.
- HALBINGER, F., AND M. SOTO. 1997. *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. In E. Hágsater, M. Soto, E. Greenwood, R. L. Dressler, P. J. Cribb, J. Rzedowski, P. M. Catling, C. J. Sheviak, and F. Chiang [eds.], *Laelias of México*. Orquídea (Méx.), vol. 15, 133–142. Asociación Mexicana de Orquideología, Mexico City, Mexico.
- HAMRICK, J. L., AND M. J. W. GODT. 1990. Allozyme diversity in plant species. In A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir [eds.], *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, 43–63. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- HAMRICK, J. L., AND M. J. W. GODT. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In J. C. Avise and J. L. Hamrick [eds.], *Conservation genetics case histories from nature*. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- HAMRICK, J. L., M. J. W. GODT, D. A. MURAWSKI, AND M. D. LOVELESS. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In D. A. Falk and K. E. Holsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, 75–86. Oxford University Press, Oxford, UK.
- HERNÁNDEZ-APOLINAR, M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae). B.Sc. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.
- HOOPER, E. A., AND C. H. HAUFLE. 1997. Genetic diversity and breeding system in a group of neotropical epiphytic ferns (*Pleopeltis*; Polypodiaceae). *American Journal of Botany* 84: 1664–1674.
- HUENNEKE, L. F. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. In D. A. Falk and K. E. Holsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, 31–44. Oxford University Press, New York, New York, USA.
- HUTCHINSON, D. W., AND A. R. TEMPLETON. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53: 1898–1914.
- IZQUIERDO, L. Y. 1995. Estructura y variación genética en cuatro especies de *Aechmea* (Bromeliaceae) en México: *A. mexicana* (Baker), *A. lueddemanniana* (K. Koch) Brong. ex Mez in Engl, Pflanzenr., *A. macvaughii*, L. B. Smith y *A. tuitensis* (P. Magaña y E. Lott). Ph.D. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.
- KALISZ, S., D. VOGLER, B. FAILS, M. FINER, E. SHEPARD, T. HERMAN, AND R. GONZALES. 1999. The mechanism of delayed selfing in *Collinsia verna* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 86: 1239–1247.
- KALISZ, S., AND D. W. VOGLER. 2003. Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* 84: 2928–2942.
- KALISZ, S., D. W. VOGLER, AND K. M. HANLEY. 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430: 884–886.
- KAY, Q. 1993. Genetic differences between populations of rare plants: implications for recovery programmes. *Botanical Society of the British Isles News* 64: 54–56.
- LI, C. C., AND D. G. HORVITZ. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics* 5: 107–117.
- LUNA-REYES, R., B. K. EPPERSON, AND K. OYAMA. 2005. Spatial genetic structure of two sympatric Neotropical palms with contrasting life histories. *Heredity* 95: 298–305.
- MEDINA, N. D. 2004. Éxito reproductivo en dos poblaciones de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae), en Michoacán, México. B. Sc. thesis, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico.
- MILLER, M. P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA), version 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer program available at website <http://www.marksgeneticsoftware.net>.
- MITTON, J. B., Y. B. LINHART, K. B. STURGEON, AND J. L. HAMRICK. 1979. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *Journal of Heredity* 70: 86–89.
- MURREN, C. J. 2003. Spatial and demographic population genetic structure in *Catasetum viridiflavum* across a human-disturbed habitat. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 333–342.
- MURREN, C. J., AND A. M. ELLISON. 1998. Seed dispersal characteristics of *Brassavola nodosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 675–680.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 9: 583–590.
- OOSTERMEIJER, J. G. B., M. W. VAN EIJCK, N. C. VAN LEEUWEN, AND H. C. M. DEN NIJS. 1995. Analysis of the relationship between allozyme heterozygosity and fitness in the rare *Gentiana pneumonanthe* L. *Journal of Evolutionary Biology* 8: 739–757.
- OYAMA, K. 1993. Conservation biology of tropical trees: demographic and genetic considerations. *Environment Update* 1: 17–32.
- PÉREZ-PÉREZ, M. A. 2003. Demografía de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) bajo diferentes condiciones de manejo en la zona centro-norte del estado de Michoacán. M.Sc. thesis, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico.
- PETTIT, R. J., A. E. MOUSADIK, AND O. PONDS. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844–855.
- QAMARUZ-ZAMAN, F., M. F. FAY, J. S. PARKER, AND M. W. CHASE. 1998. Molecular techniques employed in the assessment of genetic diversity: a review focusing on orchid conservation. *Lindleyana* 13: 259–283.
- RANKER, T. A. 1992. Genetic diversity of endemic Hawaiian epiphytic ferns: implications for conservation. *Selbyana* 13: 131–137.
- RAYMOND, M. L., AND F. ROUSSET. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- SALAZAR-CHÁVEZ, G. A. 1996. Conservation threats. In IUCN/SSC Orchid Specialist Group [eds.], *Orchids: status survey and conservation action plan*, 6–10. International Union for the Conservation of Nature/Species Survival Commission, Cambridge, UK.

- SCACCHI, R., AND G. DE ANGELIS. 1989. Isoenzyme polymorphisms in *Gymnaedenia conopsea* and its inferences for systematics within this species. *Biochemical Systematics and Ecology* 17: 25–33.
- SCACCHI, R., G. DE ANGELIS, AND R. M. CORBO. 1991. Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 176: 53–61.
- SCHMIDT, K., AND K. JENSEN. 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. *American Journal of Botany* 87: 678–689.
- SHARMA, I. K., D. L. JONES, AND C. J. FRENCH. 2003. Unusually high genetic variability revealed through allozymic polymorphism of an endemic and endangered Australian orchid, *Pterostylis aff. picta* (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 513–526.
- SNÄLL, T., J. FOGELQVIST, P. J. RIBEIRO, AND M. LASCoux. 2004. Spatial genetic structure in two congeneric epiphytes with different dispersal strategies analysed by three different methods. *Molecular Ecology* 13: 2109–2119.
- SNEATH, P. H., AND R. R. SOKAL. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, California, USA.
- SOLTIS, D. E., A. J. GILMARTIN, L. RIESEBERG, AND S. GARDNER. 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 74: 531–537.
- SQUIRRELL, J., P. M. HOLLINGSWORTH, R. M. BATEMAN, J. H. DICKSON, M. H. S. LIGHT, M. MACCONAILL, AND M. C. TEBBITT. 2001. Partitioning and diversity of nuclear and organelle markers in native and introduced populations of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 88: 1409–1418.
- STUBER, C. W., J. M. WENDEL, AND M. M. GOODMAN. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays*). Technical Bulletin 286. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA.
- SUN, M. 1996. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. *Conservation Biology* 10: 785–795.
- SUN, M. 1997. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. *American Journal of Botany* 84: 224–232.
- SUN, M., AND K. C. WONG. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 2180–2188.
- SZALANSKI, A. L., G. STEINAUER, R. BISCHOF, AND J. PETERSEN. 2001. Origin and conservation genetics of the threatened Ute ladies'-tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 88: 177–180.
- TORRES, E., J. M. IRIONDO, AND C. PÉREZ. 2003. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. *American Journal of Botany* 90: 85–92.
- TORRES, G. K. I. 2006. Sistema y éxito reproductivo de *Cuitlauzinia pendula* La Llave y Lex. (Orchidaceae) en San Andrés Corú, Michoacán, México. B.Sc. thesis, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico.
- TRAPNELL, D. W., AND J. L. HAMRICK. 2004. Partitioning nuclear and chloroplast variation at multiple spatial scales in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 2655–2666.
- TRAPNELL, D. W., AND J. L. HAMRICK. 2005. Mating patterns and gene flow in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 14: 75–84.
- TRAPNELL, D. W., J. L. HAMRICK, AND J. D. NASON. 2004. Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 1111–1118.
- TREMBLAY, R. L., AND J. D. ACKERMAN. 2001. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 47–62.
- TREMBLAY, R. L., J. D. ACKERMAN, J. K. ZIMMERMAN, AND R. N. CALVO. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1–54.
- VOGLER, D. W., AND S. KALISZ. 2001. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution* 55: 202–204.
- WALLACE, L. E. 2002. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biology* 17: 37–49.
- WALLACE, L. E. 2003. The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 90: 235–242.
- WALLACE, L. E. 2004. A comparison of genetic variation and structure in the allopolyploid *Platanthera huronensis* and its diploid progenitors, *Platanthera aquilonis* and *Platanthera dilatata* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 82: 244–252.
- WEIR, B. S., AND C. C. COCKERHAM. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- WENDEL, J. F., AND N. F. WEEDEN. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In D. E. Soltis and P. S. Soltis [eds.], *Isozymes in plant biology*, 5–45. Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA.
- WONG, K. C., AND M. SUN. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 86: 1406–1413.
- WORKMAN, P. L., AND J. D. NISWANDER. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics* 22: 24–49.

APPENDIX. Allelic frequencies in nine populations of *Laelia speciosa*. See Table 1 for the names of the populations. *N* = sample size.

Locus	Allele	OLM	INM	MAJ	AMD	BOJ	LOJ	TUT	XIG	HUH
<i>Got2</i>	1	0.053	0.028	0.066	0.310	0.115	0	0	0.016	0
	2	0.372	0.306	0.237	0.417	0.282	0.325	0.314	0.109	0.468
	3	0.032	0.056	0.132	0.036	0.141	0.075	0.186	0.109	0.208
	4	0.500	0.500	0.447	0.143	0.397	0.325	0.457	0.766	0.274
	5	0.021	0.014	0.079	0.012	0	0.050	0	0	0
	6	0.021	0.097	0.040	0.083	0.064	0.225	0.043	0	0.048
<i>N</i>		47	36	38	42	39	20	35	32	31
<i>Lap1</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0303	0.0156
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.968	0.984
<i>N</i>		48	35	38	45	34	20	37	33	32
<i>Lap2</i>	1	0.115	0.068	0.145	0.044	0.118	0.125	0.079	0.121	0.156
	2	0.260	0.446	0.105	0.767	0.221	0.100	0.211	0.152	0.406
	3	0.292	0.257	0.408	0.100	0.456	0.325	0.500	0.303	0.219
	4	0.302	0.189	0.303	0.022	0.132	0.400	0.118	0.394	0.203
	5	0.031	0.040	0.026	0.067	0.074	0.050	0.092	0.030	0.016
	6	0	0	0.013	0	0	0	0	0	0
<i>N</i>		48	37	38	45	34	20	38	33	32
<i>Mdh1</i>	1	0	0	0	0.034	0	0	0	0	0
	2	1.000	1.000	1.000	0.966	1.000	1.000	1.000	1.000	0.969
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0.031
<i>N</i>		50	37	38	44	34	19	38	33	32
<i>Mdh3</i>	1	0.146	0.194	0.197	0	0.059	0.056	0.189	0.242	0.113
	2	0	0	0	0	0	0	0	0.015	0.016
	3	0	0	0.013	0	0.029	0	0	0	0
	4	0.854	0.806	0.790	1.000	0.912	0.944	0.811	0.742	0.855
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0.016
<i>N</i>		48	36	38	44	34	18	37	33	31
<i>Pgm3</i>	1	0.033	0	0.013	0	0.017	0	0	0.074	0.017
	2	0.163	0.210	0.275	0.238	0.167	0.278	0.431	0.191	0.345
	3	0.054	0.040	0.063	0.071	0.050	0.056	0.028	0.088	0
	4	0.565	0.487	0.450	0.488	0.583	0.500	0.514	0.456	0.396
	5	0.185	0.263	0.200	0.202	0.183	0.167	0.028	0.191	0.241
<i>N</i>		46	38	40	42	30	9	36	34	29
<i>Pgm4</i>	1	0.011	0	0.013	0	0.017	0	0	0.044	0
	2	0.207	0.263	0.313	0.310	0.217	0.389	0.417	0.176	0.517
	3	0.044	0.053	0.062	0.060	0.033	0.056	0.042	0.044	0
	4	0.576	0.461	0.425	0.476	0.550	0.444	0.486	0.515	0.380
	5	0.163	0.224	0.188	0.155	0.183	0.111	0.056	0.221	0.103
<i>N</i>		46	38	40	42	30	9	36	34	29
<i>Pgi2</i>	1	0.071	0	0	0	0	0	0	0.063	0
	2	0.020	0	0.053	0.047	0.014	0	0	0.078	0
	3	0.765	0.931	0.632	0.884	0.833	0.889	0.878	0.781	0.935
	4	0.020	0.014	0.026	0.012	0	0.028	0	0.047	0
	5	0.071	0.028	0.158	0.058	0.125	0.056	0.027	0.031	0.065
	6	0.031	0.014	0.026	0	0.014	0	0.027	0	0
	7	0.020	0	0.105	0	0.014	0.028	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0.041	0	0
	9	0	0.0139	0	0	0	0	0.027	0	0
<i>N</i>		49	36	38	43	36	18	37	32	31
<i>Pgi3</i>	1	0.041	0	0	0	0	0	0	0.016	0
	2	0	0	0.132	0.012	0.014	0	0	0.078	0
	3	0.592	0.750	0.565	0.872	0.686	0.806	0.703	0.766	0.807
	4	0.021	0.083	0.026	0.023	0.057	0.028	0	0.063	0
	5	0.204	0.111	0.224	0.081	0.143	0.083	0.108	0.063	0.097
	6	0.071	0.042	0.040	0	0.014	0	0.027	0	0
	7	0.071	0	0.117	0.012	0.086	0.056	0	0.016	0.097
	8	0	0	0	0	0	0	0.122	0	0
	9	0	0.014	0.013	0	0	0.028	0.041	0	0
<i>N</i>		49	36	38	43	35	18	37	32	31

APPENDIX. Continued.

Locus	Allele	OLM	INM	MAJ	AMD	BOJ	LOJ	TUT	XIG	HUH
<i>Idh1</i>	1	0	0	0	0	0	0	0.014	0	0.074
	2	0.296	0.297	0.307	0.357	0.338	0.361	0.222	0.258	0.259
	3	0.245	0.243	0.192	0.157	0.162	0.139	0.306	0.242	0.185
	4	0.235	0.257	0.282	0.343	0.338	0.361	0.236	0.258	0.204
	5	0.225	0.203	0.192	0.143	0.162	0.139	0.222	0.242	0.278
	6	0	0	0.026	0	0	0	0	0	0
<i>N</i>		49	37	39	35	37	18	36	33	27
<i>Idh2</i>	1	0.071	0.054	0.013	0.086	0	0.028	0.056	0.015	0.204
	2	0.122	0.243	0.180	0.214	0.014	0.278	0.097	0.152	0.037
	3	0.276	0.162	0.244	0.271	0.716	0.139	0.347	0.349	0.315
	4	0.531	0.541	0.526	0.429	0.230	0.556	0.500	0.485	0.444
	5	0	0	0.026	0	0.041	0	0	0	0
	6	0	0	0.013	0	0	0	0	0	0
<i>N</i>		49	37	39	35	37	18	36	33	27
<i>6Pgd2</i>	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.938
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.063
<i>N</i>		49	36	36	43	20	12	19	34	32
<i>Cpx1</i>	1	0.075	0.079	0.091	0.058	0.050	0.083	0.181	0.058	0.172
	2	0.925	0.921	0.909	0.942	0.950	0.917	0.819	0.941	0.828
<i>N</i>		40	38	33	43	30	18	36	34	29
<i>Mnr3</i>	1	0.053	0	0	0	0	0.125	0.097	0	0
	2	0.934	1.000	1.000	0.988	0.988	0.792	0.870	1.000	0.967
	3	0.013	0	0	0.012	0.020	0.083	0.033	0	0.032
<i>N</i>		38	21	39	43	41	12	31	34	31
<i>Est2</i>	1	0	0	0	0	0	0.100	0	0	0.067
	2	0.576	0.370	0.333	0.640	0.513	0.750	0.409	0.605	0.267
	3	0.380	0.426	0.556	0.326	0.350	0.125	0.227	0.290	0.417
	4	0.044	0.185	0.111	0.023	0.088	0.025	0.197	0.105	0.200
	5	0	0.019	0	0.012	0.050	0	0.167	0	0.050
<i>N</i>		46	27	18	43	40	20	33	19	30
<i>Dia2</i>	1	0.040	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0.830	0.908	0.736	0.796	0.743	1.000	0.919	0.939	0.741
	3	0.130	0.092	0.264	0.205	0.257	0	0.081	0.061	0.258
<i>N</i>		50	38	36	44	35	20	31	33	31

CAPÍTULO 3

**SISTEMA DE APAREAMIENTO Y ÉXITO REPRODUCTIVO FEMENINO DE LA
EPÍFITA AMENAZADA *LAELIA SPECIOSA* (ORCHIDACEAE) ¹**

IRENE ÁVILA - DÍAZ^{2,3,4}, QUESADA M. ², Y KEN OYAMA²

² Centro de Investigaciones en Ecosistemas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701,
Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta. 58190,
Morelia, Michoacán, México

³ Facultad de Biología,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. R, planta baja.
Ciudad Universitaria. 58040, Morelia, Michoacán; México.

NOTA: Este capítulo se traducirá al inglés y será enviado a la revista *American Journal of Botany*, por lo cual el formato se ajusta a tal revista p. ej. referencias en la literatura citada y las palabras como in vitro y fruit set sin letras itálicas.

¹Manuscrito recibido _____; revisión aceptada _____.

Los autores agradecen a A. C. Cortés-Palomec y José G. García Franco por sus comentarios a una primer versión del manuscrito, a dos revisores anónimos por sus sugerencias. A J. Serrato-R., O. Muñoz-Serrato, R. Valencia y M. A. Pérez-Pérez por su ayuda con el trabajo de campo. A Yvonne Herrerías D. y Heberto Ferreira por su asistencia técnica. Esta investigación fue apoyada por el Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza (FMCN, proyecto A 1-99/130), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEMARNAT-CONACYT , proyecto 2002- C01-0544); IA-D fue apoyada con una beca doctoral de CONACYT (Reg. 130249) y DGEP- UNAM (Proyecto 202392).

⁴ Autor para correspondencia *iavila@oikos.unam.mx*

El conocimiento de la biología reproductiva, de la ecología y la genética de poblaciones, es esencial para planear estrategias adecuadas de conservación. Estudiamos, el sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino de *Laelia speciosa*, una orquídea epífita amenazada endémica de México. Se llevaron a cabo pruebas de polinización y se determinó la proporción de frutos por autogamia espontánea, endocruzamiento, exocruzamiento y polinización abierta, así como la viabilidad de semillas y la proporción de germinación in vitro. En endocruzamiento, se registró significativamente menor fructificación (0.15 ± 0.035) que con exocruzamiento (0.80 ± 0.053). Se estimó un menor bajo índice de auto-compatibilidad ($SCI = 0.18$) y una mayor viabilidad de semillas en el tratamiento de exocruzamiento y en polinización abierta que en el de endocruzamiento, así como una mayor tasa de exocruzamiento ($t = 0.709$) y de la tasa multilocus de exocruzamiento ($tm = 0.995$). Los resultados indican que *L. speciosa* es una especie predominantemente exógama pero con la capacidad de producir semillas viables por endocruzamiento, lo cual puede ser una ventaja adaptativa, apoyando la hipótesis de “aseguramiento reproductivo”. *L. speciosa* es dependiente de polinizadores para su reproducción sexual. El éxito reproductivo femenino (0.29 ± 0.058) indica limitación de polinizadores como en otras especies de orquídeas tropicales. Un manejo adecuado, debe favorecer la polinización cruzada dentro de las poblaciones e incrementar los tamaños poblacionales.

Palabras clave: Sistema de apareamiento; éxito reproductivo; *Laelia speciosa*; México; Orchidaceae.

La estructura floral de las orquídeas generalmente es especializada de tal forma que previene la autopolinización espontánea y facilita el cruzamiento mediante insectos (Dressler, 1981). Sin embargo, existen casos de autogamia, geitonogamia y endogamia biparental aun con la intervención de polinizadores (Wong y Sun, 1999). La mayoría de las especies de orquídeas son autocompatibles pero presentan barreras morfológicas que previenen la autopolinización (van der Pijl y Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993; Borba y Semir, 1999). También se ha reportado en pocas especies de orquídeas, barreras genéticas postpolinización (i.e. auto-incompatibilidad o bien depresión por endogamia) que promueven el exocruzamiento (Christensen, 1992; Borba et al., 2001; Wallace, 2003).

En aquellas especies predominantemente exógamas, un riesgo significativo para la extinción local de sus poblaciones es la depresión por endogamia, la cual puede reducir la adecuación de los individuos (Mills y Smouse, 1994; Frankham, 1995; Amos y Balmford, 2001). Sin embargo, la endogamia puede resultar de la autofertilización o del apareamiento entre individuos genéticamente similares. Por lo cual, en plantas con flores, cualquier especie autocompatible está potencialmente en riesgo de sufrir los efectos negativos de depresión por endogamia (Wallace, 2003). Sin embargo, en ciertas condiciones, cuando existe una disponibilidad variable de polinizadores o la polinización cruzada se ve limitada, la autogamia puede asegurar la reproducción.

Los costos combinados de la autogamia (disminución de semillas, arresto de polen y depresión por endogamia), pueden contrarrestarse con la adecuación ganada, al asegurar la producción de semillas (Kalisz et al., 2004). Se ha propuesto la hipótesis de “aseguramiento reproductivo” (reproductive assurance) que establece que si la polinización cruzada es inconsistente dentro o entre años, se favorece la autopolinización, lo cual puede resultar en una mezcla de autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas en la producción de semillas (sistema mixto de apareamiento).

Lo imprevisible de los polinizadores favorece el cambio evolutivo de polinización cruzada a autopolinización autónoma lo cuál provee el aseguramiento reproductivo (Kalisz y Vogler, 2003). La adecuación ganada con la autopolinización, puede variar entre diferentes historias de vida y la depresión por endogamia entre años pueden representar un costo de la autogamia, por

lo tanto, así se mantienen las poblaciones con sistema reproductivo mixto (Cheptou y Schoen, 2002). La hipótesis del aseguramiento reproductivo predice que en una flor puede evolucionar la autopolinización si los polinizadores no son constantes en llevar a cabo la polinización cruzada. El grado de lo imprevisible de los polinizadores, puede favorecer diferentes modos de autogamia y esos a su vez tener diferentes consecuencias en la evolución de los sistemas reproductivos (Kalisz y Vogler, 2003). Sin embargo, existe poca evidencia empírica que apoye la hipótesis de aseguramiento reproductivo (Kalisz et al., 2004).

En la familia Orchidaceae una fuerte limitación de polinizadores es característica (Tremblay et al., 2005), por lo que la disponibilidad de los polinizadores es imprevisible, presión que probablemente ha favorecido la predominancia de sistemas reproductivos mixtos, incluyendo aquellas especies principalmente exógamas pero con la capacidad, de producir frutos con su propio polinario, y aquellas especies que pueden tener polinización cruzada y también tienen la capacidad de autopolinizarse ellas mismas, las cuales pueden considerarse como una evidencia de la hipótesis de aseguramiento reproductivo.

El objetivo de esta investigación consistió en estudiar el sistema de apareamiento y también el éxito reproductivo femenino a través de la proporción de frutos obtenida con polinización abierta de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae), una orquídea epífita, amenazada y endémica de México. Miles de plantas de *L. speciosa* son cortadas cada año, para venderlas en los mercados y calles de muchas ciudades de México (Salazar-Chávez, 1996; Halbinger y Soto, 1997; I. Ávila-Díaz, obs. pers.). Esta extracción masiva ha ocasionado una extinción local de muchas de sus poblaciones naturales (Halbinger y Soto, 1997; I. Ávila-Díaz, obs. pers.), por lo que se considera de suma importancia generar conocimiento sobre su biología reproductiva que contribuya a la conservación de sus poblaciones a largo plazo. El conocer su sistema de apareamiento y éxito reproductivo, puede ser útil para implementar estrategias de manejo sustentable in situ, como ex situ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de estudio—*Laelia speciosa* es una epífita perenne, con pseudobulbos globulares u ovoides, los cuales tienen una hoja terminal rígida. La inflorescencia tiene de 15 a 25 cm. de longitud, con 1 a 3 flores grandes que miden 10-16 cm. de diámetro, de color lila-rosado, pálido

a oscuro (Halbinger y Soto, 1997). El tiempo de floración es de abril a mediados o finales de junio, con el máximo de floración a mediados de mayo (Medina, 2004; I. Ávila-Díaz, obs. pers.). Durante el tiempo de floración de *L. speciosa*, antes de que empiecen las lluvias o al inicio de estas, los árboles hospederos no presentan hojas, ya que son caducifolios como *Quercus deserticola* y *Q. laeta*, por lo que las flores vistosas de la orquídea son muy conspicuas en el bosque. Las flores son polinizadas por abejas reinas de *Bombus pennsylvanicus sonorus* y *B. ephippiatus*, adicionalmente, otros insectos como *Apis mellifera*, *Xylocopa tabaniformis* y obreros de *Bombus pennsylvanicus sonorus* han sido observados visitando las flores, pero no hay evidencia de que sean polinizadores (Medina, 2004). *L. speciosa* ha sido considerada como una orquídea que no ofrece recompensa a sus polinizadores (Hernández-Apolinar, 1992; Tremblay et al., 2005). Sin embargo dadas sus características florales (p. ej. el presentar fragancia y polen agrupado en masas conformando polinios), se considera que podría ofrecer alguna recompensa. El tiempo de maduración de los frutos es de 9 a 10 meses, y sus semillas son dispersadas en el siguiente año en febrero o marzo (I. Ávila-Díaz, obs. pers.).

L. speciosa vive en bosques deciduos, abiertos, de 1440 a 2500 m de altitud (Halbinger y Soto, 1997) es una especie endémica de la parte central de México, que incluye bosques de encino de la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, el Eje Neovolcánico Transversal y de algunas elevaciones de la parte sur de la Altiplanicie Mexicana, en el estado de Zacatecas (Halbinger y Soto, 1997).

Sitios de estudio—Dos poblaciones de *L. speciosa* en el estado de Michoacán, México, fueron seleccionadas para estudiar el sistema de apareamiento y éxito reproductivo: Indaparapeo (INM), (19° 43' 26" N, 101° 55' 19" W, con una altitud de 2400m y Cerro El Olvido (OLM) (19° 37' 59" N, 101° 29' 09" W a una altitud de 2361m). Ambos sitios se localizan en el Eje Neovolcánico Transversal y consisten en bosques con *Quercus deserticola* como la especie dominante. El clima en ambos sitios es templado subhúmedo con lluvias en verano (García, 1973). El área de OLM, tiene una precipitación anual de 961 mm, con una temperatura media anual de 16.8 °C y en INM se registra una precipitación anual de 1000 mm, con una temperatura media anual de 17.5 °C.

