



CLAVE: 13DIT0001E

TITULACIÓN INTEGRAL TESIS PROFESIONAL

**"Aspectos ecológicos, etnobotánicos,
análisis fitoquímico y cultivo *in vitro* de
Catasetum integerrimum Hook. (Orchidaceae)"**

Para obtener el Título de
Licenciatura en Biología

Integrantes

Eleimy Hernández Bautista
Luis Angel F. Martínez Espinoza

Directora

Dra. Dorismilda Martínez Cabrera

Codirectora

Dra. Eva Aguirre Hernández

Marzo 2019



DEDICATORIA

Primer autor...

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial. A mi madre que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, acompañándome durante todo mi trayecto estudiantil y de vida. A mi padre por su apoyo incondicional y por sus consejos que han sabido guiarme para culminar mi carrera profesional. A mis hermanos que siempre han estado junto a mí y me han brindado su apoyo en todo momento. A mis tíos, por brindarme su apoyo y compartir conmigo buenos y malos momentos. A mi hija Jonely Charlyn por darle sentido a mi vida, encontrando el lado dulce de la vida, mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto y mis ganas de buscar lo mejor para ella. A mis amigos y compañeros por su compañía y amistad.

Segundo autor...

A Dios, por permitirme estar en esta vida, por estar en cada paso que doy, por su bondad y sabiduría el haberme dado salud para poder cumplir mis objetivos y permitirme conocer a personas durante mi formación profesional. A mis padres: Francisca e Hipólito por darme la vida, el quererme mucho y por no dejarme solo a pesar de las caídas que tiene esta vida. A mi abuelita hermosa mamá Chica, que amo tanto y que le tengo un enorme respeto por creer en mí, por darme la confianza de seguir mis estudios que día a día se esforzaba en su negocio para que pudiera culminar mi carrera y nunca retroceder. A mis hermanas por el amor y comprensión que tienen hacia a mí, en especial a Fabiola que nunca me dejó solo, mi confidente por todo su apoyo por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos de mi vida, las quiero mucho todo esto se los debo a ustedes. A mis tíos por los consejos y apoyo moral que me llevaron hacer una buena persona, A Chapis por ser una amiga y como una tía por estar siempre escuchándome y no dejarme vencer antes las adversidades y a todos mis amigos por compartir buenos y malos momentos gracias por su infinita amistad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que se involucraron en este trabajo y me brindaron su ayuda para que saliera adelante de la mejor manera posible.

Quedo agradecida con mis dos directoras de tesis. La Dra. Dorismilda Martínez Cabrera por la confianza brindada, amistad, apoyo en todo momento, disponibilidad, generosidad y su amplio conocimiento. A la Dra. Eva Aguirre Hernández por aceptar se parte del trabajo, por su confianza y todo el apoyo, orientación y motivación. A la M. en C. Lizbeth Mariel Zavala Ocampo por su amistad, asesoramiento técnico y apoyo en este trabajo en el Laboratorio de Fitoquímica, de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Gracias a ellas participé en congresos y he recibido una formación acadpémica para realizar este trabajo.

Así mismo agradezco al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila y al equipo de trabajo dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM, por brindar el apoyo en realizar la parte de micropropagación. Al M. en C. Octavio González Caballero y al Biol. Ángel Jiménez Rodríguez por su asesoramiento técnico y enseñanzas para realizar el cultivo *in vitro*.

Agradezco a la Ing. Rosalba Gutiérrez Galván por la revisión de la tesis.

Debo agradecer a los compañeros German e Israel por su apoyo y ayuda en las salidas a campo, que siempre estuvieron dispuestos a colaborar, a mi tío por ayudarme a coleccionar material vegetal.

A mi tío Antonino y a toda su familia, que durante mi estancia me recibieron en su hogar, brindándome su apoyo incondicional y motivándome para salir adelante, haciéndome sentir a gusto, todos los días.

También quiero expresar mis agradecimientos a mi familia, sin ellos no habría podido llegar a este punto. He tenido su amor, cariño, comprensión y su apoyo. Mis padres han sido los cimientos desde mi inicio en la carrera y me han apoyado en todo momento, en ocasiones difíciles de mi vida.

Por su apoyo, su ayuda en muchas ocasiones y por todos los momentos que hemos pasado juntos, por todas las conversaciones y los buenos momentos de amistad y compañerismo quiero agradecer a Luis Angel F., de quien también es este proyecto, mostrando un interés y amor por todo lo realizado.

A mis amigos y compañeros Mariana, Kiautsin, Beatriz, Herry del Angel, Luis Alberto y Jhosimar, que me han ayudado de una forma u otra en este trabajo. A mis profesores del ITH quienes fueron parte de mi formación académica, que hoy me permite titularme como Bióloga, la carrera más bonita que pude elegir. Y a todas las personas que han sido parte de mi vida, quienes me han brindado su apoyo y sus consejos para seguir adelante.

Eleimy Hernández Bautista

AGRADECIMIENTOS

Gracias a dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia, amigos durante mi trayecto de vida, mis maestros por el apoyo infinito, no ha sido sencillo el camino hasta ahora pero gracias a sus aportes de conocimiento, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos.

Gracias a mis dos directoras de tesis la Dra. Dorismilda Cabrera Martínez por su infinita paciencia, amistad, sabiduría, tiempo y sobre todo la confianza brindada hacia mi persona. A la Dra. Eva Aguirre Hernández el haber aceptado ser parte de este trabajo por su apoyo, tiempo, orientación y risas. A la M en C. Lizbeth Mariel Zavala Ocampo en el asesoramiento técnico, la amistad y el tiempo disponible durante la realización de mi estancia en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Agradezco al Dr. Victor Manuel Chávez Ávila y a su equipo de trabajo al M. en C. Octavio González Caballero y al Biol. Ángel Jiménez Rodríguez por el apoyo brindado de sus conocimientos a cada uno al realizar la parte de cultivo *in vitro*, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM.

Gracias los compañeros German e Israel por el apoyo en salidas de campo, por su valioso tiempo.

Siembra una buena y sincera amistad y muy probablemente el tiempo te permitirá disfrutar de una agradable cosecha, gracias al Sr. Antonino y a su esposa Apolonia y toda su familia por haberme abierto las puertas de su casa, por su apoyo incondicional y hacerme sentir como en casa durante mi estancia de residencia profesional en la ciudad de México.

Mis más sinceros agradecimientos a toda mi familia por el apoyo brindado, comprensión, amor y cariño sin ellos no habría podido llegar a donde estoy. Mis padres por darme esta vida y por ser los principales promotores de nuestros sueños.

Nuestras experiencias juntos, conviviendo, aprendiendo de cada aventura y risas, me han permitido tener una bonita amistad, gracias Eleimy por el apoyo incondicional y por ser parte de este proyecto.

La vida es más sencilla y mucho más divertida cuando la compartimos a lado de nuestros buenos amigos: Beatriz, Mariana, Luis Alberto, Kiautsin, Jhosimar y Herry, gracias amigos por su apoyo durante la realización de este trabajo. A mis profesores de la carrera, quienes fueron parte de mi formación académica.

Luis Angel F. Martínez Espinoza

ÍNDICE GENERAL

I.	ÍNDICE DE CUADROS.....	i
II.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
III.	RESUMEN	1
IV.	INTRODUCCIÓN	3
V.	ANTECEDENTES	5
	5.1 Trabajos con enfoque etnobotánico y ecológico en orquídeas.....	5
	5.2 Trabajos con enfoque fitoquímico y farmacológico.....	9
	5.3 Estudios de cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas.....	11
VI.	OBJETIVOS	14
	6.1 Objetivo general.....	14
	6.2 Objetivos específicos.....	14
VII.	MARCO TEÓRICO.....	15
	7.1 Generalidades de las orquídeas.....	15
	7.2 Descripción morfológica de la familia Orchidaceae.....	16
	7.3 Clasificación taxonómica.....	24
	7.4 Importancia ecológica y económica de las orquídeas.....	25
	7.5 Problemática y estrategias de conservación.....	27
	7.6 Descripción botánica de <i>Catasetum integerrimum</i> Hook.....	29
	7.7 Uso medicinal, fitoquímica y distribución.....	31
VIII.	METODOLOGÍA	32
	8.1 Descripción del área de estudio.....	32
	8.2 Trabajo de campo.....	35
	8.3 Análisis fitoquímico.....	39
	8.3.1 Obtención de extractos.....	40
	8.3.2 Identificación preliminar por cromatografía en capa fina de los metabolitos secundarios presentes en <i>Catasetum integerrimum</i> Hook.....	41

8.3.3 Separación cromatográfica por columna del extracto de acetato de etilo de <i>Catasetum integerrimum</i>	44
8.4 Cultivo <i>in vitro</i>	46
8.4.1 Selección y preparación del medio.....	46
8.4.2 Desinfección del material vegetal.....	48
8.4.3 Siembra <i>in vitro</i>	49
IX. RESULTADOS.....	52
9.1 Aspectos ecológicos y etnobotánicos.....	52
9.2 Análisis fitoquímico.....	57
9.2.1 Identificación de metabolitos secundario de <i>Catasetum integerrimum</i> por (CCF).....	57
9.2.2 Cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo de <i>C. integerrimum</i>	59
9.3 Cultivo <i>in vitro</i>	60
9.3.1 Germinación de semillas inmaduras.....	60
9.3.2 Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de tallos jóvenes de <i>Catasetum integerrimum</i> Hook.....	62
X. DISCUSIÓN.....	64
XI. CONCLUSIONES.....	69
XII. LITERATURA CITADA.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica (<i>Catasetum integerrimum</i> Hook).....	30
Cuadro 2. Sitos de muestreo pertenecientes a los tres municipios.....	35
Cuadro 3. Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica del extracto de acetato de etilo de raíz de <i>C. integerrimum</i>	44
Cuadro 4. Medio de MURASHIGE y SKOOG 1962.....	47
Cuadro 5. Lista de hospederos y los tipos de corteza que presentan.....	54
Cuadro 6. Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>C. integerrimum</i>	57
Cuadro 7. Número de semillas de <i>C. integerrimum</i>	60
Cuadro 8. Etapas de desarrollo posteriores a la germinación de las semillas en algunas especies de orquídeas.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Purépechas moliendo tallos de orquídeas para la elaboración de pegamento.....	6
Figura 2. Vendedor de Laelias.....	7
Figura 3. Tipo de crecimiento en orquídeas.....	16
Figura 4. Tipos de tallos en orquídeas.....	17
Figura 5. Diferentes formas de hoja.....	18
Figura 6. Tipos de raíz en orquídeas.....	19
Figura 7. Diferentes tipos de inflorescencias.....	20
Figura 8. Esquema de la flor de una orquídea.....	21
Figura 9. Diferentes formas de flores.....	22
Figura 10. Fruto y semillas de <i>Catasetum integerrimum</i>	23
Figura 11. Ubicación geográfica de la Región Huasteca de Hidalgo y los tres municipios de estudio.....	32
Figura 12. Vegetación de la Región Huasteca.....	34
Figura 13. Entrevista a pobladores y comerciantes de la región.....	36
Figura 14. Muestreo en fragmentos de Selva Mediana Subperennifolia.....	37
Figura 15. Colecta de material vegetal.....	38
Figura 16. Etapas del análisis fitoquímico de <i>C. integerrimum</i>	39
Figura 17. Preparación del material vegetal.....	40
Figura 18. Obtención de extractos orgánicos.....	41
Figura 19. Procedimiento de cromatografía en capa fina.....	43
Figura 20. Reunión de fracciones del extracto de acetato de etilo de <i>Catasetum integerrimum</i>	45
Figura 21. Material vegetal para el cultivo <i>in vitro</i>	46
Figura 22. Selección de fruto inmaduro.....	48
Figura 23. Elección de tallos para el cultivo <i>in vitro</i>	49
Figura 24. Procedimiento de siembra de semillas.....	50
Figura 25. Ejemplares de <i>Catasetum integerrimum</i> en vida silvestre.....	52
Figura 26. Hospederos a los que se encuentra asociada la orquídea.....	53
Figura 27. Abundancia de individuos de orquídea por hospedero.....	

