



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
AGRÍCOLA**

**MICROPROPAGACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
DOS POBLACIONES SILVESTRES DE *Laelia gouldiana* Rchb. f.**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

ALEJANDRA VILLAFUERTE SALAZAR

Bajo la supervisión de: Dra. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA



Chapingo, Estado de México, junio de 2022

**MICROPROPAGACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS
POBLACIONES SILVESTRES DE *Laelia gouldiana* Rchb. f.**

Tesis realizada por **ALEJANDRA VILLAFUERTE SALAZAR**, bajo la dirección
del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

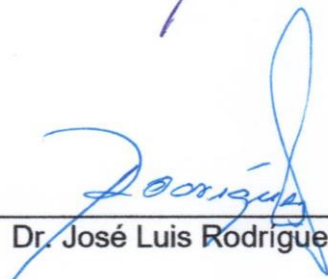
DIRECTORA:


PhD. Margarita Gisela Peña Ortega

ASESOR:


Dr. Juan Martínez Solís

ASESOR:


Dr. José Luis Rodríguez de la O

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS.....	x
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xi
RESUMEN GENERAL.....	xii
GENERAL ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Familia <i>Orchidaceae</i>	4
2.2. <i>Laelia gouldiana</i> Rchb. f	6
2.3. Biología de la conservación	7
2.4. Marcadores moleculares.....	8
2.5. ISSR y orquídeas.....	8
2.6. Agrupamiento de genotipos	9
2.7. Literatura citada	10
3. PRUEBAS DE VIABILIDAD Y GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>Laelia gouldiana</i> Rchb. f ¹	18
3.1. Resumen	18
3.2 Abstract	19
3.3. Introducción	20
3.4. Materiales y Métodos.....	22
3.4.1. Especie y área de estudio.....	22

3.4.2. Recopilación de datos.....	23
3.4.3. Prueba de viabilidad	24
3.4.4. Germinación <i>in vitro</i>	24
3.5. Resultados y discusión	25
3.5.1. Cosecha de frutos.....	25
3.5.2. Porcentaje de viabilidad	28
3.5.3. Característica de las semillas de <i>Laelia gouldiana</i>	31
3.5.4. Germinación <i>in vitro</i>	31
3.6. Conclusiones	34
3.7. Literatura citada	34
4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE <i>Laelia gouldiana</i> Rchb. f. ¹	38
4.1. Resumen	38
4.2 Abstract	39
4.3. Introducción	40
4.4. Materiales y métodos	42
4.4.1. Sitio experimental	42
4.4.2. Genotipos utilizados.....	42
4.4.3. Extracción de ADN	42
4.4.4. Cuantificación de la pureza y calidad del ADN.....	44
4.4.5. PCR condiciones de amplificación y separación de fragmentos	44
4.4.6. Análisis de geles.....	44
4.4.7. Análisis estadístico	47
4.5. Resultados y discusión	47
4.5.1. Análisis de agrupamiento.....	47
4.5.2. Análisis molecular de varianza (AMOVA).....	50
4.5.3. Descriptiva de marcadores	51
4.5.4. Índice de diversidad de Shannon-Weaver.....	54

4.6. Conclusiones	55
4.7. Agradecimientos	55
4.8. Literatura citada	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Laelia gouldiana</i> Rchb. f	6
Cuadro 2. Conteo de semillas de <i>Laelia gouldiana</i> provenientes de la Barranca de Metztitlán para obtener el porcentaje de viabilidad.	29
Cuadro 3. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular de <i>Laelia gouldiana</i>	45
Cuadro 4. Colectas de <i>Laelia gouldiana</i> provenientes de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo.	46
Cuadro 5. Análisis molecular de varianza (AMOVA) en muestras poblacionales y cultivares de <i>Laelia gouldiana</i> provenientes de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo.	50
Cuadro 6. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización de la divergencia genética de 44 genotipos de <i>Laelia gouldiana</i>	52
Cuadro 7. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en muestras poblacionales y cultivares de <i>Laelia gouldiana</i> provenientes de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Laelia gouldiana in situ</i> , Hidalgo; Ejemplar reproductivamente maduro creciendo junto a <i>Tillandsia juncea</i> sobre mezquite (<i>Prosopis sp.</i>).	23
Figura 2. Formación de frutos de <i>Laelia gouldiana</i> . (A) Inflorescencias de <i>L. gouldiana</i> posteriores a la polinización manual <i>in situ</i> . (B) <i>Laelia gouldiana in situ</i> con formación de fruto. (C) Fruto formado de la polinización natural. (D, E y F) Frutos obtenidos de la polinización asistida	26
Figura 3. Semillas de <i>Laelia gouldiana</i> . A) Semillas vanas (sin formación de embrión). B) Semillas con (teñidas de rojo carmín) y sin embrión. C) Semillas con embriones variables.	30
Figura 4. Etapas de desarrollo de la germinación de <i>Laelia gouldiana</i> . A) Protocormos de <i>Laelia gouldiana</i> a 45 días después de la germinación (ddg). B) Protocormo completamente clorofílico a 80 ddg, C) Protocormo con diferenciación del meristemo apical y presencia de rizoides en la base a 160 ddg, D) Plántula de <i>Laelia gouldiana</i> con la presencia de hojas en la parte apical y raíces en la parte basal a 280 ddg y E) Formación de brotes de <i>Laelia gouldiana</i> a 365 ddg.	32
Figura 5. Extracción de ADN de tejido de hoja en genotipos de <i>Laelia gouldiana</i> . A) Muestras de hojas colectadas en la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo. B) Secciones de hoja de <i>Laelia gouldiana</i> . C) Tejido de hoja pulverizada de <i>Laelia gouldiana</i> para la extracción de ADN.	43
Figura 6. Dendrograma jerárquico derivado de distancias genéticas de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) y algoritmo de mínima varianza de Ward para dos muestras poblacionales <i>in situ</i> y cultivares de <i>Laelia gouldiana</i>	48

Figura 7. Huellas genómicas de <i>Laelia gouldiana</i> Rchb. f. (<i>Orchidaceae</i>) obtenidas mediante el uso de iniciadores ISSR. A) iniciador ISSR 1 y B) iniciador ISSR 2.....	53
--	----

DEDICATORIA

A mis padres Ignacio Villafuerte Altamirano y Ma. Teresa Salazar Cervantes, quienes me han demostrado con su ejemplo que el amor existe y que todo lo que podemos soñar lo podemos materializar con trabajo, disciplina y dedicación.

A ti Oswaldo que has sido mi compañero de vida y con quién he formado una hermosa familia. ¡Gracias por tanto y por todo, por el apoyo incondicional, por estar para mí en los momentos más cruciales e importantes y, sobre todo, gracias por el amor hacia nosotros, tu familia!

A mis preciosos hijos Rahmses y Emiliano con mucho amor les dedico este trabajo. Gracias por regalarme grandes momentos de felicidad y darme las fuerzas y el aliento para ser mejor persona y ser humano. ¡Los amo con todo mi ser!

A mis hermanos Carlos, Guadalupe (Lupita) y Laura por su apoyo incondicional en el día a día, por estar presentes cuando más los he necesitado ¡Gracias!

A mis amigos de toda la vida, pero muy particularmente a Emmanuel, Isaías Gil y a Elid con quienes he compartido grandes momentos y aventuras desde que coincidimos en este apasionante mundo de las orquídeas. Gracias por confiar en mí, por demostrarme que las amistades se pueden construir en cualquier momento y perdurar a pesar del tiempo y la distancia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura, por mi formación como Maestra en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Gracias por los conocimientos adquiridos y por el apoyo económico para realizar esta investigación.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por ser una excelente docente, mi admiración y respeto. Gracias por compartir con amor y pasión sus conocimientos a quienes tuvimos el honor de tenerla como docente y directora de tesis.

Al Dr. Juan Martínez Solís por su apoyo y su calidez humana desde el primer momento que lo conocí. ¡Gracias por su mano amiga, por sus consejos y conocimientos que suman en mi vida académica!

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O, gracias por contribuir en mi formación académica, por apoyarme desde el primer momento como estudiante y colega, además de enriquecer esta investigación con sus valiosas aportaciones.

A Emmanuel Méndez y Héctor Elid Eslava Orduña, quiénes han estado presentes desde el inicio y el término de esta investigación. Gracias por la confianza para desarrollar este proyecto.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Alejandra Villafuerte Salazar.

Fecha de nacimiento: 20 de julio de 1989.

Lugar de nacimiento: Texcoco, Estado de México.

CURP: VISA890720MMCLLA42

Profesión: Licenciada en Biología.

Cédula Profesional: 8131624.



Desarrollo académico

Bachillerato 2005 – 2009 Colegio de Ciencias y Humanidades (CCH), Vallejo.

Licenciatura 2008 – 2012 Facultad de Ciencias, UNAM.

Maestría 2020 – 2021 Depto. de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

MICROPROPAGACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE *Laelia gouldiana* Rchb. f.¹

RESUMEN GENERAL

Laelia gouldiana representa el único caso de una especie de orquídea extinta en su hábitat natural y que se conserva gracias al cultivo *ex situ* en la Reserva de la Biósfera de la Barranca de Metztitlán (RBBM), Hidalgo, México. Se ha observado que estos ejemplares presentan una mínima o nula producción de frutos; los cuales presentan semillas infértiles por lo que se sospecha un problema genético por endogamia, sin embargo, con el descubrimiento de dos poblaciones *in situ* la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la viabilidad de las semillas de 4 frutos y la caracterización molecular de genotipos muestreados de ambas poblaciones, mediante el uso de marcadores ISSR, con el fin de determinar el grado de variabilidad. De las 4 cápsulas evaluadas, sólo una presentó semillas con embriones viables y se reportó un porcentaje de viabilidad del 2.15 % con la prueba de cloruro de tetrazolio y el potencial de germinación fue 2.46 %. En lo referente a la caracterización molecular, mediante el empleo de 28 iniciadores ISSR se analizaron 48 genotipos y se obtuvieron 150 productos amplificados, de los cuales 126 permitieron diferenciar genotipos con 58 % de polimorfismo. El análisis de agrupamiento permitió generar tres grupos y la mayor variabilidad genética (94.44 %) se presentó al interior de las muestras poblacionales. Finalmente, el índice de diversidad de Shannon-Weaver estimado fue de 4.71. Este es el primer estudio que reporta viabilidad en las semillas y realiza un análisis exploratorio sobre la diversidad genética de *L. gouldiana*.

Palabras clave: Germinación *in vitro*, ISSR, orquídea endémica, variabilidad, viabilidad.

¹Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autora: Alejandra Villafuerte Salazar
Directora de tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

MICROPROPAGATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TWO POPULATIONS OF *Laelia gouldiana* RCHB. f. ¹

GENERAL ABSTRACT

Laelia gouldiana represents the only known case of an orchid species that is extinct in its natural habitat and has survived due to *ex situ* cultivation at “Reserva de la Biosfera de la Barranca de Metztitlán” (RBBM), Hidalgo, Mexico. It has been observed that these plants have minimal or no fruit production containing nonviable seed; which might be a genetic problem due to inbreeding. The present research aimed to evaluate seed viability of four fruits obtained by artificial crossing, and the molecular characterization of genotypes sampled from both populations by using ISSR markers to determine their genetic variability. From the four capsules evaluated, only one had viable seed with a viability percentage of 2.15 % according to the tetrazolium chloride test, and the germination potential was 2.46 %. Regarding molecular characterization, 48 genotypes were analyzed by using 28 ISSR primers and resulted in 150 amplified products, out of them 126 allowed to differentiate genotypes with a percentage of polymorphism of 58 %. The Cluster Analysis generated three groups and the greatest genetic variability (94.44 %) was found within the population samples. Finally, the estimated Shannon-Weaver diversity index was 4.71. This is the first study that reports seed viability and provides an exploratory analysis of the genetic diversity of *L. gouldiana*.

Key words: Endemic orchid, *in vitro* germination, ISSR, variability, viability.

¹ Master of Science in Biotechnology Thesis, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Alejandra Villafuerte Salazar
Advisor: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

A pesar de los importantes avances en la comprensión de la ecología y biología en orquídeas, amenazas socioambientales como el cambio climático, la deforestación, incendios, construcción de carreteras, expansión de plantaciones forestales y agricultura, así como recolección excesiva para el comercio de plantas ornamentales, medicinales y alimenticias, han afectando drásticamente la supervivencia de las orquídeas (Jersáková et al., 2016; Leal et al., 2016; Phillips et al., 2016; Davies y Stpiczýnska, 2017). De acuerdo con la lista roja de la UICN, sólo se han realizado evaluaciones de 948 (3.3 %), de las 28,484 especies de orquídeas estimadas en todo el mundo (Govaerts et al., 2017), sin embargo, más de la mitad (56.5 %) se encuentran en diferentes categorías de extinción (IUCN, 2017) y en diversas especies se han producido cuellos de botella demográficos asociados con la interrupción de procesos ecológicos clave como el flujo de genes, la polinización exitosa y con ello el reclutamiento de plántulas. El uso de protocolos *in vitro* se ha previsto como un enfoque exitoso para el aprovechamiento sustentable, la conservación *ex situ* y reintroducción de orquídeas en peligro de extinción (Stenberg & Kane, 1998; Decruse et al. 2003; Sarasan et al., 2006). Las plantas generadas a partir de semillas tienen mayor variabilidad genética que las desarrolladas por métodos de propagación clonal, por lo tanto, cumplen mejor los objetivos de un programa de reintroducción, en el sentido de garantizar suficientes recursos genéticos en la población a reintroducir para someterse a adaptaciones y cambios evolutivos (Guerrant & Kaye 2007). Una ventaja adicional de la propagación masiva de orquídeas con fines de conservación es que al aumentar la disponibilidad de plantas de especies prioritarias y con el empleo de normas fitosanitarias adecuadas y precios asequibles se reduciría la recolecta ilegal de poblaciones en la naturaleza (Ramsay & Dixon 2003, Mata & Salazar, 2003).

Para asegurar una propagación exitosa resulta imprescindible evaluar los porcentajes de viabilidad de las semillas (Gantait & Mitra, 2019; Cardoso et al., 2020; Dolce et al., 2020; Pujasatria et al., 2020). Algunas de las herramientas

comúnmente utilizadas son la tinción con cloruro de trifenil tetrazolio (CTT) y la tinción con diacetato de fluoresceína (DF) (Vujanovic et al., 2000), de las cuales la primera es la más reconocida por la International Seed Testing Association y ha sido ampliamente utilizada en orquídeas epífitas tropicales, terrestres de Europa y de América del Norte (Singh, 1981).

El desarrollo de métodos de germinación asimbiótica, es decir sin inoculación fúngica de semillas, se produjo en orquídeas siguiendo la formulación del medio Knudson B y C (Knudson, 1922; 1946). A partir de entonces se han desarrollado otros medios de cultivo con fuentes de carbono variadas para la germinación de orquídeas como el medio Vacin and Went (VW; Vacin & Went, 1949), Murashige y Skoog (MS; Murashige & Skoog, 1962), medio Mitra (M; Mitra et al., 1976), etc, así los resultados obtenidos en la germinación y desarrollo de las plántulas dependerán de los medios de cultivo empleados y de la especie, lo que sugiere diferencias en los requerimientos de nutrientes. Este método ha sido empleado con éxito para la propagación y reintroducción de especies en alguna categoría de riesgo como lo es *Bletia urbana* (Rubluo et al., 1989), *Ipsea malabarica* (Gangaprasad et al., 1999) y *Spiranthes brevilabris* (Steward et al., 2003).

Otra herramienta importante para la conservación de especies es el uso de marcadores morfológicos o moleculares, siendo estos últimos determinantes en evaluación de la diversidad genética intra e interpoblacional, obtención de huellas genómicas de ADN además de identificar cultivares, derechos de variedades de plantas, confirmación de híbridos, mapeo de genomas, etiquetado de genes para selección asistida, clonación basada en mapas y análisis filogenéticos que pueden explorarse de forma rápida, precisa y eficiente (González-Aguilera et al., 2011).

En el caso particular de la familia *Orchidaceae*, se han utilizado marcadores moleculares tipo RAPD (Sun & Wong, 2001), AFLP (Yu et al., 2004), ISSR y SDS-PAGE para evaluar los niveles de diversidad y autenticación de poblaciones silvestres a nivel genérico, sub-genérico o específico para detección de híbridos (Smith et al., 2002; Ding et al., 2005; Goh et al., 2005; Shen et al., 2005; Shen et al., 2006; Shen et al., 2011; Wang et al., 2009; Yue et al., 2006). Entre éstos, los

marcadores ISSR no requieren conocimiento previo del genoma y generan alto polimorfismo para diferenciar el germoplasma de especies silvestres (Aguilera et al., 2011).

