



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E
INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Estudio morfohistológico del ovario de *Laelia
gouldiana* Rchb.f. (Orchidaceae).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

P R E S E N T A:

Alejandra Pardo Zigler.

Directora: **Dra. Ana Laura López Escamilla**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Área Académica de Biología

Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación

M. EN A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
DIR. ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE

Por este conducto le comunico que, después de revisar el trabajo titulado "Estudio morfohistológico del ovario de *Laelia gouldiana* Rchb.f. (Orchidaceae) que presenta la alumna de la Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación, **Biól. Alejandra Pardo Zigler**, el Comité Revisor de tesis ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE: Dr. Arturo Sánchez González
SECRETARIO: Dra. Estela Sandoval Zapotitla
VOCAL: Dra. Ana Laura López Escamilla
PRIMER SUPLENTE: Dra. Claudia T. Hornung Leoni

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hidalgo, a 01 de diciembre del 2014.

DR. ORLANDO ÁVILA POZOS
DIRECTOR I.C.B.I.



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts 66744
Maestría-biodiversidad@hotmail.com



LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MORFOFISIOLOGÍA VEGETAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA.

DEDICATORIA

A mi esposo Rafael, compañero, amigo y cómplice,
por siempre querer mi superación personal.

A mis padres Arlina por ser amiga y pilar, gracias por
siempre apoyarme en mis decisiones, y Alejandro
(QEDP), donde quiera que estés, siempre me harás
falta.

A mis hermanas Yirsel y Arlina, las quiero mucho,
gracias por guiarme desde niña.

Por su apoyo, cariño y comprensión en todo el
tiempo durante el posgrado, siempre han estado
conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por el espacio otorgado.

A la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales por el permiso brindado para llevar a cabo la colecta científica.

A mi directora de tesis, Dra. Ana Laura López Escamilla, por todo el tiempo que dedicó a dirigir, asesorar y aportar sus conocimientos para la realización y culminación de este trabajo.

A los integrantes del comité revisor: Dra Claudia Hornung Leoni, Dr. Arturo Sánchez González por el tiempo brindado y por las correcciones al trabajo escrito.

A la Dra. Estela Sandoval Zapotitla del Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Jardín Botánico-UNAM, por su apoyo y ayuda en la captura de fotomicrografías, así como por los conocimientos que me brindó.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias-UNAM, por su apoyo en la revisión del material procesado y su orientación en la descripción embriológica de los resultados. Gracias por su disposición y tiempo.

A la Dra. Maritza López Herrera del Centro del Investigaciones Biológicas-UAEH, por su apoyo y sus consejos.

Al M. en C. Mario Segura Almaraz del Centro de Investigaciones Biológicas-UAEH, por la captura de imágenes.

A Lidia por su apoyo desinteresado.

A mis compañeros del Laboratorio de Morfofisiología Vegetal por su amistad y ayuda; a Su-Lin y Ascención, por estar al principio de esta aventura; a Dante por los conocimientos sobre la especie; a Columba por su apoyo en las

salidas de campo; a Itzel, a Fernando, a Ivette, y a mis compañeros de posgrado Giovany, Emanuel, Rafa y Rubí.

A Yuri por ser amiga y compañera durante el tiempo que compartimos en el laboratorio.

A Judith y Samantha por su amistad brindada.

A Tulio por su asesoría en la edición de las imágenes y a Julio por su presencia y apoyo constantes.

A cada uno de ellos muchas gracias, quienes con sus conocimientos y opiniones enriquecieron y ayudaron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	III
II. INTRODUCCIÓN	1
III. ANTECEDENTES	3
3.1 Generalidades de la familia Orchidaceae	3
3.2 Las orquídeas en México y el género <i>Laelia</i>	5
3.3 Características de <i>Laelia gouldiana</i>	7
3.4 Polinización en la familia Orchidaceae.....	9
3.5 Síndrome de post-polinización en la familia Orchidaceae	11
3.6 Generalidades del desarrollo del óvulo y sus características en la familia Orchidaceae	13
3.7 Generalidades del desarrollo del saco embrionario y sus características en la familia Orchidaceae	17
IV. JUSTIFICACIÓN.....	22
V. OBJETIVOS.....	22
5.1 General	22
5.2 Particulares:.....	22
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Recolecta de botones	23
6.2 Polinización cruzada.....	24
6.3 Técnica histológica	25
VII. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	29
7.1 Recolecta de botones	29
7.2 Polinización cruzada.....	29
7.3 Síndrome de post-polinización y desarrollo de la cápsula	31
7.4 Análisis histológico	34

Etapa 1.....	35
Etapa 2.....	36
Etapa 3.....	40
Etapa 4.....	43
Etapa 5.....	46
Etapa 6.....	48
Etapa 7.....	49
VIII. CONCLUSIONES	52
IX. ANEXO.....	61
9.1 Descripción botánica de <i>Laelia gouldiana</i> Rchb. f.	61
9.2 Clasificación taxonómica	63

I. RESUMEN

Se realizó el análisis histológico del desarrollo del ovario de *Laelia gouldiana* (Orchidaceae), especie catalogada por la Norma Oficial Mexicana NOM-059 como Extinta en la naturaleza. Se llevó a cabo la recolecta de botones florales antes y después de haber realizado la polinización cruzada de forma manual y de la cápsula durante su desarrollo. Las recolectas se realizaron cada 15 o 30 días aproximadamente para obtener diferentes etapas del desarrollo. Las muestras se fijaron en Navashin, se deshidrataron en alcohol terbutílico y procesaron para ser incluidos en Paraplast®; los cortes obtenidos se tiñeron con Safranina Verde-Rápido. Se observó que en el pedúnculo floral se localiza el ovario sincárpico del tipo paracárpico, tricarpelar, unilocular con placentación parietal. La placentación inicia durante el desarrollo de los botones, formándose primordios de óvulo y en la anthesis se presentan células arqueosporiales. Después de los 50 días de la polinización, la célula arqueosporial se desarrolla directamente en la célula madre de la megaspora, a los 70 días después de la polinización se desarrollan los tegumentos, primero el interno en forma de anillo y después el externo, al mismo tiempo el óvulo se curva ligeramente y continua hasta que el micrópilo y el funículo se encuentran cerca entre si y los tegumentos han terminado su crecimiento (83 días). Los sacos embrionarios maduros se observan a los 93 días y a los 114 días las semillas contienen un embrión pequeño. Los óvulos son anátropos, bitegumentados y tenuicelados. El presente trabajo describe el síndrome de post-polinización y es el primer estudio del desarrollo embrionario de *L. gouldiana*.

II. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son consideradas entre las plantas más evolucionadas, presentan gran diversidad y variabilidad morfológica. Se distribuyen en casi todas las regiones del planeta, excepto los desiertos extremos y en las tierras permanentemente heladas, son mejor representadas en los trópicos, donde la mayoría son epífitas, mientras las especies de las zonas templadas y frías son terrestres (Velasco y Beltrán, 2008).

México alberga una notable riqueza de orquídeas representada con 1,106 especies y subespecies repartidas en 159 géneros, de las cuales 444 especies son endémicas (Hágsater *et al.*, 2005; Halbinger y Soto, 1997).

Las flores han llamado la atención en la época de Charles Darwin y han sido estudiadas desde el punto de vista ecológico (Singer, 2009), y proporcionan el ejemplo del desarrollo ovárico mediante la polinización. Las orquídeas presentan el síndrome de post-polinización que incluye eventos de desarrollo de polinización regulada que preparan colectivamente a la flor para la fertilización y la embriogénesis, provocando la pérdida de órganos florales (O'Neill, 1997). Así mismo se ha observado que en la antesis el ovario es inmaduro pero después de la polinización existe la diferenciación del óvulo, el crecimiento, el desarrollo y la formación del saco embrionario en preparación para la llegada del tubo polínico en crecimiento para la posterior fertilización (Zhang y O'Neill, 1993; Tsai *et al.*, 2008). De manera general el óvulo deriva de la placenta desde la pared del ovario y dentro de este será el sitio de la formación del saco embrionario, fertilización y embriogénesis (Reiser y Fischer, 1993), su desarrollo involucra los mismos procesos básicos necesarios para la formación de cualquier órgano de la planta, tal como la iniciación o formación de un primordio, división y expansión celular dirigida, así como crecimiento asimétrico y diferenciación (Vázquez, 2013). En la mayoría de las especies de orquídeas estudiadas se ha reportado que los óvulos son bastante rudimentarios antes de la polinización, lo cual proporciona una oportunidad única para estudiar sus etapas de desarrollo y los del saco

embrionario (Yeung y Sandra, 1997) no existe un único tipo de óvulo ni de saco embrionario en la familia, si no que se han encontrado una gran variedad de tipos (Arditti, 1992). Lo que sí es una característica general es que el ovario se alberga en el pedúnculo floral en todas las especies (Pulido *et al.*, 2000).

El género *Laelia* es típicamente mexicano y ocupa un lugar especial en la cultura Mexicana, sus flores son usadas en celebraciones religiosas (Hágsater *et al.*, 2005) y se han utilizado como parte de las ofrendas en las festividades de Día de Muertos, debido al alto valor tanto cultural como ornamental que se le atribuye (Halbinger y Soto, 1997; Hágsater *et al.*, 2005), lo que ha llevado a que sean extraídas ilegalmente para satisfacer la demanda causando la disminución de las poblaciones (Téllez, 2011), colocándolas en diferentes categorías de riesgo según la Norma Oficial Mexicana. *Laelia gouldiana* está reportada como extinta en la naturaleza y solo se ha mantenido en traspatios de localidades de la barranca de Metztlán en el estado de Hidalgo por los habitantes del lugar (Hágsater *et al.*, 2005; Téllez, 2011), aunque se presenta la formación de cápsulas, las semillas resultantes no son viables (Hágsater *et al.*, 2005). Debido a lo anterior en el presente trabajo se analizó histológicamente el síndrome de post-polinización y el desarrollo de los óvulos de *Laelia gouldiana* para contribuir al conocimiento de la especie y del género.

III. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de la familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae, es una de las más diversas dentro de las angiospermas se estima que contiene cerca de 20 - 25 mil especies en el mundo (Dressler, 1993; Freudenstein y Rasmussen, 1999; Chase, 2003). Debido a las grandes variaciones adaptativas que presentan, las hay en diferentes formas, tamaños y coloración de sus flores (Hsiao *et al.*, 2011), presentan hábitos de crecimiento muy variados y se consideran cosmopolitas (Briceño, 2004).

Orchidaceae es bien conocida como una familia en la que son posibles cruzamientos amplios para obtener híbridos interespecíficos e intergenéricos que son la base de un mercado comercial próspero. Esto se basa en la gran facilidad y frecuencia de cruza artificiales, pero, debido a las barreras mecánicas y la especificidad de polinizadores, “no existe ningún paralelo en la naturaleza” (Cameron *et al.*, 1999).

Las orquídeas son plantas herbáceas, epífitas, terrestres o litofitas con un tallo modificado denominado pseudobulbo. Hojas radicales o caulinas con flores solitarias o en racimos, espigas o panículas laterales o terminales; la flor es trímera y zigomorfa, generalmente hermafrodita, siempre nacen a partir de una axila floral de una bráctea foliácea o escuamiforme, generalmente en espigas o racimos. Perianto formado de 6 segmentos libres o unidos; los tres exteriores (sépalos), desprovistos de clorofila y los tres interiores (pétalos), los laterales semejantes entre si y el tercer pétalo central se ha modificado y constituye el labelo o labio usualmente mayor y más complejo, previsto de papilas, surcos, lamelas (Rzedowski y Rzedowski, 1990; Hágsater *et al.*, 2005; Murguía y Lee, 2007; Velasco y Beltrán, 2008).

Su gineceo es tricarpelar, con un ovario único, estilos y estambres únicos. El ovario es unilocular, es decir no tiene separaciones, y la placentación que presenta es parietal, aunque existen algunas especies que tienen ovario trilobular

con placentación axilar como Apostasioidae, *Selenipedium* y *Phragmipedium*; los primordios seminales se encuentran a lo largo de la placenta, de forma axial (Arditti, 1992).

Los filamentos de los estambres y el estilo están fusionados al menos parcialmente, formando una estructura generalmente alargada denominada columna (Dressler, 1993; Arditti, 1992; Chase, 2003; Hágsater *et al.*, 2005 citados por Signes *et al.*, 2012). El número de polinios refleja las particiones de la antera y son constantes en cada especie (Velasco y Beltrán, 2008). La cápsula se compone de tres válvulas que están delimitados por tres divisiones de dehiscencia situadas a ambos extremos de las placentas (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010).

Las orquídeas tienen la más alta producción de semillas por fruto entre las Magnoliophyta, contienen un millón o más de semillas, por lo que tienen un sistema de polinización especial, para fertilizar una gran cantidad de óvulos a la vez; en primer lugar los polinios se retiran y transportan a los estigmas funcionando con el principio de todo o nada y en segundo lugar los polinios son proveídos a los estigmas en grandes porciones, y contienen mas polen que óvulos en el ovario (Nazarov y Gerlach, 1997).

Las semillas miden entre 0.25 a 1.2 mm de largo por 0.09 a 0.027 mm de ancho, pesan entre 0.3 y 0.15 microgramos (Arditti, 1967; Arditti y Karim, 2000), debido a esto las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas polvo (Téllez, 2011), no presentan cotiledones ni endospermo por lo que para germinar necesitan de la asociación con un hongo, de la división *Basidiomycota* (Téllez, 2011) y las hifas del hongo aportan al embrión los azúcares necesarios para su crecimiento (Velasco y Beltrán, 2008; Téllez, 2011), pero las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han permitido el éxito en la germinación de estas especies, debido a que el medio de cultivo le proporciona los nutrientes necesarios sin requerir de la asociación con el hongo (Alberico, 2004).

3.2 Las orquídeas en México y el género *Laelia*

Por su ubicación geográfica, México tiene una gran riqueza de orquídeas, con un registro de 1,260 especies y 170 géneros (Halbinger y Soto, 1997, Hágsater *et al.*, 2005). Soto en 1995 hizo referencia de que se habían descrito 1,106 especies y subespecies distribuidas en 159 géneros, señalando que las 444 especies o subespecies endémicas (40% del total registrado en el país) colocaban a la orquideoflora mexicana en una de las más ricas en endemismos (Ramírez, 2004). Colombia, Ecuador y Brasil poseen más de 3,500 especies cada uno, ocupando los primeros lugares y México la decimosegunda posición (Hágaster *et al.*, 2005).

La mayor cantidad de especies se desarrollan en las regiones ubicadas al sur del Trópico de Cáncer, desde el Pacífico al Golfo, y son los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas los que presentan la mayor riqueza (Ramírez, 2004). Los géneros más importantes son: *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, *Oncidium*, *Brassia*, *Sabralia*, *Stanhopea*, *Odontoglossum*, *Gongora*, *Lycaste* (Nava, 2008).

En la Norma Oficial Mexicana-059 se encuentran catalogadas en alguna categoría de riesgo 188 especies de orquídeas, de las cuales 75 son endémicas (SEMARNAT, 2010) debido al comercio ilegal, cambio de uso de suelo y deforestación principalmente (Menchaca y Moreno, 2011). Orchidaceae se considera como el segundo grupo de plantas con más especies protegidas en el país (SEMARNAT, 2010; Beltrán *et al.*, 2012).

El género *Laelia* fue descrito en 1831 por el botánico John Lindley, y es uno de los 43 géneros que constituyen la subtribu *Laeliinae*, se encuentra únicamente en el territorio mexicano, e incluye 11 especies y una subespecie reconocida (Halbinger y Soto, 1997; Hágsater *et al.*, 2005; Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007).

Las orquídeas del género *Laelia* son herbáceas con crecimiento simpodial; epífitas a veces rupícolas; rizoma poco visible por el crecimiento de los pseudobulbos, desde la parte media de estos se desarrollan los escapos florales;

las flores son hermafroditas, grandes, vistosas que crecen sobre un escapo largo, pueden ser una, dos o varias en racimo; los sépalos libres, extendidos, subiguales; pétalos semejantes a los sépalos, labelo trilobado, ligeramente adnato a la columna, lóbulos laterales envolviendo a la columna, disco liso o lamelado; columna corta o larga, antera operculada, incumbente, lóculos 2, septados, polinios 8, 4 en cada lóculo, ovoides o comprimidos lateralmente o cerosos (Rzedowski y Rzedowski, 1990).

La maduración de la cápsula depende de la especie, en *Laelia anceps* de 4-5 meses (Téllez, 2011), *Laelia speciosa* y *L. superbiens* es de 10-12 meses, en *L. eyermaniana* es de 7-8 meses y 6-7 meses son necesarios para el resto de las especies (Halbinger y Soto, 1997). Los miembros del género *Laelia* tienen ocho polinios en dos series, a diferencia de *Cattleya* que sólo presenta cuatro (Velasco y Beltrán, 2008; Menchaca y Moreno, 2011, Téllez, 2011).

Varias comunidades antropogénicas han cultivado especies del género *Laelia* debido al alto valor ornamental que presentan sus flores, que se han utilizado desde tiempos lejanos como parte de las ofrendas en las festividades de día de muertos, por lo que se les han atribuido diversos nombres comunes, como: “calaverita”, “lirio de todos Santos”, “flor de muerto”, “flor de las ánimas”, al igual que otras especies los miembros de este género florecen en distintos meses del año y están relacionados con festividades como el día de las madres, el de la Virgen de Guadalupe y fiestas patronales (Beltrán *et al.*, 2012).

Debido al uso cultural tan extenso que tienen las flores de las 11 especies existentes, cuatro se encuentran en la NOM-059-SEMARNAT-2010: *Laelia anceps*, en peligro de extinción, *Laelia speciosa*, bajo protección especial, *Laelia superbiens*, amenazada y *Laelia gouldiana* como probablemente extinta (SEMARNAT, 2010).

3.3 Características de *Laelia gouldiana*

El nombre se le debe al norteamericano financiero Jay Gould, de Nueva York, gran aficionado a las orquídeas hace 100 años (Téllez, 2011); aunque fue descrita por primera vez por Heinrich Gustav Reichenbach en 1888, pero desconocía el lugar de origen de la planta, Reichenbach sugirió que se trataba de un híbrido natural debido al color que presenta (Halbinger y Soto, 1997; Téllez, 2011).

Su flor se distingue por tener los sépalos y pétalos de un color púrpura cálido o rojo magenta, el labelo es del mismo color, pero blanco en la garganta y con rayas rojas bifurcadas y tres quillas amarillas con rayas rojas longitudinales (Anexo) (Fig. 1) (Téllez, 2011), algunos ejemplares de *L. eyermaniana* se parecen mucho a *L. gouldiana*, pero en *L. gouldiana* las hojas están en posición vertical, con bordes puntiagudos y sus flores tienen un color magenta, pétalos más anchos, y la garganta muy rayada mientras los especímenes de *L. eyermania* son más pequeños (Halbinger y Soto, 1997).