identificado en la zona de estudio.....	54
Figura 28. Gráficas de abundancia.....	55
Figura 29. Macho de <i>Eulaema cingulata</i> visitando flor masculina de <i>Catasetum integerrimum</i>	55
Figura 30. Usos medicinales de <i>Catasetum integerrimum</i>	56
Figura 31. Porcentaje de los órganos de las planta utilizados.....	56
Figura 32. Identificación de terpenos en extractos de hexano y acetato de etilo de <i>Catasetum integerrimum</i>	57
Figura 33. Identificación de flavonoides de los extractos de acetato de etilo y metanol de <i>C. integerrimum</i>	58
Figura 34. Identificación de flavonoides Glicosilados de los extractos de acetato de etilo y metanol.....	58
Figura 35. Identificación de β -sitosterol por CCF.....	59
Figura 36. Perfiles cromatográficos de los precipitados de las fracciones 84-116 obtenidas del extracto de acetato de etilo de <i>C.</i> <i>integerrimum</i>	59
Figura 37. Semillas de <i>Catasetum integerrimum</i>	60
Figura 38. Germinación de semillas del fruto inmaduro.....	60
Figura 39. Estadios ontogénéticos de orquídea.....	61
Figura 40. Fases de germinación de semillas de <i>Catasetum integerrimum</i> ..	61
Figura 41. Establecimiento de tallos jóvenes.....	63

III. RESUMEN

Catasetum integerrimum Hook. es una especie nativa de áreas tropicales usada en la medicina tradicional. El objetivo del presente estudio fue conocer los aspectos ecológicos, caracterizar los metabolitos secundarios y realizar el cultivo *in vitro* de semillas inmaduras y tallos jóvenes. Se muestrearon 13 sitios con bosque tropical subcaducifolio en tres municipios de la región Huasteca Hidalguense, se registró la abundancia, hospederos y polinizadores. Por otra parte, se efectuaron entrevistas con la finalidad, de conocer su uso en la medicina tradicional. Para el análisis fitoquímico se utilizó la raíz de la orquídea, obteniendo distintos extractos (hexano, acetato de etilo y metanol) de éstos se identificaron terpenos y flavonoides con el método de cromatografía en capa fina. En el cultivo *in vitro* se emplearon tallos jóvenes y semillas inmaduras en un medio en un medio Murashige y Skoog (MS) ^{50/100} de sus componentes, con 30g/l sacarosa y 4g/l de agar. Los resultados muestran que los hospederos con mayor asociación de *C. integerrimum* en la zona de estudio son: *Sabal mexicana* (palma real), *Bursera simaruba* (chaca) y *Quercus oleoides* (encino); en las poblaciones registradas se detecta mayor abundancia de individuos masculinos en comparación con los femeninos; el polinizador que se identificó fue *Eulaema cingulata* (Apidae). La información etnobotánica indica que a esta orquídea se le conoce como trompa de puerco en la Huasteca Hidalguense y es empleada como remedio natural preparado en infusión, para tratar síntomas de colitis, enfermedades del riñón, diabetes y cáncer. Las pruebas fitoquímicas muestran que la raíz contiene metabolitos secundarios de tipo terpenoides (β -sitosterol, estigmaterol), flavonoides agliconas (canferol, quercetina, naringenina) y flavonoides glicosilados (rutina y naringina). En relación al cultivo *in vitro* se logró la germinación del 10% de las semillas a los 28 días de la siembra, a los 54 días se formaron los protocormos y estos fueron transferidos a medio MS donde iniciaron la formación de plántulas. Mientras que, en los tallos se estableció un método eficaz de desinfección y el cultivo en medio MS adicionado con concentraciones propias de auxina (ácido naftalenacético, ANA), citosina (benzil-amino purina, BAP). Este es el primer trabajo en *C. integerrimum* que aporta información sobre aspectos

ecológicos, etnobotánicos, fitoquímicos y de cultivo de tejidos con el propósito de generar conocimientos que sean útiles en el manejo y conservación de esta especie.

IV. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más ricas y diversas, se encuentran distribuidas alrededor del planeta en ambientes tropicales y subtropicales, se cuentan con un aproximado de 20 000 a 30 000 especies. Colocándolas en la familia con mayor diversidad, ausentes en desiertos verdaderos y en zonas con extremo frío, solo pocas se adaptan en ambientes fríos (Hágsater *et al.*, 2015).

A nivel internacional, México está considerado entre los cinco países con mayor número de especies de plantas vasculares (Llorente y Ocegueda, 2008). Esta gran diversidad florística se debe a la amplia variedad de condiciones fisiográficas y climáticas (Rzedowski, 1978).

Aunado a la riqueza natural, se suma su diversidad cultural. Cuenta con unas 1,400 especies de orquídeas, creciendo en casi todos los tipos de vegetación, sin embargo, la mayor parte se encuentra por debajo de los 2,000 metros sobre el nivel de mar, en las serranías del centro y sur del país, en diversos tipos de bosques tropicales y templados (Díaz-Toribio *et al.*, 2013).

Alrededor del mundo las orquídeas han sido consideradas una de las plantas más excéntricas por su peculiar composición y actualmente están siendo cultivadas con fines medicinales (Pant, 2013). Son un grupo de plantas muy admirables por la belleza de sus flores y a través de los años han generado interés por el uso ornamental, medicinal, alimentario y hortícola. La riqueza de especies de Orchidaceae está siendo amenazada debido a su vulnerabilidad, inestabilidad y al abuso en su uso como recurso y en consecuencia existe disminución de las poblaciones. Hoy en día en México se han extinto al menos 22 especies de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005).

En la Huasteca Hidalguense, se registran aproximadamente 30 especies de orquídeas, entre las que se encuentra *Catasetum integerrimum*. Esta especie se distribuye en los fragmentos de selva mediana subperennifolia de la región, se emplea en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y la diabetes. La extracción de *C. integerrimum* posiblemente este

disminuyendo las poblaciones de la zona. Por lo que, el presente trabajo tiene como objetivo principal conocer los aspectos ecológicos y etnobotánicos de esta especie. Asimismo, identificar los metabolitos secundarios que están presentes en la planta y evaluar la propagación *in vitro*.

V. ANTECEDENTES

5.1 Trabajos con enfoque etnobotánico y ecológico en orquídeas

Las especies vegetales son un banco de germoplasma e información genética importante y pueden ser la respuesta a muchos problemas de alimentación y salud para la humanidad. Se estima que el 80% de la población de los países en vías de desarrollo acuden a métodos tradicionales de medicina que involucran el uso de plantas de origen silvestre (Farnsworth, 1988).

La antropología ecológica y la etnobiología se han encargado de demostrar que los conocimientos ecológicos tradicionales de una etnia no son estáticos ni uniformes, sino que, más bien, se generan, mantiene y modifican de acuerdo a las ideologías locales, como así también en función de las influencias socioculturales externas incluso de la disponibilidad o de escasez de los recursos naturales. De ello, se desprende la idea de que lo ecológico necesita ser entendido en términos biológicos, sin dejar de lado su compleja relación con las prácticas culturales y económicas; implicando la transformación de los paradigmas como también la consecuente reorientación del desarrollo tecno-científico (Escobar, 1999).

El uso de las orquídeas, se basa en la parte aglutinante de la planta, el mucilago que es contenido de los pseudobulbos es usado en la fabricación de instrumentos musicales y plumería, y para la obtención del apreciado mucilago, se pelan los bulbos y se muelen para obtener una masa verde que se deja fermentar y posteriormente ser usado (Cox, 2013).

En la época de la Colonia de Felipe II, el médico Francisco Hernández vino a la nueva España a realizar una investigación acerca de las plantas medicinales de las tierras del nuevo continente y junto con los sabios indígenas describió e hizo dibujar un gran conjunto de plantas desconocidas hasta entonces en Europa. Posteriormente publicó los primeros dibujos de cinco orquídeas mexicanas de los generos: *Stanhopea*, *Laelia*, *Encyclia*, *Bletia* y *Vanilla planifolia*. En particular, la vainilla aparece ilustrada desde 1552 con el nombre de *tlixochitl* en el códice de la Cruz-Badiano (Hágsater *et al.*, 2005).

Durante el reinado de Itzcóatl (1427-1440) se utilizó la vainilla y durante los reinados de Motecuhzoma I Ihuicamina (1440-1469) y Axayácatl (1469-1482) se



Figura 1. Purépechas moliendo tallos de orquídeas para la elaboración de pegamento.

incrementado el conocimiento sobre las mismas y su consumo sustentable (Pant, 2013).

El uso principal de las orquídeas en el México precolombino fue para preparar un mucilago. De hecho, el nombre náhuatl para engrudo o pegamento, *tzauhtli* o *tzacutli*. Es el nombre genérico para la orquídea. Este mucilago se extraía de los cormos y pseudobulbos deshidratados y molidos de *laelias*, *prosthecheas* y *bletias* y una variante, el *tatzingui*. Era utilizado por los purépechas (Fig.1) (Hágsater *et al.*, 2005).

Las orquídeas no son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional como algunas otras plantas, sin embargo, existen registros de la utilización de algunas especies. Desde la época prehispánica y hasta nuestros días, muchas especies son utilizadas para adornar las celebraciones religiosas de las distintas culturas mexicanas, gracias a la belleza de las flores. Además de su uso medicinal,

usó esta planta como pago de tributos, sobre todo de los totonacas a los aztecas. Moctezuma (1502-1520) aromatizaba la bebida conocida como *xocolátl* hecha a base de cacao con el fruto maduro de esta orquídea y miel de abeja.

En la antigüedad las orquídeas eran empleadas en las prácticas tradicionales para el tratamiento de enfermedades, especialmente con función antagónica de tumores; por lo cual se les ha vinculado a la investigación de nuevos medicamentos, factor que ha

sobresalen también sus usos ceremoniales y artesanales para la elaboración de guirnaldas, coronas y ramilletes que adornan los altares con distinguidos colores y aromas, los géneros más utilizados con este fin son *Laelia* (por sus flores grandes y espectaculares) (Fig.2), y en menor medida *Barkeria*, *Oncidium*, *Prosthechea* y *Rhynchostele* (Solano *et al.*, 2011).

Los *Isochilus* son llamados en México “sanguinarias” y se emplean para curar desinteria; *Arpophyllum spicatum*, *Epidendrum anisatum*, *Bletia campanulata* y *B. coccinea* son señalados también para aliviar el mismo mal (Urbina, 1903)

Algunas orquídeas pseudobulbosas y terrestres, como *Prosthechea michoacana*, *P.varicosa* (camotes de agua) y *Rhynchostele bictoniense* (setsish), sirven para calmar la sed de los viajeros, quienes masticaban los seudobulbos para obtener un poco de su jugo acoso e insípido (Berlín *et al.*, 1974; Wright, 1963).

