El Colegio de la Frontera Sur

Variabilidad genética e inducción callogénica *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae).

Tesis

Presentada como requisito parcial para optar por el grado de

Maestra en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Con orientación en Manejo y Conservación de los Recursos Naturales

Por

Ana Gabriela Coutiño Cortés

2016

Dedicatoria

A **Dios**. Porque pese a las adversidades me ha permitido cumplir un sueño más, por enseñarme el sentido de la Vida y permitirme compartir este logro con personas a las que amo.

A mis padres. **Manuelita Cortés** no hay palabras que expresen todo lo que te agradezco. Eres mi pilar, mi ejemplo y guía. Gracias por los ánimos tan oportunos, por las llamadas de atención para culminar esta etapa y por ser quién me escucha a cada momento, Te amo. **Gabriel Coutiño** jamás pensé que sucederían tantas cosas en tan poco tiempo, me haces tanta falta. Gracias porque sé que estás conmigo a cada instante, porque he podido recordar cada consejo que me diste, porque al conocerte tan bien sé que frase dirías para levantarme el ánimo y ayudarme a continuar, Te extraño.

A mi hermano. **Gabriel Alberto Coutiño Cortés** gracias por ser quién le da un toque especial a mi Vida con lo espontaneo que eres, por soportar mis malos ratos y compartir los buenos momentos.

A mi abuelita. **Dominga González Arrevillaga** gracias por ser una segunda madre, por el apoyo que tengo de ti a cada momento y ser un ejemplo de lucha constante.

A mi tío **Pedro Cortés**. Gracias porque al ser capaz de alcanzar cada meta que te propones me demuestras que todo es posible.

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT), por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría con el financiamiento de este.

Al **Doctor Vincenzo Bertolini** por darme la oportunidad de trabajar con él y aprender de esta experiencia que era nueva para ambos. Gracias por el apoyo para culminar esta etapa.

A los miembros de mi consejo tutelar, al **Doctor Leobardo Iracheta** que fue parte esencial para desarrollar el trabajo de cultivo *in vitro*, por aceptarme en su laboratorio, por los consejos que me dio y por todo el apoyo recibido durante mi estancia en INIFAP. A la **Doctora Lorena Ruíz** que me permitió iniciar una experiencia en el ámbito de la Genética, por aceptarme en el laboratorio, por el apoyo recibido, las aportaciones y recomendaciones para este proyecto. A la **Doctora Anne Damon** por compartirme conocimientos sobre mis plantas favoritas "las orquídeas".

A la **Bióloga Maricela García** por aceptarme en el laboratorio de Genética, enseñarme con paciencia y dedicación, por el apoyo que siempre recibí. Al Maestro **Fredy Archila** y **Sandy Mendoza** por su apoyo en la colecta de muestras de Guatemala, por sus aportaciones y consejo en la realización del proyecto.

A los investigadores del cuerpo académico de la Maestría de El Colegio de la Frontera Sur, quienes me brindaron sus conocimientos en los diferentes cursos y aportaciones puntuales para este trabajo. A mis **compañeros** de **laboratorio** de **Biotecnología Vegetal** de **INIFAP** y de **Genética** de **ECOSUR**, gracias por el apoyo durante este proyecto. A mis **compañeros de generación**, en especial a **Damaris** y **Aurora**, por ser mi familia y estar en los momentos difíciles.

Índice

I Resumen 7
II Introducción 8
II.I Orchidaceae 8
II.II Variabilidad genética 9
II.III Cultivo *in vitro* 12
II.IV Problema de investigación 14
II.V Justificación 15
II.VI Antecedentes 16
II.VII Pregunta de investigación 18
II.VIII Hipótesis 18
II.IX Objetivo 19
General 19
Específicos 19
III Materiales y Métodos 20
III.I Recolecta de material 20
III.II Variabilidad genética de *Guarianthe skinneri* 22
Extracción y visualización del ADN 22
Amplificación del ADN 22
Análisis de Secuencias 24
III.III Cultivo *in vitro* de *Guarianthe skinneri* 25
Desinfección del material vegetal 25
Inducción de callogénesis 26
III.IV Análisis de datos 28
Variabilidad genética de *Guarianthe skinneri* 28
Cultivo *in vitro* de *Guarianthe skinneri* 30
IV Resultados 31
IV.I Variabilidad genética de *Guarianthe skinneri* 31
Distancias genéticas 31

Diversidad y estructura genética 32
Flujo genético 35
Redes de haplotipos 36
Filogenética 37
Relación entre la distancia genética y la distancia geográfica 42
IV.II Cultivo *in vitro* de *Guarianthe skinneri* 42
Formación de callo 42
Contaminación 44
V Discusión 48
V.I Variabilidad genética de *Guarianthe skinneri* 48
V.II Cultivo *in vitro* de *Guarianthe skinneri* 51
VI Conclusión 57
VII Recomendaciones 58
VIII Bibliografía 59
IX Anexos 67

I Resumen

Guarianthe skinneri (Bateman) Dressler & W.E.Higgins, es una orquídea nativa de México catalogada como amenazada por NOM-059-SEMARNAT-2010, debido a colectas ilegales e irracionales con fines ornamentales y la reducción de su hábitat natural. Actualmente no es fácil encontrar poblaciones silvestres de esta especie en la región del Soconusco, sin embargo en la ciudad de Tapachula es frecuente ver individuos que embellecen los interiores de los patios particulares. Estos individuos podrían ser una fuente de biodiversidad a emplear para su conservación. Los objetivos del trabajo fueron evaluar la variabilidad genética de *Guarianthe skinneri* procedentes de la ciudad de Tapachula, Chiapas, México y de cinco poblaciones silvestres de Guatemala; así como inducir la callogénesis *in vitro* en diferentes tipos de explantes de *Guarianthe skinneri* mediante fitorreguladores. Para determinar la variabilidad genética se utilizó el marcador ITS en dos poblaciones de *G. skinneri*. Para la inducción de callo se establecieron explantes de hoja y médula de pseudobulbo en medio MS con los fitorreguladores BAP, 2,4-D, Kin, la interacción BAP/2,4-D/Kin/Sad y un testigo sin fitorregulador. Se encontró un nivel alto de variabilidad genética dentro de las poblaciones y con un alto flujo genético entre ellas. El explante de médula, al ser cultivado con BAP, presentó mayor formación de callo (18%) y menor contaminación (28%) a pesar de presentar 100% de oxidación. El uso de médula es una alternativa para la inducción de callogénesis de *G. skinneri* para el desarrollo de protocolos de conservación y propagación *in vitro*.

Palabras claves: Orchidaceae, especie amenazada, conservación, estructura poblacional, propagación *in vitro*.

II Introducción

II.I Orchidaceae

La familia Orchidaceae es una de las más diversas en el mundo con más de 29,000 especies. La amplia variabilidad genética de esta familia vegetal se debe a su alta tasa de hibridación natural que ha generado en el tiempo un alto nivel de especiación (Angulo-Graterol *et al*., 2013). Las semillas de orquídeas carecen de endospermo, por lo que contienen escasos nutrimentos o reservas para realizar la germinación *in vivo* (Flores-Escobar *et al*., 2008). Por lo tanto, en condiciones naturales se asocian con hongos micorrízicos que permiten que la planta se desarrolle (Abdelnour y Muñoz, 1997).

La distribución de orquídeas depende de las condiciones climáticas y la altitud, se han encontrado orquídeas desde los cero hasta los 4800 msnm. Por lo tanto, se han reportado orquídeas en diversos hábitats, lo que permite clasificarlas en epífitas (crecen sobre los árboles), terrestres, litofitícas (crecen sobre rocas) y trepadoras (Rivera-Dueñas, 2002). Las orquídeas más abundantes en bosques húmedos son las epífitas, aunque también se han reportado en bosques secos y estacionales (Dressler, 1993). Lo anterior se atribuye a las características que presentan estas orquídeas, debido a que en las raíces cuentan una cubierta que las protege de la desecación conocida como velamen. Además, muchas especies presentan pseudobulbo (tallo modificado) y/o hojas gruesas (con cutícula encerada) que les permite almacenar agua y nutrientes (Abdelnour y Muñoz, 1997).

Dentro de la familia Orchidaceae se encuentra *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.W. Higgins, que después de formar parte del género *Cattleya* se cambió al actual a partir de estudios filogenéticos (Dressler y Higgins, 2003). La distribución de esta especie va desde México hasta Panamá (Damon y Bertolini, 2015), en México esta especie se ha reportado las Reservas de la Biosfera El Triunfo y Volcán Tacaná del estado de Chiapas (Damon, 2010).

II.II Variabilidad genética

La variabilidad genética se basa en la composición de genotipos y alelos que portan los individuos de una población, y su prevalencia depende del ambiente en el que ésta se desarrolla (Rahim *et al*., 2010). La variación genética puede ser descrita con base en las diferencias entre las secuencias de ADN de fragmento del genoma de varios individuos; y esta media permita inferir el potencial evolutivo de las especies, en particular la posibilidad de adaptación a los cambios ambientales (Frankham *et al*., 2004; Allendorf y Luikart, 2007; Lundgvist *et al*., 2008). Los procesos evolutivos que determinan con mayor frecuencia los patrones de variación genética son la deriva génica y la selección natural (Hartl y Clark, 1989). Mientras que la deriva génica es un proceso aleatorio en la que el efecto en las poblaciones es impredecible (Martínez-Palacios *et al*., 1999), la selección natural puede ser direccional con resultados que provocan una disminución de la variación genética y la adaptación al ambiente (Hartl y Clark, 1989).

La genética de poblaciones es una rama de la Biología que se encarga del estudio teórico y experimental de la variabilidad genética, ayuda a comprender cómo las poblaciones evolucionan y se adaptan (Eguiarte y Piñero, 1999). Griffiths *et al*. (2002) indican que la variación genética entre y dentro de las poblaciones en las especies ocurre por la existencia de varios alelos (dos o más formas diferentes de un gen) de diferentes loci (posición relativa del gen en el cromosoma). La variación de alelos y genotipos forman la diversidad genética de la especie y son la base de su adaptación y potencial evolutivo (Garner *et al*., 2004).

Los marcadores moleculares son la principal herramienta para los estudios de genética de poblaciones, éstos se basan en amplificar regiones de ADN lo que se logra con *primers* u oligos cuya secuencia es conocida y sintetizada *in vitro*, y que se usan para obtener el ADN blanco del organismo en estudio, mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su acrónimo en inglés *Polymerase Chain Reaction*). En plantas se ha reportado el uso de espaciadores internos de transcritos (ITS por su acrónimo en inglés: *internal Transcribed Spacer*) que son marcadores nucleares que en conjunto con los genes ribosomales y otras regiones espaciadoras conforman el ADN ribosomal nuclear o ADNrn (Aguilar-Ramírez, 2002). Hillis y Dixon (1991) indican que el arreglo del ADNrn en un genoma eucariota está conformado por cientos de copias repetidas en tándem y en el caso de plantas cuenta con tres subunidades de ADNrn conocidas como 18S, 5.8S y 26S (Aguilar-Ramírez, 2002). Estos *primers* han sido utilizados en estudios de variabilidad genética entre especies, sin embargo llegan a revelar variación dentro

de una especie a otra, pero llegan a ser muy conservadores dentro de la misma especie (Redecker, 2000).

Entre los principales métodos analíticos descritos para estimar la variabilidad genética de poblaciones sobresalen la elaboración de redes de haplotipos, árboles filogenéticos, estimadores de diversidad, estructura, flujo y diferenciación génica. La red de haplotipos se emplea para obtener información sobre la historia y la estructura genética intrapoblacional, así como, inferir procesos de diferenciación, homoplasia, recombinación y modos de especiación (Posada y Crandall, 2001). Los árboles filogenéticos se emplean para identificar grupos de organismos genéticamente relacionados.

Los parámetros que se emplean en el análisis de diversidad genética son diferencias nucleotídicas (*K*), diversidad de haplotipos (h) que es definida como la probabilidad de obtener al azar dos secuencias diferentes en la misma muestra y diversidad de nucleótidos (π) que es la probabilidad de obtener al azar dos nucleótidos homólogos distintos de la muestra (Nei, 1987). El análisis de varianza molecular (AMOVA) se realiza para evaluar si las poblaciones se encuentran estructuradas genéticamente a distintas escalas geográficas (Excoffier *et al*., 1992). El parámetro de flujo génico (*Nm*) sugiere el movimiento relativo de genes de una población a otra en una generación (Nei, 1982), mientras que la diferenciación genética (*Fst*) permite determinar el grado de diferenciación genética entre localidades o subpoblaciones (Hudson *et al*., 1992). Si los valores de *Fst* son igual a cero indican que no hay diferenciación genética entre ambas

localidades, pero si los valores son diferentes a cero indican que existe diferenciación poblacional (Tripp, 2009).

El índice D de Tajima (1989) consiste en la detección de las diferencias entre los estimadores de diversidad genética (π) y el número de sitios variables en una secuencia (θ). Un valor de D negativo indica la presencia de mutaciones deletéreas, mientras que un valor positivo indica que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva. Sin embargo, cuando el valor de D es cero no hay diferenciación entre ambos estimadores y se asume equilibrio neutral (Eguiarte *et al*., 2007).

II.III Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una herramienta de biotecnología vegetal que engloba un conjunto de técnicas mediante las cuales se pueden obtener células, tejidos o plantas completas libres de patógenos en un menor tiempo comparado con la propagación tradicional (Cardoza, 2008; Kumar y Reddy, 2011; Us-Camas *et al*., 2014). Por lo tanto, mediante el uso de estas técnicas se puede micropropagar clonalmente individuos élite de especies de interés, conservar especies en peligro de extinción, y obtener metabolitos secundarios; entre otras aplicaciones (Hussain *et al*., 2012).

El principio teórico de las técnicas de cultivo *in vitro* se basa en la totipotencialidad que presentan las células vegetales, debido a que cuentan con una copia del

material genético de la planta donadora de explantes, esto las convierte en células madre y por ende son capaces de regenerar una planta completa (Calva Calva y Pérez Vargas, 2005; Cardoza, 2008). Cardoza (2008) y Hussain *et al*. (2012) indican que las técnicas de cultivo *in vitro* consisten en emplear semillas o un fragmento de la planta (hoja, ápice, yema, entre otros) que se conoce como explante, para introducirlos en un medio nutritivo (semisólido o líquido) que puede contener fitorreguladores del crecimiento para manipular el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Así mismo, es necesario considerar las condiciones ambientales óptimas controladas para la especie de interés (pH, temperatura de incubación, condiciones de luz, entre otros).

Kumar y Reddy (2011) indican que los fitorreguladores son compuestos orgánicos que regulan el metabolismo durante el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas moléculas se han sintetizado artificialmente para su aplicación en cultivo *in vitro*, con el fin de perseguir objetivos específicos (callogénesis, embriogénesis u organogénesis). Dentro de los fitorreguladores más utilizados en el cultivo *in vitro* se encuentran las auxinas, citoquininas y giberilinas (Cardoza, 2008), el tipo y la concentración de estos dependerá del tipo de explante, ruta de desarrollo y de la especie vegetal que se desee propagar (Hussain *et al*., 2012). Las auxinas estimulan la formación de raíces, mientras que las citoquininas inducen la división celular y el desarrollo de brotes (Huan *et al*., 2004; Cardoza, 2008).

II.IV Problema de investigación

Actualmente, *G. skinneri* es una especie amenazada mencionada en la Norma Oficial Mexicana “NOM-ECOL-059" (SEMARNAT, 2010). Lo anterior como consecuencia del saqueo y la venta clandestina de esta especie que florece en la época de enero y febrero, fechas en que se festeja la Candelaria (históricamente esta especie se ha empleado para adornar altares). Sin embargo, en los últimos años la venta ilegal ha ido aumentando, y puesto que las colectas son poco racionales, se ha originado una escasez del recurso silvestre (Bertolini, comunicación personal). La especie tiene como área de distribución natural la misma planicie de la ciudad de Tapachula (Damon y Bertolini, 2015), en donde las colectas ilegales se han ambientado fácilmente en los patios particulares, generando así una población artificial dentro del complejo urbano.

Además las limitantes naturales que presenta la especie para la propagación *in vivo* y las alteraciones a su hábitat como consecuencia de las actividades antropogénicas (colecta, talas, entre otros), que conllevan a la disminución de las poblaciones naturales (Jiménez-Bautista, 2009; Damon, 2013). Esto implica indirectamente un descenso de la variabilidad genética de la especie; sin embargo, hasta ahora se desconoce la variabilidad que tiene la población natural, así como la conformada artificialmente por colectas clandestinas. Aunque se desconoce la procedencia de los individuos que crecen en los patios o jardines privados de Tapachula, se puede suponer que proceden de poblaciones diferentes de la región (poblaciones silvestres); y pueden contener una variación genética de importancia para los programas de conservación de esta especie, así como

emplearse como comparativo con poblaciones silvestres de otras áreas de distribución natural. De esta manera si los individuos que crecen en los patios o jardines privados de Tapachula tienen alta variabilidad genética, se pueden considerar como banco de germoplasma de la especie y representar una buena fuente de variabilidad genética para fines de propagación masiva y/o conservación.

Una de las alternativas para la propagación masiva y/o conservación de *G. skinneri* es el uso de las técnicas de cultivo *in vitro*. Sin embargo hasta el momento se desconoce un protocolo de propagación clonal óptimo para la especie, además la bibliografía revisada reporta que a partir del uso de explantes procedentes de campo se obtienen elevados porcentajes de contaminación. Por lo tanto, se carece de un protocolo eficiente para obtener material aséptico y con capacidad de regenerar una respuesta morfogénica *in vitro*, como la formación de callo.

II.V Justificación

Los factores que influyen en la alteración de las poblaciones de *G. skinneri* conllevan a cambios en la variabilidad genética y estructura de la población; sin embargo, no existen estudios relacionados a su reproducción, desarrollo y variabilidad genética con fines de conservación de la especie. Por lo tanto, es recomendable realizar estudios que proporcionen información sobre la situación actual en la que se encuentra la especie a nivel genético y que permitan planificar acciones de manejo y/o conservación apropiada para la especie. Una alternativa

para la conservación y propagación de la especie es el uso de técnicas de cultivo *in vitro* que permiten desarrollar protocolos de propagación masiva clonal. De esta manera, se podría disminuir la colecta y venta clandestina de la especie, lo que permitiría la conservación de las poblaciones silvestres, además de las técnicas de conservación *in vitro* y de crioconservación.

II.VI Antecedentes

Se han realizado estudios genéticos en diversas especies de orquídeas empleando diversos marcadores moleculares para conocer la situación de diversidad genética poblacional. Por ejemplo en *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., se ha reportado valores moderados de consanguinidad (0.216) con base en marcadores enzimáticos (Ávila-Díaz y Oyama, 2007), en contraste con lo reportado por Vargas *et al*. (2006) que encontraron valores altos de endogamia en *Myrmecophyla christinae* Carnevali & Gómez-Juárez var. *christinae* (0.306-0.383). El grado de consanguinidad de moderada y alta en epifitas se atribuyó al grado de fragmentación y aislamiento de las poblaciones por causas antropogénicas (Vargas *et al*., 2006; Ávila-Díaz y Oyama, 2007; Piñero *et al*., 2008).

Qian *et al*. (2013) reportaron baja diversidad genética a nivel poblacional, pero alta a nivel especie en *Calanthe tsoongiana* Tang & F.T. Wang mediante el uso de marcadores moleculares de secuencias simples repetidas (ISSR por su acrónimo en inglés *Inter Simple Sequence Repeats*), el coeficiente de diferenciación genética obtenido entre poblaciones (G_{st}= 0.55) indica que el 55% de la variación

genética fue entre poblaciones y el 45% dentro de las poblaciones; así mismo el flujo génico entre poblaciones fue bajo (Nm= 0.408). También Pinheiro *et al*. (2012) reportaron altos niveles de diferenciación dentro de las poblaciones de *Cattleya labiata* Lindl.; sin embargo, encontraron baja variabilidad genética entre las poblaciones. En el dendrograma UPGMA realizado con el índice de Jaccard, Pinheiro *et al*. (2012) obtuvieron que los individuos no se agrupan de acuerdo al origen de colecta, por lo que determinan que la estructura genética de la especie es compleja.

En el caso de experiencias previas de introducción de *G. skinneri in vitro*, Alvarado-Ulloa (2000) introdujo explantes de ápices de brotes laterales en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y Knudson (Knudson, 1946) con la combinación de los fitorreguladores ANA (ácido naftalenacético) y Kin (Kinetina) y agua de coco, los resultados indicaron que del 20% de sobrevivencia a consecuencia de la contaminación y oxidación; el 66.67% indujo formación a cuerpos protocórmicos. Coello *et al*. (2010) realizaron un experimento ortogonal para germinación *in vitro* de *G. skinneri*, emplearon medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y evaluaron la combinación de los fitorreguladores GA (ácido giberélico), BAP (Bencil amino purina), ANA (ácido naftalenacético) y AIA (ácido indolacético) a diferentes concentraciones; reportaron que la combinación de ANA a 16.1 µM, AIA a 17.1 µM y BAP a 4.9 µM indujo un mayor número de brotes nuevos (10.2) y raíces (3.7) por planta.

Si bien se ha reportado la propagación clonal para diversos tipos de orquídeas producidas de forma comercial, las más propagadas a nivel *in vitro* son *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Laelia*, entre otras, debido a su potencial de ornato mundialmente reconocido (Tiza-Arias, 2010; Raya-Montaño *et al*., 2011; INEGI 2011, 2012). En estas especies los explantes más utilizados son hojas, yemas, semillas y plántulas, para la inducción de callo, hojas, brotes y germinación *in vitro* (Chen *et al*., 2000; Young *et al*., 2000; Tiza-Arias, 2010; INEGI 2011, 2012). Sin embargo, la propagación clonal de *G. skinneri* ha sido poco estudiada, de tal forma que no hay registros para el proceso óptimo de desinfección y del mejor tipo de explante para la especie.

II.VII Pregunta de investigación

¿Los individuos de *Guarianthe skinneri* que conforman la población de Tapachula, Chiapas presentan una variabilidad genética apta para ser empleados en la propagación sustentable de la especie mediante técnicas de cultivo *in vitro* con fines de conservación?

II.VIII Hipótesis

"Si la variabilidad genética de los individuos que conforman la población de *Guarianthe skinneri* de Tapachula, Chiapas es apta para emplearse en técnicas de cultivo *in vitro*, entonces sustentablemente se pueden producir plántulas de la especie para conservar las poblaciones silvestres"

II.IX Objetivo

General

Evaluar la variabilidad genética de *Guarianthe skinneri* procedentes de la zona urbana de Tapachula, Chiapas, México y de cinco poblaciones silvestres de Guatemala. Así como inducir la callogénesis *in vitro* en diferentes tipos de explantes de *Guarianthe skinneri* mediante fitorreguladores.

Específicos

-Comparar la variabilidad genética de una población artificial y cinco silvestres de *Guarianthe skinneri*.

-Evaluar diferentes tipos de explante y fitorreguladores en la inducción callogénica *in vitro* de *Guarianthe skinneri*.

III Materiales y Métodos

El estudio se realizó en dos laboratorios dependiendo de la etapa del trabajo:

-Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Campo experimental Rosario Izapa)

-Laboratorio de Genética de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal.

III.I Recolecta de material

Se colectaron 30 individuos de patios particulares de la ciudad de Tapachula, Chiapas, México; estos presentaron de dos a tres pseudobulbos, con raíces y hojas (Figura 1). Al mismo tiempo, se obtuvieron muestras conservadas en alcohol etílico puro de caña a 96º de 40 individuos procedentes de cinco departamentos (estados) de Guatemala, estos presentaron las mismas condiciones de colecta (Cuadro 1).

Figura 1. Planta de *Guarianthe skinneri*. a) Individuo silvestre; b) flores o atractivo principal por el cual se comercializan clandestinamente y cápsulas con semilla; c) estructuras de la planta utilizadas para el establecimiento *in vitro*.

Para el trabajo de genética se emplearon los individuos colectados en la zona urbana de Tapachula (población artificial), y los individuos de los cinco

departamentos de Guatemala (poblaciones silvestres). En cuanto al apartado de cultivo *in vitro* solo se emplearon los individuos de Tapachula.

Cuadro 1. Número de individuos colectados por población de *Guarianthe skinneri*.

Población	Localidad	País	Muestras colectadas
1	Tapachula, Chiapas	México	30
2	Escuintla	Guatemala	6
3	Huehuetenango	Guatemala	16
4	Santa Rosa	Guatemala	6
5	Mazatenango	Guatemala	6
6	Jutiapa	Guatemala	6

En la Figura 2 se observa los seis sitios de colecta de los individuos de *G. skinneri* correspondientes a México y Guatemala.

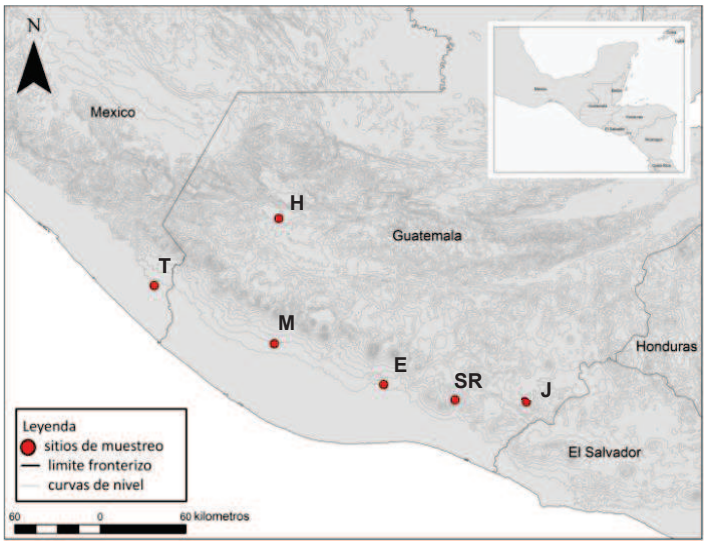

Figura 2. Distribución geográfica de los sitios de colecta de *Guarianthe skinneri*. T: Tapachula, H: Huehuetenango, M: Mazatenango, E: Escuintla, SR: Santa Rosa y J: Jutiapa.

III.II Variabilidad genética de *Guarianthe skinneri*

Obtenido el material vegetal se emplearon fragmentos de hoja (de cada individuo) que estuvieran en buen estado, libre de manchas, hongos y/u otros organismos. Las hojas se conservaron en alcohol etílico puro de caña (96º) en tubos ensayo con tapa de rosca, y se mantuvieron en refrigeración (-20ºC) hasta ser utilizados.

Extracción y visualización del ADN

Se realizó la extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de un fragmento de hoja de aproximadamente de un centímetro cuadrado, éste se colocó en el concentrador por 16 min para evaporar el alcohol en el que estaban almacenadas. Posteriormente se extrajo el ADN mediante el método convencional de extracción en plantas con CTAB-mercaptoetanol (Anexo 1: ECOSUR, 2015). La visualización del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), el tampón de carga fue de 4µl de ADN y 3µl de azul de bromofenol (utilizado como colorante indicador en el corrimiento del gel); se dejó correr el gel de 30-40 minutos con un voltaje de 100 Volts. Posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino -6-etil-5-fenilfenantridio) y se capturó una imagen de cada gel mediante una cámara fotográfica Kodak EDAS 290® conectada por un interfase a una computadora.

Amplificación del ADN

Se amplificó la región de ADN capturada por ITS1 e ITS2 mediante PCR, se realizó en un termociclador PTC-100 (*Peltier Termal Cycler*) con los oligos ITS1

(5´- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3´), ITS2 (5´- GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC -3´) e ITS3 (5´- GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC -3´) e ITS4 (5´- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3´). Las condiciones de amplificación en el termociclador de gradiente para los ITS fueron con base a las citadas por Singh *et al*. (2012) con algunas modificaciones como el uso de 35 ciclos, cada uno de los cuales estuvo integrado por una desnaturalización inicial de 3 min a 95º C, una desnaturalización avanzada de 30 seg a 95°C, un alineamiento de 30 seg a 57º C y una extensión de 2 min a 72º C. Una vez concluidos los 35 ciclos, se realizó una extensión final de 10 min a 72º C. Respecto a las condiciones para la amplificación de ITS3-ITS4, consistieron en 35 ciclos, cada uno de los cuales integrado por una desnaturalización inicial de 3 min a 95º C, una desnaturalización avanzada de 30 seg a 95°C, un alineamiento de 30 seg a 52º C y una extensión de 2 min a 72º C. Una vez concluidos los 35 ciclos, se realizó una extensión final de 10 min a 72º C.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v), para ello se empleó un tampón de carga de 1µl de ADN con 2µl de azul de bromofenol, y 2µl de azul de bromofenol con 2µl de ladder 100 pares de bases (pb) cuya longitud fue de 1500 pb. El corrimiento del gel fue de aproximadamente una hora a 89-90 Volts, de igual manera que para la visualización de la extracción el gel fue teñido con bromuro de etidio y la imagen tomada con la cámara y software Kodak EDAS 290®.

Secuenciación del ADN

Las amplificaciones de ADN obtenidas fueron enviadas a secuenciar en la compañía MACROGEN en Seúl, Corea.

Análisis de Secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas vía Internet con las colecciones de nucleótidos de BLAST en GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) (Altschul *et al*., 1997), para confirmar que pertenecían a *G. skinneri*. Dentro de BLAST en la base de datos GenBank, se obtuvieron las secuencias de *Cattleya patinii* Cogn. con número de acceso AY008586.1 (esta especie actualmente pertenece al genéro Guarianthe, (Dressler y Higgins, 2003)), y *Rhyncholaelia digbyana* (Lindl.) Schltr. (número de acceso AY008583.1) para su utilización como grupos externos comparativos.

Las secuencias fueron acotadas al número de nucleótidos correspondiente para cada ITS (White *et al*., 1990) mediante el programa Chromas Pro Versión 2.33 (McCarthy, 1998-2008). Para ITS1-ITS2 se dejó a 290 nucleótidos y para el ITS3-ITS4 a 330 nucleótidos. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Clustal X Versión 1.83 (Larkin *et al*., 2007). Posteriormente fueron revisadas manualmente para descartar posibles errores como vacíos (*gaps*) y que se pueden eliminar al comparar las secuencias.

III.III Cultivo *in vitro* de *Guarianthe skinneri*

Para la inducción *in vitro* se emplearon explantes de hoja y médula de pseudobulbo. Para el explante de hoja se realizó un corte a partir de la base, y en el caso del pseudobulbo se realizó un corte para quitar las raíces y el escapo floral. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico asperjadas con agua y se trasladaron de inmediato al Laboratorio.

Desinfección del material vegetal

El material vegetal se lavó con agua de grifo y jabón comercial, luego se efectuó una limpieza con algodón humedecido con alcohol a 95°. Posteriormente se efectuó la desinfección bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar siguiendo las recomendaciones de Jiménez y Guevara (1996). Cada hoja y/o pseudobulbo se sumergió en una solución de NaClO al 10% (v/v) con una gota de detergente Tween 80% durante 10 min. Se realizaron tres lavados con agua destilada esterilizada, posteriormente se dejaron en una solución antioxidante (0.1 g/L ácido ascórbico, 0.15 g/L de ácido cítrico y 30 g/L de sacarosa) hasta que se realizaron los cortes para obtener los explantes. En total se obtuvieron 250 explantes de hoja que consistieron en fragmentos de 5 mm^2 tomados de la parte media apical y 250 explantes de médula de pseudobulbo que fueron fragmentos de 5 mm de diámetro por 5 mm de largo, obtenidos con ayuda de un sacabocado (Figura 3). Los explantes se sembraron en las cajas Petri de 60X15 mm; los fragmentos de hoja se establecieron con el haz hacia el medio y los explantes de médula mantuvieron la polaridad al momento de la siembra.

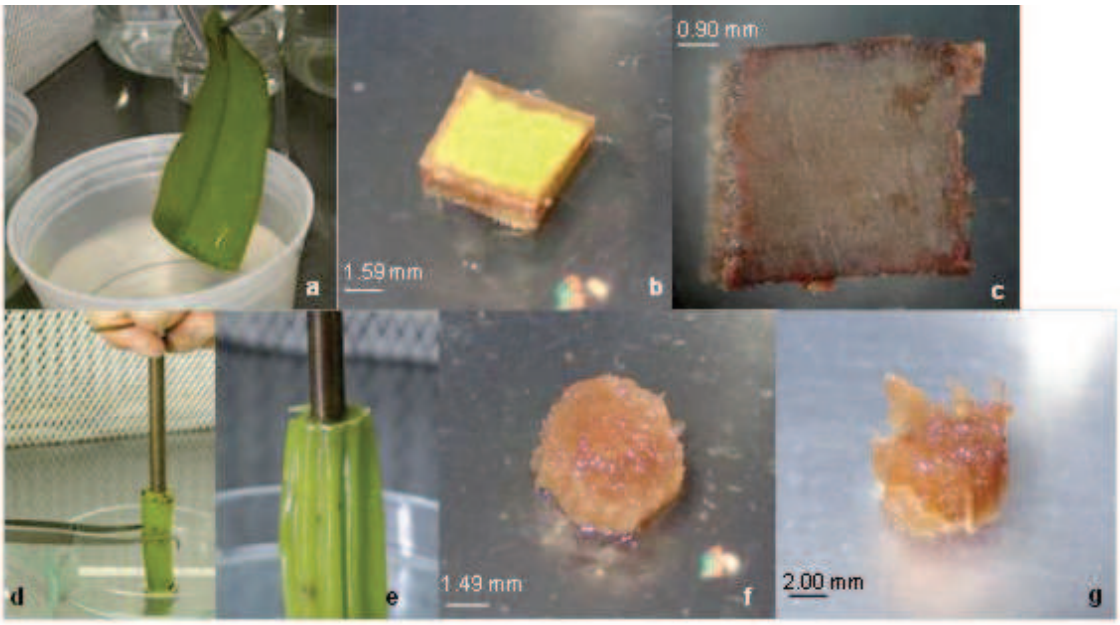

Figura 3. Explantes de *Guarianthe skinneri*. a) Parte apical de hoja; b) explante de hoja siete días posterior al establecimiento; c) explante de hoja a los 35 días con formación de callo en la zona de corte; d y e) obtención de médula del pseudobulbo con sacabocado; f) explante de médula oxidado a los tres días después del establecimiento; g) explante de médula a los 35 días.

Inducción de callogénesis

La inducción callogénica se realizó en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), al cual fueron añadidos los fitorreguladores BAP, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), Kin (kinetina) y SAd (sulfato de adenina) para ser evaluados de forma separada y en combinación (Cuadro 2). Así mismo, se consideró un tratamiento sin fitorreguladores como testigo.

Se utilizó un diseño experimental de dos factores fijos, que consistió en tipo de explante a dos niveles (hoja y médula de pseudobulbo) y el segundo factor tipo de fitorregulador con cuatro niveles; así mismo se consideró un tratamiento testigo

por tipo de explante sin fitorregulador. En total se evaluaron 10 tratamientos con 50 repeticiones cada uno, generando 500 unidades experimentales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos para la inducción de callogénesis en *Guarianthe skinneri*.

Tratamiento	FACTORES A EVALUAR					
	Tipo de explante		Fitorregulador (mg/L)			
	Hoja	Médula	BAP	2,4-D	Kin	SAd
1	x		3	0	0	0
2	x		0	5	0	0
3	x		0	0	2	0
4	x		3	5	0.86	50
5	x		0	0	0	0
6		x	3	0	0	0
7		x	0	5	0	0
8		x	0	0	2	0
9		x	3	5	0.86	50
10		x	0	0	0	0

Las variables a evaluar fueron formación de callo, oxidación y contaminación; considerándolas variables binarias de presencia o ausencia. Se consideró formación de callo cuando se observó masa celular amorfa (Calva Calva y Pérez Vargas, 2005), la variable oxidación cuando los tejidos aparecían oscurecidos (Bray *et al*., 2000), y finalmente la contaminación de explantes al constatar la presencia de bacterias u hongos en el medio de cultivo o en el explante. Las variables se midieron a partir de los tres días después del establecimiento del experimento. Las mediciones se realizaron cada siete días por un periodo de 49 días.

III.IV Análisis de datos

Variabilidad genética de *Guarianthe skinneri*

Se realizaron análisis de diversidad, estructura, flujo y diferenciación genética, redes de haplotipos, análisis filogenéticos y una regresión lineal entre la distancia genética y la distancia geográfica.

Distancias Genéticas

Las distancias genéticas intra e interpoblacionales se calcularon mediante el programa Mega 6.06 (Kumar *et al*., 2004) con el modelo de Kimura-2. El cálculo de las distancias fue realizado a nivel de los sitios de muestreo y entre las dos poblaciones.

Diversidad y estructura genética

Se analizó la diversidad genética de las poblaciones con el programa DnaSP Versión 5.0 (Librado y Rozas, 2009). El AMOVA se realizó con el programa ARLEQUÍN versión 3.5.1.2 (Excoffier *et al*., 2005) mediante el modelo de *pairwise difference* y Kimura-2, ambos con un nivel de significancia de 0.05. Se estimaron los índices de fijación equivalentes a los estadísticos de F´s de Wright, Fct: variación entre grupos, Fst: variación dentro de las poblaciones y Fsc: variación entre poblaciones dentro de grupos (Weir y Cockerham, 1984). El conjunto de muestras totales representa un población, y el conjunto de muestras de Tapachula y de las localidades de Guatemala representa subpoblaciones.

Flujo génico y diferenciación genética

Se estimó el parámetro de flujo génico (*Nm*) y el índice D de Tajima (1989) mediante el programa DnaSP Versión 4.10 (Librado y Rozas, 2009).

Redes de haplotipos: historia y estructura genética intrapoblacional

Se realizó una red de haplotipos por el método de parsimonia SP (*Statical Parsimony*) (Templeton *et al*., 1992) con el programa TCS versión 1.21 (Clement *et al*., 2000), con un 95% de confianza. El análisis se llevó a cabo sin tomar en cuenta a los nucleótidos faltantes (*gaps*).

Análisis filogenético

Se realizó un análisis de máxima parsimonia (MP) y un análisis de distancias mediante el modelo Kimura-2, estos se llevaron a cabo con el programa PAUP versión 4.0b (Swofford, 1999). Se utilizaron dos secuencias obtenidas del GenBank como grupo externo. Las distancias genéticas fueron calculadas con el modelo de evolución molecular que más se adecuó a los datos, este fue elegido a través del método de selección AIC (*Akaike Information Criterion*) implementado en el programa jModelTest versión 0.1.1 (Posada, 2008). Finalmente, se realizó una regresión lineal entre las distancias genéticas y geográficas en el Software estadístico R versión 3.2.2 (R Core Team, 2013).

Cultivo *in vitro* de *Guarianthe skinneri*

Para obtener los resultados, los datos fueron analizados mediante un modelo de regresión logística de medidas repetidas con respuesta binomial empleando el Software estadístico R versión 3.2.2 (R Core Team, 2013), debido a que las variables respuesta del experimento fueron del tipo binarias (formación de callo, oxidación y contaminación), y fueron medidas en tiempos posteriores para cada unidad experimental.

IV Resultados

IV.I Variabilidad genética de *Guarianthe skinneri*

Es importante destacar que de los 70 individuos adquiridos durante la colecta (30 de Tapachula y 40 de Guatemala) se logró extraer y amplificar ADN de 59 muestras (23 de Tapachula y 36 de Guatemala), esto se atribuye a que el ADN de las demás muestras se degradó en el periodo de conservación.

Distancias genéticas

Se obtuvo un total de 513 sitios nucleótidicos excluyéndose aquellos que se reportaron como gaps en las secuencias, así mismo se obtuvieron 270 sitios polimórficos y un total de 430 mutaciones.

Las distancias genéticas intra e interpoblaciones de los seis sitios de muestreo de *G. skinneri* se muestran en el Cuadro 3. Las muestras colectadas en Tapachula y Escuintla fueron las que presentaron mayor distancia intrapoblacional. Respecto a los resultados interpoblacionales, la mayor distancia se obtuvo entre las muestras obtenidas de Mazatenango y Escuintla (0.133).

Cuadro 3. Distancias genéticas intra e interpoblacional de los siete sitios de muestreo de *Guarianthe skinneri* calculadas con el modelo Kimura-2.

Población	Interpoblacional						Intrapoblacional
	1	2	3	4	5	6	
1 Tapachula							0.170
2 Escuintla	0.083						0.199
3 Huehuetenango	0.099	0.118					0.005
4 Santa Rosa	0.056	0.131	0.009				0.062
5 Mazatenango	0.122	0.133	0.05	0.067			0.069
6 Jutiapa	0.053	0.038	0.005	0.007	0.01		0.006

Las distancias obtenidas de las dos poblaciones en las que se muestreo, permite observar que existe una mayor distancia intrapoblacional en la colecta que se realizó en Tapachula (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distancias genéticas intra e interpoblacional de las dos poblaciones de *Guarianthe skinneri* calculadas con el modelo Kimura-2.

Población	Interpoblacional Tapachula	Intrapoblacional
Tapachula	---	0.157
Guatemala	0.099	0.039

Diversidad y estructura genética

La diversidad de haplotipos de Tapachula fue ligeramente mayor que la de Guatemala. La diversidad de nucleótidos de Tapachula se observó cuatro veces

mayor que la de Guatemala, así mismo las diferencias nucleotídicas fue tres veces más grande en Tapachula (Cuadro 5).

Cuadro 5. Índices de diversidad genética y diferencias nucleotídicas en poblaciones de *Guarianthe skinneri.*

Población	Número de haplotipos	Diversidad de haplotipos (h)	Diversidad de nucleótidos (π)	Diferencias nucleotídicas (k)
Tapachula	23	0.98	0.11	61.22
Guatemala	36	0.94	0.03	18.81

El análisis de varianza molecular (AMOVA) con el modelo de *Pairwise difference* indicó que el 93.45% de la varianza genética fue entre las muestras, y el 3.97% entre las poblaciones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA) sobre secuencias de ITS en *Guarianthe skinneri* con el modelo *Pairwise difference*.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de variación
Entre regiones	1	56.72	0.96	3.97
Entre poblaciones dentro de cada región	5	137.13	0.62**	2.58
Dentro de poblaciones	52	1182.03	22.73*	93.45
Total	58	1375.89	24.32	

Código de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*'.

Los resultados de AMOVA con el modelo de Kimura-2 no fueron estadísticamente significativos (Cuadro 7). Sin embargo, coincide con los resultados obtenidos a partir del modelo *Pairwise difference* debido a que el mayor porcentaje es obtenido dentro de las variaciones (97.37%).

Cuadro 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) sobre secuencias de ITS en *Guarianthe skinneri* con el modelo Kimura-2.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de variación
Entre regiones	1	45.03	0.62	2.28
Entre poblaciones dentro de cada región	5	136.25	0.09	0.35
Dentro de poblaciones	52	1380.33	26.54	97.37
Total	58	1561.62	27.26	

Se obtuvieron los resultados de los índices de fijación de Weir y Cockerham (1984) con el modelo *Pairwise difference* y Kimura-2; sin embargo, mediante el modelo Kimura-2 no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. El valor de Fct indicó la variación entre grupos respecto a la variación total, Fsc la variación entre poblaciones dentro de los grupos y Fst la variación dentro de las poblaciones (Cuadro 8).

Cuadro 8. Índices de fijación con los modelos empleados para AMOVA en poblaciones de *Guarianthe skinneri.*

Índice	Modelo	
	Pairwise difference	Kimura-2
Fct	0.039	0.022
Fsc	0.026**	0.003
Fst	0.065*	0.030

Código de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*'.

El valor de Fst fue bajo pero significativo, lo mismo se observó para el nivel de diferenciación entre haplotipos de las dos poblaciones de las muestras con respecto a la variación total (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de Fst obtenidos entre las subpoblaciones de *Guarianthe skinneri.*

Población	Interpoblacional					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
1 Tapachula						
2 Escuintla	0.783					
3 Huehuetenango	0.126	0.016				
4 Santa Rosa	0.800	0.029	0.297			
5 Mazatenango	0.701	0.003	0.034	0.009		
6 Jutiapa	0.814	0.019	0.029	0.011	0.006	

Flujo genético

El valor del índice de Nei obtenido fue de 6.37. El índice D de Tajima fue estadísticamente significativo con un valor de -2.21** ($P < 0.01$), al ser negativo el resultado indica la presencia de mutaciones deletéreas.

Redes de haplotipos

Se encontró que las 59 secuencias de nucleótidos de *G. skinneri* son haplotipos únicos. De los 23 individuos de Tapachula, 18 fueron completamente divergentes o segregantes. Respecto a los individuos de Guatemala 17 se consideraron completamente independientes. La unión entre haplotipos fue con un 90% de confianza. Se generaron tres redes de haplotipos SP, dos de ellas estuvieron formadas por sólo dos haplotipos (Figura 4).

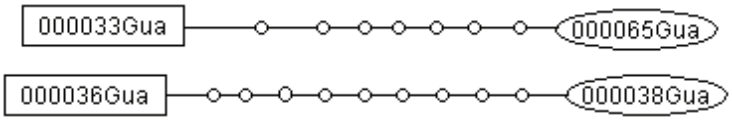

Figura 4. Red de haplotipos SP con un 90% de confianza para la conexión parsimoniosa entre haplotipos de *Guarianthe skinneri*. Los círculos sobre la línea indica el punto donde ocurre una mutación, cuyas acumulaciones forman uno u otro haplotipo. El número es el identificador único de la muestra, Gua= Guatemala.

Se obtuvo una red de haplotipos SP conformada por 20 haplotipos (cinco pertenecientes a Tapachula y 15 a Guatemala). La red se formó considerando un mínimo de cinco mutaciones y un máximo de 15, estos límites de mutaciones mostraron una moderada relación de parentesco entre los haplotipos de Guatemala y Tapachula (Figura 5).

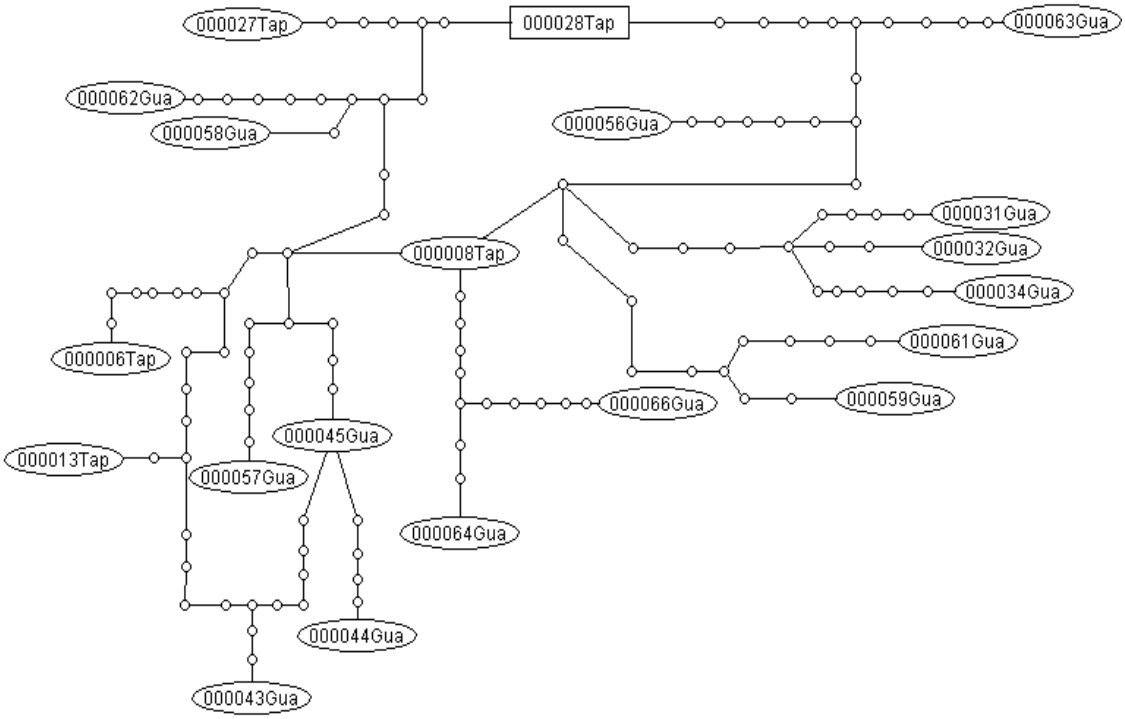

Figura 5. Red de haplotipos de *Guarianthe skinneri* por parsimonia (menor número de mutaciones) con 90% de confianza para la conexión parsimoniosa entre haplotipos. Los haplotipos sobre las líneas indica pasos mutacionales entre los haplotipos. El número es el identificador único de la muestra, Gua= Guatemala y Tap= Tapachula.

Filogenética

Las secuencias concatenadas de la regiones amplificadas de ITS 1-2 e ITS 3-4 se conformó de 577 pares de bases. El modelo evolutivo (tasas y dirección de segregación de bases) que mejor se ajustó a los 24 haplotipos (cinco de Tapachula y 19 de Guatemala) fue un modelo de tres parámetros, frecuencia desigual de haplotipos, con límites de uno a cinco sitios variables y sustitución de nucleótidos de AC=GT, AT=CG, AG=CT (TPM2uf+1+G). De esta manera se obtuvo una proporción de sitios invariables como sigue π_A = 0.18, π_C = 0.32, π_G =

0.31, y π_T = 0.17; r_{CT} = 1.21, r_{CG}= 1.00, r_{AT} = 1.40, r_{AG}= 1.21, r_{AC} = 1.40 y r_{GT}= 1.00, con γ=0.76.

Para obtener el árbol de distancias se empleó el valor de gamma obtenido con el programa JmodelTest. Se realizó un cladograma de máxima parsimonia con 500, 1000, 1500 y 2000 repeticiones, y se eligió el de 1000 repeticiones por mejor soporte para las ramas. Se apreció la formación de clados en el que incluyeron los 58 individuos o secuencias. Los grupos externos de las secuencias relacionadas con *G. skinneri* que se emplearon para el análisis fueron independientes. Se observó que los nodos de las ramas tuvieron un soporte de 81% a 100%, y se apreció que en contraste a las muestras de Tapachula; las muestras de Guatemala se encuentran más agrupadas de acuerdo a las poblaciones de colecta (Figura 6).

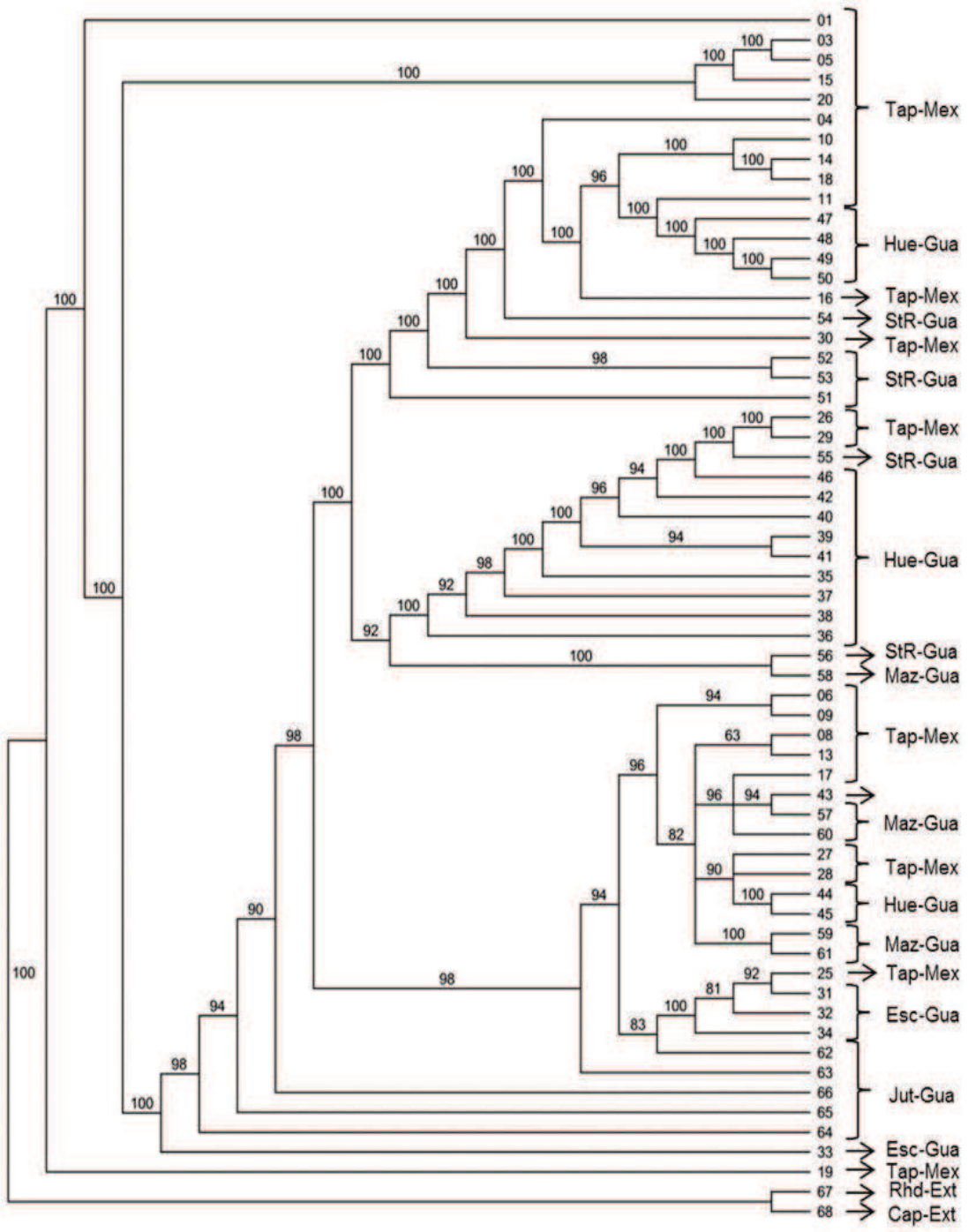

Figura 6. Cladograma de máxima parsimonia de *Guarianthe skinneri* con dos grupos externos (Rhd-Ex y Cap-Ext). Las muestras incluyen código y abreviaturas de colecta. Tap-Mex: muestras de Tapachula, Chiapas; México. Esc-Gua, Hue-Gua, StR-Gua, Maz-Gua y Jut-Gua son muestras de Escuintla, Huehuetenango, Santa Rosa, Mazatenango y Jutiapa, Guatemala. Rhd-Ext: *Rhyncholaelia digbyana* y Cap-Ext: *Cattleya patinii.*

El dendrograma por el método de NJ con base en las distancias genéticas considerando el modelo evolutivo Kimura-2 con valor de gamma γ=0.76, y con índice de fijación de la mutación, muestra un agrupamiento de las muestras recolectadas en las cinco poblaciones de Guatemala (Figura 7). Los individuos empleados como grupos externos se encuentran independiente al grupo de los individuos pertenecientes a *G. skinneri* (Figura 7).

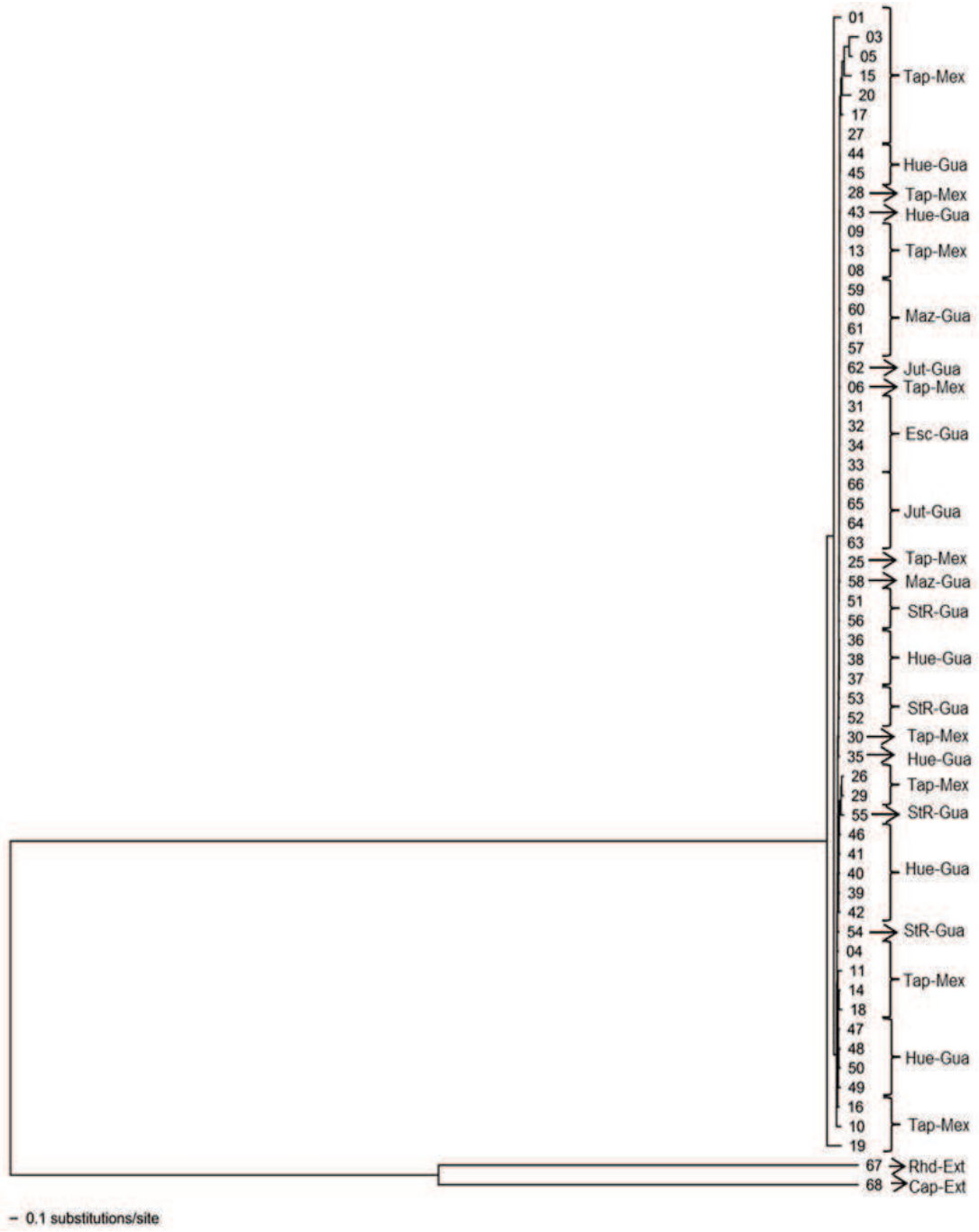

Figura 7. Dendrograma de distancias Neighbour-joining de *Guarianthe skinneri*, incluye dos grupos externos. Tap-Mex: individuos de Tapachula, Chiapas; México. Esc-Gua, Hue-Gua, StR-Gua, Maz-Gua y Jut-Gua corresponden a Escuintla, Huehuetenango, Santa Rosa, Mazatenango y Jutiapa, Guatemala. Rhd-Ext: *Rhyncholaelia digbyana* y Cap-Ext: *Cattleya patinii.*

Relación entre la distancia genética y la distancia geográfica

La figura 8 demuestra que el análisis de regresión lineal no detectó correlación entre la distancia genética y geográfica de *G. skinneri* (R^2= 0.1179, gl=13, P-value= 0.114).

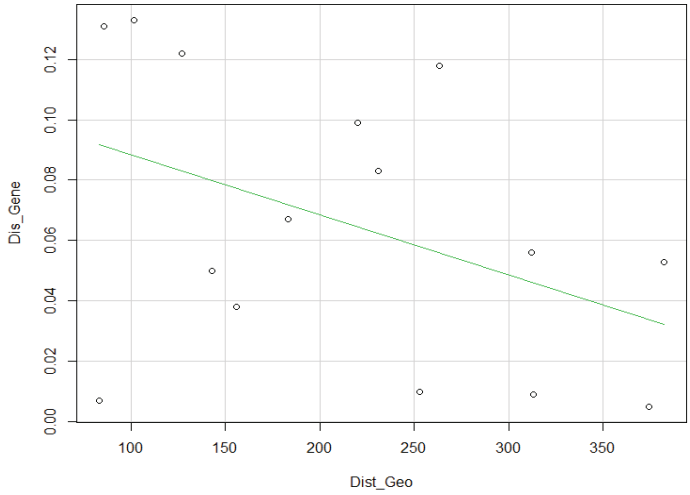

Figura 8. Regresión lineal entre la distancias genéticas y distancias geográficas en poblaciones de *Guarianthe skinneri*.

IV.II Cultivo *in vitro* de *Guarianthe skinneri*

Como las variables de respuesta de la inducción callogénica de *G. skinneri* son del tipo binario, el modelo de regresión logístico con estructura de respuesta binomial y función *link logit* resultó ser el más apropiado para describir los resultados de las tres variables evaluadas (formación de callo, oxidación y contaminación).

Formación de callo

Se observó respuesta de la variable formación de callo siete días después del establecimiento. Los resultados del análisis realizado al final del establecimiento demostraron que para esta variable hubo diferencia estadísticamente significativa

respecto al factor fitorregulador (X^2= 40.18, gl=4, p-value= 3.45e-15***) y tipo de explante (X^2= 3.96, gl=1, p-value= 0.04645*).

Se demostró que la aplicación de fitorreguladores al medio de cultivo indujo mayor formación de callo, debido a que se observó mayor formación de masa celular con los tratamientos de hoja y médula de pseudobulbo que emplearon BAP a 3 mg/L (Figura 9, tratamientos 1 y 6). En el tratamiento de médula con BAP (T6) la producción de callo se detectó a partir de los 14 días, mientras que en hoja a los siete días, se apreció que el explante de médula con el fitorregulador BAP (T6) presentó mayor velocidad de respuesta que el explante de hoja (T1).

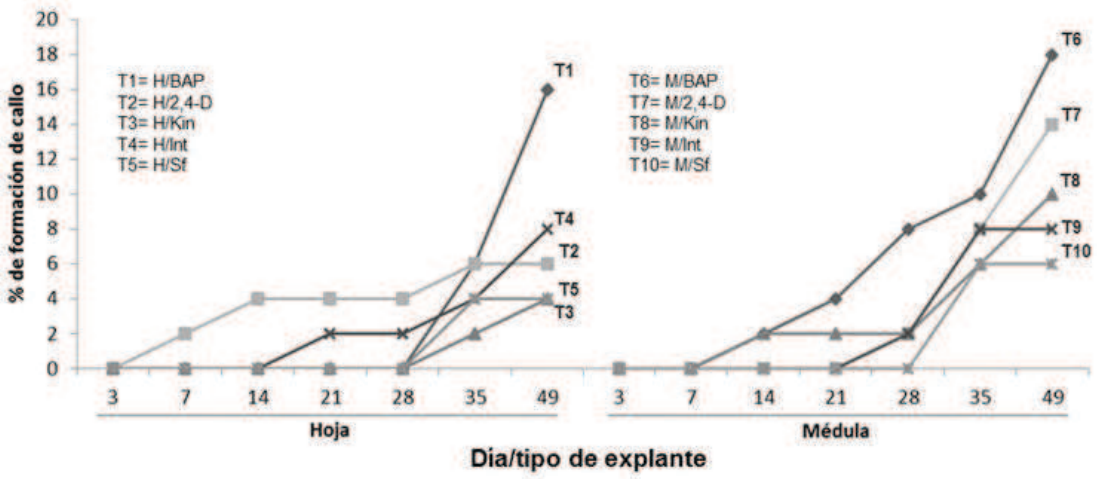

Figura 9. Dinámica del porcentaje de formación de callo en explantes de hoja y médula de *Guarianthe skinneri* a través de 49 días de cultivo *in vitro* con diferentes fitorreguladores. H: corresponde a explante de hoja, M: explante de médula, Int: interacción de fitorreguladores y Sf: sin fitorregulador.

Oxidación

En todas las unidades experimentales de los cinco tratamientos con explante médula de pseudobulbo se presentó fenolización desde el día del establecimiento;

sin embargo, no fue una limitante para la formación de callo. En los explantes de hoja la oxidación se observó desde los tres días posteriores al establecimiento del experimento, se obtuvo diferencia estadística significativa respecto al factor tipo de fitorregulador con este explante (X^2= 22.12, gl=4, p-value= 0.00018***). El tratamiento que presentó mayor porcentaje de oxidación a partir de los 14 días posterior al establecimiento fue el que utilizó el fitorregulador BAP, mientras que los dos tratamientos con explantes de hoja que presentaron menor oxidación a partir de los 28 días fueron en los que se utilizó 2,4-D y el tratamiento sin fitorregulador (Figura 10).

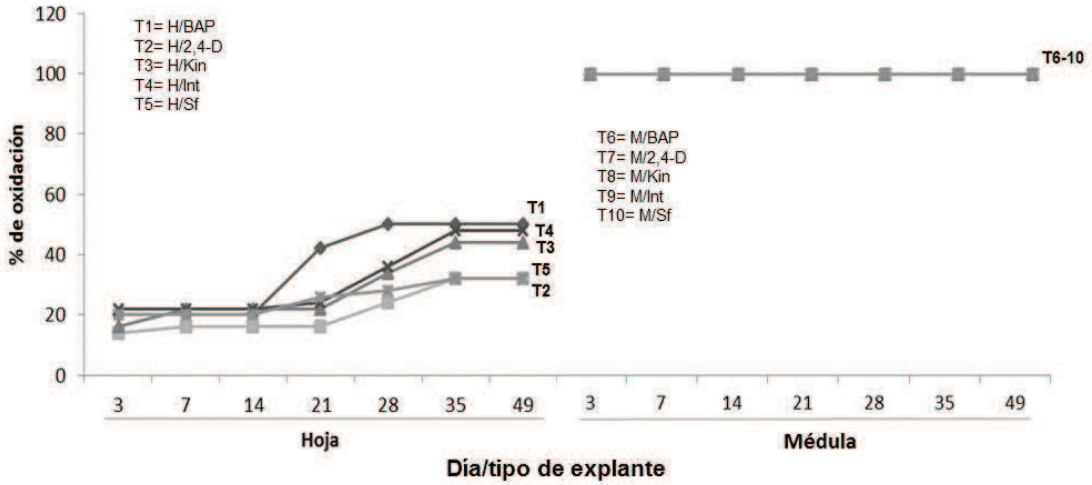

Figura 10. Dinámica del porcentaje de oxidación en explantes de hoja y médula de *Guarianthe skinneri* a través de 49 días de cultivo *in vitro* con diferentes fitorreguladores. H: corresponde a explante de hoja, M: explante de médula, Int: interacción de fitorreguladores y Sf: sin fitorregulador.

Contaminación

La contaminación en los explantes de hoja y médula se debió a la presencia de hongos, esta se observó desde los tres días después al establecimiento. La

contaminación fue una limitante para la variable respuesta formación de callo, debido a que el crecimiento del hongo se originó posterior a los tres días del establecimiento en las zonas de corte; por lo que se consideró de naturaleza endógena. Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa para los factores evaluados, para tipo de fitorregulador fue de X^2= 20.91, gl=4, p-value= 0.00032*** y para tipo de explante X^2= 285.32, gl=1, p-value= 2.2e-16*** (Figura 11).

Se presentó un mayor porcentaje de muestras contaminadas cuando se utilizaron explantes de hoja que con los de médula (Figura 11), esto fue de interés debido a que no se encontraron reportes de cultivo *in vitro* con médula en orquídeas. Respecto a los explantes de hoja el tratamiento que presentó una mayor contaminación fue en el que se empleó como fitorregulador 2,4-D (T2); por lo tanto, es recomendable emplear otro proceso de desinfección para este tipo de explante con la finalidad de obtener porcentajes mayores de asepsia que permitan evaluar las otras variables. Para los explantes de médula el tratamiento con BAP y 2,4-D fueron los que presentaron una proporción mayor de esta variable, aunque estos no pasaron de 25% (Figura 11).

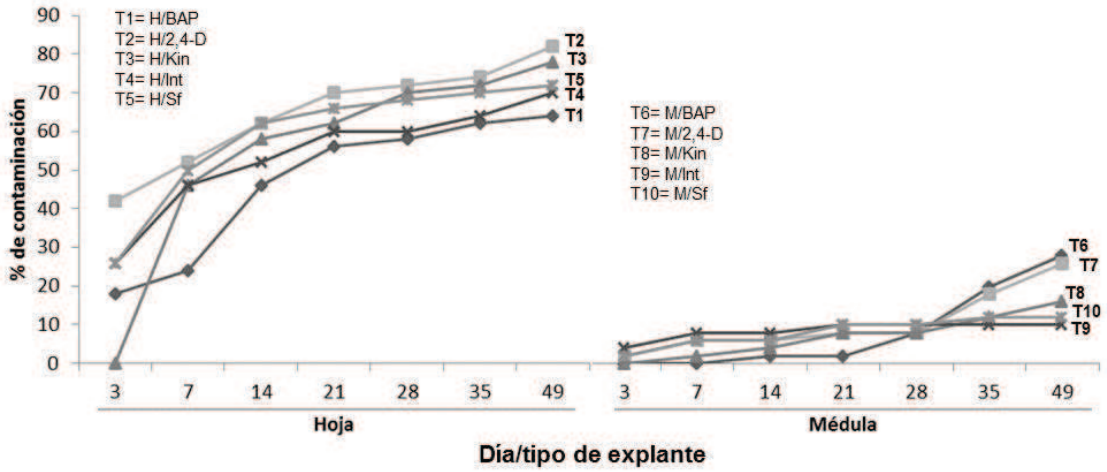

Figura 11. Dinámica del porcentaje de contaminación en explantes de hoja y médula de *Guarianthe skinneri* a través de 49 días de cultivo *in vitro* con diferentes fitorreguladores. H: corresponde a explante de hoja, M: explante de médula, Int: interacción de fitorreguladores y Sf: sin fitorregulador.

Para complementar los resultados obtenidos a partir del análisis de devianza se realizaron contrastes ortogonales, estos indicaron las diferencias estadísticas de los factores evaluados por cada variable de respuesta. En la Figura 12 se aprecian los promedios de las variables el último día de evaluación respecto al factor tipo de explante. En comparación con el explante de hoja, la médula de pseudobulbo generó mayor formación de callo (10.8%) y presentó una menor contaminación (18.8%). Por lo tanto, la médula del pseudobulbo resultó ser el explante con mayor producción de callo a pesar de la elevada oxidación (Figura 12).

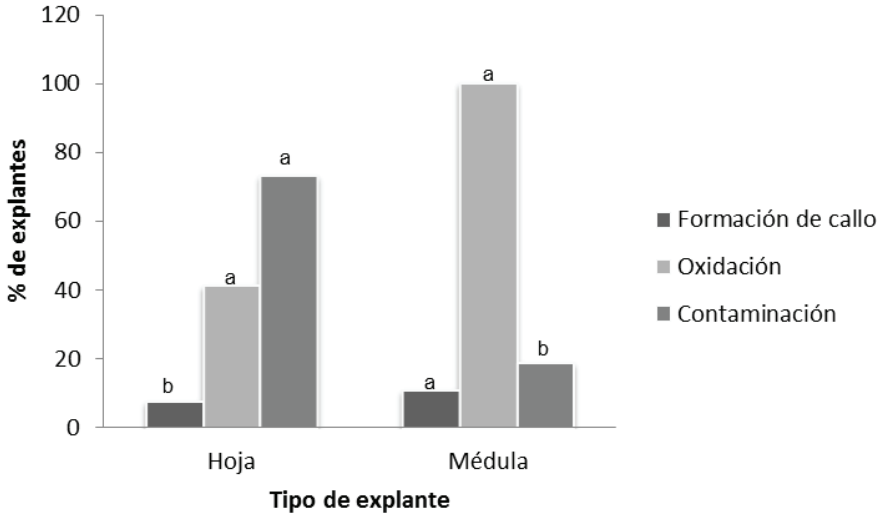

Figura 12. Porcentajes de las variables respuesta respecto al factor tipo de explante de *Guarianthe skinneri*. Letras diferentes por variable indica diferencia estadística significativa.

V Discusión

V.I Variabilidad genética de *Guarianthe skinneri*

Se encontró una alta diversidad genética medida como diversidad de haplotipos, nucleotídica y estimación de divergencia. Así mismo, se observó que las poblaciones están un poco estructuradas con relación a su ubicación geográfica; sin embargo, la distancia geográfica no explicó la diferenciación observada entre las poblaciones de Tapachula y Guatemala.

La población de Tapachula presentó una de las distancias genéticas intrapoblacionales más altas (0.170); se atribuyó a que se desconoce el origen de estos individuos, el cual puede ser incluso de zonas fuera del Soconusco. Mientras que los resultados obtenidos de Guatemala mantuvieron niveles más bajos y menores tasas de mutación, esto se atribuyó a que provinieron de un origen común o fueron poblaciones localmente adaptadas. En contraste a lo reportado por Qian *et al*. (2013) en la orquídea *C. tsoongiana*, los resultados de distancias genéticas entre las poblaciones de *G. skinneri* fueron bajos.

A pesar de las diferencias obtenidas en diversidad, se detectó un nivel de diferenciación bajo entre las poblaciones; tanto en AMOVA, como en la red de haplotipos y los índices de fijación. Esto se atribuyó a que las mutaciones son altas, y ésta puede surgir aleatoriamente en cualquier individuo sin tener algún efecto neto en la reproducción y supervivencia; tal y como lo establece la teoría de la neutralidad que le subyace a la ecología molecular (Hedrick, 2000).

Los resultados de AMOVA con el modelo Kimura-2 y *Pairwise difference* (Cuadro 6 y 7) demostraron una baja diferenciación entre poblaciones, y la mayor variación fue entre individuos (dentro de las poblaciones). Esto se atribuyó a un flujo genético alto, así mismo a las altas tasas de mutación que presentan los ITS. Similar a lo reportado en este trabajo, Pinheiro *et al*. (2012) obtuvieron bajos porcentajes de variabilidad genética entre poblaciones; atribuyeron estos resultados a la fragmentación de hábitats en especies silvestres como *C. labiata*. En contraste Pillon *et al*. (2007) reportan alta diferenciación genética significativa entre poblaciones de *L. loeselii* (Fst= 0.382; $P< 0.001$).

Con base en lo reportado por Eguiarte *et al*. (2010) el resultado de flujo genético obtenido fue considerado alto (Nm= 6.37), este valor indica que la población de *G. skinneri* muestreada supero los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local. El flujo génico encontrado en la orquídea *Cymbidium sinense* (Jacks.) Willd. fue de 2.4, indica que el flujo de genes entre poblaciones que habitan las seis regiones que fueron muestreadas fue suficiente para evitar la diferenciación poblacional (Lu *et al.,* 2011). Caso contrario a lo reportado en la orquídea *C. tsoongiana* en donde el flujo génico fue de 0.408, el bajo nivel de migración encontrado impide la continua divergencia entre las poblaciones de la especie y se atribuye a la fragmentación del hábitat que ocasiona reducción del tamaño poblacional (Qian *et al*., 2013).

La diversidad de haplotipos fue notoriamente alta, además la relación en las redes obtenidas se estableció sólo entre cinco haplotipos de Tapachula y 19 de

Guatemala (Figura 4 y 5), por lo que se atribuyó a altas tasas de mutación de la región ITS1-2 e ITS3-4 con posibles procesos de dispersión recientes (Posada y Crandall, 2001).

Los resultados del presente estudio fueron consistentes con los reportes por Pinheiro *et al*. (2012), quienes observaron divergencias en algunos genotipos de *C. labiata* pertenecientes a poblaciones silvestres. Así mismo Pillon *et al*. (2007) no encontraron una correlación entre la distribución geográfica y la agrupación de los individuos en el dendrograma obtenido en *Liparis loeselii* (L.) Rich.; atribuyeron estos resultados a la escasa variabilidad observada. En el dendrograma de distancias no se definen grupos debido a que los brazos son cortos, esto indica que no existe mucha distancia genética entre los individuos; similar a lo observado a partir de los resultados obtenidos mediante los análisis de distancias (Cuadro 3 y 4). En contraste, Alamillo-Vásquez (2013) reportó un dendrograma que presenta grupos diferenciados, pero no obtuvieron diferencia estadística significativa en las distancias genéticas de *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* (J. Anderson) Rolfe.

Al igual que Qian *et al*. (2013) no se encontró diferencia estadísticamente significativa de la correlación de distancias genéticas y distancias geográficas en las poblaciones de colecta de la especie; sólo el 11.79% de los datos se ajustó al modelo de regresión. Así mismo Smith *et al*. (2002) reportan que no obtuvieron correlación entre la distancia genética y geográfica en la orquídea *Tipularia discolor* (Pursh) Nutt., atribuyen estos resultados al área de muestreo debido a que la máxima distancia entre las poblaciones fue de 308.5 km, reportan que estos

resultados indican que ocurre flujo de genes. Lo anterior se relaciona con este trabajo, ya que la distancia máxima entre las poblaciones de *G. skinneri* fue de 382.30 km, no se obtuvo correlación estadísticamente significativa entre la distancia genética y geográfica, y el flujo de genes fue alto (Nm= 6.37).

V.II Cultivo *in vitro* de *Guarianthe skinneri*

La adición de fitorreguladores al cultivo *in vitro* de *G. skinneri* promovieron la formación de callo. Esto se atribuye a lo mencionado por Huan *et al*. (2004), indican que las citoquininas y auxinas son hormonas involucradas en la regulación de la división y diferenciación celular.

En este trabajo la aplicación de BAP fue el que generó una mejor respuesta de esta variable (Figura 9), similar a lo reportado por Thomas y Michael (2007), quienes obtuvieron un mejor desarrollo longitudinal de protocormos de *Rhynchostylis retusa* Blume a partir de la combinación de BAP (6 µM) y ANA (0.2 µM). Así mismo Chung *et al*. (2005) indican que cuando emplearon citoquininas obtuvieron mayor frecuencia de embriogénesis con explantes de hoja de *Dendrobium* 'Chiengmai Pink'. En contraste, De Oliveiraa *et al*. (2013) indican que a concentraciones mayores de 2 mg/L de BAP disminuyó la producción de brotes de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews a partir de entrenudos en medios de cultivo de doble fase.

Lo encontrado en este trabajo no coincide con otros estudios, donde hacen énfasis en la necesidad de emplear la interacción de diversos fitorreguladores para inducir una respuesta *in vitro* (Jiménez y Guevara, 1996; Tokuhara y Mii, 2003); aunque esto también dependerá de otros factores como la especie, condiciones de cultivo, tipo de explante, entre otros. Por lo que Jiménez y Guevara (1996) y Tokuhara y Mii (2003), reportaron que es importante realizar una combinación adecuada de fitorreguladores para obtener los resultados de interés. Por el contrario, Lee-Espinosa *et al*. (2010) reportaron que cuando emplearon la auxina ANA en combinación con alguna citoquinina (BAP o Kin), disminuyó la formación de callo y el índice de multiplicación en la orquídea *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*; lo anterior fue similar a lo obtenido en este trabajo debido a que los tratamientos de hoja y médula de pseudobulbo que emplearon la combinación de fitorreguladores no generaron resultados estadísticamente significativos para la formación de callo. La velocidad de respuesta que generó el uso de BAP se atribuye a la capacidad de regeneración y aumento del número de células meristemática que presentan las citoquininas, además están involucradas en la función de ciertas enzimas; por lo que desempeñan un papel importante en el metabolismo de las plantas (Kalidass *et al*., 2010; Haq *et al*., 2013).

El mayor porcentaje de formación de callo se obtuvo cuando se empleó el tipo de explante médula (Figura 12), esto se atribuyó a la constitución anatómica y fisiológica de este tipo de explante. Ely *et al*. (2007) reportaron que los pseudobulbos de las orquídeas son órganos de almacenamiento de agua, minerales y carbohidratos (almidón); como alternativa a las limitantes hídricas,

nutrimentales y a las intensidades de radiación solar que reciben por ser plantas epifitas (Stern *et al*., 2004; Yen *et al*., 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tipo de explante es un factor relevante para promover la callogénesis de *G. skinneri*; al respecto Chen y Chang (2004) confirman este dato, incluso a nivel de un mismo tipo de órgano reportaron diversos porcentajes de embriogénesis *in vitro* al evaluar cuatro regiones de hoja en *Oncidium* "Gower Ramsey".

La oxidación de los explantes de médula (Figura 10) se atribuye a la presencia de almidón en los pseudobulbos (Silva y Milaneze-Gutierre, 2004), ya que al ser un carbohidrato es sensible al pH, temperatura y a los cortes del tejido. Además, Alvarado-Ulloa (2000) reporta que los cortes realizados a los explantes producen lisis celular que conlleva a la liberación de fenoles. Similar a lo obtenido en este trabajo, George (1996) reporta que los fitorreguladores representan un papel importante en relación a la oxidación de los explantes.

En este trabajo se presentó mayor oxidación de explantes cuando se empleó BAP. Sin embargo, Azofeita (2009) menciona que las auxinas son los fitorreguladores más relacionados con problemas de oxidación y posteriormente se encuentran las citoquininas. Ruíz (2000) indica que el grado de oxidación de los explantes se debe a su estado fisiológico y a la concentración de BAP, reporta que la dosis de 0.5 mg/L genera un control de esta variable en explantes de hoja de *Anthurium andreaeanum* Linden ex André y que a pesar de no presentar diferencia estadística significativa a mayores concentraciones de este fitorregulador la

oxidación aumenta. En contraste a lo obtenido en este trabajo, Chung *et al*. (2005) indican que la presencia de 2,4-D provoca la necrosis de los explantes de *Dendrobium*, debido a que las auxinas estimulan la síntesis de etileno que provocan efectos negativos de crecimiento hasta la muerte de tejido.

Así mismo, existen reportes en los que se menciona que esta variable dependerá de otros factores como tipo de explante, balance hormonal propio de la planta y a la combinación de estos factores (Van Staden *et al*., 2006; Azofeita, 2009). Independiente al oscurecimiento de explantes que genera el estrés oxidativo, se pueden generar desordenes fisiológicos como hiperhidricidad, que consiste en la alta retención de agua a causa de condiciones adversas del cultivo (condiciones ambientales adversas, medio de cultivo, elevadas concentraciones de fitorreguladores, entre otras), situación que dificulta la regeneración de plantas aptas para la aclimatación (Van Staden *et al*., 2006).

Se observó que el tipo explante de *G. skinneri* fue estadísticamente significativo en los resultados de la variable contaminación, donde se presentó mayor porcentaje de contaminación en explantes de hoja que en el de médula (Figura 11). A pesar de no encontrar reportes del uso de médula de pseudobulbo en orquídeas, los resultados obtenidos en este trabajo indican que estos explantes pueden ser una alternativa para su introducción *in vitro*.

Parada Ponce y Villegas Monter (2009), mencionaron que otro factor que influye en los resultados de la variable contaminación es el tamaño del explante, reportan

que cuanto menor sea el tamaño del explante disminuye el porcentaje de contaminación. Sin embargo, en este trabajo se puede considerar que el tamaño de los explantes empleados fue proporcional. Por lo tanto, se consideró más factible que el estado de contaminación de los órganos de las plantas madre (donadora de explantes) fue diferente y una de las causas de los resultados de contaminación obtenidos. Lo anterior se atribuyó a la exposición de agentes contaminantes externos, a las cuales estuvieron expuestas las orquídeas empleadas en los diversos domicilios particulares; pero sobre todo a la constitución y tipo de tejido. Similar a lo mencionado por Alvarado-Ulloa (2000), quien reportó altos porcentajes de contaminación por hongos y bacterias en *G. skinneri* y en el híbrido *G. skinneri* x *Cattleya maxima*, lo cual atribuyó al estado de contaminación de la planta madre.

Dentro de las características que se consideraron para la colecta de las plantas madre no se incluyó conocer la edad de estas; sin embargo, Kamali *et al*. (2001) indicaron que la contaminación en los explantes *in vitro* varía de acuerdo a las edades que presenten las plantas madre y a las épocas del año. Lo anterior se debe a que las plantas jóvenes han estado menos expuestas a agentes contaminantes y que durante época de lluvia las plantas se vuelven más susceptibles a contaminarse por hongos.

A pesar que no se evaluaron diferentes medios de cultivo en este trabajo, existen reportes en los que indican que este factor influye en los porcentajes de contaminación (Parada Ponce y Villegas Monter, 2009); esto se atribuye a que

algunos medios son más afines o aptos para el desarrollo de microorganismos. Lo anterior se relaciona con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que la presencia de 2,4-D provocó una mayor contaminación de explantes (Figura 10); esto se atribuyó a que la concentración empleada puede generar condiciones óptimas para el desarrollo de hongos.

VI Conclusión

No se encontró correlación entre los resultados de distancias genéticas y las distancias geográficas de los seis sitios de colecta. La alta diversidad y baja estructura que se observó sugiere que esta especie tiene un alto potencial evolutivo, y que la población de Tapachula, aunque fue artificial puede ser una fuente importante de propágulos.

El explante de médula de pseudobulbo generó bajos porcentajes de contaminación (18.8%) y presentó la mayor formación de callo (10.8%). Este explante es una nueva alternativa para la inducción de callogénesis *in vitro* de *Guarianthe skinneri* para el desarrollo de protocolos de propagación *in vitro*.

VII Recomendaciones

Para futuros trabajos de genética en *G. skinneri* se requiere de un mayor número de muestras, de incluir otros marcadores o regiones de ADN más grandes; así como posibles entrevistas con los poseedores de los ejemplares para conocer el origen y confirmar la procedencia para una mejor interpretación de la diversidad genética. Así mismo, la inclusión de más poblaciones silvestres tanto de Guatemala como de Tapachula, para descartar que la hipótesis que surgió en este estudio: “Las poblaciones silvestres son menos diversas que las mantenidas en los jardines privados”.

Con fines de conservación se recomienda crear bancos de germoplasma y unidades de manejo de *Guarianthe skinneri*, además de evitar actividades antropogénicas que causen alteración a las poblaciones silvestres. Así mismo, se sugiere continuar con estudios de cultivo *in vitro* en la especie para desarrollar protocolos de propagación masiva que eviten el continuó saqueo de individuos silvestres.

VIII Bibliografía

Abdelnour, A. y A. Muñoz (1997). Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión. Pp 4-10.

Aguilar-Ramírez, J.M. (2002). Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Satureja macrostema* var. *laevigata.* [Tesis de Doctorado] Universidad de Colima, 156 p.

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*., 25:3389-3402.

Alamillo-Vásquez, J.A. (2013). Evaluación de la estabilidad genética de *Laelia anceps* subsp. *dawsonii Rolfe* propagada *in vitro* utilizando marcadores moleculares RAPD. [Tesis de Licenciatura] Universidad Veracruzana, 52 p.

Allendorf, F.W. y G.H. Luikart (2007). Conservation and the Genetics of Populations. 1a ed. Blackwell Publishing. 663 p.

Alvarado-Ulloa, C. (2000). "Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices". [Informe de proyecto Bachiller en Ingeniería en Biotecnología] Instituto Tecnológico de Costa Rica. San José, Costa Rica. 89 p.

Angulo-Graterol, L., I. Pérez-Almeida, G. Osorio, C. Ramis, A. Bedoya, S. Molina y D. Infante (2013). Estudio de la diversidad genética de nueve especies de *Cattleya* utilizando RAPD e ISTR. *Bioagro*, 25(1):23-30.

Ávila-Díaz, I., y K. Oyama (2007). Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Am J Bot*., 94:184-193.

Azofeita, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1): 153-175.

Bray, E., J. Bailey-Serres y E. Weretilnyk (2000). Responses to abiotic stresses. En: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.

Calva Calva y Pérez Vargas (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. En Revista Digital Universitaria. 6 (11): http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/int104a.htm

Cardoza, V. (2008). Tissue Culture: The Manipulation of Plant Development. En: Neal C. Stewart. Jr. (eds) Plant Biotecnhology and Genetics: Principles, Techniques and Applications. John Wiley & Sons, Inc. Pp 113-132.

Chen, J.T. y W.C. Chang (2004). TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 315–320.

Chen, Y.C., C. Chang y W.C. Chang (2000). A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant., 36:420–423.

Chung, H.H., J.T. Chen y W.C. Chang (2005). Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* 'Chiengmai Pink' and subsequent plant. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant*., 41:765-769.

Clement, M., D. Posada, y K.A. Crandall (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol*., 9: 1657-1660.

Coello, C.Y., C.L. Miceli, C. Orantes, L. Dendooven y F.A. Gutiérrez (2010). Optimización de reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de la orquídea *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E. Higgins". *Gayana Bot.,* **67**: 19-26.

Damon, A. (2013). Conservation status and strategies for the preservation of orchids in the Soconusco region of southeast Mexico. *Lankesteriana*, 13: 27-31.

Damon, A. (2010). Diversidad y conservación de las orquídeas del corredor biológico Tacaná-Boquerón. Informe final. Proyecto CHIS-2006-C06-45802. 2007-2010. CONACyT Fondos Mixtos-Chiapas.

Damon, A. y V. Bertolini (2015). Modelación de la distribución geográfica de las Orchidaceae del Soconusco. El Colegio de la Frontera Sur. Unidad Tapachula, Base de datos SIN-CONABIO, proyecto No. JM061. México, D.F.

De Oliveiraa, S.O.D., R,M. Saydb, T.A. Balzonc y J.E. Scherwinski- Pereirad (2013). A new procedure for *in vitro* propagation of vainilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. *Sci Hortic*., 161:204–209.

Dressler, R.L. (1993). Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama. New York, Estados Unidos de América. Cornell University Press. 374 p.

Dressler, R. y W. Higgins (2003). *Guarianthe*, a generic name for the *"Cattleya" skinneri* complex. *Lankesteriana* 2:37–38.

Eguiarte, L.E., E. Aguirre-Planter, E. Scheinvar, A.G. González y V. Souza (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura génetica de las poblaciones, con

ejemplos en especies de plantas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Ecología Evolutiva, México.

Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre (2007). Ecología molecular. SEMARNAT-CONABIO. México. 592 pp.

Eguiarte, L.E. y D. Piñero (1999). Genética de la Conservación: Leones Vemos, Genes No Sabemos. Pp. 375. En: Evolución Biológica. Nuñez-Farfán, J. y L. E. Eguiarte (Eds). Instituto de Ecología y Universidad Nacional Autónoma de México.

Ely, F., F. Torres, F. Rada y Y. León (2007). Estudio morfo-anatómico de dos orquídeas de una selva nublada tropical. *Interciencia*, *32*(6), 410-418.

Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider (2005). Arlequin ver. 3.5.1.2 An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online,* 1:47-50.

Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferrred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 470-491.

Flores-Escobar, G., J.P. Legaria-Solano, I. Gil-Vásquez, y M.T. Colinas-León (2008). "Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México". *Rev. Chap. Serie Hort.*, 14(3): 347-353.

Frankham, R., J.D. Ballou y D.A. Briscoe (2004). A Primer of Conservation Genetics. 1a edición. Cambridge University Press, Cambridge, England. 220 P.

Garner, A., J. Rachlow y J. Hicks (2004). Patterns of Genetic Diversity and Its Loss in Mammalian Populations. *Conservation Biology*, 19: 1215-1221.

George, E. (1996). Plant propagation by tissue culture; Part 2. inPractice.2e-d. exegeticsLimited.england.1361p.

Griffiths, A., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontine y W.L. Gelbart (2002). Genética. 7a edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 845 pp.

Haq, R., S. Naz, F. Aslam y F. Manzoor (2013). Comparison of *in vitro* response of micropropagation and callogenesis of medicinal plant, *Vincarosea. J. Agric. Rese*., 51(1): 9–17.

Hartl, D.L. y A.G. Clark (1989). Principles of Population Genetics. Sinauer Associates; Sunderland, Massachusetts. Pp. 118–119.

Hedrick P.W. (2000). *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Pub, Mass.

Hillis, D.M. y M.T. Dixon (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol*., 66:411-453.

Huan, L.V., T. Takamuray M. Tanaka (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci*., 166:1443-1449.

Hudson, R.R., D.D. Boss y N.L. Kaplan (1992). A statistical test for detecting population subdivision. *Mol. Biol. Evol*., 9:138-151.

Hussain, A., I.A. Qarshi, H. Nazir y I. Ullah (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. En: Leva A, Rinaldi LMR (eds) Recent advances in plant *in vitro* culture. InTech, Rijeka, pp 1–28.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2011 (2012). Anuario estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos exportación en pesos / Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Pp 33.

Jiménez-Bautista, L. (2009). Diversidad de la familia Orchidaceae en el Corredor Boquerón- Tacaná, Chiapas. [Tesis de Licenciatura] Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, 82 p.

Jiménez, V.M. y E. Guevara (1996). Propagacion *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) mediante el cultivo de secciones de ejes florales después de la senescencia de las flores. *Agronomia Costarricense*, 20(1):75-79.

Kamali, K., E. Majidi y R. Zarghami (2001). Micropropagation of GF-677 rootstocks (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). *Seed and Plant*, 17:175-177.

Kalidass, C., V.R. Mohan y A. Daniel (2010). Effect of auxin and cytokinins on vincristine production by callus cultures of *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae). *Trop. Subtrop. Agroecosystems*, 12: 283-288.

Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *Am Orchid Soc Bull*., 15: 214-217.

Kumar, N. y M.P. Reddy (2011). *In vitro* plant propagation: *A review. Journal of Forest Science*, 27(2): 61-72.

Kumar, S., K. Tamura y M. Nei (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*., 5: 150-163.

Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson y D.G. Higgins (2007). Clustal W and Clustal X ver. 1.83. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.

Lee-Espinosa, H.E., A. Laguna-Cerda, J. Murguía-González, L. Iglesias-Andreu, B. García-Rosas, D. Escobedo-López, Y.M. Martínez-Ocampo, F.A. Barredo-Pool y N. Santana-Buzzy (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Rev*. *Fitotec*. *Mex*., 33(4): 323–332.

Librado, P. y J. Rozas (2009). DnaSP ver. 5.10: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

Lu, J., X. Hu, J. Liu, y H. Wang (2011). Genetic diversity and population structure of 151 *Cymbidium sinense* cultivars. *J. Hortic. For.*, 3:104—114.

Lundgvist, A.C., S. Andersson y M. Lönn (2008). Genetic variation in wild plants and animals in Sweden. A review of case studies from the perspective of conservation genetics. Swedish Environmental Protection Agency. 88 p.

Martínez-Palacios, A., L.E. Eguiarte y G.R. Gurnier (1999). Genetic Diversity of the Endangered Endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahua Desert. *Am J Bot*., 86(8): 1093-1098.

Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol*. *Plant*., 15: 473-479.

Nei, M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. Nueva York.

Nei, M. (1982). Evolution of human races at the gene level. Pp. 167-181. En: Human genetics, part A: The unfolding genome. Bonne-Tamir, B., T. Cohen y R. M. Goodman (Eds.). Alan R. Liss, New York.

Parada, Ponce D. y A. Villegas Monter (2009). “Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1”. *Rev*. *Fitotec*. *Mex*., 32: 103–109.

Pillon, Y., F. Qamaruz-Zaman, M.F. Fay, F. Hendoux, y Y. Piquot (2007). Genetic diversity and ecological differentiation in the endangered fen orchid (*Liparis loeselii*). *Conserv*. *Genet*., 8:177–184.

Pinheiro, L.R., A.R.C. Rabbani, A.V.C. da Silva, A. da Ledo Silva, K.L.G. Pereira y L.E.C. Diniz (2012). Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Syst Evol*., 298(10):1815–1825.

Piñero, D., J. Caballero-Mellado, D. Cabrera-Toledo, C.E. Canteros, A. Casas, S.A. Castañeda, A. Castillo, R. Cerritos, O. Chassin-Noria, P. Colunga-GarcíaMarín, *et al*., (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, En: *Capital natural de* México, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, pp. 437-494.

Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Departamento de Genética, Bioquímica e Inmunología, Facultad de biología, Universidad de Vigo. Vigo, España.

Posada, D. y K.A. Crandall (2001). Intraspecific gene genealogies: tres grafting into networks. *Trends Ecol*. *Evol*., 16: 37-45.

Qian, X., C. Wang, M. Tian (2013). Genetic diversity and population differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a rare and endemic orchid in China. *Int*. *J*. *Mol*. *Sci*., 14:20399–20413.

R Core Team (2013). R: A lenguage and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. En: https://www.R-project.org/.

Rahim, M.A., A.A. Mia, F. Mahmud, N. Zeba, y K. Afrin (2010). Genetic variability, character association and genetic divergence in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Omics*., 3(1): 1-6.

Raya-Montaño, Y.A., G. Carrillo-Castañeda, M.E. Pedraza-Santos, T. Corona-Torres, J.A. Carrillo-Salazar, G. Alcantar-González (2011). Propagación *in vitro* de *Laelia halbingeriana*. *Rev*. *Mex*. *Cienc*. *Agríc*. 3:539-553.

Redecker, D. (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80.

Rivera-Dueñas, A.R. (2002). Guía ilustrada de 55 especies de orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras. [Tesis de Licenciatura] El Zamorano, Honduras, 45 p.

Ruíz, B. (2000). Efectos del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andreanum* L. [Tesis de Licenciatura] El Zamorano, Honduras, 84 p.

SEMARNAT (2010). Norma Oficial Mexicana-059-2010, 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, 6 de marzo de 2002. Ciudad de México. En: http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/NOM-059-ECOL-2001.pdf

Silva, C.I. y M.A. Milaneze-Gutierre (2004). Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). *Acta Scientiarum 26(1):* 91-100.

Singh, S.K., R.K. Kakani, R.S. Meena, A. Pacholy, R. Pathak y A. Raturi (2012). Studies on genetic divergence among Indian varieties of a spice herb, *Coriandrum sativum*. *J. Environ. Biol*., 33:781-789.

Smith, J.L., K.L. Hunter y R.B. Hunter (2002). Genetic variation in the terrestrial orchid *Tipularia discolor*. *Southeast. Nat*., *1*:17–26.

Stern, W.L., W.S. Judd y B.S. Carlsward (2004). Systematic and comparative anatomy of *Maxillarieae* (Orchidaceae), *sans* Oncidiinae. *Bot. J. Linn. Soc*., 144:251-274.

Swofford, D.L. (1999). PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Ver. 4.0b Computer program distributed by the Smithsonian Institution, Sinauer Associates, Sunderland.

Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

Templeton, A.R., K.A. Crandall y C.F. Sing (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.

Thomas, T.D. y A. Michael (2007). High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa* Blume., an exquisite orchid. *Plant Biotechnol Rep*., 1:243–249

Tiza-Arias (2010). Propagación *in vitro* de las orquídeas *Dendrobium, Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*". [Tesis de Licenciatura] Universidad Veracruzana, 84 p.

Tokuhara, K. y M. Mii (2003). Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 39(6):635–639.

Tripp, V.M.A. (2009). Análisis de la estructura genética poblacional del dorado (*Coryphaena hippurus*; Linnaeus, 1758) en el noroeste del Pacífico Mexicano y Golfo de California mediante el uso de microsatélites. [Tesis de Maestría] La Paz, Baja California Sur, México; 106 p.

Us-Camas, R., G. Rivera-Solís, F. Duarte-Aké, C. De-la-Peña (2014). *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*., 118: 187-201.

Van Staden, J., C. Fennell y N. Taylor (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*, 725: 55-62.

Vargas, C.F., V. ParraTabla, P. Feisinger y J. Leirana Alcocer (2006). Genetic diversity and structure in fragmented populations of the tropical orchid *Myrmecophyla christinae* var. *christinae*. *Biotropica*, 38: 754-763.

Weir, B. y C. Cockerham (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358.1370.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor (1990). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. *Academic Press*, 315-322.

Yen, C.Y.T., W.T. Starman, Y.T. Wang, A. Holzenburg y G. Niu (2008). Timing of nutrient termination and reapplication for growth, flower initiation, and flowering of the *Dendrobium nobile* orchid. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 133:501-507.

Young, P.S., H.N. Murthy y P.K. Yoeup (2000). Mass multiplication of protocormlike bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 63:67–72.

IX Anexos

Método de extracción de ADN en plantas con CTAB-mercaptoetanol; ECOSUR (2015).

1.- Moler aproximadamente 200 a 300 g de tejido foliar con 1000 µl de buffer CTAB 2X con mercaptoetanol previamente calentado con baño maría a 65 °C por 10 min (Por 1 ml de buffer CTAB 2X agregar 3 µl de mercaptoetanol). Pasar a un tubo eppendorf de 2 ml.

2.- Incubar en baño maría a 65 °C durante 60 min y agitar los tubos o pasar a vortex cada 10 min. Pasados los 60 min sacar del baño maría y dejar enfriar por 5 min, agregar 400 µl de acetato de amonio a 7.5 M. Pasar a vortex por 20 segundos.

3.- Centrifugar a 13,000 rpm por 8 min y trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo.

4.- Añadir a cada tubo el mismo volumen de cloroformo octanol 24:1 del que se recupere del sobrenadante. Pasar a vortex por 20 segundos o hasta homogenizar. Centrifugar a 13,000 rpm durante 20 min.

5.- Trasladar de 350 a 400 µl de sobrenadante a tubos nuevos con 400 µl de isopropanol a -20 °C y dejar reposar durante 12 h a -20 °C.

6.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 8 min y eliminar (decantar) el sobrenadante.

7.- Agregar 300 µl de etanol frío al 80% para limpiar el pellet y centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min.

8.- Eliminar el sobrenadante y dejar secar unos minutos, después de esto llevarlos al concentrador durante 10 min.

9.- Rehidratar el pellet con 30 µl (o según tamaño del pellet) de agua tridestilada y estéril. Reposar durante una noche en refrigeración.