Laelia gouldiana es una orquídea endémica del territorio mexicano, con un origen enigmático e importante desde el punto de vista biológico y hortícola, sin embargo, se presume extinta en estado silvestre a pesar de ser ampliamente cultivada en el mundo. Con el descubrimiento reciente de dos poblaciones relictas *in situ* en el presente estudio se plantean como objetivos centrales la evaluación del porcentaje de viabilidad y potencial de germinación *in vitro* de las semillas de *L. gouldiana* provenientes de las poblaciones silvestres en la Reserva de la Biósfera Barranca del Mezquitán, además de realizar la caracterización molecular de los genotipos con la finalidad de conocer la diversidad genética intraespecífica.

Así, el presente documento contiene tres apartados principales en los que abordará la investigación; en el primero se presenta una revisión de literatura sobre el estatus de las orquídeas a nivel mundial y nacional, conservación, marcadores moleculares y aspectos diversos en torno a *L. gouldiana*: origen, distribución e importancia de la investigación. En el segundo se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la viabilidad de semillas de cuatro cápsulas (frutos) obtenidos de la polinización artificial y natural dentro de las poblaciones bajo estudio y la descripción de la germinación *in vitro*. Y finalmente, en el tercer apartado se presenta un análisis de la diversidad genética de los genotipos silvestres y algunos cultivares de la región de la RBBM, mediante el uso de 28 marcadores moleculares ISSRs (intersecuencias simples repetidas). Con la codificación de las bandas se obtuvo una matriz binaria con la que se calcularon las distancias de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) entre pares de accesiones y se realizó un análisis de agrupamiento que se representó mediante un dendrograma y se procedió a determinar la variabilidad genética presente en dos poblaciones de *L. gouldiana*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Familia *Orchidaceae*

Orchidaceae con 29,199 especies aceptadas (Govaerts et al., 2017) y 31,000 estimadas (Joppa, Roberts & Pimm, 2010), es considerado uno de los grupos vegetales más grande y diverso en el mundo, riqueza que se concentra en las regiones tropicales y representa el 7 % de todas las especies en el planeta (Altafin et al., 2003; Rech et al., 2011). Son plantas herbáceas de larga vida, con período vegetativo de prefloración de cuatro a siete años (Wang et al., 2010), longevidad atribuible a su crecimiento inherentemente lento y su capacidad fotosintética (Schmidt & Zotz, 2002; Shefferson, 2006). Presentan un patrón de crecimiento monopodial o simpodial (Arditti, 1992; Sailo et al., 2014) y su forma de vida puede ser terrestre, epífita, litófito o saprofita; las primeras viven en las copas de los árboles o en las rocas y exhiben muchas diferencias en sus raíces, tallos y hojas con las terrestres que crecen en el suelo. Las flores son zigomorfas, el ovario infero junto con el pedicelo generalmente gira 180° de modo que el labelo se coloca en la parte inferior de la flor para formar una plataforma para los polinizadores (Zhang et al., 2016).

La diversidad de especies en *Orchidaceae* se ve en las formas, tamaños y patrones de las semillas que suelen ser extremadamente pequeñas (Arditti, 1967; Arditti & Ghani, 2000). Las semillas poseen un embrión reducido y sin endospermo (Prutsch et al., 2000), exceptuando las semillas de *Sobralia* y *Bletilla* que tienen un cotiledón rudimentario (Arditti, 1967), características que les permite permanecer en el aire o flotando en el agua durante mucho tiempo (Prutsch et al., 2000). Se cree que la mayoría de las orquídeas comienzan su ciclo de vida con la ayuda de hongos micorrízicos que proporcionan a las semillas nutrientes necesarios para la germinación, por lo que se dice que son micoheterótrofas (MH) durante la germinación (Arditti, 1992; Merckx, 2012).

En la actualidad es posible lograr la germinación asimbiótica en laboratorio y aunque los primeros experimentos de germinación de semillas asimbióticas se centraron en las orquídeas tropicales, la investigación en los últimos 20 años ha

crecido por lo que ha ganado popularidad para proyectos de conservación y restauración. Factores como el fotoperíodo, temperatura, medios de cultivo y la latencia de las semillas, pueden influir en las tasas de germinación tanto asimbiótica como simbiótica y las Investigaciones más recientes no solo han examinado la germinación, sino también el subsiguiente crecimiento y desarrollo de protocormos y plántulas (Stewart et al., 2008). Se ha demostrado que las semillas inmaduras de muchas especies de orquídeas germinan más fácilmente que las semillas maduras (Arditti et al., 1981; Arditti 1982; Linden, 1992; De Pauw & Remphrey, 1993). Factores como la permeabilidad al agua pueden contribuir al aumento de la germinación de las semillas inmaduras (Van Waes & Debergh 1986b), mientras que las maduras pueden tener inhibidores como ABA, carecer de ciertas hormonas promotoras de la germinación (Van der Kinderen, 1987) o presentar una testa impermeable (Yamazaki & Miyoshi, 2006).

Uno de los propósitos de la germinación de semillas de orquídeas es proporcionar plantas para la conservación, y aunque las poblaciones pueden crecer en hábitats sorprendentemente diferentes a lo largo de un rango geográfico, para optimizar y estudiar a fondo la germinación, se debe intentar imitar las condiciones naturales y apoyarse tanto en la germinación asimbiótica como simbiótica (Stewart et al., 2008).

En la actualidad, muchas especies de orquídeas se encuentran en peligro de extinción debido a degradación, pérdida del hábitat y extracción ilegal de ejemplares, de modo que la conservación *ex situ* es esencial para el manenimeinto a largo plazo del germoplasma (Pritchard & Seaton, 1993).

Desde el punto de vista antropogénico, las orquídeas son comercializadas por la belleza de sus flores y hasta por las propiedades terapéuticas, sin embargo, los taxones de esta familia están en peligro de extinción por lo que están incluidas en la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) I y II (Xiang et al., 2012).

Para el caso de México, la orquideoflora es bien conocida en comparación con otros países tropicales, debido en parte a los recolectores que visitaron México en el siglo XIX y a grandes esfuerzos de investigadores asociados al grupo del

Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO) (Hágsater & Soto-Arenas, 1998). Actualmente se reconocen 1,260 especies de orquídeas, distribuidas en 170 géneros, con un porcentaje de endemismo del 40 % (Dressler, 2005). La conservación de orquídeas en el territorio mexicano que se propone intenta y se hace a diferentes niveles y con distintos resultados. Desde estudios científicos y ecológicos (Hágsater et al., 2005) y técnicas biotecnológicas, tales como la micropropagación *in vitro* y criopreservación del germoplasma (Pedraza, 2012). Un caso exitoso se relaciona con *Bletia urbana* (P), especie de orquídea de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Ciudad de México. Para su conservación se aplicaron protocolos de germinación de semillas *in vitro*, cultivo de tejidos, aclimatación y reintroducción de plantas a dicha Reserva (Tejeda-Sartorius, 2017)

2.2. *Laelia gouldiana* Rchb. f

Laelia gouldiana Rchb. f, (Cuadro 1) conocida como “*Sanctorum*”, “Flor de Muerto” y “Monjita” debido a que florece en octubre y noviembre (Hágsater et al., 2005), es una orquídea endémica del Estado de Hidalgo, México, en particular de la parte baja de la Barranca de Metztitlán, es decir del área semiárida de la Vega donde lamentablemente fue erradicada de su hábitat natural debido a colecta ilegal de plantas silvestres y la transformación de la parte baja de la Barranca a campos de cultivo (Soto-Arenas et al., 1990), lo que perjudicó de manera negativa a la especie declarándose extinta en la naturaleza (NOM-059-ECOL, 2010) (Soto, 2002).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Laelia gouldiana* Rchb. f

Reino:	Plantae	Subfamilia:	<i>Epidendroideae</i>
División:	<i>Embriophyta</i>	Tribu:	<i>Epidendreae</i>
Clase:	<i>Equisetopsida</i>	Subtribu:	<i>Laeliinae</i>
Orden:	<i>Asparagales</i>	Género:	<i>Laelia</i>
Familia:	<i>Orchidaceae</i>	Especie:	<i>L. gouldiana</i> Rchb. f

Fuente: elaboración propia

Las etnias indígenas de Metztitlán le atribuyen un alto valor, siendo sus flores empleadas durante siglos como parte de festividades populares en ofrendas durante el Día de Muertos (Hágsater et al., 2005). Actualmente prevalecen varios ejemplares en estado de semicultivo en las casas y jardines; sin embargo, se ha observado una baja producción de frutos y cuando se desarrollan las semillas resultan inviables.

2.3. Biología de la conservación

La biología de la conservación es la combinación de las ciencias puras y aplicadas en las que se hace uso de los principios de genética, biología de poblaciones, ecología, economía, sociología, filosofía y otras disciplinas para resolver problemas prácticos y urgentes que proporcionen una base para el manejo inteligente e informado de los ecosistemas altamente perturbados y ayuda a entender los procesos funcionales de los ecosistemas naturales para mantener su diversidad ante la expansión de la población humana que acelera la destrucción y fragmentación de hábitats (Loo, 2011).

La meta principal de la biología de la conservación es mantener la sobrevivencia de las poblaciones de plantas y animales, mediante estrategias que incluyen elementos de conservación del manejo sustentable de los recursos y áreas protegidas, métodos de reproducción, genética poblacional, bancos de germoplasma y restauración (Loo, 2011).

Así, los estudios de genética poblacional poseen importancia en la conservación de plantas al ofrecer herramientas moleculares y métodos de análisis para conocer los niveles de diversidad y de estructura genética de sus poblaciones, estimar procesos espaciotemporales evolutivos e incluso predecir la dinámica genética de los taxa bajo estudio, para una correcta conservación, definir prioridades, reducir costos y tomar decisiones importantes en cuanto al manejo de especies prioritarias o en peligro de extinción (Pérez-Collazos & Catalán, 2011).

2.4. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se pueden utilizar para rastrear un gen o genes deseados en los genotipos examinados, son heredables según el modelo mendeliano y pueden ser monomórficos o polimórficos. De hecho, se puede usar un fragmento de ADN o una proteína como marcador; enfoques anteriores que hacían la selección de rasgos específicos, se basaban en la evaluación de características morfológicas (Staub et al., 1996), isoenzimas (Stuber, 1991) y proteínas de almacenamiento.

El conocimiento de la estructura y niveles de variación genética dentro y entre las poblaciones es importante para un adecuado aprovechamiento y conservación de las plantas (Ferreira, 1998). Hoy día se utilizan varios tipos de marcadores para evaluar el polimorfismo genético y generalmente se clasifican como marcadores basados en hibridación y marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Ferreira, 1998). Además, reducen el tiempo de identificación de genotipos con características asociadas a dichos marcadores genéticos sin necesidad de esperar su madurez y prueba en ambientes diferentes y actualmente se consideran una herramienta complementaria para los programas de mejoramiento genético (Valadez-Moctezuma et al., 2005). Si bien los marcadores RFLP han sido la base de la mayor parte del trabajo en laboratorio en animales y plantas, se han generado valiosos marcadores a partir de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), Polimorfismos de Fragmentos Amplificados de Diferente Longitud (AFLP), Microsatélites o Repeticiones de Secuencia Simple (SSR), Polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) e Inter-secuencias simples repetidas (ISSR).

2.5. ISSR y orquídeas

La técnica ISSR (inter-secuencias simples repetidas) reportada por Zietkiewicz et al. (1994) es un método basado en PCR que amplifica regiones entre loci de microsatélites (pequeñas secuencias repetidas de 2-5 pares de bases). Esta

clase de marcadores no requiere conocimiento previo sobre las secuencias a amplificar, segregan principalmente como marcadores dominantes siguiendo la herencia mendeliana simple y muestra alto polimorfismo en el material, siendo muy útil en estudios de diversidad genética intra e interpoblacional (Dávila et al., 2007), y relaciones genéticas y procesos evolutivos entre especies: filogenia, genómica y biología evolutiva. También proporciona información biogeográfica, así como características ecológicas de las especies o colecciones de germoplasma sobre las cuales se desea trabajar (Gupta et al., 1994; Reddy et al., 2002; Wallace, 2003). La técnica utiliza microsatélites, generalmente de 16 a 25 pb de longitud, como iniciadores en una reacción de PCR de iniciador único dirigida a múltiples loci genómicos para amplificar principalmente las secuencias inter-SSR de diferentes tamaños. Las repeticiones de microsatélites utilizadas como iniciadores pueden ser di-nucleótido, tri-nucleótido, tetra-nucleótido o penta-nucleótido. Los iniciadores utilizados pueden estar sin anclar (Gupta et al., 1994) o más generalmente anclados en el extremo 3' o 5' con una a cuatro bases degeneradas extendidas (Zietkiewicz et al., 1994).

En el caso particular de orquídeas, se han empleado para evaluar los niveles de diversidad genética (Lu et al., 2003; Fajardo et al., 2017; Tian et al., 2018), para construir mapas genéticos (Feng et al., 2013), para diferenciar especies del mismo género (Shen et al., 2005) y para autenticar poblaciones (Shen et al., 2006).

2.6. Agrupamiento de genotipos

Los marcadores moleculares han contribuido en los estudios de divergencia y relación filogenética entre y dentro de especies vegetales de interés biológico o agrícola, con aplicaciones en la organización del germoplasma, así como mejoramiento y genética de plantas. En estos estudios se utilizan técnicas multivariadas, como el análisis de conglomerados o agrupamientos para la representación simplificada de los resultados. El preámbulo de dichos análisis es la construcción de una matriz de similitud (o distancia) entre los genotipos evaluados (Duarte et al., 1999). Las variables registradas de marcadores

moleculares dominantes (RAPDs o ISSRs) son cualitativas y en cada posición relativa de una banda se tienen dos opciones, asignar un 1 en caso de presencia y 0 para la ausencia. Lo anterior genera las siguientes posibilidades para dos genotipos r y s:

		Genotipo r		
		1	0	
Genotipo s	1	A	B	a+b
	0	C	D	c+d
		a+c	b+d	a+b+c+d

El número de coincidencias positivas (1,1) se representa por a, y d es el número de coincidencias doble cero. Las discordancias (1,0) y (0,1) son representadas por b y c, respectivamente. Con base en estas opciones se han construido varios coeficientes de similitud S_{rs} y la distancia (disimilitud) está dada por $d_{rs}=1-S_{rs}$ (Khattree y Naik, 2000).

2.7. Literatura citada

- Aguilera, J. G., Pessoni, L. A., Rodrigues, G. B., & Elsayed, A. Y. (2011). Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6(2), 243-252.
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33(1), 1-97.
- Arditti, J., Michaud, J. D., & Oliva, A. P. (1981). Seed germination of North America orchids. I. native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Pipera*, and *Platanthera*. *Botanical Gazette*, 142(4), 442- 453. <http://www.jstor.org/stable/2474313>
- Arditti, J. (1982). *Introduction, North American terrestrial orchids*. Orchid Biology II: Reviews and Perspectives. Orchid Seed Germination and Seedling Culture- a manual. Cornell University Press.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley & Sons. Inc.
- Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 14, 367-421.
- Altafin, V. L., Menezes, M. O., Lima, R. R., & Pitombo, L. M. (2003). Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal. *Espírito Santo do Pinhal: Unipinhal*, (7), 14.

- Cardoso, J. C., Zanello, C. A., & Chen, J. T. (2020). An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal Molecular Science*, 21(3), 1-985.
- Davies, K. L., & Stpicyńska, M. (2017). Comparative floral micromorphology and the ultrastructural basis of fragrance production in pseudocopulatory *Mormolyca* s.s. and nonpseudocopulatory *Maxillaria* section *Rufescens* s.s. (*Orchidaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 185, 81–112.
- Dávila, M., Castillo, M. A., & Laurentín, H. (2007). Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y variabilidad intraespecífica en *Agave*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 33(1), 93–111.
https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Uso+de+marcadores+moleculares+ISSR+para+inferir+las+relaciones+gen%C3%A9ticas+y+variabilidad+intraespec%C3%ADfica+en+Agave&btnG=
- De Pauw, M.A., & Remphrey, W.R., (1993). *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.
- Decruse, S.W., A. Gangaprasad, S. Seeni & V.S. Menon. (2003). Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(2), 199-202.
- Ding, G., Ding, X. Y., Shen, J., Tang, F., Liu, D. Y., He, J., Li, X. X., & Chu, B. H. (2005). Genetic diversity and molecular authentication of wild populations of *Dendrobium officinale* by RAPD. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 40(11), 1028-1032.
- Dolce, N. R., Medina, R. D., Terada, G., González-Arno, M. T., & Flachsland, E. A. (2020). *In vitro* propagation and germplasm conservation of wild orchids from south america. In Khasim, S., Hegde, S., González-Arno, M., & Thammasiri, K (Eds.), *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges* (pp.37–94). Springer.
- Dressler R.L. (2005). How many orchis species? *Selbyana*, 26(1/2), 155-158.
- Duarte, J. M., Santos, J. B., & Melo, L. C. (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3), 427–432. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000300024>
- Fajardo, C.G., De Almeida Vieira, F., Felix, L.P., & Molina, W. F. (2017). Negligence in the Atlantic forest, northern Brazil: a case study of an

- endangered orchid. *Biodiversity and Conservation*, 26(5), 1047–1063.
<https://doi.org/10.1007/s10531-016-1285-5>
- Feng, S. G., Zhao, H. Y., Lu, J. J., Liu, J. J., Shen, B., & Wang, H. Z. (2013). Preliminary genetic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. Moniliforme*. *Journal of Genetics*, 92 (2), 205-212.
- Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Embrapa- Cenargen
- Gangaprasad, A.N., Decruse, W.S., Seení, S., & Menon, S. (1999). Micropropagation and restoration of the endangered Malabar daffodil orchid *Ipsea malabarica*. *Lindleyana*, 14,38-46.
- Gantait, S., & Mitra, M. (2019). Applications of synthetic seed technology for propagation, storage, and conservation of orchid germplasms. In: Faisal, M., & Alatar, A. *Synthetic Seeds*. (pp. 301-321). Springer International Publishing.
- González-Aguilera, J., Pessoni, L. A., Belfort-Rodrigues, G., Elsayed, A. Y., Henriques-da Silva, D. J., & Gonçalves-de Barros, E. (2011). Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Revista Brasileira de Ciencias Agrarias*, 6(2), 243-252. doi: 10.5039/agraria.v6i2a998
- Gosling, P.G. (2003). Viability testing. In: Smith, R.D., Dickie, J.B., Lenington, S.H., Pritchard, H.W., & Probert, R.J. (Eds.), *Seed Conservation: Turning Science into Practice* (pp. 445-481). Royal Botanic Gardens.
- Govaerts, R., Campacci, M. A., Baptista, D. H., Cribb, P. J., George, A., Kreutz, K., & Wood, J. J. (2017). *World checklist of Orchidaceae*. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://apps.kew.org/wcsp/> Retrieved
- Guerrant, E.O., & Kaye, T. N. (2007). Reintroduction of rare and endangered plants: common factors, questions, and approaches. *Australian Journal Botany*, 55, 362-370.
- Gupta, M., Chyi, Y-S., Romero-Severson, J., & Owen, J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 998–1006.
- Hágsater, E., & Soto-Arenas, M. A. (1998). Orchid conservation in Mexico. *Selbyana*, 19 (1), 15-19.
- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez, R., López-Rosas, M. A. & Dressler, R. L. (2005). *Las Orquídeas de México*. (p. 304) Instituto Chinoín.

- IUCN. (2017). The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2017-2. Published on the internet at www.iucnredlist.org.
- IUCN, Conservation Planning Specialist Group. (2017). SSC Species Conservation Planning Project Inventory. Published on the internet at <http://www.cpsg.org/new-initiatives/ssc-species-conservation-planning-project-inventory>.
- Jersáková, J., Spaethe, J., Streinzer, M., Neumayer, J., Paulus, H., Dötterl, S., & Johnson, S.D. (2016). Does *Traunsteinera globosa* (the globe orchid) dupe its pollinators through generalized food deception or mimicry? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 180, 269–294.
- Joppa, L. N., Roberts, D.L., & Pimm, S. L. (2010). How many species of flowering plants are there? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 278, 554–559. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1004>
- Khattree, R., & Naik, D. N. (2000). *Multivariate Data Reduction and Discrimination with SAS Software*. SAS Publishing.
- Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical gazette*, 78(1), 1-25.
- Knudson, L. (1946) A new nutrient solution for orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin*, 15, 214-217.
- Leal, B. S. S., Chaves, C.J.N., Koehler, S., & Borba, E. L. (2016). When hybrids are not hybrids: a case study of a putative hybrid zone between *Cattleya coccinea* and *C. brevipedunculata* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 621–639.
- Linden, B. (1992). Two new methods for pretreatment of seeds of Northern orchids to improve germination in axenic culture. *Annales Botanici Fennici*, 29(4), 305–313.
- Loo, J. A. (2011) *Manual de Genética de la Conservación. Principios Aplicados de Genética para la Conservación de la Diversidad Biológica*. Comisión Nacional Forestal. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales..
- Lu, J. S., Bu, Z. Y., Lv, W. L., Su, J.M., Huang, C.Y., & Li, C. N. (2013). ISSR analysis on genetic diversity of germplasms resources in *Dendrobium* SW. from different habitats. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 44 (1), 96-100.
- Mata, M., & Salazar, V. M. (2003). Micropropagación y conservación de orquídeas mexicanas en el Jardín Botánico Clavijero. *Lankesteriana*, 7, 151-153.

- Merckx, V. (2012). *Mycoheterotrophy: The biology of plants living on fungi*. Springer. 10.1007/978-1-4614-5209-6.
- Mitra, G. C., Prasad, R. N., & Roychowdhary, A. (1976). Inorganic salts and differentiation of protocorms in seed-callus of an orchid and correlated changes in its free amino acid content. *Indian journal of experimental biology*, 14, 350-351.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010. (2010). Protección ambiental–especies nativas de México de flora y fauna silvestres – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*.
- Pedraza, S. M. E. (2012). Importancia de las técnicas de cultivo *in vitro* para la preservación de orquídeas. En: Téllez, V.M.A. (ed.). *Conservación de orquídeas en México* (pp. 148-154), UNAM.
- Pérez-Collazos, E., & Catalan, P. (2011). Genética de poblaciones. En Domínguez, L. F., Guzmán, O. D., & Moreno, S. J. C. (Eds.). *Biología de la conservación de Vella Pseudocytisus subespecie Paui, una planta amenazada en Aragón*. (pp. 162-185), Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón. Serie Investigación.
- Phillips, R. D., Barrett, M. D., Dalziel, E.L., Dixon, K.W., & Swarts, N. D. (2016). Geographical range and host breadth of *Sebacina* orchid mycorrhizal fungi associating with *Caladenia* in south-western Australia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 182, 140–151.
- Pritchard, H. W., & Seaton, P.T. (1993). Orchids seed storage: Historical perspective current status and future prospects for long-term conservation. *Selbyana*, 14, 89-104.
- Prutsch, J., Schardt, A., & Schill, R. (2000). Adaptations of an orchid seed to water uptake and storage. *Plant Systematics and Evolution*, 220(1/2), 69–75. <http://www.jstor.org/stable/23643764>
- Pujasatria, G. C., Miura, C., & Kaminaka, H. (2020). *In vitro* symbiotic germination: a revitalized heuristic approach for orchid species conservation. *Plants*, 9, 1742.
- Reddy, M., Sarla, N., & Siddiq, E. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17.

- Rech, A. R., Rosa, Y. B. C. J., & Rosa-Junior, E. J. (2011). Levantamento e características ecológicas de *Orchidaceae* da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS. *Revista Árvore*, 35(3), 717-724. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000400016>
- Rubluo, A., Chávez, V., & Martínez, Y. A. (1989). *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat, *Lindleyana*, 4(2), 68-73.
- Sailo, N., Deepak, R., & De, L.C. (2014). Physiology of temperate and tropical orchids – an overview. *International Journal of Scientific Research*, 3(12), 3-8.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., & Rowntree, J. K. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biololgy- Plant*, 42, 206-214.
- Schmidt, G., & Zotz, G. (2002). Inherently slow growth in two Caribbean epiphytic species: A demographic approach. *Journal of Vegetation Science*, 13(4), 527-534. DOI: 10.1111/j.1654-1103.2002.tb02079.x.
- Shefferson, R. P. (2006). Survival costs of adult dormancy and the confounding influence of size in lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Oikos*, 115, 253-262.
- Shen, J., Ding, X., Liu, D., Dong, G., He, J., Li, X., Tang, F., & Chu, B. (2006). Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(3), 420-422.
- Shen, Y., Xu, C., Wang, X. F., & Zhang, M. (1994). Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* Sw. Species. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, (24), 423-427.
- Singh, F. (1981). Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin*, 50, 416-418.
- Smith, J. L., Hunter, K. L., & Hunter, R. B. (2002). Genetic variation in the terrestrial orchid *Tipularia discolor*. *Southeastern Naturalist*, 1 (1), 17–26. [doi: 10.1656/1528-7092\(2002\)001\[0017:qvitto\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1656/1528-7092(2002)001[0017:qvitto]2.0.co;2)
- Soto-Arenas, M., Salazar-Chávez, G., & Hágsater, E. (1990). *Phragmipedium xerophyticum*, una nueva especie del sur de México. *Orquídea*, 12, 1–10.
- Soto, A. M.A. (2002). *Laelia gouldiana* Rchb. f. In: Hágsater, E., & Soto, M. (Eds.), *Icones Orchidacearum. Orchids of México Part 2,3*. (p. 426). Asociación Mexicana de Orquideología. A.C.

- Staub, J.E., Serquen, F., & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction and their application in Plant Breed. *Horticulture Science*, 31, 729–741.
- Stenberg, M.L., & Kane, M.E. (1998). *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid. *Lindleyana*, 13, 101-112.
- Steward, S.L., Zettler, L.W., & Minso, J. (2003). Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. *Selbyana*, 24, 64-70.
- Stewart, S., Kauth, P., Dutra, E. D., Johnson, T., Kane, M., & Vendrame, W. (2008). Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. In: T. da Silva. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. (pp. 75-391), Global Science Books.
- Stuber, C. W. (1991). Isozyme markers and their significance in crop improvement. In: Khanna, K. R. (ed.): *Biochemical aspects of crop improvement*. (pp. 59-77), CRC Press.
- Sun, M. & Wong, K.C. (2001). Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany*, 88(12), 2180-2188. <https://doi.org/10.2307/3558379>
- Tian, H. Z., Han, L.X., Zhang, J.L., Li, X. L., Kawahara, T., Yukawa, T., & López-Pujol, J. (2018). Genetic diversity in the endangered terrestrial orchid *Cypripedium japonicum* in East Asia: Insights into population history and implications for conservation. *Scientific Reports*, 8, 64-67. DOI:10.1038/s41598-018-24912-z
- Tejeda-Sartorius, O. (2017). Estado de conservación de orquídeas silvestres (*Orchidaceae*). *Agroproductividad*, 10(6), 3-12.
- Vacin, E., & Went, F. W. (1949). Some pH changes in nutrient solution. *Botanical Gazette*, 110(4), 605 – 613.
- Valadez-Moctezuma, E., Kahl, G., Rubluo-Islas, A., & Arreguín-de los Monteros, R. (2005). Optimización de las huellas de DNA obtenidas con RAPDS y MP-PCR mediante la técnica RAMPNR. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(2), 351-356.
- Van der Kinderen, G. (1987). Absciscic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. *Lindleyana*, 2, 84-87.
- Van Waes, J. M., & Debergh, P.C. (1986b). *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*, 67, 253–261. doi:10.1111/j.1399-3054.1986.tb02452.x

- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabe, D., & Thibeault, G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, 86, 79-86.
- Wallace, L. E. (2003). The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 90(2), 235–242.
- Wang, H. Z., Feng, S. G., Lu, J. J., Shi, N. N., & Liu, J. J. (2009). Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Science Horticulture*, 122(3), 440-447.
- Wang, Y., Ma, Y., & Dai, S. (2010). The Molecular Mechanism in Regulation of Flowering in Ornamental Plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 45(06): 641-653.
- Xiang, X. G., Li, D. Z., Jin, W. T., Zhou, H. L., & Li, J. W. (2012). Phylogenetic placement of the enigmatic orchid genera *Thaia* and *Tangtsinia*: Evidence from molecular and morphological characters. *Taxon*, 61(1), 45-54.
- Yamazaki, J., & Miyoshi, K. (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae), *Annals of Botany*, 98 (6): 1197–1206. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl223>
- Yu, H., He, R., Ni, N. C., & Zhang, S. G. (2004). Fingerprinting analysis of plants of *Dendrobium* Sw. By AFLP. *Chinese Traditional Herbal Drugs*, 35 (7), 808-810.
- Yue, G. H., Lam-Chan, L. T., & Hong, Y. (2006). Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. *Molecular Ecology Notes*, 6 (3), 832–834.
- Zhang, L., Chen, F., Zhang, G.-Q., Zhang, Y.-Q., Niu, S., Xiong, J.-S., Lin, Z., Cheng, Z.-M., & Liu, Z.-J. (2016). Origin and mechanism of crassulacean acid metabolism in orchids as implied by comparative transcriptomics and genomics of the carbon fixation pathway. *Plant Journal*, 86, 175-185. <https://doi.org/10.1111/tpj.13159>
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

3. PRUEBAS DE VIABILIDAD Y GERMINACIÓN *IN VITRO* DE *Laelia gouldiana* Rchb. f¹

3.1. Resumen

Laelia gouldiana Rchb. f. es una orquídea mexicana y endémica de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán (RBBM), extinta en estado silvestre pero ampliamente cultivada y con graves problemas de reproducción sexual, debido a que la formación de frutos es mínima y las semillas producidas resultan inviables. Con el recién descubrimiento de poblaciones, se logró coleccionar cuatro cápsulas; tres de ellas producto de polinización artificial y una de polinización natural. Se planteó la presente investigación para evaluar los porcentajes de viabilidad de semillas mediante la prueba de cloruro de tetrazolio (CT) y pruebas de germinación *in vitro*. Para la prueba de CT se tomaron cinco muestras de semilla por fruto y se colocaron en Cajas Petri con CT al 0.02 % por 24 h; se cuantificó el número de embriones teñidos y no teñidos. Para el caso de la germinación *in vitro*, las semillas se desinfectaron y lavaron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5 % v/v más dos gotas de Tween durante 15 minutos, posteriormente se transfirieron 500 semillas por frasco a con un medio de cultivo Murasigue & Skoog (1962). De las cuatro cápsulas evaluadas, sólo una presentó semillas con embriones viables de formas y tamaños diversos. El porcentaje de viabilidad registrado fue de 2.15 %. Por su parte, el porcentaje de germinación *in vitro* fue de 2.46 %; la germinación ocurrió a los 19 días después de la siembra (dds). A los 100 dds de 123 semillas germinadas, 33 protocormos se oxidaron y 90 sobrevivieron. Se infiere que esta mortandad está ligada al heterogéneo desarrollo que se observó en los embriones o por posibles problemas genéticos.

Palabras clave: Micropropagación, orquídea extinta, prueba de tetrazolio, porcentaje de viabilidad, semillas viables.

¹Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autora: Alejandra Villafuerte Salazar
Directora de tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

VIABILITY TESTING AND *IN VITRO* GERMINATION OF *Laelia gouldiana* Rchb. f¹

3.2 Abstract

Laelia gouldiana Rchb. f. is a Mexican orchid and endemic to the Barranca de Metztitlán Biosphere Reserve (RBBM), extinct in the wild but widely cultivated and with serious problems of sexual reproduction, because the fruits development is minimal, and usually produce non-viable seeds. After the recent discovery of populations, it was possible to collect four capsules; three of them generated by artificial pollination and one for natural pollination. The present research was proposed to evaluate the percentages of seed viability by means of the tetrazolium chloride (CT) and *in vitro* germination tests. For the CT test, five seed samples were taken per fruit and placed in Petri Dish with CT (0.02 %) for 24 h; the number of dye and uncolored embryos was quantified. In the case of *in vitro* germination, the seeds were disinfected and washed in a solution of sodium hypochlorite (NaOCl) at 5 % v/v plus two drops of Tween for 15 minutes, later 500 seeds were transferred to a jar with a Murasigue culture medium. Among the four capsules evaluated, only one of them presented seed with viable embryos of numerous shapes and sizes. The percentage of viability registered was 2.15 %. On the other hand, the percentage of *in vitro* germination was 2.46 %; germination occurred at 19 days after planting (dds). At 100 dds of 123 germinated seeds, 33 protocorms were oxidized and 90 survived. It is inferred that this mortality is linked to the heterogeneous development that was observed in the embryos or by possible genetic problems.