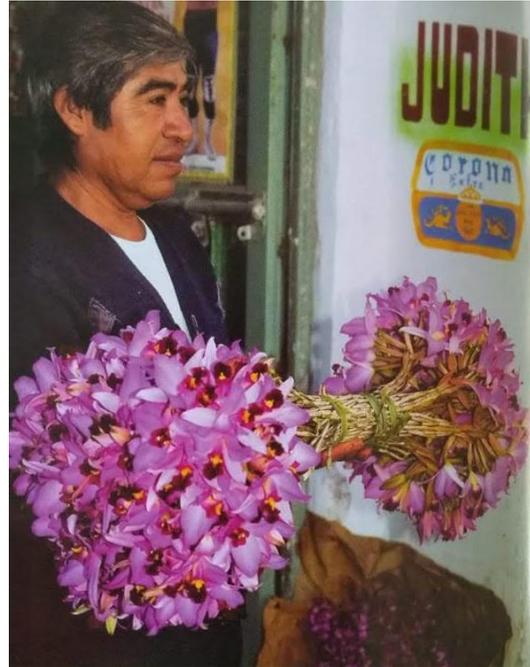


Figura 2. Vendedor de laelias (Tomado de Hágsater *et al.*, 2005)

Un uso muy diferente es el que se le ha dado a *Trichocentrum brachyphyllum*; esta especie que contiene alcaloides en sus hojas sustituye al peyote entre los rarámuri y puede ser alucinógeno (Bye, 1979; Schultes y Hoffmann, 1980).

En el centro de Veracruz y Chiapas, *Oncidium sphacelatum* es llamada flor de mayo, mayitos o “chorizo con huevo” nombre alusivo a su color amarillo y café rojizo. Durante la celebración de la Santa Cruz, el 3 de mayo, las cruces se adornan con las largas panículas (Hágsater *et al.*, 2005). En la Huasteca Hidalguense *Oncidium sphacelatum* también es usada para adornar las cruces el día 3 de mayo, es la flor representativa para la cruz que se lleva al cerro.

Asimismo, se reporta el uso medicinal de varias orquídeas mexicanas, entre ellas *Oncidium cavendishiaum* como antihistamínico, *Brassalova digbyana* contra el dolor de cabeza, *Catasetum maculatum* en abscesos e hinchazón (Del Amo, 1979; Mendieta y Del Amo, 1981). Por otra parte, Aguilar *et al.*, (1994), en una compilación de información etnobotánica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), mencionan el uso de *Catasetum sp.* como anticonceptivo y para curar la hinchazón.

Otros trabajos, también señalan que con los pseudobulbos de algunas especies se preparan cataplasmas, por ejemplo, *Catasetum integerrimum*, *Cyrtopodium macrobulbon*, *Bletia purpurea* y *Prostochea citrina* (García-Peña y Peña, 1981). Por lo tanto, es vigente recuperar y valorar el saber tradicional con respecto al uso de las plantas y aprovecharlas como recurso, así mismo analizar las relaciones hombre-planta, desde el punto de vista antropológico, ecológico, botánico y medicinal (Linares *et al.*, 1999).

Se han realizado trabajos con enfoque al conocimiento de estado poblacional de algunas orquídeas, en que podemos citar a Millán *et al.* (2007), quienes realizaron evaluaciones poblacionales para determinar la densidad y estado de conservación de la orquídea *Phragmipedium Kovachii*.

Por otra parte, Farfán (2008) realizó un estudio de biología reproductiva y demografía de *Epidendrum xanrhinum*, encontrando que esta orquídea presenta hasta nueve polinizadores lepidópteros. También señalan que la especie puede establecerse exitosamente en bordes de carretera y en zonas de pendiente, por lo tanto se hace una aproximación a la importancia de la reproducción asexual y en la ecología poblacional.

Existen pocos trabajos de la orquideoflora en la región Huasteca Hidalguense, entre los que podemos citar a Hernández y Hernández (2011), quienes realizaron un estudio de abundancia y diversidad de orquídeas en los ocho municipios que comprenden la Huasteca Hidalguense, inventariando 30 especies clasificadas en: Epidendroideae, Orchidoideae y Vanilloideae, también registran algunos hospederos y el tipo de vegetación en el que se localizan. En este listado

se encuentra *C. integerrimum*, mencionando a *Bursera simaruba* y *Guazuma ulmifolia* como sus principales hospederos.

5.2 Trabajos con enfoque fitoquímico y farmacológico

Los metabolitos secundarios son sustancias complejas, se los encuentran en concentración muy bajas, en el organismo del hombre ejercen una acción farmacológica o fisiológica, en la plantas su función no está muy clara; son usados como principios activos en la industria farmacéutica, también en dosis pequeña son usados para estudiar procesos bioquímicos (Cuevas *et al.*, 2016).

Las diferencias entre los metabolitos primarios y secundarios, es que los primeros tienen una función definida, en cambio, los metabolitos secundarios en algunos casos no tienen una función específica y no todos se encuentran en todas las plantas (Robles-García *et al.*, 2016). Sin embargo, otros autores mencionan que las estructuras vegetales de las plantas contienen componentes químicos (metabolitos secundarios) que pueden desempeñar funciones de protección contra patógenos, relación UV, plagas y comunicación para atraer polinizadores u otros (Mazid *et al.*, 2011; Pagare *et al.*, 2015).

Los principales metabolitos secundarios presentes en las orquídeas son: alcaloides, flavonoides, terpenoides, y estilbenoides (Marjoka *et al.*, 2016). En diferentes orquídeas se han logrado aislar un número significativo de fenantropiranos y estilbenoides (Sut *et al.*, 2017). También se ha reportado la presencia de saponinas y glucósidos (Marjoka *et al.*, 2016).

Varios metabolitos secundarios han sido aislados de las orquídeas, los cuales muestran una gran diversidad química cabe destacar los derivados fenólicos que por su uso terapéutico han sido utilizados para tratamientos contra el cáncer, la inflamación y la neuro degeneración (Sut *et al.*, 2017).

En algunas orquídeas con uso medicinal se ha identificado numerosos metabolitos secundarios que justifican sus propiedades medicinales, como alcaloides, flavonoides, fenaentrenos, antocioaninas, esteroles y terpenoides,

particularmente en los extractos de las flores y las hojas (Pérez, 2010; Hossain, 2011).

Son pocos los estudios fitoquímicos realizados en orquídeas. En especies brasileñas identificaron una glicosiflavonas metiladas (Williams *et al.*, 1994). Estudios farmacológicos realizados a distintas especies de orquídeas en Brasil, por ejemplo en *Oncidium flexuosum* se menciona el uso de esta planta en el proceso de cauterización y desinflamación de lesiones, donde se atribuye esta acción a la existencia de flavonoides y taninos dentro de su composición, también se menciona el género *Epidendrum* por poseer acción antitumoral, debido a la presencia fenantrenos en sus composición (Chinsamy *et al.*, 2014).

En la fragancia floral de *Catasetum maculatum* se aisló el óxido trans-carvona, el cual es epóxido de monoterpénico (Lindquist *et al.*, 1985) y en el caso de la *Phalaenopsis* ssp., orquídea mariposa se identificó el alcaloide derivado de la pirrolizidina, la phanaelopsina T (Fujiedaa *et al.*, 1998).

El fruto maduro de la vainilla se ha estudiado y utilizado como agente antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio y anticancerígeno (Sinha *et al.*, 2008., Shanmugavalli *et al.*, 2009). Los estudios se han realizado mayormente en el fruto beneficiado de la vainilla (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2008) y se han descrito alrededor de 200 metabolitos del aroma, e identificados estructuralmente como ácidos orgánicos, éteres, esterres, alcoholes, compuestos fenólicos y carbonilos (Klimes y Lamparky, 1976).

De estos compuestos casi un tercio son aromáticos volátiles, entre ellos destacan, por su concentración alta e importancia en el aroma cuatro compuestos fenólicos: ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanillico, *p*-hidroxibenzaldehido y vainillina; este último es el compuesto más abundante (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006).

5.3 Estudios de cultivo *in vitro* de Orquídeas

El término cultivo *in vitro*, se utiliza para denominar a los cultivos asépticos de origen vegetal. El cultivo *in vitro* ofrece ventajas adicionales a las técnicas convencionales de propagación, como son: germinar semillas que bajo condiciones de semilleros no germinan, o bien, obtener una rápida multiplicación a partir de pequeñas fracciones de la planta libres de patógenos.

La demanda de productos vegetales ha incrementado como las necesidades ecológicas de reforestación. Por lo que la conservación y propagación vegetativa a través del cultivo de tejidos es la alternativa. En el laboratorio de Cultivos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, de las 80 especies mexicanas amenazadas que se han regenerado, 25 son orquídeas de 16 géneros (Chávez *et al.*, 2012).

El uso de CTV con especies es una aplicación relativamente nueva de esta tecnología, que adquiere un gran valor como método de propagación particularmente para las especies en peligro de extinción nativas es una alternativa. El crecimiento de las orquídeas *in vitro* ha sido objeto de amplios esfuerzos de investigación sobre especies de interés comercial. La germinación de embriones de orquídea en medio preparados con sales de nutrientes, micronutrientes, hormonas y gelificantes ha sido la solución para que la industria propague masivamente a estas plantas que en la naturaleza, requieren de tiempo y condiciones muy particulares para crecer.

Para lograr la propagación de plantas por cultivo *in vitro*, es posible utilizar cualquier fragmento vegetal por ejemplo: tallos, parte de la flor, secciones de hojas, meristemas, células en suspensión, entre otros; a estos materiales biológicos se les denomina explantes. Mediante el uso de explantes es factible inducir la morfogénesis, término que se utiliza para denominar al conjunto de procesos relacionados con la diferenciación y desarrollo de órganos o tejidos para dar una planta completa (Fay, 1994).

La propagación y cultivo de las orquídeas fue revolucionando después del descubrimiento de Knudson (1922) de *Cattleya* y *Laelia* en agar en donde las semillas pudieron ser germinadas en un medio simple con azúcar. Este trabajo demostró que la germinación de semillas de orquídeas en condiciones *in vitro* fue posible sin la asociación con hongos. Posteriormente, el mismo autor propuso una nueva solución con la adición de nutrientes para la germinación de semillas de orquídeas en 1946. A partir de este momento muchas orquídeas se han regenerado y propagado a partir de segmentos de hoja (Murthy y Pyati, 2001).

Existen algunos trabajos de cultivo *in vitro* de orquídeas, entre los que podemos citar el de Mayo *et al.*, (2008) quienes realizan la germinación de orquídeas del estado de Tabasco (*Catasetum integerrimum* Hook, *Encyclia alata*, *Encyclia cordigera*, *Epidendrum flexuosum*, *Epidendrum shlocorynbos*, *Epidendrum stanfordianum*, *Myrmecophila sp.*, *Trichocentrum ascendes*, *Trichocentrum carthageneses*, *Oncidium sphacelatum*, *Prostochea cochleata*, *Nidema boothii* y *Trichocentrum lindeni*), obteniendo de un 70 a 90 % empleando los medios VW, MS y MS a la mitad de su concentración, todos ellos adicionados con 0.1% de carbón activado. Arenas y Aguirre (2012), establecen la micropropagación de *Barkeria scandens* evaluando el medio MS (Murashing & Shong) y KC (Knudson) con semillas inmaduras donde se utilizaron formulaciones basales solas o combinadas con el aditivo orgánico almidón de papa teniendo como resultado protocormos a partir de 108 días. Por otra parte, Carmona y Aguirre (2012), evaluaron la germinación y de proliferación *in vitro* en MS y KC de *Oncidium unguiculatum* Lindl., utilizando reguladores de crecimiento, logrando su germinación (formación de protocormos) en un 75% en 60 días.