Producción de frutos—En 1998, se llevaron a cabo pruebas de polinización para *L. speciosa* en la población INM. Se embolsaron 45 botones florales en 42 plantas, distribuidas en 17 árboles, con bolsas de tul fino, para evitar la interacción con cualquier insecto. Una vez que abrieron las flores, se llevaron a cabo las pruebas de polinización. Para probar la autogamia espontánea, se dejaron embolsadas las flores sin manipular. En los siguientes casos, se polinizaron manualmente, insertando completo el propio polinario (endocruzamiento) o de otro individuo distante (exocruzamiento), en la cavidad estigmática. La asignación del tratamiento a realizar en el campo fue al azar. Quince flores fueron utilizadas en cada tratamiento de polinización. Una vez manipuladas las flores fueron embolsadas hasta que el fruto inició su desarrollo.

En 1999 se usaron dos sitios de estudio, con un mayor número de flores. Se embolsaron 150 botones florales en cada población, en 129 plantas distribuidas sobre 58 árboles hospederos en OLM y en 126 plantas, sobre 60 árboles hospederos en INM. En cada sitio, 50 flores fueron dejadas para probar la autogamia espontánea, otras 50 tratadas con endocruzamiento, 50 más con exocruzamiento y 50 adicionales como flores abiertas, sin embolsar para registrar la polinización abierta. Cabe mencionar que en el transcurso del experimento, algunas de las flores tratadas fueron extraídas.

Las plantas de *L. speciosa* que crecen en ambos sitios de estudio, por lo general desarrollan una flor por planta, ocasionalmente dos, en tal caso, se trataron ambas flores. La producción de frutos en cada tratamiento fue evaluada por la proporción de fructificación o fruit set (total de frutos producidos en cada tratamiento/número de flores polinizadas en el mismo tratamiento) (Dafni, 1992).

Los valores de fructificación se presentan como la proporción de frutos desarrollados en relación al número de flores manipuladas (\pm error estándar). Se utilizó el modelo lineal generalizado aplicando el procedimiento GENMOD (SAS 2000). El modelo usó el tratamiento agrupado dentro del año como la variable categórica independiente. La variable dependiente fue el fruit set. Este modelo, usa una distribución binomial y una función logit.

Los estudios de autopolinización reflejan la producción de frutos o de semillas como un resultado de la autopolinización artificial en la ausencia de polen externo. La tasa de

autopolinización es un criterio importante para evaluar el desempeño del polen sobre el estigma de la misma flor, de flores de la misma planta o de flores de los mismos genets. En este trabajo se calculó el índice de autocompatibilidad (Lehnebach, 2004) de la siguiente manera:

$$\text{SCI} = \text{fruit set con endocruzamiento} / \text{fruit set con exocruzamiento}$$

Los valores de SCI están dentro del rango de 0 (una especie completamente auto-incompatible) a > 1 (una especie completamente auto-compatible) (Dafni, 1992).

Viabilidad de semillas—Fue evaluada como en otros trabajos (Borba et al., 2001; Wallace, 2003), con la proporción de semillas con embrión, que en el caso de *L. speciosa* es turgente y de color pardo (Fig. 1a). Adicionalmente, su viabilidad fue evaluada con la germinación in vitro como a continuación se detalla.

Proporción de semillas con embrión—Tomando en consideración que *L. speciosa* es una especie amenazada y no queriendo alterar sus poblaciones naturales con el presente estudio, al llevar a cabo polinizaciones manuales, sobre todo endocruzamiento que pudiera ocasionar depresión por endogamia en un futuro, todas las cápsulas desarrolladas en el tratamiento de endocruzamiento fueron colectadas, así como 10 obtenidas con en el tratamiento de exocruzamiento y 10 obtenidas con polinización abierta, para ser observadas al microscopio. La proporción de semillas con embrión, fue determinada con 10 cápsulas por tratamiento. Para cada una se tomó una muestra de semillas de 5 mg y se colocaron en 1 ml de agua destilada con 10 μl de Hyclin-Plus (Hycel de México, S.A., Zapopan, Jal.) al 1% para romper la tensión superficial y tener una mezcla más uniforme de semillas. De esta mezcla se tomaron tres muestras de 20 μl cada una para su observación en el microscopio estereoscópico Leica Zoom 2000 a 30x. Para facilitar la observación se utilizó un cubreobjetos dividido en nueve cuadrantes.

Se registró el número de semillas que presentaron embrión viable y las que se encontraron vacías o con un embrión muy pequeño e incoloro, que se consideraron inviables (Fig. 1a, b), ya que al sembrar ese tipo de semillas in vitro, no germinaron. En promedio se observaron 481 semillas por cápsula (con un mínimo de 114).

Para cada cápsula se calculó la proporción de semillas con embrión. Se utilizó el modelo lineal generalizado aplicando el procedimiento GENMOD (SAS 2000). El modelo usó el tratamiento dentro del sitio como la variable categórica independiente. La variable dependiente fue viabilidad de semillas evaluada con la presencia de embrión. Este modelo utilizó una distribución binomial con una función logit.

Germinación in vitro—De las cápsulas utilizadas para determinar la presencia de embriones, provenientes de la población OLM, se tomó una submuestra de seis cápsulas por tratamiento para sembrar sus semillas in vitro. Se tomaron aprox. 0.15 g de semillas, las cuales fueron sometidas al siguiente tratamiento de asepsia: etanol al 70% por 3 min., agua oxigenada 3% durante 3 min., hipoclorito de sodio (cloralex) al 20% 20 min., cinco enjuagues con agua destilada estéril.

Una vez desinfectadas, las semillas se distribuyeron uniformemente sobre la superficie del medio de cultivo sembrando 4 frascos por cápsula. Se sembraron 24 frascos por tratamiento (endocruzamiento, exocruzamiento y polinización abierta), obteniendo un total de 72 frascos.

El medio de cultivo utilizado fue el MS (Murashigue – Skoog, 1962), sin reguladores de crecimiento, con 20 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar y un pH de 5.7, el cual es un medio óptimo para la germinación de *L. speciosa* (Ávila-Díaz y Salgado, 2000). Los frascos fueron mantenidos en un cuarto de crecimiento a una temperatura de ca. 25 °C, con 16 horas de luz, (2000 lux). A los 5 meses, se extrajeron con una espátula aprox. 0.5 cm² de muestra de cada uno de los cuatro frascos para cada tratamiento, para observar el número de semillas germinadas en un total de 100 por cápsula, con un total de 600 observaciones por tratamiento.

Se calculó la proporción de semillas germinadas in vitro en cada uno de los tratamientos \pm error estándar. Se utilizó el modelo lineal generalizado aplicando el procedimiento GENMOD (SAS 2000). El modelo considera el tratamiento como la variable independiente. La variable dependiente fue germinación in vitro. Este modelo utilizó una distribución binomial con una función logit.

Tasa de exocruzamiento (t)—Una estimación de la exogamia en condiciones naturales, puede obtenerse con la comparación de los valores de semillas (en este caso de embriones)

obtenidas en flores polinizadas naturalmente con aquellas polinizadas manualmente, tanto con endocruzamiento como con exocruzamiento (Dafni, 1992). En este estudio, se calculó la tasa de exocruzamiento t para el año 1999, definida como:

$$t = 1 - S$$

donde S es la tasa de endocruzamiento y se estima de la siguiente manera:

$$S = P_X - P_O / P_X - P_S$$

P_X es el valor de la producción de embriones con exocruzamiento, P_O con la polinización abierta y P_S con endocruzamiento (Charlesworth y Charlesworth, 1987).

Tasa multilocus de exocruzamiento (tm)—Para estimar la tasa multilocus de exocruzamiento, se muestrearon en cada población 50 individuos reproductivos (cada uno de diferente árbol hospedero). Se utilizaron secciones de raíces frescas, para los análisis genéticos con aloenzimas siguiendo los sistemas y tinciones reportados por Ávila-Díaz y Oyama, 2007. Los 16 loci usados en once sistemas enzimáticos fueron: *Got2*, *Lap1*, *Lap2*, *Est2*, *Mdh1*, *Mdh3*, *Pgm3*, *Pgm4*, *Pgi2*, *Pgi3*, *Idh1*, *Idh2*, *6Pgd2*, *Cpx1*, *Dia2* y *Mnr3*. Los sistemas enzimáticos con más de un locus fueron numerados en orden ascendente a partir del locus con mayor movilidad.

La tasa multilocus de exocruzamiento (tm) para *L. speciosa* se calculó usando los modelos de Ritland (1989a) y Lynch y Ritland (1999). Para su cálculo, se utilizó el programa MLTR (Ritland, 1996) y la desviación estándar fue obtenida por bootstrapping con 1000 repeticiones (Ritland, 1996).

RESULTADOS

Producción de frutos—Al coleccionar los frutos obtenidos en cada uno de los tratamientos, se observaron de dos tipos (Fig. 1c y 1d): unos secos y amarillos, de los cuales algunos ya estaban iniciando su dehiscencia a los 7 meses de efectuados los tratamientos y otros frutos verdes e hidratados sin abrir. Aquellos frutos que se observaron amarillos y secos, no presentaron embriones en sus semillas o se observaron embriones pequeños e incoloros. Al sembrar ese tipo

de semillas in vitro no germinaron en un lapso de 5 meses, por lo que se consideraron como no viables tales frutos y solamente como frutos viables aquellos verdes e hidratados.

Como en el tratamiento de autogamia espontánea, no se registró fructificación, para la comparación de la producción de frutos solo se utilizaron los tratamientos de endocruzamiento, exocruzamiento y polinización abierta. En la Tabla 1 se muestran los estadísticos que indican que no se tiene un efecto significativo de año, sitio, o la interacción entre estos y solamente el tratamiento tiene un efecto significativo, por lo que todos los datos de ambos años y sitios, se consideraron como una sola entidad para evaluar el efecto de los tratamientos en el fruit set.

En el tratamiento de endocruzamiento, se registra significativamente ($X^2=53.80$, $df=1$, $P<0.0001$) menor fructificación (0.15 ± 0.035), que en el tratamiento de exocruzamiento (0.80 ± 0.053). También en el tratamiento de polinización abierta, la producción de frutos (0.29 ± 0.058), es significativamente menor ($X^2=27.90$, $df=1$, $P<0.0001$) que con exocruzamiento, pero mayor que con endocruzamiento ($X^2=4.90$, $df=1$, $P=0.0268$) (Tabla 2).

El índice de auto-incompatibilidad para *L. speciosa* es $SCI = 0.18$.

Viabilidad de semillas

Presencia de embrión en las semillas—Los estadísticos para la viabilidad de semillas evaluada con la presencia de embrión, indican que no se tiene un efecto significativo en cuanto al sitio de estudio ($X^2=0.58$, $gl=1$, $P=0.4478$) ni la interacción entre sitio y tratamiento ($X^2=3.59$, $gl=2$, $P=0.1665$); solamente se observa un efecto significativo del tratamiento ($X^2=60.33$, $gl=2$, $P<0.0001$).

Las proporciones de semillas con embrión en el tratamiento de endocruzamiento son significativamente ($X^2=41.49$, $df=1$, $P=<0.0001$) menores (0.062 ± 0.060) que en el tratamiento de exocruzamiento (0.670 ± 0.059) y también significativamente menores ($X^2=23.75$, $df=1$, $P<0.0001$) que en el tratamiento de polinización abierta (0.494 ± 0.060) (Fig. 2). No se registran diferencias significativas entre la proporción de semillas con embrión en el tratamiento de exocruzamiento y en el de la polinización abierta ($X^2=1.90$, $df=1$, $P=0.1679$) (Fig. 2).

Germinación in vitro—Las proporciones de germinación in vitro de las semillas provenientes de la submuestra de frutos de la población OLM son significativamente diferentes entre los tratamientos. En el tratamiento de endocruzamiento, la germinación es significativamente menor (0.2383 ± 0.017 , $X^2=386.22$, $df=1$ $P<0.0001$) que en el de exocruzamiento (0.7867 ± 0.0167), en el cual, a su vez se observa una menor ($X^2=11.49$, $df=1$ $P=0.0007$) germinación que en semillas provenientes del tratamiento de polinización abierta (0.8617 ± 0.0141) (Tabla 3).

Tasa de exocruzamiento (*t*)—El valor de la tasa de exocruzamiento, calculada en base a las proporciones de semillas con embrión, en los tratamientos de exocruzamiento, endocruzamiento y polinización abierta, fue de: $t=0.709$.

Tasa multilocus de exocruzamiento (*tm*)— El valor de la tasa multilocus de exocruzamiento para *L. speciosa* fue de : tm (SD) = 0.995 (0.004).

DISCUSIÓN

Producción de frutos—*L. speciosa* es dependiente de polinizadores para su reproducción sexual, dado que no hubo fructificación con autogamia espontánea; como en la mayoría de las especies de orquídeas, que requieren de un agente polinizador externo para producir frutos y semillas (Dressler, 1981; Zimmerman y Aide, 1989; Ackerman y Montalvo, 1990; Parra-Tabla et al., 2000; Borba et al., 2001; Matsui et al., 2001; Elliott y Ladd, 2002; Wallace, 2003; Lehnebach y Robertson, 2004). La mayor producción de frutos en *L. speciosa*, por exocruzamiento que por endocruzamiento está acorde con los bajos valores del índice de auto-compatibilidad calculados ($SCI = 0.18$).

Nuestros resultados concuerdan con los encontrados en *Earina aestivalis* y *Winika cunninghamii*, dos orquídeas epífitas de Nueva Zelanda, que también muestran una producción de frutos significativamente mayor con exocruzamiento comparada con la de endocruzamiento, sugiriendo los autores para esas especies, una auto-incompatibilidad parcial (Lehnebach y Robertson, 2004).

Se considera necesario puntualizar que las observaciones de la producción de frutos deben llevarse a cabo en etapas avanzadas de su desarrollo, ya que como en el caso de *L. speciosa*, los frutos con endocruzamiento pueden empezar a desarrollarse de manera muy similar a aquellos con exocruzamiento, y no es sino hasta después de 6 - 7 meses de desarrollo que se ven las diferencias entre los frutos no viables y los viables.

Viabilidad de semillas—La mayor viabilidad de semillas en *L. speciosa* en los frutos producto de exocruzamiento, sugiere un mecanismo de abortición temprana. En otras especies de orquídeas epífitas se observa también una mayor producción de embriones con exocruzamiento, considerándose que esto favorece en gran medida la exogamia (Stort y Martins, 1980; Stort y Galdino, 1984; Tremblay et al., 2005).

Consideraciones del sistema de apareamiento—*L. speciosa* es una especie predominantemente exógama en sus poblaciones naturales, por los bajos valores de SCI, así como por la mayor viabilidad de semillas por exocruzamiento y polinización abierta que en endocruzamiento, por los altos valores de las tasas de exocruzamiento (t y tm) así como por su biología floral dado que en general esta especie presenta solo una flor por planta, de gran tamaño, coloración intensa, con forma, color y tamaño muy variables, con una gran longevidad (I. Ávila-Díaz, obs. pers.) y como en el caso de otras orquídeas, presenta una separación espacial del polen (en polinios) y del estigma, a través de una barrera física (rostelo) en la estructura que los porta denominada columna (Fig. 3). *Laelia rubescens* otra orquídea epífita tropical con rostelo, es también predominantemente exógama (Trapnell y Hamrick 2005).

Las flores grandes, y conspicuas, así como la estrategia de incrementar la longevidad de la flor, aumentan la probabilidad de las visitas de los agentes polinizadores y por tanto de la función reproductiva sexual (Ashman y Schoen, 1994; Schoen y Ashman, 1995).

El hecho de que con endocruzamiento manual se produzcan algunos frutos con semillas viables que desarrollan plántulas capaces de sobrevivir más de dos años in vitro (I. Ávila-Díaz, obs. pers.), en porcentajes suficientes para considerar que la auto fertilización puede ser tolerada en esta especie, significa que *L. speciosa* tiene un sistema de reproducción mixto, en el cual aunque la exogamia sea el mecanismo más común para producir semillas, la autogamia y el apareamiento entre parientes puede existir, lo cual podría relacionarse con los niveles moderados

de endogamia encontrados en un estudio previo ($f(F_{IS}) = 0.216$, 95% IC = 0.029-0.381) (Ávila-Díaz y Oyama, 2007).

Otras especies de orquídeas en las que también se sugiere como mecanismo de reproducción principal la exogamia, pero con la capacidad de producir cápsulas con semillas viables con endocruzamiento son algunas especies del género *Laelia* (Stort y Galdino, 1984), diversas especies del género *Cattleya* (Stort y Martins, 1980; Camargo et al., 2006), algunas *Pleurothallis* (Borba et al., 2001), y *Platanthera leucophaea* (Wallace, 2003).

Se ha reportado que la autogamia facultativa puede ocurrir en diversas especies de orquídeas y puede ser una estrategia apropiada cuando la frecuencia de polinización es baja (Stort y Martins, 1979; Catling, 1990; Neiland y Wilcock, 1998; Oh et al., 2001). La proporción relativa de los dos modos de reproducción (autogamia y exogamia) es dependiente de la especie. Se ha sugerido que las epífitas obligadas podrían caracterizarse por incrementar la autogamia para asegurar una alta producción de semillas (Benzing, 1978). Pero, por otro lado, las barreras de auto-incompatibilidad, han sido consideradas generalmente como una estrategia ventajosa en especies epífitas, ya que frecuentemente son escasas en el bosque y la autogamia y apareamiento entre parientes es más fácil que ocurra (Ackerman, 1986).

La combinación de ambos tipos de reproducción (autogamia y exogamia) en la misma especie, puede ofrecer una ventaja para asegurar la producción de progenie aún bajo condiciones ambientales adversas o en eventos de colonización, esto es, cuando es variable la disponibilidad de polinizadores y/o de parejas reproductivas (Vogler y Kalisz, 2001; Kalisz et al., 2004). Tasas de exocruzamiento de intermedias a altas, como las encontradas en *L. speciosa* ($t = 0.709$ y de $tm=0.995$), predominan en un amplio rango de especies polinizadas por animales, considerándose que lo imprevisible de los polinizadores podría ser una presión de selección para obtener la capacidad de auto polinizarse y también de tener polinización cruzada (Vogler y Kalisz, 2001). En general, en la familia Orchidaceae existe una marcada limitación de polinizadores (Tremblay et al., 2005), lo cual probablemente esté relacionado con la predominancia de los sistemas de apareamiento mixtos, por lo cuál *L. speciosa* y muchas otras especies de orquídeas (Stort y Martins, 1980; Stort y Galdino, 1984; Trapnell y Hamrick, 2005; Tremblay, 2005), pueden ajustarse a la hipótesis de aseguramiento reproductivo (reproductive

assurance hypothesis). Aquellas especies de orquídeas capaces de auto polinizarse en ausencia de polinizadores como es *Cattleya aurantiaca* (Stort y Martins, 1980), son una evidencia de tal hipótesis.

Éxito reproductivo femenino—El valor de la proporción de frutos obtenida en flores con polinización abierta, registrada para *L. speciosa* fue de 0.29, que es mayor a los reportados con anterioridad en la misma especie, 0.15 para OLM (Hernández-Apolinar, 1992), 0.15 también en OLM y 0.05 en otra población “Cerro El Agostadero” al Noroeste del estado de Michoacán (Medina, 2004). La variación observada tanto espacial como temporal del éxito reproductivo en *L. speciosa* podría explicarse, al igual que en otras especies de orquídeas, por una densidad y actividad diferencial de los polinizadores (Ackerman et al., 1997; Parra-Tabla et al., 2000; Matsui et al., 2001; Murren, 2002; Medina, 2004; Tremblay et al., 2005), así como también por una diferencia en la disponibilidad de recursos (Montalvo y Ackerman, 1987; Tremblay et al., 2005), condiciones ambientales o interacciones bióticas (p. ej. herbivoría, presencia de otras plantas semejantes que ofrecen recompensa) (Malo et al., 2001; Matsui et al., 2001; Elliott y Ladd, 2002; Murren, 2002; Medina, 2004; Anderson et al., 2005).

Los niveles de fruit set encontrados en *L. speciosa* están dentro de los rangos reportados para otras especies de orquídeas tropicales que no ofrecen recompensa (Schemske, 1980; Ackerman y Montero Oliver, 1985; Pettersson, 1989; Zimmerman y Aide, 1989; Ackerman y Montalvo, 1990; Calvo, 1993; Ackerman et al., 1997; Parra-Tabla et al., 2000; Borba y Semir, 2001; Borba, et al., 2001; Flores-Palacios y García Franco, 2003; Trapnell y Hamrick, 2006). En *L. speciosa* y en general en la familia Orchidaceae, los valores de fruit set son bajos, menores que los registrados en los tratamientos de polinización manual, lo cual se atribuye a una severa limitación de polinizadores (Zimmerman y Aide, 1989; Calvo, 1990; Hernández-Apolinar, 1992; Calvo, 1993; Ackerman et al., 1997; O’Connell y Johnston, 1998; Matsui et al., 2001; Oh et al., 2001; Elliott y Ladd, 2002; Tremblay et al., 2005).

En el tratamiento de polinización abierta en *L. speciosa*, los altos valores de flores no fecundadas (proporciones mayores de 0.50), mucho mayores que los de frutos no viables (0.032), sugieren también una limitación por polinizadores, lo cual es acorde con los bajos

porcentajes de remoción de polinios reportados en la población OLM (24.75%) y en el “Cerro El Agostadero”, al Noroeste del estado de Michoacán (19.91%) (Medina, 2004).

La proporción de semillas viables con polinización abierta, evaluada con la presencia de embrión, no mostró diferencias significativas con respecto al exocruzamiento, mientras que la viabilidad evaluada con la germinación *in vitro*, fue mayor en polinización abierta que con exocruzamiento, probablemente porque la progenie proveniente de polinización abierta tuvo una mayor adecuación que la de exocruzamiento, debido a que los polinizadores pueden polinizar a *L. speciosa* con más de un tipo de polinios o fragmentos de polinios (Medina, 2004), pudiendo existir selección de aquellos genotipos más aptos, mientras que nosotros polinizamos con un polinario completo de un solo individuo, con los ocho polinios.

Implicaciones para la conservación—Los resultados de este estudio indican que *L. speciosa* es dependiente de polinizadores para su reproducción sexual, por lo que si la perturbación del hábitat afecta la diversidad, abundancia o actividad de los polinizadores, tendrá un efecto en su reproducción, ya sea disminuyendo o aumentando la producción de frutos y semillas, por lo que es de suma importancia conservar el hábitat como un ecosistema integral. Se considera necesario establecer un plan de manejo adecuado para *L. speciosa*, tal que estimule el crecimiento y estabilidad de las poblaciones existentes, al favorecer el exocruzamiento dentro de las poblaciones e incrementar los tamaños poblacionales, así como preservar su variabilidad y estructura genética en todo su rango de distribución (para más detalle ver Ávila-Díaz y Oyama, 2007).

Se reitera que los planes de manejo para especies raras o en alguna categoría de riesgo, deben ser diseñados con información multidisciplinaria, como lo son la estructura genética de las poblaciones, requerimientos ecológicos y la biología reproductiva.

LITERATURA CITADA

ACKERMAN, J. D. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1: 108–113.

ACKERMAN, J. D., Y J. C. MONTERO-OLIVER. 1985. Reproductive biology of *Oncidium variegatum*: moon phases, pollination, and fruit set. *American Orchid Society Bulletin* 54: 326–329.

ACKERMAN, J. D., Y A. M. MONTALVO. 1990. Short - and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* 71: 263–272.

ACKERMAN, J. D., E. J. MELÉNDEZ-ACKERMAN, Y J. SALGUERO-FARIA. 1997. Variation in pollinator abundance and selection on fragrance phenotypes in an epiphytic orchid. *American Journal of Botany* 84: 1383–1390.

AMOS, W., Y A. BALMFORD. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* 87: 257–265.

ANDERSON, B., S. D. JOHNSON, Y C. CARBUTT. 2005. Exploitation of a specialized mutualism by a deceptive orchid. *American Journal of Botany* 92: 1342–1349.

ASHMAN, T. L., Y D. J. SCHOEN. 1994. How long should flowers live? *Nature* 371: 788–791.

ÁVILA-DÍAZ, I, Y K. OYAMA. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94: 184-193.

BENZING, D. H. 1978. The life history of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae) and the rarity of extreme epiphytism among the angiosperms. *Selbyana* 2: 325–327.

BORBA, E. L., Y J. SEMIR. 1999. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* 217: 197–204.

- BORBA, E. L., Y J. SEMIR. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* 88: 75–88.
- BORBA, E. L., S. SEMIR, Y SHEPPARD G. J. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88: 89–99.
- CALVO, R. N. 1990. Four-year growth and reproduction of *Cyclopogon cranichoides* (Orchidaceae) in South Florida. *American Journal of Botany* 77: 736–741.
- CALVO, R. N. 1993. Evolutionary demography of orchids: intensity and frequency of pollination and the cost of fruiting. *Ecology* 74: 1033–1042.
- CAMARGO, E. S., SILVA-PEREIRA V., Y BORBA E. L. 2006. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* 21: 85–91.
- CATLING, P. M. 1990. Auto-pollination in the Orchidaceae. In: J. Arditti [ed.], *Orchid biology: reviews and perspectives*. 5: 121–158. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- CHARLESWORTH, D., Y B CHARLESWORTH. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237-268.
- CHEPTOU, P. O., Y D. J. SCHOEN. 2002. The cost of fluctuating inbreeding depression. *Evolution* 56: 1059-1062.
- CHRISTENSEN, D. E. 1992. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. *Lindleyana* 7: 28–33.
- DAFNI, A. 1992. *Pollination ecology: practical approach*. Oxford University Press, New York.

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

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

ELLIOT, C.P., P.G. LADD. 2002. Pollen limitation of fruit set in Western Australian terrestrial orchids. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 85: 165–168.

FLORES-PALACIOS A., Y J. G. GARCÍA-FRANCO. 2003. Effects of floral display and plant abundance on fruit production of *Rhyncholaelia glauca* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical* 51: 71–78.

FRANKHAM, R. 1995. Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation Biology* 9: 792–799

GARCÍA, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones particulares de la República Mexicana. UNAM. México, D.F.