Key words: Extinct mexican orchid, micropropagation, percentage of viability, viable seeds.

¹Master of Science in Biotechnology Thesis, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Alejandra Villafuerte Salazar
Advisor: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

3.3. Introducción

Las pruebas de viabilidad de semillas implementadas para evaluar si las semillas son viables y utilizables después de la recolección o después de estar en almacenamiento, son una parte integral de la investigación y conservación de las plantas en peligro de extinción (Pradhan, 2022). Una prueba de viabilidad de semillas se define como cualquier técnica utilizada para determinar si las semillas parecen estar vivas o muertas dentro de una muestra (Gosling, 2003). Las pruebas de viabilidad más simples y tempranas se basaron en que las semillas estuvieran llenas o no, sumergiendo las semillas en agua y asignando a las semillas que se hundían hasta el fondo como llenas o buenas semillas y separando las semillas que flotaban como "vacías" o no viables. Otras pruebas evalúan el color, apariencia, peso volumétrico, densidad y tasa de imbibición para indicar la viabilidad de la semilla (França-Neto & Krzyzanowski, 2019).

Una semilla puede contener tejidos vivos o muertos, y una viva puede o no ser capaz de germinar. Generalmente, las pruebas de viabilidad evalúan si una semilla está activa y posee enzimas capaces de catalizar las reacciones metabólicas necesarias para la germinación y el crecimiento de las plántulas (Copeland & McDonald, 2001), con el inconveniente de que los resultados de dichas pruebas pueden ser inexactas (França-Neto & Krzyzanowski 2019). Por su parte, las pruebas de germinación evalúan la capacidad de una semilla para convertirse en plántula y se consideran una medida más directa para evaluar la capacidad de reproducción de una semilla, pero puede subestimar la viabilidad de la semilla (Gosling, 2003).

En especies objeto de conservación, es común que las técnicas para romper la latencia de las semillas pueden no ser efectivas para promover la germinación debido a la falta de conocimiento de la especie o falta de cantidades adecuadas de semillas para obtener experimentalmente tal conocimiento sobre la latencia de las semillas. En muchas especies, incluso cuando se superan tales impedimentos para la germinación, esta puede ser muy lenta y requerir un seguimiento a largo plazo. En el primer caso, puede que no sea posible germinar semillas con éxito (Yamazaki & Miyoshi, 2006) y en el último, el tiempo requerido

para completar la prueba de germinación puede exceder los tiempos de prueba estándar (Koene et al., 2020). Esto es especialmente cierto para las orquídeas, que puede tomar varios años para completar la germinación en comparación semillas de cultivo agrícola y hortícola toman días o pocas semanas en especies leñosas. En estos últimos casos, un conjunto de muestra de semillas se puede cortar y abrir para evaluar la calidad de los tejidos de las semillas (Gosling, 2003). Sin embargo, para la gran mayoría de las especies de la familia *Orchidaceae*, las semillas parecen polvo, no poseen endospermo y sólo consisten en un pequeño embrión suspendido dentro de la cubierta, comúnmente transparente, aunque en ocasiones pigmentada. El número de semillas por cápsula varía de 13,000 a 4,000,000 ya que son muy pequeñas de 0.025 a 1.2 mm de largo y 0.009 a 0.27 mm de ancho (Arditti, 1967), por lo que las pruebas de corte no son prácticas, ni son pruebas que permitan examinar y clasificar a las semillas según su contenido interno (Gosling, 2003). En la naturaleza las orquídeas son micoheterotróficas en las etapas iniciales de su crecimiento, es decir sólo germinan cuando se asocian con micorrizas (hongos), por lo que en condiciones naturales la germinación sólo puede alcanzar un máximo del 2 a 3 % (Vu Quoc Luan et al., 2006), por lo que es necesario conocer el porcentaje de viabilidad, antes de planear su reproducción *in vitro*.

Las pruebas comúnmente utilizadas para conocer la viabilidad de las semillas de orquídeas son: a) la tinción con cloruro de trifetil tetrazolio (CTT) y b) la tinción con diacetato de fluoresceína (DF) (Vujanovic et al., 2000). La primera es una alternativa rápida reconocida por la International Seed Testing Association, la cual ha sido utilizada exitosamente con orquídeas tropicales epífitas y adaptada para varias especies europeas y especies terrestres de América del Norte (Singh, 1981). Dentro del tejido vivo hidratado, que contienen enzimas respiratorias o deshidrogenasas, el cambio de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio en su su forma oxidada (ncolora), pasa a su forma reducida 2,3,5-trifenil formazán, propiciando un cambio de coloración (rojo- rosado) en dichos tejidos embrionarios (Copeland & McDonald, 2001).

La biología reproductiva y los enfoques ecológicos de las orquídeas son complicados y únicos (Tsai et al., 2008) y requieren investigaciones eficientes sobre conservación.

Laelia gouldiana es una especie de orquídea extinta en su hábitat que se conserva en cultivo *ex situ* (Soto-Arenas & Solano-Gómez, 2007) en la Reserva Biósfera de la Barranca de Metztitlán (RBBM). Es muy llamativa en época de floración (octubre- noviembre) y de gran valor hortícola; bien conocida por los pobladores de la región, quienes utilizan las inflorescencias en altares, tumbas y ofrendas de Día de Muertos (Hornung, 2019). Gran parte de los individuos de la especie se encuentran semicultivados en mezquites (*Prosopis* sp.) o bardas de piedra, con una mínima o nula producción de frutos, semillas infértiles y adicionalmente no se ha observado una variación fenotípica considerable en sus flores (Halbinger & Soto, 1997), por lo que se sospecha un problema genético de endogamia (Soto, 2002). Se ha considerado como una especie autoincompatible (Soto, 2002), con un futuro poco esperanzador; sin embargo, el descubrimiento de algunas poblaciones *in situ* en la región, proporciona la posibilidad para el estudio de aspectos biológicos, como la evaluación de la viabilidad y germinación de las semillas.

En este sentido, entre las acciones consideradas importantes para la conservación de especies en alguna categoría de riesgo o prioritaria se encuentra la generación de conocimiento enfatizado en su biología reproductiva, por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la viabilidad y el potencial germinativo de las semillas de *L. gouldiana*.

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Especie y área de estudio

Se colectaron frutos de *Laelia gouldiana* establecida sobre mezquites (*Prosopis* sp.) (Figura 1) en uno de los dos sitios de estudio, ubicados de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, a 3.5 kilómetros de distancia entre poblaciones, a una altitud entre 1,580 y 1,660 msnm.

El clima del área es BS1kw, es decir semiseco templado, con lluvias en verano concentradas de mayo a septiembre; precipitación media anual de 581.4 mm; presenta temperatura media anual de 17.5 °C y su oscilación térmica es de 6.7 °C; la vegetación nativa es matorral cactus-mezquite.



Figura 1. *Laelia gouldiana* in situ, Hidalgo; Ejemplar reproductivamente maduro creciendo junto a *Tillandsia juncea* sobre mezquite (*Prosopis* sp.).

3.4.2. Recopilación de datos

En el año 2020 se localizaron dos poblaciones relicto de *L. gouldiana* en la Reserva de la Biósfera Barranca del Mezquitlan, Hidalgo. En ambas poblaciones se realizaron 20 polinizaciones controladas entre el 24 y 25 de octubre del 2020; diez de ellas autopolinizaciones (geitogamia) y los 10 restantes polinizaciones cruzadas (xenogamia). Después de cinco meses se observó la formación y madurez de cuatro frutos procedentes de un sólo sitio tres de ellos producto de polinizaciones artificiales y uno por polinización natural mismo que mostraba un menor desarrollo. Las cápsulas maduras se colectaron en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Fitotecnia

en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) para realizar los estudios de viabilidad.

3.4.3. Prueba de viabilidad

Para determinar la presencia o ausencia y características del embrión, las semillas extraídas de las cuatro cápsulas se colocaron en Cajas Petri y se observaron con el objetivo 40x de un microscopio óptico Olympus con la finalidad de realizar un análisis exploratorio sobre las características de las semillas. De los cuatro frutos cosechados, se observó que sólo uno de ellos contenía semillas con embrión y el resto de los frutos sólo contenían semillas vanas. La prueba de cloruro de tetrazolio se realizó únicamente en el fruto con semillas que presentaron embrión. Debido al tamaño microscópico de las semillas y su difícil manipulación, se tomó la mitad de estas y se procedió a realizar la prueba de cloruro de tetrazolio al 0.2 %. Al cabo de 24 h se observaron y contabilizaron las semillas tomando 20 muestras de 200 semillas al azar para obtener el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = (SCET/ST) \times 100$$

Donde se tiene que:

ST = Número de semillas totales (con y sin embrión).

$SCET$ = Número de semillas con embrión teñido de rojo (naranja y rojo).

Como se observa en la fórmula anterior, y debido a las características de las semillas de orquídea, en el número de semillas totales se considero a todas sin importar si contenían o no embrión.

3.4.4. Germinación *in vitro*

Para la desinfección y siembra de las semillas de *L. gouldiana* se utilizó el método de la "jeringuilla", que consiste en colocar semillas en una jeringa estéril de 5 ml con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5 % v/v más dos gotas de Tween 15 durante 5 minutos y en agitación constante. Posteriormente, en la campana de flujo laminar (previamente desinfectada), las semillas se depositaron

en un embudo con papel filtro (previamente esterilizado) y se realizaron cinco lavados con agua desionizada estéril. Finalmente se tomaron las semillas y se procedió a la siembra de las semillas en medio Murashige & Skoog (1962), colocando 500 ± 10 semillas por frasco de un total de 10.

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Cosecha de frutos

En *L. gouldiana* de un total de 40 polinizaciones manuales (Figura 2A, B) solo se obtuvo la cosecha de tres frutos (Figura 2D, E, F) por xenogamia provenientes del sitio 1, lo que representa el 7.5 % de éxito reproductivo femenino total, adicionalmente en el mismo sitio se colectó un fruto producto de la polinización natural (Figura 2C), mismo que se corroboró su origen debido a la ausencia de etiqueta (marcaje) y a una diferencia en tamaño y desarrollo del fruto respecto a los frutos asistidos (Figura 2). Los resultados contrastantes en los dos mecanismos de polinización realizadas de manera artificial permiten especular que los individuos de estas poblaciones son autoincompatibles del mismo modo que lo ha declarado Soto (2002) en otras orquídeas, debido a que en las polinizaciones geitogámicas no se logró la formación de frutos, caso contrario a lo observado en las polinizaciones xenogámicas en donde se reporta la formación de algunos frutos y aunque no se analizaron las posibles causas de la mínima producción de frutos con semillas viables, es posible que este fenómeno se relacione con los niveles de variabilidad genética, que podrían ser relativamente bajos al interior de cada población y entre los ejemplares encontrados en cada forofito, efecto producido por la fragmentación del hábitat y con ello la disminución de individuos, generando poblaciones relictas de unos pocos cientos de ejemplares. Se ha documentado que la cercanía de las estructuras reproductivas sexuales en las flores hermafroditas incrementa considerablemente la probabilidad de la autofecundación. Para evitarlo, varias especies desarrollaron el sistema de incompatibilidad sexual (SI), mecanismo presente en varias familias de angiospermas que permite al pistilo rechazar el polen propio y aceptar el de

plantas genéticamente diferentes. Esto evita la endogamia y favorece la polinización cruzada (Jiménez- Durán & Cruz-Gracia, 2011).

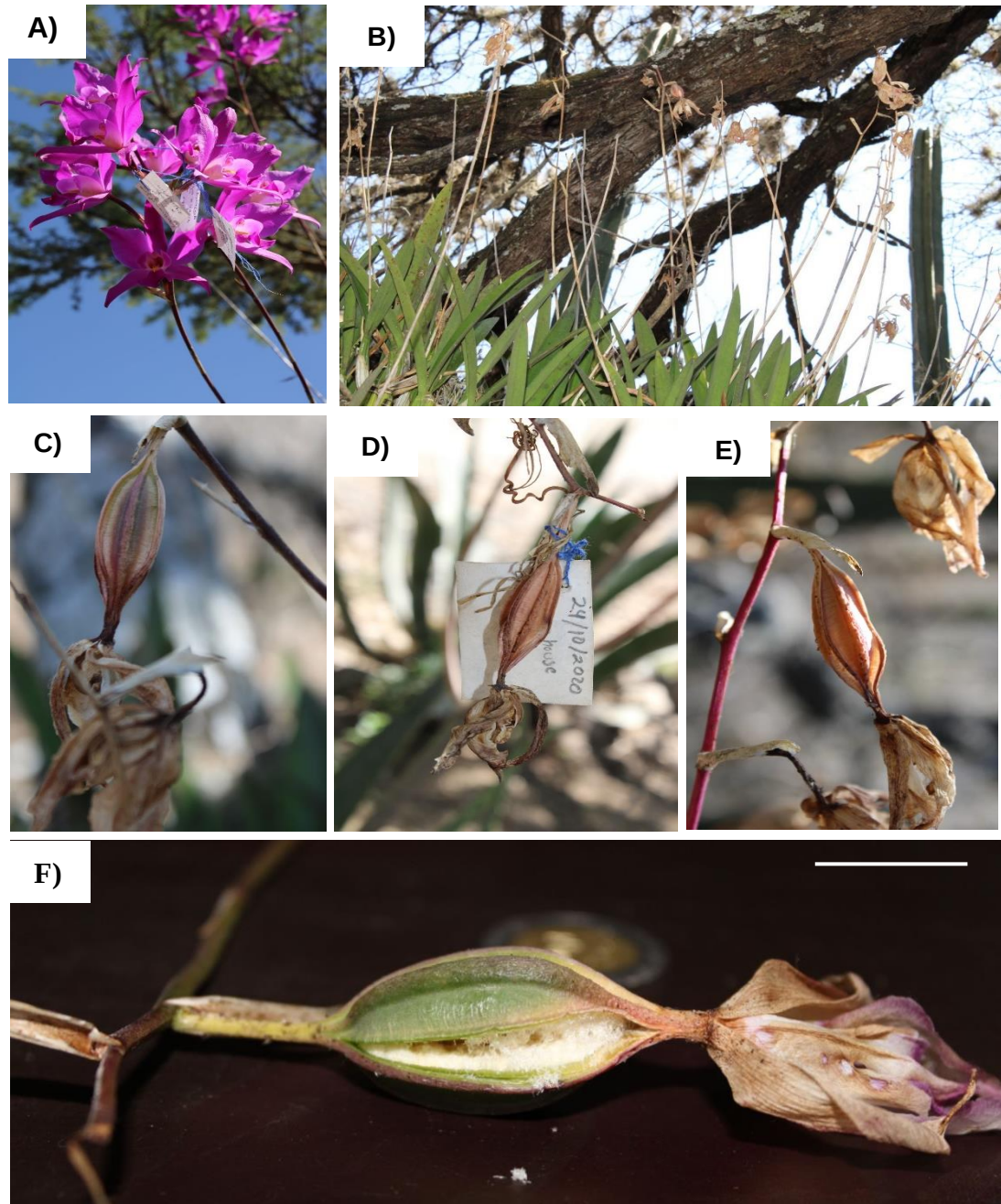


Figura 2. Formación de frutos de *Laelia gouldiana*. (A) Inflorescencias de *L. gouldiana* posteriores a la polinización manual *in situ*. (B) *Laelia gouldiana* *in situ* con formación de fruto. (C) Fruto formado de la polinización natural. (D, E y F) Frutos obtenidos de la polinización asistida.

En relación con el fruto formado por polinización natural, se desconoce si se originó mediante autopolinización o por polinización cruzada. Sin embargo, es evidente que en dichas poblaciones se refleja una limitación en la polinización debido probablemente a la baja abundancia y distribución de los polinizadores potenciales y/o por la calidad y cantidad de polen disponible (Tremblay et al., 2005).

Desde un punto de vista genético, la disminución del tamaño poblacional efectivo y el incremento en el grado de aislamiento hace que las poblaciones fragmentadas sean más susceptibles a la deriva génica y a la endogamia, esta última caracterizada por la reducción en el valor medio de caracteres cuantitativos, relacionados con la capacidad reproductiva o eficiencia fisiológica de la planta, debido a la homocigosis de alelos deletéreos (Falconer, 1989), disminuyendo el éxito y el potencial evolutivo de las especies e incrementando el riesgo de extinción (Ellstrand & Elam, 1993; Young et al., 1996).