Figura. 1. Escapo floral de *Laelia gouldiana* mostrando flores con las características de la especie. Tomadas en campo en la comunidad de El Veladero, municipio de San Agustín Metzquitlán Hidalgo, México. ©Alejandra Pardo Zigler, 2014.

Solamente se tiene registrada una recolecta en 1873 en El Chico, Hidalgo de ejemplares de *L. gouldiana*, actualmente se encuentran creciendo sobre árboles de mezquite ubicados en los patios de las casa de los habitantes de algunas comunidades de la barranca de Metzquitlán, en el estado de Hidalgo conformando grandes agrupaciones de pseudobulbos (Fig. 2), en un clima semiárido, con lluvias en verano y poca precipitación invernal (Halbinger y Soto, 1997; Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007; Téllez, 2011).

La especie se mantiene gracias al valor cultural que tiene para los grupos indígenas de la zona principalmente de habla otomí y náhuatl (CONANP, 2003; INEGI, 2004) quienes utilizan sus flores en las festividades populares en las ofrendas del Día de Muertos, la conocen comúnmente como Sanctorum, Flor de Muerto y Monjita, debido a que su época de floración es en los meses de octubre y noviembre (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007; Hágsater *et al.* 2005; Téllez, 2011). De igual manera se ha mantenido al cuidado de los lugareños a fin de venderlas a quien lo solicite (CONANP, 2003).



Figura. 2: Numerosos psudobulbos de *Laelia gouldiana* creciendo sobre un árbol de mezquite en la comunidad de El Veladero, municipio de San Agustín Metzquititlán Hidalgo, México.
©Alejandra Pardo Zigler, 2013.

L

os habitantes de la zona han preservado esta especie a lo largo de muchos años ya que hacen referencia que sus abuelos y los abuelos de estos ya la cultivaban a

través de la propagación vegetativa, separando y reubicando los pseudobulbos en nuevas horquillas y/o ramas de los mezquites. Los pobladores hacen referencia que las “varitas” (escapo floral con 4 o 5 flores) se venden en el municipio de Atotonilco El Grande, ofreciendo el ciento de varitas a razón de \$25 - \$30 pesos mexicanos (\$2 - \$2.3 dólares aproximadamente) (Comunicación personal).

A pesar de que forma fácilmente cápsulas cuando es polinizada con polen de otras especies, se tiene registrado que es auto-incompatible por lo que las semillas resultantes son no viables (Hágsater *et al.*, 2005); esto se corrobora con lo reportado por Aguirre-León y colaboradores (2005) que obtuvo semillas viables cruzando dos especímenes de *L. gouldiana* aparentemente diferentes.

3.4 Polinización en la familia Orchidaceae

La reproducción sexual es esencial para la supervivencia ya que el proceso de la meiosis permite la variación aleatoria de los genes parentales (Yeung y Sandra, 1997). Los óvulos son el sitio de los procesos esenciales para la reproducción sexual de las plantas, incluyendo la formación del megagametofito, la fertilización, la embriogénesis y, finalmente, la formación de la semilla (Tsai *et al.*, 2008). La estructura y funciones de las semillas no pueden entenderse adecuadamente sin estudiar el óvulo en todos sus aspectos (Yeung y Sandra, 1997) ya que el resultado final de la polinización es la fertilización, lo que conduce a la formación de cigoto y posteriormente la embriogénesis (O’Neill, 1997) y formación de la semilla (Arditti, 1992).

La polinización es la transferencia de polen desde los órganos sexuales masculinos (anteras) a los órganos sexuales femeninos (estigma) (Márquez, 2013); las orquídeas son conocidas por su biología reproductiva y estrategias ecológicas únicas (Tsai *et al.*, 2008); morfológicamente diferente de otras especies de plantas con flor en varios detalles importantes, los pétalos y los sépalos pueden ser del mismo color; el pétalo de en medio al cual se le denomina labelo, se modifica considerablemente y sirve como una plataforma de aterrizaje para los polinizadores: por encima del labelo en la flor abierta de la mayoría de las

orquídeas (y debajo de ella en unos pocos) existe una estructura llamada ginostemo o columna, que representa una fusión de los estambres (anteras y filamentos), estigmas y estilos (Arditti, 1979; Tsai *et al.*, 2008). La presencia de este ginostemo podrían ayudar a la autopolinización pero los polinios y el estigma se encuentran separados por una barrera, el rostelo, que solo ocurre en un 3% de las especies de esta familia (Silva y Lima, 1984).

Otra de las modificaciones en las orquídeas es que los granos de polen se encuentran empaquetados en masas adhesivas denominadas polinios (Rodríguez-Robles *et al.*, 1992; Peter y Johnson, 2009), los cuales son transportados por los polinizadores como unidad, consecuentemente un solo evento de polinización es suficiente para fertilizar la mayoría de los óvulos (Rodríguez-Robles *et al.*, 1992)

Se le ha denominado autogamia cuando el polen de la misma flor es depositado en su propia superficie estigmática (Singer y Sazima, 2001). A pesar de que en las orquídeas se mantiene la auto-compatibilidad (Tremblay *et al.*, 2005) como sucede con *Comparettia falcate* (Rodríguez-Robles *et al.*, 1992), *Prescottia densiflora*, *P. plataginea*, *P. stachy* (Singer y Sazima, 2001) y *Acrolophia cochlearis* (Peter y Johnson, 2009); existen algunas especies auto-incompatibles tales como *Gomesa bifolia* y numerosas especies de la subtribu *Oncidiina* (Tremblay *et al.*, 2005; Torreña *et al.*, 2011), específicamente en varias especies del género *Oncidium*, *Vanda*, *Burlingtonia*, *Gomezia*, *Notylia*, *Rodriguesia* y *Stigmatostalis* (Silva y Lima, 1984).

Aunque en la mayoría de las plantas con flores el ovario madura durante el desarrollo de la flor y los óvulos están completamente formados antes de la polinización, y listos para ser fertilizados por lo general poco después de la polinización (Yu y Goh, 2001; Tsai *et al.*, 2008), en muchas otras flores la polinización regula un síndrome de respuestas que contribuye a la reproducción sexual satisfactoria en plantas superiores (O'Neill, 1997).

En las orquídeas durante la floración o antesis, el ovario es inmaduro y carece de óvulos, la placentación se encuentra en forma de ancla y las células muy juntas dejando poco espacio en la parte central del ovario (Zhang y O'Neill,

1993), y el desarrollo del óvulo se inicia después de la polinización exitosa (Yeung y Sandra, 1997).

En estudios realizados en *Orchis champagneuxii*, *Orchis mascula*, *Orchis olbiensis*, *Orchis spitzelli*, *Ophrys fusca*, *Ophrys lutea*, *Ophrys tenthredinifera* y *Ophrys scolopax* reportaron que el ovario se alberga en el pedúnculo floral, es tricarpelar sincárpico unilocular, con placentación parietal (Fig.3) y contiene numerosos primordios seminales (Pulido et al., 2000).

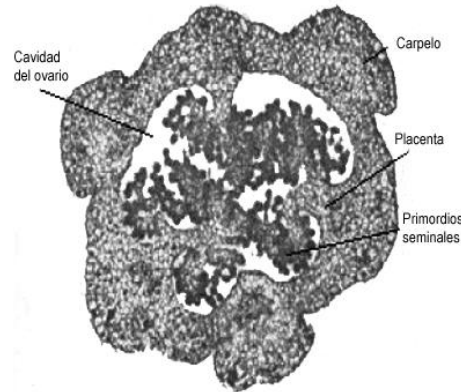


Figura. 3: Sección transversal del ovario de *Orchis lutea*. Modificada de Pulido et al., 2000.

3.5 Síndrome de post-polinización en la familia Orchidaceae

Se ha reportado que el desarrollo del óvulo se desencadena después de la polinización (Zhang y O'Neill, 1993; Yu y Goh, 2001), la polinización induce la diferenciación del óvulo, el crecimiento, el desarrollo y la formación de saco embrionario en preparación para la llegada del crecimiento del tubo polínico y la fertilización (Zhang y O'Neill, 1993), provocando la pérdida de órganos florales que han terminado su función en la dispersión de polen y la recepción (O'Neill, 1997), a esto se le denomina síndrome de post - polinización (Arditti, 1979; Zhang y O'Neill, 1993) y se puede iniciar con polen viable o inviable, aunque el efecto del mismo puede disminuir (Arditti, 1979). Los procesos que lo componen es la senescencia del perianto y abscisión de órganos florales, cambios en la pigmentación, la maduración del ovario, desarrollo y diferenciación del óvulo y gametofito (Zhang y O'Neill, 1993; O'Neill, 1997) pero el efecto más significativo es la formación del óvulo (Arditti, 1979) previo a la fertilización (O'Neill, 1997).

Los signos de polinización exitosa es la senescencia del perianto que es el rápido marchitamiento de sépalos y pétalos, pérdida de pigmento para que los recursos se redirijan hacia el desarrollo de los óvulos y la posterior embriogénesis después de la fecundación (Yu y Goh, 2001), otro es la ampliación de la columna (ginostemo) (Swamy, 1942). Esto hace a las orquídeas sistemas atractivos para la investigación de la iniciación del óvulo y su posterior desarrollo (Yu y Goh, 2001).

Peter y Johnson (2009) observaron en *Acrolophia cochlearis* que después de haber sido removidos los polinios, los pétalos y sépalos se cerraron alrededor de la columna y el labelo se plegó, se puso rígido y cambio de un color blanco o crema a un color amarillo-cremoso oscuro y los sépalos y pétalos se tornaron cafés. Por otro lado algunas especies de *Phalaenopsis* los sépalos y los pétalos se tornan verdes y fotosintéticos después de la polinización, para proporcionar fotosintatos durante un período prolongado de muchos meses hasta que la cápsula este madura (Yu y Goh, 2001).

Pero la regulación del desarrollo del megagametofito por la polinización no se limita a las orquídeas ya que es una característica de reproducción de plantas superiores (O'Neill, 1997). El megagametofito, también conocido como gametofito femenino o saco embrionario tiene una posición central en el óvulo (Vázquez, 2013). En muchas especies el desarrollo del megagametofito se completa por la polinización, en *Prunus dulcis* (almendra) el desarrollo del óvulo está detenido en la etapa del megasporocito antes de la antesis y se completa sólo después de la polinización (Pimienta y Polito, 1983).

La regulación de la megasporogenesis y megagametogénesis de las orquídeas por la polinización se relaciona con su ecología reproductiva, ya que existe una baja probabilidad de que la polinización se lleve a cabo debido a que los polinizadores son altamente específicos, por lo cual la longevidad de las flores de orquídeas fue una adaptación para aumentar la probabilidad de la polinización (Tsai *et al.*, 2008); es decir, la estrategia reproductiva de las orquídeas consiste en desarrollar el megagametofito después de la polinización, cuando está casi asegurada la fertilización (O'Neill, 1997; Tsai *et al.*, 2008), maximizando el número de frutos producidos (Cozzolino y Widmer, 2005).

En las orquídeas se encuentran tres diferentes estrategias reproductivas:

En ovarios no polinizados los óvulos están completamente ausentes y su desarrollo se desencadena por la polinización como: *Cattleya*, *Sophranitis*, *Epidendron*, *Laelia*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Doritis* (O'Neill, 1997; Tsai *et al.*, 2008).

Antes de la polinización se encuentran primordios de óvulos pero permanecen suspendidos en una etapa premeiótica hasta que la polinización provoca un mayor desarrollo del óvulo como en: *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Herminium*, *Epipactis*, *Platanthera* (O'Neill, 1997; Tsai *et al.*, 2008), *Comperia comperiana*, *Dactylorhiza incarnata*, *Dactylorhiza romana*, *Ophrys mammosa ssp. mammosa*, *O. scolopax ssp. cornuta*, *Orchis coriophora*, *O. picta*, *O. provincialis*, *O. simia*, *O. tridentata*, *Platanthera bifolia*, *Platanthera chlorantha* y *Steveniella satyrioides*. (Nazarov y Gerlach, 1997).

Aquellas que poseen óvulos que están listos para la fertilización en el momento de la antesis, en *Epipogium aphyllum*, *Hetaeria shikokiana* (Tsai *et al.*, 2008) y *Epipogium roseum* (Govindappa y Karanth, 1981)

El desarrollo del óvulo es indispensable con el fin de comprender la información sobre los procesos reproductivos, las orquídeas al no tener los óvulos totalmente desarrollados sino rudimentarios hasta el éxito de la polinización, proporciona una oportunidad para estudiar los eventos de desarrollo del óvulo y el saco embrionario (Yeung y Sandra, 1997).

3.6 Generalidades del desarrollo del óvulo y sus características en la familia Orchidaceae

Los óvulos que se desarrollan dentro del ovario están formados por: conjunto de megasporangios (nucela) cubiertas con uno o dos tegumentos y el funículo que lo une a la placenta (Johri *et al.*, 1992; Reiser y Fischer, 1993; Vázquez, 2013;) se originan a partir de la megaspora funcional (megasporogénesis) hasta la formación del saco embrionario (megagametogénesis), donde posteriormente se lleva a cabo la fertilización y la

embriogénesis (Reiser y Fischer, 1993). El desarrollo de los óvulos inicia como una protuberancia en la placenta y se distinguen tres elementos: una región proximal (funículo), una central (calaza) y una distal (nucela) (Vázquez, 2013). Una célula nucelar subdérmica se agranda, muestra un núcleo prominente, esta célula se le denomina arqueospora (Johri *et al.*, 1992; Reiser y Fischer, 1993), la arqueospora puede funcionar directamente como megaspora o también llamada célula madre de la megaspora o puede someterse a una división mitótica para producir dos células de diferente tamaño, una megaspora y una célula parietal o célula somática (Reiser y Fischer, 1993; Vázquez, 2013). Esta diferencia en la formación de la célula madre de la megaspora se debe por la presencia (crasinucelados) u ausencia (tenuinucelados) de nucela en el óvulo (Vázquez, 2013).

Los tegumentos se inician en la base de la nucela durante la megasporogénesis (Reiser y Fischer, 1993) como un anillo alrededor de la calaza (Vázquez, 2013). En óvulos bitégmicos surgen independientemente (Johri *et al.*, 1992), el tegumento interno es dérmico en origen mientras que el tegumento externo se deriva tanto de la dermis y estratos subdérmicas (Reiser y Fischer, 1993).

La megasporogénesis termina cuando la célula madre de la megaspora sufre meiosis y se producen cuatro megasporas. Durante la megagametogénesis se desarrolla el saco embrionario maduro mediante divisiones posteriores de meiosis, la migración nuclear y la citocinesis, existen diversas vías de desarrollo del saco embrionario por variaciones en estos procesos (Reiser y Fischer, 1993). Un saco embrionario maduro usualmente presenta un aparato del huevo (una célula huevo y dos sinérgidas), tres células o núcleos antipodales y dos núcleos polares, y dependiendo del número de núcleos que tomen parte en la formación del saco embrionario se designa como mono, bi y tetra nucleado (Johri *et al.*, 1992).

Aunque en la mayoría de las orquídeas la megasporogénesis se inicia tan pronto como la polinización ha tenido lugar (Fredrikson, 1991), existen especies como *Epipogium roseum* en la cual la proliferación de la placenta y la formación de

los óvulos se producen antes de la antesis (Govindappa y Karanth, 1981), o como en *Spathoglottis* que los primordios del óvulo se organizan después de la antesis, la fertilización no sigue inmediatamente a la polinización la cual puede ocurrir días o semanas después, los frutos se desarrollan lentamente y puede tomar un año o más para madurar (Fig. 4) (Arditti, 1992).

El desarrollo del óvulo empieza a la semana después de la polinización en *Catleya* y en *Geodorum citrinum*, dos semanas después en *Dendrobium* y *Doritis pulcherrima*, cuatro semanas en *Arachnis hookeriana* (Arditti, 1992).

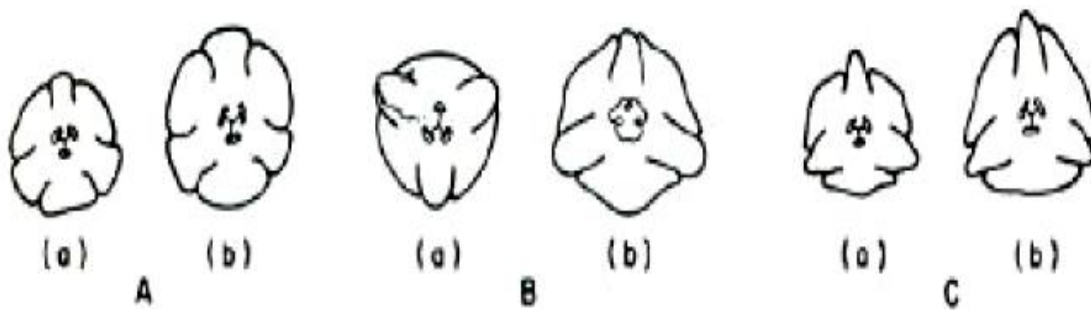


Figura. 4: Desarrollo de ovario: **A.** *Arachnanthe sulingi* (a) sin polinizar; (b) siete días después de la polinización. **B.** *Rhynchosstylis retusa* (a) sin polinizar; (b) siete días después de la polinización. **C** *Aerides odoratum* (a) sin polinizar; (b) siete días después de la polinización (Tomado de Arditti, 1992) (Tomado de Arditti, 1979)

Los primeros eventos en *Phalaenopsis* son las divisiones celulares en la región meristemática de las crestas de la placenta que comienzan poco después de la polinización (Nadeau *et al.*, 1996), en *Catleya* y *Arachnis hookeriana* el crecimiento de la placenta es masivo, con sus extremos planos o líneas en forma de flecha (Arditti, 1992).

En la mayoría de las orquídeas, el ovario contiene tres crestas placentarias en el momento de la maduración del polen y polinización, la auxina presente en el polen causa que masas de células en los bordes placentarios empiecen su proliferación, esta proliferación inicia en la formación de filas filamentosas que consisten en 5 a 7 células delimitadas por una epidermis (Arditti, 1992).

En *Dendrobium* y *Epidendrum ibaguense* durante la antesis estas tres crestas de la placenta se encuentran orientadas longitudinalmente y tienen los bordes de cada cresta ondulada, cubiertas por un estrato de células formando la epidermis; posterior a la polinización empieza haber actividades mitóticas dando

como resultado la formación de un sistema de ramificación dicotómica (Sagawa e Israel, 1964; Yeung y Sandra, 1997).

La punta de cada cresta en *Epidendrum ibaguense* se compone de cinco a 55 células nucleares cubiertas por la proto-epidermis (Yeung y Sandra, 1997). En *Phalaenopsis* se alargan dicotómicamente varias veces en el lapso de 4 semanas y forman miles de primordios de óvulo en forma de dedo (Nadeau *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 2008). En *Dendrobium* a los 2 días después de la polinización (DDP) las células de la placenta comienzan a dividirse y dar lugar a un sistema de excrecencias dicotómica ramificados, a los 35 DDP estas las crestas se han diferenciado en un grupo de células densas organizados en una columna central de varias células nucleares rodeadas por un solo estrato de la epidermis (Sagawa e Israel, 1964).

A los dos días después de la polinización (DDP), los óvulos permanecen indiferenciados en *Vanilla planifolia* y únicamente se observa un gran número de funículos que constituyen la placenta (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010), mientras que en *Phalaenopsis* a los dos días de la polinización ya se encuentran miles de primordios de óvulo (Tsai *et al.*, 2008).

En *Cypripedium cordigerum* los primordios de óvulo surgen de la placenta parietal y cada primordio ovular consta de una fila axial de cinco u ocho células rodeadas por una epidermis (Sood y Mohana Rao, 1986). En *Dendrobium* a los 35 a 40 DDP los primordios ovulares se observan como una columna central de varias células nucleares rodeadas por un solo estrato de la epidermis (Sagawa e Israel, 1964). En *Spinthlottis aurea* estas son de una longitud de 10 a 12 células y tres células de ancho, la célula apical de estas filas se convierte en la célula arquesporial, una excepción a esto es en *Oncidium praetextum* donde una célula de la epidermis se convierte en la célula arquesporial (Arditti, 1992).

La célula terminal que se encuentra justo debajo de la epidermis de cada columna nuclear de la placenta se comienza a ampliar para formar la célula arquesporial en *Cymbidium bicolor* (Swamy, 1942), *Dendrobium* (Sagawa e Israel, 1964), *Cypripedium cordigerum* (Sood y Mohana Rao, 1986), *Platanthera bifolia*

(Fredrikson, 1991), *Phalaenopsis* (Zhang y O'Neill, 1993) y *Paphiopedilum delenatii* (Lee y Yeung, 2012).

La célula arquesporial se agranda en una célula de mayor tamaño para funcionar directamente como célula madre megaspora (Sagawa e Israel, 1964; Sood y Mohana Rao; 1986; Nadeau *et al.*, 1996; Zhang y O'Neill, 1993, Tsai *et al.*, 2008 y Lee y Yeung, 2012). La célula madre de la megaspora puede ser reconocida en los ovarios de orquídeas después de la polinización, pero su desarrollo ocurre únicamente después de la deposición del polen. Su desarrollo consiste en una serie de divisiones que resultan en el desarrollo del saco embrionario (Arditti, 1992).

En *Scilla autumnalis* se reportó que el óvulo es anátropo, bitegumentado y crasinucleado, y que los tegumentos consisten en dos estratos de células (Batygina *et al.*, 2003).

Trabajos realizados por Shamrov y Anisimova, (2003) en *Gentiana cruciata*, *Gymnadenia conopsea* y *Luzula pedemontana* encontraron que estas especies tienen un gineceo del tipo paracarpico y óvulos anátropos pero que difieren en la estructura y la distribución, mientras *G. cruciata* presenta dos carpelos, *G. conopsea* y *L. pedemontana* tienen tres carpelos. Durante el desarrollo de los óvulos y semillas en *G. cruciata* se distinguieron ocho diferentes etapas y en *G. conopsea* y *L. pedemontana* 11 etapas.

3.7 Generalidades del desarrollo del saco embrionario y sus características en la familia Orchidaceae

El primer paso en la formación del saco embrionario es la división de la célula madre de la megaspora, lo que produce una diada de células haploides, algunas veces la célula madre de la megaspora se alarga de 4 a 5 veces después de dividirse. Una de esas células resultantes, la célula micropilar es usualmente menor y se desintegra poco después de haber sido formada.

Durante la primera división meiótica para formar dos células hijas en *Dendrobium* (Sagawa e Israel, 1964), *Phalaenopsis* (Zhang y O'Neill, 1993) y

Paphiopedilum delenatii (Lee y Yeung, 2012) la diada de la región micropilar no se va a dividir más y degenera en una masa como mancha oscura, la célula de la diada de la región calazal se somete a la segunda división meiótica dando lugar a la formación de dos megasporas, en aquellas especies que tienen un patrón de saco embrionario bispórico se mantendrán, mientras que la megáspora de la zona calazal es más grande que la micropilar que degenera. En *Cypripedium cordigerum*, durante la segunda división meiótica no va a tener citocinesis resultando en una primera megaspóra binucleada (Sood y Mohana Rao, 1986) y en *Platanthera bifolia* la primera división meiótica va a dar lugar a la diada hasta formar cuatro megasporas, la más inferior de la tétrada es la megaspóra funcional y las otras tres degeneran (Fredrikson, 1991). Las tétradas de la megaspora son lineales o en forma de T, a veces forman tríadas de la megaspora en lugar de tétradas (Batygina *et al.*, 2003).

La megagametogénesis comienza cuando el núcleo de la megaspóra se divide y dependiendo del tipo de saco que la especie desarrolle serán los caminos que cada uno tomará. En *Cymbidium bicolor* (Swamy, 1942), *Cypripedium cordigerum* (Sood y Mohana Rao, 1986) y *Paphiopedilum delenatii* (Lee y Yeung, 2012), presentan un desarrollo bispórico tipo *Allium* la diada funcional se alarga y posteriormente se somete a la segunda división meiótica formando un saco embrionario binucleado, el cual sufre una segunda división resultando en la formación de un saco embrionario tetranucleado, los núcleos del micrópilo del saco embrionario tetranuclear, se dividieron y produjeron un saco embrionario de seis núcleos. Para *Dendrobium* (Sagawa e Israel, 1964), *Platanthera bifolia* (Fredrikson, 1991) y *Phalaenopsis* (Nadeau *et al.*, 1996) que presentan un saco monospórico del tipo *Polygonum* de 8 núcleos, la etapa de saco embrionario uninnucleado es prolongado, pero luego la megaspóra calazal se amplía y divide sucesivamente 3 veces para formar un saco embrionario octanucleado, formando las etapas bi y tetra nucleadas al mismo tiempo que las vacuolas se fusionan para formar una única gran vacuola en la parte central del saco embrionario, las tres megasporas que degeneraron son visibles como estructuras densas en el extremo

micropilar del saco embrionario, las características generales del desarrollo de estas especies se observan en el cuadro 1

Después de la formación de los primordios de óvulo el integumento interno aparece como un crecimiento semejante a un collar alrededor de la punta de los primordios y el tegumento exterior se inicia poco después, esto se ha reportado en *Cypripedium cordigerum* (Sood y Mohana Rao, 1986), *Phalaenopsis* (Zhang y O'Neill, 1993; Nadeau *et al.*, 1996 y Tsai *et al.*, 2008). El tegumento interno forma el micrópilo. El tegumento exterior rodea al saco embrionario, al tegumento interno y toma parte en la formación del micrópilo (Fredrikson, 1991).

En *Vanilla planifolia* el tegumento exterior se compone de cuatro estratos de células y hasta ocho en su base. Esta característica difiere de las otras orquídeas, cuyo tegumento interno está formado por un solo estrato de células. El tegumento interior y el exterior del integumento del óvulo no se fusionan y existe una brecha entre los dos (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010).

En *Platanthera bifolia* una o ambas sinérgidas a veces parecen degenerar cuando el tubo polínico entra en el saco embrionario, los núcleos de las antípodas son pequeñas y persisten hasta un estado tetracelular del embrión (Fredrikson, 1991).

La nucela muestra un desarrollo considerable en *Vanilla planifolia* en relación con otras orquídeas, el cual se digiere rápidamente a partir de las primeras divisiones del cigoto (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010).

Debido a la duración prolongada de las primeras etapas de desarrollo en el ovario de *Dendrobium*, Sagawa e Israel (1964) establecieron cinco etapas: en reposo, proliferativa, nucelar, arqueosporial y fases meióticas.

Se ha reportado que el tiempo transcurrido entre la polinización y la fertilización definitiva en diferentes especies de orquídeas es muy variable 7-130 días (Duncan y Curtis, 1942), lo que refleja el tiempo requerido para la formación de los óvulos y de los sacos embrionarios maduros. En *Phalaenopsis* el tiempo transcurrido entre la polinización y la maduración del óvulo y la fecundación final es aproximadamente 80 días (Zhang y O'Neill, 1993), en *P. delenatii* es de 50 días (Lee y Yeung, 2012) mientras que en *P. bifolia* es de 21 días (Fredrikson, 1991)

En *Cypripedioideae* el desarrollo del saco embrionario es del tipo *Allium*, en *Orchidoideae* es del tipo *Polygonum*. El saco embrionario bisporico se ha reportado en los taxones primitivos así como en las especies de *Neottiae* y *Epipogiae* (Batygina *et al.*, 2003).

Especie	Tipo óvulo	Tiempo de formación de la semilla (DDP)	Tipo de saco embrionario	Patrón del saco embrionario	Referencia
<i>Cymbidium bicolor</i> Lindl.	Ortótropo	60	Bispórico. 8 y 6 núcleos. Los núcleos de las antípodas se suprimen.	<i>Allium</i>	(Swamy, 1942)
<i>Dendrobium</i>	Anátropo	210	Monospórico. 8 núcleos.	<i>Polygonum</i> .	(Sagawa e Israel, 1964). (Herbert y Sagawa, 1964)
<i>Epipogium roseum</i> (D. Don) Lindl	Anátropo	Antesis	Bispórico. 4 y 5 núcleos Existe reducción.	<i>Apinagia</i>	Govindappa y Karanth, 1981)
<i>Cypripedium cordigerum</i> D. Don.	Anátropo	Antesis	Bispórico. 6 núcleos. Existe reducción.	<i>Allium</i>	(Sood y Mahana Rao, 1986)
<i>Platantera bifolia</i> (L.) Rich.	---	21	Monospórico. 4 y 8 núcleos.	<i>Polygonum</i> .	(Fredrikson, 1991)
<i>Phalaenopsis</i>	Anátropo	56 85	Monospórico. 8 núcleos.	<i>Polygonum</i> .	(Zhang y O'Neill, 1993). (Nadeau et al., 1996) (Tsai, 2008).
<i>Vainilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews	Anátropo	105	---	---	(Lapeyre-Montes et al., 2010).
<i>Paphiopedilum delatanii</i> Guillaumin	Anátropo	50	Bispórico. 6 núcleos.	<i>Allium</i>	(Lee y Yeung, 2012)

Cuadro 1. Generalidades del desarrollo del saco embrionario en ocho diferentes especies de orquídeas. DDP = días después de la polinización

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Laelia gouldiana* es una especie catalogada como probablemente extinta en el medio silvestre por la NOM-059-SEMARNAT-2010 y se tiene registrado que no produce semillas viables, es importante comprender la biología reproductiva de esta especie, a través de la caracterización morfohistológica del gineceo, y estudio del desarrollo de los óvulos por medio de las técnicas histológicas. De esta manera, se pretende contribuir al conocimiento biológico del género así como de la especie para proponer estrategias adecuadas de propagación y conservación de la misma.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Contribuir al conocimiento de la familia Orchidaceae y en particular al género *Laelia*, realizando la descripción y análisis morfohistológico del desarrollo del gineceo antes y después de la polinización cruzada en *Laelia gouldiana*.

5.2 Particulares:

Describir el desarrollo morfológico e histológico del síndrome de post-polinización en las flores de *Laelia gouldiana* (Orchidaceae).

Analizar histológicamente el desarrollo del ovario en *Laelia gouldiana* (Orchidaceae) antes y después de su polinización.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó en la comunidad de El Veladero (Fig. 5), municipio de San Agustín Metzquititlán Hidalgo, México. Se realizaron visitas periódicas cada quince días del 1° de septiembre de 2013 al 19 de marzo de 2014, previo a la floración, durante la antesis y posteriormente de realizada la polinización

Se ubicaron 13 diferentes árboles de mezquite y se etiquetaron las plantas que presentaban un escapo floral en desarrollo. A lo largo de las visitas se recolectaron escapos florales en etapas tempranas sin haberse diferenciado, en botón, así como aquellos que ya se encontraban diferenciados. Durante la floración se realizó la polinización cruzada y se recolectaron las flores aproximadamente cada 15 días hasta el desarrollo de la cápsula.



Figura. 5 Plantas de *Laelia gouldiana* (flecha) creciendo en árboles de *Quercus* en los traspatios de la comunidad de El Veladero, Municipio de San Agustín Metzquititlán, Hidalgo, México.

©Alejandra Pardo Zígler. 2013.

6.1 Recolecta de botones

Se realizó una recolecta de escapos sin diferenciar en botón el día 19 de septiembre de 2013 y el 17 de octubre escapos con botones de diferentes tamaños. Con la ayuda de una tijera de podar se cortaron lo más cerca de la base, se colocaron en bolsas de papel estraza y se etiquetaron.

En el laboratorio con una regla y un vernier se midió a cada botón desde donde inicia la bráctea hasta el extremo apical del botón, así como el ancho del mismo en la parte media. A los botones ya diferenciados se les eliminó el perianto para medir el largo del ovario, que se consideró desde la base del pedúnculo hasta el extremo distal de la columna y su ancho en la parte más gruesa del ovario.

6.2 Polinización cruzada

Debido al desarrollo asincrónico de las flores se realizaron polinizaciones cruzadas en diferentes fechas, la primera el 31 de octubre de 2013 y la segunda el 20 de noviembre de 2013.

Para ello se recolectaron los polinios de una flor en anthesis con ayuda de unas pinzas y se colocaron en cajas Petri con una ligera capa de agua destilada para transportarlos a otra planta lo más alejada posible. Uno o dos polinios se depositaron en la superficie estigmática de la flor en anthesis de otro individuo con auxilio de las pinzas. La flor polinizada se etiquetó y se cubrió con una gasa (Fig. 6).



Figura. 6 Flores de *Laelia gouldiana* cubiertas con gasas después de haber sido polinizadas.
©Yuritzi Aracely Vargas Aguirre, 2013.

Posteriormente en el laboratorio con la ayuda de una regla y un vernier se midió a cada flor: desde la base del ovario hasta el extremo distal del perianto lo que se consideró como largo total; de la parte basal del pedúnculo hasta la parte basal del perianto definiéndola como largo del ovario, la parte más gruesa del

ovario se consideró como el ancho del ovario, de la parte basal del perianto a la zona apical de la columna fue el largo de columna, y en la parte media de esta el ancho.

Se consideró como tiempo cero la antesis y posteriormente el número de días después de la polinización (DDP), se realizó la recolecta con auxilio de una tijera de podar a los 19, 40, 50, 62, 71, 89, 119 y 140 DDP, de aquellas flores que presentaron síndrome de post-polinización. Las muestras se colocaron en bolsas de papel estraza y se etiquetaron.

6.3 Técnica histológica

Para permitir que el fijador penetrara adecuadamente en los tejidos, a los botones florales y a las flores se les eliminó el pedúnculo (P), las brácteas (Br), los pétalos y sépalos (P) para dejar descubierta la columna (Co) y el ovario (O) (Fig.7).

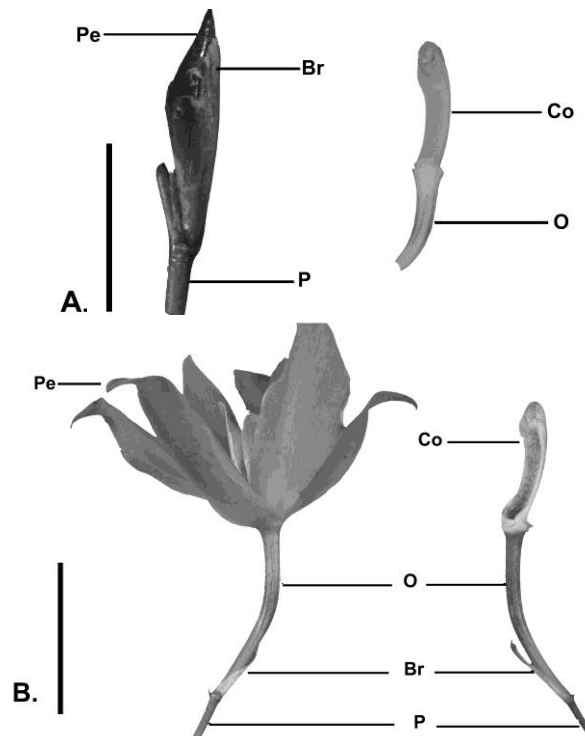


Figura. 7: A. Botón y B. flore de *L. gouldiana* desprovistos de la Bráctea (Br) perianto (A) dejando descubierta la columna (Co) y al ovario (O) Escala= 20 mm ©Alejandra Pardo Zigler, 2013.

Las muestras se etiquetaron y fijaron con Navashin donde permanecieron 24 horas. Posteriormente se enjuagaron en agua y se pusieron en alcohol al 70% para su preservación.

Las muestras se deshidrataron en alcohol terbutílico (TBA) de forma gradual: 35%, 50%, 60%, 70%, 85%, 95%, 100% durante 12 hrs cada uno y tres cambios en alcohol TBA 100% por 12 horas cada uno. En el último cambio se dejó menos de una cuarta parte y se anexaron cinco escamas de Paraplast® Plus cada 30 min hasta doblar el volumen inicial de TBA. Una vez duplicado el volumen y para su infiltración permanecieron durante 24 horas en los frascos dentro de una estufa a 58-69°C. Posteriormente se desechó la solución de TBA y Paraplast® Plus para agregar Paraplast® Plus puro durante 24 horas dentro de una estufa a 58-60°C. Para las muestras con 89, 119 y 140 DDP se aumentó el tiempo a 24 horas en la deshidratación y 48 horas en la infiltración e inclusión en Paraplast.

Para su inclusión las muestras se colocaron en bloques de papel y se rellenaron con Paraplast® Plus puro dando la orientación deseada. Se colocaron en refrigeración hasta su solidificación (mínimo 24 horas). Se realizaron cortes secuenciales de diez μm en un micrótomo de rotación. Las secciones obtenidas se montaron en portaobjetos.

Se realizó la técnica dicrómica safranina-verde rápido (S-VR) para observar núcleos y divisiones mitóticas. Para desparafinar los cortes se introdujeron en la estufa durante 30 minutos a una temperatura de 65°C, posteriormente se sumergieron en xilol puro, xilol-alcohol y alcohol absoluto durante 30 min cada uno. Seguido se hidrataron en una serie gradual de alcoholes etílico del 100%, 96%, 70%, 50% y 30% durante 15 minutos cada uno y se introdujeron las muestras en la solución de safranina donde permanecieron 24 horas. A continuación se les eliminó el exceso de colorante con agua destilada y se dejaron secar durante 24 horas.

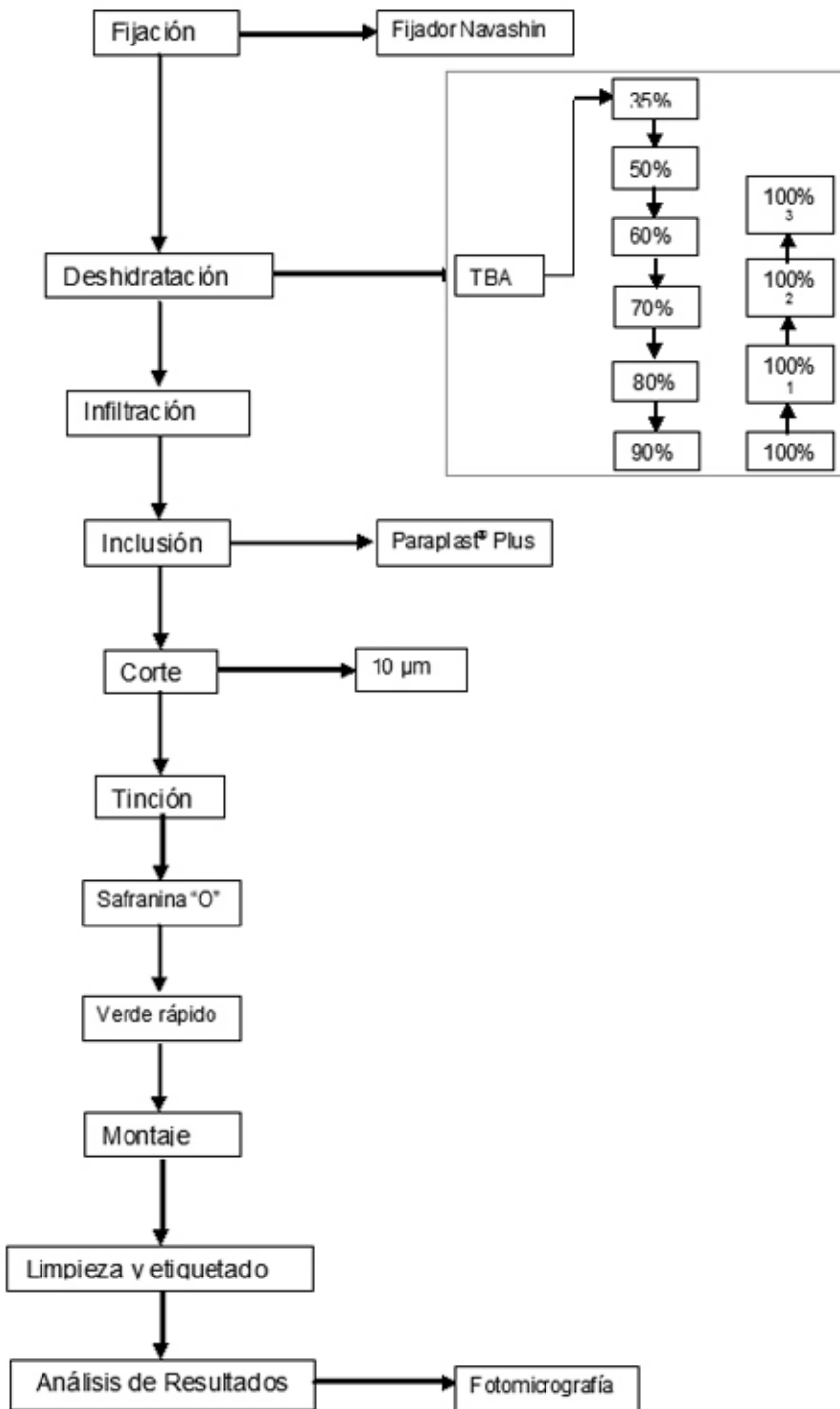
Previo a la tinción con verde rápido se deshidrataron las muestras en una serie alcohólica al 30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%, dos minutos cada uno, se aplicó el verde rápido y con un enjuague de alcohol al 100% se eliminó el exceso

de colorante, se agregó una gota de aceite de clavo durante 10 minutos y una gota de xilol para deshidratar completamente las muestras.

Las mejores preparaciones se montaron en resina sintética diluida al 60% con xilol, se etiquetaron con los siguientes datos: Nombre de la especie, Familia, estructura y sección, técnica de tinción, nombre de quién elabora y fecha y se realizó la interpretación de las mismas.

Se realizó la toma de fotomicrofotografías en un microscopio de luz Carl Zeiss Axioskope a través de técnicas de iluminación de campo claro y contraste de fase. Las imágenes seleccionadas fueron editadas con el programa Photoshop Creative Suite 5.

La metodología empleada (Sandoval *et al.*, 2005) se representa en el cuadro 2.



Cuadro 2: Diagrama de flujo con la metodología empleada para el procesamiento histológico de las diferentes muestras recolectadas de *Laelia gouldiana*.

VII. RESULTADOS y DISCUSIÓN

7.1 Recolecta de botones

A lo largo de las visitas se realizaron recolectas de los escapos florales en diferentes etapas de su desarrollo, para lo cual se agruparon en etapas para su descripción.

Se recolectaron dos escapos florales en etapas iniciales de su desarrollo, por lo compacto del botón y sin desarrollo aún del perianto éste no se eliminó, se registró el largo total del ovario fue de 20.7 en promedio (Fig. 8). Los botones estaban cubiertos por la bráctea que era de color verde y el pedúnculo presentaba una coloración verde - café. En esta etapa de desarrollo no es posible determinar el número de botones que conforman los escapos.

Al desarrollarse los escapos y separarse los botones florales estos tenían diferentes tamaños, en esta etapa de desarrollo se recolectaron dos escapos que tenían 4 y 5 botones florales. El promedio del largo del ovario fue de 33.2 y 3.43 mm de diámetro.

Todos los botones aún mantenían la bráctea de color verde que los envuelve, y se apreciaba en la parte apical del botón la coloración magenta del perianto, el pedúnculo conservó el color café verdoso.

7.2 Polinización cruzada

De la primera polinización cruzada que se realizó, de las 26 flores polinizadas después de 21 días presentaron el síndrome de post-polinización pero

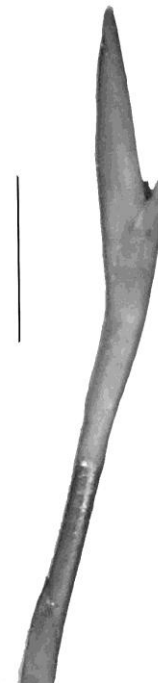


Figura 8: Botones indiferenciados de *Laelia gouldiana* en etapas tempranas de desarrollo
Escala=20 mm.

únicamente cuatro prosiguieron su desarrollo, el resto de las flores (22) se marchitaron y cayeron. A los 40 días, dos flores más se perdieron restando solamente dos, de las cuales una fue recolectada, la flor polinizada restante se dejó para que continuara su desarrollo y se recolectó a los 140 días después de polinizada lográndose desarrollar hasta la formación de la cápsula.

De las 43 flores polinizadas la segunda vez, a los 19 días 21 flores presentaban síntomas del síndrome de post-polinización de las cuales se recolectaron 4 y se dejaron las 17 restantes continuar con su desarrollo. A los 50 días solo se encontraron 7 flores de las 17 anteriores, se recolectó una en esta etapa y se dejaron las 6 restantes para subsecuentes recolectas. A los 62 días ya se observó el desarrollo de las cápsulas pero solamente permanecían tres de las seis flores polinizadas se recolectó una cápsula inmadura y las otras dos se dejaron para que siguieran desarrollándose. A los 89 días después de la polinización las dos cápsulas que se habían dejado continuaron su desarrollo, se recolecto una y se dejó la última la cual se recolecto a los 119 DDP.

A lo largo del desarrollo se observó que el ovario alcanzó un diámetro de 15.8 mm después de la polinización y posteriormente disminuye 14.0 mm cuando se da el desarrollo de la cápsula la cuál empieza a deshidratarse.

La pérdida y caída de las flores de *Laelia gouldiana* después de la polinización fue un evento recurrente, debido probablemente a un proceso de senescencia. Se tiene conocimiento que la senescencia está asociada con un incremento en la respiración, síntesis de etileno, cambios de color y la pérdida de la turgencia (Wills *et al.*, 1998 citado por Trujillo-Villagarcía *et al.*, 2006), en las flores se reduce el contenido de azúcares, de proteínas, ácidos nucleicos y se incrementa la actividad de proteasas (Breeze *et al.*, 2004 citado por Trujillo-Villagarcía *et al.*, 2006). Las flores de las orquídeas pueden mantenerse turgentes por unas semanas o meses cuando no son polinizadas, pero entran en un rápido estado de senescencia una vez polinizadas (O'Neill, 1997 citado por Attri *et al.*, 2007). Lehnebach y Riveros (2000) señalan que aparentemente la senescencia floral es estimulada por la autopolinización de las flores. En *Gomesa bifolia* la longevidad de las flores no manipuladas fue de aproximadamente tres semanas,

pero en las flores manualmente polinizadas (auto-polinización o polinización cruzada), la senescencia floral se hizo evidente un día después de la polinización (Torreta *et al.*, 2011). En *L. gouldiana* aparentemente se produce este fenómeno de senescencia lo que no permite que se lleve a cabo el subsecuente desarrollo del ovario.

7.3 Síndrome de post-polinización y desarrollo de la cápsula

El evento más importante durante el síndrome de post-polinización es el desarrollo de los óvulos (Arditti, 1979), pero existen otros procesos evidentes a simple vista, como mencionan Zhang y O'Neill (1993), que reportan la pérdida de turgencia en el perianto y la senescencia del mismo, empezando desde la parte más apical de los sépalos y pétalos, esto se observó también en *L. gouldiana* (Fig. 9).



Figura. 9. Flores de *Laelia gouldiana* en campo. Se observa pérdida de turgencia en el perianto hasta la senescencia del mismo.
©Ariadna Columba Gómez Olvera, 2013.

Durante la antesis la flor se encuentra completamente turgente, los pétalos y los sépalos totalmente abiertos, con un color magenta muy brillante; el ovario tiene un color café oscuro brillante con un diámetro promedio de 2.7 mm. La bráctea es incipiente en el pedúnculo de color beige (Fig. 10A).

A los 19 DDP, el perianto se encuentra senescente, la flor ha perdido la turgencia y su color se opacó, la bráctea se ha caído, el ovario tiene un color magenta y en la base un color beige. Su diámetro ha aumentado 3.5 mm en

promedio (Fig. 10B). En *Dendrobium* se ha reportado que entre los 2 y 4 DDP la columna aumenta su tamaño y el perianto empieza a plegarse, a los 5 DDP se ve un incremento en el ovario en su longitud y diámetro (Sagawa e Israel, 1964).

En *L. gouldiana* a los 40 DDP el perianto se ha marchitado totalmente pero conserva un color beige rosado en la zona apical y beige-verde en la base. Longitudinalmente al ovario se observan unas estrías de color verde brillante y entre ellas de color verde rosado con mayor intensidad; el ovario tiene una longitud de 39.2 mm con un diámetro en la base de 2.4 mm y en su zona más ancha de 3.2 mm (Fig. 10C).

A los 50 DDP el perianto mantiene las tonalidades anteriormente descritas, se observan manchas oscuras en la base y en la zona apical. Las líneas carpelares y de dehiscencia ya son evidentes y se muestran como estrías longitudinales. El incremento en el diámetro del ovario es evidente a simple vista y mide 4.3 mm, presenta una tonalidad entre verde-rosado siendo de mayor intensidad entre las líneas carpelares (Fig. 10D).

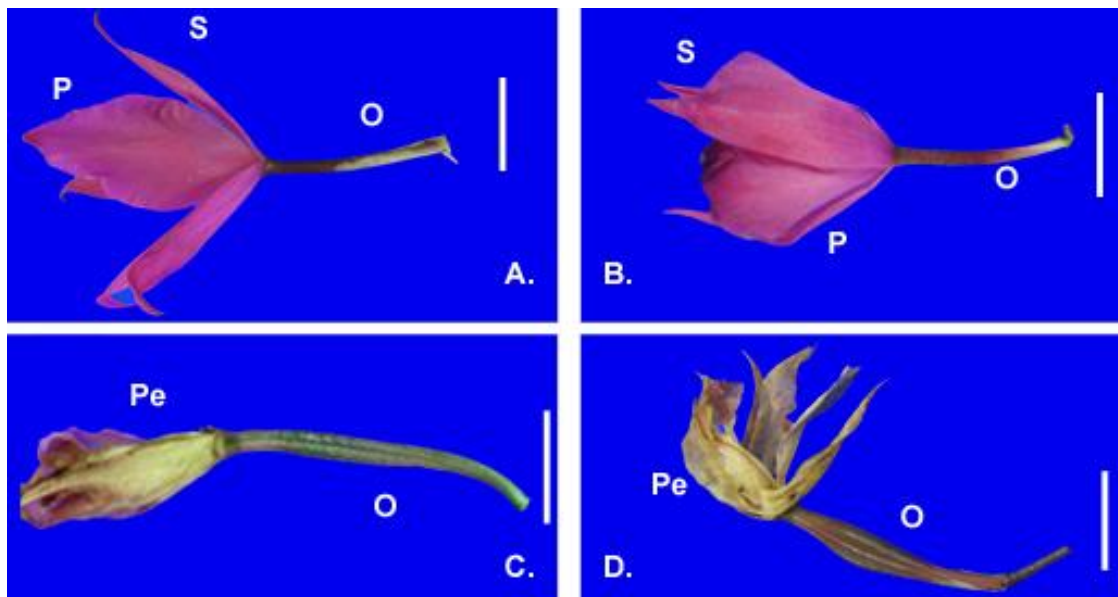


Figura 10: Proceso de formación de cápsula en *Laelia gouldiana*. A. Anthesis, B. 19 DDP, C. 40 DDP y D. 50 DDP. Escala a 20 mm. (P) pétalo, (S) sépalo, (O) ovario, (C) columna y (Pe) perianto

A los 71 DDP las manchas oscuras se han esparcido a todo el perianto. El ovario tiene un color magenta tanto en las líneas de dehiscencia como en las

líneas carpelares, y entre estas se observa un color verde claro. El diámetro ha aumentado a 5.8 mm mientras la columna se ha empezado a enrollar sobre su propio eje (Fig. 11A).

A los 83 DDP además de que el perianto tiene manchas oscuras, este se ha adelgazado y ha aumentado la tonalidad beige en él, las líneas de dehiscencia y las líneas carpelares mantienen el color magenta y un color verde entre ellas. El ovario tiene un diámetro de 5.7 mm (Fig. 11B).

A los 93 DDP el perianto se ha vuelto muy delgado, traslucido y quebradizo con un color beige verdoso. El ovario se observa en una tonalidad magenta verdosa brillante, las líneas de dehiscencia como las líneas carpelares tienen un color más oscuro que las hendiduras entre ellas que mantienen un color más verdoso. El diámetro del ovario se ha duplicado a 13.3 mm (Fig. 11C).

A los 119 DDP el ovario ha perdido turgencia, el color ha cambiado totalmente a un color amarillo – rosado en las líneas de dehiscencia y en las hendiduras amarillo, la parte basal se encuentra adelgazado y quebradizo con un color beige amarillo (Fig. 11D).

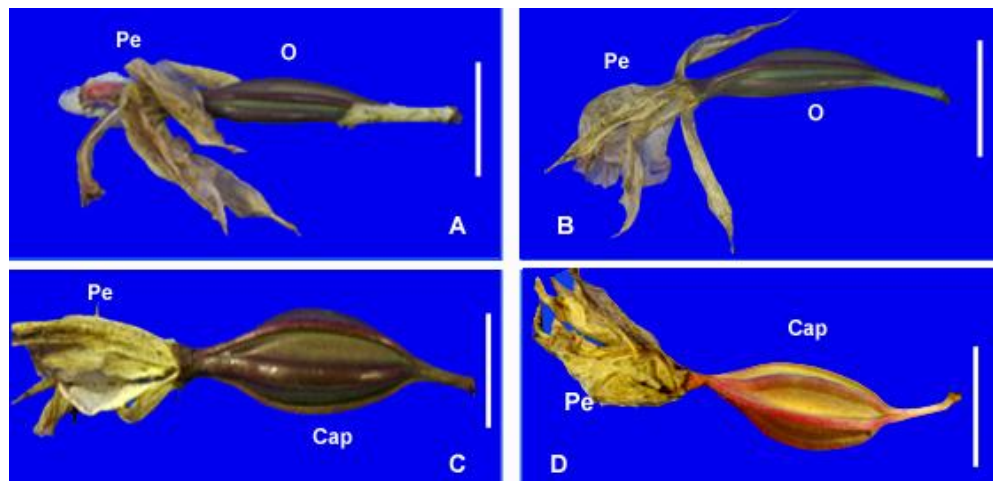


Figura 11: Proceso de formación de cápsula en *Laelia gouldiana*. A. 71 DDP, B. 83 DDP, C. 93 DDP, y D. 119 DDP. Escala a 20 mm. (Pe) perianto, (O) ovario y (Cap) Cápsula.

A los 140 DDP se ha desarrollado en su totalidad la cápsula, el perianto tiene una tonalidad café con partes beige, el ovario perdió la turgencia y se

observa seco con un color más rosado, las líneas de dehiscencia se empiezan abrir por si solas, el diámetro que tiene es de 14 mm (Fig. 12).

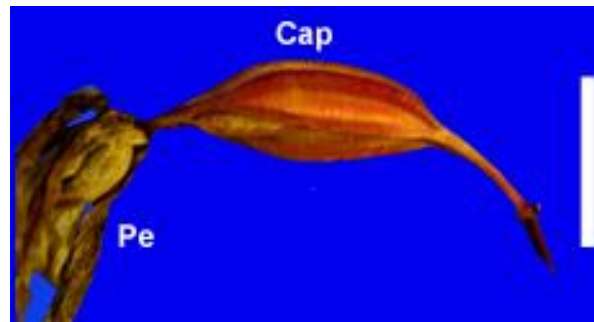


Figura 12: Cápsula de *Laelia gouldiana* a los 140 DDP. Escala a 20 mm. (Pe) perianto y (Cap) Cápsula.

De manera general se reporta que el desarrollo de la cápsula en algunas especies de orquídeas como en *Dendrobium* donde requiere de 210 DDP, *Phalaenopsis* 80 días (Zhang y O'Neill, 1993), *P. delenatii* 50 días (Lee y Yeung, 2012), *Laelia anceps* 150 días DDP, *Laelia speciosa* y *L. superbiens* es de 10-12 meses, en *L. eyermaniana* es de 7-8 meses. podrías y para el género *Cattleya* 335 días (Téllez, 2011). En el caso de *L. gouldiana* el tiempo que requiere para desarrollar la cápsula es muy similar al de *L. anceps*, lo que podría considerarse como una característica del género.

7.4 Análisis histológico

Las primeras observaciones confirmaron que el tamaño de los botones florales no refleja el estado de maduración del ovario, las secciones analizadas se agruparon de acuerdo al desarrollo de la parte central del ovario en siete diferentes etapas sin considerar el tamaño que cada una de las muestras tenía.

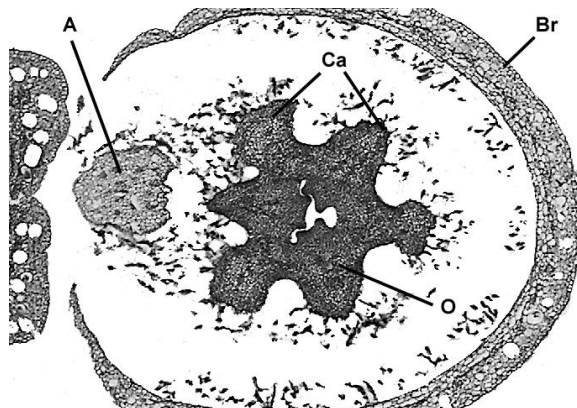


Figura 13: Sección transversal de un botón indiferenciado donde se observa al androceo (A) y al ovario (O) envueltos por la bráctea (Br). Se observan las seis crestas exteriores (Ca) que forman al ovario. 5X

Etapa 1

Se observa el botón floral en etapas tempranas, cuando aún no se diferencia el número de botones que va a desarrollar el escapo floral.

El corte transversal de ovario de *Laelia gouldiana* se realizó a un nivel de $\frac{3}{4}$ de la base del botón floral. Se observan envolviendo al androceo (A) y al ovario (O) la bráctea (Br) (Fig. 13). El ovario está compuesto de seis crestas externas (Ca) (Fig. 13), la epidermis presenta numerosas divisiones anticlinales y periclinales; al igual que tricomas (Tr) formados por una o cuatro células (Fig. 14).

Arditti (1992) observó tricomas en los ovarios de varias especies de orquídeas y menciona que pueden ser de varios tamaños y formas.

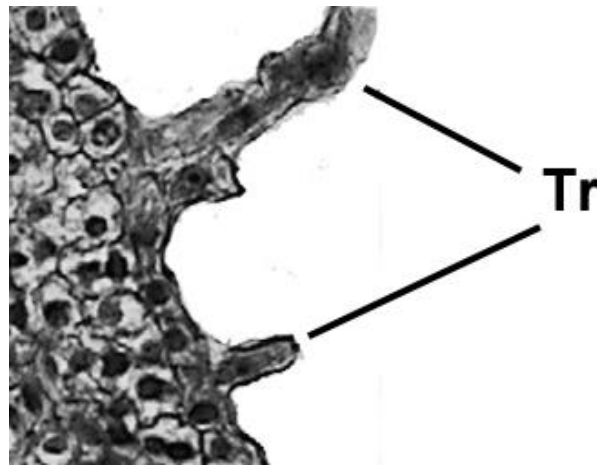


Figura 14: Detalle de la epidermis de un sección transversal de botón indiferenciado de *L. gouldiana* donde se observa los tricomas (Tr) en ella.
40X

El ovario está compuesto de seis crestas externas, tres en forma globular y tres en forma piramidal que se distribuyen alternadamente, presentan en su parte media incipientes haces vasculares y tres puntos de diferenciación vascular, siendo el xilema el que primero se observa mientras que el floema apenas es visible. En la parte central se observa la cavidad ovárica (lóculo) sin presencia de septos, en el lumen se observan seis protuberancias que muestran en su extremo apical células indiferenciadas con gran actividad mitótica, con núcleos grandes y citoplasma denso que indican zonas meristemáticas (Am) (Fig. 15). En *Phalaenopsis* se ha reportado que estas zonas posteriormente darán lugar al desarrollo de la placenta (Zhang y O'Neill, 1993).

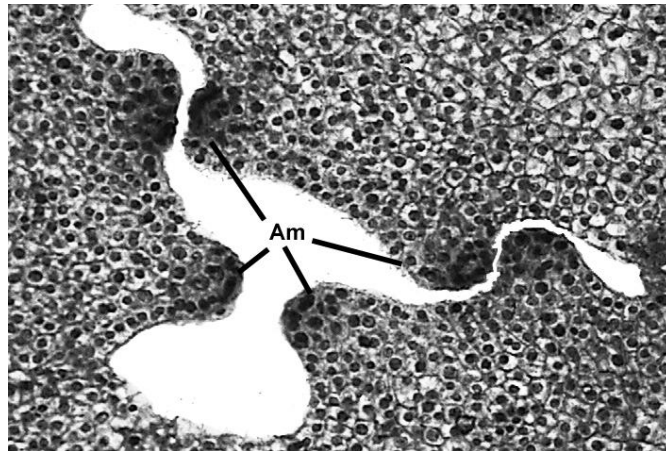


Figura. 15: Detalle del lóculo de un botón indiferenciado de *L. gouldiana* donde se observan varias zonas meristemáticas (Am). 40X

Etapa 2

La epidermis (Ep) aun se encuentra en formación y va a presentar divisiones anticlinales (An) en todo su perímetro e inmediatamente se observa células de parénquima (Pa) (Fig. 16), al igual que *Paphiopedilum barbatum* a diferencia de otras especies como *Paphiopedilum insigne* tiene hipodermis colenquimatosa debajo de la epidermis (Arditti, 1992).

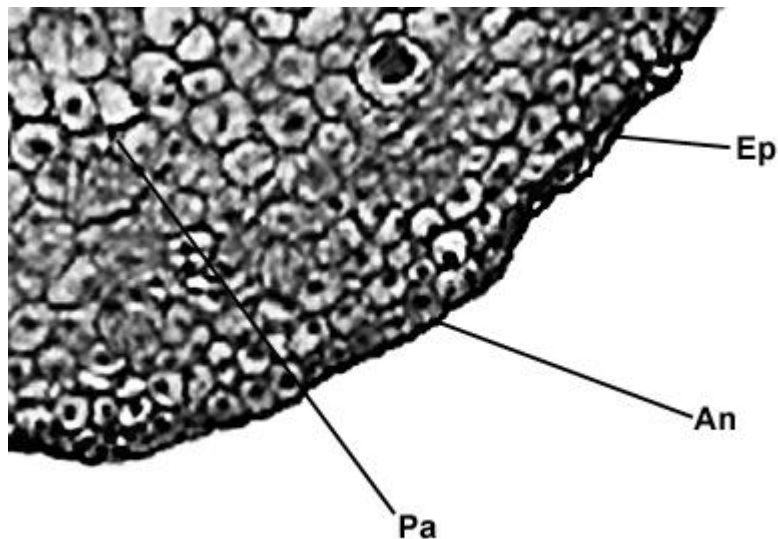


Figura 16: Detalle de la epidermis (Ep) de una sección transversal de botón de *L. gouldiana* donde se muestra las divisiones anticlinales (An) e inmediatamente después el parénquima (Pa).10X

Las valvas continúan su desarrollo, los fértiles (Fe), con forma triangular, presentan un haz vascular (Hv) ovalado y los estériles (Es) de forma redonda un haz vascular principal y dos en diferenciación (Dv) (Fig. 17A), este arreglo se reporta en *Oncidium flexuosum* (Mayer *et al.*, 2011). Se observan espacios aéreos del tipo lisogénico que aumentan con relación al tamaño del botón, y cristales de calcio en forma de rafidios característicos de las orquídeas (Arditti, 1992; Arévalo *et al.*, 2011; Noguera-Savelli y Jáuregui, 2011).

Cada una de las crestas tienen haces vasculares que difieren de su arreglo, en las crestas redondeadas tienen una forma circular y se encuentra formado por tres grupos de xilema y en medio el floema (Fig. 17B); en las crestas triangulares la forma que presentan es ovalada, con dos grupos de xilema y en medio el floema (Fig. 17C), aunque se observan otros dos sitios de formación de otros haces vasculares.

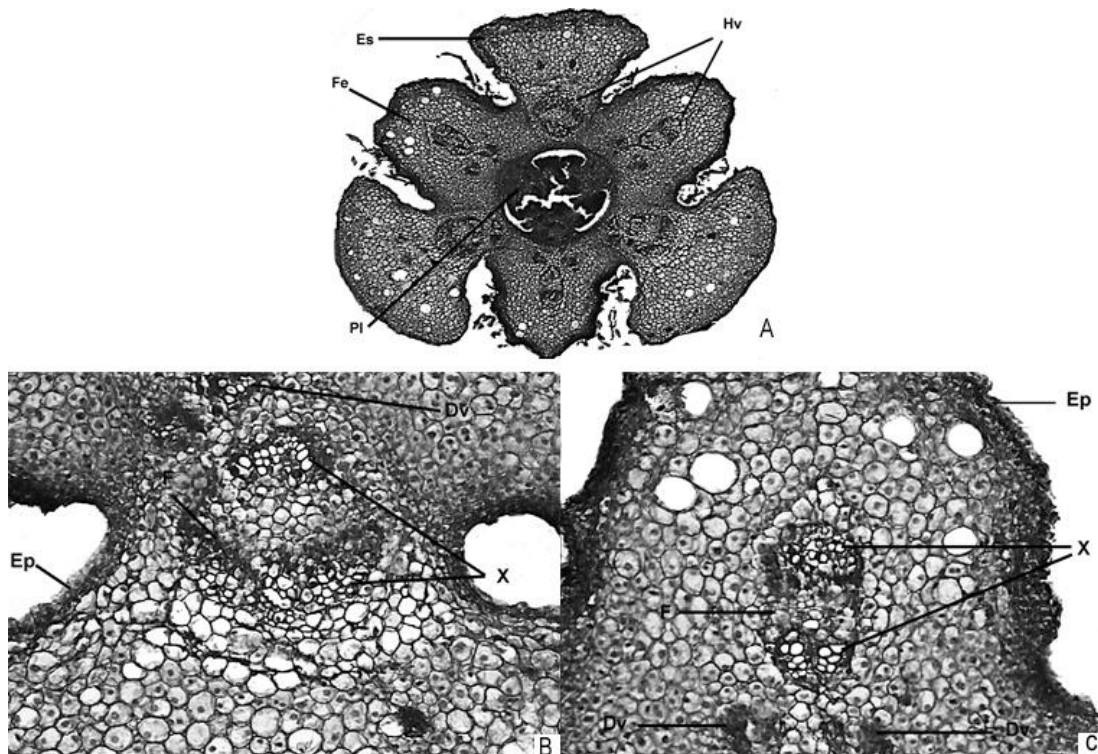


Figura 17: A. Parte media de una sección de ovario de *L. gouldiana* mostrando las valvas fértiles (Fe) y estériles (Es) en cada una de ellas grupos de haces vasculares (Hv) en la parte media de la sección se observa a la placenta (Pl). B. Detalle de las crestas redondeadas y C. Detalle de la cresta con forma triangular donde se observa la epidermis (Ep) los haces vasculares donde se observa el arreglo del xilema (X) y el floema (F) así como otros puntos de diferenciación vascular (Dv). A. 5X, B y C 20X.

El lóculo presenta una epidermis interna (Ep) formada por dos estratos de células pequeñas, alargadas con núcleos pequeños, el tejido placentario se ha dividido en tres protuberancias (PI) que han dado origen a numerosas células pequeñas, alargadas con núcleos pequeños (Fig. 18A). Se ha reportado que en *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Cattleya*, *Limodorum abortivum* y *Cephalanthera alba* (Arditti, 1992) el tipo de placentación es parietal que es igual al que se observa en *L. gouldiana* pero al igual que lo observado por Zhang y O'Neill (1993) con *Phalaenopsis* la placentación tiene forma “de ancla” ya que se va dividiendo en filamentos en cuyos extremos se encuentran los primordios de óvulo, dejando muy poco espacio en la parte central del ovario.

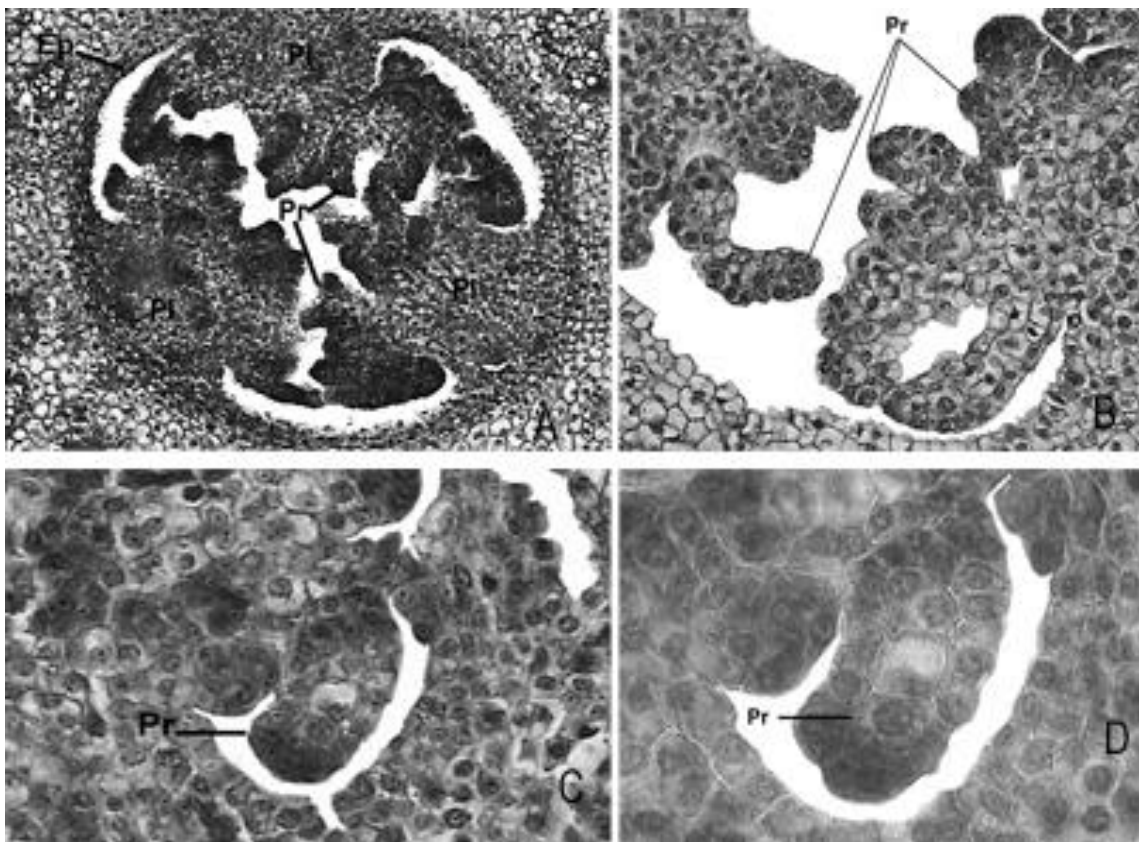


Figura 18: Parte media de la sección transversal de ovario de *L. gouldiana*
A. Lóculo del ovario de *L. gouldiana* con una epidermis (Ep) biestratificada de la cual la placenta (PI) en forma de ancla que se va dividen en filamentos en cuyos extremos se encuentran los primordios de óvulo (Pr). **B.** Detalle de los filamentos en cuyos extremos se observar los primordios de óvulo (Pr). **C.** Se observa el desarrollo de la placenta hasta llenar casi por completo al lóculo y en la parte distal de los filamentos se observan a los primordios de óvulo (Pr). **D.** Detalle de los primordios de óvulo. A. 20X, B, C 40X, D 100X

De las protuberancias que se ramifican en la placenta se observan los filamentos nucelares que corresponden a los primordios de óvulo (Pr) (Fig. 18B y Fig.18C). Estas protuberancias son parecidas a las descritas por Vázquez (2013), las cuales tienen tres elementos, el elemento proximal es el más cercano a la placenta y está representado por el funículo, el medio por la calaza y el más distal lo forma la nucela (Fig 18D). Mayer *et al.* (2011) reportan que en las orquídeas la proliferación de la placenta y la formación de los óvulos generalmente ocurren después de la polinización.

Arditti (1992) describió que la proliferación de la placenta inicia con la formación de filas filamentosas que consisten en 5 a 7 células delimitadas por la epidermis. En *Phalaenopsis* los primordios de óvulo presentan una forma de dedo (Nadeau *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 2008). En *Cypripedium cordigerum* los primordios ovulares surgen de la placenta parietal y cada primordio ovular consta de una fila axial de cinco u ocho células rodeadas por una epidermis (Sood y Mohana Rao; 1986). Esta etapa de desarrollo se observó en los botones de *L. gouldiana* mientras Sagawa e Israel (1964) en *Dendrobium* reportan algo similar a los 35 a 40 DDP, y les indica que el inicio de las divisiones celulares en las crestas de la placenta de *Dendrobium* depende de la polinización.

Dentro de las estrategias reproductivas se ha reportado que los óvulos en especies del género *Laelia* están completamente ausentes y se desarrollan hasta el momento de la polinización (Tsai *et al.*, 2008), en *L. gouldiana* se observó que la formación de la placenta no se encuentra regulada por la polinización, si no que se produce antes de la antesis, donde ya se observan primordios de óvulos, contrario a lo que se había reportado. Este tipo de estrategia reproductiva que presenta *Laelia gouldiana* es similar a la reportada por O'Neill (1997) y Tsai y colaboradores (2008) donde señalan que los primordios de óvulos se encuentran en una etapa premeiótica hasta que la polinización provoca el desarrollo de los óvulos como en los géneros *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Herminium*, *Epipactis*, *Platanthera*.

Etapa 3

Esta correspondió a los eventos que se dan durante la antesis hasta los 40 DDP. La cresta externa con forma redondeada y la de forma piramidal Mayer y colaboradores (2011) las denominan como valva estéril y fértil respectivamente presentan una epidermis (Ep) con un estrato de células isodiamétricas con pared celular engrosada (Fig. 19) a diferencia de *Oncidium flexousum* que está formada de dos o tres estratos de pequeñas células subepidérmicas y compactas de paredes delgadas (Mayer *et al.*, 2011).

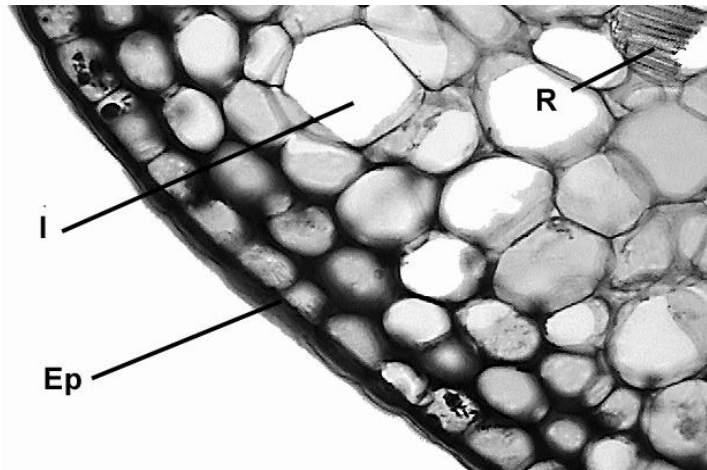


Figura. 19: Sección transversal de un ovario de *L. gouldiana* donde se observa: Epidermis (Ep) biestratificada con células de paredes engrosadas. Idioblastos con rafidios (R). 40X.

Por debajo de esta epidermis se observó un estrato de células subepidérmicas de paredes delgadas, el resto del ovario contiene varios estratos de células que son de mayor tamaño, con paredes delgadas y grandes vacuolas, donde se aprecian idioblastos (I) que contienen cristales de oxalato de calcio en forma de rafidios (Fig. 20) que se han reportado en varias especies de orquídeas como en *Maxillaria miniata* y *Pleurothallis cardiantha* (Ely *et al.*, 2007), *Oncidium flexousum* (Mayer *et al.*, 2011); *Oncidium abortivu*, *Epidendrum excisum*, *Rodriguezia lehmannii*, *Hirtzia escobarii*, *Elleanthus oliganthus*, *Elleanthus purpureus*, *Pleurothallis cordifolia*, *Hirtzia wagener* (Arévalo *et al.*, 2011), *Cattleya jenmanii* y *Cattleya lueddemanniana* (Torres y Sanabria, 2011).

En la base de la valva estéril se observan dos haces vasculares, ovoides con paredes engrosadas e idioblastos (I) con presencia de rafidios (R) (Fig. 20),

esto Arévalo y colaboradores (2011) han encontrado presentes en otras especies de orquídeas epífitas *Elleanthus excisum*, *E. oliganthus*, *E. purpureus* y *Pleurothallis cordifolia*, y se consideran como comunes en las orquídeas, particularmente en las epífitas, en la subtribu *Oncidiinae* se les encuentra en las células del mesófilo de la hoja, a menudo en idioblastos cristalinos (Sandoval-Zapotitla *et al.*, 2010)

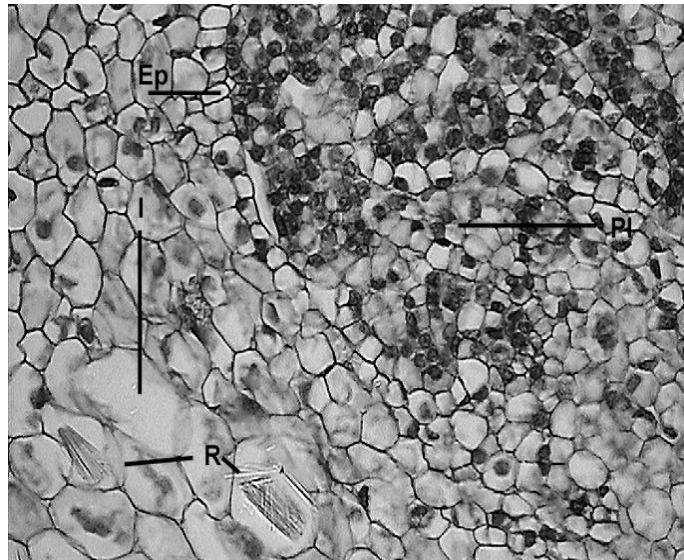


Figura 20: Sección transversal de ovario de *L. gouldiana* donde se observan idioblastos (I) con rafidios (R) y la epidermis (Ep) interna del lóculo con algunos primordios de óvulo (Pr). 40X

Los haces vasculares (Hv) en las valvas estériles con forma de sombrilla son tres, uno de mayor tamaño en la base con forma circular y dos hacia la epidermis, el arreglo que van a presentar es el xilema (X) orientado en la parte central y el floema (Fl) hacia el exterior (Fig. 21A). Las crestas redondeadas o valvas fértiles muestran cuatro grupos de haces vasculares, uno de mayor tamaño con forma ovoide en la parte media, con el floema (F) hacia la epidermis y el xilema (Xi) hacia el lóculo en su arreglo; dos de tamaño parecido situados en la parte interna del valva, uno frente al otro, de forma ovoide polarizados con el xilema y floema laterales; y uno en formación cercano a la epidermis de la cavidad ovárica (Fig. 21B).

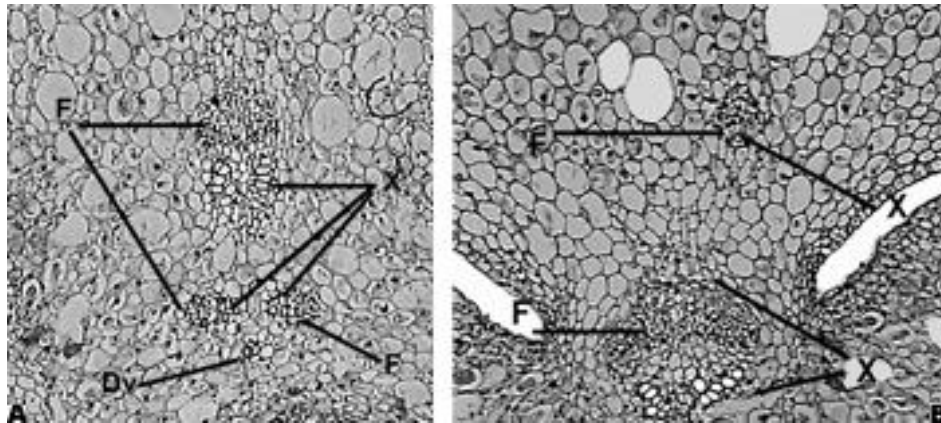


Figura 21: Sección transversal de un ovario de *L. gouldiana* mostrando **A.** Detalle de las valvas estériles y **B.** Detalle de las valvas fértiles, donde se observa la epidermis (Ep), los haces vasculares con el arreglo del xilema (X) y el floema (F) diferente así como otros puntos de diferenciación vascular (Dv).10X.

La epidermis interna hacia el lóculo se mantiene sin modificaciones, mientras que la placenta (PI) se divide para formar hileras de células las cuales formarán los filamentos (Fc) donde se observa una hilera de células centrales delimitadas por un estrato de células de menor tamaño (Fig. 22A). En la parte distal de los filamentos se encuentra una célula central de mayor tamaño que corresponde a la célula arqueosporial (Arq) con un núcleo grande y denso (Fig. 22B). Cada uno de los filamentos se desarrollan independiente.

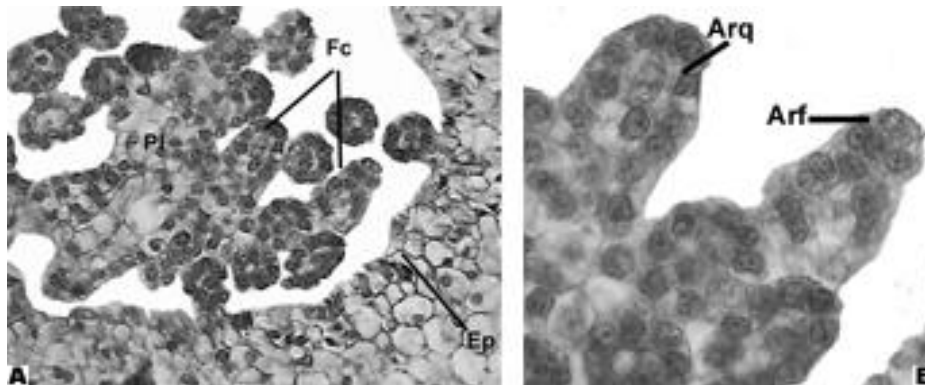


Figura 22: **A.** Lóculo de *L. gouldiana* mostrando su epidermis (Ep), la placenta (PI) que ha continuado el desarrollo de los filamentos celulares (Fc). Parte distal de los filamentos celulares donde se muestra la célula arqueosporial (Arq) y **B.** Un filamento en formación (Arf). A 40X, B 100X.

A los 40 DDP estas hileras han llenado por completo al lóculo y no se observan espacios entre los filamentos.

Arditti (1992) describió que las células terminales de esos filamentos funcionan como arqueosporas, al igual que en *Cypripedium cordigerum* (Sood y Mohana Rao; 1986) o *Paphiopedilum delenatii* (Lee y Yeung, 2012).

Etapa 4

Esta etapa comprendió los 50 como a los 71 DDP.

La epidermis de las valvas se ha mantenido biestratificada. En las valvas fértiles (Fe) se observó una pronunciada elongación de las células del parénquima que no es un incremento en el número de las células sino un cambio en su volumen mostrando gran cantidad de espacios aéreos (Ae) del tipo lisogénicos (Fig. 23). Estos cambios también son reportados por Mayer *et al.* (2011) en *Oncidium flexuosum*.

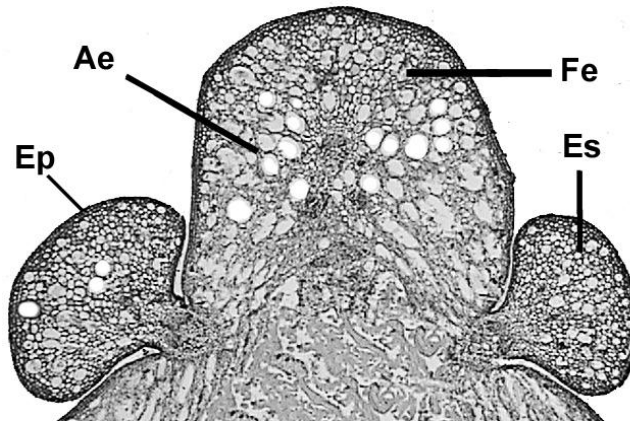


Figura 23: Sección transversal de una cápsula de *L. gouldiana* donde se observa una epidermis biestratificada (Ep) engrosada y gran cantidad de espacios aéreos. Detalle de las valvas fértiles (Fe) y estériles (Es). 2.5X

Las valvas estériles han disminuido su tamaño y mantienen la forma de sombrilla, en la base se estas se observa un menor número de estratos celulares y células de menor tamaño, alrededor del haz vascular (HV) circular con el xilema (X) hacia la epidermis externa y el floema (F) hacia la cavidad ovárica (Fig. 24A), estas valvas son las líneas de dehiscencia, que a diferencia de *Laelia anceps* que consisten en un grosor de dos a tres células pequeñas (Arditti, 1992), en *L. gouldiana* presentan un grosor mayor a 10 células.

Los haces vasculares (Hv) de las valvas fértiles se han desarrollado en tres grupos, uno de mayor tamaño en medio de la valva con forma circular polarizado con el xilema (X) hacia la epidermis externa y el floema (F) hacia el lóculo, y dos

similares ubicados diagonalmente del mayor hacia los lados con igual arreglo (24B).

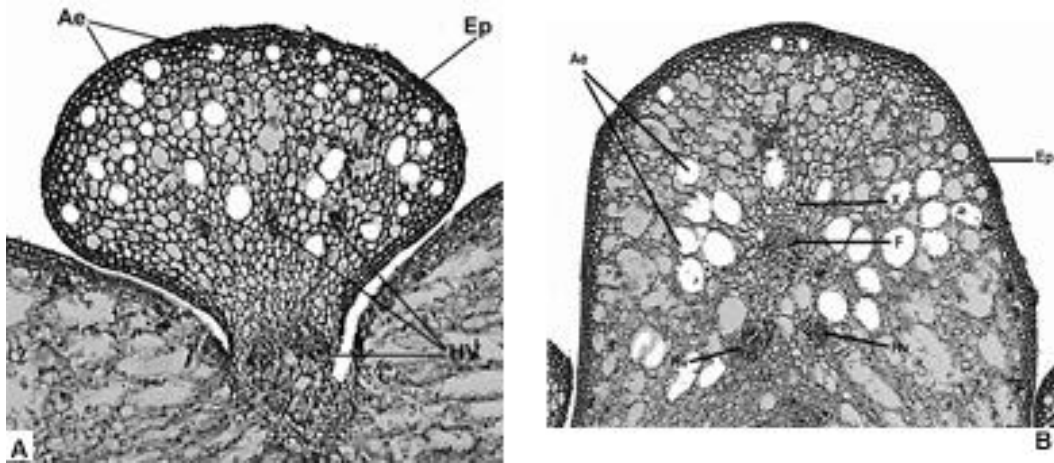


Figura 24: Sección transversal de una cápsula de *L. gouldiana* mostrando **A.** Detalle de las valvas estériles y **B.** Detalle de las valvas fértiles, donde se observa la epidermis (Ep) los haces vasculares con el arreglo del xilema (X) y el floema (F) distinto, así como gran cantidad de espacios aéreos del tipo lisogénicos. 5X.

A nivel de los lóculos la epidermis interna es uniestratificada y se observa que la placentación se bifurca para generar dos crestas placentarias y se observan abundantes filamentos, dentro de ellos, en el extremo micropilar las células arqueosporiales se han agrandado para formar a la célula madre de la megaspora (Cmm) (Fig. 25). Esta característica es igual a la reportada en *Dendrobium* a los 40 DDP (Sagawa e Israel, 1964), *Phalaenopsis* (Zhang y O'Neill, 1993; Tsai *et al.*, 2008), y *Paphiopedilum delenatii* a los 14 DDP (Lee y Yeung, 2012).

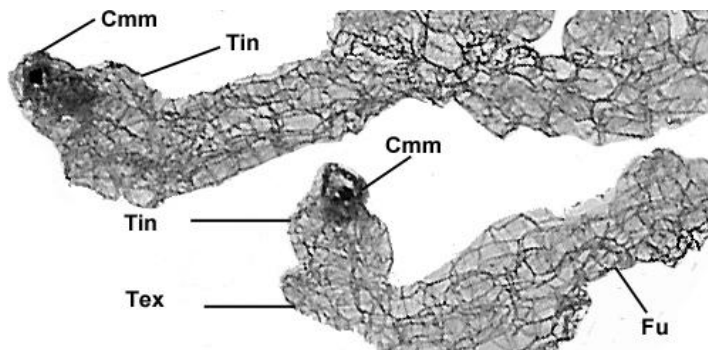


Figura 25: Imagen de filamentos. Células madre de la megaspora (Cmm), la cual se observa como una célula de mayor tamaño con citoplasma denso, ubicada en el extremo micropilar donde también se observa el inicio de los tegumentos internos (Tin) y de tegumentos externos (Tex). En el resto del filamento se forma un funículo (Fu) alargado. 40X.

La célula madre de la megaspora (Cmm) se encuentra en la parte más distal de los filamentos con un núcleo prominente y citoplasma denso dará lugar al óvulo en desarrollo (Fig. 25 y 26A). Se observa el desarrollo del tegumento interno (Tin) a nivel de la base de la célula madre de la megaspora con un crecimiento semejante a un anillo (Fig. 26A) seguido por el tegumento externo (Tex) (Fig. 26B). El desarrollo de los tegumentos es similar a lo reportado para *Cypripedium cordigerum* (Sood y Mohana Rao; 1986); *Platanthera bifolia* a los 2 DDP se desarrolla el tegumento interno y a los 5 DDP el tegumento externo (Fredrikson, 1991); *Phalaenopsis* (Zhang y O'Neill, 1993, Nadeau *et al.*, 1996 y Tsai *et al.*, 2008) y *Paphiopedilum delenatii* el tegumento interno a los 0 DDP (Lee y Yeung, 2012), con la diferencia que en ellos se desarrolla cuando apenas se encuentra la célula arqueosporial, mientras que en *L. gouldiana* al momento de la formación de la célula madre de la megaspora, como lo reportado en *Vanilla planifolia* que a 15 días después de la polinización el tegumento exterior y el tegumento interno del óvulo se diferencian casi simultáneamente con la individualización de la célula madre de megaspora (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo del tegumento externo (Tex), el funículo se curva, observándose la forma del óvulo anátropo (curvatura que junta el micrópilo con el funículo) y tenuinucelado ya que presenta dos estratos de nucela (Fig. 26A y 26B).

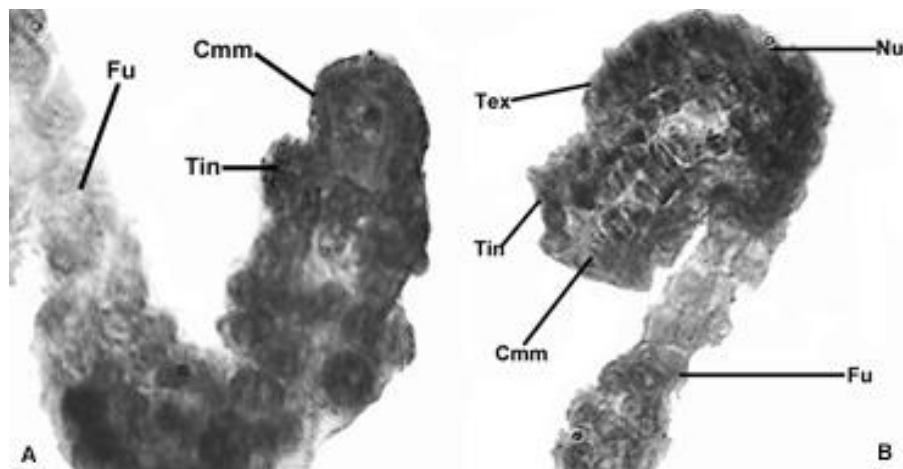


Figura 26: Imagen de óvulos de *L. gouldinana*. **A.** Con el funículo (Fu) la célula madre de la megaspora (Cmm), la formación de los tegumentos internos (Tin) en forma de anillo. **B.** Formación de los tegumentos, tegumento externo (Tex), mostrando una curvatura del óvulo que muestra una escasa nucela (Nu). 100X.

Esta etapa muestra similitud a lo reportado por Zhang y O'Neill (1993) donde se observa el óvulo inmaduro en *Phanelpsis* a los 56 días después de la polinización y que contiene la célula madre de la megaspora. Es el principio que consiste en una serie de divisiones meióticas para la formación del saco embrionario (Arditti, 1992)

Etapa 5

Se consideró a los 83 DDP,

En la epidermis (Ep) de las valvas, estéril (Es) y fértil (Fe), se observó un estrato más de células isodiamétricas con paredes celulares engrosadas, lo que probablemente esté dando paso a un proceso de lignificación. En las valvas estériles (Es) se presenta una reducción de su diámetro en la zona basal y hay células con paredes evidentemente gruesas, en la unión entre las valvas estériles y fértiles se observan dos o tres estratos de células con paredes delgadas que están generando una zona de abscisión (Za) (27A y B) que serán las líneas de dehiscencia, esto es similar a lo reportado por Mayer *et al.* (2011) en *Oncidium flexousum* que durante esta etapa, las células precursoras de la línea de dehiscencia están presentes en el borde entre las válvulas estériles y las válvulas fértiles y que los precursores de la línea de dehiscencia se hacen evidentes como un estrato de células pequeñas.

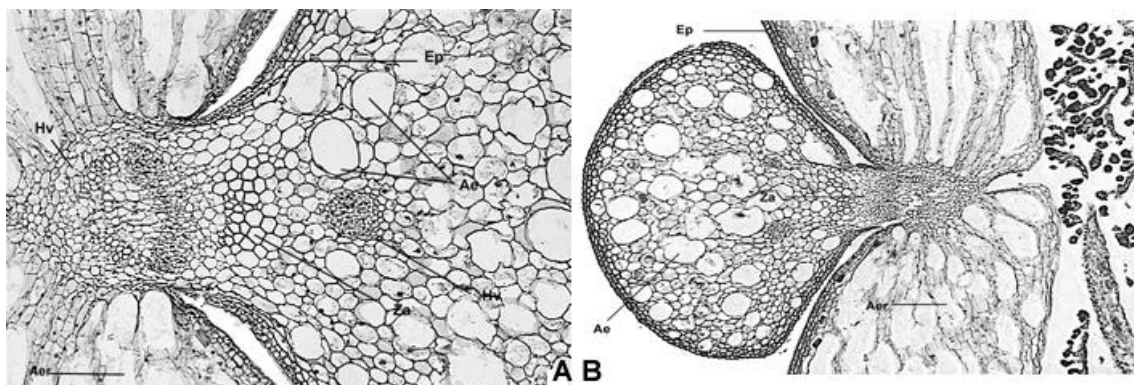


Figura 27: Imágenes de secciones transversales de cápsula de *L. gouldiana* donde se observa **A.** En las crestas infértiles la formación de una zona de abscisión (Za) detrás de los haces vasculares (Hv) principales, la epidermis (Ep) se ha engrosado y el tejido parenquimático contiene gran cantidad de espacios aéreos (Ae). **B.** El tejido de las crestas fértiles se ha vuelto aerénquima (Aer). Extremo superior e inferior de la imagen. A 40X, B 20X

Dentro del lóculo se observan el desarrollo del óvulo en diferentes etapas, una característica ha sido la presencia de funículos (Fu) muy largos compuestos de numerosas células (28A y B).

El óvulo se inicia en una sola célula subdérmica que por divisiones periclinales da lugar a una fila axial de las células cubiertas por un estrato dérmico. La célula terminal subdérmica se diferencia en una arqueosporial con un evidente núcleo. Las divisiones celulares del estrato dérmico dan lugar a la formación de los tegumentos interior y exterior y a la curvatura del óvulo (28C).

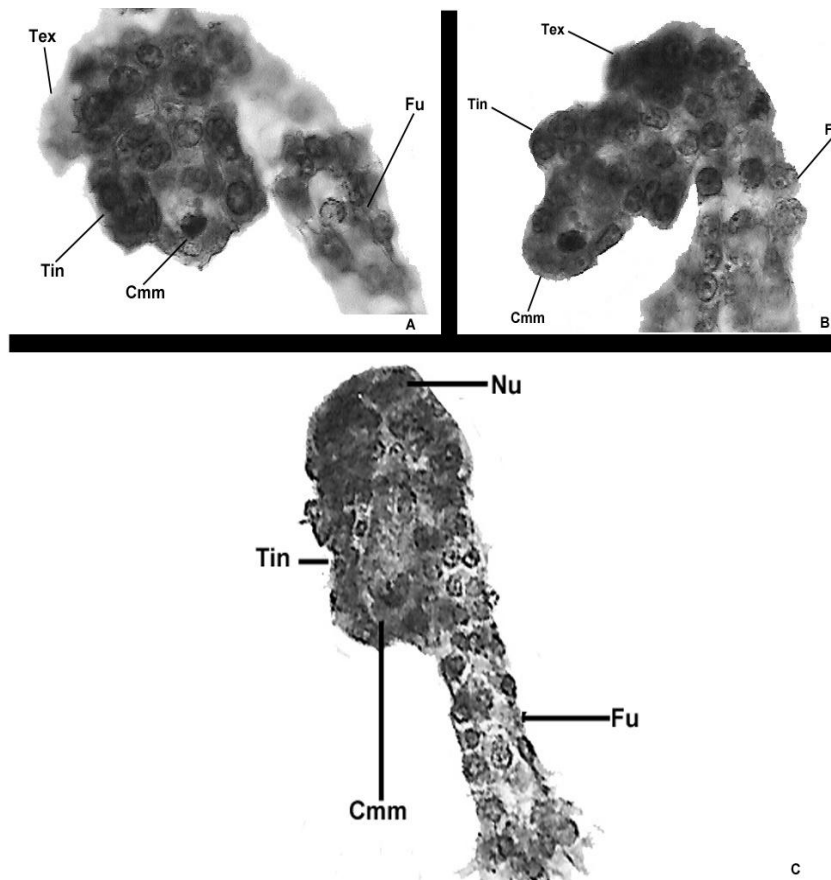


Figura 28: Diferentes etapas de desarrollo del óvulo. **A.** Célula madre de la megaespora (Cmm) con tegumento interno (Tin) en formación. **B.** Célula madre de la megaespora (Cmm) con formación del tegumento interno (Tin) y externo (Tex). **C.** Célula madre de la megaespora preparándose para división celular con los tegumentos ya formados, se observa el tegumento interno (Tin), la nucela (Nu) con un grosor de una célula. En todas las imágenes se observa el funículo (Fu) y la curvatura de un óvulo Anátropo. 100X.

Etapa 6

En esta etapa ya se encuentra la cápsula en desarrollo y corresponde a 93 DDP.

Las células de la epidermis (Ep) de la cápsula engrosaron más sus paredes celulares, y el tejido aerénquima (Aer) de las valvas fértiles se ha degenerado aún más, en las líneas de dehiscencia la zona de abscisión (Za) se ha terminado de desarrollar a nivel de los haces vasculares, en una de ellas ya se desprendió la valva estéril (Fig. 29B). Parecido a lo reportado en *Oncidium pollardii*, que la cápsula abre de las tres líneas de dehiscencia que se encuentran entre los haces vasculares (Dodson y Hagsater, 1978)

Por la conformación el tipo de abertura es del tipo loculicida y lo realiza a partir de las tres líneas de dehiscencia que abren apicalmente como en la mayoría de orquídeas (Arditti, 1992) dejando al descubierto a las tres valvas que contienen a las semillas.

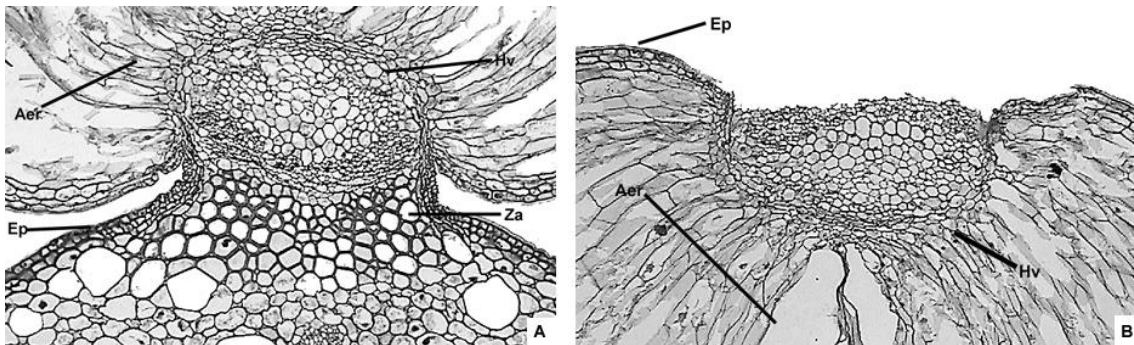


Figura 29: A. Cresta infértil con la presencia de un zona de abscisión (Za) formada por delante del haz vascular (Hv); cresta con una epidermis (Ep) engrosada y espacios aéreos (Ae). B. Desprendimiento de la cresta a través de la zona de abscisión (Za). 5X

En el lóculo se observan varios sacos embrionarios (Sem) en divisiones celulares (Fig. 30).

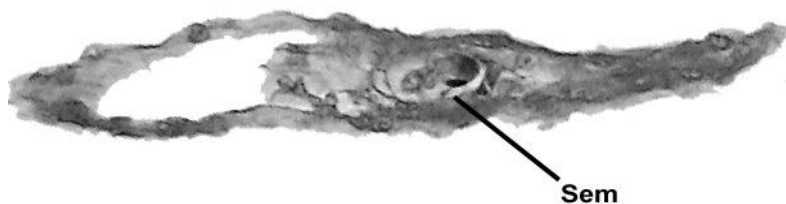


Figura 30. Saco embrionario (Sem) de *L. gouldiana* en formación. 40X

Las orquídeas se caracterizan por la reducción del número de núcleos en el desarrollo del saco embrionario monospórico de 8 a 4. Las células de las antípodas tienen forma de pera con un aparato filiforme. Las células de las antípodas están presentados por los núcleos (1 a 3) en algunas especies como *Calanthe* los núcleos de las antípodas y células polares se funden y crean un grupo polar antípoda (Batygina *et al.*, 2003)

Etapa 7

En la última etapa se observa a partir de los 119 DDP, las valvas estériles se han reducido aún más y el arénquima persiste, la línea de dehiscencia es más evidente y las valvas fértiles se han ensanchado y casi unido entre sí, presentan células muy alargadas, la epidermis es estratificada y con paredes celulares engrosadas que le da la rigidez a la cápsula (Fig. 31).

A nivel del lóculo ya se han desarrollado las semillas, las cuales presentan una cubierta seminal ó testa reticulada que está constituida por células muertas en forma de red. En el interior de las semillas son pocas aquellas que albergan un embrión.

Se observa dentro de la semilla en la parte central un embrión (Fig. 32A y 32B), Arditti (1992) registro que en la subfamilia Epidendroideae presentan un suspensor conformado por una sola célula, del tipo I, a la que esta especie pertenece.

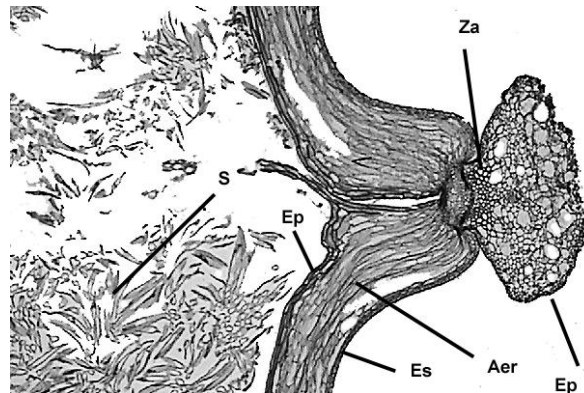


Figura 31. Sección transversal de una cápsula de *L. gouldiana* donde se observa la cresta estéril con línea de dehiscencia, las crestas fértiles con tejido aerénquima y hacia la izquierda de la imagen, dentro el lóculo se observan las semillas (Se). 2.5X

Por la conformación el tipo de abertura de la cápsula que presenta *L. gouldiana* es del tipo loculicida y lo realiza a partir de las tres líneas de dehiscencia que abren apicalmente como en la mayoría de orquídeas (Arditti, 1992) dejando al descubierto a las tres valvas que contienen a las semillas.

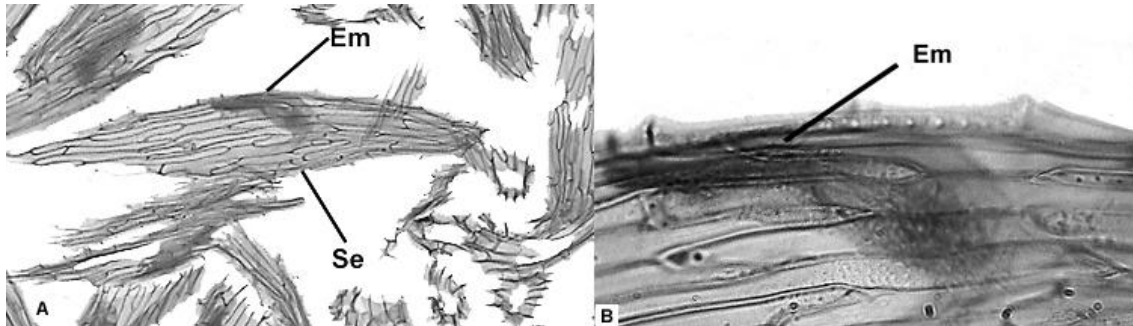


Figura 32. A. Semilla (Se) de *L. gouldiana* donde se observa al embrión (Em) en la parte media. B. Detalle del embrión en el interior de la semilla. A 40X B 100X

Los resultados mostrados conforman el primer reporte en *L. gouldiana* que permite establecer las diferentes etapas del desarrollo morfo-histológico, desde botones florales y el seguimiento del desarrollo de ovario antes y después de ser polinizada (Cuadro 3). Este trabajo es una valiosa aportación para comprender parte de la biología reproductiva de esta especie así como del género.

		Características		
		Morfológicas	Histológicas	
1	Botones indiferenciados	Formación escapo floral. Botones indiferenciados color verde oscuro. Largo total y diámetro del ovario 21.4 mm y 20 mm	Ovario con tres carpelos dividido en seis valvas: tres estériles (forma redondeada) y tres fértiles (forma piramidal). Hazes vasculares incipientes	Lóculo con protuberancias dos en cada valva fértil, en su extremo apical células indiferenciadas con núcleos grandes y citoplasma denso (zonas meristemáticas).
2	Botones	Botones florales desarrollados, con bráctea envolvente de color verde y en la parte apical magenta. Largo y diámetro del ovario 33.2 mm y 3.43 mm	Valvas fértiles (un haz vascular), valvas estériles (dos haces vasculares) Espacios aéreos tipo isogénico. Cristales en forma de rafidios	Placentación parietal en forma "de ancia" similar a <i>Phalaenopsis</i> Protuberancias que se ramifican en la placenta con filamentos nucleares (primordios de óvulo)
3	Flor antesis	Flor turgente, abierta color magenta brillante. Diámetro ovario 2.7 mm		Placenta en continua división formando hileras de células para conformar filamentos delimitados por un estrato de células de menor tamaño (protodérmis). Parte distal de los filamentos con la célula arqueosporial.
	Días Después de la Polinización	Perianto marchito beige rosado en la zona apical y beige-verde en la base. Estrías de color verde brillante y entre ellas de color verde rosado con mayor intensidad. Longitud de y diámetro del ovario 39.2 y 3.2 mm	Valva estéril y fértil con epidermis de células isodiamétricas con pared celular engrosada	
4	40			
4	50-71	Manchas oscuras en perianto. Líneas carpelares y de dehiscencia evidentes, estrías longitudinales (verde-rosado) Ovario cambia a color magenta tanto en las líneas de dehiscencia como en las líneas carpelares. Diámetro del ovario 4.3 a 5.8 mm	Epidermis biestratificada. Reducción del tamaño de las valvas estériles futuras líneas de dehiscencia Valvas fértiles pronunciada elongación de las células del parénquima e incremento en su volumen con gran cantidad de espacios aéreos del tipo isogénicos	Bifurcación de la placenta. Células arqueosporiales forman la célula madre de la megaspora. Desarrollo del tegumento interno en la base de la célula madre de la megaspora se diferencia en una arqueosporial con un evidente núcleo. Formación de los tegumentos interior y exterior y a la curvatura del óvulo
5	83	Perianto deshidratado y con manchas oscuras. Líneas de dehiscencia y las líneas carpelares igual que en la etapa anterior. Ovario 5.7 mm de diámetro	Incremento en la epidermis de las valvas con un estrato más de células isodiamétricas con paredes celulares engrosadas (lignificación) Reducción del diámetro de las valvas estériles	Funiculos alargados. Óvulos anátropos, tenuinucleados.
6	93	Perianto delgado, translucido y quebradizo (beige verdoso) Ovario color magenta verde brillante, líneas de dehiscencia y carpelares oscuras. Diámetro del ovario 13.3 mm.	Células epidérmicas con paredes celulares gruesas. Células delgadas (zona de abscisión)	Desarrollo del saco embrionario.
7	119	Perianto delgado y quebradizo color beige amarillo. Ovario no turgente, color amarillo – rosado en las líneas de dehiscencia y en las hendiduras amarillo- Cápsula	Las valvas estériles se han reducido más, el arénquima persiste la línea de dehiscencia es más evidente. Las valvas fértiles se han ensanchado y casi unido entre sí, presentan células muy alargadas, la epidermis es estratificada y con paredes celulares engrosadas que le da la rigidez a la cápsula.	Semillas con cubierta seminal reticulada constituida por células muertas en forma de red

Cuadro 3. Descripción morfo-histológica de las diferentes etapas del desarrollo de los botones florales y del ovario antes y días después de la polinización de *Laelia gouldiana*.

VIII. CONCLUSIONES

La floración de *L. gouldiana* es asincrónica y en el pedúnculo floral se localiza el ovario sincárpico del tipo paracárpico, tricarpelar, unilocular con placentación parietal.

Diecinueve días posteriores a la polinización manual se produjo la caída de las flores probablemente ocasionado por un proceso de senescencia asociado a una autopolinización.

Las flores que si lograron ser polinizadas presentaron el síndrome de post-polinización, con la progresiva senescencia del perianto y el aumento gradual del ovario hasta que se desarrollo la cápsula.

En etapas muy jóvenes y antes de que se diferenciaran en botones florales individuales se observó que el ovario presenta seis crestas externas conformadas de valvas estériles y fértiles en las cuáles ya se presenta las primeras etapas del desarrollo de la placenta.

Durante el desarrollo de los botones florales y previos a la antesis, la placenta prolifera y ocupa todo el lóculo definiéndose como una placentación parietal en forma de ancla.

El tipo de estrategia reproductiva es diferente a la reportada para el género debido a que *L. gouldiana* presenta la formación de primordios de óvulo antes de ser polinizada.

Fue posible observar durante la antesis y hasta 40 días después de la polinización, el desarrollo de las células arqueosporales las que posteriormente dieron lugar a la célula madre de la megaspora y el desarrollo de los tegumentos, los óvulos en *Laelia gouldiana* son anátropos, bitegumentados y tenuicelados.

La gametogénesis inicia 83 días después de la polinización formando el saco embrionario y finalmente las semillas.

El desarrollo del ovario mostró la reducción de las válvulas infértiles con el desarrollo de células de paredes muy gruesas que endurecen los tejidos de la

cápsula y definiendo una zona de abscisión que posteriormente serán las líneas de dehiscencia.

La cápsula tiene dehiscencia tipo loculicida y requiere para desarrollarse entre 119 - 140 días posteriores a la polinización, tiempo similar al reportado para *L. anceps* (150 días)

La pérdida de material por la senescencia de las flores después de la polinización fue una limitante para poder realizar un seguimiento más detallado de la formación del saco embrionario y definir con más precisión sus etapas hasta el desarrollo de la semilla.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-León E., C. Esquivel-Huesca, y J. Márquez-Guzman.** 2005. Seed germination of *Laelia gouldiana* (Orchidaceae): a case of semicompatibility (with 1 table and 3 figures). *Phyton* 54: 191-199.
- Alberico F.** 2004. Germinación *in vitro* de semillas de *Laelia speciosa*, orquídea en peligro de extinción. Trabajo de grado, Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División Ciencias Biológicas y de Salud. 12 pp.
- Arditti J.** 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The botanical review.* 33:1.
- Arditti J.** 1979. Aspects of the physiology of orchids. *Advances in botanical research.* 7: 421-655.
- Arditti J.** 1992. *Fundamentals of orchid biology.* John Wiley and Sons. 691 pp.
- Arditti J y A. Karim.** 2000. Tansley Review No. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol* 145, 367-421.
- Arévalo R., Figueroa, J. y S. Madriñán.** 2011. Anatomía foliar de ocho especies de orquídeas epífitas. Population structure of *Oncidium poikilostalix* (Orchidaceae), in coffee plantations in Soconusco, Chiapas, México. *Lankesteriana* 11 (1) 39-54.
- Attri L. K., H. Nayyar, Bhanwra R. K., y S. P. Vij.** 2007. Post-pollination biochemical changes in the floral organs of *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. And *Aerides multiflora* Roxb.(Orchidaceae). *Journal of Plant Biology* 50(5): 548-556.
- Batygina T, E. Bragina y V. Vasileyva.** 2003. The reproductive systems and germination in orchids. *Acta biológica Cracoviensia. Serie botánica* 45(2):21-34.
- Beltrán R.L.A., B. Martínez-Rivera y A. P. Maya.** 2012. Etnoecología de la flor de Catarina- *Laelia autumnalis* (La Llave et Lex. Lindl.)- (Orchidaceae) en una

comunidad campesina al sur del estado de Morelos, México: conservando un recurso preservando saberes populares. *Etnobiología* 10 (1): 1-17.

Briceño J.I.S. 2004. Propagación vegetativa, fenología y comercio de seis especies del género *Cattleya* Lindl (Orchidaceae) Tesis de Maestría en Botánica Tropical. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 57 pp.

Cameron K. M., M. W. Chase, Whitten W. M., Kores, P. J., Jarrell D. C., Albert V. A. y D. H. Goldman. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86 (2): 208-224.

Chase M. W. 2003. Phylogenetics [of Cranichidinae]. En **A. P.J. Cribb, M. W. Chase y F.N. Rasmussen** (Eds). *Genera Orchidacearum*, Volume 3: *Orchidoideae Part 2, Vanilloideae*. Oxford University Press, Oxford. 400pp.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2003. Programa de manejo reserva de la biosfera Barranca de Metztitlán. México. 209 pp.

Dodson C.H. y E. Hagsater. 1978. *Oncidium pollardii* una nueva especie del centro- sur de México. *Orquídea* 7(1): 11-15

Dressler R. 1993. Phylogeny and clasiffication of the orchid family. Dioscorides press. 314 pp.

Duncan R.E. y J.T. Curtis. 1942. Intermittant growth of fruits of *Phalaenopsis*. A correlation of the growth phases of an orchid fruit with internal development. *Bull. Torrey bot. Club.* 69. 167-83.

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

Fredrikson M. 1991. An embryological study of *Plantathera bifolia* (Orchidaceae) *Plant Systems Evolution* 174: 213-220.

Freudenstein J.V. y F.N. Rasmussen. 1999. What does morphology tell us about orchid relationships? — A cladistic analysis. *American Journal of Botany* 86 (2): 225-248.

Govindappa D. A. y K. A. Karanth 1981. The embryology of *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 138, 1-7.

- Hágsater E., M. Soto, Salazar G., Jiménez R., López M. y R. Dressler.** 2005. Orchids of Mexico. Herbario AMO, Instituto de Biología, 303 pp.
- Halbinger, F. y M. Soto.** 1997. *Laelias* of Mexico. Orquídea, Herbario Asociación Mexicana de Orquideología (AMO) 15.
- Herbert W. I. y Y. Sagawa.** 1964. Post-pollination ovule development in *Dendrobium* Orchids. II. Fine structure of the nucellar and archesporial phases, Caryologia: International Journal of Cytology, Sytosystematics and Cytogenetics, 17 (2): 301-316
- Hsiao Y. Y., Z. J. Pan, Hsu C. C., Yang Y. P., Hsu Y. C., Chuang Y. C. y Chen H. H.** 2011. Research on orchid biology and biotechnology. Plant and Cell Physiology, 52 (9): 1467-1486.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI).** 2004. La Población Hablante de Lengua Indígena de Hidalgo. México. 104pp.
- Johri B.M., K.B. Ambegaokar y P.S. Srivastova.** 1992. Comparative Embryology of Angiosperms Vol. 1. Springer-Verlag 612 pp
- Lapeyre-Montes F., G. Conéjéro, J.L. Verdeil y E. Odoux.** 2010. Anatomy and biochemistry of vanilla bean development (*Vanilla planifolia* G. Jackson) en **Odoux E. y M. Grisoni** (Eds.). Vanilla: Medicinal and Aromatic Plants — Industrial Profiles CRC Press. 149-171 pp.
- Lee Y. y E.C. Yeung.** 2012. Embryology of the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*: Ovule development. Botanical Studies 53: 97-104.
- Lehnebach C. Y M. Riveros.** 2000. Ampliación del rango de distribución de *Gavilea Kingii* (Orchidaceae) en Chile. Hickenia 23: 81-85.
- Márquez G. J.** 2013. Capítulo III: Desarrollo del androceo. En **Márquez G. J., M. O. Collazo, Martínez G.M., Orozco S.A. y Vázquez S.S.** (Eds.) 2013. Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. 602 pp.
- Mayer, J. L. S., S. M. Carmello-Guerreiro y B. Appezzato-da-Glória.** 2011. Anatomical development of the pericarp and seed of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 206(6): 601-609.

- Menchaca A.R.G. y D.M. Moreno.** 2011. Conservación de orquídeas una tarea de todos. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo de México. 41 pp.
- Murguía G.J. y H.E. Lee.** 2007. Manual de Producción de Orquídea. Dirección General Editorial. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. 75 pp.
- Nadeau J., X.S. Zhang, Li S. y S.D. O'Neill.** 1996. Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific in cDNAs. *The Plant Cell*, 8: 213-239.
- Nava, J.J.F.** 2008. Propagación *in vitro* y establecimiento en invernadero de las orquídeas *Trichocentrum carthagenense* (Jacq.) Sw. y *Laelia eyermaniana* Rechb.f., para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable. Tesis Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos. 124 pp.
- Nazarov V. y G. Gerlach.** 1997. The potential seed productivity of orchid flowers and peculiarities of their pollination systems. *Lindleyana* 12 (4): 188–204.
- Noguera-Savelli E. y D. Jáuregui.** 2011. Anatomía foliar comparada y relaciones filogenéticas de 11 especies de *Laeliinae* con énfasis en *Brassavola* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical* 59 (3): 1047-1059.
- O'Neill S.D.** 1997. Pollination regulation of flower development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 547–74.
- Peter C.I. y S.D. Johnson.** 2009. Reproductive biology of *Acrolophia cochlearis* (Orchidaceae): estimating rates of cross-pollination in epidendroid orchids. *Annals of Botany* 104: 573-581.
- Pulido L., M. A.Carrizosa y G. Pozuelo.** 2000. Estudio Anatómico De Dos Géneros De Orquídeas (*Orchis* y *Ophrys*) De La Provincia De Albacete. En internet: www.secforestales.org/buscador/pdf/3CFE05-008.pdf
- Ramírez J.** 2004. Orquídeas de México. *Biodiversitas* No. 5: 1-5. CONABIO. México.
- Reiser L. y R.L. Fischer.** 1993. The ovule and the embryo sac. *The plant cell* 5: 1291-1301.

- Rodríguez-Robles J. A., E. J. Meléndez y J.D. Ackerman.** 1992. Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 79 (9): 1009-1017.
- Rzedowski J. y G.C. Rzedowski.** 1990. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología. Centro regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán. 494pp.
- Sagawa, Y., y H. W. Israel,** 1964. Post-pollination ovule development in *Dendrobium* orchids. I. Introduction. *Caryologia*, 17(1): 53-64.
- Sandoval E., L.A. Rojas, Gúzman R. C., Carmona J. L., Ponce S. R., León G. C., Loyola B. C., Vallejo Z. M. y A. A. Medina.** 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuaderno 38. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 278p.
- Sandoval-Zapotitla E., T. Terrazas y J.L. Villaseñor.** 2010. Diversidad de inclusiones minerales en la subtribu *Oncidiinae* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical* 58 (2): 733-755
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).** 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-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.
- Shamrov I. I., y G. M Anisimova.** 2003. Critical stages of ovule and seed development. *Acta Biológica Cracoviana*. 45 (1), 167-172.
- Signes P. T., S. C. García y Císcar J. S.** 2012. Un nuevo híbrido del género *Ophrys* L. (Orchidaceae) en el litoral valenciano. *Flora Montiberica*. 51: 93-96.
- Silva S.M.N. y G.G. Lima.** 1984. Self and cross pollination in some species of the genus *Laelia* Lindl (Orchidaceae). *Revista Brasileira de genética* 7(4): 671-676
- Singer R.B. y M. Sazima.** 2001. The pollination mechanism of three sympatric *Prescottia* (Orchidaceae: *Prescottinae*) species in southeastern Brazil. *Annals of Botany*. 88: 999-1005.

- Singer R.B.** 2009. Morfología Floral y polinización de orquídeas: segundo libro de Darwin. Acta biológica. Colombiana. 14: 337-350.
- Sood S. K. y P. R. Mohana Rao.** 1986. Studies in the embryology of the diandrous orchid *Cypripedium cordigerum* (*Cypripediaceae*, Orchidaceae). Plant Systematics and Evolution 160: 159-168
- Soto-Arenas M. A. y A.R. Solano-Gómez.** 2007. Ficha técnica de *Laelia gouldiana*. Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Base de Datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029.
- Swamy B.G.L.** 1942. Female gametophyte and embryogeny in *Cymbidium bicolor* Lindl. Proceedings: Plant Sciences. 15 (4): 194-201
- Téllez V. M. A. A.** (Compiladora.) 2011. Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma de México.
- Torres A.J. y M.E.Ch. Sanabria.** 2011. Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía foliar de *Cattleya jenmanii* rolfe y *C. lueddemanniana* Rchb.f. (Orchidaceae). Acta Bot. Venez. 34 (1): 199-214
- Torretta J. P., N. E. Gomiz, Aliscioni S. S. y M. E. Bello.** 2011. Biología reproductiva de *Gomesa bifolia* (Orchidaceae, *Cymbidiaceae*, *Oncidiinae*). Darwiniana 49 (1): 16-24.
- Trujillo-Villagarcía B. A., H. A. Zavaleta-Mancera, Mora-Herrera M. E. y H. A. López-Delgado.** 2006. Efecto del CaCl₂ sobre la actividad enzimática antioxidante durante la vida florero de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolux ex Hook F.) Revista Chapingo. Serie Horticultura, 12(2): 203-209.
- Tremblay R. L., J. D. Ackerman, J. K. Zimmerman y R. Calvo.** 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. The Biological Journal of the Linnean Society. 84: 1-54.
- Tsai W. C., Y. Y. Hsiao, Pan Z. J., Kuoh C. S., Chen W. H., y H. H. Chen.** 2008. The role of ethylene in orchid ovule development. Plant science, 175 (1): 98-105.

- Vázquez S.S.** 2013. Capítulo II: Desarrollo del gineceo. En **Márquez G. J., M. O. Collazo, Martínez G.M., Orozco S.A. y S.S. Vázquez** (Eds.). 2013. Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. 602 pp.
- Velasco A. L. y P. B. Beltrán.** 2008. Orquídeas del Parque Natural sierra de Grazalema. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. España. 270p.
- Yeung E. y L. K. Sandra.** 1997. Ovule and Megagametophyte Development in Orchids. En **Arditti J. y A.M. Pridgeon** (Eds.). 1997. Orchid Biology: Reviews and Perspectives. 7:31-73.
- Yu H. y C. J. Goh.** 2001. Molecular genetics of reproductive biology in orchids. *Plant Physiology*, 127(4), 1390-1393.
- Zhang X. S. y S. D. O'Neill.** 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *The Plant Cell*, 5(4): 403-418.

IX. ANEXO

9.1 Descripción botánica de *Laelia gouldiana* Rchb. f.

(Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007)

Hierba epífita, cespitosa, 30-100 cm de alto. Raíces teretes 1.5-3 mm de diámetro. Rizoma corto, ca. 2-3 cm de largo, 7-15 mm de diámetro. Pseudobulbos elipsoide-fusiformes, algo comprimidos, con vainas escariosas, 8-sulcados, 54-88 mm de alto, 18.5-32 mm de ancho. Hojas 2, ensiformes, agudas, mucronadas, conspicuamente erectas, coriáceo-carnosas, duras, conduplicadas en la base, carinadas, 16.5-24 x 2.8-3.0 cm. Inflorescencia erecta, 40-75 cm de largo, pedúnculo de 3.5-5 mm de diámetro, con 6 brácteas, tubulares; racimo subdístico, con 3-5(-9) flores. Brácteas florales oblongotriangulares, agudas, ligeramente carinadas, escariosas, 18-32 x 5-11 mm. Flores muy vistosas, resupinadas, 6.5-7.5 cm de diámetro; tépalos púrpura-magenta oscuro, brillantes; labelo con los lóbulos laterales blancos con los márgenes apicales magenta, garganta crema-amarillento, fuertemente marcada con líneas púrpura-magenta; lóbulo medio púrpura-magenta intenso, con la base crema-amarillento, callo amarillo cromo, quillas con una líneas e hileras de puntos púrpura, columna blanco-verdosa con muchas hileras de puntos púrpura, antera blanca; fragancia intensa, floral-aromática. Ovario pedicelado, subterete, 6-sulcado, furfuráceo, ca. 32-48 mm, 2-4 mm de diámetro.

Sépalos extendidos, ligeramente convexos, márgenes algo reflexos, los ápices ligeramente conduplicados y carinados, ocasionalmente recurvados; sépalo dorsal erecto, oblongo a angostamente elíptico, agudo-acuminado, 49-56 x 15-17 mm; sépalos laterales descendentes, angostamente elípticos a lanceolados, acuminados, oblicuos (Fig. 33), 45-53 x 13-15 mm. Pétalos extendidos, planos a convexos, rómbicos, agudos, subunguiculados, base cuneada, ápice algo conduplicado, márgenes ligeramente plegados, ondulados, 46-54 x 26-30 mm.

Labelo 3-lobado, largo total 33-46 mm, 33 mm de ancho cuando extendido, más bien recto; lóbulos laterales erectos, elípticos.

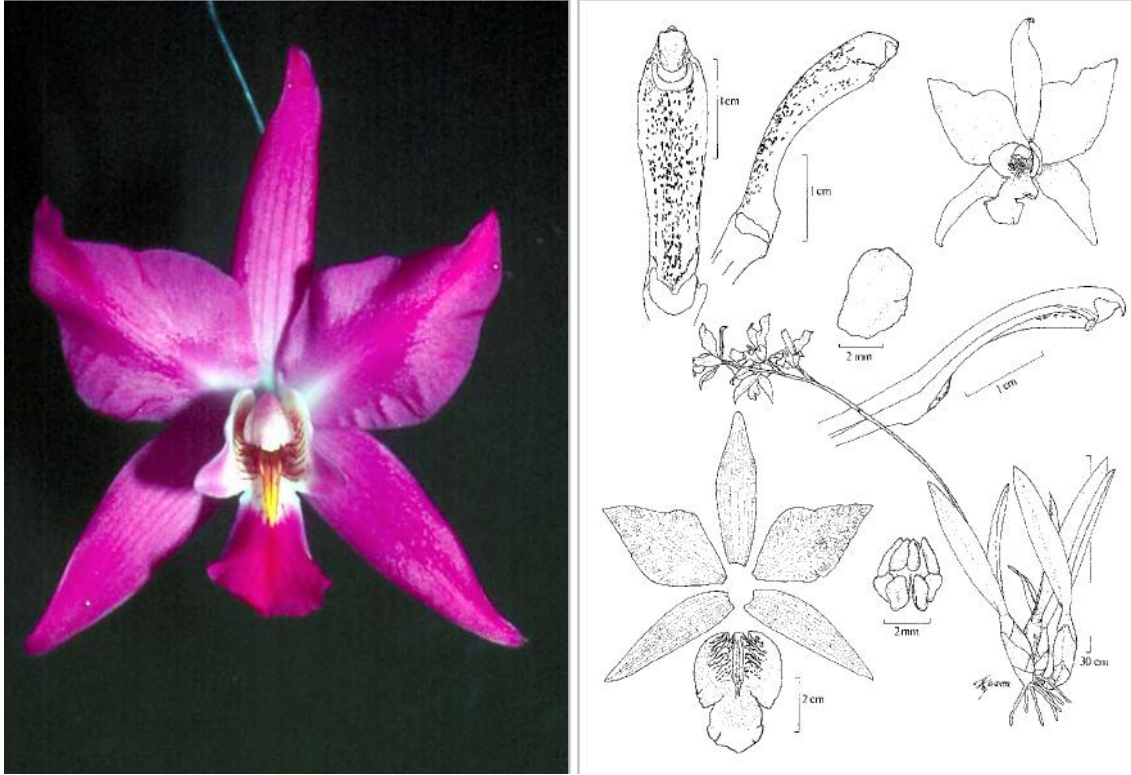


Figura 33: Características de *Laelia gouldiana*. Foto de una flor de *Laelia gouldiana*.
Lámina de las características de *Laelia gouldiana*
Tomada de Soto-Arenas y Solano-Gómez (2007).

9.2 Clasificación taxonómica

(Modificado de Téllez, 2011)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Oechidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: *Laeliinae*

Género: *Laelia*

Especie: *Laelia gouldiana*.