HALBINGER, F., Y M. SOTO. 1997. *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. In Hágsater E., M. Soto, E. Greenwood, R. L. Dressler, P.J. Crib, J. Rzedowski, P. M. Catling, CH. J. Sheviak, y F. Chiang [eds.], *Laelias of México, Orquídea (Méx.)*15: 133–142. México City, México

HERNANDEZ-APOLINAR, M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae). Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

KALISZ, S. Y D. W. VOGLER. 2003. Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* 84: 2928-2942.

KALISZ, S., D. W. VOGLER, Y K. M. HANLEY. 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430: 884–887.

LEHNEBACH, C. A. Y A. W. ROBERTSON. 2004. Pollination ecology of four epiphytic orchids of New Zealand. *Annals of Botany* 93: 773–781.

- LYNCH, M., Y K. RITLAND. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753–1766.
- MALO, J. E., J. LEIRANA-ALCOCER Y V. PARRA-TABLA. 2001. Population fragmentation, florivory, and the effects of flower morphology alterations on the pollination success of *Myrmecophila tibicinis* (Orchidaceae). *Biotropica* 33: 529–534.
- MATSUI, K., A. USHIMARU, Y N. FUJITA. 2001. Pollination limitation in a deceptive orchid, *Pogonia japonica*, on a floating peat mat. *Plant Species Biology* 16: 231–235.
- MURREN, C. J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *Journal of Ecology* 90: 100–107.
- MEDINA, N. D. 2004. Éxito reproductivo en dos poblaciones de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae), en Michoacán, México. Tesis de licenciatura. UMSNH. México.
- MILLS, S. L., Y P. SMOUSE. 1994. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. *American Naturalist* 144: 412–431.
- MONTALVO, A. M., Y J. D. ACKERMAN 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides*. *Biotropica* 19: 24–31.
- NEILAND, M. R. M., Y C. C. WILCOCK. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657–1671.
- OH, G. S., M. Y. CHUNG, S. G. CHUNG, Y M. G. CHUNG. 2001. Contrasting breeding systems: *Liparis kumokiri* and *L. makinoana* (Orchidaceae). *Annales Botanici Fennici* 38: 281–284.
- O'CONNELL, L. M., Y M. O. JOHNSTON. 1998. Male and female pollination success in a deceptive orchid, a selection study. *Ecology* 79: 1246–1260.
- PARRA-TABLA, V., C. F. VARGAS, S. MAGAÑA-RUEDA, Y J. NAVARRO. 2000. Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindey (Orchidaceae) in two contrasting habitat patches: forest vs agricultural field. *Biological Conservation* 94: 335–340.

- PETTERSSON, B. 1989. Pollination in the African species of *Nervilia* (Orchidaceae). *Lindleyana* 1: 33–41.
- RITLAND, K. 1989 a. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43: 848–859.
- RITLAND, K. 1989 b. Variation of sex allocation among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 76: 1731–1739.
- RITLAND, K. 1996. Multilocus mating system program (MLTR). Versión 1.1 Department of Botany, University of Toronto, Toronto. Canadá.
- SALAZAR-CHÁVEZ, G. A. 1996. Conservation threats. En: IUCN/SSC Orchid Specialist Group, Orchids: Status Survey and Conservation Action Plan, 6 –10. IUCN, Cambridge, UK.
- SCHEMSKE, D. E. 1980. Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution* 34: 489–493
- SCHOEN, D. J., Y T. L. ASHMAN. 1995. The evolution of floral longevity: resource allocation to maintenance versus construction of repeated parts in modular organisms. *Evolution* 49: 131-139.
- SPSS. 2003 . Statistical software package, version 12. SPSS. Chicago, Illinois, USA
- STORT, M. N. S. Y P. S. MARTINS. 1980. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do Gênero *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciência e Cultura* 32: 1080-1083.
- STORT, M. N. S. Y G. DE LIMA GALDINO. 1984. Self –and cross-pollination in some species of the genus *Laelia* Lindl. (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Genética* VII (4): 671-676.
- TRAPNELL, D. W. Y J. L. HAMRICK. 2005. Mating patterns and gene flow in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 14: 75-84.

TRAPNELL, D. W. Y J. L. HAMRICK. 2006. Floral display and mating patterns within populations of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 93: 1010-1018.

TREMBLAY, R. D., J. D. ACKERMAN, J. K. ZIMMERMAN, Y R. N. CALVO. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1-54.

VAN DER PIJL, Y C. H. DODSON. 1966. Orchid flowers: their pollination and evolution. University of Miami Press, Coral Gables, Florida, USA.

VOGLER, D. W., Y S. KÁLIZ. 2001. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution* 55: 202-204.

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

WONG, K. C., Y M. SUN. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 86: 1406-1413.

ZIMMERMAN, J. K., Y T. M. AIDE. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinators vs. resource limitation. *American Journal of Botany* 76: 67-73.

Tabla 1. Estadísticos obtenidos con el modelo linear generalizado aplicando el procedimiento GENMOD (SAS 2000). El modelo usó el tratamiento y el año como variables independientes. La variable dependiente fue el fruit set.

Variable	gl	X^2	<i>P</i>
tratamiento	2	40.27	< .0001
año	1	0.08	0.7715
sitio de estudio	1	1.07	0.3005
año*trat	1	0.03	0.8629
sitio*trat	2	2.28	0.3192

Tabla 2. Producción de frutos bajo diferentes tratamientos de polinización (proporción de frutos \pm error estándar), en *Laelia speciosa* en el estado de Michoacán, México. Superíndices diferentes, indican diferencias significativas.

Tratamiento	N	frutos \pm error estándar
autopolinización	73	0 \pm 0
endocruzamiento	103	0.15 \pm 0.035 ^a
exocruzamiento	59	0.80 \pm 0.053 ^b
polinización abierta	62	0.29 \pm 0.058 ^c

Tabla 3. Proporción de semillas germinadas in vitro procedentes de una submuestra de cápsulas con diferentes tratamientos de polinización de *Laelia speciosa* obtenidas en la población El Olvido, Michoacán. Superíndices diferentes, indican diferencias significativas.

Localidad	Tratamiento	Germinación
OLM	endocruzamiento	0.2383 ± 0.0174^a
	exocruzamiento	0.7867 ± 0.0167^b
	polinización abierta	0.8617 ± 0.0141^c

Fig. 1. a) Semilla de *Laelia speciosa* viable con embrión turgente (flecha negra) y semilla inviable, sin embrión (flecha blanca), b) semilla con embrión pequeño, no viable (flecha blanca), c) frutos no viables a los 7 meses de efectuadas las polinizaciones manuales, d) frutos viables a los 7 meses de efectuadas las polinizaciones manuales.

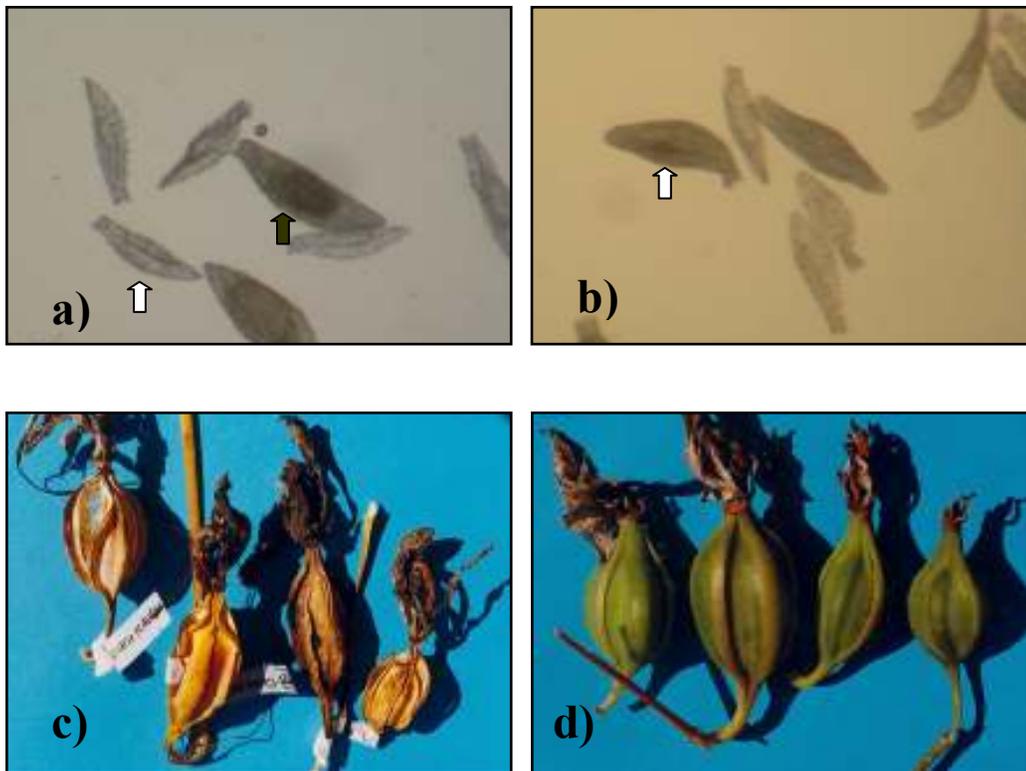


Fig. 2. Proporción de semillas con embrión en *L. speciosa*, en frutos producto de endocruzamiento, exocruzamiento y polinización abierta, provenientes del estado de Michoacán, México. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

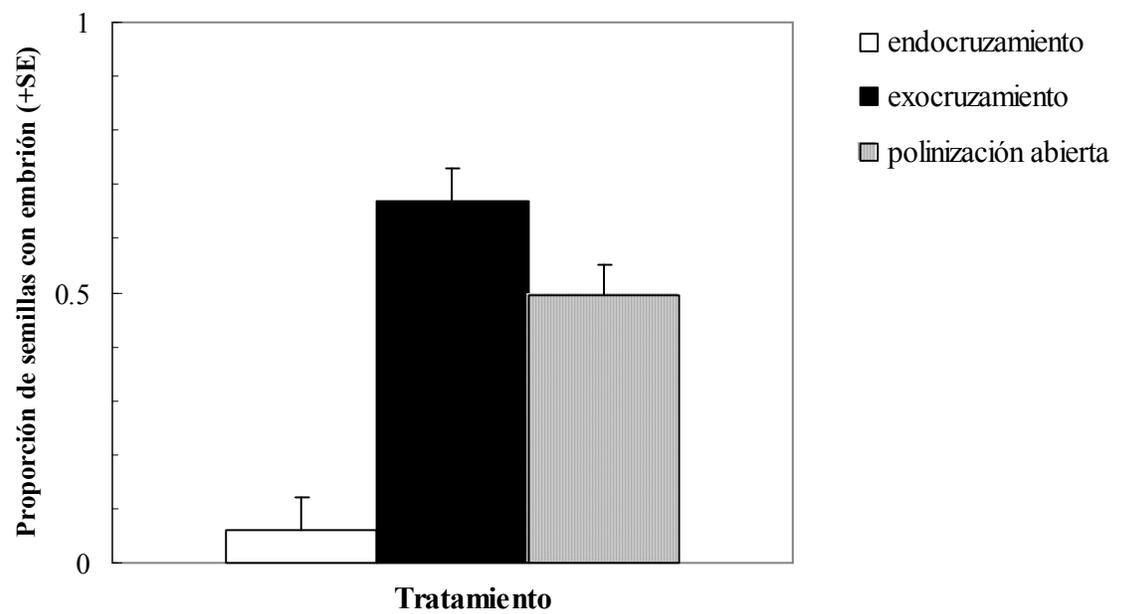
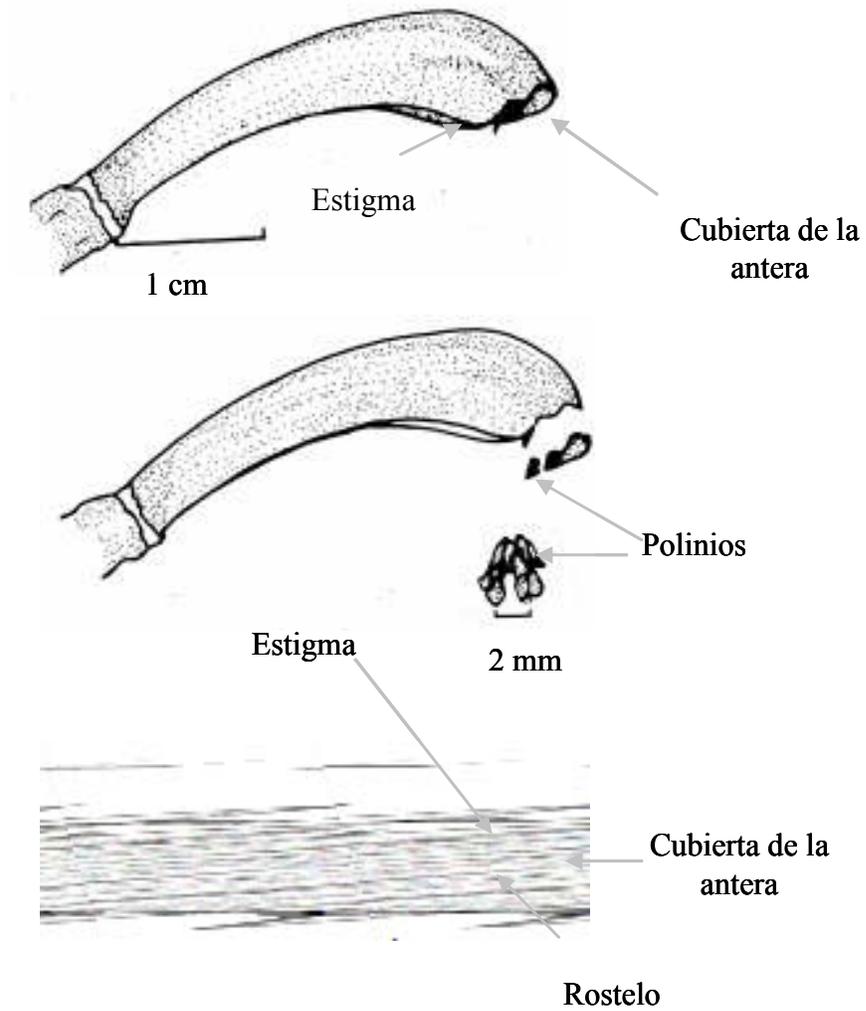


Fig. 3. Columna de *L. speciosa* que porta tanto los polinios, como el estigma, separados espacialmente, a través del rostelo, lo cual favorece la polinización cruzada, como en otras especies de orquídeas.



CAPÍTULO 4

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA ÓPTIMO DE GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS *in vitro* DE *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (ORCHIDACEAE)

I. ÁVILA-DÍAZ, C. GÓMEZ, K. OYAMA Y R. SALGADO-GARCIGLIA

NOTA: Este capítulo se traducirá para ser enviado a la revista *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.

Palabras clave: benciladenina, madurez de la cápsula, orquídea epífita amenazada, propagación *in vitro*

Muchas poblaciones de *L. speciosa*, han sido fuertemente extraídas por su valor ornamental y cultural, lo que ha ocasionado en muchos casos su extinción local. Se considera que la propagación *in vitro*, es una alternativa para su manejo sustentable. El efecto de los factores ambientales y de los fitorreguladores en la germinación de las semillas de orquídeas es variable y particular a nivel de género o de una especie, por lo que los objetivos de esta investigación son: 1 estudiar el efecto de la benciladenina (BA), madurez de la cápsula, luz y diversos medios de cultivo sobre la germinación y primeros estados de desarrollo *in vitro* de *L. speciosa*; 2 determinar un medio óptimo de subcultivo *in vitro* de plántulas para *L. speciosa*. Semillas de cápsulas colectadas a los 4, 7 y 9 meses después de su polinización manual, fueron germinadas en medios Murashige y Skoog (MS) con 30g l^{-1} de sacarosa y diferentes concentraciones (0.0, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 mg l^{-1}) de BA, bajo condiciones de luz y de oscuridad. El mayor porcentaje de germinación (100%) se registra en semillas maduras con 0.1 mg l^{-1} de BA con luz los 30 días de efectuada la siembra y de desarrollo de plántulas (60%) a los 90 días, en semillas maduras en MS sin BA y expuestas a la luz. Los medios MS y $\frac{1}{2}$ MS, fueron mejores para la germinación y primeros estados de desarrollo de *L. speciosa*, que el medio Knudson C, ampliamente utilizado en el cultivo *in vitro* de orquídeas. Para el subcultivo de plántulas, MS suplementado con 30g l^{-1} de sacarosa, 0.5 mg l^{-1} de ANA y 0.1 mg l^{-1} de GA_3 fue el óptimo.

Abreviaciones: ANA ácido naftaleneacético, BA benciladenina, GA_3 ácido giberélico, MS medio Murashige-Skoog, PLBs cuerpos como protocormos.

El género *Laelia* (Orchidaceae), con un total de once especies, es endémico de México, y se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos. Las distintas etnias indígenas mexicanas han cultivado tradicionalmente especies como *L. albida*, *L. anceps*, *L. gouldiana* y *L. autumnalis*. Dentro de este género se encuentra *Laelia speciosa*, la cual es una especie epífita endémica de México, dentro de la categoría de riesgo amenazada en la norma oficial vigente (NOM-059-2001). Esta especie presenta flores muy vistosas que miden 10-16 cm de diámetro, de color lila-rosado, pálidas a oscuras (Halbinger y Soto, 1997), lo que la hace ser muy apreciada como planta ornamental. También es utilizada con fines artesanales y en ceremonias religiosas. Sin embargo, no existe un manejo sustentable para esta especie, dado que es muy lento su crecimiento ya que para que alcance su etapa reproductiva sexual requiere de 8 a 16 años (Hernández, 1992) y su reproducción asexual a través de división vegetativa es muy ineficiente (Ávila-Díaz, obs. pers.). Una alternativa que puede colaborar a su manejo sustentable es la propagación *in vitro* a gran escala, lo cual al ofrecer plantas de calidad en el mercado, colaboraría a bajar la presión que sobre sus poblaciones naturales se ejerce y también podrían utilizarse plantas propagadas *in vitro* para rehabilitar poblaciones depauperadas.

El cultivo *in vitro* es un método potencial para la conservación de especies endémicas o en peligro de extinción (Morel, 1960, 1965; Arditti, 1977; Arditti y Ernst, 1984; Capellades et al., 1991; Arditti y Krikorian, 1996); particularmente útil en orquídeas que presentan baja polinización natural por la limitación de polinizadores (Tremblay et al., 2005); un proceso de germinación complejo ya que sus semillas no tienen reservas por lo que requieren de hongos simbioses y tasas de crecimiento lentas. Estos factores determinan que las orquídeas tengan una capacidad reproductiva limitada y un lento desarrollo (Dressler, 1981; Arditti 1992).

Las técnicas de propagación *in vitro* han sido utilizadas de forma extensiva en la producción y conservación de los recursos vegetales, sobre todo de aquellos que pertenecen a poblaciones extremadamente reducidas o que se encuentran bajo peligro de extinción (Villalobos, 1990). Para el caso de las orquídeas silvestres que han sufrido una sobre-extracción y continua pérdida de sus hábitats, este método es una modalidad de conservación y propagación (Buyun, 2004; Lo et al., 2004), que permite cultivar y desarrollar sobre un medio nutritivo y en condiciones asépticas, plantas, semillas, embriones, meristemos, tejidos, células y protoplastos.

La germinación *in vitro* utilizando semillas, es uno de los componentes más importantes para la conservación y propagación de orquídeas, porque permite mantener la variabilidad genética de las poblaciones naturales y no solamente clones, como es el caso del cultivo de tejidos (Pritchard, 1989).

Varios factores son determinantes para lograr el establecimiento de semillas *in vitro* de orquídeas, como el estado de madurez de la cápsula, los componentes de los medios de cultivo y las condiciones de cultivo como luz y temperatura (Arditti, 1982). Por lo que es necesario investigar los factores óptimos para cada especie en particular y determinar el sistema de establecimiento y cultivo *in vitro*.

Esta modalidad de conservación ha sido aplicada en México. *Encyclia citrina*, *Laelia anceps*, *Rhyncholaelia glauca*, *Bletia urbana*, *Lemboglossum ehrenbergii*, *Lycaste aromatica*, *L. skinneri* y *Oncidium stramineum* han sido propagadas a través de semillas y las últimas cinco especies, también por la inducción de brotes o protocormos (PLBs) para ser reintroducidas a su hábitat (Rubluo et al., 1993).

En el caso particular de *L. speciosa*, es importante establecer un sistema óptimo de germinación y crecimiento de las plántulas en condiciones *in vitro*, con el propósito de lograr su conservación y hacer más eficiente en tiempo y costos el proceso de su propagación. Para esto, se plantearon los siguientes objetivos: estudiar el efecto de la benciladenina, la madurez de la cápsula y la luz, sobre la germinación y primeros estados de desarrollo de *Laelia speciosa* cultivada *in vitro* y determinar un medio óptimo de subcultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del cultivo aséptico

Asepsia de cápsulas y siembra de semillas—Las cápsulas de *Laelia speciosa* utilizadas en los experimentos aquí presentados, fueron cápsulas cerradas, obtenidas de la población Cerro El Olvido (OLM) (19° 37' 59" N, 101° 29' 09" W a una altitud de 2361m) sometándose al siguiente proceso de asepsia: inicialmente se sumergieron en detergente Extrán al 15% durante 5 minutos, posteriormente se colocaron en etanol al 70% por 5 minutos, después en agua

oxigenada al 3% durante 5 minutos, en seguida en hipoclorito de sodio al 1.2%, durante 15 a 20 minutos, posteriormente en la campana de flujo laminar, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, se bañaron en alcohol al 96%, se escurrieron y se flamearon. Cada cápsula se disectó en cuatro partes, haciendo un corte transversal y otro longitudinal, dentro de una caja de Petri estéril, para la extracción de las semillas, las cuales se mezclaron entre si para llevar a cabo la siembra con las técnicas propias del cultivo de tejidos vegetales (Arditti, 1982; Arditti y Ernst, 1984; Pierik, 1990). Se colocaron uniformemente aproximadamente 5 mg de semillas con una espátula [aprox.25 856 semillas (Medina, 2004)] en cada frasco con el medio de cultivo utilizado en cada uno de los experimentos que a continuación se indican.

Efecto de la madurez de la cápsula, de la benciladenina y de la luz en la germinación y primeros estados de desarrollo de L. speciosa—Se implementó un experimento, en el cual se sembraron de manera secuencial las semillas de seis cápsulas con diferente estado de madurez después de su polinización manual (exocruzamiento) en el campo. Fueron utilizadas dos cápsulas inmaduras, con 4 meses de desarrollo; dos de madurez intermedia, con 7 meses de desarrollo y otras dos más maduras, de 9 meses de desarrollo. En cada caso después de la asepsia de las dos cápsulas, sus semillas se extrajeron en condiciones de esterilidad y se mezclaron para ser sembradas.

Los medios de cultivo utilizados fueron el de Murashige- Skoog (MS), adicionado con diferentes concentraciones de benciladenina (0.0, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 mg l⁻¹ BA), bajo condiciones de luz (fotoperiodo de 16 H luz, 130 μE/m seg²) o de oscuridad constante. Se incluyeron de 7 a 10 frascos para cada tratamiento. Los frascos se mantuvieron en un cuarto de cultivo a una temperatura constante de 25°C.

A los 30 y 90 días de efectuada la siembra, se sacaron bajo condiciones de esterilidad, muestras de individuos de *L. speciosa* en aproximadamente 1 cm² de la superficie del medio de cultivo de cada uno de los tratamientos, se hicieron preparaciones y fueron observadas al microscopio, para registrar el estado de desarrollo de 100 individuos en cada tratamiento, observándose un total de 6000 individuos. Los estados de desarrollo de *L. speciosa* considerados fueron: a) semilla, esto es sin ningún desarrollo aparente la semilla con embrión y cuando el embrión de las semillas empieza a dividirse hasta que forma el suspensor; b)

protocormo1, cuando se observa el protocormo como una estructura globular característica aún dentro de la testa; c) protocormo 2, protocormo más desarrollado y fuera de la testa; d) plántula, una vez que se han formado las hojas.

Para conocer si hubo diferencias significativas en el desarrollo de *L. speciosa*, se llevó a cabo una prueba de ANOVA de dos vías, empleando el Modelo General Lineal (Rosner, 1995). Para determinar diferencias significativas entre tratamientos en cada una de las cápsulas trabajadas tanto en luz como en oscuridad (intragrupos) así como en cada uno de los tratamientos entre la luz y la oscuridad (intergrupos), se elaboró una L (matrix), para el uso especificado de coeficientes de contraste.

Germinación en diferentes medios de cultivo diseñados para optimizar el proceso—Con la finalidad de optimizar el establecimiento del cultivo aséptico (germinación y primeros estados de desarrollo de *L. speciosa*), se llevó a cabo una siembra de semillas de una cápsula madura también de la población OLM, en diferentes medios de cultivo: MS con sacarosa, MS sin sacarosa, MS con la mitad de sus sales y sacarosa, MS con la mitad de sus sales sin sacarosa, medio MSA1 (MS con sacarosa suplementado con 0.5 mg l^{-1} de ANA y 0.1 mg l^{-1} de GA_3), medio MSA2 (MS con sacarosa suplementado con 1.0 mg l^{-1} de ANA y 0.1 mg l^{-1} de GA_3), Agar-Agua y Knudson C modificado (Sigma K-4003). De cada uno de los tratamientos se prepararon 4 frascos los cuales se mantuvieron bajo condiciones de luz (fotoperiodo de 16 H luz, $130 \mu\text{E/m seg}^2$). El medio Knudson “C” es muy utilizado en la propagación de orquídeas, otros medios como el MS a la mitad de la concentración de sus sales, fueron probados para explorar la reducción de costos de la propagación.

Se llevaron a cabo observaciones a los 90 días de efectuada la siembra, calculándose el porcentaje de individuos en cada uno de los estados de desarrollo observados para este experimento: protocormo 1 (dentro de la testa), protocormo 2 (fuera de la testa), plántula 1 (con 1-2 hojas) y plántula 3 (con más de 3 hojas). Para llevar a cabo los análisis se asignaron categorías de desarrollo, el número 1 para protocormo 1, el 2 para protocormo 2, 3 para plántula 1 y 4 para plántula 2.

Para explorar si hubo diferencias significativas en el desarrollo de *L. speciosa* en los diferentes medios de cultivo, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis y para conocer las diferencias entre cada uno de los medios utilizados, una prueba Post Hoc de Tukey para contraste de todos los desarrollos y la determinación de cuales fueron diferentes entre si.