Toledo *et al.* (2012), realizaron la micropropagación de *Chysis bractescens* con semillas en medio MS suplementando (ácido a-naftalenacetico ANA), (ácido indolacetico AIA) y (6-benziladenina BA). Se obtuvo un máximo de 1.2 brotes con 1mg/l ANA+3mg/l BA. Un máximo de 5.73 raíces en cada brote se obtuvo con 1mg/l ANA+1 mg/l AIA y un máximo de 6.73 hojas con 1mg/l ANA+3mg/l BA. Finalmente

se determinó que no es necesaria la adición de reguladores de crecimiento para promover la longitud del protocormo.

Ávila y Salgado (2006), establecieron métodos de propagación de nueve orquídeas mexicanas (*Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Euchile citrina*, *Epidendrum radicans*, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis*, *Lelia speciosa*, *Oncidium tigrinum* y *Oncidium cavendishianum*), se estableció un medio MS adicionado con concentraciones propias de auxina (ANA) citosina (BA) y ácido giberelico (GA₃), utilizado para a inducción de callo, proliferación de protocormos, en el que obtuvieron el 100% de germinación. Asimismo, Salgado *et al.* (2012), realizaron la propagación *in vitro* de especies de orquídeas de Michoacán que están registradas en categoría de riesgo: *Cuitlauzima pendula*, *Enclyclia adenocaula*, *Prosthechea citrina*, *Laelia speciosa*, *Oncidium tigrinum*, *Rossioglossum splendens* y *Rhynchostele cervantesii*, las cuales se obtuvieron a partir de segmentos de hojas y pseudobulbos en medio MS adicionado con auxina, citosina y giberelina.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Conocer los aspectos ecológicos y etnobotánicos, caracterizar los metabolitos secundarios y realizar el cultivo *in vitro* de *Catasetum integerrimum* Hook. (Orchidaceae).

6.2 Objetivos específicos

- Estimar el tamaño de las poblaciones presentes y su relación con factores ambientales (polinizadores, hospederos y abundancia) en tres municipios de la Región de la Huasteca Hidalguense: Atlapexco, Huejutla y Huautla.
- Determinar la utilidad que se le atribuye a *Catasetum integerrimum* desde el punto de vista etnobotánico, en los tres municipios de la región Huasteca.
- Identificar y separar por técnicas cromatográficas los metabolitos presentes en la raíz de *C. integerrimum*.
- Evaluar la germinación de semillas de esta especie en medios de cultivo.
- Establecer el cultivo *in vitro* de tallos jóvenes de *C. integerrimum*.

VII. MARCO TEORICO

7.1 Generalidades de las orquídeas

Las orquídeas son plantas herbáceas, muy conocidas por la belleza y elegancia de sus formas, por sus aromas y diversos colores, varios son los aspectos las cuales llaman la atención, algunas miden más de 30 cm y unas solo alcanzan unos milímetros, sus flores son agrupadas por racimos algunos hasta de 20 cm, y pueden tener variedad de colores, desde presentar colores blancos, tenues hasta rosas, rojas, amarillas, verdes, incluso azules, estas flores tienen una estructura similar sus diferentes partes desde sépalos, pétalos y una estructura partícula es el labelo o labio (Ramírez, 1996).

La familia Orchidaceae se distribuyen en todos los continentes (excepto en la Antártida) pero su mayor diversidad se concentra en la regiones tropicales. Se considera como la familia más diversa de las monocotiledóneas, posee especies con una amplia gama de aplicaciones, cosméticos, fármacos y perfumes (Sut *et al.*, 2017).

En México están registradas 1,260 especies y 170 géneros de orquídeas, con 40% de endemismos (Soto-Arenas *et al.*, 2007). Ocupan el tercer lugar a nivel nacional en cuanto a mayor diversidad taxonómica, siendo superadas por las familias Asteráceas y Fabáceas (Villaseñor, 2003). En el estado de Hidalgo se registran 17 familias de epífitas vasculares reconociendo nueve pertenecientes a las Pteridofitas y el resto a las Magnoliofitas, 64 géneros y 163 especies de epífitas vasculares. La familia mejor representada a nivel genérico es Orchidaceae con 28 taxa (Ceja-Romero, 2010).

Los ecosistemas de México más ricos y diversos en orquídeas son el bosque mesófilo de montaña (BMM), donde se encuentran 60% de sus especies, así como la selva tropical húmeda del sur del país (Hágsater *et al.*, 2005).

7.2 Descripción morfológica de la familia Orchidaceae

Las orquídeas son plantas herbáceas, perennes (raramente anuales), terrestres o epífitas, ocasionalmente trepadoras, algunas veces saprófitas o raramente, microparásitas, tienen variaciones morfológicas en cuanto a formas, tamaños y textura de hojas, tallos y raíces. Todas estas características las hacen ver muy diferentes (Tellez y Flores, 2007).

❖ Hábito de crecimiento

Plantas monopodiales: crecimiento vertical, sin pseudobulbos, posee un solo ápice vegetativo que si es destruido provocaría la muerte de la planta (Fig. 3) (Fischer, 2007).

Plantas simpodiales: crecimiento horizontal, con pseudobulbos y varios ápices vegetativos (Fig. 3) (Fischer, 2007).



Figura 3. Tipo de crecimiento en orquídeas. A) Orquídea monopodinal, B) Orquídea simpodial.

❖ Tallos

Es un órgano útil para efectuar la fotosíntesis, estos pueden ser de diferentes formas y de gran tamaño. Las orquídeas epífitas en la base de las hojas presentan estos órganos (almacenamiento de agua y alimento) (Freuler, 2008).

Su desarrollo es una respuesta adaptativa a los diferentes medios donde habitan las orquídeas: hay tallos aéreos, que crecen hacia arriba o colgado hacia abajo. Otro tipo de tallo es el pseudobulbo, característico de las orquídeas epífitas, que es un tallo engrosado carnososo de muy variadas formas dependiendo del género y la especie, que crece a partir del rizoma, siendo un tallo rastrero que se desarrolla paralelamente y sobre la superficie del sustrato. Los tallos subterráneos son los cormos y los tubérculos que funcionan como órganos de reserva y proveen agua y otras sustancias (Fig. 4) (Menchaca, 2011).



Figura 4. Tipos de tallos en orquídeas. A) Cilíndricos, B) Pseudobulbos, C) Cormos, D) Globoso, E) Ovoide, F) Oblongo, G) Cilíndrico y Segmentado, H) Clavado, I) Fusiforme (Tomado de Menchaca, 2011).

❖ Hojas

Presentan hojas simples, es decir no presentan divisiones, los márgenes son enteros y no tienen aserraduras ni espinas, su tamaño, color o textura depende del ambiente de procedencia. En lugares secos las hojas son carnosas y succulentas son alargadas y angosta, las cuales se conservan durante muchos años. En lugares muy cálidos las hojas son cilíndricas para evitar la deshidratación (Fig. 5) (Menchaca, 2011).



Figura 5. Diferentes formas de hoja. A) Elíptica, B) Lanceolada, C) Oblonga, D) Ovado-lanceolada, E) Lineal, F) Ligulada, G) Falcada (Tomado de Menchaca, 2011).

❖ Raíces

Es la estructura de la planta que la mantiene fija a la tierra o al sustrato y por medio de la cual toma agua y otros minerales del suelo, en las especies terrestres las raíces son iguales a la de cualquier otra planta: alargada y ramificada, cubierta con pelos absorbentes; sin embargo, en las epífitas presentan las raíces aéreas colgando o unidas a la corteza de los troncos. Con un diámetro de 1 y 10 mm dependiendo de la especie. Tanto en las especies terrestres como en las epífitas y litófilas, las raíces están protegidas por un tejido esponjoso de células muertas de color blanco o gris, llamado velamen que actúa como esponja y facilita la absorción del agua y de los gases del aire (Fig. 6). En el extremo de la raíz de las epífitas existe una parte verde, que tiene la función de realizar la fotosíntesis (Menchaca, 2011).



Figura 6. Tipos de raíz en orquídeas. A) Raíz fasciculada y tuberosa de *Dichromanthus cinnabarinus*, B) Raíz de *Cattleya purpurata* en crecimiento de color verde y la porción diferenciada en velamen de color blanco (Tomada de Hágster *et al.*, 2005). C) Raíz aérea en crecimiento de *Catasetum integerrimum*, (© Luis Angel Martínez Espinoza y Eleimy Hernández Bautista).

❖ Inflorescencias

En las orquídeas podemos tener diferentes tipos de inflorescencias. Por su inserción en la planta se clasifican en: axilar, la vara floral sale entre el tallo y la hoja; basal, la vara floral surge de la base del pseudobulbo; terminal, surge de la parte terminal del tallo o pseudobulbo (Fig. 7) (Freuler, 2008).

Por su forma se reconocen los siguientes tipos: espiga, las flores aparecen a partir de una vara central; panícula, la vara floral presenta varias ramificaciones, produciendo gran cantidad de flores que generalmente son pequeña; racimo, la vara floral presenta una ramificación donde se desarrollan las flores y umbrela, al final de la vara floral aparecen todas las flores alineadas en fila (Menchaca, 2011).

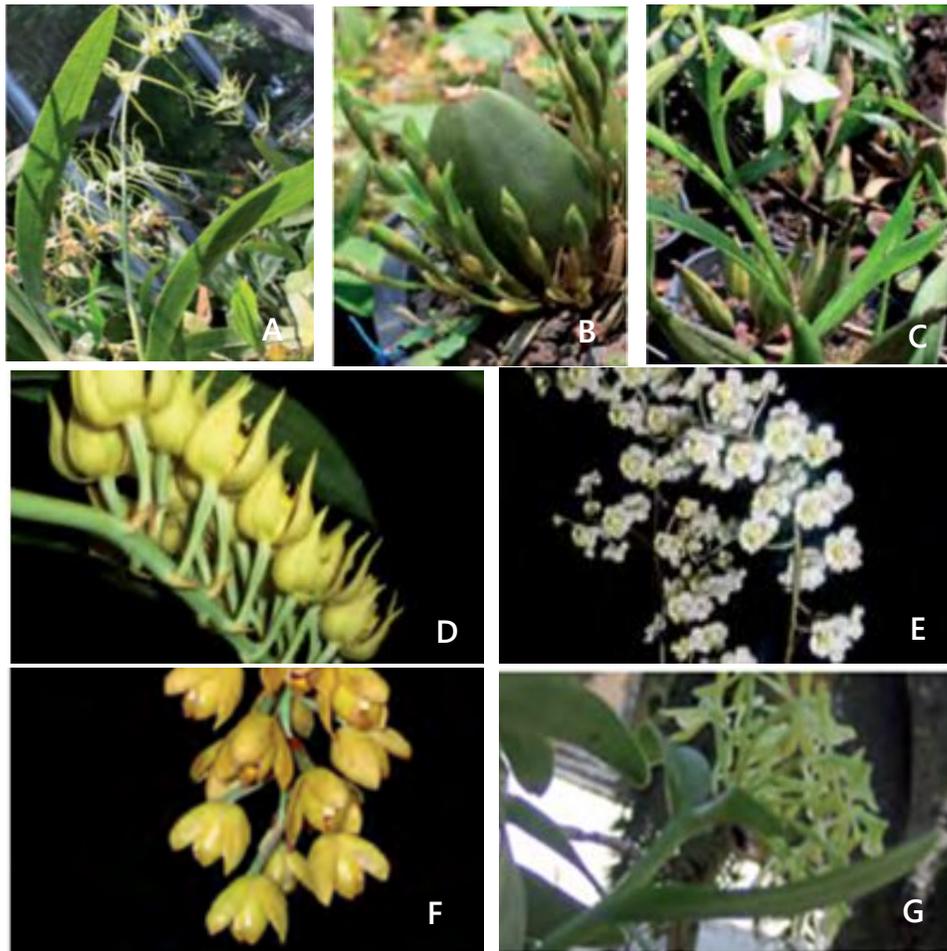


Figura 7. Diferentes tipos de inflorescencias. A) Axilar, B) Basal, C) Terminal, D) Espiga, E) Panícula, F) Racimo, G) Umbrela (Tomado de Menchaca, 2011).