En la literatura se han documentado casos similares en especies del mismo género en donde se reporta formación de frutos con semillas vanas; por ejemplo, Aguilar-Morales & López-Escamilla (2013), indicaron en frutos maduros de *Laelia speciosa* provenientes de la Barranca de Metztitlán semillas sin presencia de embriones (vanas), mientras que Santos et al. (2006) encontraron frutos de *L. albida* con semillas en la misma situación; carentes de embriones, atribuyéndole este fenómeno al efecto de múltiples factores ecofisiológicos y de la variabilidad genética. Por su parte Maya (2010) indicó que *L. speciosa* es una planta que requiere de un agente polinizador externo para su reproducción sexual, además de que es una especie con sistema de apareamiento mixto, que tiende a la exogamia como lo establece Ávila-Díaz (2007) y en *Laelia gouldiana* podría especularse un sistema de reproducción sexual similar debido a la cercanía que guarda con sus especies hermanas.

En especies de la subtribu Laeliinae, como es el caso de *Cattleya luteola* (Quiroga et al., 2010), *Brassavola cebolleta* Rchb. f. (Rech et al., 2010), *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. (Ávila-Díaz y Oyama, 2007), *Rhyncho스테le cervantesii* (Magaña et al., 2021) y *Prosthechea vespa* (Vell.) W.E. Higgins (Quiroga et al., 2010), se ha

reportado una alta producción de frutos producto de polinizaciones cruzadas a diferencia de la autogamia donde la producción de frutos fue nula.

Históricamente se ha sugerido que la gran diversidad taxonómica de *Orchidaceae* se atribuye a la radiación adaptativa para atraer polinizadores específicos, sin embargo, también se ve limitada al depender de ellos, tal como ocurrió en esta investigación durante la fase de campo, en dónde la producción de frutos por medio de polinización natural fue extremadamente baja.

También se ha documentado que la fructificación en orquídeas es mayor en especies templadas que en las tropicales, y en aquellas que ofrecen recompensas a los polinizadores que en las que no, además de que el éxito reproductivo está sesgado hacía unos pocos individuos en una población y los tamaños de poblacionales a menudo son pequeños.

3.5.2. Porcentaje de viabilidad

De los 4 frutos cosechados, se realizó la prueba de viabilidad a las semillas contenidas en un fruto producido por xenogamia, debido a que en el resto sólo se observó la presencia de semillas vanas. Con base en los embriones teñidos de rojo carmín (Figura 3), se presentó un porcentaje de viabilidad promedio de 2.15 %, en el entendido de que en esta investigación se tomaron en cuenta todas las semillas muestreadas sin discriminar a las semillas vanas puesto que la separación de éstas respecto aquellas con embrión resultaría sumamente difícil de manipular por su tamaño microscópico (Cuadro 2).

El cambio de coloración en los embriones indica que bioquímicamente las enzimas deshidrogenasas están activas y por lo tanto se está llevando a cabo la respiración celular. En el presente trabajo, no se analizaron las posibles causas de la presencia de semillas no viables; sin embargo, como se mencionó con anterioridad este fenómeno puede estar asociado a un problema genético ocasionado por la disminución de las frecuencias alélicas o fijación de algunas deletéreas que podrían estar afectando considerablemente la reproducción sexual de la especie desde el momento en que se fragmentó la población y quedaron unos cuantos individuos, lo que probablemente ocasionó problemas de

endogamia (Soto, 2002), sin embargo son sólo especulaciones que deberán corroborarse con estudios más detallados sobre biología reproductiva.

Cuadro 2. Conteo de semillas de *Laelia gouldiana* provenientes de la Barranca de Metztitlán para obtener el porcentaje de viabilidad.

Muestra	ST	SCE	SCET	PV	Muestra	ST	SCE	SCET	PV
1	200	3	3	1.5 %	11	200	10	10	5.0 %
2	200	6	6	3.0 %	12	200	5	5	2.5 %
3	200	2	2	1.0 %	13	200	1	1	0.5 %
4	200	5	5	2.5 %	14	200	3	3	1.5 %
5	200	8	8	4.0 %	15	200	4	4	2.0 %
6	200	12	12	6.0 %	16	200	3	3	1.5 %
7	200	6	6	3.0 %	17	200	2	2	1.0 %
8	200	4	4	2.0 %	18	200	1	1	0.5 %
9	200	3	3	1.5 %	19	200	1	1	0.5 %
10	200	3	3	1.5 %	20	200	4	4	2.0 %
				Total	20	6,600	142	142	2.15

ST: Semillas totales, SCE: Semillas con embrión, SCET: Semillas con embrión teñido, PSCE: Porcentaje de semillas con embrión, PV: Porcentaje de viabilidad.

Resultados similares obtuvieron Stort & Martins (1980) al contabilizar la formación de embriones en 14 especies alógamas de *Cattleya* y al realizar las comparaciones entre los frutos usando autopolinización y polinización cruzada, donde observaron un promedio de 15.3 % de semillas con embriones en el primer sistema de polinización y 47.5 % en el segundo.

Las herramientas fisiológicas, como una prueba confiable de viabilidad de semillas, pueden usarse para resolver de manera efectiva los problemas de conservación (Cooke et al., 2013). En el caso de la conservación de las orquídeas a través de los bancos de semillas, la prueba de viabilidad de semillas es una herramienta esencial para diseñar y gestionar su conservación. Una mayor comprensión de los factores que afectan la precisión y confiabilidad de las pruebas de viabilidad de las semillas podría facilitar la determinación del estado fisiológico de las semillas a conservar, aumentando el éxito y la eficiencia de los

bancos de semillas o la investigación para la conservación (Dalziell & Tomlinson, 2017).

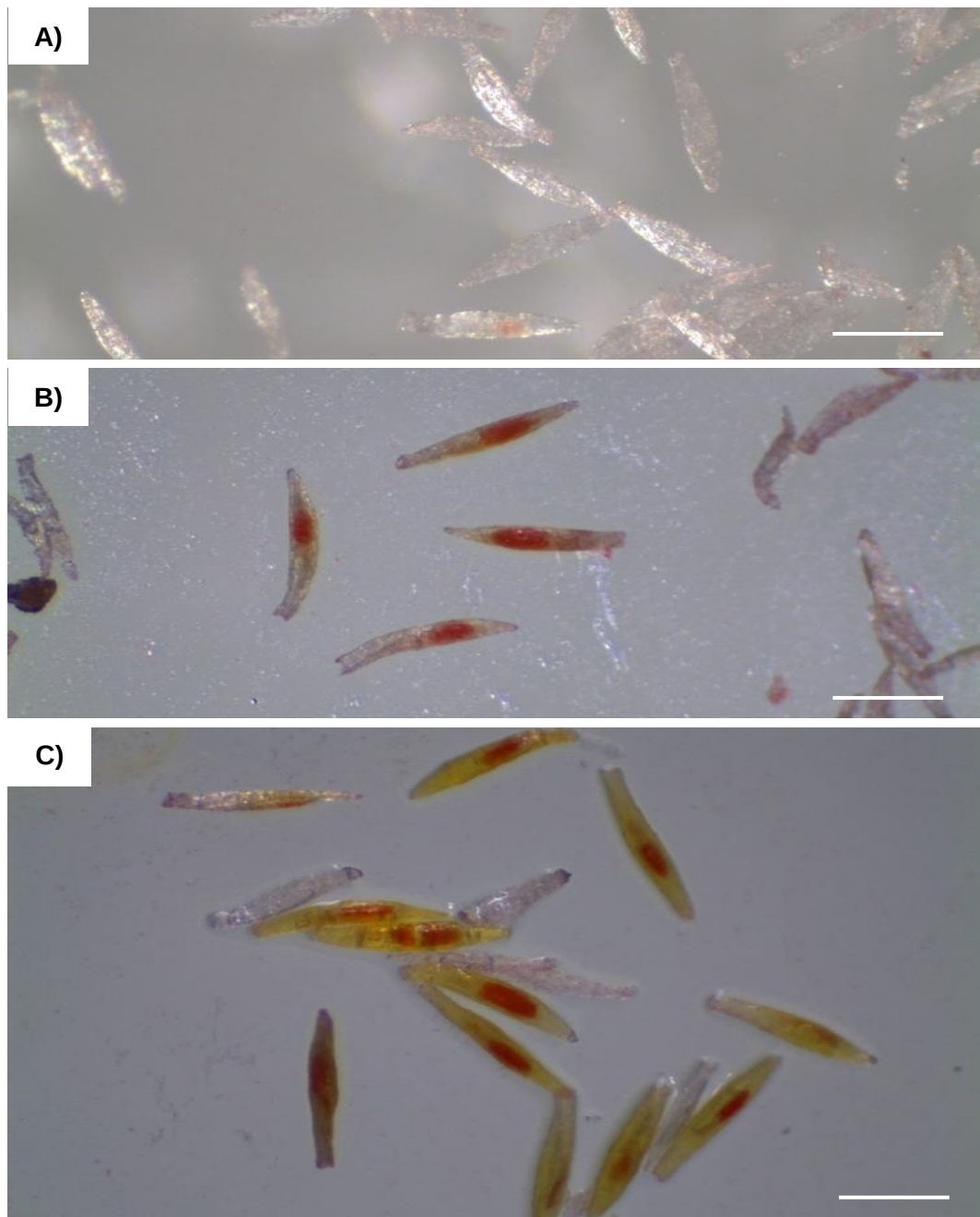


Figura 3. Semillas de *Laelia gouldiana*. A) Semillas vanas (sin formación de embrión). B) Semillas con (teñidas de rojo carmín) y sin embrión. C) Semillas con embriones variables.

En *L. gouldiana* esta es la primera investigación donde se reporta viabilidad en sus semillas y se sugiere continuar con ensayos de la biología reproductiva para corroborar el sistema de polinización que se propone en esta investigación y poder dilucidar más sobre la formación y desarrollo de los embriones desde que se realizó la fecundación hasta la maduración de los frutos.

3.5.3. Característica de las semillas de *Laelia gouldiana*

Las semillas de *L. gouldiana* con embrión presentaron una longitud promedio de 28 μm y un ancho de 4.5 μm (Figura 3); sin embargo, se observa una gran variación en el tamaño de los embriones desde aquellos inconspicuos (Figura 3A) que apenas se alcanzaban a notar al microscopio, hasta aquellos que llegaban a ocupar un tercio de parte interna de la semilla (Figura 3B y C). De igual manera las formas de los embriones variaron en gran medida desde minúsculos apenas perceptibles semejando un punto hasta embriones filiformes, fusiformes, rectangulares y ovoides. Por su parte las semillas sin embrión siempre fueron mucho más pequeñas alcanzando una longitud promedio de 21 μm y un ancho de 3 μm (Figura 3). Estas diferencias pueden deberse al posible problema genético que se supone en la especie, sin embargo, en futuras investigaciones se deberán de realizar estudios más detallados para refutar o corroborar dicha información.

3.5.4. Germinación *in vitro*

Se logró la germinación asimbiótica de *L. gouldiana* en el medio Murashige & Skoog (1962) (Figura 4) registrándose 2.46 % de germinación del total de las semillas sembradas a los 19 días después de la siembra (dds), sin embargo, el crecimiento y desarrollo fue extremadamente lento. A los 8 días después de la siembra (dds), los embriones se encontraron en la etapa 0 de la germinación, caracterizada por la imbibición de estos; los embriones se observaron ligeramente hinchados, con una coloración blanquecina y sin evidencia de ruptura de testa.

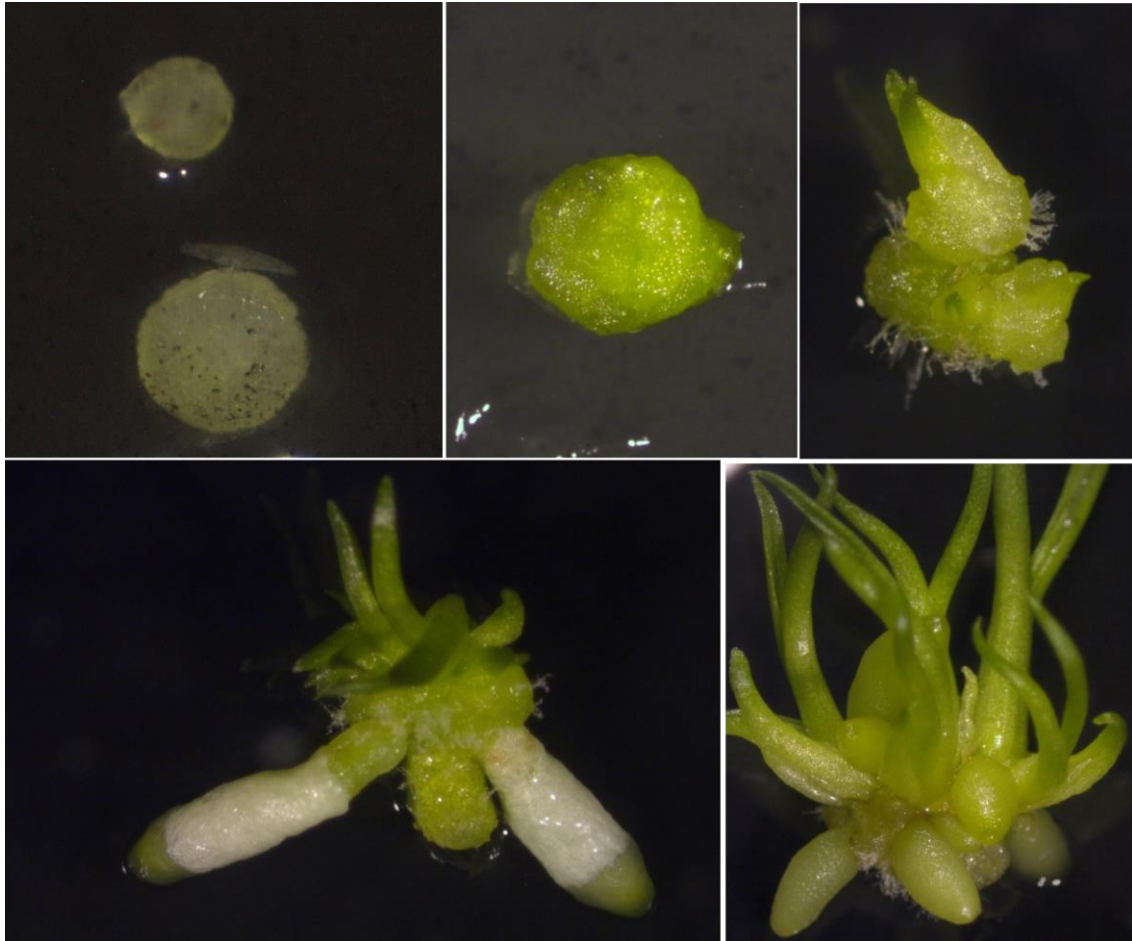


Figura 4. Etapas de desarrollo de la germinación de *Laelia gouldiana*. A) Protocormos de *Laelia gouldiana* a 45 días después de la germinación (ddg). B) Protocormo completamente clorofílico a 80 ddg, C) Protocormo con diferenciación del meristemo apical y presencia de rizoides en la base a 160 ddg, D) Plántula de *Laelia gouldiana* con la presencia de hojas en la parte apical y raíces en la parte basal a 280 ddg y E) Formación de brotes de *Laelia gouldiana* a 365 ddg.

A los 19 dds la mayoría de los embriones se encontraban en la etapa 1 y algunos en la etapa 2; se observaron embriones de mayor tamaño, esféricos de tonalidad verde que estaban iniciando la germinación, mediante la ruptura de la testa. A los 45 dds (etapa 3) (Figura 4A) prácticamente todos los embriones habían logrado la germinación, sin embargo, su diámetro fue heterogéneo, mostrándose desde aquellos que apenas sobrepasaban la longitud de la testa con 35 μm de diámetro hasta otros que casi duplicaban su diámetro con 65 μm . A los 80 dds (Figura 4B)

ya se observaron los protocormos evidentemente fotosintéticos, que se encontraban en la etapa 4 de la germinación, caracterizada por la visualización de los dos polos apicales; el foliar caracterizado por la formación de un pico con coloración más oscuro que dará origen a las hojas de la planta y el polo radicular, caracterizado por un ensanchamiento de la parte media-baja con presencia de rizoides, que tendrán la función de absorber nutrientes del medio de cultivo (Figura 4C). Finalmente, la etapa 5 (Figura 4D) se alcanzó a los 280 dds en la mayoría de las plantas, cuyas características principales fueron la presencia de una o más hojas y la formación de raíces (Figura 4E). Estos resultados coinciden con los de otras especies indicadas por Damon et al. (2004), Flores-Escobar et al. (2008), Aguilar- Morales & López-Escamilla (2013).

Es importante resaltar que a los 100 dds, de las 123 semillas germinadas, 33 protocormos se oxidaron, lo que representó un 73.2 % de supervivencia y las plántulas presentaron un comportamiento clonal, que generó callo, organogénesis y embriogénesis somática, lo que podría reflejar la elevada capacidad y estrategia de reproducción que manifiestan los ejemplares en campo para mantenerse vigentes. Se infiere que la mortandad de los protocormos pudo estar ligada a que no todos los embriones alcanzaron a desarrollarse y madurar, pues como se explicó con anterioridad, la forma y tamaño de los embriones fue heterogéneo y seguramente este desarrollo tiene que ver con cuestiones genéticas, que requieren ser estudiadas.

Esta herramienta ha sido empleada con éxito para la reintroducción de la especie de orquídea *Bletia urbana* (Rubluo et al., 1989), *Ipsea malabarica* (Gangaprasad et al., 1999) y *Spiranthes brevilabris* (Steward et al., 2003).

En la mayoría de los estudios que involucran pruebas de viabilidad y pruebas de germinación, no ha habido una distinción clara entre la “viabilidad” de la semilla y la “germinabilidad” de la semilla, lo que crea una falsa impresión de que una “semilla viable” es sinónimo de una “semilla germinable” (Gosling, 2003). La primera es aquella que está viva mientras que la segunda aparte de estar viva exhibe un embrión que consta de un eje completo y además tiene la capacidad de germinar y crecer de manera normal en condiciones favorables (Copeland &

McDonald, 2001). Por lo que en un programa de conservación es imprescindible realizar ambas estrategias con la finalidad de generar conocimiento que aporte más información sobre la biología reproductiva de las especies bajo estudio, tal como se desarrollo en la presente investigación para *L. gouldiana*.

3.6. Conclusiones

Es posible producir semilla viable de *Laelia gouldiana* con polinización cruzada asistida. La germinación *in vitro* (asimbiótica) de *L. gouldiana* es una alternativa para la producción y conservación de la especie.

3.7. Literatura citada

- Aguilar-Morales, M. A., & López-Escamilla A. L. (2013). *Germinación in vitro de Laelia speciosa (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación ex situ*. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas.
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review*, 33(1), 1-97.
- Ávila-Díaz, I. (2007). *Biología de poblaciones Laelia speciosa (HBK) Schltr. (Orchidaceae) para su manejo y conservación*. [Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones en ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Ávila-Díaz, I., & Oyama, K. (2007). Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 94, 184-193.
- Cooke, S. J., Sack, L., Franklin, C. E., Farrell, A. P., Beardall, J., Wikelski, M., & Chown, S. L. (2013). What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conservation Physiology*, 1(1), 1-23. cot001. <https://doi.org/10.1093/conphys/cot001>
- Copeland, L. O., & McDonald, M. B. (2001). *Principles of seed science and technology*. (4 Ed.) Kluwer Academic Publishers.
- Dalziell, E. L., & Tomlinson, S. (2017). Reduced metabolic rate indicates declining viability in seed collections: an experimental proof-of-concept. *Conservation Physiology*, 5(1).
- Damon, A., Aguilar-Guerreo, L., & Nikolaeva, V. (2004). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 10, 195-203.

- Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217-242.
- Falconer, D. S. (1989). *Introduction to quantitative genetics*. (3 Ed.) Longman.
- Flores-Escobar, G., Legaria, S. J. P., Gil, V. I., & Colinas, L. M.T. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Serie Horticultura*, 14, 347-353.
- França-Neto, J. D. B., & Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41, 359–366.
- Gosling, P.G. (2003). Viability testing. In: Smith, R.D., Dickie, J.B., Lenington, S.H., Pritchard, H.W., & Probert, R.J. (Eds.), *Seed Conservation: Turning Science into Practice* (pp. 445-481). Royal Botanic Gardens. Govaerts, R., Campacci, M. A., Baptista, D. H., Cribb, P. J., George, A., Kreutz, K., & Wood, J. J. (2017). *World checklist of Orchidaceae*. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Halbinger, F., Soto, M.A. (1997) Laelias of Mexico. *Orquídea*, 15, 1–160.
- Hornung-Leoni, C. T., Chavarria-Olmedo, Y. J., & Ramírez-Morillo, I. M. (2019). The Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán (Hidalgo): An illustrated checklist of bromeliads and orchids and their high levels of Mexican endemisms. *PhytoKeys*, 118, 105–123. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.118.31603>
- Jiménez-Durán, K., Cruz-García, F. (2011). Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal. *Revista fitotecnia mexicana*, 34(1): 1-9.
- Koene, F. M., Amano, É., Smidt, E. D. C., & Ribas, L. L. F. (2020). Asymbiotic germination and morphological studies of seeds of Atlantic Rainforest micro-orchids (*Pleurothallidinae*), 15, 12. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243297>
- Luan, V. Q., Thien, N. Q., Khiem, D. V., Nhut, D.T., & Nong, L. U. (2006). *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. *In vitro germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. In Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*. Nong Lam University.
- Magaña, L. R., Ávila-Díaz, I., & Herreras-Diego, Y. (2021). Mating system and female reproductive success of the endemic and endangered epiphyte *Rhynchostele cervantesii* (Orchidaceae) in a cloud forest in Michoacan,

Mexico. *Plant Ecology and Evolution*, 154, 56-62.
10.5091/plecevo.2021.1551.

- Maya, R. G. (2010). Sistema de apareamiento y tasa de exocruzamiento de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr (Orchidaceae) en poblaciones sujetas a diferente grado de perturbación. [Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Morelia, Michoacán].
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, 15, 473-497.
- Pradhan, N., Fan, X., Martini, F., Chen, H., Liu, H., Gao, J., & Goodale, U. (2022). Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. *Botanical Studies*, 63, 1-14. DOI: 10.1186/s40529-022-00333-0.
- Quiroga, D., Martínez, M., & Larrea-Alcázar, D. M. (2010). Sistemas de polinización de cinco especies de orquídeas creciendo bajo condiciones de invernadero. *Ecología en Bolivia*, 45, 131–137.
- Rech, A. R., Rosa, Y. B. C. J., & Manente-Balestieri, F. C. de L. (2010). Aspects of the reproductive biology of *Brassavola cebolleta* Rchb. f. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 32, 335-341.
- Santos, L., Aguirre E., Campos J. E., & Martínez, M. (2006). Conservación *in situ* de la flora mexicana: La orquídea *Laelia albida*, en una reserva de la biosfera. *Ciencia y Desarrollo en Internet*, 1-10.
- Singh, F. (1981). Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin*, 50, 416-418.
- Soto, A. M.A. (2002). *Laelia gouldiana* Rchb. f. In: Hágsater, E., & Soto, M. (ed.), *Icones Orchidacearum. Orchids of México Part 2,3*. (p. 426), Asociación Mexicana de Orquideología. A.C.
- Soto-Arenas, M. A., & Solano-Gómez, A. R. (2007). Ficha técnica de *Laelia gouldiana*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. *Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C.* Bases de datos SNIB-CONABIO.
- Stort, M. N. S., & Martins, P. S. (1980). Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do género *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciencia y Cultura*, 32, 1080–1083.

- Tsai, W. C., Hsiao, Y. Y., Pan, Z. J., Kuoh, C. S., Chen, W. H., & Chen, H. H. (2008) The role of ethylene in orchid ovule development. *Plant Science*, 175, 98–105.
- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K., & Calvo, R. N. (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.
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabe, D., & Thibeault, G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals. Botany*, 86, 79-86.
- Yamazaki, J., & Miyoshi, K. (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Ochidaceae). *Annals Botany*, 98, 1197–1206.
- Young A., Boyle T., & Brown T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 413-418.

4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE *Laelia gouldiana* Rchb. f.¹

4.1. Resumen

Orchidaceae con poco más de 26,000 especies reconocidas, es considerada una de las familias de angiospermas más diversa a nivel mundial; desafortunadamente también se encuentra catalogada como uno de los grupos vegetales más vulnerable. *Laelia gouldiana*, orquídea descrita como extinta (NOM-059-SEMARNAT-2010) representa una de las especies más emblemática y enigmática de la orquideoflora mexicana. Se tiene nula información sobre su diversidad genética, sin embargo, con el descubrimiento de dos poblaciones *in situ*, el objetivo de esta investigación fue realizar la caracterización molecular de los ejemplares provenientes de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán (RBBM), Hidalgo, México, en particular de 48 genotipos, mediante el uso de 28 marcadores moleculares tipo ISSR. A partir de tejido de hojas se realizó la extracción de ADN con el método CTAB y los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2 %. El polimorfismo general obtenido fue de 58 % y el análisis de agrupamiento permitió separar a las plantas muestreadas en tres grupos. En el AMOVA se encontraron diferencias estadísticas entre las muestras poblacionales y al interior de estas, lo que permitió separarlas en grupos genéticamente diferentes, donde la mayor variabilidad genética (94.44 %) se presentó dentro de las muestras poblacionales. El índice de diversidad de Shannon-Weaver estimado fue de 4.71. Los resultados obtenidos demuestran que los marcadores ISSRs fueron capaces de diferenciar genéticamente a los individuos de ambas poblaciones, por lo que resultaron de utilidad para la obtención de sus huellas genómicas.

Palabras clave: Huellas genómicas, diversidad genética, ISSRs, marcador molecular, polimorfismo.

¹Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autora: Alejandra Villafuerte Salazar
Directora de tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TWO POPULATIONS OF *Laelia gouldiana* Rchb. f.¹

4.2 Abstract

Orchidaceae, with about 26,000 recognized species, is considered one of the most diverse families of angiosperms in the World; unfortunately, it is also one of the most vulnerable plant groups. *Laelia gouldiana*, an orchid catalogued as extinct (NOM-059-SEMARNAT-2010) represents one of the most emblematic and enigmatic species of the Mexican orchid flora. There is no information on its genetic diversity; however, with the discovery of two populations *in situ*, the objective of the present research was to characterize by molecular means specimens from the “Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán” (RBBM), Hidalgo, Mexico, specifically 48 genotypes, using 28 ISSR molecular markers. DNA extraction was obtained from leaf tissue using the CTAB method. The amplification products were visualized on a 2 % agarose gel. The overall polymorphism obtained was 58 % and the clustering analysis allowed separating the sampled plants into three groups. In the AMOVA, statistical differences were found among the population samples and within them, which allowed their separation into genetically different groups; in addition, the greatest genetic variability (94.44 %) was found within the population samples. The estimated Shannon-Weaver diversity index was 4.71. The results obtained show that the ISSR markers were able to genetically differentiate the individuals of both populations and were therefore they were useful for obtaining their genomic fingerprints.

Key words: Fingerprints, genetic diversity, ISSRs, molecular marker, polymorphism.

¹Master of Science in Biotechnology Thesis, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Alejandra Villafuerte Salazar
Advisor: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

4.3. Introducción

El género *Laelia* Lindl, abarca alrededor de 25 especies de orquídeas epífitas distribuidas desde México a Bolivia, al sur de Brasil y las Antillas. En México, la taxonomía de las *Laelias* mexicanas fue revisada por Halbinger (1993) y Halbinger & Soto (1997) quienes reconocieron 11 especies, dos subespecies y cuatro híbridos naturales. La mayoría crece sobre forofitos del género *Quercus*, éstos formando bosques abiertos caducifolios que van desde los 100 a los 2,700 msnm, donde las orquídeas reciben mucha luz y vientos húmedos; aunque también pueden soportar heladas, las cuales regularmente se presentan en bosques por arriba de los 2,000 msnm (Halbinger, 1993).

Históricamente, las especies de este género han representado uno de los grupos más importantes, no sólo por las propiedades adhesivas en sus pseudobulbos, de los cuales se extraía un mucílago que era utilizado en el arte plumario prehispánico o por la elaboración del alfeñique (dulces tradicionales) (Cox & Cervantes, 2016), sino también por la belleza de sus flores y la coincidencia de sus épocas de floración con celebraciones religiosas y festividades de Día de muertos que han hecho que muchas de las especies mexicanas sean excelentes candidatas para ser utilizadas como plantas de ornato y/o flor de corte. Sin embargo, esta situación ha colocado a varias especies en peligro de extinción (Halbinger & Soto, 1997, Hágsater et al., 2005), tal como sucedió con *Laelia gouldiana*, orquídea presuntamente extinta en estado silvestre y de la cual hoy día su distribución se reduce a traspatios de una pequeña región del estado de Hidalgo (Halbinger, 1993).

Bajo estas circunstancias, es urgente trabajar en diferentes líneas de acción que lleven al mantenimiento y conservación del capital natural mexicano. En el campo de la conservación, la pérdida de la variabilidad genética puede disminuir la capacidad de las especies para responder a cambios en el ambiente y, como consecuencia, disminuir su probabilidad de adaptación futura, su sobrevivencia y su potencial evolutivo (Loo, 2011).

Mediante técnicas moleculares es posible cuantificar la variabilidad genética y esto puede ayudar a definir prioridades y tomar decisiones importantes en cuanto

al manejo de las especies en peligro de extinción. Gran parte de los estudios que utilizan marcadores moleculares pueden ser considerados como estimaciones de la historia evolutiva de los organismos, debido a que evalúan las relaciones filogenéticas (de parentesco) desde diferentes niveles jerárquicos. Estas relaciones pueden estimarse desde niveles micro hasta macroevolutivos, con la siguiente escala: a) identidad genética, como en organismos de reproducción clonal; b) parentesco (parental, padres a hijos); c) afinidad genética dentro de un grupo local o población; d) diferenciación entre poblaciones o subespecies; e) diferenciación entre especies; y f) estructura filogenética en la evolución de los seres vivos (Ríos et al., 2009; Arrigoni-Blank, 2016).

Así, los estudios sobre diversidad genética dentro de las poblaciones son fundamentales para optimizar las estrategias de conservación de la diversidad biológica. La conservación *ex situ* no es la mejor manera de preservar una especie, debido a que puede no mantener la variación genética y su estructura poblacional, representa una mejora alternativa a la pérdida de taxón por completo (Loo, 2011).

Hasta ahora *Laelia gouldiana* es la única orquídea endémica del territorio mexicano catalogada como extinta en estado silvestre. Desde el año 1888 (año en que se describió por primera vez) no se conocían ejemplares en su hábitat natural y sí no se hubiera recolectado y mantenido en cultivo durante muchas décadas por los campesinos en Hidalgo, esta especie probablemente sería desconocida en la actualidad (Soto, 2002). De los ejemplares en semicultivo no se han podido producir cápsulas fértiles, además de que la variación observada es muy estrecha y es posible que todos los especímenes conocidos representen divisiones del mismo clon.

Con el reciente descubrimiento de dos poblaciones relicto de *L. gouldiana* en la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán se planteó la presente investigación con el objetivo de evaluar y conocer los niveles de diversidad genética de los ejemplares en campo y generar conocimiento sobre aspectos genéticos sobre *L. gouldiana*.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Sitio experimental

La investigación se llevó a cabo de junio a diciembre de 2021 en el laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo y se ejecutó en dos etapas; en la primera se realizaron visitas periódicas al área de distribución donde se encontraron las poblaciones silvestres de *L. gouldiana* con la finalidad de tomar datos ecológicos, así como las muestras del material vegetal necesarias para la investigación. En la segunda etapa se realizó la extracción de ADN y con ello la exploración y caracterización molecular (huellas de ADN) de los genotipos mediante la utilización de 28 iniciadores ISSR.

4.4.2. Genotipos utilizados

Se obtuvieron 48 colectas (genotipos) (Cuadro 3): 7 provenientes de plantas cultivadas en los traspatios de las casas de los pobladores (5 de una casa y 2 de otra, provenientes del sitio 1 y 2, respectivamente) y 41 procedentes de dos poblaciones silvestres (21 de la primera población y 20 de la segunda) de la Reserva de la Biósfera de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México.

4.4.3. Extracción de ADN

Se tomaron muestras de tejido de hojas sin daño aparente de los 48 genotipos de *L. gouldiana* (Figura 5A), en la cuales se utilizó el protocolo de extracción de CTAB para la obtención de ADN. Las hojas se lavaron con jabón y alcohol al 70 %; posteriormente se pesó 1 g de tejido y se colocó en un mortero para añadir nitrógeno líquido para ser triturado el material vegetal hasta obtener un polvo fino (Figura 5B y C), mismo que fue transferido a 600 µL de amortiguador de extracción (Tris HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, 2-mercaptoetanol 0.2 %, CTAB 2 %, pH 8.0) contenidos en un microtubo de 1.5 mL precalentado a 65 °C en un termoblock marca Thomas Scientific®. El microtubo se agitó hasta que se obtuvo una mezcla homogénea; para ser calentado nuevamente a 65 °C en el

termoblock durante 20 min. Posteriormente los tubos Eppendorf se colocaron en una centrífuga marca Thermo® durante 10 min a 21000 gravedades.



Figura 5. Extracción de ADN de tejido de hoja en genotipos de *Laelia gouldiana*.

A) Muestras de hojas colectadas en la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo. B) Secciones de hoja de *Laelia gouldiana*. C) Tejido de hoja pulverizada de *Laelia gouldiana* para la extracción de ADN.

Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente se centrifugó a 21000 gravedades por 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro microtubo de 1.5 mL donde se agregó 4 μ L de ARNasa, se incubó 20 min a temperatura ambiente o a 37 °C. A continuación, se agregaron 600 μ L de fenol frío y se agitó por inversión suavemente hasta obtener una emulsión. Se centrifugó a 21000 xg por 5 min, del que se obtuvo un sobrenadante que se colocó en otro microtubo donde se agregaron 600 μ L de cloroformo frío, los que se agitaron por inversión suavemente. Nuevamente se centrifugó a 21000 xg por 5 min y una vez separado el sobrenadante, se colocó en otro microtubo en el que se agregaron 600 μ L de isopropanol frío; finalmente, se agitó por inversión suavemente hasta obtener el precipitado de los ácidos nucleicos. Los tubos se colocaron a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó a 21000 xg por 5 minutos, se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no perder la pastilla y se escurrió sobre una toalla sanitaria. Se secó la pastilla en el termoblock a 40 °C durante aproximadamente 15 minutos y finalmente se disolvió en 50 μ L de TE y se almacenó a 4 °C.

4.4.4. Cuantificación de la pureza y calidad del ADN

Para cuantificar la pureza del ADN se utilizó un espectrofotómetro “NanoDrop Lite” de “Thermo Scientific” para lo cual se tomaron 4 μL de ADN disuelto en amortiguador TE. Las lecturas se registraron en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y absorbancia a 280 nm. Las soluciones de trabajo se homogenizaron a una concentración final de 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ la cual se calculó a partir de las lecturas obtenidas con la ecuación: $C_1V_1=C_2V_2$, usando agua de grado Biología Molecular.

La calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 2.0 % y TAE al 0.5 % de 4 mm de grosor. En cada pozo se depositaron 10 μL de la solución de trabajo con ADN. La electroforesis se realizó por 40 min a 140 voltios. El gel se tiñó con solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante 15 min. Después se documentó mediante un transiluminador marca UVP y el paquete Doc-It LS Image Acquisition marca UVP. El ADN de las muestras que generaron bandas demasiado tenues u oscuras se concentraron o diluyeron, respectivamente, y se repitió el gel de calidad hasta que se generaron bandas uniformes. Adicionalmente se realizó una prueba de amplificación mediante PCR del gen 16s y electroforesis de las muestras en gel de agarosa al 1.5 % para verificar la amplificación del ADN como tercera prueba de calidad.

4.4.5. PCR condiciones de amplificación y separación de fragmentos

Se realizaron las reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) con 28 iniciadores (Cuadro 3).

4.4.6. Análisis de geles

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 150 V por 40 min, para posteriormente ser teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y TAE 1 X) durante 15 min y hacer su documentación con luz UV en el fotodocumentador marca UVP y el paquete Doc-It LS Image Acquisition marca UVP. Los genotipos se identificaron como se muestra en el Cuadro 4.

El análisis de los geles obtenidos se realizó al comparar las similitudes y las diferencias en los patrones de bandeo, asignando el valor 0 a la ausencia y 1 a la presencia de cada banda polimórfica. Se cuantificó el número de bandas polimórficas producto de la amplificación para cada iniciador, asignándole un número de acuerdo con la distancia (pb) de migración en el gel construyendo una matriz básica de datos (MBD).

Cuadro 3. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular de *Laelia gouldiana*.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Ta (°C)
ISSR1	(CA) ₈ AAGG	60
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	60
ISSR3	(GA) ₈ CTC	58
ISSR4	(AG) ₈ CTC	58
ISSR5	(AC) ₈ CTA	60
ISSR6	(AC) ₈ CTG	58
ISSR7	(AG) ₈ CTG	58
ISSR8	(AC) ₈ CTT	56
ISSR9	(AG) ₈ C	50
ISSR10	(GA) ₈ T	50
17899 A	(CA) ₆ AG	42
17898 B	(CA) ₆ GT	42
MELS1	(CA) ₆ GG	44
MELS2	(GA) ₆ GG	56
MELS3	(TG) ₇ G	46
PI01	(CA) ₆ AGCT	48
PI02	AGCT(GACA) ₃	48
PI03	(CA) ₆ AGG	48
PI04	(CT) ₈ AGC	58
PHV6	CCA(CT) ₈	60
PHV7	(GTG) ₂ (TG) ₆ T	60
LOL7	(GA) ₆ CC	48
LOL8	(GT) ₆ CC	56
LOL9	CA(CCA) ₂ CGC	38
LOL10	(GTG) ₃ GC	38
UBC807	(AG) ₈ T	50
UBC809	(A G) ₈ G	52
UBC890	VHV(GT) ₇	52

Ta: Temperatura de alineamiento, A: adenina, G: guanina, C: citocina, T: timina.

Cuadro 4. Colectas de *Laelia gouldiana* provenientes de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo.

Colecta	Sitio	Procedencia	Estatus
C0101	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Cultivada
C0102	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Cultivada
C0103	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Cultivada
C0104	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Cultivada
C0105	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Cultivada
M0101	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0102	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0103	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0104	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0105	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0106	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0107	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0108	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0109	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0110	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0111	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0112	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0113	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0114	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0115	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0116	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0117	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0118	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0119	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0120	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0121	1	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0201	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0202	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0203	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0204	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0205	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0206	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0207	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0208	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0209	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0210	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0211	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0212	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0213	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0214	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0215	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0216	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0217	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0218	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0219	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
M0220	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Silvestre
C0201	2	Barranca de Metztitlán, Hidalgo	Cultivada

4.4.7. Análisis estadístico

A partir de los datos moleculares se generaron las distancias genéticas de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) (1912) entre pares de accesiones y posteriormente se llevó a cabo un análisis de agrupamiento mediante el método de varianza mínima de Ward y se construyó un dendrograma mediante el uso del paquete estadístico SAS ver. 9.0. Con objeto de explorar la distribución de la variabilidad genética se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) y adicionalmente se calculó el índice de Shannon-Weaver para evaluar la biodiversidad presente. Estos análisis fueron obtenidos mediante el uso del programa InfoGen® (Universidad de Córdoba, Argentina).

4.5. Resultados y discusión

4.5.1. Análisis de agrupamiento

A partir de la MBD se calcularon las distancias genéticas de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) (1912) entre pares de accesiones y se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método de varianza mínima de Ward. En el dendrograma obtenido (Figura 6), se muestra que a una altura de corte de 0.15 se forman tres grupos bien diferenciados, donde tres genotipos (C0104, M0102 y M0106) conforman un grupo aislándose entre sí y del resto de las agrupaciones. Se observa que, de las poblaciones muestreadas, la más diversa fue la uno, ya que, de los 21 individuos muestreados, catorce genotipos quedaron en el primer grupo (de izquierda a derecha en el dendrograma), junto con siete accesiones de la población dos y cuatro cultivares; en el segundo grupo se congregaron dos cultivares con seis genotipos de la población dos.

En lo referente a la población dos, los genotipos se repartieron en tres grupos: siete quedaron incluidos en el grupo uno junto con otros genotipos y cultivares del sitio uno; seis en el grupo dos junto con dos cultivares provenientes del mismo sitio y los otros siete formaron el grupo tres junto con cuatro individuos de la muestra poblacional uno.

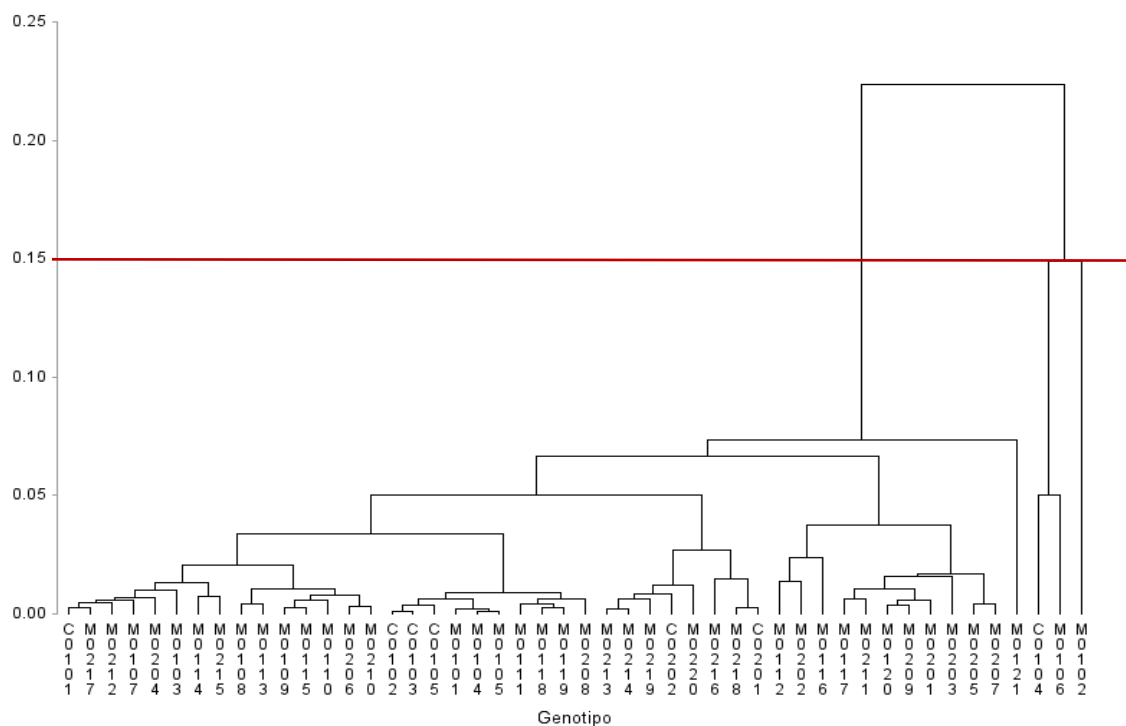


Figura 6. Dendrograma jerárquico derivado de distancias genéticas de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) y algoritmo de mínima varianza de Ward para dos muestras poblacionales *in situ* y cultivares de *Laelia gouldiana*.

La segregación de 2/3 de las accesiones de la población dos en los grupos dos y tres probablemente se debe a que las muestras se tomaron a una distancia de 600 m una de la otra y además se encontraban creciendo en forfitos diferentes, indicando que pueden tener cierta similitud genética entre sí, aunque se encuentran manifiestamente separadas. Estos resultados coinciden con los encontrados por Tian et al. (2018) quienes indicaron una correlación entre las distancias genéticas entre poblaciones silvestres y su distancia geográfica.

En el dendrograma también se puede apreciar que los siete genotipos cultivados se ubicaron en los extremos de cada grupo o subgrupo, indicando que genéticamente fueron diferentes de las poblaciones silvestres, resultados que coincidieron con los observados por Qian et al. (2013), quienes establecieron que los efectos de la fragmentación de poblaciones silvestres conducen a la

diferenciación genética entre los individuos y respecto a las poblaciones cultivadas.

En el extremo izquierdo del dendrograma se observa que cuatro de los genotipos cultivados (C0101, C0102, C0103 y C0104) se agrupan junto con 14 individuos de la población uno, lo cual sugiere que los productores que han cultivado dichas plantas los tomaron originalmente de lo que en este estudio se ha denominado población uno. Más específicamente se aprecia que esos materiales cultivados se encuentran genéticamente emparentados con los genotipos M0101, M0104 y M0105, los cuales se encontraron creciendo en el mismo forofito. Con base en el dendrograma es posible especular que las muestras M0106 y C0104 corresponden al mismo individuo genético, es decir, que se trata de clones.

Al analizar detenidamente el tercer grupo conformado por 6 accesiones de la población dos, se observa que también quedaron incluidos los genotipos cultivados C201 y C0202 (colectados en el mismo sitio de distribución), por lo que es posible que originalmente fueron obtenidos de dicha población e inclusive se podría especular que los genotipos C0201 y M0218 son clones.

Por otra parte, los genotipos M0121, C0104, M0106 y M0102 se separaron completamente del resto de los individuos evaluados, lo que sugiere que al ser genéticamente muy distantes podrían utilizarse para la realización de cruzamientos con éstos, ya que de acuerdo con Li et al. (2021) el desarrollo de nuevas variedades de orquídeas depende en gran medida de la utilización de genotipos genéticamente divergentes para resolver los problemas como la baja capacidad para germinar de las semillas.

Finalmente, con los resultados obtenidos se corrobora que todos los cultivares muestreados provienen de ambas poblaciones y esto tiene sentido, pues la ubicación de los traspatios donde se mantienen bajo semicultivo se encuentra dentro del área de distribución de dichas poblaciones.

Considerando que se desconoce el tiempo de colonización del hábitat en donde crecen las poblaciones de *L. gouldiana* y en ausencia de la localización de otras poblaciones relicto, es muy probable que la variación genética entre ambas poblaciones se ha mantenido mediante los escasos éxitos reproductivos

sexuales en los cuales se logra la formación y maduración de frutos con pocas semillas viables, que son dispersadas, logrando la germinación *in situ*. Esta aseveración puede corroborarse porque durante las visitas a campo fue posible observar por lo menos una planta juvenil en ambas poblaciones. Sin embargo, es importante mencionar que las poblaciones bajo estudio se han mantenido vigentes a través del crecimiento clonal, mismas que año con año desarrollan nuevos brotes.

4.5.2. Análisis molecular de varianza (AMOVA)

En relación con la estructura genética de las poblaciones evaluada mediante los marcadores ISSR, se encontró una gran variabilidad genética (95.54 %) (Cuadro 5). El análisis molecular de varianza permitió determinar que la mayor variabilidad se localizó dentro de las poblaciones y únicamente 4.46 % se estimó entre poblaciones.

La composición y la dinámica de las poblaciones fundadoras históricamente se ha relacionado con la diversidad genética; si la población fundadora contiene pocos individuos, entonces será genéticamente pobre, pero múltiples poblaciones fundadoras y / o poblaciones fundadoras grandes y diversas, tendrán altos niveles de diversidad (Cai et al., 2012).

Cuadro 5. Análisis molecular de varianza (AMOVA) en muestras poblacionales y cultivares de *Laelia gouldiana* provenientes de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo.

F.V.	gl	CM	Componentes de varianza	Variación (%)
Entre	2	0.24**	0.01	4.46
Dentro	45	0.14*	0.14	95.54
Total	47	0.15	0.15	100.0

FV: Fuentes de Variación; gl: Grados de libertad, CM: Cuadrado medio del error. **: sginificativo ($p \leq 0.01$); *: significativo ($p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que los ejemplares muestreados de ambas poblaciones probablemente provinieron de poblaciones grandes y diversas, lo que concuerda con lo señalado por Cai et al. (2012)

quienes mediante el uso de 12 microsatélites en poblaciones de *Dendrobium loddigessi* Rolfe, una orquídea en peligro de extinción en China, encontraron que la mayor diversidad molecular (82 %) se localizó dentro de poblaciones y no entre poblaciones (18 %), similar a los resultados de Xu et al. (2017), quienes al analizar seis poblaciones de *Rhododendron triflorum* con 11 iniciadores ISSR encontraron que el 75 % de la variabilidad molecular se localizó dentro de poblaciones y sólo el 25 % restante ocurrió entre poblaciones.