Subcultivo

Para encontrar un medio de cultivo óptimo de desarrollo *in vitro* de las plántulas de *L. speciosa*, a los 150 días de su siembra, se transfirieron del tratamiento MS sin fitorreguladores (con luz y provenientes de las cápsulas maduras), a tratamientos con diferentes concentraciones (mg l^{-1}) de ácido giberélico (GA_3) y de ácido naftalenacético (ANA), como se detalla en el Cuadro 1. Se prepararon 5 frascos de cada uno de los medios. En cada frasco se transfirieron 5 a 7 plántulas de 3 a 5 mm de altura. Se llevaron a cabo observaciones y mediciones de las plántulas a los 90 días de efectuada la transferencia, registrando también otras características como son: vigor, producción de raíces, brotes y de callo.

En el análisis estadístico de los datos, se utilizó la prueba de ANOVA a través del Modelo Linear Generalizado de una vía. Para cada una de las características (tamaño, vigor, raíces, brotes, y callo), se llevó a cabo una prueba Post Hoc para reconocer los grupos homogéneos de desarrollo en los diferentes medios de cultivo. En el caso de las características cualitativas, se asignaron categorías de acuerdo al desarrollo de cada uno de estas (asignando el número 1 al menor desarrollo al número 4 con máximo desarrollo observado).

RESULTADOS

Establecimiento del cultivo aséptico

Efecto de la Benciladenina (BA), madurez de la cápsula y luz en la germinación y primeros estados de desarrollo de L. speciosa—A los 30 días de efectuada la siembra (Fig. 1a y 1b), todas las semillas de las cápsulas inmaduras, se encuentran en su estado inicial de desarrollo, en ambas condiciones de luz, ya que no se registra ningún protocormo. A los 90 días, se observa una interacción entre condiciones de luz y tratamientos con diferentes concentraciones de BA ($F=5.095$, $gl=4$, $P=0.000$), puede apreciarse que en los tratamientos con luz (Fig. 1c) el

desarrollo de sus semillas es mínimo, no encontrándose diferencias significativas entre los mismos (Ver Anexo 1a), y solamente el medio de cultivo con una concentración de 0.5 mg l^{-1} de BA, es diferente significativamente con un 6% de protocormos. En la oscuridad (Fig. 1d), el tratamiento sin BA no registra diferencias significativas con respecto a el tratamiento sin BA en la luz y se registran individuos de *L. speciosa* con un menor desarrollo que aquellos con BA, registrándose en el tratamiento con 0.5 mg l^{-1} de BA, hasta un 17% de individuos en el estado protocormo 1 (aún dentro de la testa) y 12 % de individuos en protocormo 2 (fuera de la testa). Al hacer una comparación inter-tratamientos, esto es entre los tratamientos con la misma concentración de BA, en los contrastes de luz y oscuridad, se registran diferencias significativas en los tratamientos con BA, lo cual indica un mayor desarrollo de la orquídea con BA en la oscuridad.

La respuesta de las semillas provenientes de las capsulas con madurez intermedia se presenta en la Figura 2. A los 30 días de efectuada la siembra, ya se observan algunos individuos en el estado de desarrollo de protocormo (Figs. 2a y 2b). Aquellos tratamientos expuestos a la luz con BA presentan significativamente mayor desarrollo de *L. speciosa* que el tratamiento sin BA en esta condición de luz (Ver Anexo 2). En los tratamientos sujetos a oscuridad, con 0.01 y 0.05 mg l^{-1} de BA, también se observa un mejor desarrollo que en el tratamiento sin BA en oscuridad, pero comparados con aquellos de mayores concentraciones, no hay diferencias significativas.

A los 90 días, de haberse sembrado las semillas, se observa que existe interacción entre condiciones de luz y los tratamientos ($F=41.646$, $gl=4$, $P=0.000$) y que el tratamiento sin fitorregulador y expuesto a la luz (Fig. 2c) es significativamente diferente a todos los demás y es el único en el cual los protocormos fueron capaces de desarrollar 22% de plántulas. Con la adición de BA la respuesta es variable, en general es mayor el desarrollo con luz pero en el caso de los medios con 0.01 mg l^{-1} y 0.5 mg l^{-1} es mayor en oscuridad.

En la Figura 3 se muestra que en las semillas provenientes de las cápsulas maduras, a los 30 días de efectuada la siembra (Figs. 3a y 3b), también existe interacción entre las condiciones de luz y los tratamientos con diferentes concentraciones de BA ($F=19.789$, $gl=4$, $P=0.000$), y se

aprecian mayores porcentajes de estados de desarrollo más avanzados en todos los tratamientos con luz (Anexo 3).

En la segunda observación, a los 90 días de efectuada la siembra, se aprecia que el tratamiento sin BA y en la luz (Fig. 3c) registra diferencias significativas en el desarrollo de *L. speciosa* con respecto a los demás tratamientos en los que se agregó BA (Ver Anexo 3), con el porcentaje más alto de plántulas (60%). Es notable que en los tratamientos con BA disminuye drásticamente la formación de plántulas (4% en 0.01 mg l⁻¹ de BA, 1% en 0.1 mg l⁻¹ de BA y 0% en las otras concentraciones). En la oscuridad (Fig. 3d), el tratamiento que no contiene BA es también significativamente diferente a los demás, con un mayor porcentaje (46%) de plántulas y conforme aumenta la concentración de este fitorregulador, también se disminuye la formación de plántulas (8% en 0.01 mg l⁻¹ de BA, 1% en 0.1 mg l⁻¹ de BA y 0% en las otras concentraciones).

Desarrollo inicial de L. speciosa en diferentes medios de cultivo diseñados para optimizar el proceso de germinación—El desarrollo inicial de *L. speciosa in vitro*, muestra diferencias significativas en los diferentes medios de cultivo probados ($F=363.018$, $gl=7$, $P=0.000$). En el Cuadro 2 se observa que los medios de cultivo en el que se registraron las medias más altas de desarrollo de *L. speciosa*, son: MS c/sac (3.56 ± 0.074) y MS ½ c/sac (3.33 ± 0.068); seguidos del medio MSA1 (3.15 ± 0.083) que tiene un significativamente menor desarrollo que el MS c/sac pero no hay diferencias con MS ½ c/sac. Los medios MSA2 (2.39 ± 0.124) y Knudson C (2.33 ± 0.070), presentan un desarrollo significativamente menor que los medios anteriores, pero mayor que el registrado para los medios restantes. Los medios con el menor desarrollo y significativamente diferente a los demás son aquellos que no contienen sacarosa: MS s/sac (1.01 ± 0.007), ½ MS s/sac (1.03 ± 0.013) y Agar-Agua (1.0 ± 0.000).

Subcultivo

En el Cuadro 3 se registran el tamaño (mm), el vigor, la producción de raíces, brotes y de callo de las plántulas de *L. speciosa* después de 90 días de efectuado el subcultivo.

En cuanto al tamaño, se registran diferencias significativas ($F=6.26$, $gl=29$, $P=0.000$), observando que los medios 29, 30, 26 y 27, con una alta concentración de GA₃ (10.0 mg l⁻¹), son

en los que se registra el máximo crecimiento, sin embargo el vigor y el desarrollo de raíz son nulos (plántulas muy delgadas, débiles y sin raíces).

El vigor también presenta diferencias significativas entre los tratamientos ($F=3652.01$, $gl=29$, $P=0.000$) y se observa máximo en el medio 9 (suplementado con 0.1 mg l^{-1} de GA_3 y 0.5 mg l^{-1} , de ANA), seguido por los medios 6, 7, 8, 10, los cuales tienen también una baja concentración de GA_3 (0.1 mg l^{-1}) y los medios 3, 4, 5, que no tienen GA_3 .

Las diferencias en el desarrollo de la raíz ($F=3652.01$, $gl=29$, $P=0.000$), se aprecian con el mayor desarrollo en los medios 3 (suplementado con 0.25 mg l^{-1} de ANA) y 9 (suplementado con 0.1 mg l^{-1} de GA_3 y 0.5 mg l^{-1} de ANA), sin embargo, también se registra un alto desarrollo de la raíz en los medios 8, 6, 19, 23, 13, 2, 1, 18, 20 y 5, lo que indica que no existe un patrón determinado para la inducción de raíz en ciertas concentraciones de estos fitorreguladores.

En el presente experimento se observaron procesos de morfogénesis como la regeneración de brotes (PLBs, protocorm- like bodies) y la formación de callo. La producción de PLBs se observó en medios con $\leq 0.5M$ de GA_3 , obteniéndose el mayor número (3-8 por plántula) en el medio 4 (suplementado con 0.5 mg l^{-1} de ANA y 0 mg l^{-1} de GA_3). Tales estructuras se desarrollaron a partir de estructuras globulares. La producción de callo se registró en cuatro de los tratamientos, presentando significativamente mayor cantidad (2.5 cm de diámetro/explante) y calidad de éste (verde claro con centros meristemáticos) en el medio 5 (con 1.0 mg l^{-1} de ANA y 0 mg l^{-1} de GA_3).

DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo aséptico

Efecto de la Benciladenina (BA), madurez de la cápsula y luz en la germinación y primeros estados de desarrollo de *L. speciosa*—El efecto de la citocinina benciladenina (BA) en semillas con diferente estado de madurez de *L. speciosa*, es variable. En las semillas inmaduras se promovió la germinación a altas concentraciones de BA (0.5 mg l^{-1} BA), en condiciones de oscuridad, pero los protocormos no fueron capaces de desarrollar plántulas posiblemente debido a la inmadurez fisiológica de las semillas. El que en semillas inmaduras se promueva la

germinación con altas concentraciones de BA y en semillas de madurez intermedia y maduras con bajas concentraciones y se observe una inhibición a más alta concentración, puede deberse a que en las semillas inmaduras los niveles de fitorreguladores endógenos son menores que en el caso de semillas de madurez intermedia y maduras.

El papel de los fitorreguladores en la germinación de las semillas de las orquídeas, incluyendo las citocininas, es variable y puede ser que sea específico a nivel de género o de una especie dada (Arditti and Ernst, 1984; Stewart y Kane, 2006), p. ej. en *Habenaria macroceratitis*, las citocininas BA y Zeatina promovieron la germinación en una concentración de 0.225 mg l^{-1} , pero se inhibió a concentraciones más altas (0.675 mg l^{-1} a 2.25 mg l^{-1}) (Stewart y Kane, 2006) semejante a como se observó en semillas maduras de *L. speciosa*, donde la germinación óptima fue a 0.1 mg^{-1} e inhibida a más alta concentración. En *Epipactis gigantea*, Arditti et al. (1981) demostraron una inhibición similar de la germinación con 1.0 mg l^{-1} de BA.

Mientras que la germinación de las semillas de madurez intermedia y maduras de *L. speciosa* fue promovida con bajas concentraciones de BA, este fitorregulador inhibe el desarrollo posterior de plántulas, ya que es significativamente mayor en los tratamientos sin BA (particularmente en el tratamiento expuesto a la luz), lo cual pudiera deberse a la presencia de suficientes fitorreguladores endógenos requeridos para su desarrollo.

Con la siembra de semillas de cápsulas maduras colectadas 9 meses después de efectuada la polinización, se obtuvo un sistema óptimo de germinación y de desarrollo de las plántulas, con un mayor porcentaje de éstas, logradas en un menor tiempo de cultivo, considerándose que alcanzaron su madurez fisiológica en ese lapso de tiempo. Con base en estos resultados no se recomienda sembrar semillas de esta especie provenientes de cápsulas de 4-6 meses como se ha recomendado para especies e híbridos del género *Laelia* (Sauleda, com. pers.; Pierik, 1990) y para *Cattleya aclandiae*, *C. bowringiana* y *Cattleyopsis lindenii* (Buyun et al., 2004). En *Dendrobium tosaense*, como en *L. speciosa*, también se observa un efecto de la madurez de las semillas en su germinación, ya que se registran mayores promedios de plántulas en cápsulas con mayor madurez que en cápsulas con una madurez menor (Lo et al., 2004).

A diferencia de lo observado en *L. speciosa*, en muchas especies de orquídeas terrestres, como son algunas del género *Cypripedium*, se ha documentado que las semillas inmaduras

germinan mejor que las semillas maduras (Harvais, 1980; Light, 1989; St. Arnaud et al., 1992; Pauw y Remphrey, 1992) lo cual ha sido explicado por una mayor cantidad de suberización en las semillas, lo que las hace ser de un color más oscuro e impermeables (Pauw y Remphrey, 1992), proceso no observado en *L. speciosa*. Un estado de desarrollo óptimo de las semillas de orquídeas para su germinación *in vitro* - que es variable en las diferentes especies - sugiere que antes de este tiempo, las semillas pueden ser inmaduras y no aptas para su germinación, lo cual puede estar relacionado con el proceso de fertilización tan lento que se reporta para esta familia (Pauw y Remphrey, 1992; O'Neill, 1994).

El tiempo de germinación reportado para algunas orquídeas *in vitro* es muy variado, dependiendo del grado de madurez fisiológica de la cápsula al momento de la siembra, en general se reporta que las semillas de cápsulas maduras germinan en 30-60 días de cultivo (Lee y Lee, 1991). En el caso particular de *L. speciosa* se observa que semillas de cápsulas maduras, sin BA o con concentraciones $\leq 0.1 \text{ mg l}^{-1}$, expuestas a la luz, germinan el 100% a los 30 días, considerándose por tanto óptimos estos resultados.

El papel del fotoperiodo en la germinación de las semillas de orquídeas es variable. Se ha documentado que en muchas especies terrestres la luz inhibe la germinación (Arditti et al., 1981; Van Waes y Deberg, 1986; Takahashi et al., 2000). Sin embargo, la luz puede ser importante en la germinación y reclutamiento *in situ* de algunas especies, como en el caso de *Cypripedium calceolus* (Kull, 1998). Se observó diferente respuesta a la luz en cápsulas con diferente estado de madurez, ya que en aquellas semillas de cápsulas inmaduras, no se registran diferencias significativas entre los tratamientos que no tienen BA sujetos a luz u oscuridad y en los tratamientos con BA, es mejor el desarrollo en la oscuridad. En las semillas provenientes de cápsulas de madurez intermedia y de cápsulas maduras, sembradas en medios de cultivo sin BA, la luz favoreció su desarrollo durante los primeros 90 días.

L. speciosa es de hábito epífita y los árboles hospedero sobre los que crece (*Quercus deserticola*), en cierta época del año pierden las hojas, lo cual coincide con la dispersión de semillas de la orquídea, permitiendo que estén sujetas a una alta intensidad lumínica (Halbinger y Soto, 1997), lo que podría explicar sus altos requerimientos de luz para el proceso de germinación.

Desarrollo inicial de *L. speciosa* en diferentes medios de cultivo diseñados para optimizar el proceso de germinación—El establecimiento del cultivo aséptico (germinación y primeras etapas de desarrollo) de *L. speciosa*, fue óptimo en el medio MS con sacarosa. También ½ MS (a la mitad de sus sales con sacarosa), es un medio en el que se obtiene un desarrollo óptimo de las semillas de *L. speciosa*, lo cual permite reducir los costos de su propagación *in vitro* a gran escala. Se han documentado diversas respuestas de la germinación de semillas de orquídeas en el medio MS, p. ej. en *Habenaria macroceratitis*, las semillas no desarrollaron más allá del estado de protocormos en ese medio (Stewart y Kane, 2006), en *Dendrobium tosaense* en cambio se reporta que los medios MS y ½ MS, ambos con 3% de sacarosa fueron excelentes para su germinación (Lo et al., 2004). Similarmente, en *Anoectochilus formosanus*, el medio ½ MS, suplementado con 0.25% de carbón activado y 8% de homogenado de plátano, fue adecuado para su germinación (Shiau et al., 2002).

Es notable que el desarrollo de *L. speciosa* en sus primeras etapas con los medios aquí probados fue mejor, en relación con el medio Knudson C, ampliamente utilizado en la propagación de orquídeas. Además la alta disminución en el desarrollo de *L. speciosa* al quitar la sacarosa de los medios de cultivo, corroborando con esto la importancia de este compuesto en el desarrollo de las orquídeas y el de hongos endófitos que lleva en sus semillas (Ávila- Díaz et al., dat no publ.), los que también requieren de una fuente de carbono para su crecimiento y desarrollo.

Subcultivo

Las plántulas que alcanzaron los tamaños máximos, en los medios de cultivo con altas concentraciones de GA₃, se observaron muy débiles y sin raíces, por lo que se sugiere utilizar un medio MS suplementado con 30 g/l sac. y 0.5 mg l⁻¹ ANA y 0.1 mg l⁻¹ de GA₃ (medio 9) para el subcultivo de plántulas de *L. speciosa*. En este medio se tiene el mejor vigor, el desarrollo de raíces dentro de los más altos registrados (característica importante para el éxito de la aclimatación en invernadero), y no hay pérdida de plántulas, con la producción de callo. Los resultados de esta investigación son similares a los de otros estudios en muchas otras plantas micropropagadas, en las que concentraciones relativamente bajas de auxinas y citocininas (0.01

y 0.1 mg l⁻¹) y un poco más altas de giberelinas (0.1 a 1.0 mg l⁻¹) son las óptimas para un buen desarrollo de las plántulas, aptas para su transplante y aclimatación (Hurtado y Merino, 1994).

La producción de PLBs en el medio MS suplementado con 0.5 ANA y 0 GA₃ (medio 4) y de callo en el medio MS suplementado con 1.0 de ANA y 0 de GA₃ (medio 5), se considera importante, ya que pueden ser una alternativa de reproducción asexual y propagación a gran escala. Sin embargo, se sugiere llevar a cabo otros experimentos que incluyan la adición de citocininas para aumentar la producción de PLBs, como ha sido reportado en otras especies de orquídeas, en donde han logrado desde 5 hasta 50 brotes por explante (Mosich et al., 1973; Villalobos, 1990; Duan et al., 1996; Nayak et al., 1997; Sheelavantmath et al., 2000). En la orquídea *Cattleyopsis lindenni* fue necesario la presencia de 0.1 mg l⁻¹ ANA, 0.1 mg l⁻¹ BA y 0.1 mg l⁻¹ de GA₃, con lo cual se observó la aparición de brotes, induciendo la elongación de los tallos y la aparición de raíces adventicias incipientes (García, 2000). En otras especies, la formación de brotes puede darse sin la adición de fitorreguladores, como en *Laelia anceps* (Ramírez, 1999).

En el presente estudio se observó que una baja concentración de citocinina y alta dosis de auxina (2.5 mg l⁻¹) induce la formación de callo. Para la especie en estudio las auxinas son las responsables directas del proceso de callogénesis, de igual manera que lo observado al cultivar segmentos de rizoma, pseudobulbos y raíces de *Cymbidium ensifolium* en medio MS a la mitad de sus componentes con 10 mg l⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg l⁻¹ de Thiadiazurón (Chang y Chang, 1998). Sin embargo, Goh (1981) reporta que en *Dendrobium* sp. y *Aranda* sp. se indujo la presencia de callo al utilizar un medio nutritivo suplementado con agua de coco, responsable de esta respuesta por la presencia de citocininas (Letham, 1974; van Standen y Drenes, 1975).

El tiempo de cultivo *in vitro*, esto es de la germinación a la obtención de plántulas aptas para su aclimatación en invernadero, en otras especies de orquídeas tropicales como *Cattleyopsis lindeni* es en promedio de 20 meses y de 17 meses en diversas especies del género *Cattleya* (Buyun, 2004). En *L. speciosa* este tiempo de cultivo *in vitro* hasta su aclimatación se acortó considerablemente de 12 - 18 meses (Ávila-Díaz, obs. pers.) a ca. 8 meses, lo cual es una ventaja para la producción de esta especie. Los medios de cultivo y condiciones encontradas como óptimas para la germinación, primeros estados del desarrollo de *L. speciosa* y subcultivo de

plántulas, permitieron el establecimiento de un sistema de propagación *in vitro* eficiente para esta especie, lo cual puede ser en conjunto con otras acciones, una alternativa para el manejo sustentable de la misma.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a José G. García Franco por sus comentarios a una primer versión del manuscrito y a Marcela Sarabia O. por su apoyo técnico en laboratorio. Esta investigación fue apoyada por el Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza (FMCN, project A 1-99/130), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEMARNAT-CONACYT, proyecto 2002-C01-0544); IA-D fue apoyada con una beca doctoral de CONACYT (Reg. 130249) y DGEP-UNAM (Project 202392).

REFERENCIAS

- Arditti J (1977) Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissue Culture- A Manual. En: J. Arditti (ed) Orchid biology reviews and perspectives, I. Cornell University Press, Ithaca
- Arditti J, Michaud JD, Oliva AP (1981). Seed germination of North America orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera*. Botanical Gazette 142:442-453
- Arditti J (1982) Orchid seed germination and seedling culture - A Manual. En J. Arditti (ed) Orchid biology reviews and perspectives, II. Cornell University Press, Londres
- Arditti J (1992) Fundamental of orchid biology. John Wiley and Sons. New York
- Arditti J, Ernst R (1984) Physiology of germinating orchid seeds. En: Arditti J. (ed), Orchid biology reviews and perspectives, III. Cornell University Press, Ithaca
- Arditti J, Krikorian AD (1996) Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigations. Botanical Journal of the Linnean Society 122:183-241
- Buyun L, Lavrentyeva A, Kovalska L, Ivannikov R (2004) *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. Acta Universitatis Latviensis, Biology 676:159-162
- Capellades M, Beruto M, Vanderschaeghe A, Debergh PC (1991) Ornamentals. En: Debergh PC y Zimmerman (eds), Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishersm, London, U.K.
- Chang C, Chang WC (1998) Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. Plant Cell Reports. 17:251-255
- Dodds JH, Roberts LW (1995) Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, New Jersey

Dressler RL (1981) The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts

Duan JX, Chen H, Yasawa S (1996) In vitro propagation of *Phalaenopsis* via culture of cytokinin-induced nodes. Journal of Plant Growth Regulators. 15:133-137

García GM (2000) Establecimiento de un sistema de micropropagación de la orquídea *Cattleyopsis lindenni*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Goh CJ (1981) Development of orchid tissue culture in South-East Asian countries. En: Rao AN (ed) Symposium on economically important plants. Botany Department, National University of Singapore. Singapore, 1981

Halbinger F, Soto MA (1997) *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. En: Halbinger F, Soto MA (eds) Laelias of Mexico. Orquídea, vol 15. México D. F., pp135-139

Harvais G (1980) Scientific notes on a *Cypripedium reginae* of Northwestern Ontario, Canadá. American Orchid Society Bulletin 49:237-244

Hernández AM (1992) Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 138

Hurtado MDV, Merino MME (1994) Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, México

Knudson L (1921) La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. Boletín Real de la Sociedad Española de Historia Natural 21:250-260

Kull T (1998) Fruit-set and recruitment in populations of *Cypripedium calceolus* in Estonia. Botanical Journal of the Linnean Society 126:27-38

Lee J, Lee H (1991) Micropropagación de orquídeas a partir de semillas. Boletín Informativo de FIRA, México, DF, XXIV: 15-30

Letham DS (1974) Regulators of cell division in plant tissues. The cytokinins of coconut milk. *Physiology Plantarum* 32:66-70

Light MHS (1989) Germination in the *Cypripedium /Paphiopedilum* alliance. *Canadian Orchid Journal* 5:11-19

Lo SF, Nalawade SM, Kuo CL, Chen CL, Tsay HS (2004) Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino-a medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 40:528-535

Medina ND (2004) Éxito reproductivo en dos poblaciones de *Laelia speciosa* (Lex.) Schltr. (Orchidaceae) en Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México

Morel G (1960) Producing virus-free Cymbidiums. *American Orchid Society Bulletin*. 29:495-497

Morel G (1965) Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Society News*. 20:3-11

Mosich SK, Ball EA, Arditti J (1973) Propagación clonal de *Dendrobium* por medio del cultivo de nodos. *Orquídea* 3:244-255

Nayak NR, Patnaik S, Rath SP (1997) Direct shoot regeneration from foliar explant of an epiphytic orchid *Acampe praemorsa* (Rosb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Reports* 16:538-586

O'Neill S (1994) Pollen signaling and interorgan regulation of the postpollination syndrome of flowers. En: Stephenson AG, Teh-hui Kao (eds), *Pollen-pistil interactions and pollen tube growth*. Proceedings Ninth Annual Penn State Symposium in Plant Physiology. Rockville

Pauw MA, Remphrey WR (1992) In vitro germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment. *Canadian Journal of Botany* 71:879-885

Pierik RLM (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid

Pritchard HW (1989) Modern methods in orchid conservation: The role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press, Cambridge

Ramírez RJ (1999) Cultivo *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* Lindl, subespecie *dawsonii* f. *chilapensis*. En: Memorias VIII Congreso de Horticultura. México, DF.

Rosner B (1995) Fundamentals of biostatistics. Duxbury Press International Thomson Publishing Inc. Belmont, California

Rubluo A, Chávez V, Martínez AP, Martínez-Vázquez O (1993). Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. Biological Conservation 63:163-169

Sagawa Y, Kunisaki JT (1984) Clonal propagation: Orchids. En: Vasil IK (ed) Cell cultured somatic cell genetics of plants. Academic Press, Orlando, Florida

Sheelavantmath SS, Murthy HN, Pyati AN, Ashok Kumar HG, Ravishankar BV (2000) In vitro propagation of the endangered orchid *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr. through rhizome section culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 60:151–154

St. Arnaud, Lauzer M, Barabe D (1992) In vitro germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). Lindleyana 7:22-27

Stewart SL, Kane ME (2006) Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86:147-158

Takahashi K, Ogiwara I, Hakoda N (2000) Seed germination of *Habenaria (pecteilis) radiata* (Orchidaceae: Orchideae) in vitro. Lindleyana 15:59-63

Tremblay RD, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84:1–54

WITHNER, C. L. 1974. Developments in Orchid Physiology. *En*: Whithner C. L. [ed.], *The Orchids Scientific Studies*. John Wiley & Sons, New York, USA. 129-168.

Van Staden J, Upfold SJ, Drenes FE (1994) Effect of seaweed concentrates on growth and development of the marigold (*Tagetes patula*). *Journal of Applied Phycology* 6:427-428

Van Waes JM, Debergh PC (1986) *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiology Plantarum* 67:253-261

Villalobos AVM (1990) Historia del Cultivo de Tejidos. *En*: Rosell CH, Villalobos AVM (eds), *Fundamentos Teórico – Prácticos del cultivo de Tejidos Vegetales*. FAO 105:3-7

Zettler LW, Hofer CJ (1998) Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany* 39:189-951

Cuadro 1. Barrido hormonal con ácido giberélico (GA_3) y ácido naftalenacético (ANA).

		ANA				
		0	0.1	0.25	0.5	1.0
GA_3	0	1	2	3	4	5
	0.1	6	7	8	9	10
	0.5	11	12	13	14	15
	1.0	16	17	18	19	20
	5.0	21	22	23	24	25
	10.0	26	27	28	29	30

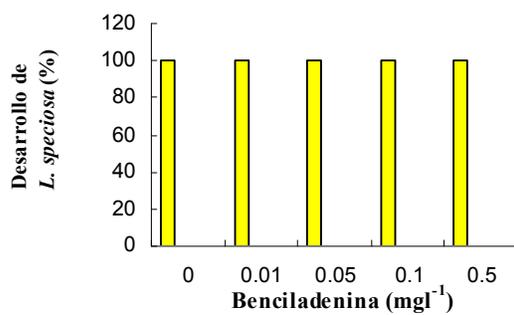
Cuadro 2. Porcentajes de cada uno de los estados de desarrollo de *L.speciosa* en diferentes medios de cultivo, a los 90 días de efectuada la siembra.

	MS sac	1/2 MS sac	MSA1	MSA2	Knudson C	MS s/sac	1/2 MS s/sac	Agar-Agua
Protocormo 1	3.2	5.1	6.8	26.6	23.8	98.9	96.7	100
Protocormo 2	3.2	5.8	18.2	29.1	30.7	1.1	3.3	0
Plántula1	28.0	40.6	28.0	22.8	34.4	0	0	0
Plántula 2	65.6	48.6	47.0	21.5	11.1	0	0	0
Media±error								
Standard	3.56±.074 ^a	3.33±.068 ^{ab}	3.15±.083 ^b	2.39±.124 ^c	2.33±.070 ^c	1.01±.007 ^d	1.03±.013 ^d	1.0±.000 ^d

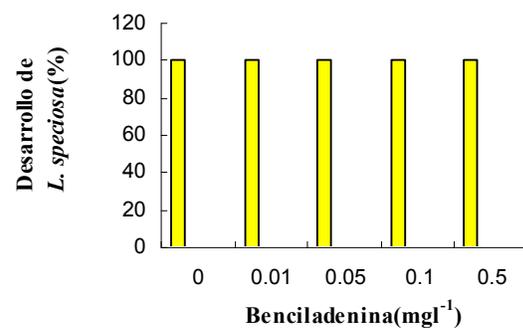
Cuadro 3: Tamaño (mm), vigor, raíces, brotes y callo (en orden de arriba a abajo, incluyendo en primer lugar el número de medio, (medias \pm error estándar)) de las plántulas de *Laelia speciosa* transferidas en medios MS suplementados con diferentes concentraciones de GA₃ y ANA; a los 90 días de su subcultivo.

		ANA				
		0	0.1	0.25	0.5	1.0
GA ₃	0	1	2	3	4	5
		6.12 \pm .688 ^a	8.87 \pm .875 ^{abc}	7.36 \pm .363 ^a	8.32 \pm .946 ^{abc}	10.86 \pm .677 ^{abcde}
		2.06 \pm .062 ^b	2.00 \pm .000 ^b	3.00 \pm .000 ^{bc}	2.95 \pm .053 ^c	3.00 \pm .000 ^c
		1.81 \pm .292 ^{abcdefg}	2.00 \pm .354 ^{abcdefg}	2.92 \pm .130 ^g	1.32 \pm .154 ^{abcd}	1.57 \pm .130 ^{abcdefg}
		1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.32 \pm .097 ^a	2.68 \pm .254 ^b	1.90 \pm .248 ^{ab}
	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b	4.00 \pm .000 ^c	
	0.1	6	7	8	9	10
		6.85 \pm .458 ^a	6.69 \pm .835 ^a	7.80 \pm .516 ^a	9.79 \pm .568 ^{abcd}	9.71 \pm .398 ^{abcd}
		3.00 \pm .000 ^c	3.00 \pm .000 ^c	3.00 \pm .000 ^c	4.00 \pm .000 ^d	3.00 \pm .000 ^c
		2.67 \pm .200 ^{defg}	1.46 \pm .215 ^{abcdef}	2.68 \pm .214 ^{efg}	2.79 \pm .160 ^{fg}	1.50 \pm .272 ^{abcdef}
		1.52 \pm .135 ^{ab}	2.08 \pm .239 ^{ab}	1.80 \pm .191 ^a	1.58 \pm .145 ^{ab}	1.57 \pm .228 ^{ab}
	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.04 \pm .040 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	
	0.5	11	12	13	14	15
		6.88 \pm .776 ^a	7.00 \pm .775 ^a	7.16 \pm .574 ^a	11.0 \pm 1.548 ^{abcde}	10.07 \pm 1.382 ^{abcde}
		2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b
1.18 \pm .095 ^a		1.40 \pm .163 ^{abcde}	2.26 \pm .274 ^{abcdefg}	1.47 \pm .194 ^{abcdef}	1.20 \pm .145 ^{ab}	
1.88 \pm .342 ^{ab}		1.60 \pm .306 ^{ab}	1.21 \pm .096 ^a	1.94 \pm .303 ^{ab}	2.20 \pm .312 ^{ab}	
1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	2.00 \pm .000 ^b	1.00 \pm .000 ^a		
1.0	16	17	18	19	20	
	8.40 \pm .821 ^{abc}	5.64 \pm 1.329 ^a	5.64 \pm .592 ^a	9.29 \pm 1.899 ^{abc}	7.69 \pm .977 ^a	
	2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b	2.00 \pm .000 ^b	
	1.27 \pm .153 ^{abc}	1.43 \pm .291 ^{abcde}	1.64 \pm .310 ^{abcdefg}	2.57 \pm .481 ^{cdefg}	1.62 \pm .331 ^{bcdefg}	
	1.13 \pm .091 ^a	1.71 \pm .221 ^{ab}	1.36 \pm .152 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.31 \pm .133 ^a	
1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a		
5.0	21	22	23	24	25	
	7.70 \pm 1.096 ^a	6.50 \pm .957 ^a	10.03 \pm 1.292 ^{abcd}	10.50 \pm .957 ^{abcde}	9.17 \pm 3.124 ^{abcd}	
	1.00 \pm .000 ^a	2.00 \pm .000 ^b	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	
	1.20 \pm .200 ^{ab}	1.17 \pm .167 ^a	2.53 \pm .201 ^{bcdefg}	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	
	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.34 \pm .159 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	
1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a		
10.0	26	27	28	29	30	
	14.13 \pm 1.716 ^{cde}	14.09 \pm 2.213 ^{bcde}	8.00 \pm .845 ^{ab}	16.13 \pm 1.146 ^e	15.00 \pm 1.485 ^{de}	
	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	
	1.25 \pm .250 ^{abc}	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	
	1.00 \pm .000 ^a	1.73 \pm .273 ^a	1.57 \pm .202 ^{ab}	1.53 \pm .133 ^a	1.31 \pm .133 ^a	
1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a	1.00 \pm .000 ^a		

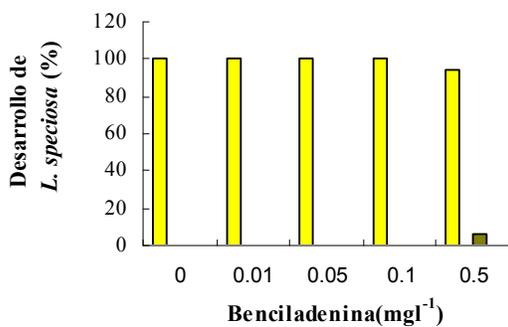
Fig. 1. Efecto de la benciladenina en el desarrollo de semillas inmaduras de *L. speciosa*, bajo condiciones de luz (a) y de oscuridad (b) a los 30 días de efectuada la siembra y luz (c) y oscuridad (d) a los 90 días. Los estados de desarrollo de *L. speciosa* son: ■ semilla, ■ protocormo 1, ■ protocormo 2, ■ plántula.



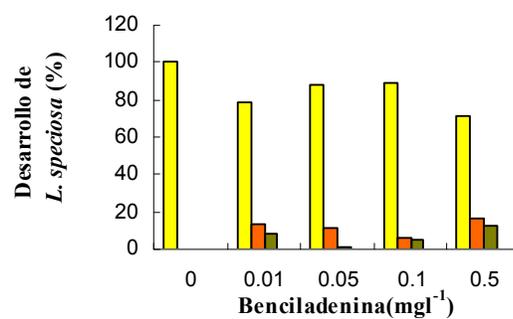
a)



b)

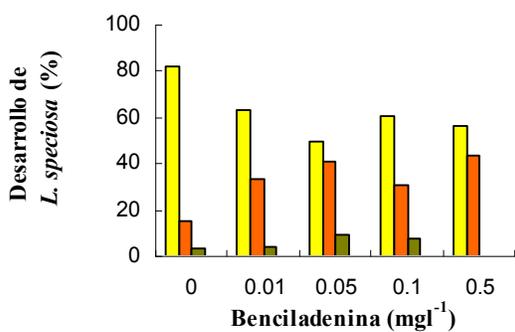


c)

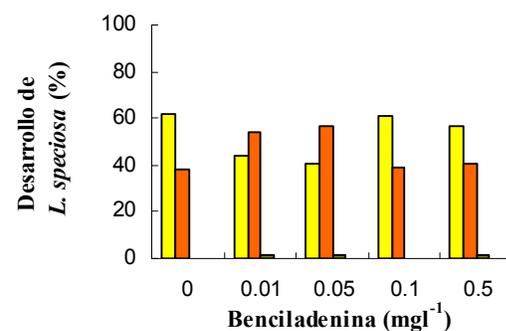


d)

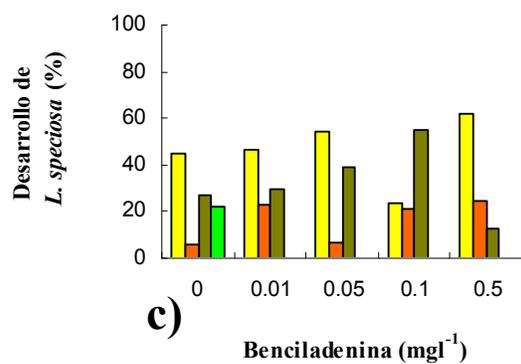
Fig. 2. Efecto de la benciladenina en el desarrollo de semillas de madurez intermedia de *L. speciosa* bajo condiciones de luz (a) y de oscuridad (b) a los 30 días de efectuada la siembra y luz (c) y oscuridad (d) a los 90 días. Los estados de desarrollo de *L. speciosa* son: ■ semilla, ■ protocormo 1, ■ protocormo 2, ■ plántula.



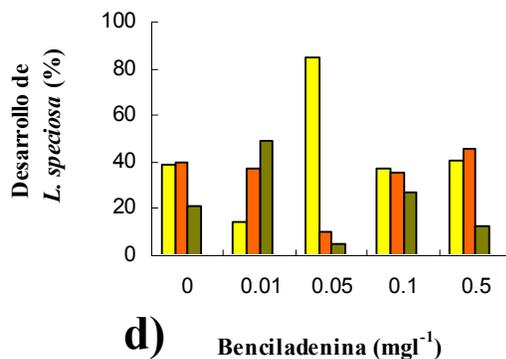
a)



b)



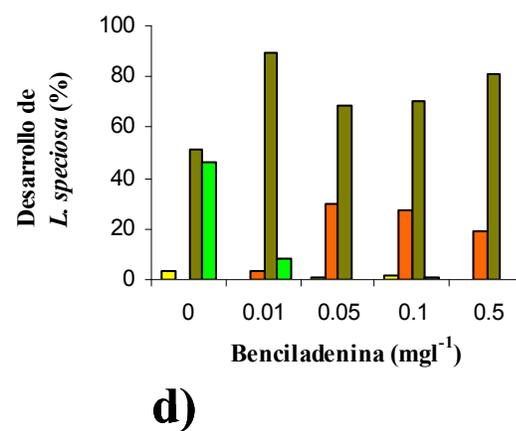
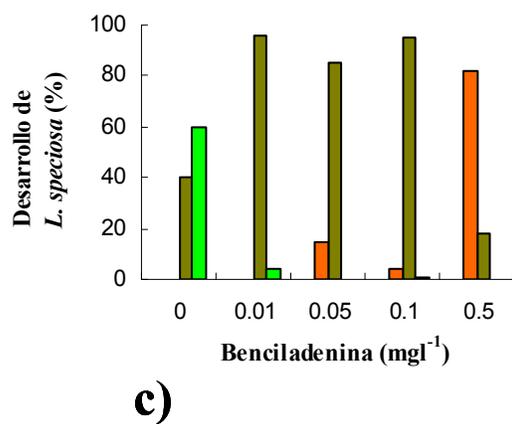
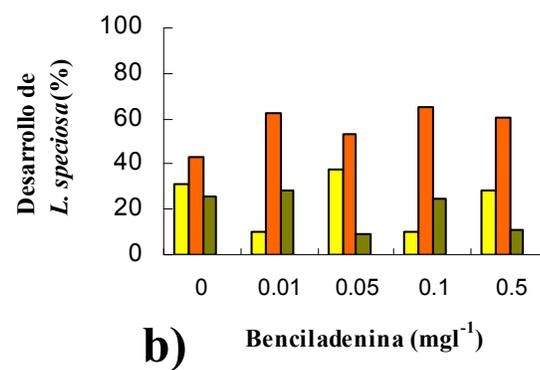
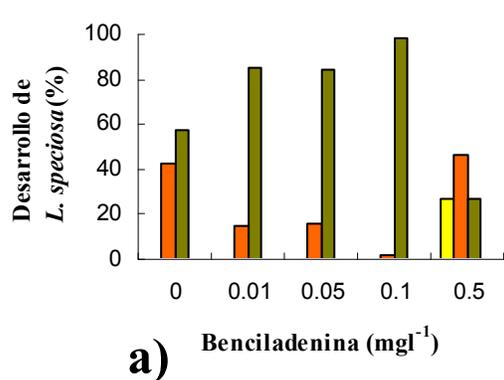
c)



d)

Fig. 3. Efecto de la benciladenina en el desarrollo de semillas provenientes de una cápsula madura de *L. speciosa* bajo condiciones de luz (a) y de oscuridad (b) a los 30 días de efectuada la siembra y luz (c) y oscuridad (d) a los 90 días. Los estados de desarrollo de *L. speciosa* son:

■ semilla, ■ protocormo 1, ■ protocormo 2, ■ plántula.



Anexo 1a. Estadísticos en la comparación intratratamientos del desarrollo de semillas inmaduras de *L. speciosa* en condiciones de luz y de oscuridad.

A los 30 días en todos los tratamientos se observa igual el desarrollo, por lo que no se presentan estadísticos.

90 DIAS	CONTRASTE INTRA	DIF±E.E.	IC 95%		F	Sig.	
			L.I.	L.S.			
LUZ	T1 vs. T2	.000 ± .054	-.106	.106	.000	1.000	
	T3	.000 ± .054	-.106	.106	.000	1.000	
	T4	.000 ± .054	-.106	.106	.000	1.000	
	T5	.120 ± .054	-.226	-.014	4.947	.026	
	T2 vs. T3	.000 ± .054	-.106	.106	.000	1.000	
	T4	.000 ± .054	-.106	.106	.000	1.000	
	T5	.120 ± .054	-.226	-.014	4.947	.026	
	T3 vs. T4	.000 ± .054	-.160	.106	.000	1.000	
	T5	.120 ± .054	-.226	-.014	4.947	.026	
	T4 vs. T5	.120±.054	-.226	-.014	4.947	.026	
	OSC.	T1 vs. T2	-.290 ± .054	-.396	-.184	28.891	.000
		T3	-.130 ± .054	-.236	-.024	5.806	.016
T4		-.160 ± .054	-.266	-.054	8.795	.003	
T5		-.410 ± .054	-.516	-.304	57.748	.000	
T2 vs. T3		.160 ± .054	.054	.266	8.795	.003	
T4		.130 ± .054	.024	.236	5.806	.016	
T5		-.120 ± .054	-.226	-.014	4.947	.026	
T3 vs. T4		-.030 ± .054	-.136	.076	.309	.578	
T5		-.280 ± .054	-.386	-.174	26.933	.000	
T4 vs. T5		-.250 ± .054	-.356	-.144	21.471	.000	

Anexo 1b. Estadísticos en la comparación del desarrollo de semillas inmaduras de *L. speciosa* en cada una de las concentraciones de BA (gl^{-1}) entre las condiciones de luz y de oscuridad.

90 DIAS	CONTRASTE		DIF.± E.E.	IC 95 %		F	P
	LUZ vs. OSC.			L.I.	L.S.		
0.0	1.00	1.00	.000 ± .054	-.106	.106-	.000	1.000
0.01	1.00	1.29	-.290 ± .054	.396	-.184-	28.891	.000
0.05	1.00	1.13	-.130 ± .054	.236	-.024-	5.806	.016
0.1	1.00	1.16	-.160 ± .054	.266	-.054-	8.795	.003
0.5	1.12	1.41	-.290 ± .054	.396	-.184	28.891	.000

Anexo 2a. Estadísticos en la comparación intratratamientos del desarrollo de semillas de madurez intermedia de *L. speciosa* en condiciones de luz y de oscuridad.

30 DIAS	CONTRASTE	DIF± E.E.	IC 95 %		F	P
			L.I.	L.S.		
LUZ	INTRA					
	T1 vs. T2	- .200 ± .077	-.351	-.049	6.717	.010
	T3	- .380 ± .077	-.531	-.229	24.249	.000
	T4	- .260 ± .077	-.411	-.109	11.352	.001
	T5	- .230 ± .077	-.381	-.079	8.883	.003
	T2 vs. T3	- .180 ± .077	-.331	-.029	5.441	.020
	T4	- .060 ± .077	-.211	.091	.605	.437
	T5	- .030 ± .077	-.181	.121	.151	.698
	T3 vs. T4	.120 ± .077	-.031	.271	2.418	.120
	T5	.150 ± .077	-.001	.301	3.778	.052
	T4 vs. T5	.030 ± .077	-.121	.181	.151	.698
	OSC.	T1 vs. T2	- .200 ± .077	-.351	-.049	6.717
T3		- .230 ± .077	-.381	-.079	8.883	.003
T4		- .010 ± .077	-.161	.141	.017	.897
T5		- .070 ± .077	-.221	.081	.823	.365
T2 vs. T3		- .030 ± .077	-.181	.121	.151	.698
T4		.190 ± .077	.039	.341	6.062	.014
T5		.130 ± .077	-.021	.281	2.838	.092
T3 vs. T4		.220 ± .077	.069	.371	8.128	.004
T5		.160 ± .077	.009	.311	4.299	.038
T4 vs. T5		-.060 ± .077	-.211	.091	.605	.437

90 DIAS	CONTRASTE	DIF.± E.E.	IC 95 %		F	P	
			L.I.	L.S.			
	INTRA						
LUZ	T1 vs. T2	1.030 ± .113	.809	1.251	83.321	.000	
	T3	.410 ± .113	.189	.631	13.202	.000	
	T4	-.050 ± .113	-.271	.171	.196	.658	
	T5	.830 ± .113	.609	1.051	54.105	.000	
	T2 vs. T3	-.620 ± .113	-.841	-.399	30.190	.000	
	T4	-1.080 ± .113	-1.301	-.859	91.606	.000	
	T5	-.200 ± .113	-.421	.021	3.142	.077	
	T3 vs. T4	-.460 ± .113	-.681	-.239	16.619	.000	
	T5	.420 ± .113	.199	.641	13.85	.000	
	T4 vs. T5	.880 ± .113	.659	1.101	60.820	.000	
	OSC.	T1 vs. T2	-.530 ± .113	-.751	-.309	22.061	.000
		T3	.620 ± .113	.399	.841	30.190	.000
T4		-.080 ± .113	-.301	.141	.503	.479	
T5		.100 ± .113	-.121	.321	.785	.376	
T2 vs. T3		-1.150 ± .113	-.181	.121	103.866	.000	
T4		.450 ± .113	.929	1.371	15.904	.000	
T5		.630 ± .113	.229	.671	31.172	.000	
T3 vs. T4		-.700 ± .113	.409	.851	38.484	.000	
T5		-.520 ± .113	-.921	-.479	21.237	.000	
T4 vs. T5		.180 ± .113	-.041	.401	2.545	.111	

Anexo 2b. Estadísticos en la comparación del desarrollo de semillas de madurez intermedia de *L. speciosa* en cada una de las concentraciones de BA (gl^{-1}) entre las condiciones de luz y de oscuridad.

30 DIAS	CONTRASTE		DIF.± E.E.	IC 95 %		F	Sig.
	LUZ vs. OSC.			L.I.	L.S.		
0.0	1.21	1.38	-0.170 ± .077	-0.321	-0.019	4.853	.028
0.01	1.41	1.58	-0.170 ± .077	-0.321	-0.019	4.853	.028
0.05	1.59	1.61	-0.020 ± .077	-0.171	.131	.067	.796
0.1	1.47	1.39	-0.080 ± .077	-0.071	.231	1.075	.300
0.5	1.44	1.45	-0.010 ± .077	-0.161	.141	.017	.897
90 DIAS							
0.0	2.26	1.82	.440 ± .113	.219	.661	15.205	.000
0.01	1.23	2.35	-1.170 ± .113	-1.341	-.899	98.518	.000
0.05	1.85	1.20	.650 ± .113	.429	.871	33.182	.000
0.1	2.31	1.90	.410 ± .113	.189	.631	13.202	.000
0.5	1.43	1.72	-.290 ± .113	-.511	-.069	6.605	.010

Anexo 3a Estadísticos en la comparación intratratamientos del desarrollo de semillas maduras de *L. speciosa* en condiciones de luz y de oscuridad.

DIAS ³⁰	CONTRASTE	DIF.± E.E.	IC 95 %		F	P.	
			L.I.	L.S.			
	INTRA						
LUZ	T1 vs. T2	-.280 ± .079	-.434	-.126	12.698	.000	
	T3	-.270 ± .079	-.424	-.116	11.807	.001	
	T4	-.410 ± .079	-.564	-.256	27.226	.000	
	T5	.570 ± .079	.416	.724	52.623	.000	
	T2 vs. T3	.010 ± .079	-.144	.164	.016	.899	
	T4	-.130 ± .079	-.284	-.024	2.737	.098	
	T5	.850 ± .079	.696	1.004	117.020	.000	
	T3 vs. T4	-.140 ± .079	-.294	.014	3.175	.075	
	T5	.840 ± .079	.686	.994	114.283	.000	
	T4 vs. T5	.980 ± .079	.826	1.134	155.552	.000	
	OSC.	T1 vs. T2	-.230 ± .079	-.320	.120	8.568	.003
		T3	.240 ± .079	.370	.810	9.329	.002
T4		-.200 ± .079	.500	.940	6.479	.011	
T5		.120 ± .079	.380	.820	2.332	.127	
T2 vs. T3		.470 ± .079	.470	.910	35.778	.000	
T4		.030 ± .079	.600	1.040	.146	.703	
T5		.350 ± .079	.480	.920	19.841	.000	
T3 vs. T4		-.440 ± .079	-.090	.350	31.357	.000	
T5		-.120 ± .079	-.210	.230	2.332	.12	
T4 vs. T5		.320 ± .079	-.340	.100	16.585	.000	

90 DIAS	CONTRASTE	DIF.± E.E.	IC 95 %		F	Sig.	
			L.I.	L.S.			
	INTRA						
LUZ	T1 vs. T2	.560 ± .060	.442	.678	86.644	.000	
	T3	.750 ± .060	.632	.868	155.413	.000	
	T4	.630 ± .060	.512	.748	109.659	.000	
	T5	1.420 ± .060	1.302	1.538	557.110	.000	
	T2 vs. T3	.190 ± .060	.072	.308	9.974	.002	
	T4	.070 ± .060	-.048	.188	1.354	.245	
	T5	.860 ± .060	.742	.978	204.344	.000	
	T3 vs. T4	-.120 ± .060	-.238	-.002	3.979	.046	
	T5	.670 ± .060	.552	.788	124.026	.000	
	T4 vs. T5	.790 ± .060	.672	.908	172.432	.000	
	OSC.	T1 vs. T2	.350 ± .060	.232	.468	33.845	.000
		T3	.720 ± .060	.602	.838	143.228	.000
T4		.700 ± .060	.582	.818	135.382	.000	
T5		.590 ± .060	.472	.708	96.176	.000	
T2 vs. T3		.370 ± .060	.252	.488	37.824	.000	
T4		.350 ± .060	.232	.468	33.845	.000	
T5		.240 ± .060	.122	.358	15.914	.000	
T3 vs. T4		-.020 ± .060	-.138	.098	.111	.740	
T5		-.130 ± .060	-.248	-.012	4.669	.031	
T4 vs. T5		-.110 ± .060	-.228	.008	3.343	.068	

Anexo 3b. Estadísticos en la comparación del desarrollo de semillas maduras de *L. speciosa* en cada una de las concentraciones de BA (gl^{-1}) entre las condiciones de luz y de oscuridad

30 DIAS	CONTRASTE		DIF.± E.E.	IC 95 %		F	P
	LUZ vs. OSC.			L.I.	L.S.		
0.0	2.57	1.95	.620 ± .079	.466	.774	62.260	.000
0.01	2.85	2.18	.670 ± .079	.516	.824	72.706	.000
0.05	2.84	1.71	1.130 ± .079	.976	1.284	206.814	.000
0.1	2.98	2.15	.830 ± .079	.676	.984	111.578	.000
0.5	2.00	1.83	.170 ± .079	.016	.324	4.681	.031
90 DIAS							
0.0	3.60	3.40	.200 ± .060	.082	.318	11.052	.001
0.01	3.04	3.05	-.010 ± .060	-.128	.108	.028	.868
0.05	2.85	2.68	.170 ± .060	.052	.288	7.985	.005
0.1	2.97	2.70	.270 ± .060	.152	.388	20.141	.000
0.5	2.18	2.81	-.630 ± .060	-.748	-.512	109.659	.000

CAPÍTULO 5

RECOGNIZING ENDOPHYTIC FUNGI CARRIED IN SEEDS OF THE EPIPHYTIC ORCHID *Laelia speciosa* AND THEIR SYMBIOTIC RELATIONSHIP

Irene Ávila-Díaz^{1,2}, R. Salgado-Garciglia³ and Ken Oyama²

¹ Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Edif. R planta baja. Ciudad Universitaria. 58040, Morelia, Michoacán, México.

² Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta. 58190, Morelia, Michoacán, México

³ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Edif. B-3. Ciudad Universitaria. 58040, Morelia, Michoacán, México.

⁴ Author for correspondence iavila@oikos.unam.mx. Tel. (443) 3 15 50 51. Fax (443) 3 22 27 19

Total word count: 6220. Summary 148 words, Introduction 787 words, Materials and Methods 1142 words, Results 1256 words, Discussion 1437 words, References 1451 words.

6 Figures and 2 Tables.

NOTA: Este capítulo sera enviado a la revista *New Phytologist*, por lo que el formato corresponde al requerido.

Summary

- Mycorrhiza-orchid relationships have been studied more in terrestrial than in epiphytic orchids. The present work deals with the extent and significance of such relationships in *Laelia speciosa*, an epiphytic Mexican orchid.

- *In vitro* germination and development of *L. speciosa* in relation to endophytic fungi carried in seeds were studied. The symbiotic relationship was assessed by observations of fungal colonization in seeds at different stages of maturity, from different natural populations and with a fungicide experiment.

- Fungal colonization was dependent on seed maturity. Fungi were present in all the seeds observed from different populations. Increasing fungicide concentration decreased fungal colonization and plant development.

- *L. speciosa* apparently has a specific symbiotic relationship with an endophytic fungi. This is the first report of the existence of endophytic fungi within orchid seeds. The presence of this fungi provides important ecological advantages for seed germination and the establishment of seedlings of this epiphytic orchid.

Key words: epiphytic orchids, endophytic fungi, *Laelia speciosa*, symbiotic relationship.

Introduction

The fungus-orchid association has been a long-standing issue in the study of orchid development. Orchid seeds, almost devoid of reserves, require the presence of fungi as an energy source for germination and during early developmental stages in nature (Benzing, 1981; Arditti *et al.*, 1990; Johansen & Rasmussen, 1992; Rasmussen & Whigham, 1993; Rasmussen, 1995; McKendrick *et al.*, 2000; Otero *et al.*, 2002).

The orchid-fungi symbiotic interactions and the degree of potential specificity have been demonstrated mainly in seeds of terrestrial orchid species germinated *in vitro* with the addition of fungal species isolates, either from roots of orchid species or from diseased non-host plant species (Hadley, 1970; Clements, 1988; Peterson *et al.*, 1998). Additionally, the improvement of *in vitro* symbiotic germination techniques has been useful for the propagation of species that are difficult to reproduce (Clements & Ellyard, 1979; Smreciu & Currah, 1989; Anderson, 1991; Zettler & McInnis, 1994; Tan *et al.*, 1998; Zettler & Hofer, 1998).

There is a great diversity of symbiotic fungi associated with orchid roots. Generally they are members of the Subdivision Basidiomycotina, which can form characteristic intracellular masses of hyphae, called pelotons, within root or rhizome cortical tissue of orchids (Zelmer *et al.*, 1996; Currah *et al.*, 1997; Rasmussen, 2002). Other fungi of the Subdivision Ascomycotina and the Fungi Imperfecti have also been isolated from these organs, but their biological role is unknown and may be as important to orchids in nature as the Basidiomycetes that form pelotons (Currah *et al.*, 1997).

Methods have been developed that allow for *in situ* studies of terrestrial orchid seed germination (Rasmussen & Whigham, 1993; Masuhara & Katsuya, 1994; Zelmer *et al.*, 1996; McKendrick *et al.*, 2000, 2002; Batty *et al.*, 2001). These methods, which enable identification and enumeration of fungi in the field, are important for understanding the ecology of orchids and their fungal associates in natural habitats (Batty *et al.*, 2001). For example, in *Tripularia discolor*, germination was more frequent in plots with decomposing wood (Rasmussen & Whigham, 1998) and in *Caladenia arenicola*, it was found that germination increased in the vicinity of adult *C. arenicola* plants and in the presence of other soil factors (Batty *et al.*, 2001).

It is interesting to note that some of these *in situ* studies (Rasmussen & Whigham, 1993; Batty *et al.*, 2001) have shown that seeds of terrestrial orchids which have not been colonized by fungi, failed to germinate, indicating that they need to be colonized in natural habitats for their development. Molecular tools have also helped to identify the origin and specificity of endophytic fungi, especially those that are difficult to isolate (Taylor & Bruns, 1997, 1999; Selosse *et al.*, 2002; McKendrick *et al.*, 2000, 2002; Otero *et al.*, 2002, 2004; Shefferson, *et al.*, 2005).

The type, physiological role and degree of association of fungi in epiphytic orchids are poorly understood compared with those of terrestrial species (Richardson *et al.*, 1993; Rasmussen, 1995; Rivas *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2005). The frequency of mycorrhizas and the degree of specificity in epiphytic tropical orchids is variable (Clements, 1988; Lesica & Antibus, 1990; Goh *et al.*, 1992; Richardson & Currah, 1995; Rivas *et al.*, 1998; Zettler *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2005), as well as the physiological role that is conferred on these mycorrhizas (Richardson *et al.*, 1993, Richardson & Currah, 1995; Bayman *et al.*, 2002). It has been inferred that this association is generally not as critical for adult plants as for germinating seeds (Richardson *et al.*, 1993; Bayman *et al.*, 2002), and that epiphytic orchids are less dependent upon and more generalized about their choice of symbiotic fungus because they are more easily germinated on a sterilized medium than terrestrial orchids (Johansen & Rasmussen, 1992; Otero *et al.*, 2005). We think that these less dependence could be because seeds of epiphytic orchids has endophytic fungi and their relationship can be an adaptive advantage, in an epiphytic habitat where periodical droughts and temperature fluctuations constrain the survival of canopy plants (Benzig, 1978)

The objective of this study was to describe the relationship between the epiphytic orchid *L. speciosa* and its endophytic fungi. Our hypothesis was that *L. speciosa* should contain the endophytic fungi inside the seeds in capsules sampled from different populations and in seedlings growing *in vitro*. We predicted seed germination and seedling development to require the presence of endophytic fungi. We designed a fungicide experiment *in vitro* to assess the symbiotic relationship, hypothesizing that if fungicides inhibited growth of symbiotic fungi they should reduce the development and survival of *L. speciosa* seedlings.

Materials and Methods

Plant and sample localities

Laelia speciosa (HBK) Schltr. is an epiphytic orchid endemic to Mexico, and widely distributed in the Sierra Madre Oriental, the Sierra Madre Occidental, the Transverse Volcanic Belt and the southern part of the Mexican Plateau. *Laelia speciosa* grows on oaks, primarily of the species *Quercus deserticola* Trel. and occasionally on *Q. laeta* Liebm. The plants grow in open deciduous forests at an altitude of 1900 to 2500 m, withstanding severely dry seasons from December to June, with short periods of time with temperatures down to 0° C. Annual precipitation varies from 700 to 1000 mm (Halbinger & Soto, 1997). Plants are single or form compact clumps, and are 12-40 cm high excluding the inflorescence, with globular or ovoid pseudobulbs which carry one stiff, terminal leaf. They produce an inflorescence that ranges from 15 to 25 cm long, with 1 to 2 flowers which measure 10-16 cm in diameter and range in color from pale to dark pink-lilac to purplish. *Laelia speciosa* is considered an endangered species under special protection by Mexican law (PROY-NOM-059-ECOL-2001). However, thousands of plants of *L. speciosa* are harvested each year from their habitats to be sold in the streets and markets in several cities and towns in Mexico due to the beauty of its flowers (Salazar-Chávez, 1996; Halbinger & Soto, 1997; Ávila-Díaz & Oyama, 2007). This massive harvesting has caused local extinction, but fortunately, large populations can still be found in some localities (Halbinger & Soto, 1997; Ávila-Díaz & Oyama, 2007).

We studied samples from six populations of *L. speciosa* in the central part of Mexico (Table 1) to evaluate the presence of fungi in seeds within capsules.

Fungal colonization and development of Laelia speciosa

The presence of endophytic fungi was observed in seeds, protocorms and seedlings cultivated *in-vitro*. A modified protocol using the differential stain “trypan blue” (Currah *et al.*, 1997) was used with 80% ethanol to light up tissues and eliminate chlorophyll and other pigments, which made the fungi easier to see, because the trypan blue bind to the walls of the fungal cells. The process of fungal colonization and development of *L. speciosa* were classified

into different stages based on the location and level of infection of the fungi in the plant and the developmental stage of the seed to seedling.

Assessment of L. speciosa – fungi relationship

In order to assess the symbiotic relationship between *L. speciosa* and the fungi species, we observed seeds and protocorms from capsules at different stages of maturity, and seeds and seedlings growing *in vitro* from capsules collected from all the populations studied. In addition, an experiment was designed to observe the effects of fungicides on the fungal colonization and development of *L. speciosa*, as explained below.

Fungal colonization and seed maturity—Six capsules of *L. speciosa* at different stages of maturity (5, 7 and 10 months) were collected from the OLM population. Before the dehiscence of the capsules, they were disinfected as follows: 15% Extran, 5 min; 70% ethanol, 5 min; 3% hydrogen peroxide, 3 min; 20% sodium hypochlorite, 15-20 min. The capsules were subsequently washed three times with distilled water inside a laminar flow hood, followed by soaking in 96% alcohol and were flamed to avoid contamination.

Seeds were extracted from the capsules inside a laminar hood, and immediately afterwards they were stained and later observed under the microscope. We recorded the percentages of each fungal colonization stage and means of colonization (\pm standard error); the categories for stages of colonization were as follows: 1 without colonization; 2 initial colonization in suspensor; 3 to presence of pelotons; 4 to pelotons with rhizoids and 5 to parasitism. Additionally, placental tissue was stained and observed under the microscope.

Data was analyzed using a non-parametric method because the data was not normally distributed. A Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney *U* test were performed to assess significant differences for fungal colonization between the capsules with different maturity stages.

Detection of endophytic fungi from different populations of L. speciosa—The mature capsules were disinfected as described above, and seeds were extracted under sterile conditions and stained to detect the presence of fungi. Seeds from the same capsules were grown in

Murashige-Skoog medium (MS), with 20 g l⁻¹ of sucrose, 7 g l⁻¹ of agar at pH 5.7 (Murashige & Skoog, 1962; Ávila-Díaz & Salgado-Garciglia, 2000). Roots of more than one-year-old seedlings cultivated *in vitro* were stained and examined under a light microscope (at 100x, 200 x and 400 x magnifications) as well as in a scanning electron microscope (SEM), to confirm the presence of fungi.

Fungicide experiment—Three mature capsules from *L. speciosa* collected in 2000 in Indaparapeo were disinfected as described previously. Seeds were extracted from the capsules, mixed under sterile conditions and cultured *in vitro* on MS medium (Murashige & Skoog, 1962) to which two systemic fungicides usually used in orchid culture (Burnett, 1986; Ruiz, 1997) were added separately. Benomyl (DuPont, Mexico) and Tecto (Tiabendazol 60%, Syngenta Co., Mexico) in concentrations of 0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 g l⁻¹ were added to the medium after sterilization. Four flasks of each treatment were used. It has been suggested that fungicide treatment should inhibit the development of both contaminant fungi on the media and symbiotic fungi in the plant (Brown *et al.*, 1982). The germination flasks were kept at 25°C, under a photoperiod of 16 h with 130 µE/s² light. Observations were made at 30 and 90 days after the seeds were sowed. For each flask a sample of approximately 1.0 cm² was taken with a spatula, and was stained to observe, on average, 180 individuals per treatment. A total of 3611 individuals of *L. speciosa* were observed to quantify the fungal colonization stages (% of each), the number of pelotons in individual orchids (mean ± standard error) and the stages of *L. speciosa* development (% of each).

The program SPSS 12.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) was used for all data analysis. Significant differences were assessed for fungal colonization by the use of the non-parametric Kruskal-Wallis test; to assess differences between treatments the Mann-Whitney *U* test was used. Analysis of variance was done using the General Lineal Model for the fungal colonization for observation made after 90 days; observations from both dates were used to assess *L. speciosa* development because in these cases interaction between fungicides and treatment were found. To adjust the *P* value to reduce type I error the Holm's sequence with the Bonferroni procedure was done to the non parametric Mann Withney *U* test. For comparison of the number of pelotons in individuals, a Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney *U* test were used, since the distribution of this data was not normal ($P < 0.05$).

The Spearman test was applied to correlate fungal colonization with plant development.

Results

Fungal colonization and development of Laelia speciosa

Few immature seeds were not colonized (Fig. 1a). Fungal colonization occurred through the suspensor (Fig. 1b, c) via placental tissue (Fig. 1i). Next, the formation of pelotons, mainly at the base of the protocorms in cortical cells, was observed (Fig. 1d, e). These pelotons developed abundant colonized rhizoids (Fig. 1e, f), which can be formed in the apical part of the protocorm. In some cases, reproductive structures of fungi were observed (Fig. 1g). In other cases, the orchids were infected by the fungi, which fully invaded and destroyed the seeds.

The development of *L. speciosa* started when the embryos increased their volume (“the imbibition stage”) with cell division. In this stage, the fungi presence was observed in the orchid suspensor, and the embryos continued growing until circular protocorms were formed. Latter, pelotons were formed at the bases of the protocorms, increasing their volume until the protocorms broke out of the seed coat; then, the rhizoids developed and protocorms grew, followed by the formation of the first leaves and roots. We classified this developmental process into four arbitrary stages: Stage 1: “protocorm 1” (“imbibition stage” and circular protocorm inside of seed coat) (Fig. 2a, b, c); stage 2: “protocorm 2” (protocorm outside of seed coat) (Fig. 2d, e, f); stage 3: “seedling 1” (with 1-2 leaves) (Fig. 2g, h); and stage 4: “seedling 2” (Fig. 2i) (more than 3 leaves).

Assessment of L. speciosa – fungi relationship

Fungal colonization in seeds and protocorms from capsules at different stages of maturity—Fungal colonization varies slightly through a range of maturity levels for *L. speciosa* seeds (Table 2). The stages of fungal colonization are related to seed maturity levels ($P < 0.001$, $df = 6$, $F = 158.164$). Some seeds in immature capsules were not colonized (stage 1), while in intermediate and mature capsules, all the seeds were colonized. The values of initial colonization (stage 2) were higher in immature and intermediate seeds (80% and 84% respectively) than in mature seeds (27%), while the percentage of more advanced colonization

stage 3 (seeds with pelotons) was higher in mature seeds (48%) than in immature seeds (3%) or intermediate seeds (16%). The mean fungal colonization, regarding stages of colonization (1, 2, 3, 4 or 5) was observed to be higher in mature seeds (2.95 ± 0.074) than in intermediate (2.16 ± 0.037) or immature seeds (1.86 ± 0.043); however, they did not register significant differences.

It was also observed that 24% of mature seeds were parasitized and destroyed while intermediate or immature seeds were not parasitized.

Detection of endophytic fungi from different populations of *L. speciosa*—Seeds of *L. speciosa* from all sampling sites contained endophytic fungi; seeds and protocorms showed either incipient colonization in the suspensor or the presence of pelotons (Fig. 1 b, c).

In all the seedlings grown *in vitro*, regardless of which population they came from, the pelotons look like spheres with the same apparent morphological structure, forming a single film between the velamen and the cortical cells (Fig. 1h). At least two fungi form an association with *L. speciosa*, seeming to prove a multi-symbiote relationship. Two morphologically distinct endophytes with two types of hyphae were observed to infect the plants, one with thin hyphae structures and another with wide hyphae (Fig. 3). It was not possible for us to isolate and cultivate these fungi; there seems to be a difficulty with some orchid fungi in that they do not grow in culture media or are very difficult to isolate (Bayman *et al.*, 1997, 2002; Taylor *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2004), so microscopic observation was done directly in the plant tissue. One of the fungus species belongs to the subdivision Basidiomycotina. Like the majority of other orchid fungi which can form pelotons (Currah *et al.*, 1997), it has hyaline, with septa and no clamp connection hyphae. Eventually, a structure was observed that looked like basidia uniform with large sterigmata, probably belonging to the genus *Ceratobasidium*; on the other hand, structures like the subdivision Ascomycotina were also observed for the second fungus species.

Fungicide experiment—Fungal colonization was affected significantly by the concentration of Benomyl ($X^2 = 187.646$, $df = 4$, $P = 0.000$) or Tecto ($X^2 = 160.562$, $df = 4$, $P = 0.000$) at 30 days after application (Fig. 4a, c). At 90 days, we also observed significant differences in fungal colonization between treatments with both fungicides ($X^2 = 412.176$, $df = 4$, $P = 0.000$) (Fig. 4b,

d). Fungal colonization was inhibited at concentrations of 0.25 g l^{-1} for both fungicides. The percentage of seeds in the stage of initial colonization increased for concentrations higher than 0.25 g l^{-1} for both observation periods. In contrast, the stage of pelotons with rhizoids showed lower values with the application of 0.25 g l^{-1} of both fungicides. When the application was increased to 0.50 g l^{-1} , the percentage of this fungal colonization state also decreased. At higher fungicide concentrations the presence of pelotons or pelotons with rhizoids was minimal with Benomyl and was practically absent with Tecto (Fig. 4). It is interesting to note that using Tecto, there were some seeds found which did not develop, and were apparently dead.

On the other hand, upon decreasing the amounts of either fungicide down to 0.25 g l^{-1} or zero, the average number of pelotons per individual plant increased considerably (Fig. 5). The inhibiting effect on fungal development 30 and 90 days after the seeding period was evident when 0.25 g l^{-1} of Tecto was used because there were significant differences in the number of pelotons present per individual plant (Fig. 5c, d). However, it was necessary to add 50 g l^{-1} of Benomyl to have a significant difference at 90 days (Fig. 5b). When more than 0.50 g l^{-1} of either fungicide was added to the culture media, no significant differences were observed at 90 days. Treatments with the fungicide Tecto in the range from 0.50 to 1.0 g l^{-1} practically prevented development of pelotons (Fig. 5c, d).

Both Benomyl and Tecto fungicides significantly inhibited the development of *L. speciosa* ($F = 412.18$, $df = 4$, $P = 0.000$, at 30 days after application and $F = 305.67$, $df = 4$, $P = 0.000$, at 90 days) (Fig. 6). At 90 days after sowing, small amounts (0.25 g l^{-1}) of the fungicides reduced *L. speciosa* development significantly. The results of higher concentrations (0.5 g l^{-1}) were significantly different from the 0.25 and 0 concentrations. One g l^{-1} of fungicide gave rise to the highest percentages of protocormo 1 (i.e., the earliest stage of development). Fungicide free treatments resulted in high rates of growth [i.e., protocormo 2 at 30 days after sowing (Fig. 6a, c), and both seedling stages, 90 days after sowing (Fig. 6b, d)]. Stage “seedling 1” development (1, 2 leaves) was not diminished by the addition of 0.25 g l^{-1} of Benomyl (Fig. 6b), while it was diminished by the use of Tecto at the same concentration (Fig. 6, d). The seedling 1 and seedling 2 stages were strongly inhibited at higher concentrations ($\geq 0.5 \text{ g l}^{-1}$) of both fungicides.

The relationship between fungal colonization and *L. speciosa* development was strongly positive. The Spearman test showed a higher correlation with Tecto (Spearman rho correlation=0.918, N=1846, $P=0.000$), while Benomyl treatment resulted in a lower correlation (Spearman rho correlation=0.783, N=1765 $P=0.000$) 90 days after sowing.

Discussion

Fungal colonization and development of Laelia speciosa

The initial fungi colonization in the embryo of *L. speciosa* occurs through the suspensor, as has been observed in other orchid species (Clemens, 1988; Mc Kendrick *et al.*, 2000). Initial fungal colonization in orchids also occurs within other structures, such as rhizoids, epidermal hairs (Withner, 1974; Anderson, 1991; Zelmer *et al.*, 1996) or basal cells of the proembryo (Zelmer *et al.*, 1996). In general, in sexually produced seeds, initial fungal colonization of the protocorm can take place through the suspensor, while in embryos produced by adventitious embryony, it occurs through the rhizoids.

The development of *L. speciosa* is similar to those reported for other tropical orchids [e.g., *Encyclia boothiana* var. *erythronioides* (Stenberg & Kane, 1998), *Cattleya aelandiae*, *C. bowringiana*, *C. granulose*, *C. percivaliana*, *Cattleyopsis lindeni*, *Dendrobium parishii* (Buyun, et al., 2004), *Calopogon tuberosus* (Kauth, 2005)]. It is important to note that the development of seeds to seedlings always occurred after the endophytic fungi colonization, which suggests a symbiotic relationship between *L. speciosa* and the fungi.

Assessment of L. speciosa – fungi relationship

Fungal colonization in seeds and protocorms from capsules at different stages of maturity—The results of fungal colonization in seeds from capsules at different stages of maturity suggests that the fungi is inherited from the parental plant, through the placental tissue, which was observed with the presence of fungi. It is probably the case that there were not significant differences in fungal colonization among capsules at different stages of maturity because by the time the fruits were analyzed the colonization had been occurring for some time.

Detection of endophytic fungi from different populations of *L. speciosa*—The evidence of at least two fungi species associated to *L. speciosa* in all capsules examined from different populations seems to prove a multi-symbiote relationship, like that reported by McKendrick *et al.* (2002) who observed two fungi species in close association with seeds and seed coats of *Neottia nidus-avis*. Pelotons from more than one endophyte with different resource needs can be found at the same time and in the same tissue (Zelmer *et al.*, 1996; Kristiansen *et al.*, 2001; Rasmussen, 2002).

Fungicide experiment—The results of the fungicide experiments were consistent with the hypothesis that inhibition of growth of mycorrhizal fungi (or beneficial endophytic fungi) would reduce the growth and survival of young plants. In *L. speciosa*, fungicides significantly decreased the development of fungi. These results agree with those found by Bayman *et al.* (2002) in propiconazole-treated *Lepanthes rupestris* in the field, which had significantly fewer fungal colonies in their roots and significantly fewer degraded pelotons than did control plants. By contrast, in *L. rupestris*, Benomyl did not affect the number of degraded pelotons in roots (Bayman *et al.*, 2002). This may be due to differences in *in situ* on *L. rupestris*, and *in vitro* cultures of *L. speciosa*. A fungicide might have a negative impact on a plant by inhibiting mycorrhizal fungi, but this effect may be masked by a positive impact due to inhibition of pathogens in the field (Bayman *et al.*, 2002).

Considerations of the symbiotic relationship between *L. speciosa* and endophytic fungi—The symbiotic relationship between *L. speciosa* and fungi was assessed by the fungicide treatments in which all essential nutrients were present in the culture media (MS with sucrose). Increasing the amount of both fungicides produced a marked decrease in the development of the orchid due to the inhibiting effect on the fungi. Also, it should be stressed that there was a strong positive correlation between the development of the plant and that of the fungi.

It has been reported that seeds of epiphytic orchids were able to germinate in simple media that contained minerals and sugar (Knudson, 1922; Arditti *et al.*, 1990), assuming that a fungus was not present. The results of this study demonstrate that *L. speciosa* carries symbiotic fungi within the seeds either before the capsules mature. The existence of the fungi within the seedlings grown *in vitro* was further evidenced from microscopic observations and from

preliminary molecular results (Ávila-Díaz & Oyama, unpublished). The existence of orchid symbiotes has been discussed at length in the literature, but it has never been reported within the seeds themselves. It has been considered that orchid seeds are free from endophytic fungi (Warcup, 1981; Warcup, 1985) and that the initial contact between the mycorrhizal fungus and the seeds is probably fortuitous and haphazard (Clements, 1988). Nevertheless, in *Lepanthes caritensis*, the presence of *Xylaria corniformis* has reported along with an unidentified *Xylaria* mycobiont associated with the roots, but the fungi were never found at the bark of the host tree (Tremblay *et al.*, 1998). In the light of our findings, it seems apparent that such mycobionts were already within the plant itself.

We observed the existence of symbiotic fungi in seedlings grown *in vitro* of other epiphytic orchids, such as *Laelia autumnalis*, *Cattleya aurantiaca*, *Epidendrum parkinsonianum*, *Euchile citrina*, *E. adenocaula*, *Dendrobium thyrsiflorum*, which indicates that these endophytic fungi are apparently generalized in epiphytic orchids. Therefore we suggest that the specificity of these fungi from natural populations should be studied in seedlings grown *in vitro* which have only endophytic fungi and will not be contaminated by foreign fungi.

Specificity in orchid mycorrhizae has been controversial. Some studies have found either that orchids are generalists (Hadley, 1970; Smreciu & Currah, 1989; Rasmussen, 1995) or specialists (Taylor & Bruns, 1997, 1999; Mc Kendrick *et al.*, 2002; Shefferson, 2005) in their mycorrhizal symbioses. It is necessary to distinguish between associations that may be possible under certain experimental conditions, such as *in vitro*, and thus show a physiological compatibility or potential specificity, and those that are possible under natural conditions or are specific in an ecological context. It is known that orchid seeds form mycorrhizae with a greater breadth of fungi *in vitro* than in the wild (Masuhara & Katsuya, 1994; Rasmussen, 2002).

Zettler and Hofer (1998) found that protocorms of *Platanthera clavellata* which were inoculated with a fungus isolated from the same species and the same locality exhibited considerably larger development than protocorms inoculated with isolates from three other co-habiting species of *Platanthera*. This indicates the presence of a particular mycobiont responsible for germination and growth of each orchid species, thus avoiding mutual competition for food by employing different species of fungi (Rasmussen, 2002). A fungal

specificity is also evident in the terrestrial orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertesiana* (Taylor & Bruns, 1999), *Neottia nidus-avis* (Mc Kendrick *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2002), *Cephalanthera austinae* (Taylor & Bruns, 1997) and other *Cypripedium* species (Shefferson *et al.*, 2005).

However, studies about specificity in epiphytic orchids are limited (Clements, 1987; Rivas *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 1998). Otero *et al.* (2002, 2004) in a reviewing of tropical epiphytic orchids, found some species to be generalists, like *Tolumnia variegata*, while others, like *Ionopsis utricularoides*, are highly specific; this occurs in spite of the fact that *T. variegata* and *I. utricularoides* are phylogenetically related and also are species of similar habitats (Otero *et al.*, 2004). It is interesting that individuals of *T. variegata* differ in their relative preference for the micorrhizal fungi in such a way that different individuals prefer different fungi; thus at the individual level, this species may be specific, while at the population level, it may be more of a generalist (Otero *et al.*, 2005).

Apparently, the same fungi species are related with *L. speciosa* over its geographic range. The fungi were very similar, despite originating from six different populations isolated from three geographically distant Mexican states. Microscopic observations related to peloton morphological features in seeds and in seedling roots grown *in vitro* showed a constant pattern. Additionally, preliminary molecular characterization showed similar ITS sequences among the different localities (Ávila-Díaz & Oyama, unpublished).

The presence of symbiotic fungi in *L. speciosa* seeds may have profound implications in the biology of the species and probably among other epiphytic plants. It may bring physiological advantages for plants with small reserveless seeds dispersed by wind to colonize adverse and heterogeneous environments with fluctuating conditions of water, nutrients and temperature. Mycorrhizic fungi increase water absorption by seeds, thereby easing the germination process in canopy orchids (Yoder *et al.*, 2000), and to play a considerable role in the intake of phosphorus (Alexander *et al.*, 1984).

We consider that the presence of endophytic fungi has enormously important ecological advantages for seed germination and establishment of seedlings in the evolution of the life history of epiphytic plants.

Acknowledgements

The authors thank to A. C. Cortés-Palomec for comments to preliminary drafts of this manuscript, two anonymous reviewers for helpful suggestions, M. A. Pérez-Pérez, R. Valencia for providing field assistance, C. Gómez, A. Valencia and H. Ferreira for their technical assistance. L. Mondragón and C. Scareli in scanning electron microscopy support. M. McGloin for help with English. This research was supported by Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza (FMCN, A 1-99/130), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEMARNAT-CONACYT, 2002- C01-0544); IA-D was sponsored by a doctoral scholarships from CONACYT (130249) and DGEP- UNAM (Project 202392).

References

- Alexander C, Alexander IJ, Hadley G. 1984.** Phosphate uptake by *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal infection. *New Phytologist* **97**: 401-411.
- Anderson AB. 1991.** Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae). *Lindleyana* **6**: 183-186.
- Arditti J, Ernst R, Wing-Yam T, Glabe C. 1990.** The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana* **5**: 249-255.
- Ávila-Díaz I, Oyama K. 2007.** Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **94**: 184-193.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett M, Sivasithamparam K. 2001.** Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. *New Phytologist* **152**: 511-520.
- Bayman P, Lebrón LL, Tremblay RL, Lodge JD. 1997.** Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist* **135**:143-149.
- Bayman P, González EJ, Fumero JJ, Tremblay RL. 2002.** Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. *Journal of Ecology* **90**: 1002-1008.
- Benzing DH. 1978.** Germination and early establishment of *Tillandsia circinnata* Schlecht. (Bromeliaceae) on some of its hosts and other supports in Southern Florida. *Selbyana* **5**: 95-106.
- Benzing DH. 1981.** Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic?. *Selbyana* **5**: 241-242.
- Brown DM, Groom CL, Cvitanik M, Brown M, Cooper JL, Arditti J. 1982.** Effects of fungicides and bactericides on orchid seed germination and shoot tip cultures *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **1**: 165-180.

Burnett HC. 1986. Diseases caused by fungi and bacteria. In: American Orchid Society, ed. *The Handbook on Orchid Pests and Diseases*, West Palm Beach, FL USA. 71-91.

Buyun L, Lavrentyeva A, Kovalska L, Ivannikov R 2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. *Acta Universitatis Latviensis, Biology* **676**: 159-162.

Clements MA, Ellyard RK. 1979. The symbiotic germination of Australian terrestrial orchids. *American Orchid Society Bulletin* **48**: 810-815.

Clements MA. 1987. Orchid-fungus-host associations of epiphytic orchids. In: Saito K, Tanaka R, eds. *Proceedings of the 12th World Orchid Conference*. Tokyo, Japan: 12th World Orchid Conference, 80-83.

Clements MA. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* **3**: 73-86.

Currah RS, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA. 1997. Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J, Pridgeon AM, eds. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VII*. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 117-170.

Goh CJ, Sim AA, Lim G. 1992. Mycorrhizal associations in some tropical orchids. *Lindleyana* **7**:13-17.

Hadley G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* **69**:1015-1023.

Halbinger F, Soto M. 1997. *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. In Hágsater E., M. Soto, E. Greenwood, R. L. Dressler, P.J. Crib, J. Rzedowski, P. M. Catling, CH. J. Sheviak, and F. Chiang, eds. *Laelias of México*. México City, México: *Orquídea*, 133–142

Johansen B, Rasmussen H. 1992. *Ex situ* conservations of orchids. *Opera Botanica* **113**: 43-48.

Kauth P. 2005. *In vitro* seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: Two Florida native terrestrial orchids. MSc,

Thesis. University of Florida. Florida, USA.

Knudson L. 1922. Non symbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* **73**: 1-25.

Kristiansen KA, Taylor DL, Kjøller R., Rasmussen HN, Rosendahl S. 2001. Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. *Molecular Ecology* **10**: 2089-2093.

Lesica P, Antibus RK. 1990. The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes of two Costa Rican rain forest. *Biotropica* **22**: 250-258.

Masuhara G, Katsuya K. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist* **127**: 711-718.

McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **145**: 523-537.

McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytologist* **154**: 233-247.

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

Otero JT, Ackerman JD, Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*- like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* **89**: 1852-1858.

Otero JT, Ackerman JD, Bayman P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology* **13**: 2393-2404.

Otero JT, Bayman P, Ackerman JD. 2005. Variation in mycorrhizal performance in the

epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology* **19**: 29-43.

Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, Fernández EA. 2005. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany* **83**: 54-65.

Peterson LR, Uetake Y, Zelmer C. 1998. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* **25**: 29-55

Rasmussen HN. 1995. *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Rasmussen HN. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* **244**: 149-163.

Rasmussen HN, Whigham DF. 1993. Seed ecology of dust seeds *in situ*: A new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany* **80**: 1374 –1378.

Rasmussen HN, Whigham DF. 1998. Importance of woody debris in seed germination of *Tripularia discolor* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 829 –834.

Richardson KA, Currah RS, Hambleton S. 1993. Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic Orchidaceae. *Lindleyana* **8**: 127-137.

Richardson KA, Currah RS. 1995. The fungal community associated with the roots of some rainforest epiphytes of Costa Rica. *Selbyana* **16**: 49-73.

Rivas M, Warner J, Bermúdez M. 1998. Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de Biología Tropical* **46**: 211-216.

Ruíz CR. 1997. Conocimiento ecológico y de cultivo para la conservación de algunas especies de orquídeas michoacanas. BSc thesis Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México

Salazar–Chávez GA. 1996. Conservation threats. In: IUCN/SSC Orchid Specialist Group, eds. *Orchids: Status Survey and Conservation Action Plan*. Cambridge, UK: IUCN, 6–10.

Shefferson RP, Weib M, Kull T, Taylor DL. 2005. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* 14: 613-626.

Selosse MA, Weiß M, Jany JL, Tillier A. 2002. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* 11: 1831-1844.

Smreciu EA, Currah RS. 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lyndleyana* 1: 6-15.

SPSS. 2003 . Statistical software package, version 12. SPSS. Chicago, Illinois, USA

Stenberg, ML, Kane ME. 1998. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid. *Lindleyana* 13: 101-112

Tan TK, Loon WS, Khor E, Loh CS. 1998. Infection of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds by mycorrhizal fungus. *Plant Cell Reports* 18: 14-19.

Taylor DL, Bruns TD. 1997. Independent, specialized invasion of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 5410-5415.

Taylor DL, Bruns TD. 1999. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertesiana*. *Molecular Ecology* 8: 1719-1732.

Taylor DL, Bruns TD, Szaro TM, Hodges SA. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany* 90: 1168-1179.

Tremblay RL, Zimmerman JK, Lebrón L, Bayman P, Sastre I, Axeirod F, García JA. 1998. Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican Orchid *Lepanthes caritensis*. *Biological Conservation* **85**: 297-304.

Withner CL. 1974. Developments in Orchid Physiology. In: Whithner CL, ed. *The Orchids Scientific Studies*. New York, USA: John Wiley & Sons, 129- 168.

Warcup JH. 1981. Orchid mycorrhizal fungi. In: Lawer L, Kerr R, eds. *Proceedings of the Orchid Symposium, 13 th International Botanical Congress*. Sidney, Australia: Orchid Society of New South Wales, 57-63.

Warcup JH. 1985. *Rhizanthella gardneri* (Orchidaceae), its Rhizoctonia endophyte and close association with *Melaleuca uncinata* (Myrtaceae) in western Australia. *New Phytologist* **99**: 273-280.

Yoder JA, Zettler LW, Stewart SL. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science* **156**: 145-150.

Zelmer CD, Cuthbertson L, Currah RS. 1996. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience* **37**: 439-448.

Zettler LW, McInnis TM. 1994. Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). *Plant Science* **102**: 133-138

Zettler LW, Hofer CJ. 1998. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany* **39**: 189-951.

Zettler LW, Burkhead JC, Marshall JA. 1999. Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* in vitro. *Lindleyana* **14**: 102-105.

Fig. 1. Stages of fungal colonization in *Laelia speciosa*. a) Stage 1: no colonization was present, b) Stage 2 : incipient colonization in suspensor (white arrows), c) Detail of suspensor with hyphae (black arrow), d) Stage 3: presence of pelotons (white arrows), e) Stage 4: pelotons with rhizoids (black arrow), f) Detail of rhizoids with colonization, g) Reproductive structure of fungus, like apotecio h) Pelotons in roots of more than one year old seedling grown *in vitro*, i) Fungi is transmitted through the placental tissue (black arrows).

Fig. 2. Stages of development of *Laelia speciosa*. a), b) and c): “protocorm 1” (seeds and circular protocorm inside of seed coat); d), e) and f): “protocorm 2” (outside of seed coat); g), h): “seedling 1” (with 1-2 leaves); i): “seedling 2” (more than 3 leaves).

Fig. 3. Scanning electron microscope image of endophytic fungi carried in the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (Notice a fungus with thin hyphae (black arrow), and another with wide hyphae (white arrow)).

Fig. 4. Fungal colonization affected by Benomyl and Tecto fungicides in *Laelia speciosa*. At 30 (a, c) and 90 (b, d) days. Incipient colonization (—○—); presence of pelotons (—●—); pelotons with rhizoids with colonization (—□—); dead (—■—). Significant differences were assessed for fungal colonization by the use of the Kruskal-Wallis test and to know differences between treatments the Mann-Whitney U test for 30 days, and for 90 days observation, through the General Lineal Model. To adjust the *P* value to reduce type I error the Holm’s sequence with the Bonferroni procedure was done to the non parametric U Mann Whitney test ($P < 0.005$)

Fig. 5. Fungal colonization (average of number of pelotons) in *Laelia speciosa* seeds growing *in vitro*, after application of Benomyl (a) and Tecto (b) fungicides at 30 (a, c) and 90 (b, d) days of sowing. Bars represent one standard error. Significant differences were assessed for means of pelotons by the use of Kruskal - Wallis test and Mann-Whitney *U* test ($P < 0.05$) and are indicated by different letters. Error bars represent one standard error.

Fig. 6. Development of *Laelia speciosa* affected by the concentration of Benomyl and Tecto fungicides at 30 (a, c) and 90 days (b, d). Stage 1 (—△—): protocorm inside the seed coat,

stage 2 (): protocorm outside of the seed coat, stage 3 (): seedling 1 (with 1-2 leaves), stage 4 (): seedling 2 (with more than 3 leaves) and ()dead protocorms.

Table 1. Populations of *Laelia speciosa* where capsules for this study were collected. *speciosa* in the central part of Mexico to evaluate the presence of fungi in seeds within capsules.

Population	Geographic localization	State	Altitude (m)	Capsules sampled
El Olvido	19° 37' 59" N, 101° 29' 09" W	Michoacán	2361	9
Indaparapeo	19° 43' 26" N, 101° 55' 19" W	Michoacán	2400	3
Caurio de Gpe.	19 56.688'N- 101 54.245'W	Michoacán	2350	1
Mazamitla	19° 58' 14" N, 102° 59' 35" W	Jalisco	2180	2
Bolaños	21° 53' 22" N, 103° 51' 36" W	Jalisco	2320	1
Xichú	21° 18' 49" N, 100° 05' 38" W	Guanajuato	1666	1

Table 2. Fungal colonization in seeds of *Laelia speciosa* with different maturity levels. Immature seeds of five months of development, intermediate seeds of seven months and mature seeds of 10 months of development.

Seeds	Without fungal	Initial fungal	Presence of pelotons	Parasitism	Mean of colonization (\pm SE)
Maturity levels	colonization (%)	colonization (%)	(%)	(%)	
Immature	17	80	3	0	1.86 \pm 0.043 ^a
Intermediate	0	84	16	0	2.16 \pm 0.037 ^a
Mature	0	27	48	24	2.95 \pm 0.074 ^a

Fig. 1

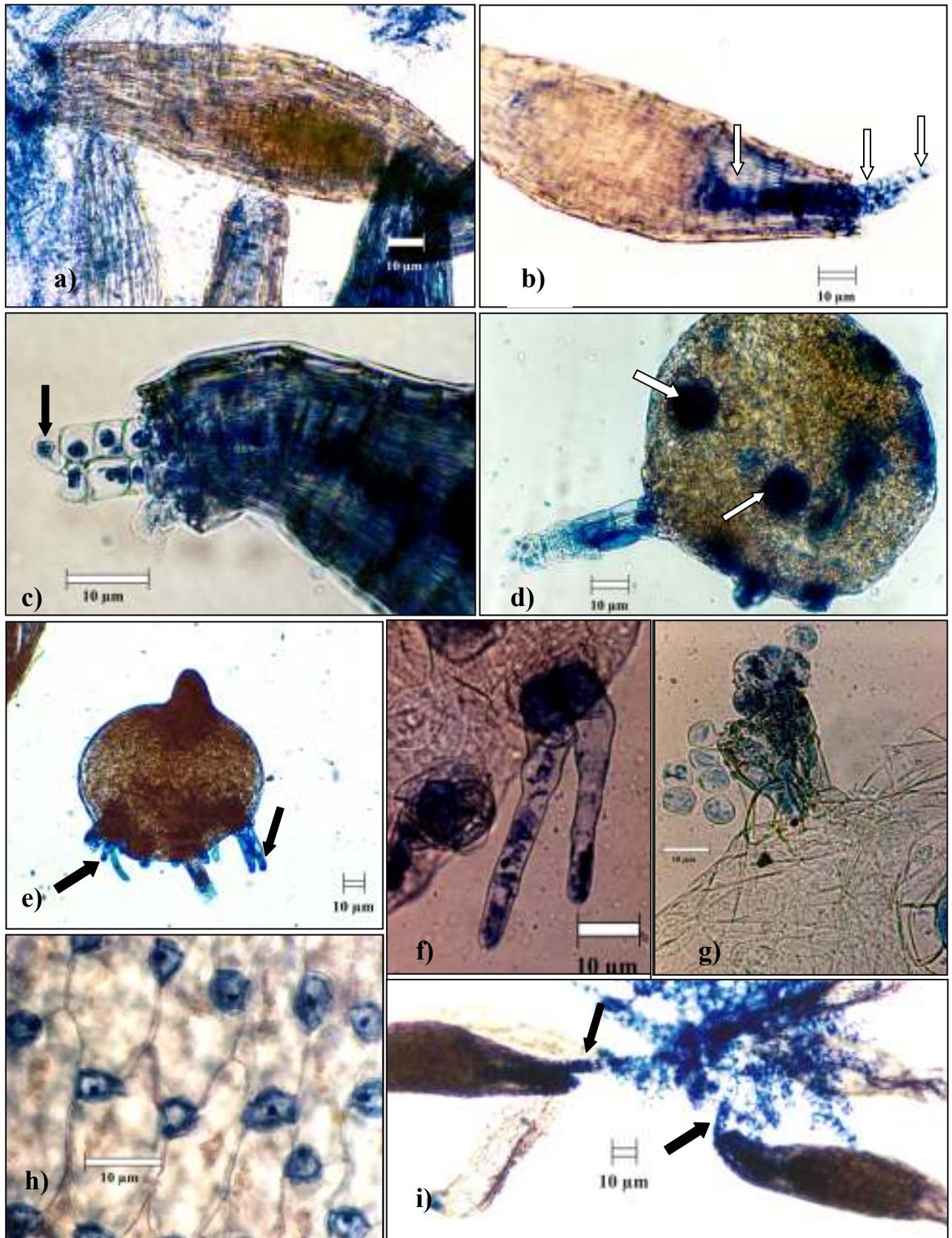


Fig. 2

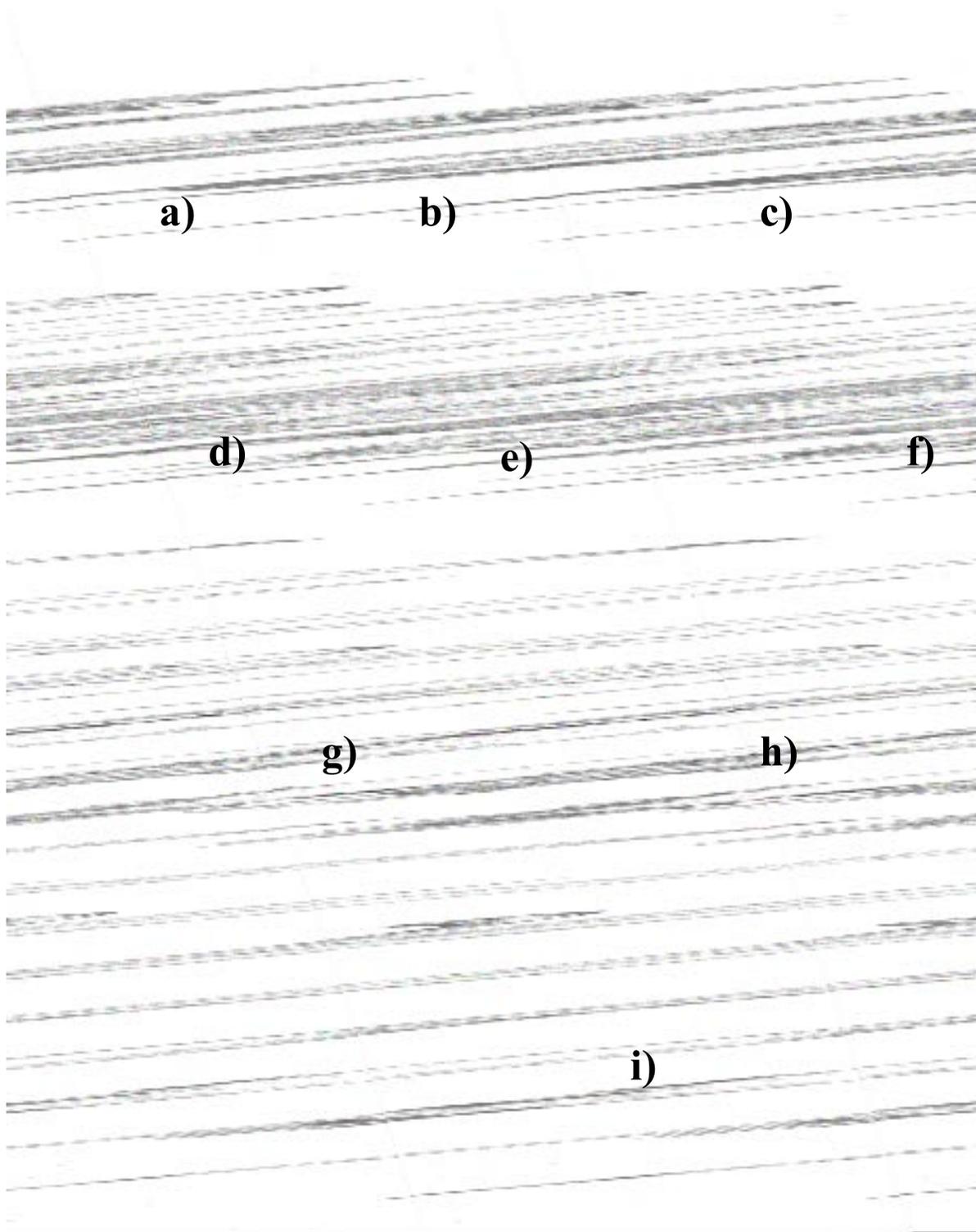


Fig. 3.

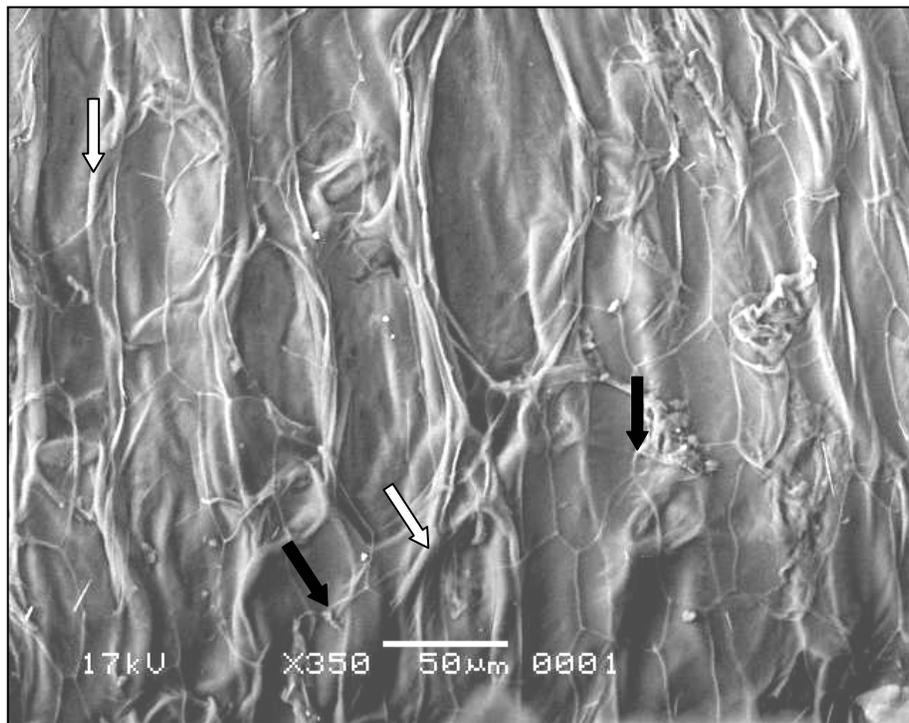


Fig. 4.

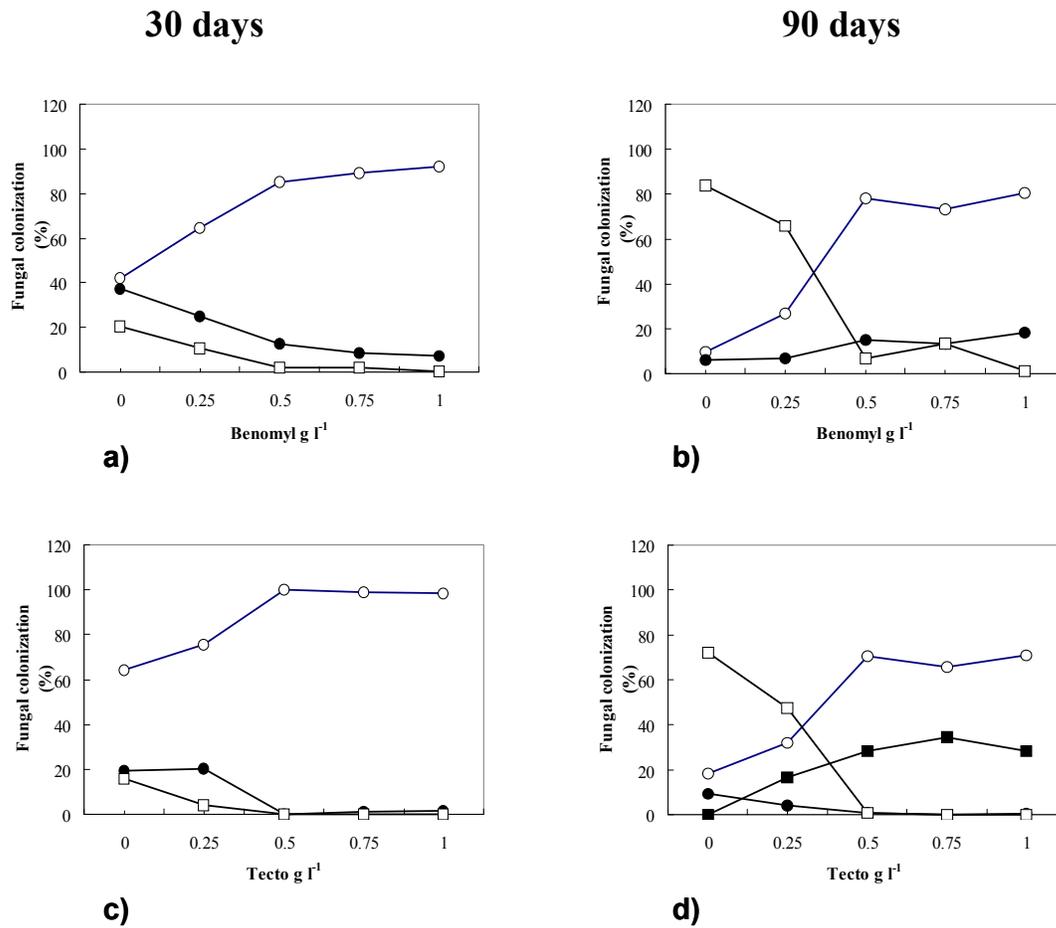


Fig. 5.

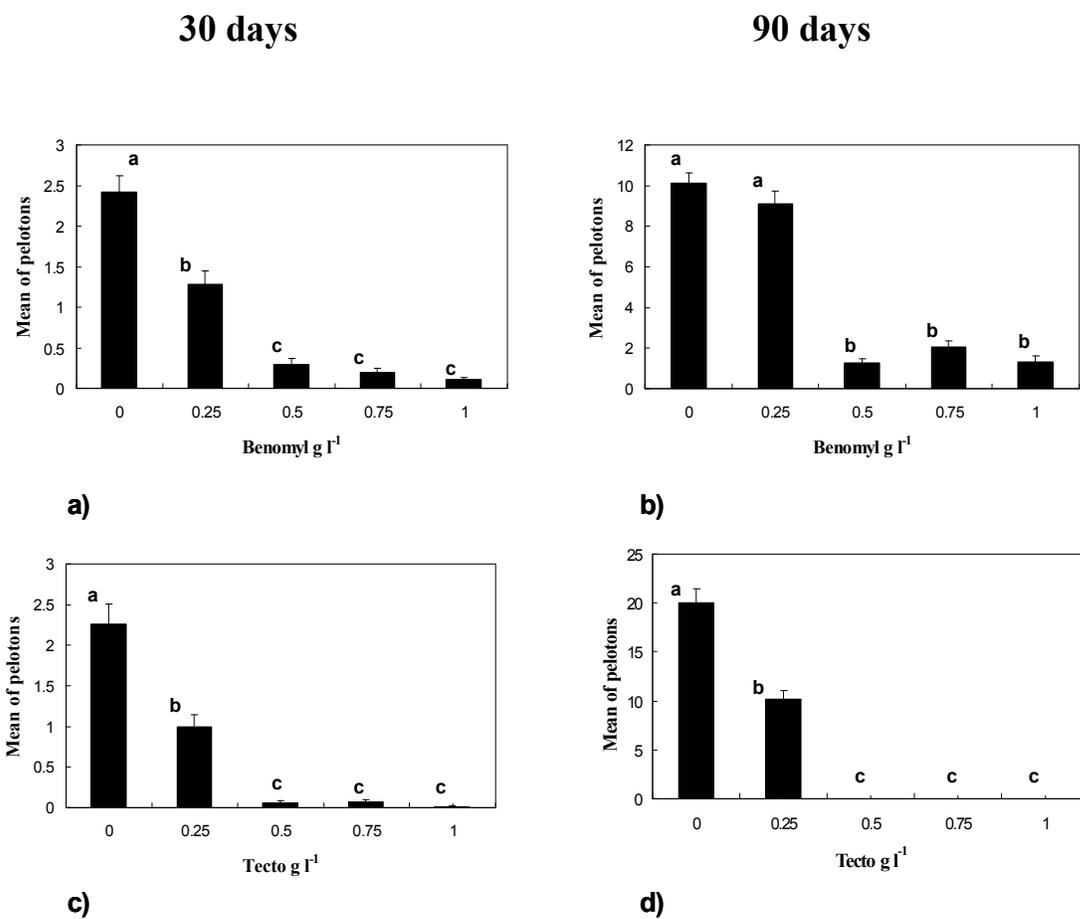
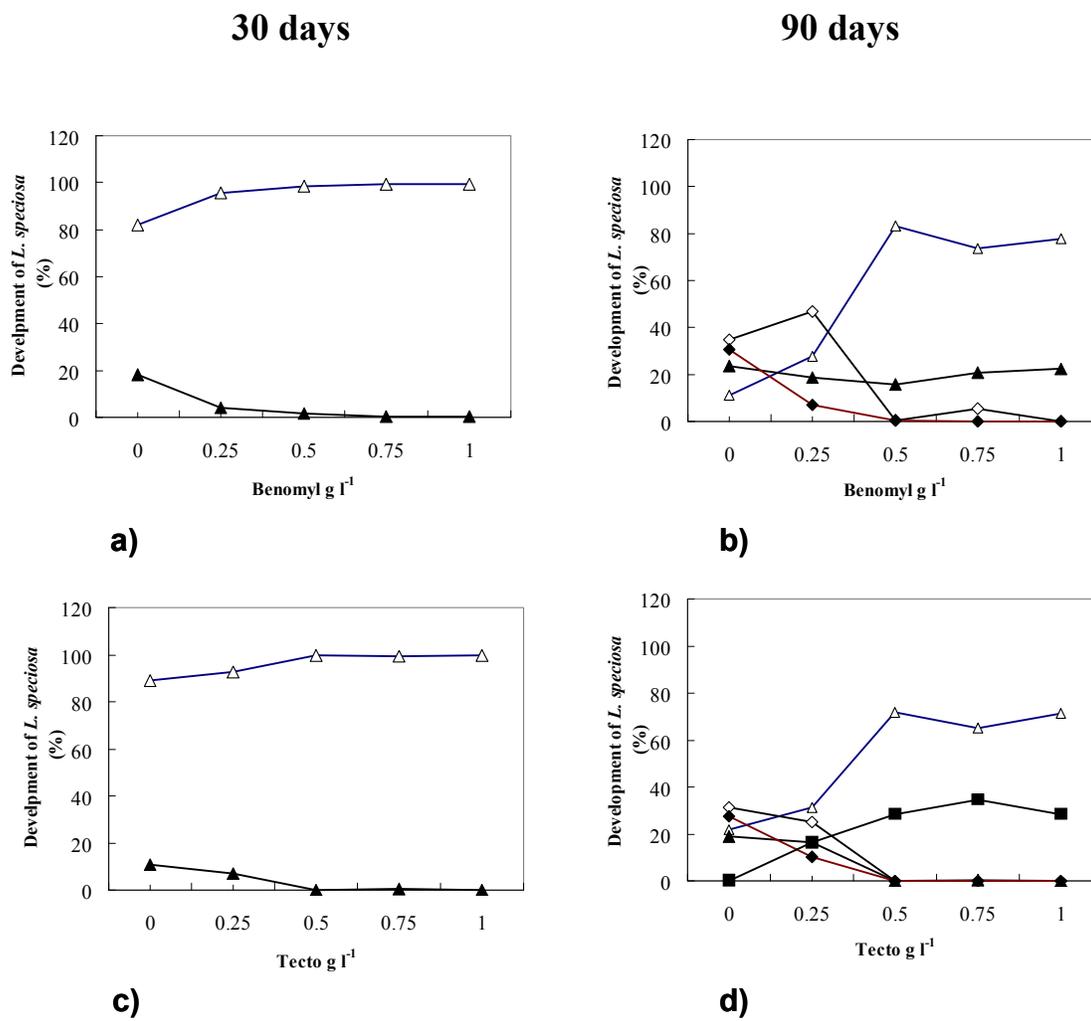


Fig. 6



DISCUSIÓN GENERAL

La vegetación del dosel tiene una gran importancia ecológica ya que los miembros de tales comunidades contribuyen a la dinámica de los ecosistemas en donde habitan (Lowman y Nadkarni, 1995). En lo particular, las epífitas vasculares influyen en sus ecosistemas en procesos como el ciclo de minerales y almacenamiento de nutrientes, en la contribución del mantenimiento de la diversidad de algunos bosques (Benzing, 1995).

Es de especial interés la variedad de adaptaciones morfológicas y fisiológicas que presentan las epífitas vasculares, lo que facilita su sobrevivencia en ambientes muy desfavorables. Los sustratos en donde crecen presentan severas restricciones al desarrollo de las poblaciones, ya que en general se trata de hábitats discontinuos, inestables y extremos, que seguramente han ejercido una presión particular en la evolución de las plantas con esta forma de vida (Benzing, 1995).

Laelia speciosa, el sistema de estudio del presente trabajo, es una orquídea epífita obligada, que puede tolerar periodos prolongados de severa sequía y condiciones ambientales muy desfavorables (Halbinger y Soto, 1997), considerándose una de las especies de orquídeas epífitas que pueden soportar temperaturas más extremas (Soto, com. per ; Ávila-Díaz obs. pers.).

Con la investigación realizada, en esta tesis al cumplir con el objetivo de evaluar la diversidad y estructura genética de poblaciones representativas de *Laelia speciosa* (HBK) Schlt, así como su sistema de apareamiento, éxito reproductivo, la germinación y su desarrollo *in vitro*; para proponer estrategias de manejo sustentable; se hicieron contribuciones importantes que permiten ampliar el conocimiento de la genética y ecología de las plantas epífitas.

En el capítulo 1, se presenta un marco conceptual de los siguientes, al revisarse literatura sobre las consecuencias genéticas del manejo en poblaciones de plantas. Se analizaron también conceptos básicos de factores genéticos relacionados con el manejo, los que determinan la variación y la estructura genética de las poblaciones, así como el efecto de la actividad humana en procesos ecológicos que influyen en la viabilidad de las poblaciones. Teóricamente la fragmentación y la extracción, disminuyen los tamaños poblacionales y pueden incluso ocasionar su extinción local, por lo que se disminuye el flujo de genes, incrementa la endogamia y la deriva génica, lo cual conlleva a una erosión de la variación genética. Muchos estudios empíricos, sin embargo no reportan consecuencias genéticas negativas en cuanto a heterocigosidad y polimorfismo en poblaciones degradadas, probablemente porque la pérdida de variación genética

es un proceso a largo plazo. En cambio, a corto plazo, se documentan los efectos negativos de las actividades antrópicas en los niveles de endogamia y adecuación en la progenie, así como también su efecto en procesos ecológicos como la polinización y el éxito reproductivo de las poblaciones remanentes.

La mayor parte de los estudios de genética de poblaciones en orquídeas se han enfocado a las especies terrestres, en contraste, las epífitas, a pesar de su gran diversidad e importancia ecológica, han recibido menos atención; lo que hace particularmente interesante el capítulo 2, acerca del estudio sobre la genética de la conservación de *L. speciosa*. Se reportan altos niveles de variación genética en poblaciones de *L. speciosa*, más altos que los reportados en monocotiledóneas; en especies herbáceas perennes de ciclo de vida largo; en plantas con amplio rango geográfico; en plantas con semillas dispersadas por viento; en plantas con reproducción sexual (Hamrick y Godt, 1990) y en especies de orquídeas terrestres. En contraste, se ha sugerido que especies epífitas obligadas podrían caracterizarse por tener bajos niveles de variación genética y altos de autogamia, para asegurar la producción de semillas (Benzing, 1978); sin embargo, los resultados aquí presentados están dentro de los pocos rangos reportados en otras especies de orquídeas epífitas y rupícolas, las cuales por lo general tienen alta diversidad genética y poca diferenciación entre sus poblaciones (Ackerman and Ward, 1999; Bush et al., 1999; Borba et al., 2001, Murren, 2003; Trapnell y Hamrick, 2004; Trapnell et al., 2004). Este patrón, se observa también en otras plantas epífitas comunes como bromelias (Soltis et al., 1987, González-Astorga et al., 2004), helechos (Ranker, 1992; Hooper y Haufler, 1997), y briofitas (Akiyama, 1994; Snäll et al., 2004). Se considera que una alta diversidad genética puede significar una ventaja adaptativa para las plantas epífitas que viven en hábitats discontinuos y extremos.

Es interesante que teniendo altos niveles de variación genética en *L. speciosa* se registran moderados niveles de endogamia, lo cual puede relacionarse con su sistema de apareamiento mixto, con la baja proporción de flores que producen frutos y con que solamente algunas plantas son exitosas en su reproducción en años consecutivos. Es sobresaliente para establecer estrategias de manejo, que hay una cierta estructuración genética (ya que las poblaciones localizadas en el mismo sistema montañoso-Sierra Madre Occidental, Eje Neovolcánico o Sierra Madre Oriental-son más similares genéticamente) y que se encuentran alelos privados y raros en diversas poblaciones.

Los resultados del capítulo 3 sobre el sistema de apareamiento y éxito reproductivo femenino de *L. speciosa*, indican que *L. speciosa* es predominantemente exógama en sus poblaciones naturales, lo cual se relaciona con los altos niveles de variación genética reportados (capítulo 2-Ávila y Oyama, 2007). Sin embargo, la autofertilización puede ser tolerada, sugiriendo que la autogamia y el apareamiento entre parientes es factible, lo que quizás explique los niveles moderados de endogamia ($f(F_{IS}) = 0.216$, 95% IC = 0.029-0.381) (Ávila-Díaz y Oyama, 2007). El sistema de reproducción mixto en *L. speciosa*, apoya la hipótesis de aseguramiento reproductivo, la cual establece que la combinación de ambos tipos de reproducción (autogamia y exogamia) en la misma especie, puede ofrecer una ventaja para asegurar la producción de progenie cuando es variable la disponibilidad de polinizadores y/o de parejas reproductivas (Vogler y Kalisz, 2001; Kalisz et al., 2004). En el caso de *L. speciosa* y otras orquídeas epífitas, su sistema mixto de reproducción, puede representar una ventaja adaptativa, ya que si no ocurre el exocruzamiento –aún con todas las características para que este ocurra– pueden tener la capacidad de aceptar su propio polen, para asegurar su reproducción aún con una limitación de polinizadores, o de parejas reproductivas en eventos de colonización.

La dependencia de polinizadores para la reproducción sexual de *L. speciosa* y los bajos valores de *fruit set* obtenidos en condiciones naturales, en comparación con los obtenidos en polinizaciones manuales –que indican una limitación de polinizadores– llaman la atención en el riesgo adicional en el que se encuentran *L. speciosa* y muchas otras especies de orquídeas epífitas, que viven en hábitats fuertemente perturbados por las actividades antropogénicas; ya que muy probablemente se han visto afectados sus polinizadores.

Para colaborar en la conservación de *L. speciosa*, se ha establecido un sistema óptimo de germinación y desarrollo de plántulas *in vitro*, el cual se presenta en el capítulo 4. Se muestra que la benciladenina (BA) a bajas concentraciones promueve la germinación, como ha sido reportado en otras especies de orquídeas (Stewart y Kane, 2006). Se muestra también que este fitorregulador inhibe etapas posteriores del desarrollo *in vitro* de *L. speciosa*, ya que la formación de plántulas se observó disminuida significativamente aún en bajas concentraciones. Es interesante resaltar la respuesta diferencial en cuanto a la luz en cápsulas con diferente madurez, observándose que semillas maduras se desarrollan mejor con luz. Esta característica de las semillas fue un factor con gran relevancia en la germinación de *L. speciosa*, ya que las maduras germinan y se desarrollan mejor en un tiempo más corto, que las de madurez intermedia e inmaduras, lo cual contrasta con lo reportado en la literatura en otras especies de los géneros *Laelia* y *Cattleya* (Pierik, 1990; Buyun et al., 2004; Sauleda, com. pers.). Para fines de

conservación, el determinar los medios óptimos de germinación y de desarrollo de plántulas *in vitro* de *L. speciosa*, aptas para ser aclimatadas en invernadero, se considera fundamental para haber logrado el establecimiento de un sistema óptimo de propagación a partir de semillas. Se considera de gran utilidad el obtener PLBs y callo como alternativas de reproducción asexual para propagar plantas con características específicas, que tienen un interés comercial.

En el capítulo 5, se dio a conocer la presencia de hongos endófitos en las semillas de *L. speciosa*, así como su relación simbiote. Las observaciones realizadas en una amplia gama de semillas de diferente madurez, de semillas provenientes de poblaciones naturales distantes, y de plántulas cultivadas *in vitro*, indican que tales hongos están siempre presentes en la orquídea. Es sobresaliente la existencia de un patrón en cuanto a la morfología y disposición de los pelotones de tales hongos, sugiriéndose una especificidad entre *L. speciosa* y sus endófitos, sin embargo para su determinación se considera útil llevar a cabo su caracterización molecular.

Con el experimento implementado de fungicidas, es muy clara la inhibición tanto del desarrollo de los hongos como de *L. speciosa*, por lo que se concluye su relación simbiote, e importante papel de estos organismos en la germinación y establecimiento de la orquídea estudiada. La presencia de hongos endófitos en plántulas cultivadas *in vitro* de otras especies de orquídeas epífitas, sugiere que aquellos pueden conferirles importantes ventajas ecológicas para la germinación y establecimiento en esos hábitats tan extremos.

En la literatura se reporta que las semillas de las orquídeas están libres de hongos endófitos (Warcup, 1981; Warcup, 1985), y que el contacto inicial entre los hongos micorrícicos y las semillas de orquídeas, es fortuita y azarosa (Clements, 1988). En este trabajo se describe por primera vez la existencia de hongos endófitos en las semillas de la familia Orchidaceae.

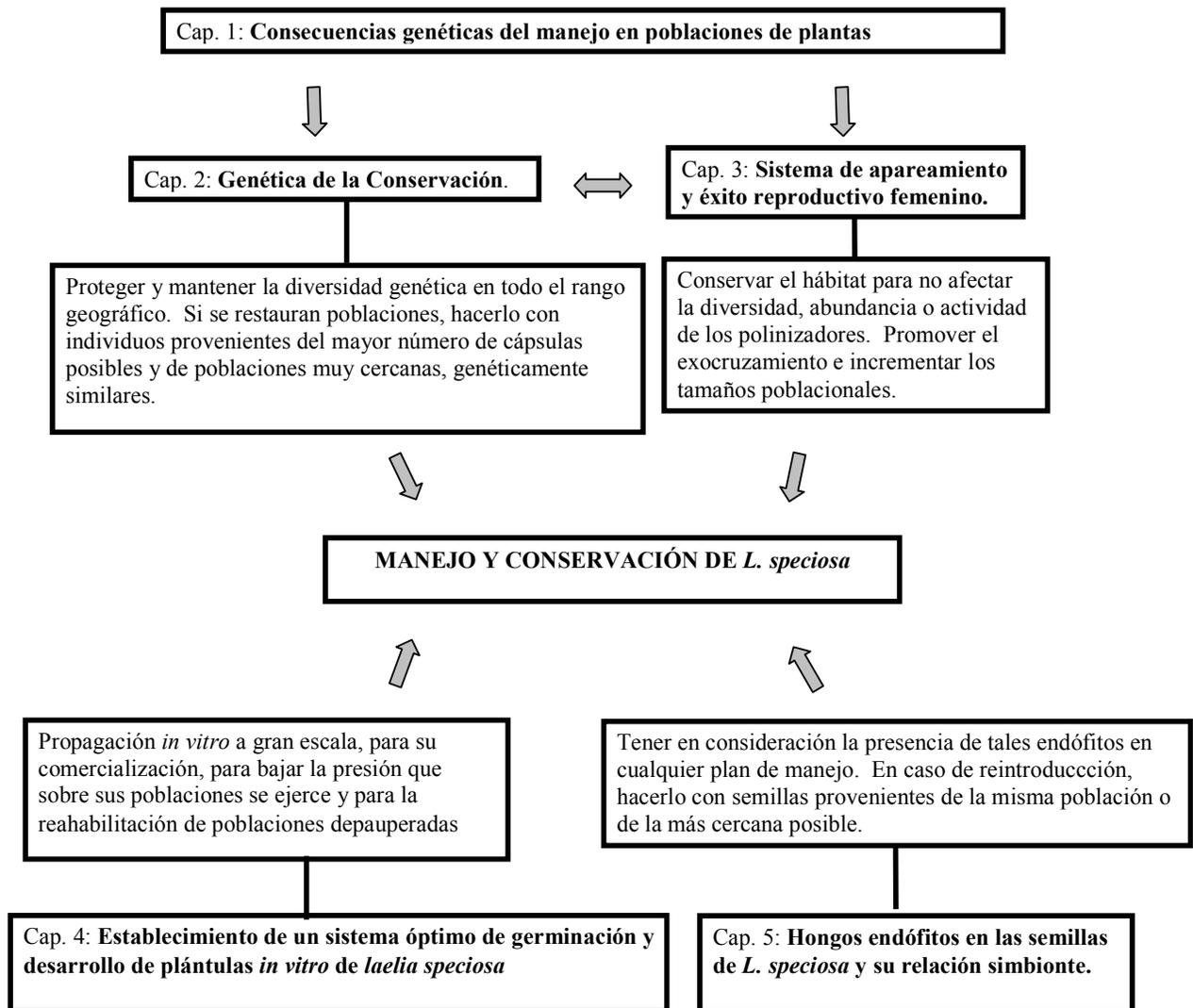
Además de las contribuciones mencionadas al conocimiento de la genética y ecología de *L. speciosa*, se considera útil este trabajo por las innovaciones metodológicas realizadas.

Implicaciones para la Conservación de Laelia speciosa

La interrelación de los capítulos de esta tesis y principales implicaciones de cada uno de ellos para el manejo y la conservación de *L. speciosa*, se muestran en la Fig. 1.

Además de las propuestas hechas en base a la investigación aquí realizada, finalmente quiero enfatizar que es importante continuar con la investigación multidisciplinaria que permita sentar las bases para colaborar a un manejo sustentable de *L. speciosa* y otras especies de orquídeas

mexicanas, así como llevar a cabo acciones inmediatas para la conservación del hábitat y de sus poblaciones *in situ*.



REFERENCIAS GENERALES

- ACKERMAN, J. D., Y S. WARD. 1999. Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? *Systematic Botany* 24: 282–291.
- AKIYAMA, H. 1994. Allozyme variability within and among populations of the epiphytic moss *Leucodon* (Leucodontaceae: Musci). *American Journal of Botany* 81: 1280–1287.
- ÁVILA, D. I. 1996. Orquídeas Michoacanas. *Internet*. <http://www.ccu.unimich.mx>
- ÁVILA-DÍAZ, I, Y K. OYAMA. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94: 184-193.
- BENZING, D. H. 1978. The life history of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae) and the rarity of extreme epiphytism among the angiosperms. *Selbyana* 2: 325–327.
- BENZING, D. H. 1995. Vascular Epiphytes. *En*: Lowman M. D. y Nadkarni N.M. [eds.]. Forest Canopies. Academic Press. San Diego. 225-254.
- BORBA, E. L., J. M. FELIX, V. N. SOLFERINI, Y J. SEMIR. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419–428.
- BUSH, S. P., W. E. KUTZ, Y J. M. ANDERTON. 1999. RAPD variation in temperate populations of the epiphytic orchid *Epidendrum conopseum* and the epiphytic fern *Pleopeltis polypodioides*. *Selbyana* 20: 120–124.
- BUYUN, L., A. LAVRENTYEVA, L. KOVALSKA, Y R. IVANNIKOV. 2004. *In vitro* germination of seeds of some rare tropical orchids. *Acta Universitatis Latviensis, Biology* 676: 159-162.
- CIBRIÁN, A. 1999 Variación genética de *Vanilla planifolia* en México. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 60.
- CLEMENTS, M. A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3: 73-86.

- DRESSLER, R. L. 1990. The Orchids. Natural History and Classification. Harvard University Press. London. 332.
- ELLSTRAND, N Y ELAM, D. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. . *Annual Review of Ecology and Systematics*. 24: 217-42.
- FRANKHAM, R. 1995. Conservation Genetics. *Annual Review in Genetics* 29: 305-327.
- GONZÁLEZ–ASTORGA, J. , A. CRUZ-ANGÓN, A. FLORES–PALACIOS, Y A. P. VOVIDES. 2004. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 94: 545–551.
- HÁGSATER, E., M. Á. SOTO ARENAS, G. A. SALAZAR CHÁVEZ, R. JIMENEZ MACHORRO, M. A. LÓPEZ ROSAS, Y R. L. DRESSLER. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.
- HALBINGER F, SOTO M. 1997. Laelias of México. *Orquídea (Méx)* 15: 135-139.
- HAMRICK, J.L. Y GODT, M.W. 1990. Allozyme diversity in plant species. En: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir B.S. [eds]. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates, E.U.A.
- HERNÁNDEZ, A. M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 138.
- HOOPER, E. A., Y CH. H. HAUFLER, 1997. Genetic diversity and breeding system in a group of neotropical epiphytic ferns (*Pleopeltis*; Polypodiaceae). *American Journal of Botany* 84: 1664–1674.
- KALISZ, S., D. W. VOGLER, Y K. M. HANLEY. 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430: 884–887.
- LOWMAN M. D., Y N. M. NADKARNI. 1995. Forest Canopies. Academic Press. San Diego. USA.

- MASERA, O. R., M. J. ORDOÑEZ Y R. DIRZO. 1997. Carbon emissions from Mexican Forests: current situation and long-term scenarios. *Climatic Change* 35: 265-295.
- MIRANDA, F. 1997. Sobrevivencia de artesanías prehispánicas. En: Manos Michoacanas. Colegio de Michoacán, México. 35-48.
- MURREN, C. J. 2003. Spatial and demographic population genetic structure in *Catasetum viridiflavum* across a human-disturbed habitat. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 333-342.
- PÉREZ-PÉREZ M. A. 2003. Demografía de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr.(Orchidaceae) bajo diferentes condiciones de manejo en la zona centro-norte del estado de Michoacán. Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
- PÉREZ, N., N. Y PIÑERO D. 1997. Isoenzimas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 77-84.
- PIERIK, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- RANKER, T. A. 1992. Genetic diversity of endemic Hawaiian epiphytic ferns: implications for conservation. *Selbyana* 13: 131-137.
- RAVEN, P. 1987. The scope of the plant conservation problem world-wide. En: Bramwell, D., Hamann, O, Heywood, V. y Synge, H. [eds.]. Botanic Gardens and the World Conservation Strategy. Academic Press. London, UK. 19- 29.
- RZEDOWSKI, J. 1991 Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14: 3-12
- SALAZAR-CHÁVEZ, G. A. 1996. Conservation threats. En: IUCN/SSC Orchid Specialist Group, Orchids: Status Survey and Conservation Action Plan, 6 -10. IUCN, Cambridge, UK.
- SCHEMSKE, D., HUSBAND, B., RUCKELSHAUS, M., GOODWILLIE, C., PARKER I. Y J. BISHOP, I. 1994 Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants . *Ecology* 75: 584- 606

- SNÄLL, T., J. FOGELQVIST, P. J. RIBEIRO, AND M. LASCoux. 2004. Spatial genetic structure in two congeneric epiphytes with different dispersal strategies analysed by three different methods. *Molecular Ecology* 13: 2109–2119
- SOLTIS, D. E., A. J. GILMARTIN, L. RIESEBERG, AND S. GARDNER. 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 74: 531–537.
- STEWART S. L. Y M. E. KANE. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 147-158.
- SOULÉ, M. 1986 Conservation biology: The science of scarcity and diversity. Sinauer. Sunderland, Massachusetts.
- TOLEDO, V. 1988. La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo. México 81: 17-30.
- TRAPNELL, D. W., AND J. L. HAMRICK. 2004. Partitioning nuclear and chloroplast variation at multiple spatial scales in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 2655–2666.
- TRAPNELL, D. W., J. L. HAMRICK, AND J. D. NASON. 2004. Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 1111–1118.
- VOGLER, D. W., Y S. CÁLIZ. 2001. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution* 55: 202–204.
- VOVIDES, A. 1995. Experiencias y avances en el conocimiento de las plantas mexicanas en peligro de extinción. En : Linares, E. et al. [eds.]. Conservación de las plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques. UNAM. 139-144
- WONG, K. C., AND SUN, M. 1999. Reproductive Biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 86: 1406–1413.
- WARCUP, J. H. 1981. Orchid mycorrhizal fungi. En: Lawer L, Kerr R, eds. *Proceedings*

of the Orchid Symposium, 13 th International Botanical Congress. Sidney, Australia: Orchid Society of New South Wales, 57-63.

WARCUP, J. H. 1985. *Rhizanthella gardneri* (Orchidaceae), its Rhizoctonia endophyte and close association with *Melaleuca uncinata* (Myrtaceae) in western Australia. *New Phytologist* 99: 273-280.