❖ Flores

Sin duda, es la parte más atractiva de las orquídeas y la que más varía en su tamaño, presentan una fusión, entre los filamentos de los estambres y el estilo la cual incluye los órganos sexuales femeninos y masculinos, llamada columna o ginostemio. Posee tres sépalos y tres pétalos; uno de ellos es opuesto al o a los estambres puede ser diferente a los otros dos, ya sea en cuanto al tamaño, forma o coloración, además producen polen, compuestos aromáticos, aceites o pseudopolen. Este pétalo modificado llamado labio o labelo, es la parte más vistosa de la flor cuya función es la atracción de los insectos polinizadores (Fig. 8) (Hágsater *et al.*, 2005).

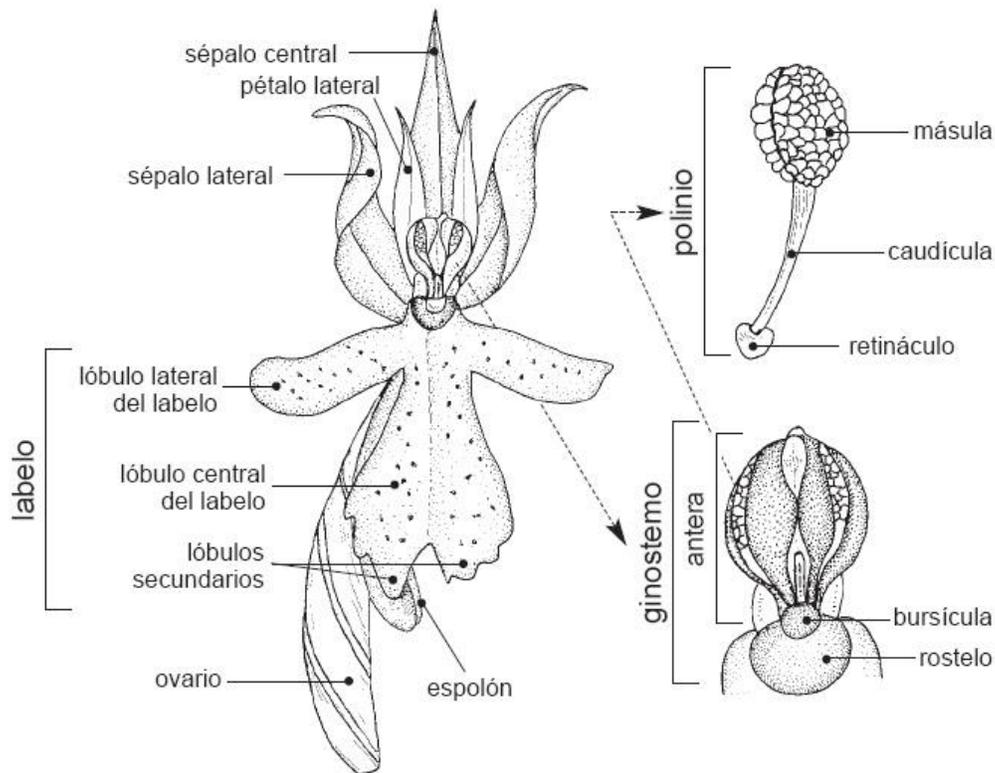


Figura 8. Esquema de la flor de una orquídea, con sus principales elementos (Tomado de *Bitacora Naturae*, 2007).

El polen es liberado en unidades formadas por cuatro granos (tétradas) que constituyen cuerpos más o menos sólidos llamados polinios (Menchaca, 2011). El

polen suele variar de consistencia desde ser suaves y cerosos hasta ser granuloso a duros. El número de polinios varía de acuerdo al grupo, entre dos y ocho rara vez hasta ocho, pueden ser removidos de una antera y depositados en estigma todos ellos juntos o por separados (Hágsater *et al.*, 2005).

Las flores son hermafroditas, es decir, en la misma flor se presenta tanto órganos sexuales masculinos (estambres y sus anteras) como femeninos (ovario, estilo y estigma) (Hágsater *et al.*, 2005). Pero pueden existir, en menor cantidad, las flores unisexuales que son las que tienen órganos masculinos o femeninos, pero no ambos, esto es con sexos separados, como en el caso de los géneros *Catasetum*, *Mormodes* y *Cycnoches* (Téllez y Flores, 2007). La flor presenta una simetría bilateral ya que al cortarla a la mitad quedan dos partes iguales. El tamaño de las flores varía, ya que pueden ser desde 3 mm hasta 25 cm de diámetro (Fig. 9).

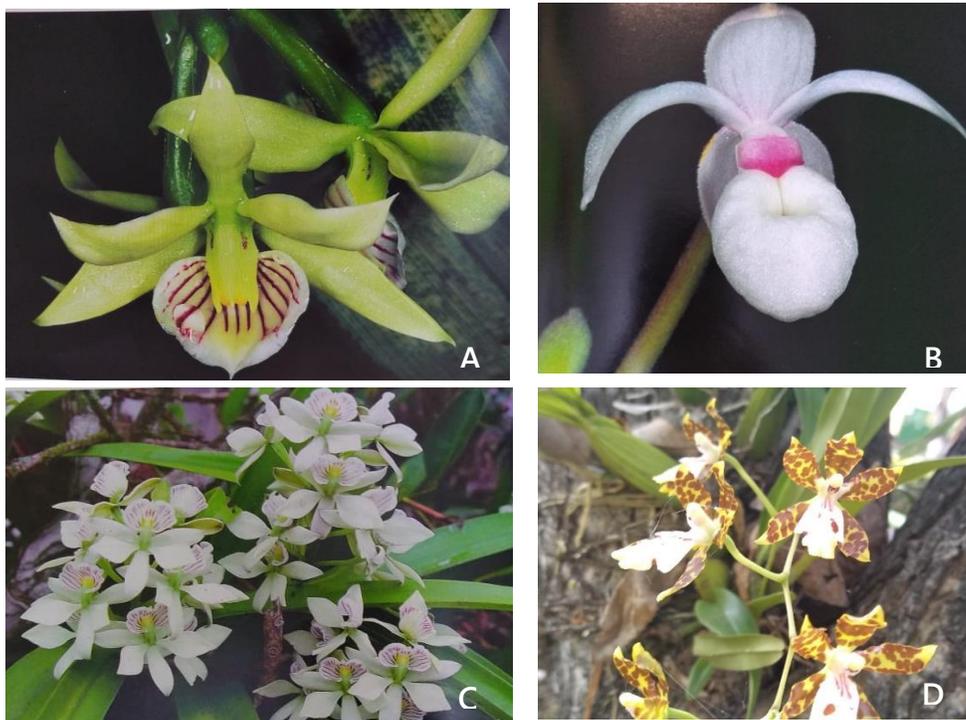


Figura 9. Diferentes formas de flores. A) *Prosthechea ionophlebia*, B) *Mexipedium xerophyticum*, C) *Prosthechea radiata* (Tomadas de Hágsater *et al.*, 2005); D) *Oncidium maculatum* (©Luis Angel Martínez Espinoza).

❖ Frutos

Son nombrados botánicamente como cápsulas que al madurar presentan varias aberturas longitudinales por las cuales desprenden las semillas. Los hay largos y ovalados o casi redondos, y pueden tener verrugas o ser muy angulosos (Hágsater *et al.*, 2005).

❖ Semillas

Estan hechas de una sola pieza o cotiledón (monocotiledóneas). En la parte interior de los frutos podemos encontrar miles de semillas. Su forma general varía desde forma de hilo (filiforme) o cilíndrica con punta (fusiforme) y en ocasiones parecen alas o protuberancias. El número de semillas por fruto varía entre unos pocos miles y cuatro millones; su tamaño es muy pequeño, miden entre 0.3 y 5 mm de largo, y pesan por lo general entre 0.4 y 2 μg (Fig. 10) (Arditti, 1992). Consta de una cubierta y un embrión, viéndose desprovista de endospermo que sirve para alimentar al embrión mientras salen sus hojas, la testa o cáscara está formada por células muertas y el embrión por un rango de entre 8 y 200 células. Su dispersión se hace generalmente con ayuda del viento.

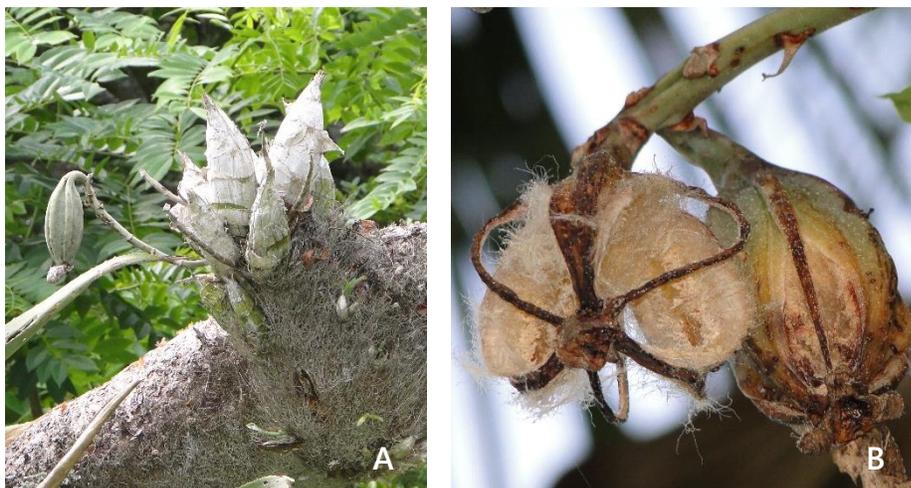


Figura 10. Fruto y semillas del género *Catasetum*. A) Cápsula en desarrollo, B) Cápsula en plena dehiscencia varios meses después, liberando millones de semillas diminutas (©Luis Angel F. Martínez Espinoza).

7.3 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la familia es compleja, de manera tradicional se ha basado en los caracteres morfológicos de la columna. Para su clasificación no se utilizan las formas de vida, distribución o el espectro ecológico de las especies. Sin embargo, parece estar bastante correlacionada con los desarrollos evolutivos del grupo más aceptado por la mayoría de los autores.

El uso de métodos que reconstruyen la historia evolutiva de los organismos y de uso accesos a nuevas fuentes de información, en particular las secuencias de ADN, han permitido conocer mejor las relaciones filogenéticas y proponer sistemas de clasificación más naturales (Dressler, 1993; Chase, 1999; Chase *et al.*, 2015).

En la actualidad se reconocen cinco linajes principales dentro de las orquídeas, consideradas de manera formal como subfamilias (Chase *et al.*, 2015). De acuerdo con su orden de aparición en el árbol evolutivo de la familia, éstas son: Apostasioides, Vanilloides, Cyripedioides, Orchidoides y Epidendroides.

Las Apostasoides se encuentran únicamente en el sureste asiático e incluyen solo dos géneros y unas 16 especies. Las Vanilloides hace poco tiempo fueron confirmadas como una subfamilia distinta (Cameron *et al.*, 1999). En México está representada solo por el género *Vainilla*. La subfamilia Cyripediodeae tiene una amplia distribución; tiene alrededor de 155 especies y cinco géneros de los cuales tres se encuentran en México. Por otra parte las Orchidoides abarcan 210 géneros y cerca de 5 000 especies, en México despliegan una diversidad importante y muchas especies terrestres pertenecen a este grupo.

La subfamilia Epidendroideae es el linaje más diverso tanto en número de especies y géneros como en hábitos y formas de vida, intervalo de tamaños y estrategias reproductivas y el grupo predominante en el biotopo epífita. El 80% de las orquídeas, es decir, cerca de 20,000 especies, pertenece a esta subfamilia. En México los grupos principales de orquídeas epidendroides son las Malaxideae, las Bletias, las Laeliinas, las Pleurothallidinas, las Oncidiinas, las Maxillariinas y las Catasetinas, además de muchos otros más pequeños (Hágsater *et al.*, 2005).

7.4 Importancia ecológica y económica de las orquídeas

Las orquídeas se han podido establecer en casi todos los ambientes de la tierra gracias a sus adaptaciones para soportar muy distintas condiciones tienen adaptaciones necesarias para habitar el ecosistema, la mayoría vive sobre los árboles (epífitas), algunas prefieren adherirse a rocas u hongos y otras son terrestres (Hágsater *et al.*, 2005).

Dentro de las familias de las orquídeas el 25% son terrestres pudiendo habitar en lugares húmedos o en hojarasca los cuales les permita absorber los nutrientes necesarios, el 5% capaces de crecer como epífitas o como plantas terrestres que puedan adherirse a rocas o troncos muertos cerca de arroyos y el resto son exclusivamente epífitas, que van a encontrarse a grandes alturas de los árboles ocupándolos como sostén para que puedan absorber agua de las lluvias y puedan alcanzar los rayos de la luz solar (Dressler, 1993).

Las orquídeas, cumplen importantes funciones ecológicas, además de ofrecer refugio a animales como pájaros, serpientes, y en especial a las hormigas, ofrecen néctar a abejas, mariposas, palomillas y colibríes, algunas aportan gotas de fragancia a machos de las abejas verdes y doradas (las Euglossinas), para que se perfumen y puedan atraer a las hembras. Son excelente en la convivencia y refugio de microorganismos, como hongos y bacterias (Ávila, 2015).

Al igual que todas las plantas con flores, las orquídeas necesitan de los polinizadores para reproducirse y factores físicos como temperatura y luminosidad para germinar. Sin embargo, algo que las caracteriza es la complejidad de sus interacciones con otros organismos, entre las cuales destaca la simbiosis micorrícica que se lleva a cabo con hongos micorrizógenos específicos, que ayudan a la planta a germinar proporcionándole carbono y minerales (Hágsater *et al.*, 2005).

No obstante, esta variabilidad en forma y tamaño, las orquídeas presentan una gran uniformidad en sus estrategias reproductivas: un 99% son hermafroditas es decir, sus flores desarrollan tanto polen como óvulos. En este grupo de orquídeas

el polinizador puede tanto depositar polen en el estigma como retirar polen de las anteras en ese orden en una sola visita (Romero-González, 2012).

La reproducción de estas plantas de flores exóticas es a base de polinización entomófila, desarrollando cápsulas llenas de semillas diminutas. Las cuales al salir, se dispersan por el aire depositándose en sitios donde deben encontrar condiciones óptimas para su germinación. Estas incluyen la presencia de un hongo micorrízico que es un requisito obligado para muchas especies para poder germinar, desarrollarse y nutrirse, proporcionándole carbohidratos que de otra forma no podría adquirir del medio ambiente (Camargo *et al.*, 2012).

Tradicionalmente las orquídeas han sido utilizadas por distintos pueblos con fines ornamentales y medicinales. Los chinos fueron los primeros en cultivarlas desde, aproximadamente, el año 500 a.C. Más tarde, en el siglo V, los griegos las empleaban como plantas medicinales. En América, los aztecas las utilizaban como plantas medicinales, especias, alimenticias y ornamentales.

Una de las orquídeas empleadas por este pueblo fue la popular vainilla (*Vanilla planifolia*), tlixochitl en náhuatl, utilizada para aromatizar el chocolate; que fue llevada a Europa por los conquistadores españoles a principios del siglo XVI y desde ahí a regiones tropicales como Madagascar, país que se ha convertido en el primer productor del mundo de esta especia, utilizada como saborizante y aromatizante en todo el mundo (Ossenbach, 2005).

Su cultivo es posible en todas partes, ya que muchos híbridos intergenéricos fueron creados y comercializados con éxito. La exportación para flor cortada y el cultivo en maceta afecta algunos géneros cuyo cultivo se practica en muchos países. Actualmente, las orquídeas son importante artículo comercial de la exportación y venta de plantas cultivadas.

7.5 Problemática y estrategias de conservación

México es un país megadiverso con graves problemas ambientales y sociales que ponen en peligro una parte importante de la biodiversidad. La alteración que muestran los ambientes naturales del país por la presión humana ejercida sobre ellos, por el mal uso y el abuso de los recursos naturales es muy notoria. Casi 30 millones de mexicanos viven principalmente de la agricultura y la ganadería en un país que es gran parte seco y montañoso. La deforestación en México ha alcanzado niveles alarmantes y se ha estimado en 4.2% anual (SEMARNAT, 2008).

Históricamente, el tráfico internacional de orquídeas se ha presentado tanto para satisfacer a aficionados como para integrarlas a las colecciones científicas. Con lo que se han cometido barbaridades contra las orquídeas; por ejemplo en el siglo XIII una comisión española embarcó 1,000 000 de ejemplares de orquídeas colombianas que cruzaron el mar para morir en la madre patria por desconocerse la manera de cultivarlas (Suárez, 2004).

Las orquídeas han sido colectadas desde hace muchos años principalmente por la belleza de sus flores, estas prácticas han traído consecuencias negativas para muchas poblaciones de estas plantas ya que hay especies de orquídeas que ya no están en los bosques y algunas otras siguen este mismo rumbo. Tal es el caso de *Mexipedium xerophyticum* y *Pragmipedium exstaminodium* subsp. *exstaminodium*, estas especies ya no pueden vivir en la naturaleza, pues son tan raras que sus poblaciones no son viables y los bosques donde viven están desapareciendo muy rápido (Díaz-Toribio *et al.*, 2013).

Aunque no se tiene cifras exactas, se sabe que en México se trafican más ejemplares de orquídeas que los que son vendidos legalmente, tanto en el comercio internacional como el local. Se estima, por ejemplo, que en los años noventa se traficaron ilegalmente en México 12 millones de plantas mientras que solo se vendieron legalmente 152,000 aproximadamente el 1% (Flores-Palacios y Brewster, 2002).

La desaparición de una especie de orquídea puede tener un impacto negativo en el futuro de los polinizadores específicos, ya que las relaciones de dependencia entre las dos especies son, en muchos casos, exclusivas.

La riqueza de las orquídeas está siendo amenazada debido a su vulnerabilidad, inestabilidad y el abuso en su uso como recurso y como consecuencia hay la disminución de sus poblaciones. Hoy en día en México se han extinto al menos 22 especies de orquídeas. En la Península de Yucatán varias están en peligro de extinción, como es el caso de *M. christinae*, debido a la reducción de su hábitat y perturbación ocasionada por el desarrollo urbano y turístico. Así mismo están en peligro de extinción *Cohniella cebolleta* y *Laelia rubescens* por la restricción de su área de distribución y perturbación (Carnevali, 2010).

Para la conservación de las orquídeas, se necesitan la participación conjunta de investigadores, viveristas, coleccionistas y sobre todo, de los poseedores del recurso en el campo, con el fin de conservar, lograr su manejo sustentable, generar una alternativa económica (Menchaca y Moreno, 2011). La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, una Ley General de Vida Silvestre y una norma que categoriza diversos organismos.

No comprar orquídeas que vengan directamente del campo ya que se pone en riesgo la supervivencia de las poblaciones en los bosques. Se han propuesto dos formas de conservación de los recursos genéticos, la conservación *in situ* y la conservación *ex situ*.

7.6 Descripción botánica de *Catasetum integerrimum* Hook.

Hierba epífita, de hasta 70 cm de alto. **Raíces** carnosas, de 2-6 mm de grosor, con raicillas colectoras rígidas, erectas, de 0.3-1 mm de grosor. **Pseudobulbos** de varios entrenudos, ovoides a fusiformes, de 7-26 x 2.5-8 cm, cubiertos por vainas foliares papiráceas terminadas en 1-3 espinas. **Láminas** foliares 6-10, dísticas, plegadas articuladas con las vainas, deciduas, oblongo-oblancooladas a elípticas, agudas a acuminadas, con 3-5 venas prominentes en el envés, de 7-60 x 2-16.5 cm. Inflorescencia racimosa, erecta, apareciendo en la base del brote inmaduro, produciendo flores masculinas o femeninas. Brácteas florales ovado-lanceoladas, agudas a cortamente acuminadas, de 8-16.5 x 4-9 mm. **Flores** unisexuales, dimórficas, no resupinadas, poco vistosas, intensamente fragantes durante el día. **Flores masculinas** verdes o verde amarillentas, frecuentemente esfumadas y/o manchadas de rojo-púrpura. **Ovario** subcilíndrico, abruptamente recurvado cerca del ápice, de 20-30 x 3.5-4.5 mm. **Sépalos** y pétalos formando una capucha amplia sobre la columna, prominentemente plurivenados, ligeramente quillados dorsalmente cerca del ápice, mucronados, el dorsal oblancoolado a elíptico-oblancoolado, obtuso o abruptamente agudo, de 32-50 x 9-24 mm; los laterales oblicuamente elíptico-oblancoolados, abruptamente agudos, con márgenes involutos, de 35-54 x 14-27 mm. **Pétalos** elípticos a elíptico-obovados, abruptamente agudos, con márgenes involutos, de 33-50 x 16-24 mm. **Labelo** calceiforme, subcónico, comprimido lateralmente, carnoso, rígido, de 25-29 mm de largo y 15-20 mm de ancho; abertura suborbicular, con margen entero, de 9-11 mm de diámetro, cerrándose justo frente a la columna y aquí con márgenes serrulados que casi se tocan. **Columna** trígona, rostrada, de 30-34 x 8-10 mm, la parte ventral con 2 antenas setáceas dirigidas hacia el interior del labelo, una de ellas doblada abruptamente, la otra arqueada hacia el fondo de la cavidad, sensitiva al contacto, provocando la expulsión automática del polinario, de ca. 20 mm de largo. **Antera** obclaviforme, bilocular, de 13-15 x 6-7 mm. **Polinario** de 11-14 mm de largo, recto; polinios 2, dorsiventralmente comprimidos, ovados, sulcados, amarillos; estípite oblongo, acanalado; viscidio masivo, oculto originalmente detrás del rostelo. **Rostelo** protuberante, carnoso. **Cavidad estigmática** cóncava, subcuadrada.

Flores femeninas verdes con el labelo a veces amarillo. **Ovario** subcilíndrico, paulatinamente engrosado hacia el ápice, sigmoide, de 25-40 x 6-8 mm. Sépalos y pétalos muy extendidos. **Sépalos** oblongo-rectangulares, obtusos, de 19-27 x 12-13 mm. **Pétalos** elíptico-rectangulares, obtusos, de ca. 20 x 18 mm. **Labelo** calceiforme, obovoide, comprimido dorsiventralmente, carnosos, rígido, de 20 mm de largo y 22 mm de ancho; abertura semiorbicular, con margen entero, de ca. 10 x 15 mm, con un diente romo, poco evidente, en el margen distal. Columna muy corta, semiterete, truncada, de ca. 8 x 9 mm. Antera y polinario vestigiales. Rostelo abreviado. Cavidad estigmática consistente en una angosta hendidura transversal, poco profunda. Cápsula elipsoide, con 6 costillas, glauca, péndula, de 8-10 x 3-6 cm (Hágsater y Salazar, 1990).

Taxonomía

Catasetum integerrimum fue descrita por William Jackson Hooker y publicado en *Botanical Magazine* en 1840.

Catasetum nombre genérico que procede del griego “kata”=“bajo” y del latín “seta” = “seda”. Por los dos apéndices prolongación de la columna, parecidos a antenas, que están vueltos hacia abajo en las flores macho de la mayoría de las especies.

integerrimum: epíteto latino que significa “entera, sin dientes”

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Catasetum integerrimum* Hook. (Dressler, 1993).

Clasificación taxonómica de <i>Catasetum integerrimum</i> Hook.	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroide
Tribu	Cymbidieae
Subtribu	Casetinae
Género	<i>Catasetum</i>
Especie	<i>Catasetum integerrimum</i> Hook.

7.7 Uso medicinal, fitoquímica y distribución

Conocida en la lengua maya como Ch'itku'uk (cuya traducción al español sería “inflamado por dentro”), esta especie es usada en Quintana Roo para el tratamiento de mordedura de víbora, en tabasco para curar los “nacidos” y en Yucatán para deshacer tumores y para curar forúnculos, llagas y heridas en la piel, los pseudobulbos son pelados, salados y asados para su aplicación (Cox, 2013). Los pseudobulbos de esta especie son mezclados con las flores de *Laelia auntumnalis* para la preparación de infusiones contra la tos (Martínez, 1959).

Existe un trabajo de estudios fitoquímicos de *C. integerrimum*, Mendieta (2017), identificó ácidos fenólicos y flavonoides presentes en extractos de acetato de etilo de raíz y evaluó la citotoxicidad de los extractos de acetato de etilo de hoja, pseudobulbo y raíz de *C. integerrimum* en dos líneas celulares humanas de cáncer de mama: insensible a estrógenos y sensible a estrógenos, donde las hojas y raíz tuvieron actividad contra el cáncer de mama insensible a estrógenos y el pseudobulbo fue activo contra el cáncer de mama sensible a estrógenos, mostrando que la raíz tiene el efecto más potente. Por otra parte el análisis fitoquímico identificó como componentes activos a los ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales podrían combatir el carcinoma humano.

El género *Catsetum* tiene aproximadamente unas 130–140 especies distribuidas desde el noroeste de México hasta el norte de Argentina. Sin embargo, *C. integerrimum* es poco frecuente, que se encuentra en los bosques húmedos, prosperando en lugares altamente perturbados. En nuestro país se encuentra distribuido en los estados como Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Veracruz, Puebla, Querétaro, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Hágsater y Salazar, 1990).

VIII. METODOLOGIA

8.1 Descripción del área de estudio

El presente trabajo, se efectuó en tres municipios de la región de la Huasteca Hidalguense: Atlapexco, Huejutla y Huautla (Fig. 11). La Huasteca se encuentra ubicada entre los meridianos 98°17' y 98°37' de longitud oeste y los paralelos 21°13' y 21°15' de latitud norte (INEGI, 1992).

Limita al norte con los estados de San Luis Potosí y Veracruz; al este con Veracruz; al sur con Veracruz y el municipio de Calnali del estado de Hidalgo; al oeste con el estado de San Luis Potosí y los municipios de Tlanchinol y Lolotla, también del estado de Hidalgo. Este lugar es la región más baja de la entidad, las montañas son poco altas y el suelo casi no tiene ondulaciones.

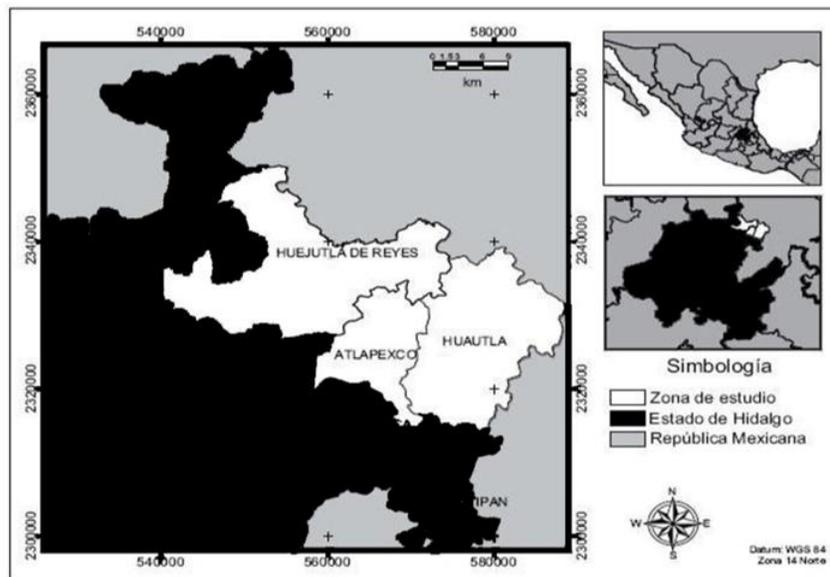


Figura 11. Ubicación geográfica de la Región Huasteca Hidalguense y los tres municipios de estudio.

Es una región de gran colorido étnico por la abundante población indígena de origen náhuatl, cuya cultura, lengua y artesanías imprimen su particular sello a la región. La planicie costera del golfo Norte, ocupa solo por una parte de los municipios de Huejutla y Huautla (INEGI, 1992).

Clima

Presenta zonas de clima cálido y semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano y principios de otoño, en municipios de Huejutla, San Felipe Orizatlán, Huautla, Atlapexco, Xochiatipan y Jaltocán (INEGI, 1992).

Vegetación

Presenta una vegetación muy verde y variada a continuación se describe cada una de ellas.

Bosque tropical perennifolio. Este tipo de vegetación se desarrolla en México en altitudes de 200 a los 1000 msnm, en la Huasteca se observa principalmente en Yahualica y Huautla. En Orizatlán, Huejutla, Jaltocán y Xochiatipan la selva prácticamente ha desaparecido (Villavicencio y Pérez, 2010). La selva se caracteriza por la presencia de árboles como *Brosimum alicastrum* (ojite), *Protium copal* (copal), *Bursera simaruba* (chaca) y *Cedrela odorata* (cedro) (INEGI, 1992).

Bosque mesófilo de montaña. En la región Huasteca ha quedado reducido a manchones pequeños en Huejutla, Huazalingo y Yahualica, este bosque presenta arboles como *Liquidambar styraciflua* (copal o suchiate), *Quercus* (encinos), *Clethra mexicana* (zapotillo) y *Carpinus caroliniana* (corriosillo). Se registra la presencia de helechos arborecentes del género *Cyathea*. Abundan las plantas trepadoras como *Smilax* sp (zarzaparrilla), *Vitis tilifolia* (mecate de uva), así como orquídeas y epífitas como las bromelias (INEGI, 1992).

Bosque de encino. El encinar se presenta en zonas francamente tropicales en parte de la Huasteca. En clima caliente constituyen una condición relictual y se correlaciona con los avances de los glaciares de Pleistoceno. Así este bosque puede considerarse como refugio de especies. El bosque de encino se observa en Huautla, Atlapexco y Yahualica (Villavicencio y Pérez 2010). La huasteca también es rica en frutas tropicales como: naranja, plátano, tamarindo, mamey, cacao, café, y caña de azúcar.

Fauna

Su fauna es muy abundante, hay aves como: tórtola, clarín, jilgueros, ceniztla, cuitatoca, águila, cuervo, calandrias, paloma, papán, garzas, tordos, alondras, cotorras, palomas, ruiseñor, codorniz, guajolote silvestre y colibríes.

Entre los mamíferos hallamos conejos, tejones, tlacuaches y es posible encontrar algún jabalí, gato montés, coyote y venado cuachichoco. Tiene reptiles pequeños y serpientes, algunas muy venenosas, como el coralillo, la nauyaca, boa constrictor y metlapil o mano de metate. También encontramos ríos, como el Calabozos, Amajac, Candelaria y Hules, corrientes de agua que van a desembocar al río Pánuco y luego al Golfo de México (Guía Hidalgo, 2015).



Figura 12. Vegetación de la Región Huasteca Hidalguense. A) Vegetación presente en Atlapexco, B) Vegetación presente en Huautla, C) Vegetación presente en Huejutla, (© Luis Angel F. Martínez Espinoza).

8.2 Trabajo de campo

En cuanto al trabajo de campo se refiere, se muestrearon 13 sitios pertenecientes a los 3 municipios (Cuadro 2), el trabajo se dividió en tres partes, la primera obtención de información por medio de entrevista a pobladores y determinar la utilidad que se le da a la orquídea desde el punto de vista etnobotánico, la segunda realizar muestreos en áreas con vegetación para estimar el tamaño de las poblaciones (individuos femeninos y masculinos), hospederos en cada sitio y polinizadores La tercera coleccionar material vegetal para el estudio fitoquímico y cultivo *in vitro* de la especie.

Cuadro 2. Sitios de muestreo pertenecientes a los tres municipios (Huejutla, Atlapexco y Huautla).

Municipio	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
	Xiloco	21°11'25''	98°48'44''	417
	Santa Catarina	21°09'78''	98°37'75''	215.44
HUEJUTLA	Rancho la Güera	21°07'22''	98°23'40''	319
	Las chacas	21°12'37''	98°41'98''	147.91
	Chacatitla	21°08'09''	98°23'58''	266
	Ixtacuayo	21°05'75''	98°38'76''	286.57
ATLAPEXCO	Cuatapa	21°07'36''	98°37'21''	337.4
	Valle verde	21°07'09''	98°37'31''	147
	La puerta	21°05'69''	98°26'97''	500
	Cuatenahuatl	21°06'31''	98°27'76	448.6
HUAUTLA	Hernandeztla	21°01'25''	98°30'34''	546
	El Barbecho	21°02'10''	98°18'46''	507
	Pautitla	21°05'80''	98°27'24''	459

1. Para la obtención de información acerca de los usos, partes que son usadas, lugares de colecta, y otros aspectos, se realizó por medio de una comunicación personal con los habitantes de la zona y vendedores que se dedican a la compra y venta de plantas medicinales (Fig. 13). Esto se llevó a cabo, por medio de entrevistas semiestructuradas, donde las personas que fueron entrevistadas por lo general eran adultas, personas que conservan el

uso de remedios naturales y personas que se dedican a vender en los tianguis plantas curativas de la región.



Figura 13. Entrevista a pobladores y comerciantes de la región Huasteca. A-B) Atlapexco, C-D) Huejutla, E-F) Huautla (©Eleimy Hernández Bautista).

2. Se hicieron salidas a campo durante los meses de septiembre-noviembre, en los 13 sitios pertenecientes a los tres municipios, estos fueron ubicados en puntos de verificación de la vegetación con fragmento de selva mediana subperennifolia (bosque tropical subcaducifolio *sensu* Rzedowki, 1978) con un intervalo altitudinal entre los 100 a 500 msnm. Se tomaron fotografías de la vegetación, se colectaron ejemplares botánicos de los hospederos a los que se encuentra asociada la orquídea, mismos que fueron identificados con la ayuda de claves taxonómicas especializadas (Pennigton y Sarukhán, 1998), se contabilizó el número de individuos masculinos y femenino, se determinó la abundancia de la especie en cada sitio, como el polinizador en el área de estudio.



Figura 14. Muestreo en fragmentos de selva mediana subperennifolia. A) Fragmento de selva, B) Hospedero *Quercus oleides*, C) Hospedero *Cecropia obtusifolia*, D) Flor masculina de *C. integerrimum*, E) Flor femenina de *C. integerrimum* (©Eleimy Hernández Bautista).

3. La obtención del material vegetativo (raíz y pseudobulbo) y reproductivo (cápsula) de la especie, fueron realizadas en dos lugares diferentes, los pseudobulbos se colectaron en la localidad de Cuatapa, Atlapexco y La

Puerta, Huautla (Fig. 15). Se eligieron pseudobulbos jóvenes y que estuvieran en buenas condiciones para llevar a cabo el cultivo *in vitro*. La cápsula y la raíz se colectaron en la localidad de Rancho La Güera, Huejutla, Hidalgo, ya que presentaba abundancia de individuos en una especie de palma (Fig. 15).



Figura 15. Colecta de material vegetal. A-B) Tallos jóvenes, C-D) Raíz y plántulas de *Catasetum integerrimum* (©Eleimy Hernández Bautista).

La determinación taxonómica de la especie fue corroborada por la Dra. Dorismilda Martínez Cabrera, el material colectado se resguardó en el Herbario HERITH del Instituto Tecnológico de Huejutla, para el posterior traslado al Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, donde se realizó el análisis fitoquímico con la raíz de *Catasetum integerrimum*. Asimismo, los pseudobulbos jóvenes y cápsulas se trasladaron al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, para la micropropagación de tejidos.

8.3 Análisis fitoquímico

Diagrama general del diseño experimental seguido en la parte fitoquímica para la obtención de extractos y la separación e identificación de los metabolitos secundarios en *C. integerrimum* (Fig. 16).

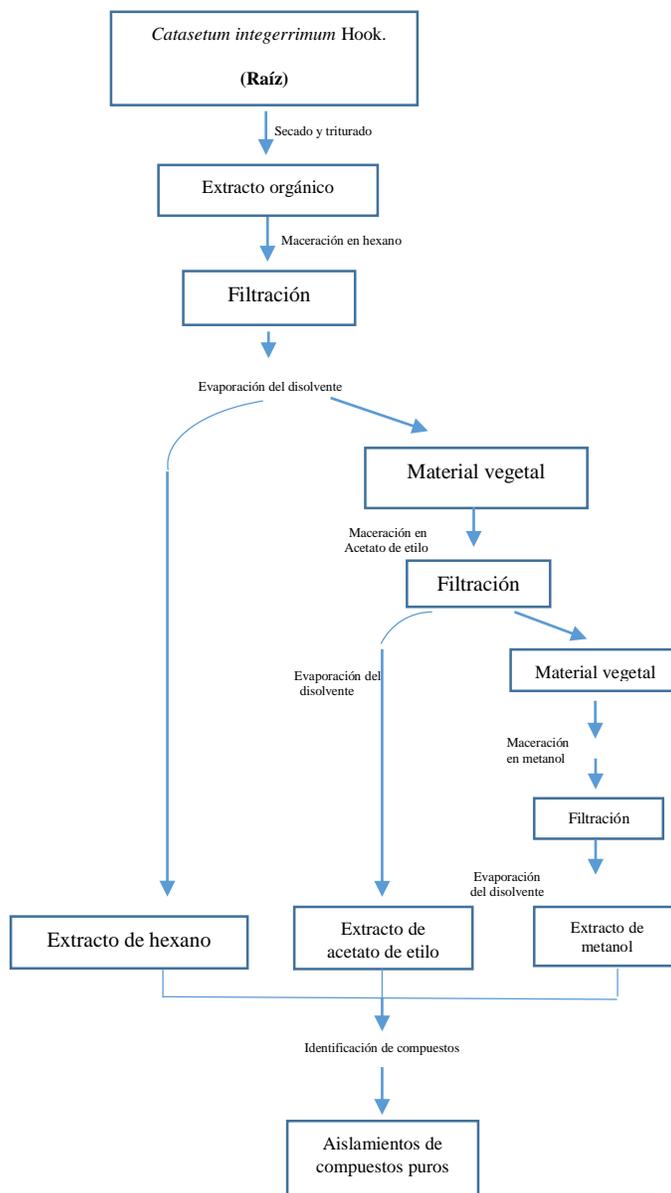


Figura 16. Etapas del análisis fitoquímico de *C. integerrimum*.

Para la obtención de extractos orgánicos de *Catasetum integerrimum*. Se pesaron 119.5 gramos de raíz misma que fueron secadas a temperatura ambiente y dos meses después de la colecta se trituraron completamente y se colocaron en frascos para su posterior maceración con diferentes disolventes (Fig. 17).



Figura 17. Preparación del material vegetal: A) Limpieza y trituración de la raíz, B) Maceración de la raíz en hexano. (©Luis Angel F. Martínez Espinoza).

8.3.1 Obtención de extractos

La raíz seca se sometió a tres extracciones de 24 horas cada una, utilizando tres disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol). El exceso de disolvente se eliminó en un rota evaporador y finalmente, una vez obtenido el extracto, se colocaron en frascos de cristal y llevados a una campana de vacío para su secado (Fig. 18). Los extractos fueron pesados para calcular su rendimiento.



Figura 18. Obtención de extractos orgánicos: A) Maceración y filtración, B) Destilación del disolvente y C) Extracto.

8.3.2 Identificación preliminar por cromatografía en capa fina de los metabolitos secundarios presentes en *Catsetum integerrimum* Hook.

Los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *C. integerrimum* se identificaron por medio de cromatografía en capa fina (CCF). Para ello, se utilizaron placas de sílica gel (Merck) de 8.5 x 10 cm y 0.1 mm de espesor. Se trabajaron con dos grupos de metabolitos secundarios: terpenos y flavonoides, mediante la siguiente metodología:

Terpenos. Las muestras de cada uno de los extractos, así como los estándares se aplicaron en las placas cromatográficas. Los terpenos utilizados fueron β -sitosterol, ácido ursólico, ácido oleanólico y estigmasterol de la marca Sigma-Aldrich. Las placas se colocaron en una cámara de cromatografía con 5 mL de una fase móvil de hexano-acetato de etilo (7:3 v/v). Posteriormente, las placas fueron observadas en una cámara de luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm) y finalmente fueron revelados con el reactivo de vainillina para identificar terpenoides (Fig.19) (Wagner y Bladt, 1996).

Flavonoides. Para la detección de flavonoides agliconas se aplicaron en las placas cromatográficas los extractos de acetato de etilo y metanol y los estándares canferol, naringenina y quercetina (Sigma-Aldrich). Para el corrimiento de la placa se utilizó 10 mL de una mezcla de cloroformo-acetona-ácido fórmico (12:2:1 v/v/v). Posteriormente, la placa se asperjó con el reactivo de Productos Naturales (Wagner y Bladt, 1996) y fue observada en una cámara de luz UV en una longitud de onda de 365 nm.

Para la identificación de flavonoides glicosilados, los extractos de acetato de etilo y metanol fueron aplicados en la placa cromatográfica y la naringina y rutina como estándares. La fase móvil que se preparó fue acetato de etilo-acetona-ácido fórmico-ácido acético-agua (12:6:1:1:1 v/v/v/v/v). La placa fue revelada con el reactivo de Productos Naturales y observada en una cámara de luz UV a una longitud de onda de 365 nm (Wagner y Bladt, 1996).

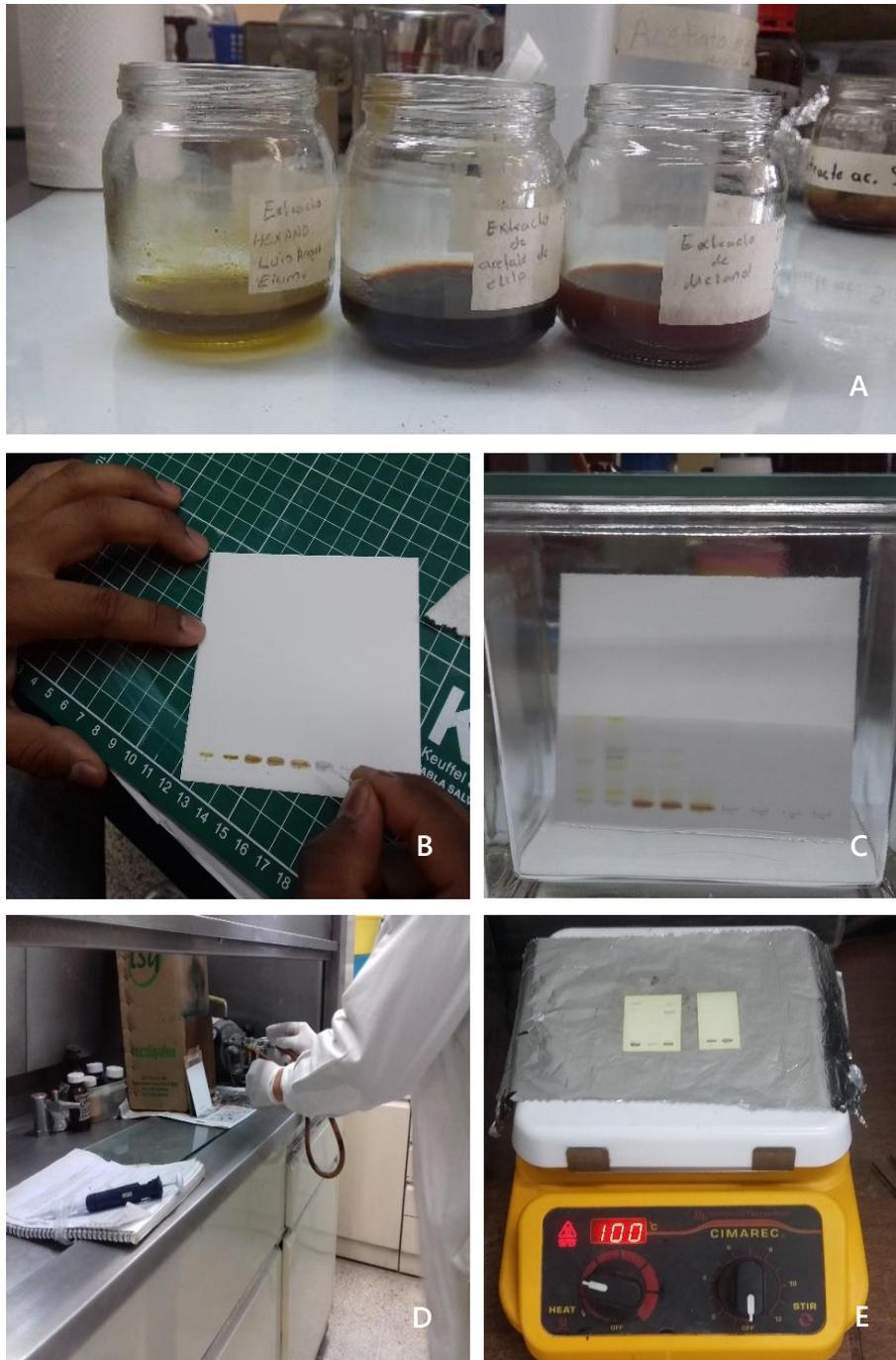


Figura 19. