

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
CENTRO DE INVESTIGACIONES TROPICALES



Pre-aclimatación de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* y
caracterización de su establecimiento en campo en Chavarrillo, Mpio.
de Emiliano Zapata, Ver.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN ECOLOGIA TROPICAL

PRESENTA
VERENYCE MORALES RUIZ

Comité Tutorial:

Dra. Rebeca Alicia Menchaca García

Dr. Juan Carlos López Acosta

Dra. Irene Ávila Díaz

Xalapa, Veracruz

Mayo 2019

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

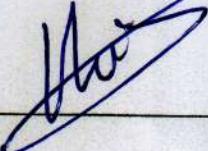
El presente documento titulado “**Pre-aclimatación de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* y caracterización de su establecimiento en campo en Chavarrillo, Mpio. de Emiliano Zapata, Ver.**” realizado por **Verenyce Morales Ruiz**, ha sido aprobado y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de **Maestra en Ecología Tropical**.

Dra. Rebeca Alicia Menchaca García

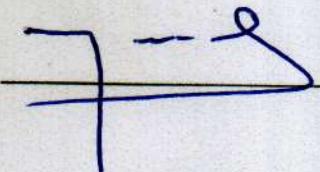


SINODALES

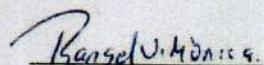
Presidente: Dr. Noé Velázquez Rosas



Secretario: M. en C. David Moreno Martínez



Vocal: M. en C. Mónica Rangel Villafranco

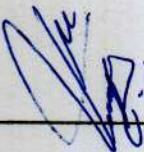


DECLARACIÓN

El presente trabajo de investigación titulado "Pre-aclimatación de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* y caracterización de su establecimiento en campo en Chavarrillo, Mpio. de Emiliano Zapata, Ver.", fue desarrollado por la Biol. Verenyce Morales Ruiz como estudiante de maestría en el Posgrado de Ecología Tropical en el Centro de Investigaciones Tropicales de la Universidad Veracruzana (CITRO-UV), bajo la dirección de la Dra. Rebeca Alicia Menchaca García.

Para tal efecto contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante su Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

El contenido y los resultados de esta investigación son originales y no han sido utilizados anteriormente para obtener otros grados académicos, ni serán utilizados para tales fines en el futuro.



Biol. Verenyce Morales Ruiz

Derechos de autor

Mayo 2019



Dedicatoria



*A mi hermosa Laelía Verenyce, mi hija y a
mi esposo Julio Antonio por su amor,
paciencia y apoyo incondicional,
principalmente durante la maestría y
desarrollo de este trabajo.*

Gracias mis amores

*A mis padres por estar siempre a mi lado
apoyándome en mi profesión y alentarme con
amor para alcanzar mis metas.*





Agradecimientos Personales

A Dios, por darme la vida y bendecirme hoy y siempre.

A la Dra. Rebeca Alicia Menchaca García, por abrirme las puertas del orquídario y de su casa; brindarme su amistad y confianza, escuchar mis sueños e inquietudes... mil gracias por darme la mano, guiarme, alentarme en todo momento a desarrollarlos.

Al M. en C. David Moreno Martínez y su hermosa familia, por su amistad incondicional además de compartir en todo momento experiencias, conocimientos y trabajo del tema que tanto nos apasiona, las orquídeas.

A José Martín Barreda Castillo por su amistad y apoyo incondicional en la etapa final de este trabajo.

A la Dra. Leticia Margarita Cano Asseleih por su amistad y gran apoyo en la presentación oral de la presente tesis.

A Abraham Méndez, por su amistad, apoyo y compañía a campo, donde disfrutamos observando, identificando y contando orquídeas.

A todos mis compañeros y amigos del orquídario con quienes he compartido conocimientos, experiencias y hermosos momentos.

A mis amigas: María, Ilíana y Ana Celia, por la hermandad, respeto, cariño y apoyo incondicional.

A mis compañeros de la maestría con quienes compartí experiencias profesionales y aprendí lecciones de vida.

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Veracruzana y al Centro de Investigaciones Tropicales por aceptarme en el posgrado, así mismo a todos los Doctores y Maestros del CITRO y externos, que influyeron en mi formación y me compartieron sus conocimientos durante el posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca durante dos años, así como también una beca mixta durante mi estancia en el extranjero.

A la Dra. Rebeca Alícia Menchaca García, por confiar en mí y dirigir este trabajo; gracias por su tiempo y dedicación para culminación de la tesis.

A los Asesores: Dra. Irene Ávila Díaz y Dr. Juan Carlos López Acosta, por sus aportaciones, comentarios y sugerencias para el desarrollo y culminación de esta tesis.

A la Dra. Ana Celia Aguilar Chama por su disposición y revisiones para la culminación de la presente tesis.

A los miembros del comité de sínodales: Dr. Noé Velázquez Rosas, M. en C. David Moreno Martínez, M. en C. Mónica Rangel Villafranco, M. en C. Antonio Heriberto Maruri García y M. en C. Lorena Patricia Sánchez Morales, por sus valiosas aportaciones y sugerencias a la presente investigación.

INDICE GENERAL

RESUMEN	12
I.-INTRODUCCIÓN	13
II.- ANTECEDENTES	15
2.1.-Generalidades de la familia Orchidaceae.	15
2.2.-Las orquídeas silvestres, amenazas para su conservación.	17
2.3.-Estrategias para la conservación de orquídeas.	19
2.4.-Técnicas empleadas para el cultivo <i>in vitro</i> en <i>Laelias</i> .	20
2.5.- La aclimatación de plántulas procedentes de cultivo <i>in vitro</i> .	22
2.6.- Estudios sobre patrones de establecimiento natural de especies.	24
III. - GÉNERO <i>LAELIA</i>	28
3.1.-Descripción de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> Lindl.	30
3.2.-Distribución geográfica de la especie.	32
3.3.-Importancia de la especie en la zona centro del estado de Veracruz.	33
IV.- DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO	35
V.- JUSTIFICACIÓN	39
VI.-PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	40
VII.- OBJETIVOS	40
VIII.-METODOLOGÍA	41
8.1.-Obtención de las plántulas de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	41
8.2.-Pre-aclimatación y aclimatación de plántulas	42
8.2.1.- Condiciones de vivero y preparación de materiales.	42
8.2.2.- Montaje del experimento de Pre-aclimatación.	43
8.2.3.- Análisis de datos.	46
8.3.-Establecimiento natural de la especie en campo.	47
8.3.1.-Zonas de estudio.	47
8.3.2.-Muestreo en campo.	48
8.3.3.-Análisis de datos.	50
IX.- RESULTADOS	51
9.1.- Pre-aclimatación para la aclimatación de plántulas de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	51
9.1.1.-Supervivencia	51
9.1.2.-Longitud de plántula.	53
9.1.3.-Número de hojas.	54
9.1.4.-Número de raíces.	55
9.1.5.-Pseudobulbos.	56
9.2.-Establecimiento natural de la especie en campo.	57
9.2.1.-Análisis de Componentes Principales.	57
9.2.2.- <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> (PC1).	59

9.2.2.1.- Altura a la que se encuentran las plantas en el forofito.	59
9.2.2.2.-Tamaño de las plantas.	60
9.2.2.3.-Asociación de la especie	61
9.2.3.-Encinos, forofito de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> (PC2).	62
9.2.3.1.- Altura.	63
9.2.3.2.- DAP.	64
9.2.3.3.- Cobertura.	65
9.3.-Orientación de la especie	66
9.4.-Distribución vertical y ubicación en rama.	67
X.-DISCUSIÓN	69
10.1.- Pre-aclimatación para la aclimatación de plántulas procedentes de cultivo <i>in vitro</i> .	69
10.2.- Establecimiento natural de la especie.	72
XI.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
XII.-BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Morfología floral de las orquídeas en la especie <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	16
Figura 2	Cápsula y semilla de <i>Laelia anceps</i> Lindl.	17
Figura 3	Zonas de distribución de epífitas en el forofito.	25
Figura 4	<i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> (Chavarrillo, Ver.).	28
Figura 5	<i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> . Ilustración científica.	31
Figura 6	Distribución geográfica de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> en México.	32
Figura 7	Uso tradicional de la especie en la región.	33
Figura 8	Cultivo de traspatio de la <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	34
Figura 9	Mapa del área de estudio.	35
Figura 10	Selva baja caducifolia.	36
Figura 11	Selva mediana subperennifolia.	37
Figura 12	Vegetación de galería.	37
Figura 13	Encinar tropical.	38
Figura 14	Cultivo <i>in vitro</i> , germinación y crecimiento de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	41
Figura 15	Subcultivo de las plántulas de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	42
Figura 16	Frascos con plántulas utilizadas en el experimento de pre-aclimatación y aclimatación de la especie.	42
Figura 17	Macetas individuales con las plántulas por tratamiento en el mini- invernadero.	44
Figura 18	Mini-invernaderos con los 7 tratamientos de pre-aclimatación de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	45
Figura 19	Plántula de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> a los 4 meses después de su trasplante.	46
Figura 20	Zonas de estudio para la caracterización de la especie.	47
Figura 21	Toma de datos en campo.	48
Figura 22	Zonas de distribución vertical consideradas para el estudio de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> en encinos.	49
Figura 23	Curvas de supervivencia de las plántulas de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> durante su aclimatación con tratamientos de pre-aclimatación.	52
Figura 24	Longitud total de las plántulas (cm) por tratamiento.	53
Figura 25	Número de hojas por tratamiento.	54
Figura 26	Número de raíces por tratamiento.	55
Figura 27	Formación de pseudobulbo en las plántulas por tratamientos	56

Figura 28	Gráfico bidimensional del análisis de componentes principales para el establecimiento natural de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> en los relictos de encinar tropical.	58
Figura 29	Altura promedio de establecimiento de la <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> en el hospedero.	59
Figura 30	Frecuencia observada de las categorías de tamaño de plantas encontradas.	60
Figura 31	Frecuencia observada de la asociación de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> con otras epífitas en las zonas de estudio.	61
Figura 32	Altura de los árboles hospederos de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> en las zonas de estudio.	63
Figura 33	Diámetro a la altura del pecho (DAP) de los árboles hospederos de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	64
Figura 34	Cobertura (%) de los árboles hospederos de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	65
Figura 35	Diagrama de rosa que indica la preferencia de orientación de la especie.	66
Figura 36	Diagramas de rosa muestran la frecuencia de la orientación de la especie por zonas de estudio.	66
Figura 37	Distribución vertical y ubicación en rama de la especie sobre los forofitos en las zonas de estudio.	67
Figura 38	Ilustración de la distribución vertical y ubicación en rama de <i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> sobre el forofito.	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Porcentaje de sobrevivencia por tratamientos al final del experimento.	51
Tabla 2	Ánálisis de supervivencia en la pre-aclimatación de plántulas al final del experimento (Kaplan-Meier).	51
Tabla 3	Valores de media y error estándar para la variable longitud total en la pre-aclimatación de plántulas por tratamientos.	53
Tabla 4	Valores de media y error estándar para la variable número de hojas en la pre-aclimatación de plántulas por tratamiento.	54
Tabla 5	Valores de media y error estándar para la variable número de raíces en la pre-aclimatación de plántulas por tratamiento.	55
Tabla 6	Muestra los componentes principales del análisis y las variables agrupadas en cada uno.	57
Tabla 7	Variables asociadas que integran el PC1.	57
Tabla 8	Variables asociadas que integran el PC2.	58
Tabla 9	Diferencias significativas con el promedio y error estándar de variable altura del establecimiento en campo de la especie.	59
Tabla 10	Frecuencias observadas y esperadas para la categoría de tamaño por zona.	60
Tabla 11	Frecuencias observadas y esperadas de epífitas asociadas con la especie por zona.	61
Tabla 12	Media con desviación estándar de las variables evaluadas de los árboles por zona de estudio.	62

RESUMEN

En México, *Laelia anceps* subsp. *anceps* es una orquídea de importancia cultural, ornamental y hortícola; sin embargo, la presión antrópica y la extracción ejercida sobre la vegetación natural donde se establece (encinares tropicales) ponen en riesgo su prevalencia, conservación, uso y aprovechamiento sustentable.

Esta especie ha sido ampliamente estudiada en cuanto a su cultivo *in vitro*, así como la aclimatación de las plántulas a condiciones *ex vitro*; sin embargo, se considera necesario realizar estudios de aclimatación en lugares donde finalmente se establecerán, ya sea con fines de reintroducción o aprovechamiento hortícola.

En el presente trabajo, se aborda la pre-aclimatación para una óptima aclimatación de las plántulas procedentes de cultivo *in vitro* en un sitio de distribución natural; donde después de la pre-aclimatación en frasco, se aclimataron las plántulas de manera escalonada cada cinco días, obteniendo 7 tratamientos, los cuales se evaluaron durante 4 meses; los mejores resultados de aclimatación se obtuvieron en plántulas con 10 días de pre-aclimatación en frasco *in vitro*, reflejándose en las variables sobrevivencia, crecimiento y formación de pseudobulbos.

Por otro lado, se realizó la caracterización del establecimiento en campo de la especie en los relictos de encinar tropical en Chavarrillo, Veracruz; considerando que *Laelia anceps* subsp. *anceps* es una especie epífita con preferencia a establecerse en encinos y se encontró que esta orquídea se establece sobre el forofito a una altura de entre 3 y 6 m., en las zonas B, C y D que corresponde dentro de la copa del forofito; se asocia principalmente con otras epífitas (musgos, líquenes y bromelias), se establece sobre la parte superior de las ramas y tiene preferencia de orientarse hacia el norte.

Por lo antes descrito, el presente estudio reúne la información necesaria que puede ser considerada para diseñar programas de reintroducción y/o reabastecimiento de la especie para su conservación en *in situ*, así como mejorar el manejo de las plántulas procedentes de cultivo *in vitro* dentro de vivero.

I.-INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las familias más diversas del reino vegetal, se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales, cuenta con alrededor de 25,000 especies en todo el mundo (Hágsater *et al.*, 2005). En México se estiman unas 1254 especies de orquídeas (Soto-Arenas *et al.*, 2005), las cuales se distribuyen principalmente en los estados de: Oaxaca, Chiapas, Michoacán, Guerrero, Puebla, Morelos, Jalisco, San Luis Potosí y Veracruz. Para el Estado de Veracruz se tienen reportadas 433 especies (Castañeda-Zarate, *et al* 2012), siendo *Epidendrum*, *Encyclia*, *Oncidium* y *Pleurothallis*, los géneros más representados (Landa-Cortina, 1992).

Desafortunadamente, este grupo de plantas como muchas otras, enfrentan diversos problemas que han llevado a la disminución de sus poblaciones naturales, entre los cuales está el cambio de uso de suelo para actividades agrícolas, la extracción ilegal de plantas, el incumplimiento de la legislación ambiental, aprovechamiento y conservación y la falta de asesoría, que deja de lado la participación de las comunidades locales para su manejo (Menchaca-García y Moreno-Martínez, 2011), dicho escenario pone en riesgo la abundancia y diversidad de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005 y IUCN /SSC Orchid Specialist Group, 1996).

El género *Laelia* es uno de los géneros nativos mejor conocidos en nuestro país el cual consta de 11 especies que se distribuyen principalmente en la Sierra Madre Occidental, Eje Volcánico, Sierra Madre del Sur, Sierra Madre Oriental e Isthmo de Tehuantepec (Halbinger y Soto, 1997).

Estas especies son apreciadas y cultivadas debido a su importancia cultural y ornamental (Halbinger, 1993). De manera particular, *Laelia anceps* Lindl. es una de las especies con mayor importancia hortícola, siendo la más empleada en programas de hibridación (Soto-Arenas, 1993).

Laelia anceps Lindl. consta de dos subespecies: *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* que se distribuye en la zona del Pacífico y *Laelia anceps* subsp. *anceps* que se distribuye por la vertiente del Golfo de México, principalmente en los estados: San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz, cuyas

poblaciones suelen tener ejemplares con alta variación fenotípica (forma, tamaño y color) recibiendo nombres de interés hortícola mas no taxonómico (Soto-Arenas, 1993).

Debido a que esta especie es ampliamente utilizada para fines tradicionales y en vista de su potencial ornamental; es necesaria tomar medidas pertinentes para su conservación y aprovechamiento, ya que sus poblaciones naturales se ven afectadas por la presión antrópica, la cual podría generar consecuencias negativas importantes para la conservación de la especie.

De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010; la cual incluye un listado de las especies de flora y fauna silvestre con alguna categoría de riesgo y especificaciones de inclusión, exclusión o cambio de estas; *Laelia anceps* subsp. *anceps* no se encuentra incluida, sin embargo, es necesario generar una línea base de conocimiento para la implementación de estrategias para la conservación de la especie manera *ex situ*, *in situ* y *circa situm* (conservación dentro paisajes agrícolas alterados ya sea sistemas agroforestales o huertos caseros, fuera de la naturaleza, pero dentro del rango geográfico nativo de la especie) (Dawson, et al., 2013).

En el presente estudio se propagaron plántulas mediante técnicas de cultivo *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* y con el fin de establecer un protocolo eficiente para la aclimatación de las plántulas, para lo cual se consideró una fase importante, la pre-aclimatación, para asegurar mayor sobrevivencia y crecimiento de las plántulas procedentes de cultivo *in vitro*; así mismos se realizó la caracterización de los patrones del establecimiento en campo de la especie en diferentes zonas contrastantes dentro del encinar tropical. Con los resultados obtenidos, nos permiten realizar propuestas de manejo para la conservación y/o reintroducción de la especie *in situ*.

II.- ANTECEDENTES

2.1.- Generalidades de la Familia Orchidaceae

Las orquíáceas son la familia más evolucionada y diversa del reino vegetal, la cual comprende un total de aproximadamente 25 mil especies (Chase *et al.*, 2015) y su distribución es extendida por todo el mundo, siendo particularmente abundantes en las regiones tropicales y subtropicales. Las orquídeas son cosmopolitas, están presentes en todos los continentes, sin embargo, su distribución no es uniforme ya que se concentran hacia los trópicos e incluso dentro de los mismos varía entre continentes y regiones, las cuales aparentemente tienen poco en común, sin embargo, la diversidad de hábitat, geología, clima y el grado de aislamiento son los principales factores que influyen en la distribución de esta familia (Dressler, 2005).

Las orquídeas son plantas herbáceas, monocotiledóneas con venación foliar paralela, ovario ínfero y partes florales en múltiplos de tres (Dressler, 1982); sus hábitos de vida, se clasifican en terrestres, epífitas, litófitas y saprófitas; tienen dos tipos de crecimiento: simpodial el cual se caracteriza por tener el crecimiento del tallo paralelo al suelo o rama sobre la que crece la planta y monopodial el cual se caracteriza por tener el crecimiento del tallo de manera perpendicular al suelo; tienen raíces especializadas las cuales dependiendo del hábito de vida pueden ser con o sin cormos, rizomas cortos o largos, con y sin velamen; también pueden tener o no pseudobulbo (Dressler, 1993, Suárez-Quijada, 2010).

La familia Orchidaceae ha sido estudiada desde Darwin (1877) hasta la actualidad y una de las principales características morfológicas distintivas de esta familia es su morfología floral, la cual es compleja y con adaptaciones atribuidas a los diferentes polinizadores (aroma, forma y color) (Hágsater *et al.* 2005).

En general, las flores presentan simetría bilateral, tienen seis piezas florales, de las cuales tres son sépalos (iguales entre sí) en la parte posterior de la flor y tres pétalos, de cuales dos son iguales y uno modificado ubicado en el centro llamado “labelo”, característico de las orquídeas (Fig. 1), el cual puede presentar ornamentos como callos, puede producir néctar, aceites o compuestos aromáticos, puede estar envolviendo o enmarcando a la columna, estructura única compuesta por la fusión de los órganos sexuales masculinos y femeninos, en donde en la punta de esta estructura se encuentra la antera cubierta por un casquete cuya función es proteger los polinios, los cuales

pueden estar dispuestos en paquetes de 2, 4 y 8, dependiendo del grupo taxonómico; abajo del casquete se encuentra el estigma, lugar a donde el polen debe llegar para la formación de frutos; las estructuras femenina y masculina se encuentran divididas por el rostelo, el cual es una glándula que segregá viscidio, sustancia pegajosa que ayuda a que el polen se adhiera a la cavidad estigmática cuando es transportado por insectos o permitirle al insecto adherirse los polinios al retirarse; además impedir la autopolinización (Menchaca-García y Moreno-Martínez, 2011).



Figura 1.- Morfología floral de las orquídeas en la especie *Laelia anceps* subsp. *anceps* . Tomada por Morales-Ruiz, 2017.