4.5.3. Descriptiva de marcadores

El análisis de perfiles moleculares de los 48 ejemplares de dos poblaciones silvestres de *Laelia gouldiana* con 28 iniciadores ISSR (Cuadro 6), generó un total de 150 bandas, de las cuales 126 fueron polimórficas, lo cual representó un polimorfismo general del 84 % y se corroboró que ninguna muestra se encontraba repetida. El iniciador con más bandas fue el ISSR 1 con 10 bandas en total, de las cuales todas fueron polimórficas, con un 35 % de amplificación a través de todas las muestras.

El valor más alto de contenido de información polimórfica se obtuvo en el iniciador ISSR 3, seguido por ISSR1, y ISSR 2, por lo que éstos serían los más recomendables a utilizar en estudios posteriores de caracterización molecular en orquídeas, particularmente en el género *Laelia*. La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA) por iniciador también fue encontrada para el iniciador ISSR 3. Esto indica que dicho iniciador mostró un alto grado de confianza en la identificación de individuos genéticamente diferentes en las dos muestras poblacionales en *L. gouldiana*. De manera contraria, los iniciadores MESL-2, MESL-3 y UBC807 mostraron valores bajos de capacidad discriminatoria y contenido de información polimórfica.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Gao y Yang (2006), quienes evaluaron once poblaciones de *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae), orquídea en peligro de extinción de China, encontrando que el iniciador con el dímero (GA)₈ fue el que presentó el mayor contenido de información polimórfica.

Cuadro 6. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización de la divergencia genética de 44 genotipos de *Laelia gouldiana*.

Primer	Secuencia (5'-3')	BP	BM	BT	PMF (95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
ISSR1	(CA) ₈ AAGG	10	0	10	0.9	0.29	0.03	35	1.10E-14
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	7	0	7	0.86	0.27	0.03	71.43	6.20E-10
ISSR3	(GA) ₈ CTC	8	0	8	1	0.33	0.02	49.74	1.90E-15
ISSR4	(AG) ₈ CTC	5	1	6	0.33	0.17	0.04	85.76	2.70E-05
ISSR6	(AC) ₈ CTA	4	0	4	0.75	0.22	0.02	67.19	2.80E-09
ISSR5	(AC) ₈ CTG	7	0	7	0.43	0.13	0.03	89.29	5.90E-05
ISSR7	(AG) ₈ CTG	5	1	6	0	0.05	0.01	81.6	4.10E-02
ISSR8	(AC) ₈ CTT	4	0	4	0.25	0.08	0.01	95.31	7.90E-04
ISSR9	(AG) ₈ C	8	0	8	0.5	0.18	0.04	71.61	7.30E-07
ISSR10	(GA) ₈ T	4	0	4	0.5	0.16	0.02	86.46	6.10E-07
LOL7	(GA) ₆ CC	3	0	3	0.33	0.1	0.01	93.75	2.30E-04
LOL8	(GT) ₆ CC	3	0	3	0.33	0.09	2.50E-03	95.14	1.20E-04
LOL9	CA(CCA) ₂ CGC	3	3	6	0.17	0.08	0.02	97.57	7.80E-02
LOL10	(GTG) ₃ GC	3	2	5	0.2	0.16	0.04	72.08	1.20E-03
17898-A	(CA) ₆ AG	1	3	4	0.25	0.3	0.01	93.75	5.10E-03
17898-B	(CAtt) ₆ GT	8	0	8	0.75	0.16	0.02	83.33	2.10E-06
MESL-1	(CA) ₆ GG	7	0	7	0.86	0.22	0.03	66.96	6.50E-10
MESL-2	(GA) ₆ GG	0	4	4	0	sd	0	100	1
PHV6	CCA(CT) ₈	5	0	5	0.2	0.09	0.01	95	5.90E-04
PHV7	(GTG) ₂ (TG) ₆ T	7	0	7	0.14	0.06	0.01	55.36	7.20E-03
PI01	(CA) ₆ AGCT	5	0	5	0.4	0.11	0.02	64.17	1.90E-03
PI03	(CA) ₆ AGG	2	2	4	0.5	0.18	3.20E-03	94.27	1.30E-03
PI04	(CT) ₈ AGC	5	0	5	0.6	0.14	0.03	64.58	1.50E-05
UBC890	VHV(GT) ₇	5	0	5	1	0.23	0.01	84.17	1.30E-12
PI02	AGCT(GACA) ₃	5	0	5	0.8	0.14	0.01	91.25	1.80E-06
MESL-3	(TG) ₇ G	0	3	3	0	sd	0	100	1
UBC807	(AG) ₈ T	0	3	3	0	sd	0	100	1
UBC809	(A G) ₈ G	2	2	4	0	0.08	0.01	97.92	6.70E-02
Total		126	24	150				77.47	3.80E-136

Bases: A=adenina, G=guanina, C=citosina y T=timina. H = (A, G, T); V = (A, C, G). BP: bandas polimórficas, BM: bandas monomórficas, BT: bandas totales, PMF(95): proporción de loci polimórficos, PIC: contenido de información polimórfica, EE:Error estándar, AMP: porcentaje de amplificación, PDICMA: probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar.

Por su parte Sreedhar et al. (2007) en el análisis molecular de poblaciones de vainilla (*Vainillia planifolia*) hallaron que los iniciadores conteniendo el dímero

(CA)₈ fueron los que proporcionaron el mayor número de bandas polimórficas en la caracterización de 25 accesiones. En la caracterización molecular de 16 poblaciones de 5 especies de orquídeas de Irán, Gholami et al. (2021) observaron que el iniciador con el dímero (GA)₈ fue uno de los que proporcionaron un mayor contenido de información polimórfica. Por su parte Wang et al. (2009) en un estudio en 31 especies de *Dendrobium* encontraron que el iniciador con el dímero (CA)₈ fue uno de los que produjeron un mayor número de bandas amplificadas y mayor contenido de información polimórfica.

En el caso de *Laelia gouldiana*, se había pensado que al ser una especie endémica podría presentar severos problemas genéticos de endogamia; sin embargo, los resultados obtenidos muestran que las poblaciones muestreadas poseen una muy alta variabilidad genética (95.54 %) lo cual es un incentivo para la conservación de este invaluable recurso mexicano. En la Figura 7 se muestran las huellas genómicas obtenidas mediante el uso de los iniciadores ISSR 1 e ISSR 2 de las diferentes muestras poblacionales y cultivares de *Laelia gouldiana*. En ella se pueden apreciar los patrones de bandas bien definidos y claramente distintos entre los individuos evaluados.

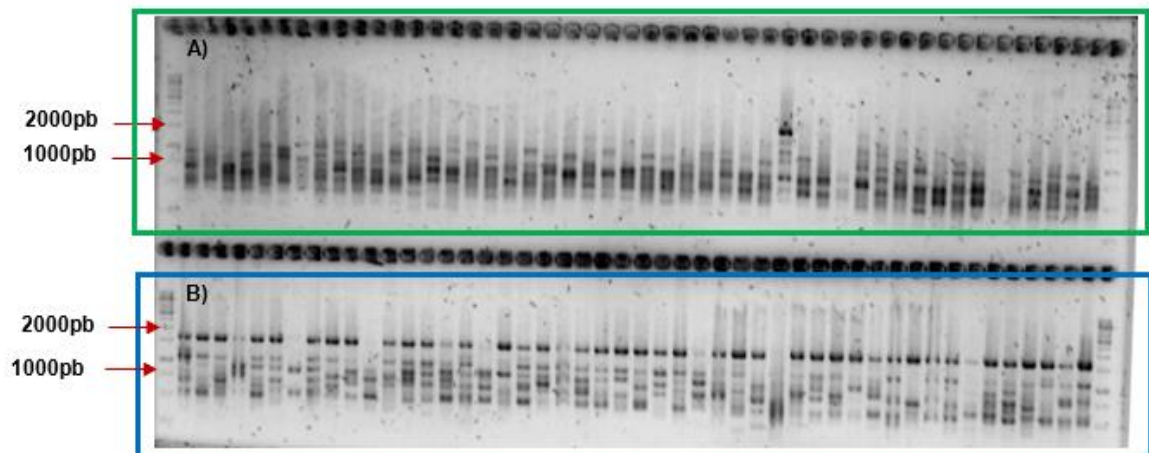


Figura 7. Huellas genómicas de *Laelia gouldiana* Rchb. f. (Orchidaceae) obtenidas mediante el uso de iniciadores ISSR. A) iniciador ISSR 1 y B) iniciador ISSR 2.

4.5.4. Índice de diversidad de Shannon-Weaver

Uno de los índices más utilizados para cuantificar la biodiversidad específica es el de Shannon, también conocido como Shannon-Weaver (Shannon & Weaver, 1949), el cual refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Conceptualmente es una medida del grado de incertidumbre asociado a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad. El cálculo de este índice permite dimensionar la diversidad genética, considerando un valor de cero cuando sólo se presenta un alelo en la población y conforme aumenta el número de alelos éste incrementa su valor y con ello la diversidad genética presente (Pla, 2006). El cuadro 7 presenta el Índice de Shanon para las tres poblaciones evaluadas obtenido mediante 500 ciclos de remuestreo (Bootstrap) (Balzarini & Di Rienzo, 2004).

Cuadro 7. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en muestras poblacionales y cultivares de *Laelia gouldiana* provenientes de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo.

Origen de la muestra	n	I	I _{Boot}	EE _{Boot}	L _I	L _S
Cultivadas	7	4.68	4.66	0.02	4.68	4.69
Población 1	21	4.71	4.70	0.01	4.70	4.73
Población 2	20	4.70	4.69	0.01	4.69	4.71
Total	48	4.71	4.71	0.01	4.70	4.73

L_I: Límite inferior; L_S: Límite superior; I_{Boot}: 500 ciclos de remuestreo (Bootstrap) con intervalo de confianza de 0.95; EE_{Boot}: error del remuestreo.

Los índices de Shannon en las tres muestras poblacionales, una cultivada y dos silvestres, fue de 4.68, 4.71 y 4.70, respectivamente. Con un nivel de confianza del 95 % y usando la aproximación normal, los intervalos de confianza fueron: [4.68-4.69], [4.70-4.73] y [4.69-4.71]. Estos resultados sugieren que las plantas cultivadas presentaron menor diversidad genética respecto a las poblaciones silvestres 1 y 2.

El índice total obtenido en el presente estudio fue de 4.71, el cual se considera alto, lo que indica que a pesar de ser poblaciones relicto y tener una mínima cobertura espacial estos genotipos, aún mantienen una alta diversidad genética. Los valores del Índice de Shannon-Weaver encontrados comúnmente en diversos estudios realizados en orquídeas son generalmente muy bajos, entre $I = 0.169$ en *Cypripedium japonicum* (Tian et al., 2018) y $I = 0.576$ en *Calenthe tsoongiana* (Qian et al., 2013). Los valores del Índice de Shannon-Weaver encontrados en el presente estudio son similares a los obtenidos por Munguía (2018) en la caracterización molecular de dos especies de orquídeas mexicanas: *Chysis bractescens* y *Rhyconcholaelia glauca*, en donde reportó un índice Shannon-Weaver de $I = 5.11$. Estos resultados sugieren que la deriva genética aleatoria junto con un flujo de genes limitado entre las poblaciones han jugado un papel importante en la configuración de los niveles de diversidad genética de esa especie.

Estas poblaciones relicto, al ser relativamente pequeñas, aisladas y específicas en su distribución son restos de una distribución histórica más amplia, que por razones antropogénicas se fueron perdiendo a tal grado de considerarla una especie extinta en estado silvestre. Con este proyecto de investigación se vislumbra un panorama esperanzador para el mantenimiento y conservación *in situ* y *ex situ* a mediano y largo plazo, aprovechando las tecnologías de biología molecular y las técnicas de micropropagación para lograr su reproducción de forma más asertiva y a mayor escala.

4.6. Conclusiones

Los marcadores moleculares ISSR detectaron diversidad genética a nivel población entre y dentro de colectas y cultivares de *Laelia gouldiana* de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo.

4.7. Agradecimientos

Se agradece al Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez por el apoyo académico y de reactivos para la fase de micropropagación y al Químico Ricardo Gaspar Hernández del Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Departamento

de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por todo su apoyo, sus enseñanzas y paciencia durante la realización de la fase experimental de esta investigación.

4.8. Literatura citada

- Arrigoni-Blank, M. F., Santos, M. S., Blank, A. F., Rabbani, A. R. C., Silva-Mann, R., Santos, J. B., Costa, A.S., & Menezes T. S. A. (2016). Analysis of genetic diversity of *Laeliinae* (Orchidaceae) in the state of Sergipe using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1-9. 10.4238/gmr.15027997. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027997>
- Balzarini, M., & Di Rienzo, J. (2004). Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Argentina: Facultad de Ciencia Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- Cai, X., Feng, Z., Hou, B., Xing, W., & Ding, X. (2012). Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Dendrobium loddigesii* Rolfe, an endangered orchid in China, *Biochemical Systematics and Ecology*, 43, 42-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.09.003>.
- Cox-Tamay, L., & Cervantes, U. J. (2016). Laelias: Flores mágicas y ceremoniales. *Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Herbario CICY*, 8, 122–127.
- Gao, L., & Yang, V. (2006). Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis. *Biodiversity Science*, 14 (3), 250-257. DOI: 10.1360/biodiv.060015.
- Gholami, S., Vafaee, Y., Nazari, F., & Ghorbani, A. (2021). Exploring genetic variations in threatened medicinal orchids using start codon targeted (SCoT) polymorphism and marker-association with seed morphometric traits. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(4), 769–785. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00978-4>
- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez, R., López-Rosas, M. A. & Dressler, R. L. (2005). *Las Orquídeas de México*. (p. 304) Instituto Chinoín.
- Halbinger, F. (1993). *Laelias de México*. (p.71). Asociación Mexicana de Orquideología A.C.
- Halbinger, F., & Soto, M.A. (1997) *Laelias of Mexico*. *Orquídea*. 15, 1–160
- Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist*, 11(2), 37–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>

- Li, T., Yang, W., Wu, S., Selosse M-A., & Gao, J. (2021). Progress and prospects of mycorrhizal fungal diversity in orchids. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1-20. 12:646325. doi: 10.3389/fpls.2021.646325
- Loo, J. A. (2011) *Manual de Genética de la Conservación. Principios Aplicados de Genética para la Conservación de la Diversidad Biológica*. (p. 192). Comisión Nacional Forestal. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Munguía, M. A. (2018). *Caracterización molecular y crioconservación de semillas de Chysis bractescens y Rhyncholaelia glauca*. [Tesis de maestría, UACH.]
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583–590.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33911906>
- Qian, X., Wang, C., & Tian, M. (2013). Genetic diversity and population differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a rare and endemic orchid in China. *International Journal Molecular Science*, 14(10), 20399–20413.
- Ramsay, M.M., & Dixon, K. W. (2003). Propagation science, recovery, and translocation of terrestrial orchids. In: Dixon, K.W., Kell, S. P., Barrett, R. L., Cribb, P. C. (Eds.), *Orchid conservation* (pp. 259-288). Natural History Publications, Malaysia,
- Rios, E., Mejia, H., & Alvarez-Castañeda, S. T. (2009). Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. *Ciencia*, 60, 5-13.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Soto, A. M.A. (2002). *Laelia gouldiana* Rchb. f. In: Hágsater, E., & Soto, M. (Eds.), *Icones Orchidacearum. Orchids of México Part 2,3*. Asociación Mexicana de Orquideología.
- Sreedhar, R. V., Venkatachalam, L., & Bhagyalakshmi, N. (2007). Molecular analysis of *Vanilla planifolia* cultivated in India using RAPD and ISSR markers, *Orchid Science and Biotechnology*, 1(1), 25-30.
- Tian, H. Z., Han, L. X., Zhang, J. L., Li, X. L., Kawahara, T., Yukawa, T., López-Pujo, J., Kumar, P., Chung, M. G., & Chung, M. Y. (2018). Genetic diversity in the endangered terrestrial orchid *Cypripedium japonicum* in East Asia: Insights into population history and implications for conservation. *Science Repuplic*, 8, 6467. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24912-z>
- Wang, H. Z., Feng, S. G., Lu, J. J., Shi, N. N., & Liu, J. J. (2009). Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-

simple sequence repeat (ISSR) markers. *Science Horticulture*, 122(3), 440-447.

Xu, J. J., Zhang, L.Y., Zhao, B., & Shen, H.F. (2017). Assessment of genetic diversity among six populations of *Rhododendron triflorum* in Tibet using ISSR and AFLP markers. *South African Journal of Botany*. 108, 175-183. 10.1016/j.sajb.2016.10.023.