Las orquídeas son plantas básicamente entomófilas, es decir, son polinizadas principalmente por insectos, aunque en las zonas tropicales existen especies polinizadas por aves (colibríes)(Dressler, 1982); sus flores presentan un conjunto de atributos relacionados con la atracción del polinizador, como son: simetría dorsiventral de las flores, labelo posadero para los insectos basado en colores pertenecientes al espectro visual de los insectos, producción de néctar a veces almacenado en espolones o cavidades de la flor, dibujos, manchas o marcas en las flores; especialmente en el labelo, llamadas “señales del néctar”, producción de sustancias aromáticas, etc. (Hágsater et al., 2005).

Después de la polinización, los óvulos se fecundan e inicia el crecimiento del ovario hasta formar un fruto denominado cápsula, las cuales son tricarpeladas y pueden ser largos, ovalados, redondos o angulosos, dependiendo del género (Menchaca-García y Moreno-Martínez, 2011), estos al madurar se abren y liberan las semillas las cuales se dispersan por el viento, se estima que una

cápsula puede contener entre 1300 a 4 millones de semillas, cada semilla puede pesar entre 0.3 a 14 microgramos y el tamaño de las mismas oscila de 0.25 a 1.2 milímetros de longitud y de 0.09 a 0.27 mm. de ancho; dependiendo de la especie; por ejemplo, las semillas de *Laelia anceps* Lindl., miden 0.250 x 0.075 mm (Arditti, 1967 y Arditti y Ghani, 2000); por lo cual se les conoce como semillas polvo y cada semilla consta de una testa con sus correspondientes polos y un embrión el cual carecen de sustancias de reserva (Fig. 2) (Menchaca-García y Moreno-Martínez 2011).

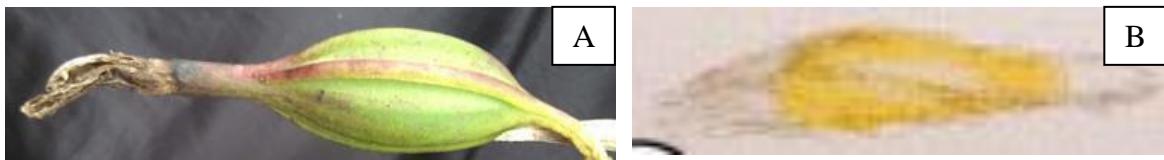


Figura 2.- A.- Cápsula de *Laelia anceps* Lindl. (Morales-Ruiz 2019) y B.- Semilla de *Laelia anceps* Lindl. Tomada de Arditti y Ghani, 2000.

La germinación de las semillas de orquídeas en la naturaleza ocurre solamente cuando la semilla se encuentra en un ambiente con las condiciones favorables, además de establecer una relación simbiótica con hongos micorrízicos los cuales le aportan al embrión nutrientes necesarios para germinar (semillas son micoheterótrofas), por lo que de las miles de semillas que puede contener un fruto, al ser liberadas y dispersadas por el viento, sólo 1 de 1000 logran germinar en su hábitat natural (Hágsater et al., 2005).

2.2.- Las orquídeas silvestres, amenazas para su conservación.

México, así como la mayoría de los países, enfrenta serios problemas para la conservación de las orquídeas, donde los factores principales que influyen son las actividades agropecuarias por el cambio de uso de suelo, deforestación, comercio ilegal, urbanización, y cambio climático (Tejeda-Sartorius, et al. 2017, Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007).

En cuanto a orquídeas, la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) incluyen 187 especies en cuatro categorías: amenazadas (A) en un 33.42%, protección especial (Pr) con 58.47%, en peligro de extinción (P) con un 7.58% y en extinción (E) el 0.53%; además de que el 40% de las especies enlistadas son endémicas de México (SEMARNAT,2010).

De acuerdo con la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), todas las especies mexicanas de la familia Orchidaceae están incluidas en el Apéndice II, excepto los híbridos reproducidos artificialmente de los géneros *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* y *Vanda*; siempre y cuando cumplan con las condiciones impuestas por la convención y ser especímenes fácilmente identificables como reproducidos artificialmente, presentar un elevado grado de uniformidad y aspecto saludable, cumplir con las normas de envío acompañadas de los documentos CITES apropiados y factura, etiquetados y empaquetados. En este apartado entran todas las partes y derivados de las plantas, excepto semillas, polinias, flores cortadas de plantas reproducidas artificialmente, frutos, partes y derivados de plantas naturalizadas o reproducidas artificialmente del género *Vanilla* (CITES, 2017).

La familia Orchidaceae a pesar de ser tan numerosa y extendida en el planeta, muchas son raras e incluso pueden ser susceptibles a la extinción o amenazadas, principalmente las que por naturaleza tienen un rango geográfico limitado; en México tenemos una especie rango geográfico limitado, *Mexipedium xerophyticum*, que se encuentra en la zona de los Chimalapas, Oaxaca; esta especie de rareza demográfica y restricción de hábitat se encuentra catalogada como en peligro de extinción ya que solo se reportan 11 individuos (Cribb, et al., 2003); debido a que su población probablemente ha sido arrasada de su hábitat natural a causa de incendios forestales; sin embargo, su conservación de manera *ex situ* ha sido exitosa a través de la propagación *in vitro*, regulando su comercio a través de viveros comerciales, lo cual ayuda a reducir la presión ejercida a las poblaciones en su hábitat natural (Pérez-García, 2010).

En cuanto al género *Laelia*, cuatro especies se encuentran enlistadas en la Norma Oficial Mexicana, de las cuales tres especies son endémicas y una en peligro de extinción, *Laelia gouldiana* esta especie es endémica del Metztitlán, Hidalgo y actualmente está extinta de su hábitat natural como consecuencia de sobrecolección y hábitat alterado, por lo que sólo se encuentran ejemplares en colecciones privadas y jardines botánicos (Bertolini et al., 2012). *Laelia anceps* subsp. *dowsonii*, especie propia de la vertiente del Pacífico y Sierra Madre del sur, en los estados de Oaxaca y Guerrero (Salazar-Rojas, et al. 2007) y *Laelia speciosa*, especie endémica de la zona centro y occidente del país, en donde sus poblaciones son vulnerables por sobreexplotación además de ser una especie de lento crecimiento (Ávila-Díaz y Oyama, 2007).

2.3.- Estrategias para la conservación de orquídeas

Son muchos los esfuerzos que se hacen para conocer y conservar la orquideoflora mexicana, considerando que las orquídeas se pueden conservar dentro (*in situ*) o fuera (*ex situ*) de su hábitat natural y que de manera conjunta (*in situ* y *ex situ*) se pueden obtener mejores resultados para la conservación de las especies, se han implementado diversos programas de conservación, dentro de las técnicas *ex situ*, se encuentra el establecimiento de bancos de semillas, técnicas de micropropagación y cepario de hongos micorrízicos (Cribb *et al.*, 2003).

En cuanto a conservación *in situ*, está enfocada principalmente en la preservación de la especie en su hábitat natural, la cual es la estrategia ideal por el hecho de que mantiene la variación genética y sus interacciones con otros organismos (Atwood, 1997).

Otra manera de conservar especies es cerca del sitio de donde se distribuyen, actualmente esta modalidad de conservación comunitaria es de las que se consideran más efectivas nombrada *circa situm* (conservación dentro de paisajes agrícolas alterados ya sea sistemas agroforestales o huertos caseros, fuera de la naturaleza, pero dentro del rango geográfico nativo de la especie) (Dawson, *et al.*, 2013), modalidad que permitirá a futuro mejorar los programas para la reintroducción de especies *in situ*.

Culturalmente a las orquídeas se les han atribuido diversos usos, algunas especies son utilizadas con fines medicinal, alimenticio, cosmético, ornamental, sociocultural y religioso; el uso ornamental les ha provisto un gran valor hortícola, teniendo alta demanda, aunque cede el paso al comercio ilegal de especies (factor que afecta directamente a la pérdida de especies); sin embargo, esta se puede frenar en la medida en que se de abasto a la demanda. Para contribuir a la conservación de las especies, es necesario implementar diversas estrategias *in situ*, *ex situ* y *circa situm* y programas para el aprovechamiento sustentable de las especies (Seaton, *et al.*, 2013 y Seaton y Ramsay, 2005).

En México, uno de los géneros más apreciado y que de manera tradicional ha sido cultivado, es el género *Laelia*, el cual posee valor cultural y ornamental, lo cual ha provocado en gran medida la reducción de sus poblaciones naturales (Halbinger y Soto, 1997); este género ha sido muy

estudiado, por lo que se ha contribuido en gran medida al conocimiento de las especies para su conservación (Hágsater *et al.*, 2005).

En México la forma legal más importante de propagación, cultivo y venta de orquídeas es a través de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), promovidas y apoyadas por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (Tejeda-Sartorius, *et al.* 2017), esta estrategia de conservación permite promover el cultivo y aprovechamiento sustentable de las especies en las comunidades rurales mediante viveros debidamente registrados lo cual permitirá disminuir la presión ejercida por la recolección en las poblaciones naturales (Menchaca-García, *et al.*, 2012).

En México de acuerdo a la Ley General de Vida Silvestre, las UMAs son las Unidades de Manejo para la conservación de la vida silvestre y son una figura legal para el aprovechamiento de especies que se encuentran dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059 (SEMARNAT, 2010), en nuestro país hay registradas 73 UMAs de orquídeas (Sánchez Morales, 2015), en la cuales llevan a cabo la propagación vegetativa y/o asexual de las especies para su conservación, además de ser una alternativa de aprovechamiento sustentable y conservación; dicha actividad puede llegar a ser económicamente importante ya que México cuenta con gran cantidad de especies de importancia hortícola y con variación genética única (Aguirre, 2012 y Rocha y Duque, 2017).

2.4.-Técnicas empleadas para el cultivo *in vitro* en *Laelias*.

En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, en las que se han empleado medios líquidos con diferentes soluciones para cultivo. En particular, para el género *Laelia* se han realizado siembra de semillas procedentes de frutos maduros e inmaduros con diferentes concentraciones de medio de cultivo, subcultivos con medios adicionados con fertilizantes comerciales, diferentes fuentes de carbohidratos; donde se han evaluado su germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas (Romero-Tirado, 2008), y evaluaciones del crecimiento (Sánchez-Roldan, 2009).

Por otro lado, se ha experimentado adicionando extractos naturales al medio de cultivo como son el agua de coco, homogeneizado de papa e hidrolizado de caseína, los cuales ayudan al

crecimiento y desarrollo de las plántulas, también se ha experimentado con otras fuentes de azúcares como el manitol, sorbitol y sacarosa, adicionando reguladores de crecimiento como el ácido absísico (ABA) y temperaturas bajas como regulador de crecimiento (Castañeda-Zárate, 2008). Lee-Espinosa *et al.*, 2007) probaron la adición de reguladores de crecimiento (BAP, ANA, Kin y AIA) al medio de cultivo para *Laelia anceps* subsp. *dawsonii*, los cuales indujeron el crecimiento de callos que al ser sub-cultivados obtuvieron plantas completamente desarrolladas, las cuales lograron aclimatar en invernadero.

En *Laelia autumnalis* se ha experimentado la germinación de semillas de manera asimbiótica con diferente calidad de luz (filtros de colores), resultando de gran importancia para la germinación, crecimiento y desarrollo de las plántulas en condiciones *in vitro* (Sierra-Jiménez, 2006).

Con *Laelia speciosa*, una de las especies del género más estudiada, se han realizado diversos estudios de germinación adicionando benciladenina al medio de cultivo compuesto que bajo diferentes condiciones de luz ha permitido obtener resultados favorables para la germinación y se ha establecido como protocolo para coadyuvar a la conservación de la especie (Ávila-Díaz, 2009). Con esta misma especie Aguilar-Morales *et al.* 2013, realizaron pruebas de germinación probando el tipo y concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962 y Knudson, 1946; en frutos maduros e inmaduros encontrando que el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962 y Knudson, 1946) al 100 % es el mejor tratamiento para la germinación de semillas de frutos inmaduros de esta especie.

El cultivo *in vitro* de plantas (micropagación) ha sido ampliamente utilizado para obtener de manera rápida y masiva plantas de diversas especies, que se desarrollan y crecen bajo condiciones controladas (Pedraza-Santos, 2017); desafortunadamente cuando éstas pasan a condiciones *ex vitro* (invernadero o campo), la sobrevivencia se reduce, por lo que ha sido necesario implementar diversas estrategias para maximizar la sobrevivencia de las plántulas en condiciones *ex vitro* (Menchaca-García, *et al.* 2012).

2.5.- La aclimatación de plántulas procedentes de cultivo *in vitro*.

La aclimatación de plántulas cultivadas *in vitro* es la última fase del proceso de micropagación y es considerada una etapa crítica en donde se determina la sobrevivencia y establecimiento de las plántulas, este proceso implica cambios drásticos en las condiciones de cultivo (Francisco-Nava, *et al.* 2011).

Cuando las plántulas se encuentran bajo condiciones *in vitro* por el hecho de estar en un entorno aséptico, no desarrollan resistencia contra patógenos, presentan pequeñas variaciones de temperatura, alta humedad y disposición de nutrientes, baja intensidad de luz y emisión de carbono, es decir son heterótrofas o fotomixotróficas por presentar baja tasa de fotosíntesis, nulo funcionamiento de estomas y reducción de la cera; es decir, las plántulas presentan deficiencias morfofisiológicas (Pospisilova *et al.*, 1999 y Teixeira da Silva *et al.*, 2017).

Cuando las plántulas procedentes de cultivo *in vitro* se someten a condiciones *ex vitro* se estresan y la supervivencia se ve afectada por las deficiencias fisiológicas y anatómicas que tienen las plántulas cuando están bajo condiciones *in vitro*, siendo necesario corregir su funcionamiento estomático (forma circular a elíptica) y densidad de los mismos para controlar su transpiración y evitar la deshidratación, por lo que se recomienda pasar de manera gradual de humedad alta a baja; regular el intercambio gaseoso y presentar endurecimiento de cutícula, y optimizar su capacidad fotosintética para tolerar condiciones ambientales adversas (Montes-Cruz, *et al.* 2016 y Ortega-Loeza, *et al.*, 2011, Hazarika, *et al.*, 2006, Teixeira da Silva *et al.*, 2017).

Para obtener resultados óptimos en la aclimatación, es importante considerar los hábitos de crecimiento de la especie (terrestre, epífita, saprófita, litófita o micoherotrófica) y poder seleccionar los sustratos adecuados para obtener una eficiente aclimatación de las plántulas procedentes de cultivo *in vitro*. En orquídeas epífitas se han desarrollado algunos trabajos de aclimatación de plántulas de especies que se encuentran en la Norma Oficial Mexicana; así que Ortega-Loeza *et al.* (2011) en su investigación desarrollaron un protocolo para la aclimatación de plántulas de *Laelia speciosa* procedentes de cultivo *in vitro* utilizando macetas individuales con sustrato de tezontle y corteza de pino en proporción en condiciones de invernadero; antes de aclimatar, realizaron una pre-aclimatación de las plántulas dentro de los frascos en el invernadero y después las aclimataron de

manera escalonada cada 5 días (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30) con estancia en invernadero; evaluaron la dinámica de estomas, supervivencia y crecimiento de las plántulas obteniendo los mejores resultados en plántulas con 20 días de pre-aclimatación con un 97.5% de supervivencia.

En *Laelia autumnalis* (Sierra-Jiménez, 2006) realizó mezclas de cuatro sustratos inertes y esterilizados para la aclimatación de las plántulas, además evaluó la aplicación de fertilizante foliar y granular a las plántulas durante el proceso de aclimatación, obteniendo resultados favorables en sobrevivencia con la mezcla de sustratos perlita con sphagnum con la aplicación de fertilizantes foliares. Así mismo, Heredia *et al.* (2009) realizaron aclimatación de *Laelia halbingeriana*, especie endémica de Oaxaca, evaluaron durante 6 meses y utilizaron tres mezclas de sustratos y una fertilización en cuatro concentraciones de nitrógeno, consideraron las variables altura de la planta, número de hojas, ancho de la hoja mayor, número de pseudobulbos, formación de raíz y formación de brotes, obteniendo los mejores resultados con la mezcla de sustratos turba con grava volcánica y con una fertilización de 30 y 50 mg/l. de concentración de nitrógeno, observando formación de pseudobulbos a partir del cuarto mes de experimento.

Nava *et al.* (2011) aclimataron plántulas de *Laelia eyermaniana* de diferentes tamaños y las sembraron en macetas con domo en sustrato de fibra de palma (*Brahea dulcis*) a temperatura de 25° C y fotoperiodo de 16 hr. luz /8 hr. de oscuridad; el domo lo abrían cada 15 días hasta retirarlo totalmente a los 45 días; evaluaron la sobrevivencia a los 90 días y obtuvieron 46.9% de sobrevivencia, registrando mayor mortalidad entre los 60 y 90 días; observaron que la densidad estomática incrementó en la región abaxial de las hojas (56 a 103 estomas por mm²) y se percataron que en la región adaxial de las hojas de las plántulas *in vitro* como *ex vitro* no presentaron incremento en la densidad estomática, manteniéndose en proporción de 2.5 estomas por mm².

Para la especie *Laelia anceps*, Castañeda-Zárate (2008) realizó la aclimatación de plántulas analizando la relación de los tratamientos de cultivo *in vitro* bajo condiciones *ex vitro* con dos sustratos: tepezil y una mezcla de corteza de pino, carbón vegetal en proporción 1:1:1, obteniendo una alta sobrevivencia, en tepezil 82.42 % y en la mezcla el 82.92%; además aplicó dos fertilizantes foliares (Nitrofoska® y lombricomposta líquida), obteniendo mejores resultados en cuanto en crecimiento con la aplicación de lombricomposta.

La importancia de estos estudios radica en el éxito en cuanto a sobrevivencia y crecimiento de las plántulas durante su aclimatación, mejorando el manejo para cada especie y contribuyendo a su conservación.

2.6.- Estudios sobre patrones de establecimiento natural de especies.

Las plantas epífitas incluyen a las familias de las bromelias, aráceas, helechos, orquídeas, entre otras; son plantas que crecen sobre árboles sin tener una relación fisiológica con sus forofitos (no son parásitas), únicamente los utilizan como soporte ya sea de las ramas o del tronco (Benzing, 1990). Las orquídeas epífitas tienen adaptaciones ecofisiológicas que les permiten establecerse sobre los árboles, los cuales, por su forma biológica, altura, textura de corteza en tronco-ramas, arquitectura del follaje (perenne o caducifolia) y las condiciones ambientales, les permiten mantener una relación estrecha con el forofito, ubicándose dentro de los diferentes estratos arbóreas según las necesidades de cada especie (Granados-Sánchez, *et al*, 2003).

La distribución de las orquídeas epífitas sobre el forofito responde principalmente a la necesidad luz y humedad de la especie y en segunda instancia al sustrato; sin embargo, podemos encontrar algunas especies con preferencia por un tipo de sustrato y en segunda instancia la intensidad de luz; de acuerdo a esto, existe casi ausencia de plantas epífitas bajo las copas de los árboles (tronco) debido a la baja intensidad lumínica, por lo que este es el factor limitante para la distribución de orquídeas sobre el forofito (Johansson, 1974).

El establecimiento de las epífitas sobre los diferentes estratos arbóreos depende de la interacción entre los mecanismos morfofisiológicos de las semillas y las características del forofito y posteriormente su éxito depende de la habilidad de la especie para competir por determinados recursos y la capacidad de adaptarse a la heterogeneidad del medio (Zots y Andrade, 2002). La edad del forofito es importante. Cuantos más años tenga el árbol, permitirá el establecimiento de comunidades epífitas estables (Higuera, 2008); aunque también se ha reportado que los árboles con crecimiento lento, copa abierta, cortezas estables y absorbentes resultan ser los mejores forofitos (Ceja-Romero, *et al.*, 2008).

La distribución vertical de las epífitas puede ser explicado en base a las zonas propuestas por Johansson (1974), quien subdividió a el forofito en cinco zonas, esto en función de la composición de especies epífitas encontradas. Las zonas propuestas son las siguientes: Zona I: Parte basal del tronco, Zona II: Largo del tronco hasta la primera ramificación, Zona III: Parte basal de las ramas grandes, Zona IV: Parte media de las ramas grandes y Zona V: Parte exterior de las ramas grandes (Fig. 3).

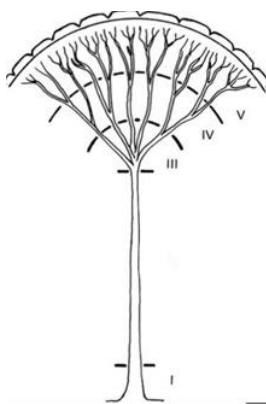


Figura 3.- Zonas de distribución de epífitas en el forofito propuesta por Johansson en 1974. Tomada de Johanson, 1974.

En nuestro país, algunas investigaciones relacionadas con la distribución vertical de especies de orquídeas epífitas sobre los forofitos, destaca el estudio realizado en Reserva de la Biosfera “El Cielo”, Tamaulipas, el cual describe la distribución vertical de las especies epífitas del bosque mesófilo de montaña sobre forofitos, las cuales muestran preferencia hacia las zonas III y IV, correspondientes a las partes basal y media de las ramas (García Balcázar, 2012). Así mismo Morales-Hernández, *et al.* (2016) realizaron la caracterización de las orquídeas epífitas y sus forofitos en el parque ecológico universitario de la Universidad Autónoma del Estado de México, en donde registraron nueve especies de forofitos, donde *Quercus spp.* muestra valores más altos de importancia.

En el estado de Veracruz, específicamente en la zona arqueológica y áreas adyacentes a El Tajín, se realizó un estudio de distribución vertical e identificación de árboles hospederos para las especies de orquídeas *Lophiaris cosymbephorum*, *Oncidium sphacelatum* y *Catasetum integerrimum*

logrando identificar once especies de forofitos los cuales alojaban a las especies en la parte exterior de la copa (Ortiz de Ángel, 2017).

En el estado de Chiapas se realizó el estudio de la distribución espacial de *Erycina crista galli* sobre plantas de café, donde la especie determinó su distribución espacial en función de altura u diámetro en ramas, siendo abundantes en ramas menores de dos centímetros de grosor, además de influir fuertemente la arquitectura del hospedero (Maldonado-Flores, 2005).

Para *Prosthechea aff. karwinskii*, determinaron los patrones de distribución vertical y horizontal de acuerdo con su estructura poblacional; censaron 355 individuos, considerando: largo y ancho del pseudobulbo más joven bien desarrollado, número de eventos reproductivos, sección y zona del forofito, orientación, posición en la rama y sustrato; ésta especie presentó una distribución mayor en la copa, en la parte media e interna de las ramas; las plántulas se establecen en la parte lateral y en ramas verticales, mientras que las plantas adultas en la posición lateral y debajo de las ramas; las orientaciones al Este, Sur y Oeste principalmente; las plántulas presentaron la mayor frecuencia sobre sustrato de liquen, las juveniles sobre liquen y corteza y las adultas tuvieron mayor afinidad por la corteza, la distribución resultó más homogénea en las primeras fases de vida, observando que *Prosthechea aff. karwinskii* tiene como hospedero específico a *Quercus desertícola* (Cedillo, et. al. 2013).

Dentro de los trabajos realizados en otros países, destaca el estudio de distribución de *Lepanthes eltoroensis*, orquídea epífita y amenazada en el Bosque Nacional Yunque, Puerto Rico (Tremblay y Velázquez, 2009) en donde evaluaron la preferencia de posición cardinal de las poblaciones sobre los troncos de los árboles, así como la saber si existe una relación entre árboles grandes con las poblaciones más grandes; los resultados que obtuvieron son que la especie tiene preferencia por el lado noroccidental de los troncos de los árboles y no encontraron evidencia entre el tamaño de los árboles con el tamaño de la población, por lo que los autores sugieren que para lograr una mayor sobrevivencia de la especie cuando se considere una reubicación o establecimiento de nuevas poblaciones, se tome en cuenta los resultados de este estudio.

En Cuba, específicamente en la finca Pinar del Río, se estudió *Ionopsis utricularioides* (García-González y Riverón-Giró, 2014) determinaron la estructura poblacional y hábitos de crecimiento de la especie en huertos de naranjo considerando las variables: altura y diámetro de los naranjos y ramas donde crecían la especie, distribución de las plantas (tronco, ramas o ramillas), estadio de vida, solitarias o agregadas y orientación de las orquídeas en el forofito. En tan solo ocho forofitos encontraron 217 plantas, cuya distribución y crecimiento dentro del árbol es de 98.61% en ramillas, nunca en el tronco de los árboles; registraron sólo dos estadios de vida y creciendo en agregación con otros individuos de su misma especie y con otras especies de epífitas vasculares; además de se identificó como una población establecida y madura, no presentó una marcada preferencia en cuanto a orientación, sin embargo destacan un 16.1 % al este y 16.6% al suroeste; posteriormente.

También en Cuba dentro del Parque Nacional Desembarco del Granma se realizó el estudio en una población de *Tetramicra malpighiarum*, especie endémica cubana, considerando la abundancia de la especie, clases de vida de los individuos (inmaduros y adultos), forofitos sobre los que crecían, micrositios que ocupaban en los mismos (tronco, ramas o ramillas), si los individuos estaban solitarios o agregados y orientación cardinal que tenían las plantas sobre los forofitos; registraron veinte forofito de siete especies con 254 individuos. El estudio demostró que el 69.3 % de los individuos fueron adultos y el 93.7% creciendo en las ramillas tanto de manera agregada como solitaria y la población mostró tendencia a crecer con orientaciones sur y noroeste principalmente (García-González, et al., 2016).

Como podemos visualizar, trabajos de esta índole, destacan las características tanto del hospedero como de su ubicación específica las cuales favorecen el establecimiento de las orquídeas epífitas, esta información básica y necesaria debe ser considerada para diseñar un buen manejo de estas plantas procedentes de cultivo *in vitro*, dirigiendo los esfuerzos para mejorar su establecimiento natural de la especie y manejo *in situ*, *ex situ* y *circa situm* (Dawson, et al., 2013) lo cual permitirá en un futuro afinar programas de reintroducción de especies.

III.- GÉNERO LAELIA

El género mexicano *Laelia*, posee unas de las flores más bellas y conocidas en nuestro país, estas plantas tradicionalmente han sido cultivadas, apreciadas y utilizadas como ofrenda en las festividades del día de muertos principalmente, a lo que debe la variedad de nombres comunes con los que se le denomina: "calaverita", "lirio de todos santos", "flor de muerto", "flor de las ánimas", entre otros (Fig. 4), cabe mencionar que las especies que florecen en otros meses del año, retoman el nombre común dependiendo de las festividades populares más cercanas a su floración, como "día de las madres", "de la Candelaria", "de la virgen de Guadalupe", "Lirio de San Miguel", "Lirio de San Francisco", "Lirio de Corpus", etc. (Halbinger, 1993).



Figura 4.- *Laelia anceps*, subsp. *anceps* (Chavarrillo, Ver.). Tomada por Morales-Ruiz, 2017.

Históricamente, este género ha sido reconocido por las propiedades adhesivas de sus pseudobulbos, de los cuales se extraía un mucílago que era utilizado en el arte plumario prehispánico, así como la elaboración del alfeñique (dulces tradicionales) (Cox y Cervantes, 2016).

El género *Laelia* fue establecido en 1831 por el botánico inglés John Lindley en "The Genera and Species of Orchidaceous Plants" (Los géneros y especies de plantas orquídáceas), basándose en las especies mexicanas, la característica principal que distingue a todas las especies de este

género es que sus flores poseen 8 polinios; comparado con los 4 polinios que poseen el género más cercano que es *Cattleya* (Halbinger y Soto, 1997).

De acuerdo a Halbinger (1993) y Salazar, *et al*, (2014) el género consta de 12 especies y un híbrido natural; las cuales botánicamente se reconocen principalmente por sus características florales y vegetativas cuando son plantas adultas de acuerdo al tamaño y número de hojas, forma de pseudobulbos y rizoma; donde *Laelia halbingeriana* es la especie recientemente descrita, así como *Laelia oaxacana*, híbrido natural (*Laelia halbingeriana* y *Laelia anceps*). De todas las especies que integran el género, solo *Laelia anceps* Lindl. tiene dos subespecies: subsp. *anceps* y subsp. *dawsonii* (Soto-Arenas, 1993).

La mayoría de las especies de *Laelias* se presentan en forofitos del género *Quercus*, estos forman bosques abiertos caducifolios que van desde los 100 a los 2700 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 2000 msnm (Halbinger, 1993).

Las especies del género desde hace muchos años han sido motivo de estudio, cultivo y manejo en diferentes ámbitos (académico, coleccionistas, cultivadores), sin embargo, la reducción de sus hábitats naturales y la extracción sin regulación de ejemplares, ponen en peligro la sobrevivencia de éstas como es el caso de *Laelia gouldiana*, de la cual no se conocen poblaciones naturales y su distribución se reduce a traspasos de una pequeña región del estado de Hidalgo (Halbinger, 1993); por lo que es necesario trabajar en diferentes líneas de acción que nos lleven a la conservación de las especies.

En los últimos años, los estudios que se han desarrollado sobre las diferentes especies del género *Laelia*, van desde pruebas de germinación asimbiótica con diferente calidad y filtros de luz (Sierra-Jiménez, 2006) lo cual incide en germinación y crecimiento de las plántulas, su pigmentación y concentración de clorofila en *Laelia autumnalis*. En *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* se realizó la regeneración *in vitro* ocupando hormonas de crecimiento y aclimatación bajo condiciones de invernadero (Lee-Espinosa *et al.* 2007).

Para *Laelia anceps* subsp. *anceps*, se han evaluado medios de cultivo líquido en plántulas para promover el crecimiento de las plantas (Sánchez-Roldan, 2009), así como el uso de medios de cultivo gelificado en diferentes concentraciones para la germinación, (Romero-Tirado, 2008). Por otro lado se ha probado la capacidad regenerativa de plántulas procedentes de semilla de *Laelia anceps* subsp. *anceps* f. *semialba* en medios de cultivo adicionados con extractos naturales y reguladores de crecimiento (Castañeda-Zárate, 2008).

En *Laelia speciosa*, se ha probado la germinación de las semillas procedentes de frutos maduros e inmaduros (Aguilar-Morales, *et al.*, 2013), así como la germinación de semillas y en diferentes etapas de desarrollo del fruto en diferentes condiciones de luz (Ávila-Díaz, *et al.* 2009).

Dada la importancia de las especies del género, es necesario seguir perfeccionando las técnicas para su cultivo *in vitro* y lograr mejorar su manejo para su conservación, tanto de manera *in situ* como *ex situ*.

3.1.- Descripción de *Laelia anceps* subsp. *anceps* Lindl.

Ésta especie fue descrita por John Lindley en 1835, es una planta epífita, ocasionalmente litófita de 25 a 40 cm. de alto sin incluir inflorescencia, raíces rollizas y blanquecinas, rizoma alargado y ligeramente comprimido, pseudobulbos elipsoide-ovoides, alargados, comprimidos, una hoja apical oblongo-elíptica a lanceolada coriácea-carnosa, rígida; inflorescencia terminal racemosa erecto-archeada usualmente de 2 a 3 flores, raramente más de 5, las brácteas florales cubiertas de mucílago transparente, flores resupinadas, grandes y muy vistosas de hasta 12 cm de alto y 8 cm de ancho; tépalos rosado a rosa purpura, labelo purpura con disco amarillo pálido con líneas purpura, magenta o pardo rojo; lóbulo usualmente más oscuro que los tépalos, callo amarillo intenso, columna blanco-verdosa con líneas y estrías, aroma débil dulce (Fig.5) (Halbinger, 1993).

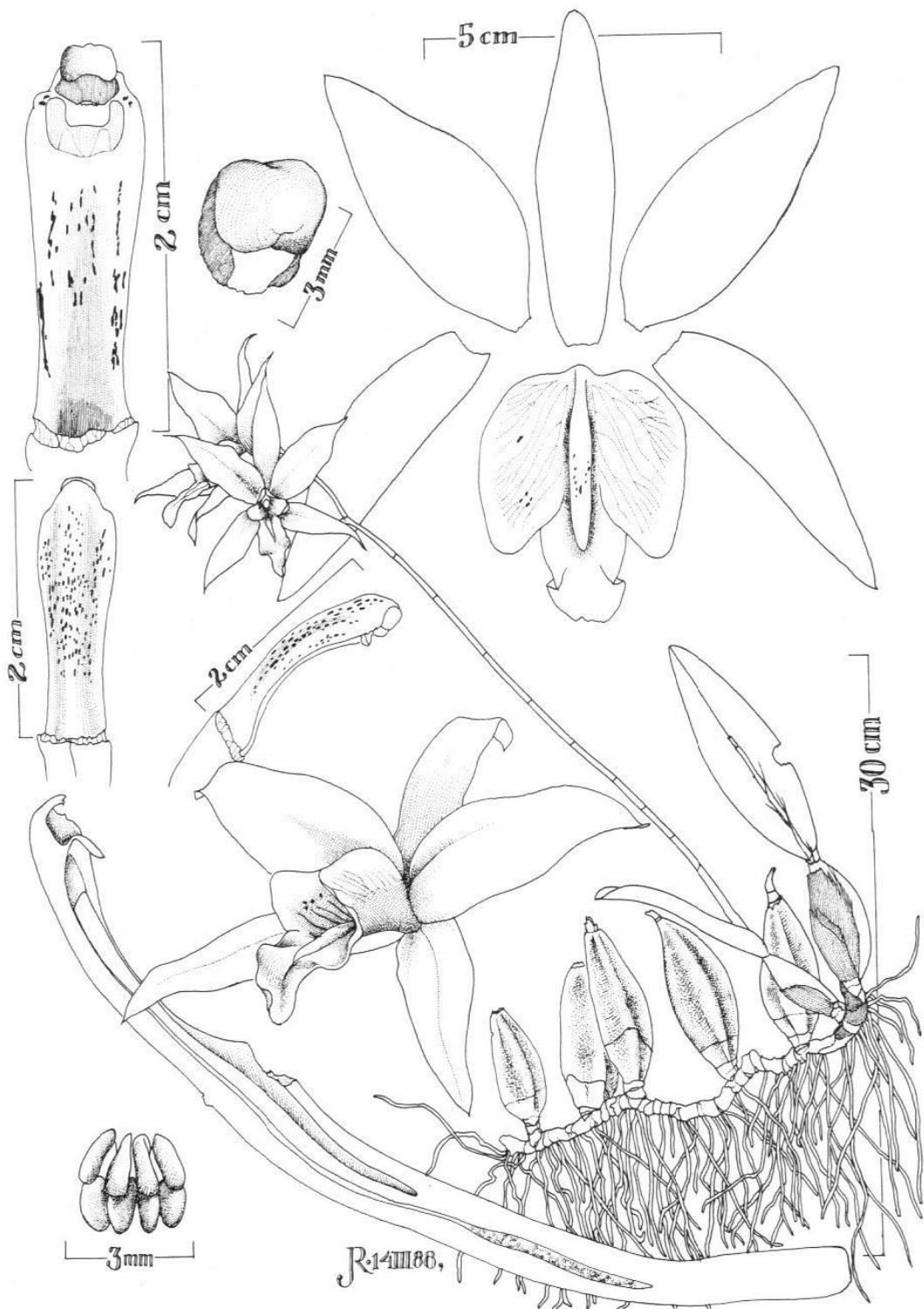


Figura 5.- *Laelia anceps* subsp. *anceps*. Ilustración científica. Tomada de Soto-Arenas, 1993.

En cuanto a la fenología de la especie, en el mes de febrero comienza el crecimiento de la raíz y continúa hasta al menos octubre a diciembre. De marzo a mayo presentan brotes, alcanzando su tamaño máximo de agosto a noviembre. Entre los meses de septiembre a diciembre (otoño) los tejidos maduran con las condiciones frías, secas y soleadas, preparándose para la sequía de primavera. De octubre a diciembre florece y atrae a los insectos polinizadores (abejorro *Bombus medius*) al cual no le ofrece recompensa, la polinización es de tipo engaño.

Una vez que la flor se poliniza, forma un fruto (cápsula) alcanzando su madurez a los 4 meses y contiene miles de semillas diminutas que se dispersan por el viento, temporada que coincide con el momento en que el bosque pierde sus hojas y probablemente haya menos interferencia para su dispersión, en estación seca, entre marzo y abril (Halbinger y Soto, 1997).

3.2.- Distribución geográfica de la especie

En México, la distribución de casi todas las especies del género *Laelia* son en sierras del occidente del país, mientras que en las sierras de la vertiente del golfo sólo hay una especie, *Laelia anceps*, subsp. *anceps* (Fig. 6) (Halbinger, 1993).

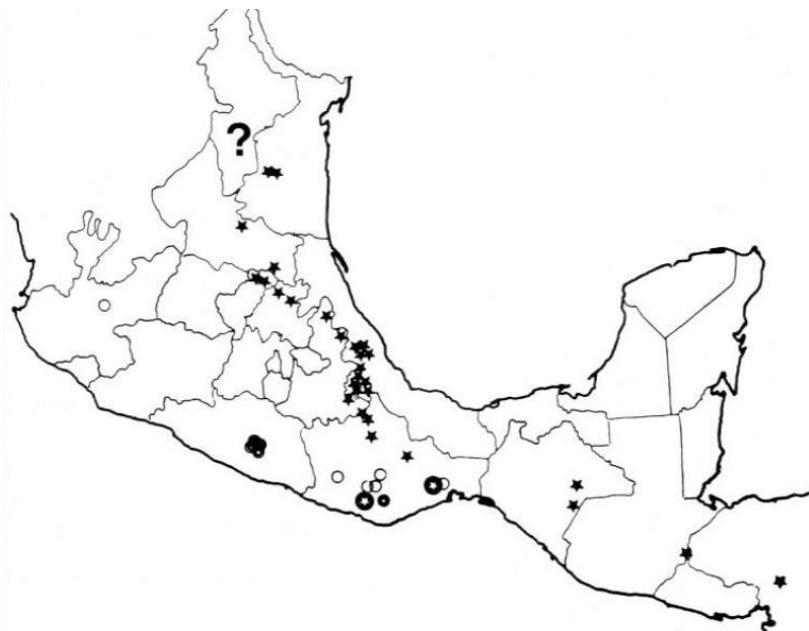


Figura 6.- Distribución geográfica de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en México; en donde ★ indica las poblaciones naturales silvestres reportadas. Tomada de Soto-Arenas, 1993.

En Veracruz ésta especie llega a ser abundante en la zona centro del estado, desde Zongolica hasta Naolinco, sobre el bosque de encinos, que va desde los 700 a 1200 m. de altitud y que se establece en la zona intermedia del bosque de neblina y bosque tropical deciduo; también puede encontrarse desde las selvas tropicales húmedas hasta encinares fríos y bosques de neblina y plantaciones de café (Soto-Arenas, 1993).

En este estado la especie se encuentra reportada para los municipios de Actopan, Banderilla, Coatepec, Córdoba, Cosautlán, Emiliano Zapata, Fortín de las Flores, Ixhuacán de los Reyes, Huatusco, Jalcomulco, Jilotepec, Naolinco, Orizaba, Puente Nacional, San Andrés Tlalnehuayocan, Teocelo, Tepatlazco, Tlaltetela, Tlilapan, Veracruz, Xalapa y Zongolica (Castañeda-Zárate, 2008).

3.3.-Importancia de la especie en la zona centro del estado de Veracruz.

En la zona centro del estado de Veracruz, *Laelia anceps* subsp. *anceps*, es reconocida por el uso tradicional (cultural-religioso) como ofrenda y/o adorno del altar en “Todos Santos” y para llevarlas al panteón, por lo que es comúnmente nombrado “lirio de todos santos” (Fig. 7) (Menchaca-García y Morales-Ruiz, 2016).



Figura 7.- Uso tradicional de la especie en la región. A. En ofrenda en una de las tumbas en el panteón. B. En el “altar de todos santos”. Tomada por Morales-Ruiz, 2017.

Por sus cualidades ornamentales, ha sido una de las favoritas para los cultivadores y coleccionistas por su fácil propagación vegetativa y poseer gran valor hortícola; motivo por el cual se ha empleado en programas de hibridación para la comercialización de flor a nivel nacional e internacional (Halbinger y Soto-Arenas, 1997)

Los habitantes realizan la recolección de las “varas florales” (inflorescencia) en el campo, donde aún se conserva la especie, aunque también es importante reconocer el cultivo en traspatios con gran éxito (Fig. 8).



Figura 8.- Cultivo de traspatio de la *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Chavarrillo, Ver.). Tomada por Morales-Ruiz, 2017.

IV.- DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

Chavarrillo, es una localidad asentada entre las faldas del cerro Tepeapulco y la barranca que lleva el mismo nombre, pertenece al Municipio de Emiliano Zapata, Veracruz y se localiza a los 19° 25' 49" LN 96° 45' 31" LO; su población es de 1409 habitantes (INEGI 2011) y tiene una extensión de 764 ha, cuyas elevaciones van desde los 600 msnm en el fondo de la barranca hasta los 1100 msnm en la cima del cerro; colinda al norte con los ejidos de La Estanzuela y El Chico, al sur con la localidad de Monte Oscuro y Cantera (Mpio. de Coatepec), al este con Rancho Viejo y Palmarejo y al oeste con la localidad de La Estación de Chavarrillo y Plan Chico (Fig. 9).

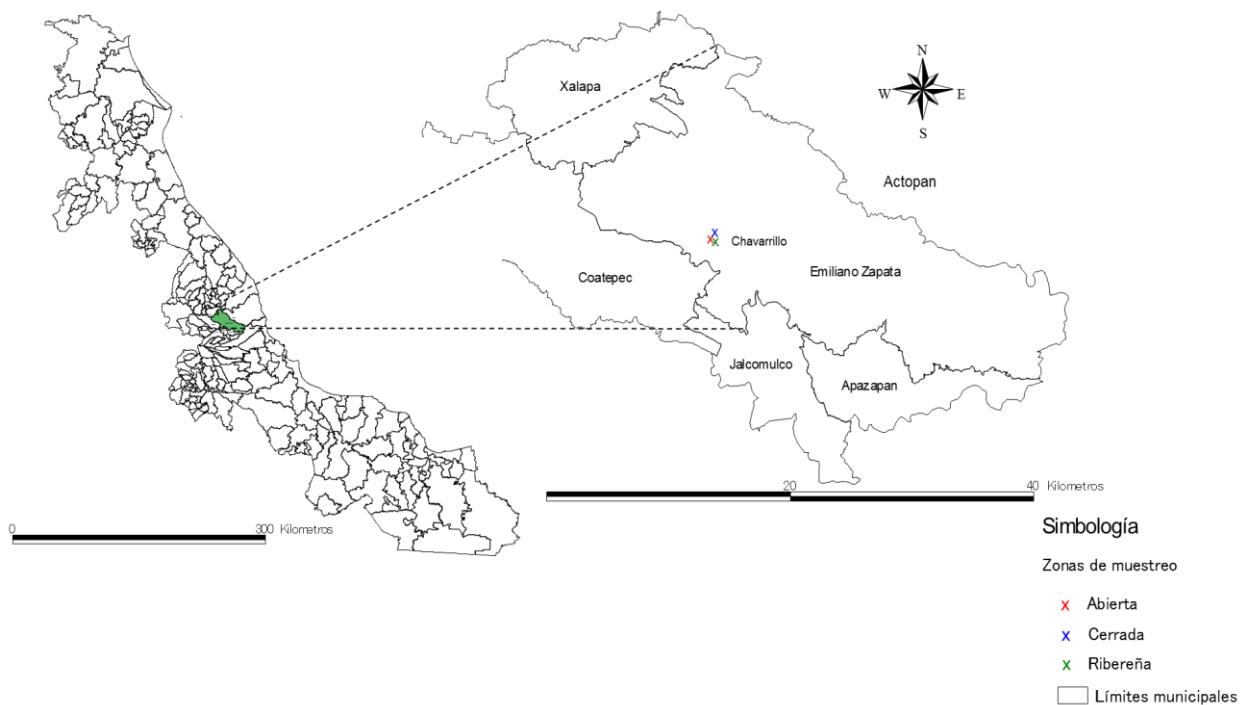


Figura 9.- Mapa del área de estudio, el cual muestra los tres puntos de muestreo para el estudio de la especie.

El clima es cálido sub-húmedo con vientos dominantes del sureste y precipitación anual de 1060 mm, temperatura media anual de 24° C, con lluvias de junio a septiembre (verano), con vientos del norte en invierno que ocasionan lloviznas y descensos de temperatura (CNA, 2016).

En cuanto a vegetación, los terrenos circundantes a la localidad de Chavarrillo aún presentan algunos fragmentos de vegetación natural original, principalmente de selva baja

caducifolia, selva mediana subperennifolia, vegetación de galería y encinar tropical (Torres-Cantú, 2013 y Morales-Ruiz, 2003).

La Selva baja caducifolia es el tipo de vegetación que está mejor representado, sus características fisonómicas residen en el tamaño de los árboles, que van de 4 a 15 m de altura; la perdida de hojas de estas especies por un periodo de aproximadamente seis meses, habiendo un contraste entre la época de seca y la de lluvia; vegetación presente principalmente en el cerro Tepeapulco (Torres-Cantú, 2013) (Fig. 10).



Figura 10.- Selva baja caducifolia en Chavarrillo. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

La selva mediana subperennifolia cuya vegetación se reduce de 25 a 50% su follaje durante la época de sequía, los árboles pueden llegar hasta los 35 m de altura (Fig. 11).



Figura 11.-Selva mediana subperennifolia en Chavarrillo. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

La vegetación de galería que se encuentra en los márgenes de ríos, con aguas permanentes y/o temporales, el estrato arbóreo forma líneas continuas en la orilla del río se encuentra compuesto principalmente por *Salix humboldtiana* Willd., *Tecoma stans* (L.) Juss. ex H. B. & K. y *Platanus mexicana* Moric., *Lindenia rivales* Benth y *Salix taxifolia* H.B.& K., *Momordica charantia* L., *Sida rhombifolia* L. y *Pavonea shiedeana* Steudel (Castillo, 1985) (Fig. 12).



Figura 12.- Vegetación de galería en Chavarrillo. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

Los acahuales o vegetación secundaria presente en la zona se encuentran en diferentes intensidades de perturbación tanto en planicies, mesetas, valles, laderas y en ocasiones cantiles; las especies dominantes son: *Bauhinia divaricata* L., *Leucaena pulverulenta* (Schlechter) Benth, *Macuna pruriens* (L.) y *Sapindus saponaria* L. (Castillo, 1985).

El encinar tropical en Chavarrillo su distribución altitudinal de 600 a 840 m., está representado por árboles que presentan una altura que va desde 6 a 15 m, generalmente compuesto por tres especies: *Quercus oleoides* Schldl. & Cham., *Quercus peduncularis* Nee y *Quercus laurina* Humb & Bonal en los cuales se encuentras abundantes epífitas, siendo las orquídeas con mayor representación (Fig.13); las especies de orquídeas que se encuentran en esta vegetación son *Prostechea cochleata* (L.) Lemee., *Laelia anceps* Lindl., *Rhyncholaelia glauca* y *Oncidium sphacelatum* Lindl, y especies terrestres como *Bletia purpúrea* (Lam.) DC. (Morales-Linares, 2009 y Castillo, 1995, CONABIO, 2011).



Figura 13.- Encinar tropical en Chavarrillo (Relicto). Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

V.- JUSTIFICACIÓN

En la localidad de Chavarrillo las poblaciones naturales de *Laelia anceps*, subsp. *anceps* han disminuido a consecuencia del cambio de uso de suelo, situación que podría poner en peligro la abundancia local de sus poblaciones, ya que ésta especie se establece y desarrolla principalmente en encinares tropicales, prefiriendo cortezas de árboles de diversas especies de *Quercus* los cuales están en sitios alterados (Halbinger y Soto-Arenas, 1997, Soto-Arenas, 1993)).

La región de Chavarrillo ha sido reconocida por coleccionistas y cultivadores de antaño por haber tenido grandes poblaciones de esta especie de gran valor económico-ornamental, las cuales visitaban y colectaban la planta con las mejores características fenotípicas (color, forma, tamaño, duración de flor) para su cultivo, obteniendo especímenes de gran potencial para realizar hibridaciones; poblaciones que fueron disminuyéndose de manera considerable (Menchaca-García y Morales-Ruiz, 2016).

Por lo anterior expuesto es necesario conocer e implementar medidas para la conservación de la especie en la región, tomando en cuenta las diversas estrategias y protocolos generados para su manejo y conservación en la región, contemplando desde la propagación *in vitro*, su manejo en pre-acclimatación hasta estudios ecológicos que describan sus requerimientos para su establecimiento en estudios de reintroducción en campo.

VI.-PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuántos días de pre-aclimatación necesitan las plántulas de *Laelia anceps* subsp *anceps* para obtener mayor supervivencia y crecimiento?

¿Como se distribuye y establece de manera natural *Laelia anceps* subsp *anceps* en forofitos de encino?

VII.- OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de la pre-aclimatación en el crecimiento de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* procedentes de cultivo *in vitro* y determinar las características ambientales que influyen en su establecimiento natural.

PARTICULARES

1. Evaluar la supervivencia, longitud total, número de hojas y número de raíces en plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* sometidas a siete tratamientos de Pre-aclimatación
2. Describir la distribución vertical, orientación y asociación con otras epífitas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en forofitos de encino en condiciones naturales en tres zonas del área de estudio.
3. Describir las características principales del forofito: altura, cobertura y DAP en las zonas de estudio.

VIII.- METODOLOGÍA

8.1.- Obtención de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*.

Para obtener las semillas se colectaron 3 frutos maduros de tres individuos diferentes, procedentes del área de estudio, las cuales se desinfectaron con el “método de sobre” (Menchaca y Moreno 2011) y se sembraron en frascos de vidrio de 125 ml, con 25 ml de medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) al 100 % (MS-basal) cada uno, se colocaron en el cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con una temperatura constante de $25 \pm 3^\circ \text{C}$ (Fig. 14) durante 5 meses, tiempo en el cual las semillas germinaron, crecieron y formaron plántulas con raíces y hojas.

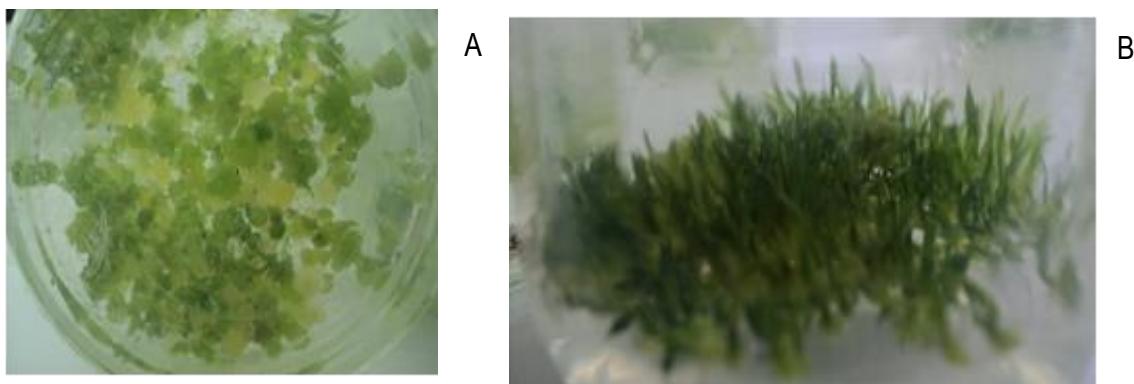


Figura 14. Cultivo *in vitro*, germinación y crecimiento de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. A.- Protocormos fotosintéticos B. Desarrollo (formación de hojas) de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. Tomada por Morales-Ruiz, 2015.

Con la finalidad de obtener mayor crecimiento y formación de hojas y raíces en las plántulas, se subcultivaron en frascos de 125 ml previamente preparados con 25 ml de medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) (MS-Basal), colocando 10 plántulas por frasco, en total se sembraron 300 plántulas (Fig. 15); los frascos se colocaron en el cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con una temperatura constante de $25 \pm 3^\circ \text{C}$ durante 4 meses, tiempo en el cual las plantas crecieron y formaron hojas y raíces.



Figura 15.- Subcultivo de las plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*. Tomada por Morales-Ruiz, 2015.

8.2.- Pre-aclimatación y aclimatación de plántulas.

Se obtuvieron las plántulas de cultivo *in vitro* de 9 meses (siembra y subcultivo), se retiraron 28 frascos con 10 plántulas del cuarto de incubación las cuales ya tenían sistema radicular y hojas. (Fig. 16).



Figura 16.- Frascos con plántulas utilizadas para el experimento de pre-aclimatación y aclimatación de la *Laelia anceps* subsp. *anceps*. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

8.2.1.- Condiciones de vivero y preparación de materiales.

En la localidad de Chavarrillo, se instalaron mini-invernaderos dentro de un sombreadero con malla al 70 %. Se seleccionaron y esterilizaron los sustratos, con los cuales se preparó la mezcla para sembrar las plántulas, el cual estuvo integrado por grava volcánica roja, tepeccil, peat moss™ y

carbón vegetal (proporción 1:1:0.5:0.5) con la cual se llenaron envases de plástico transparentes de 10 cm de diámetro que funcionaron como macetas individuales (Ortega-Loeza, *et al.*, 2011, Sierra-Jiménez, 2006 y Castañeda-Zárate, 2008). Cada vez que correspondía aclimatar plántulas, se preparaba una solución de Kasumin™ (1 ml/l agua) y Captan™ (1 gr/l agua) por 10 minutos, como método preventivo de contaminación por hongos y/o bacterias.

8.2.2.- Montaje del experimento de Pre-aclimatación.

La pre-aclimatación consiste en pasar los frascos con plántulas cultivadas *in vitro* (condiciones controladas) a condiciones de invernadero, donde la temperatura e intensidad lumínica inciden en las plántulas y la estancia de los frascos cultivados bajo esas condiciones y con el paso de los días, empiecen a adaptarse a las condiciones *ex vitro*.

Por lo que se trasladaron los frascos con las plántulas a la zona de estudio y se colocaron dentro de un sombreadero, inmediatamente se sometieron a “tratamientos de pre-aclimatación” (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días) (Ortega Loeza, *et al.*, 2011) y posteriormente, según el tratamiento, se realizó la aclimatación (sacar las plantas de condiciones *in vitro*) de manera escalonada de las plántulas, 40 plántulas cada 5 días; obteniendo en total 7 eventos de “liberación” en un total de 30 días, considerados como tratamientos pre-aclimatación.

La aclimatación consiste básicamente en sacar las plántulas del frasco, para lo cual se enjuagan perfectamente con agua ligeramente tibia para quitar todos los residuos de agar y evitar que las raíces corran el riesgo de contaminarse por hongos y se sumergen en una solución de Kasumin™ (1 ml/l agua) y Captan (1 gr/l agua) por 5 minutos, se escurren y se colocaron sobre una charola con papel absorbente para a reducir la humedad.

Para el experimento, se realizó la toma de datos por plántula (1- 40) y por tratamiento (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días), registrando el número de plántula considerando las variables: longitud total de la plántula (con ayuda de un vernier), número de hojas, número de raíces y la presencia o ausencia de pseudobulbo.

Al finalizar la toma de los datos por plántula, se procedió a sembrarlas en macetas individuales, las cuales se etiquetaron con el número de tratamiento y número de plántula. Una vez terminada la toma de datos del tratamiento, se asperjó (40 plántulas) con una solución antifúngica de Captan™ (1gr./l agua).

Finalmente, se colocó un domo a cada maceta sembrada, el cual consistió en una bolsa de celofán ajustada con una liga de hule y se colocaron dentro del mini-invernadero instalado previamente bajo sombreadero (Fig. 17).



Figura 17.- Macetas individuales con las plántulas por tratamiento en el mini- invernadero. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

Con el fin de obtener un endurecimiento de la cutícula y adaptación al medio externo se realizaron perforaciones periódicas a los domos colocados en cada maceta, esto fue de manera escalonada, según los tiempos por tratamiento; la primera perforación fue a los cinco días y posteriormente a los veinticinco días, permitiendo el intercambio de aire y oxígeno entre la planta y su ambiente de manera paulatina, comenzando su adaptación al clima y humedad del lugar; finalmente el domo se les retiró a los treinta días de cada tratamiento (Fig. 18).



Figura 18.- Mini-invernaderos con los 7 tratamientos de pre-aclimatación de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en Chavarrillo. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

Una vez instalado el experimento, conforme a los tiempos de cada tratamiento, se registró mensualmente la sobrevivencia y se realizó el conteo de hojas por plántula cuando se detectó presencia por contaminación de hongos y/o bacterias, se aplicó fungicida a todos los tratamientos por aspersión.

Al cumplir cuatro meses cada tratamiento, se procedió a extraer las plántulas del sustrato por maceta, se tomaron datos de las plántulas sobrevivientes, considerando como parte del crecimiento las siguientes variables: longitud total de la plántula, número de hojas y raíces, además de la presencia o ausencia de pseudobulbo (Fig. 19). Al terminar cada registro, las plántulas se volvieron a sembrar para que continuaran con su crecimiento y desarrollo. Cabe señalar que el conteo del número de raíces solo se realizó al inicio de cada tratamiento y al finalizar el experimento (4 meses en total), para no interferir en el enraizamiento de la plántula.



Figura 19.-Plántula de *Laelia anceps* subsp. *anceps* a los 4 meses después de su trasplante. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

8.2.3.- Análisis de datos

Para la supervivencia de las plántulas en diferentes “tiempos de liberación” (considerados como tratamientos), se realizó un modelo lineal generalizado y curvas de supervivencia (funciones de supervivencia por tratamiento) basadas en el estimador Kaplan-Meier.

Para las variables de crecimiento: longitud total de las plántulas, el número de hojas y número de raíces por tratamiento, se realizó un análisis de varianza de una vía con prueba post hoc Tukey ($P < 0.05$).

8.3.- Establecimiento natural de la especie en campo.

8.3.1.- Zonas de estudio

Se realizaron recorridos en el área de estudio con el fin de localizar los sitios con la presencia de encinos, logrando identificar tres: Ribereña (orillas de los arroyos y ríos), Cerrada (vegetación cerrada con acceso por caminos) y Abierta (con árboles aislados) (Fig. 20).

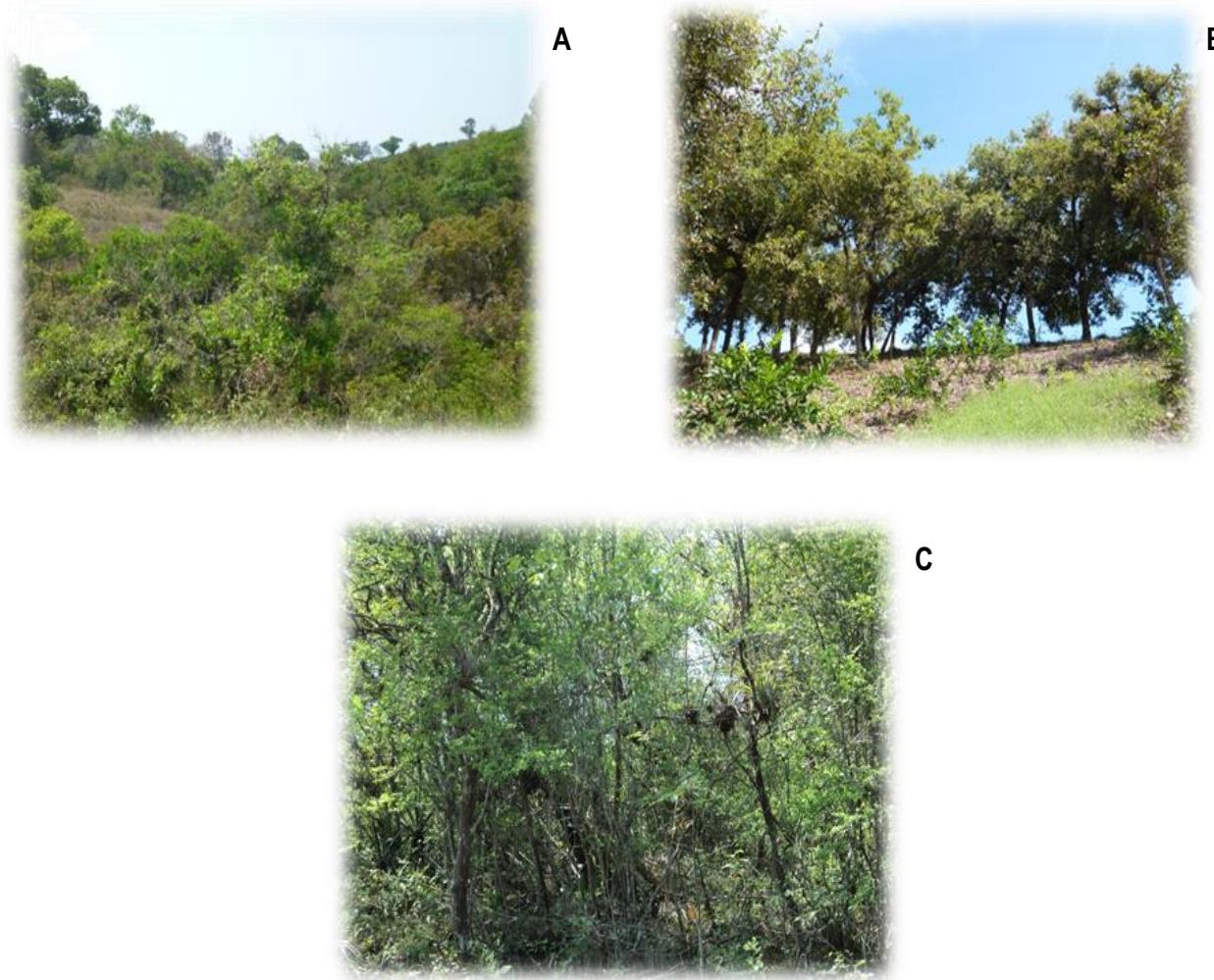


Figura 20.- Zonas de estudio para la caracterización de la especie. A). - Zona Ribereña, B). - Zona Abierta y C). - Zona de Cerrada. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

8.3.2.- Muestreo en campo

En cada zona de estudio, se realizaron transectos de 150 m. y se registraron todos los individuos de encinos que se encontraron con o sin presencia de orquídeas, se realizaron tantos transectos fueron necesarios hasta obtener una muestra de 15 forofitos con presencia de la *Laelia anceps* subsp. *anceps* por zona.

Para facilitar la toma de datos en campo, se realizó un formato considerando las variables: altura, cobertura y diámetro de los árboles huésped, número de plantas por árbol, altura a la que se encontraba la planta, la zona de ubicación vertical de cada planta en el huésped (según lo recomendado por Johansson, 1974 y Pupulin, et al., 1995) (Fig. 21 y Fig. 22).



Figura 21.- Toma de datos en campo en la zona abierta del área de estudio. Tomada por Morales-Ruiz, 2016.

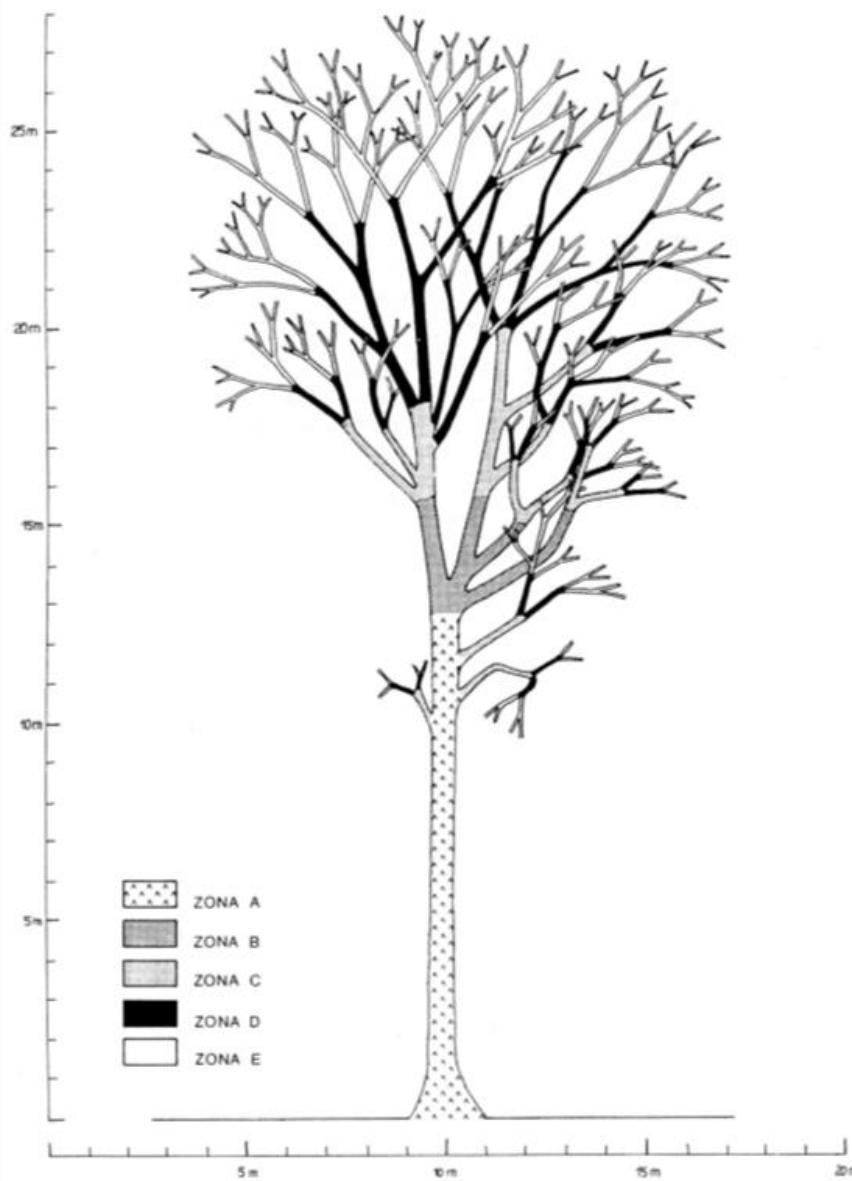


Figura 22.- Zonas de distribución vertical consideradas para el estudio de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en encinos; en el cual se aprecian 5 zonas: A) Tronco, B) Parte basal de las ramas, C, D y E correspondientes a la copa de los árboles. Tomada de Pupulin *et al.*, 1995.

Para el tamaño de la planta se consideró según la cantidad de pseudobulbos, en tres categorías: categoría 1= 1-5 pseudobulbos, categoría 2 = 6-10 pseudobulbos y categoría 3 ≥ 10 pseudobulbos.

Para la variable "asociación" se consideró la presencia de la especie con otras plantas epífitas (musgo, liquen, bromelia u orquídea); en la variable ubicación en rama se consideraron cuatro categorías (superior, inferior, lateral y envolvente) y para la orientación se realizó en grados (360°) considerando: noreste, noroeste, sureste y suroeste.

8.3.3.- Análisis de datos

Se realizó un análisis de componentes principales, considerando las siguientes variables: altura, diámetro y cobertura del árbol huésped, altura a la que se encontraban las orquídeas en el huésped, número de orquídeas presentes en el árbol hospedero, tamaño de las plantas (en categorías) y la asociación con otras epífitas (en categorías). Dada la diferencia de las unidades de medición de cada variable, se utilizó la matriz centrada de datos estandarizados.

Posteriormente, se consideraron los componentes principales que recogieron la mayor variabilidad posible y sus datos originales se analizaron de manera individual.

Se aplicó un análisis de Kruskal-Wallis, considerando los supuestos de normalidad de los datos según la variable, para distinguir diferencias entre zonas de estudio.

Para probar la hipótesis de independencia de las frecuencias observadas en el tamaño de las plantas y la asociación de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en los diferentes sitios se utilizó un análisis de Chi².

IX.- RESULTADOS

9.1.- Pre-aclimatación para la aclimatación de plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps*.

9.1.1.- Supervivencia

La supervivencia global fue del 70 %, sin embargo, el tratamiento con 10 días de pre-aclimatación presentó mayor supervivencia al final del experimento (Tabla 1).

Tabla 1.- Porcentaje de supervivencia por tratamientos al final del experimento.

Tratamiento	Supervivencia
0	55%
5	67%
10	93%
15	76%
20	75%
25	50%
30	71%

Para esta variable se realizó un análisis de Modelo Lineal Generalizado (GLM), el cual mostró ser estadísticamente significativo (Devianza =31.06, gl=6, P< 0.001) con análisis de residuales estadísticamente significativo (Tratamiento 10: Error estandar=0.70 y P= 0.00041).

En análisis de supervivencia Kaplan-Meier mostro diferencias estadísticamente significativas en las plántulas por tratamiento (Log-Rank test= 35.01, g.l.= 6, P< 0.001) (Tabla 2, Fig. 23).

Tabla 2.- Análisis de supervivencia en la pre-aclimatación de plántulas al final del experimento (Kaplan-Meier).

Tratamiento	Error estandart	Lower 95% CI	Upper 95% CI
T 0	0.0775	0.274	0.585
T 5	0.0790	0.343	0.658
T 10	0.0474	0.812	0.998
T 15	0.0775	0.274	0.585
T 20	0.0782	0.441	0.751
T 25	0.0754	0.229	0.534
T 30	0.0765	0.492	0.795

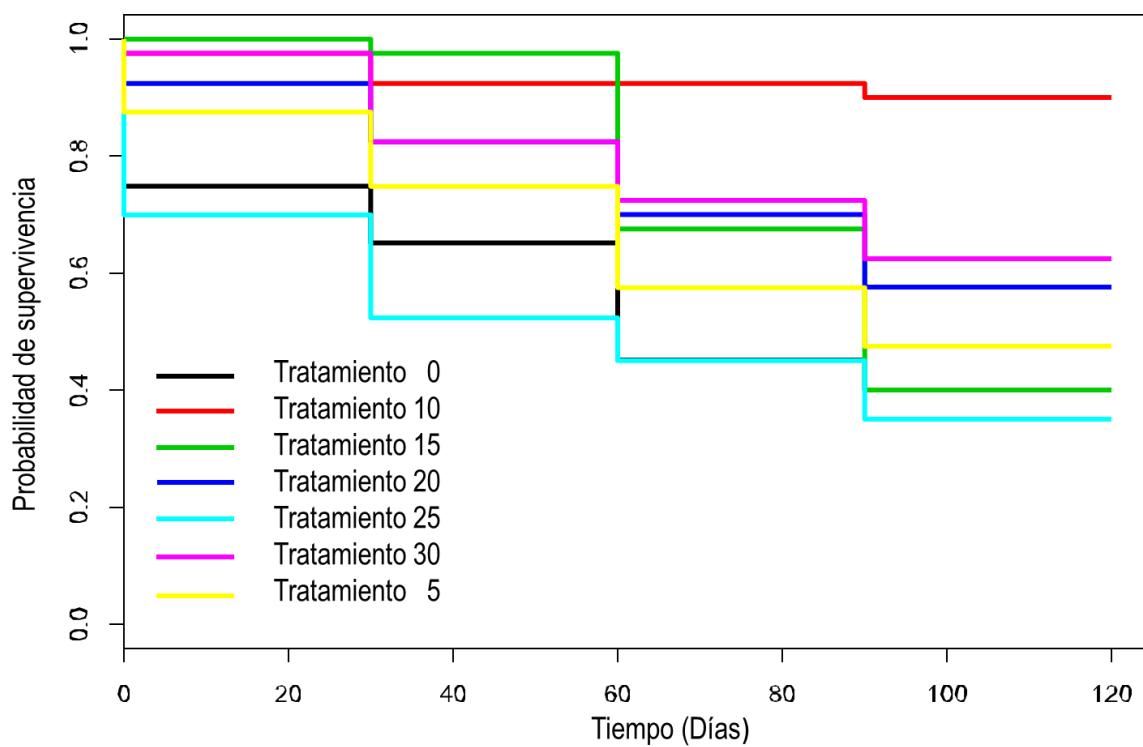


Figura 23.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de las plántulas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* durante su aclimatación con tratamientos de pre-acclimatación.

9.1.2.-Longitud de plántula.

En los 4 meses de seguimiento se registró un promedio de 2.47 cm en la longitud de las plántulas que tuvieron 10 días de pre-aclimatación, seguida de las plántulas con 20 días de pre-aclimatación, con un promedio de 1.62 cm. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($F= 6.4$, $g.l.= 6$, $P < 0.001$ (Fig. 24).

En general, el tratamiento con 10 días de pre-aclimatación es el que se observaron plántulas de mayor longitud con respecto a los demás tratamientos (Tabla 3).

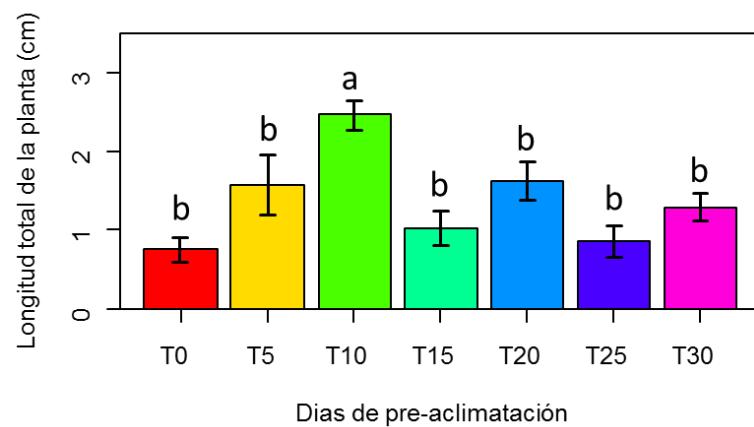


Figura 24- Longitud total de las plántulas (cm) por tratamiento.

Tabla 3.- Valores de media y error estándar para la variable longitud total en la pre-aclimatación de plántulas por tratamientos.

Tratamiento	Media	Error estandar
0	0.748	0.157
5	1.577	0.379
10	2.473	0.183
15	1.025	0.221
20	1.627	0.252
25	0.858	0.211
30	1.293	0.176

9.1.3.- Número de hojas

Se observaron diferencias en el número de hojas entre tratamientos ($F= 8.22$, $g.l.= 6$, $P< 0.001$); siendo mayor en las plántulas del tratamiento con 10 días de pre-aclimatación, el cual registró un promedio de 4.9, seguida de las plántulas del tratamiento con 30 días de pre-aclimatación, con 3.05 (Fig. 25, Tabla 4).

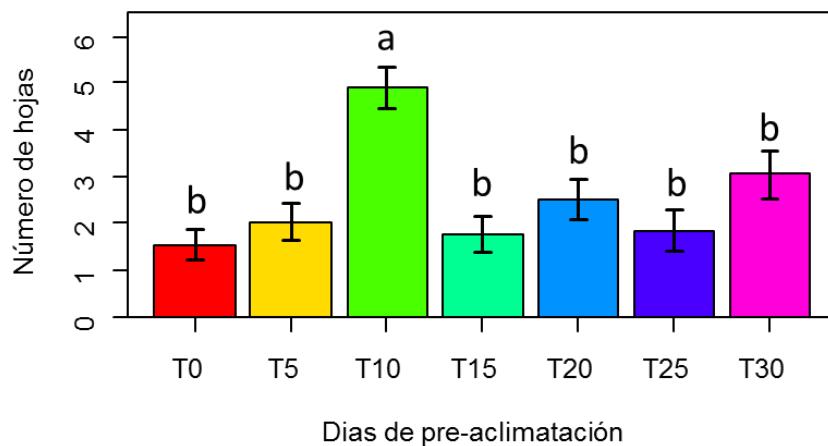


Figura 25.- Diferencia en número de hojas por tratamiento en *Laelia anceps* subsp. *anceps*.

Tabla 4.- Valores de media y error estándar para la variable número de hojas en la pre-aclimatación de plántulas por tratamiento.

Tratamiento	Media	Error estandar
0	1.525	0.332
5	2.025	0.388
10	4.9	0.461
15	1.775	0.38
20	2.5	0.436
25	1.85	0.447
30	3.05	0.51

9.1.4.- Número de raíces

El incremento del número de raíces, comprendido desde el día de la aclimatación de cada tratamiento hasta finalizar los 4 meses, mostró que las plántulas difieren en el número de raíces obtenidas ($F= 8.71$, g.l.= 6, $P<0.001$; Fig. 26) y el tratamiento con 10 días de pre-aclimatación mostró mayor número de raíces comparado con los otros tratamientos (Tabla 5).

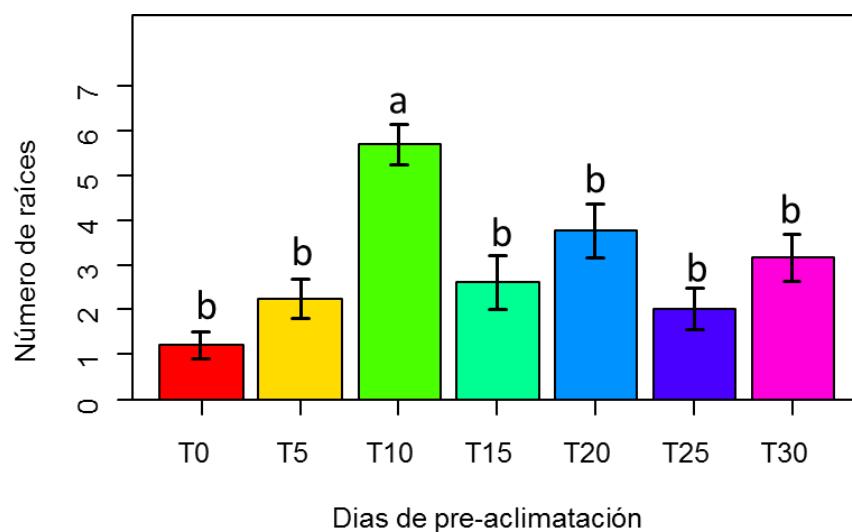


Figura 26.- Incremento del número de raíces en *Laelia anceps* subsp. *anceps* por cada tratamiento.

Tabla 5.- Valores de media y error estándar para la variable número de raíces en la pre-aclimatación de plántulas por tratamiento.

Tratamiento	Media	Error estandar
0	1.225	0.315
5	2.25	0.444
10	5.7	0.452
15	2.625	0.607
20	3.775	0.586
25	2.025	0.481
30	3.175	0.51

9.1.5.- Pseudobulbos

Al finalizar el tiempo de observación del experimento (4 meses), se observó que algunos tratamientos registraron la formación de pseudobulbos, en particular el tratamiento de 10 días de pre-aclimatación presentó un mayor número de plántulas con la formación de dicha estructura (10 plántulas) que corresponde al 27.7% del total (Figura 27).

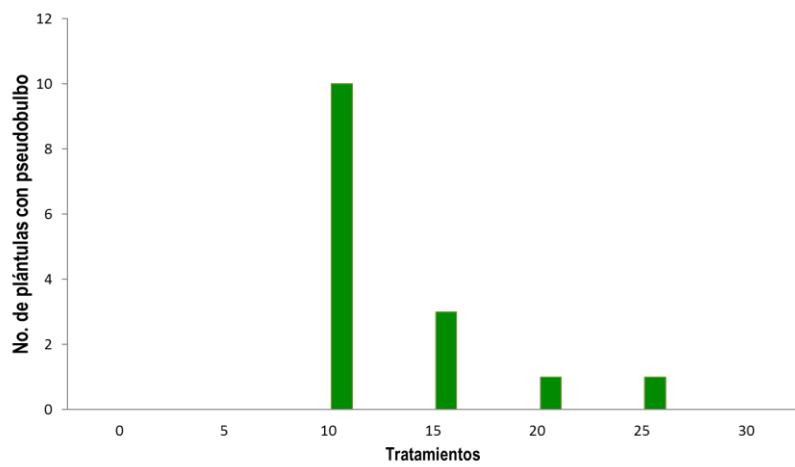


Figura 27.- Formación de pseudobulbo en las plántulas por tratamientos, donde las plántulas con 10 días de pre-aclimatación presentaron formación de dicha estructura cuya función es almacenar agua y nutrientes.

9.2.- Establecimiento natural de la especie en campo.

9.2.1.-Análisis de Componentes Principales

De acuerdo con el criterio de Kaizer (Chan, 2011) el cual indica que solo deben considerarse como componentes principales los que presenten un valor propio mayor a 1 (CP>1). En la tabla 6 se presenta el valor del componente principal, el valor de varianza que explica y las variables asociadas a dicho componente (Figura 28).

Tabla 6.- Muestra los componentes principales del análisis y las variables agrupadas en cada uno.

Componente	Desviación estándar	Proporción de varianza	Asociación de variables
PC 1	1.7450351	0.38	Altura, Tamaño y Asociación de <i>Laelia</i>
PC 2	1.1596039	0.16	Altura, DAP y Cobertura del forofito

El primer componente principal (PC1) explica un 38 % de la varianza y asocia las variables relacionadas con *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Tabla 7).

Tabla 7.-Variables asociadas que integran el PC1.

Variable	Valor propio
Altura a la que se encuentra la especie	0.494
Tamaño de la planta	0.444
Asociación con otras epífitas	0.422

El segundo componente principal (PC2) explica un 17 % de la varianza y asocia las variables propias del forofito (Tabla 8).

Tabla 8.- Variables asociadas que integran el PC2.

Variable	Valor propio
Altura	0.533
DAP	0.528
Cobertura	0.592

En total, la proporción de varianza explicada acumulada (PC1 y PC2) es de 54 %.

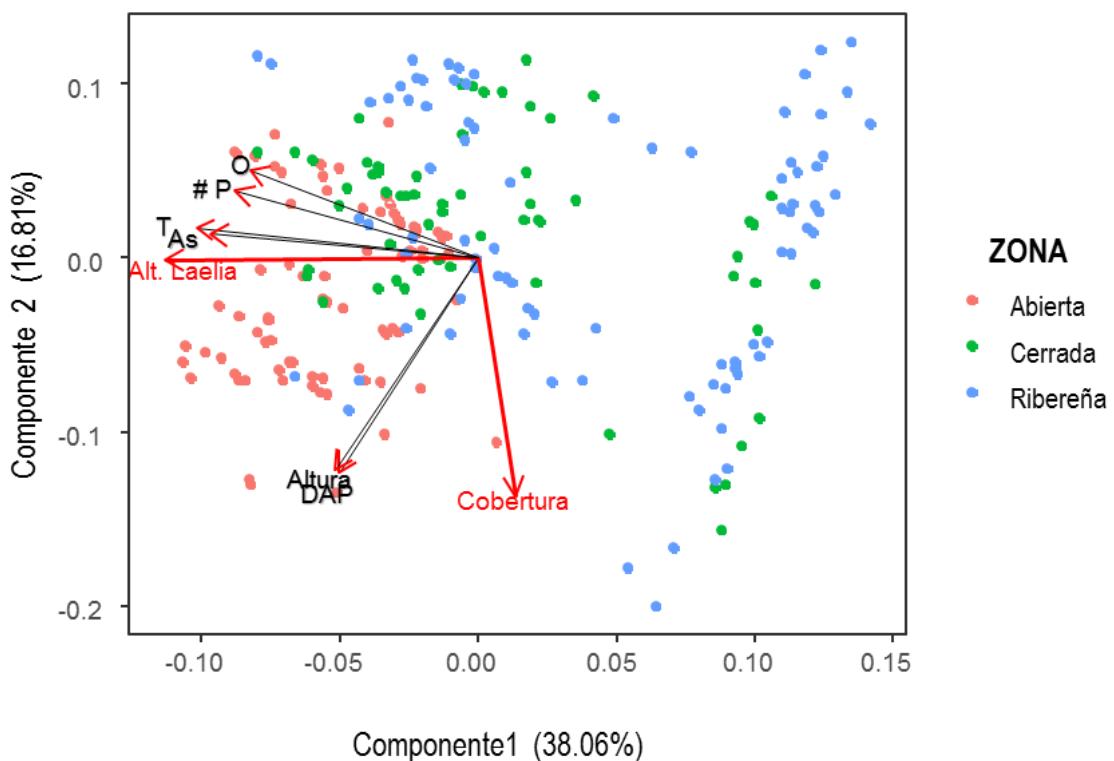


Figura 28.- Gráfico bidimensional del análisis de componentes principales para el establecimiento natural de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en los relictos de encinar tropical en Chavarrillo.

9.2.2.- *Laelia anceps* subsp. *anceps* (PC1).

9.2.2.1.- Altura a la que se encuentran las plantas en el forofito.

En el análisis comparativo de las zonas de estudio (Kruskal-Wallis), para la variable altura a la que se encuentran las plantas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en el forofito, mostró diferencias significativas entre ellos ($X^2 = 59.2$, g.l.= 2, $P<0.001$) donde la altura del establecimiento de la orquídea es diferente en cada sitio, siendo mayor en la zona abierta y menor en la zona ribereña (Tabla 9, Figura 29).

Tabla 9.- Muestra las diferencias significativas con el promedio y error estándar de variable altura del establecimiento en campo de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en las tres zonas de estudio en campo.

Zonas	Abierta	Cerrada	Ribereña
Media	5.881	4.358	2.425
Error estándar	0.225	0.389	0.283

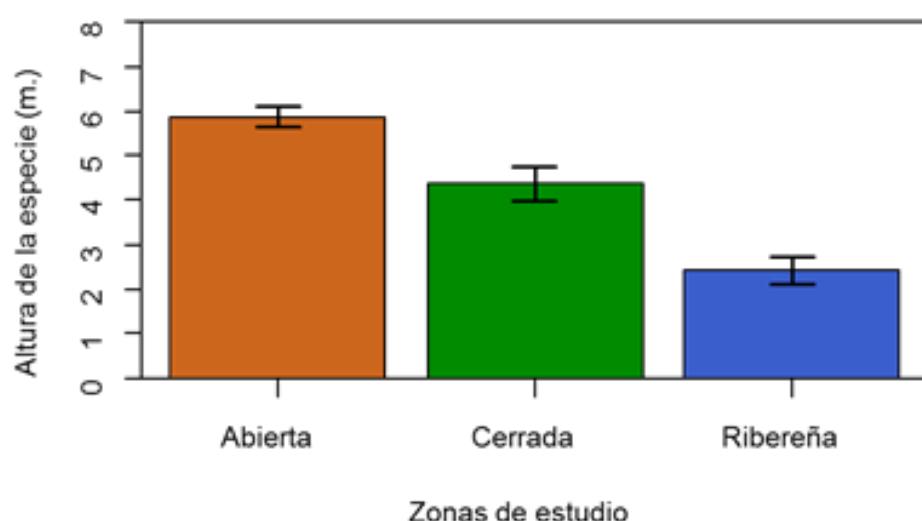


Figura 29.- Altura promedio de establecimiento de la *Laelia anceps* subsp. *anceps* en el forofito por zonas de estudio.

9.2.2.2.- Tamaño de las plantas.

Para el tamaño las plantas, en la zona abierta se observó un mayor número de plantas en las tres categorías considerados; la zona cerrada tuvo menor frecuencia de plantas de mayor tamaño (categoría 3), mientras que en la zona ribereña se observó en menor número de plantas. ($\chi^2= 14.27$, g.l.= 8, $P< 0.001$; Tabla 10, Fig. 30).

Tabla 10.- Muestra las frecuencias observadas y esperadas (dentro de paréntesis) para la categoría de tamaño por zona.

Zonas	Tamaño			TOTAL
	1	2	3	
Abierta	26 (35)	32 (29)	42 (36)	100
Cerrada	25 (17)	15 (14)	8 (17)	48
Ribereña	16 (16)	10 (13)	20 (17)	46

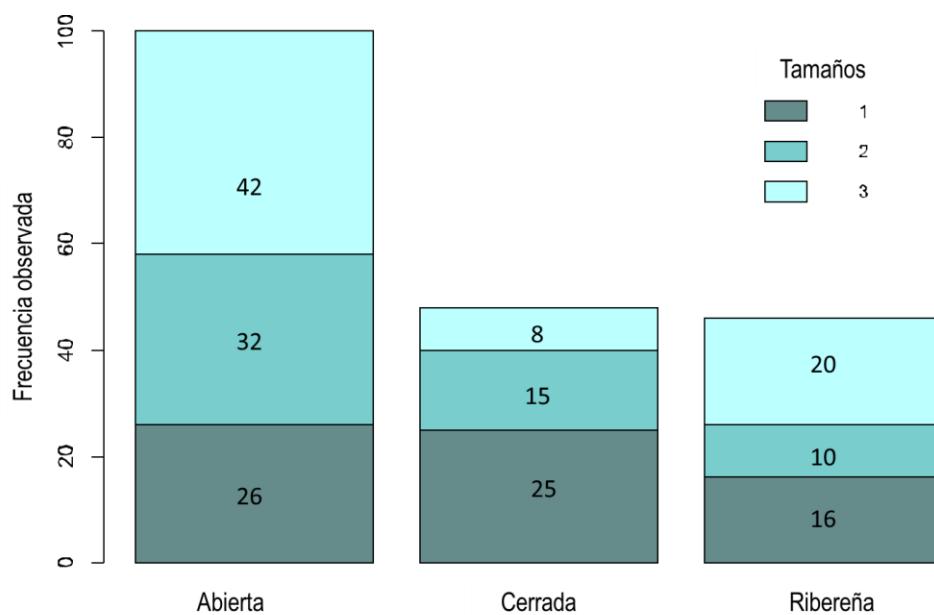


Figura 30.- Muestra la frecuencia observada de las categorías de tamaño de plantas encontradas por zonas de estudio.

9.2.2.3.- Asociación de la especie

En el análisis mostró que es más frecuente encontrar a *Laelia anceps* subsp. *anceps* asociada con otras plantas epífitas (musgo, liquen y bromelia) y esta asociación observada depende de la zona ($\chi^2 = 45.18$, g.l.=6 y $P<0.001$; Tabla 11, Figura 31).

Tabla 11.- Muestra las frecuencias observadas y esperadas (dentro de paréntesis) de epífitas asociadas con la especie por zona.

Epifita	Zonas		
	Abierta	Cerrada	Ribereña
Musgo	4 (10)	15 (5)	1 (5)
Liquen	18 (12)	5 (6)	1 (6)
Bromelia	1 (3)	1 (1)	4 (1)
Combinación	77 (75)	28 (36)	39 (34)

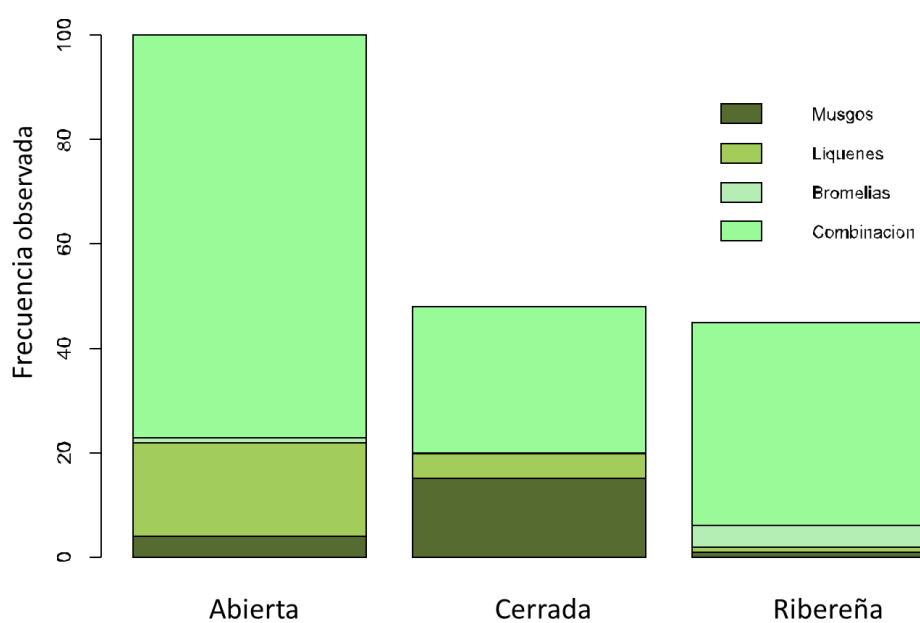


Figura 31.- Frecuencia observada de la asociación de *Laelia anceps* subsp. *anceps* con otras epífitas en campo en las zonas de estudio.

9.2.3.- Encinos, forofito de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (PC2)

En las zonas relictas de encinar tropical, donde se realizó el estudio del establecimiento natural de *Laelia anceps* subsp. *anceps*, los forofitos las zonas abierta y cerrada presentaron una altura promedio de 10.34 y 10.73 m respectivamente, mientras que en la zona ribereña tienen una altura promedio de 8 m.; en cuanto al diámetro a la altura del pecho (DAP), los forofitos de la zona abierta presentaron un promedio de 51 cm, mientras que en la zona cerrada y ribereña fue de 40.15 cm y 42.72 cm respectivamente; finalmente, la cobertura de los forofitos de zona abierta fue de 54.72%, en la zona cerrada de 43.59% y en la zona ribereña un 49.13% (Tabla 12).

Tabla 12.- Muestra la media con desviación estándar de las variables evaluadas de los árboles por zona de estudio.

Zona	Altura	Cobertura	DAP
Abierta	10.52±2.119	52.167±16.067	51.693 ±16.978
Cerrada	10.173±2.038	34.625±18.281	43.693±9.69
Ribereña	9.333±2.582	48.521±24.439	44.691±12.371

9.2.3.1.-Altura

La altura de los forofitos de *Laelia anceps* subsp. *anceps* de las zonas abierta y cerrada fueron diferentes de la ribereña ($F=23.6$, g.l.= 2, $P< 0.001$). Sin embargo, entre las zonas abierta y cerrada no fueron diferentes ($P> 0.05$) (Fig. 32).

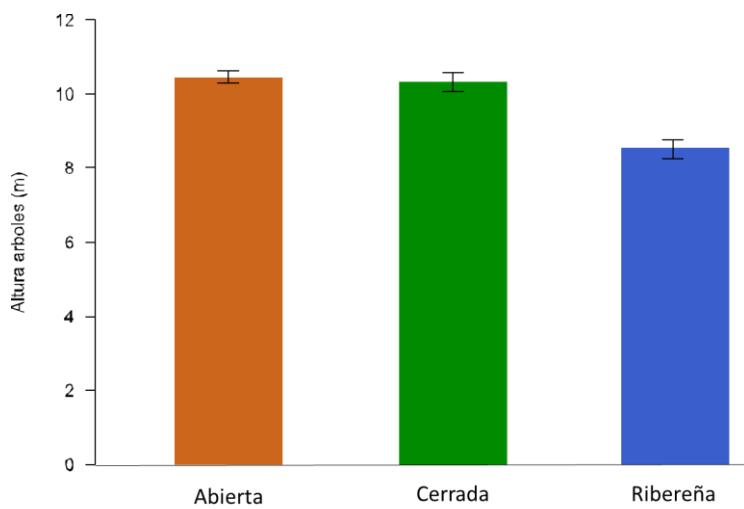


Figura 32.- Altura de los forofitos de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en las zonas de estudio.

9.2.3.2.-DAP

Para el caso del diámetro a la altura del pecho (DAP), los forofitos difirieron ($F= 18.9$, $g.l.= 2$, $P< 0.001$), sólo entre las zonas abierta-cerrada y abierta-ribereña ($P< 0.05$; Fig. 33)

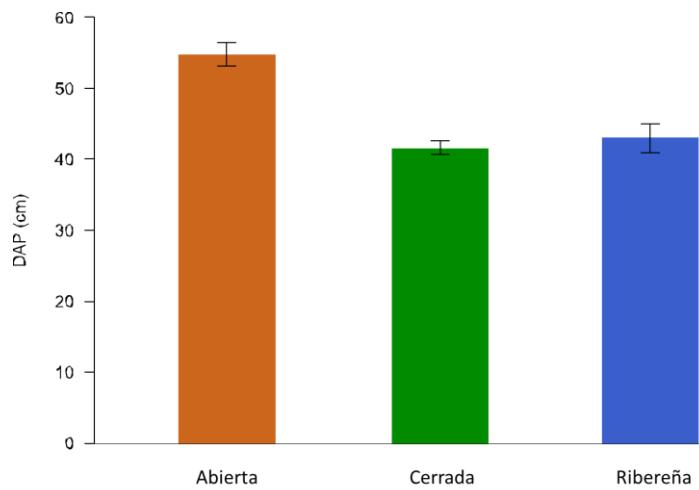


Figura 33.- Diámetro a la altura del pecho (DAP) de los forofitos de *Laelia anceps* subsp. *anceps* en las zonas de estudio.

9.2.3.3.- Cobertura

Finalmente se observó que los arboles hospederos fueron diferentes en cuanto a su cobertura entre las zonas. Por ser una variable con porcentaje, los datos se trasformaron a raíz cuadrada y posteriormente se aplicó el análisis de varianza ($F= 17.46$, $g.l.= 2$, $P< 0.001$), siendo la zona abierta la que presentó mayor cobertura que la zona cerrada ($P< 0.05$) (Fig. 34).

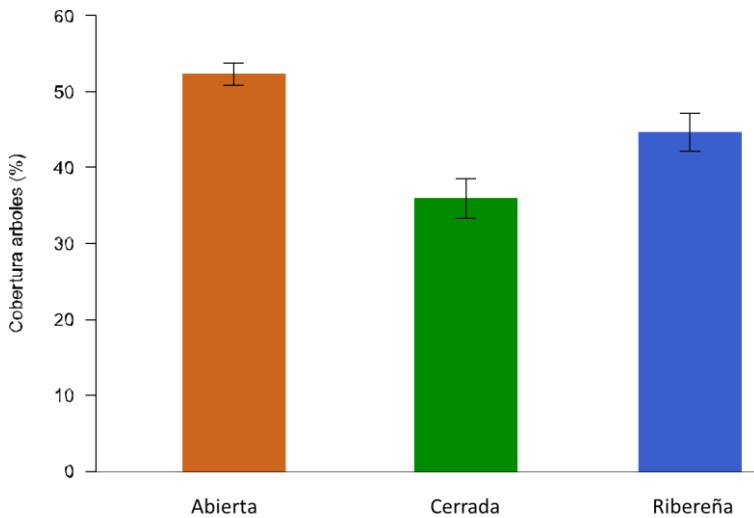


Figura 34.- Cobertura (%) de los forofitos de *Laelia anceps* subsp. *anceps*.

9.3.- Orientación de la especie

De manera general, la especie en los relictos de encinar tropical se orienta al norte (Fig. 35), y el análisis mostró que existe una relación altamente significativa entre la orientación de la especie con las zonas de estudio ($X^2= 43.738$, g.l.=11, $P< 0.001$) (Fig. 36).

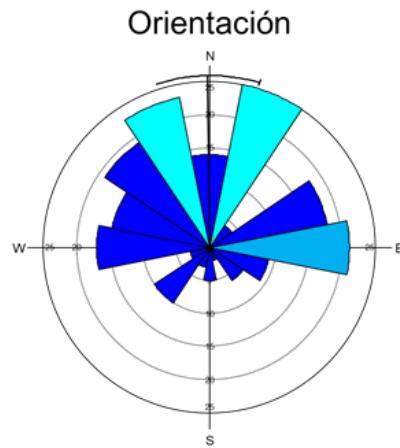


Figura 35.- Diagrama de rosa que indica la preferencia de la especie en orientarse hacia el norte.

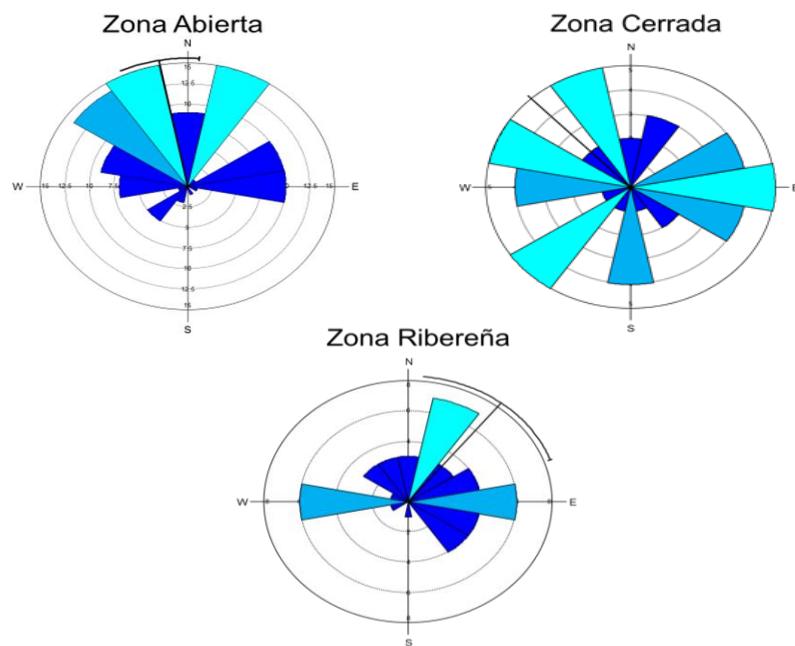


Figura 36.- Diagramas de rosa muestran la frecuencia de la orientación de la *Laelia anceps* subsp. *anceps* por zonas de estudio: Abierta, Cerrada y Ribereña.

9.4.-Distribución vertical y ubicación en rama

La especie se distribuye de manera natural en el árbol hospedero entre las zonas B, C y D (Johansson, 1974 y Pupulin *et al.*, 1995, estableciéndose de manera natural sobre la parte superior de las ramas y creciendo de manera envolvente sobre el árbol hospedero (Fig. 37 y 38).

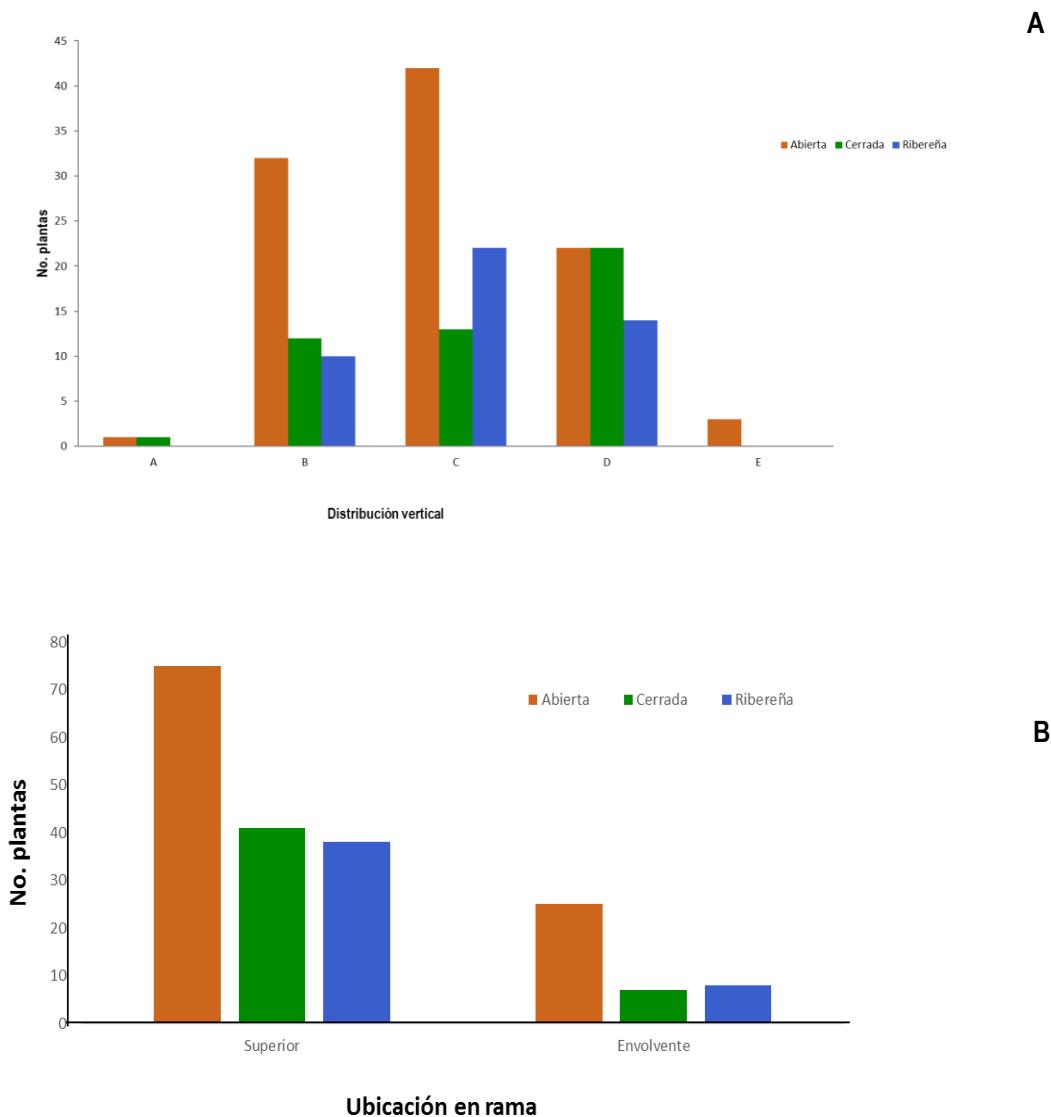


Figura 37.- Distribución vertical y ubicación en rama de *Laelia anceps* subsp. *anceps* sobre los forofitos en las zonas de estudio. A.- Distribución vertical y B.- Ubicación en rama.

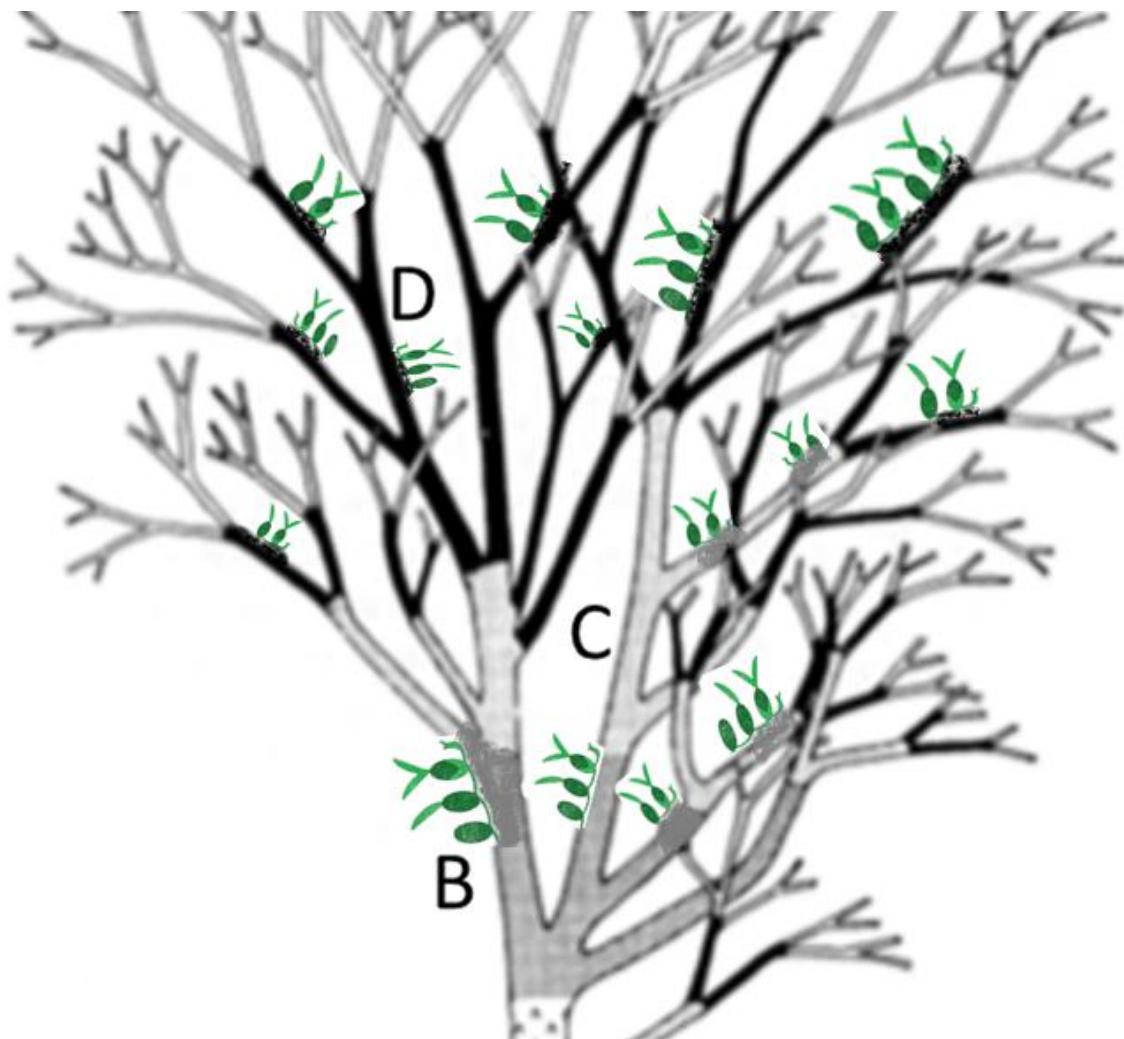


Figura 38.-Ilustración que muestra la distribución vertical y ubicación en ramas de *Laelia anceps* subsp. *anceps* sobre el forofito.

X.- DISCUSIÓN

10.1.- Pre-aclimatación para la aclimatación de plántulas procedentes de cultivo *in vitro*.

Existen muchos trabajos sobre aclimatación de plántulas procedentes de cultivo *in vitro* en los cuales se prueba y evalúa desde la eficacia de los medios de cultivo, diferentes concentraciones, sustratos, fertilizantes, etc. (Teixeira da Silva *et al.*, 2017), sin embargo, investigaciones donde se considere una pre-aclimatación de las plántulas (dentro del frasco *in vitro*) antes de la aclimatación, hasta el momento, sólo lo han realizado Ortega-Loeza *et al.* (2011). Estos autores propusieron realizarlo de manera escalonada en plántulas de *Laelia speciosa* y lograron concretar que dicha especie con 20 días de pre-aclimatación de las plántulas dentro de los frascos de cultivo *in vitro*, presenta plántulas con mayor crecimiento, vigor y funcionamiento estomático, en comparación con los otros tratamientos; sugiriendo que la pre-aclimatación es un factor importante para promover el funcionamiento estomático antes de la transferencia *ex vitro*, ya que se obtienen plántulas mejor adaptadas, con mayor posibilidad de supervivencia en condiciones invernadero y con óptimo crecimiento, por lo que la pre-aclimatación consiste en adaptar a las plántulas a las condiciones de luz e intensidad luminosa del sitio donde se realizará el endurecimiento.

Por lo antes descrito, se consideró replicar parte del experimento realizado por Ortega-Loeza *et al.* (2011); partiendo de que la especie en estudio pertenece al mismo género; sin embargo, de acuerdo a los resultados, *Laelia anceps* subsp. *anceps* mostró requerir tan solo 10 días de pre-aclimatación y se obtuvieron plántulas mejor adaptadas a condiciones *ex vitro* con óptimo crecimiento durante su aclimatación; por lo que se pudo demostrar que cada especie tiene sus propios requerimientos fisiológicos y fenológicos.

Laelia speciosa crece en sitios con mayor altitud, más fríos y secos y requiere de un periodo de reposo con bajas temperaturas, alta intensidad luminosa y escasa o nula precipitación (Hernández-Apolinar, 1992, Ávila y Oyama, 2002), mientras que *Laelia anceps* subsp. *anceps* requiere de periodos de reposo con temperaturas medias, humedad constante e intensidad luminosa media (Soto-Arenas, 1993).

Se ha observado que en especies de orquídeas epífitas de bosques de pino encino o bosques de mayor altitud los periodos de reposo son más largos, mientras que las especies de orquídeas epífitas de clima templado- cálido son de reposo más cortos.

Especie	Altitud	Intensidad luminosa	Clima	Humedad	Ciclo	Periodo de reposo	Tamaño
<i>Laelia speciosa</i>	1800-2500 msnm	soleada	frio	Seca o baja	17 años	5 meses	10-20 cm.
<i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i>	300-1000 msnm	Sombra media	cálido	Media a alta	4 años	3 meses	25-40 cm.

Otros ejemplos de orquídeas tropicales de ciclo corto son las especies e híbridos de *Dendrobium* (Teixeira da Silva *et al.*, 2017) en donde aplican la pre-aclimatación para incrementar la sobrevivencia de las plántulas; lo que me lleva a deducir que la pre-aclimatación debe ser similar al clima, reposo y ciclo de crecimiento de la especie en forma natural; por lo que es importante que en futuros trabajos de pre-aclimatación se estudien y relacionen la fenología, la duración del ciclo y las eco fisiología de la especie con la duración del periodo de pre-aclimatación.

Como podemos observar, aunque son especies del mismo género no necesariamente el periodo de pre-aclimatación es similar; *Laelia anceps* subsp. *anceps* presentó periodos de pre-aclimatación cortos, similares a los del género *Dendrobium*; por lo que parece que los periodos están más relacionados con la ecofisiología y fenología de las especies que pertenecer al mismo género.

Durante la aclimatación, la supervivencia de las plántulas se ve afectada por las deficiencias fisiológicas y anatómicas que estas presentan, ya que pasan de un estado fotomixotrófico (heterótrofo) a autótrofo (Hazarika *et al.*, 2006), pudiendo desecarse rápidamente por los cambios drásticos sobre todo de humedad en el medio ambiente, por ello es importante que se tomen las precauciones para adaptar la plántula al nuevo entorno. En este caso la propuesta es la pre-aclimatación de las plántulas dentro de los frascos procedentes de cultivo *in vitro* y que las plántulas empiecen a corregir gradualmente las anomalías morfofisiológicas dentro del mismo y asegurar la supervivencia en condiciones *ex vitro* (Pospísilová *et al.*, 1999) lo cual se logra observar en la aclimatación de las mismas en las raíces, donde las plántulas presentan desarrollo de sistema

radicular funcional, control estomático para optimizar la transpiración y endurecimiento cuticular (Hew and Yong, 2004).

Cabe destacar que el experimento de pre-aclimatación se realizó a finales de invierno y principios de primavera, entre los meses febrero-mayo y en esta época del año las condiciones de temperatura y luz en Chavarrillo son similares a las condiciones de incubación; para que de manera gradual las plántulas se adaptaran a las nuevas condiciones ambientales de luz y temperatura y de acuerdo con la fenología de la especie, en febrero comienza el crecimiento de la raíz y de marzo a mayo se activan las yemas vegetativas (brotes); por lo que durante el experimento se observó que en los diferentes tratamientos, las plántulas presentaron incremento en su sistema radicular, así como también activación de yemas de crecimiento expresada en incremento de hojas y en su longitud total de la plántula, donde las plántulas sobrevivientes de cada tratamiento lograron corregir las anomalías morfológicas de *in vitro*, elevaron su tasa fotosintética, activaron los estomas y presentaron un endurecimiento de cutícula, sin embargo, las plántulas del tratamiento con 10 días de pre-aclimatación presentaron mayor supervivencia y crecimiento.

En último mes de evaluación (al cuarto mes) se presentó la formación de pseudobulbos, el tratamiento con 10 días de pre-aclimatación presentó un número mayor de plántulas con dicha estructura. Esto indica que las plántulas aumentaron su capacidad de almacenar agua y nutrientes, asegurando su crecimiento y desarrollo (Hew and Yong, 2004), preparándose para sobrevivir bajo las condiciones adversas en su zona de distribución y establecimiento. Este resultado coincide con la aclimatación de *Laelia halbingeriana*, cuyas plántulas presentaron formación de pseudobulbo a partir del cuarto mes de aclimatación (Heredia, *et al.*, 2009).

10.2.- Establecimiento natural de la especie.

La caracterización de la especie en campo se realizó relictos de encinar tropical, por el hecho de que se ha observado que *Laelia anceps* subsp. *anceps* tiene preferencia por establecerse sobre los encinos (Morales-Linares, 2009, Torres-Cantú, 2013 y Soto-Arenas, 1993). De acuerdo a los resultados obtenidos, los forofitos de las zonas de estudio presentaron estructura muy parecida, en cuanto a la altura, diámetro a la altura del pecho y la cobertura.

Se pudo observar que *Laelia anceps* subsp. *anceps* se establece de manera natural sobre este forofito(encino), el cual le brinda las condiciones adecuadas para su establecimiento. En primera instancia les da soporte y su corteza rugosa les permite un buen enraizamiento y drenaje, la cobertura necesaria para el desarrollo de la especie, ya que esta oscila entre el 35 y 50 %, según la zona y la estación del año; pero siempre expuesta a mucha luz. Las semillas de las orquídeas son muy pequeñas y se dispersan con el viento, recorriendo largas distancias y las que se alojan sobre la copa de los forofitos, pueden germinar y adaptarse a la corteza del árbol por medio de sus raíces, las cuales han desarrollado una estructura esponjosa llamada velamen, cuya función es la de absorber el agua y nutrientes procedentes de la lluvia y escurrimientos de las ramas, además de realizar fotosíntesis; el tejido cortical de la raíz hospeda hifas de hongos las cuales le ayudan a la orquídea a degradar y absorber los nutrientes y proveen a las semillas de nutrientes para su germinación y desarrollo.

Además, este forofito, encino, aloja a otras especies de orquídeas, líquenes, bromelias y musgos, los cuales ofrecen un buen lugar para el establecimiento de semillas y esporas de epifitas. En este estudio se identificó que *Laelia anceps*, subsp. *anceps* se establece en la corteza de encinos asociada y en combinación con musgos, líquenes y bromelias en un 74.2 % y comparte espacio una especie de orquídea, *Rhyncholaelia glauca* (Flores-Palacios y García-Franco, 2003) principalmente, en cuanto a la siguiente asociación más frecuente es con líquen, con un 12.3%, lo cual coincide en parte con el estudio realizado por Cedillo *et al*, (2013), ya que *Prosthechea aff. karwinskii* en su establecimiento sólo se asocia con líquenes.

Otra de las adaptaciones de esta especie es el pseudobulbo, el cual le permite almacenar nutrientes y agua para posteriormente utilizarla en la época marcada de sequía; por lo que las adaptaciones morofisiológicas de las epifitas dependen en mucho de las características del forofito (su forma biológica, altura, textura, arquitectura del follaje y su condición perenne o caducifolia) y las condiciones ambientales (Granados-Sánchez, et al.,2003).

De acuerdo a la zona de estudio, la cual se caracteriza por ser cálida y presentar estaciones muy marcadas, tuvo como vegetación principal el encinar tropical, del cual solo quedan relictos y sobre los cuales trabajamos; estas estaciones marcadas para la orquídea son importantes y parecieran que la fenología del forofito y de la especie están sincronizadas, por el hecho de que esta especie de orquídea necesita mucha luz, temperatura cálida, ventilación y buen drenaje para su germinación, crecimiento y desarrollo; factores que el forofito y el ambiente en el que se desarrollan le proveen.

<i>Laelia anceps</i> subsp. <i>anceps</i> .	Forofito (<i>Quercus</i> spp.)	Relación
<p>Primavera: Desarrolla yemas estimuladas por la luz.</p> <p>Verano: Termina de crecer el nuevo brote y el pseudobulbo se llena de agua y nutrientes, además de inducirse la vara floral.</p>	<p>Primavera-Verano: Renovación de hojas ocasionada por las lluvias y florecen.</p>	<p>Primavera: El aumento de hojas nuevas en el encino, reduce la intensidad luminosa y permite el desarrollo de las yemas vegetativas.</p> <p>Verano: La cobertura foliar total del encino, protege a la orquídea de los rayos directos del sol durante la etapa de mayor crecimiento y desarrollo de la vara floral.</p>
<p>Otoño: Florece y generar cápsulas con semillas, las cuales tienen un tiempo de maduración de 4 meses a partir de su polinización.</p> <p>Invierno: Cápsula se abre y se dispersan las semillas.</p>	<p>Otoño-Invierno: Defoliación (hasta el 60 %) y tiran sus semillas(bellotas).</p>	<p>Otoño: La senescencia de las hojas del encino permite una mayor entrada de luz que permite antesis de la flor de la orquídea.</p> <p>Invierno: La defoliación del encino permite una mayor entrada de luz y ventilación que coincide con el periodo de reposo de la orquídea y al finalizar permite que las yemas se activen e inician crecimiento durante la primavera.</p>

De acuerdo con Halbinger y Soto-Arenas (1997) y Hágster et al. (2005), la distribución de los individuos de *Laelia anceps* subsp. *anceps* sobre los árboles no ha sido estudiada a profundidad

y sólo se describe de manera general que las especies de este género se desarrollan en ramas grandes y horizontales, ausentes en niveles inferiores de tronco y ramas exteriores de copa. En el presente estudio pudimos constatar que la especie independientemente de la altura de los árboles hospederos, se establece, crece y desarrolla dentro de la copa del árbol (zonas: B, C y D) (Johansson, 1974) en la parte superior de las ramas grandes horizontales, lo cual permite a las hojas de la especie tengan un mayor acceso a la luz, tener una mejor ventilación, captación de humedad, agua y nutrientes; logrando activar las yemas para su crecimiento y su desarrollo vegetativo; además de ser accesible a los polinizadores.

La preferencia de establecimiento natural de *Laelia anceps* subsp. *anceps* contrasta con el de la especie *Ionopsis utricularioides*, la cual crece y se distribuye en las ramillas de los árboles (Zona E), nunca en el tronco ni dentro de la copa (García-González y Riverón-Giró, 2014), así mismo con *Prosthechea aff. karwinskii*, la cual tiene preferencia por establecerse en la parte lateral y debajo de las ramas (Cedillo *et al.*, 2013).

En cuanto a la orientación de la especie en la zona de estudio, se observó que esta especie en la zona abierta tiene preferencia por orientar sus hojas y varas florales hacia el norte (noreste y noroeste), lo cual al orientarse al norte crea un micro hábitat donde hay una mayor humedad. Sin embargo, estudios de orientación otras especies, indican que *Lepanthes eltoroensis* tiende a hacerlo hacia el noroccidente (Tremblay y Velázquez-Castro, 2009); mientras que *Tetramicra malpighiarum* crece con orientaciones sur y noroeste (García-González *et al.*, 2016) y *Prosthechea aff. karwinskii* hacia el este, sur y oeste (Cedillo *et al.*, 2013) mientras tanto *Ionopsis utricularioides* no presenta una marcada preferencia de orientación cardinal (García-González y Riverón-Giró, 2014).

A pesar de que *Laelia anceps* subsp. *anceps* tiene preferencia de establecerse sobre este forofito; debido a los cambios de uso de suelo en la zona de estudio, el encinar tropical ha sido desplazado por cultivos (Arriaga, 2000). Sin embargo, se ha observado que la especie puede adaptarse, crecer y desarrollarse sobre otros forofitos, incluso sobre las rocas, siempre y cuando tengan las condiciones favorables para hacerlo (Halbinger y Soto-Arenas, 1997). Esto abre una alternativa para la conservación y manejo de la especie, pudiendo hacerlo dentro de su rango geográfico, aunque no sea sobre su principal forofito (*circa situm*).

XI.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Esta investigación nos permitió entender y ampliar el conocimiento sobre *Laelia anceps* subsp. *anceps*, especie de gran valor cultural, económico y ornamental en la localidad de Chavarrillo y la región.

La pre-aclimatación es importante para obtener una óptima aclimatación en plántulas procedentes de cultivo *in vitro* ya que nos ayuda a tener mayor sobrevivencia y crecimiento durante esa etapa crítica; por lo que en el presente trabajo contribuye a mejorar y sistematizar el manejo de la especie en condiciones de invernadero, ya sean para fines económicos, culturales, ornamentales y/o ecológicos.

El presente trabajo contiene información relevante necesaria para la conservación de la especie en campo y simultáneamente la importancia de conservar los remanentes de encinares tropicales, ya sea considerando una reubicación, repoblación y/o establecimiento de nuevas poblaciones, tanto de plántulas procedentes de cultivo *in vitro* como divisiones de plantas adultas (reproducción asexual) logrando mayor sobrevivencia de la especie en campo de manera *in situ* o *circa situm*.

Por lo anterior expuesto, se propone lo siguiente:

- Realizar cultivo *in vitro* de la especie con semillas procedentes de la mayor cantidad de cápsulas y de la región, con lo cual aseguramos conservar la variabilidad genética de la especie.
- Trasladar los frascos sellados con plántulas al sitio donde finalmente se destinarán y mantenerlos así bajo las condiciones del lugar durante 10 días (pre-aclimatación) para luego aclimatar (extraer las plántulas de los frascos).
- Aclimatar las plántulas en maceta con una mezcla de sustratos (grava, tepezil, carbón y Peat moss™) en la proporción 1:1:0.5:0.5) para asegurar buen drenaje el desarrollo del sistema radicular de la especie.
- Se recomienda una aclimatación de al menos 4 meses, debido a que durante ese tiempo la sobrevivencia es del 90% y muchas plántulas presentan formación de pseudobulbos.

- Es importante realizar este proceso durante el invierno ya que las plántulas sufren menos desecación y conforme va pasando el tiempo se van adaptando a la luz y a las altas temperaturas que pudieran presentarse en primavera y verano.

Después de haber obtenido las plántulas se puede considerar mantenerlas en condiciones de vivero para un aprovechamiento sustentable, el cual se puede realizar a través de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAS), en donde se necesitaría establecerlas y/o trasplantarlas en otras macetas para que continúes con un óptimo crecimiento.

Un aspecto importante por considerar es el ocupar las plántulas para programas de reintroducción y/o reabastecimiento de la especie en áreas específicas, según el caso; para lo cual se propone realizarlo de la siguiente manera:

- Considerar la altura y cobertura de los forofitos, según el tipo de relictio de encinar y/o acahual, incluso en zonas de cultivo (*circa situm*); sin embargo, si se decide realizarlo en zonas relictio de encinar tropical, se propone que en zonas abiertas se establezcan a los 6 m. de altura, en las zonas cerradas se establezcan a los 5 m y en las zonas ribereñas a los 3 m de altura; procurando establecerlas en zonas expuestas a la luz y corrientes de aire.
- Es importante establecer la especie dentro de la copa de los árboles, en las zonas: B, C y D (Johansson, 1974), sobre la parte superior de las ramas y que la corteza del forofito esté habitada por al menos líquenes, además de otras plantas epífitas (musgo, bromelias y orquídeas).

XII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Morales, M. y López-Escamilla. 2013. "A germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*". Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. 1(1). Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas.
- Aguirre, L., E. 2012. Conservación de orquídeas en México: situación actual, problemas y perspectivas. In: Conservación de Orquídeas en México. María Aida Téllez (comp. y ed.) México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. pp: 238-242.
- Arditti, J, Ghani A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol* 145:367–421.
- Arditti, J. Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds, *Botanical Review*, Vol. 33, No. 1, Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds (Jan. - Mar. 1967), pp. 1-97 Published by: Springer on behalf of New York Botanical Garden Press.
- Arriaga, L., J.M. Espinoza, C. Aguilar, E. Martínez, L. Gómez y E. Loa (Coordinadores). 2000. Regiones terrestres prioritarias de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México. RTP-104.
- Atwood, J. T. 1997. Some thoughts on Orchid Conservation 97. *Selbyana* 18 (2): 1-151.
- Ávila, D.I y K. Oyama. (2002). Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchideaceae). *Biodiversitas*.7(43):9-12.
- Ávila-Díaz, I., K. Oyama, C. Gómez-Alonso & R. Salgado- Garciglia. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 99. 335–343.
- Benzing, D.H., 1990. *Vascular Epiphytes: General Biology and Related Biota*. Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Bertolini, V. Damon, A., Luna T., Francisco R., Rojas Velázquez, Ángel N. 2012. Las orquídeas del Valle del Mezquital, Hidalgo (México), resultados preliminares. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* XI.
- Castañeda-Zárate, M. 2008. Propagación y conservación de lirio de todos santos *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* f *semialba* (orchidaceae) a través del cultivo de tejidos. Tesis de licenciatura, zona Xalapa.
- Castañeda-Zárate, M. Viccon-Esquivel, J., Ramos-Castro, S.E. y Solano-Gómez, R. 2012. Registros nuevos de Orchidaceae para Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 281-284.

- Castillo, G. 1985. Integración de paisajes en la región de Jalcomulco, Veracruz. Universidad Veracruzana. Tesis Profesional. Xalapa, Ver. 110 p.
- Castillo, G, 1995, Ecología del paisaje del municipio de Jalcomulco, Veracruz, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 192 pp.
- Cedillo, L., Gómez-Alonso, C., Ávila-Díaz, I. 2013. Patrones de distribución vertical y horizontal de la epífita endémica *Prosthechea aff. karwinskii* (Orchidaceae) en Michoacán, México. Lankesteriana International Journal on Orchidology 13
- Ceja Romero, J., Espejo Serna, A., López Ferrari, A., García Cruz, J., Mendoza Ruiz, A., Pérez García, B. 2008. Las plantas epífitas, su diversidad e importancia Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México 1 (91) 34-41.
- Chan, M .2011. Modern Issues and Methods in Biostatistics in Statistics for Biology and Health (series) Editors: Gail, M., Samet, J.M., Singer, B., Tsiatis, A. Springer, U.S.A.
- Chase, M., Cameron K., Freudenstein J., Pridgeon A., Salazar G., Van den Berg C., Schuiteman A. 2015. An updated classification of Orchidaceae *Botanical Journal of the Linnean Society*. 177, (2) 51–174.
- CITES, 2017. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Apéndices I, II y III.
- CONABIO, 2011. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. La biodiversidad en Veracruz: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Veracruz, Universidad Veracruzana, Instituto de Ecología, A.C. México.
- Comisión Nacional del agua. 2016. Normales climatológicas del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave. Estación 00030140 Rancho Viejo, Mpio Emiliano Zapata. Latitud: 19° 26`49`` N. Longitud: 96° 47`01`` W. Altura: 914.0 msnm.
- Cox-Tamay, L. y Cervantes Uribe J. 2016. Laelias: Flores mágicas y ceremoniales. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Herbario CICY 8: 122–127.
- Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K., W. y Barrett, R. L. 2003. *Orchid Conservation in Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah. 259-288.
- Darwin, C. R. 1877. *The various contrivances by which orchids are fertilised by insects*. London: John Murray. 2d edition.

- Dawson, I.K., Guariguata, M.R., Loo, J., Weber, J.C., Lengkeek, A., Bush, D., Cornelius, J., Guarino, L., Kindt, R., Orwa, C., Russell, J. & Jamnadass, R. 2013. What is the relevance of smallholders' agroforestry systems for conserving tropical tree species and genetic diversity in *circa situm*, *in situ* and *ex situ* settings? A review. *Biodiversity and Conservation*, 22 (2) 301-324.
- Dressler, R.L. 1982. The orchids natural history and classification. Second printing. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts and London, England.
- Dressler, R.L. 1993, Phylogeny and classification of the orchid family, Dioscorides Press, Portland.
- Dressler, R. 2005. How many orchids species? *Selbyana* 26(1,2): 155-158.
- Flores-Palacios, A. y García-Franco J.G. 2003. Efectos de la exhibición floral y la abundancia de plantas en la producción de frutos de *Ryncholaelia glauca* (Orchidaceae). *Revista de biología tropical*. 51 (1), 71-78.
- Flores-Palacios, A. y S. Valencia-Díaz. 2007. Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biol. Conserv.* 136 372-387.
- Francisco-Nava, J.J, Jiménez Aparicio, A.R., De Jesús Sánchez, A., Arenas Ocampo, M.L., Ventura Zapata, E. y Evangelista Lozano, S. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas in vitro. *Polibotánica* Núm. 32, pp. 107-117, ISSN 1405-2768; México.
- García-Balzázar, N. 2012. Preferencia de hospederos y distribución vertical de epífitas vasculares en un fragmento de bosque mesófilo de montaña de la reserva de la biosfera "El Cielo", Tamaulipas, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Forestales. Tesis de Maestría en Ciencias Forestales.
- García-González, A. y Riverón-Giró, F. B. 2014. Organización espacial y estructura de una población de *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae) en un área suburbana de Pinar del Río, Cuba. *Lankesteriana*, 13(3), 419-427.
- García-González, A., Riverón-Giró, F., González-Ramírez, I., Escalona Domenech, R., Hernández Montero, y Palacio Verdecia, E. 2016. Ecología y estructura poblacional del endemismo cubano *Tetramicra malphiarum* (Orchidaceae) en el Parque Nacional Desembarco del Granma, Cuba. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*.

- Granados-Sánchez, D.; López-Ríos, G. F.; Hernández-García, M. Á.; Sánchez-González, A. 2003. Ecología de las plantas epífitas Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Universidad Autónoma Chapingo Chapingo, México .9 (2) 101-111.
- Hágsater, E., Soto-Arenas M.A., Salazar Chávez G.A., Jiménez Machorro R., López Rosas M.A. y Dressler R.L. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México. 1- 304
- Halbinger, F. 1993. Laelias de México. Asociación Mexicana de Orquideología A.C. México, D.F.
- Halbinger, F. y Soto-Arenas, M. 1997. Laelias of México. Asociación Mexicana Orquideología A.C. Herbario AMO. México D.F.
- Hazarika, B.N., Teixeira da Silva, J.A y Talukdar, A. 2006. Effective Acclimatization of in Vitro Cultured Plants: Methods, Physiology and Genetics. Acclimatization of in vitro plants. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume II. Global Science Books, UK. 427-438 pp.
- Hernández-Apolinar M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK.) Schltr. (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 86 pp.
- Heredia-Rendón, A., Enríquez-del Valle J., Campos, G.V., Marini, F. and Velasco, V.A. 2009. Ex Vitro Acclimatization of *Laelia halbingeriana* Plants Grown in Different Media and Fertilization Doses. *Acta Horticulturae*. No. 843 p. 191-196.
- Hew, C. S. and Yong W. J. J. The physiology of tropical orchids in relation to the industry. 2nd ed. 2004. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 5 Toh Tuck Link, Singapore 596224.
- Higuera, D. 2008. Epífitas y árboles hospederos: relación entre especies o restricción de recursos. URL Document. <http://waste.ideal.es/epifitas2.htm>.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 2011. Censo de Población y Vivienda, 2010 (Informe nacional y estatales), México.
- Johansson, D. 1974. Ecology of vascular epiphytes in west African rain forest. *Acta Phytogeographica Suecia*. 59: 1-136.
- Landa-Cortina, M.T. 1992. Inventario de las Orquídeas registradas para el estado de Veracruz. Tesis Facultad de Biología, zona Xalapa, Veracruz, México.

- Lee-Espinosa, H., Laguna-Cerda, A., Murguía-González J. Elorza-Martínez P., Iglesias-Andreu, L., García-Rosas, B., Barredo-Pool F.A. y Santana-Buzzy N. 2007. Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* subsp *dawsonii*. Revista UDO agrícola 7 (1) :58-67.
- Maldonado-Flores, C. 2005. Patrón de distribución espacial y dinámica poblacional de *Oncidium crista galli*, una especie de orquídea epífita de Chiapas. Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de Maestría.
- Menchaca-García, R.A., y Moreno Martínez, D. 2011. Manual para la propagación de orquídeas CONAFOR. 1-51p.
- Menchaca-García, R.A., Moreno Martínez, D. 2012. La importancia de las Unidades de Manejo Ambiental en la conservación de las orquídeas mexicanas, un ejemplo. En Conservación de orquídeas en México. UNAM. México. 284-288 pp.
- Menchaca-García, R. A., Lozano Rodríguez, M. A., Sánchez Morales, L. 2012. Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 3(13): 9-16.
- Menchaca-García, R. A. y Morales-Ruiz, V., 2016. Lirio de Todos Santos, tradición y conservación. Diario de Xalapa, Cultura. Ciencia y Luz. Pp. 3-E.
- Montes-Cruz, S., Lalama-Aguirre J. M., Echeverría-Félix J. M. y Salazar-Torres S. M. 2016. Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero. Dom. Cien., ISSN: 2477-8818 Vol. 2, núm. esp. 63-89 p.
- Morales-Hernández, J.L., González-Razo, F.J. y Pérez-Chávez, M.A. 2016. Polibotánica Núm. 42, pp. 103-119, México, 2016
- Morales-Linares, J. 2009. Diversidad de orquídeas en cuatro ambientes del ejido Rancho Viejo-Palmarejo, Municipio de Emiliano Zapata, Ver. Tesis Profesional. Universidad Veracruzana, Facultad de Biología, Zona Xalapa. 95p.
- Morales-Ruiz, V. 2003. Plantas medicinales silvestres de Chavarrillo, municipio de Emiliano Zapata, Ver. Tesis Profesional. Universidad Veracruzana, Facultad de Biología, Zona Xalapa. 61 p.
- Murashige, T. Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473-497.

- Ortega-Loeza, M. M., Salgado Garciglia, R., Gómez Alonso, C. y Ávila-Díaz, I. 2011. Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid, *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. European Journal of Environmental Sciences, 1(2) 48–54.
- Ortiz del Ángel, G. 2017, Interacciones ecológicas en orquídeas epífitas presentes en la zona arqueológica “El Tajín”, Papantla, Veracruz. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Campus Tuxpan. Tesis de Maestría en Ciencias del Ambiente.
- Pedraza-Santos, M.E. 2017. La propagación masiva de orquídeas (Orchidaceae); una alternativa para la conservación de especies silvestres. Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 6, junio. 2017. pp: 31-36.
- Pérez-García, E. A. 2010. El Redescubrimiento De *Mexipedium Xerophyticum* (Soto Arenas, Salazar & Hágsater) V.A. Albert & M.W. Chase. Universidad de Costa Rica Cartago, Costa Rica. Lankesteriana International Journal on Orchidology 9(3) 557-563.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadlecová, P. y Haisel, D. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. Biología Plantarum 42 (4): 481-497.
- Pupulin, F., Bianchi, E., Germani, M., Pedruzzi, D. y Wagner, A. 1995. Orchid diversity and distribution on a tree at Reserva Forestal de San Ramón, Costa Rica. Bremesia (43-44) 47–54.
- Rocha-Gutiérrez, O.E. y Duque-Sánchez, J.A. 2017. Unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre con enfoque en orquídeas (Orchidaceae). Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 6, junio. 2017. pp: 62-65.
- Romero-Tirado, R. 2008. Fertilizantes comerciales como sustitutos en el cultivo in vitro de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). Especie mexicana. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios Superiores Zaragoza, México D.F.
- Salazar-Rojas, V. M., Herrera Cabrera, B. E., Flores Palacios, A. y Ocampo Fletes, I. 2007. Traditional Use And Conservation Of The “Calaverita” *Laelia Anceps* Subsp. *Dawsonii* F. Chilapensis Soto-Arenas At Chilapa Guerrero México. Lankesteriana International Journal on Orchidology. 7(1-2) 368–370.
- Salazar, GA, Jiménez-Machorro, R., Huerta, HM, y Hágsater, E. 2014. A new species and a new natural hybrid of *Laelia* (Orchidaceae) from Oaxaca, Mexico. Phytotaxa, 178.3. 1.
- Sánchez-Roldan, M. 2009. Evaluación de medios de cultivo para la reproducción in vitro de *Laelia anceps*. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

- Sánchez-Morales, L.P. 2015. Caracterización de unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre (UMAs) de orquídeas, como base para el diseño de estrategias de operación: seis estudios de caso. Colegio de Postgraduados. Campus Veracruz. Tesis de Maestra en Ciencias. 106 p.
- Seaton, P., Kendon P. J. Pritchard H. W., Puspitaningtyas D. M., Marks T. R. 2013. Orchid conservation: the next ten years. *Lankesteriana. International Journal on Orchidology* 13(1-2): 93-101;
- Seaton, P. and M. Ramsay. 2005. Growing orchids from seeds. Royal Botanical Garden, Kew. London, England. 83 pp.
- SEMARNAT, 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-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, 30 de diciembre de 2010.
- Sierra-Jiménez H. 2006. Germinación *in vitro* y adaptaciones a condiciones *ex vitro* de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lexarza) Lindl. (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Zaragoza, México D.F.
- Soto-Arenas, M.A., Hágster, E., Jiménez Machorro, R., Salazar Chávez, G.A., Flores González, R. y Ruiz Contreras I. 2005. Las Orquídeas de México. Catálogo Digital. Disco interactivo multimedia, win-Mac. Herbario AMO. Instituto Chinoín, A.C. México.
- Soto-Arenas, M.A. 1993. Clasificación infraespecífica de *Laelia anceps*. Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. México. *Orquídea* 13 (1-2):125-144.
- Suárez-Quijada, I. 2010. Alternativas simbióticas y asimbióticas de propagación (micropropagación e introducción) de *Dichromantus aurantiacus* (Orchidaceae) como especie modelo en la reserva del Pedregal, Tesis de maestría Posgrado en ciencias biológicas,UNAM.
- Teixeira da Silva, J.A., Musharof Hossain, M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J.C., and Zeng SJ. 2017. Acclimatization of in Vitro-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3 (3): 110–124.
- Tejeda-Sartorius, O. Téllez-Velasco, M.A.A. y Escobar-Aguayo, J.J. 2017. Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 6, junio. 2017. pp: 3-12.

Torres-Cantú G. B. 2013. Lista florística de la barranca de Monte Oscuro, municipio de Emiliano Zapata, Veracruz, México. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

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

IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. Orchids-status survey and action plan IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK. 153 p.

Zotz, G. y J. L. Andrade. 2002. La ecología y la fisiología de las epifitas y las hemiepífitas. Capítulo 12: 271-296. En: M. R. Guariguata y G. H. Catan (Eds.) Ecología y conservación de bosques neotropicales. Editorial Libro Universitario Regional, Costa Rica.

ANEXOS

Pre-aclimatación

Prueba de Tukey HS de significancia estadística al 95% para la variable longitud de plántulas entre los tratamientos.

Tratamientos	Valor P
10-0	0.0000058
10-15	0.0003994
10-25	0.0000441
10-30	0.0008505

Resultados de la prueba Tukey HS con una significancia de 95 %, la cual muestra diferencias significativas en número de hojas por tratamiento ($P > .001$).

Tratamientos	Valor P
10-0	0.0000027
10-5	0.0001335
10-15	0.0000102
10-20	0.0039287
10-25	0.0000042
10-30	0.0444245

Resultados prueba Tukey HS con 95 %, muestra diferencias significativas en número de raíces.

Tratamientos	Valor P
10-0	0.0000001
10-5	0.0000274
10-15	0.0003007
10.25	0.0000058
10-30	0.0006418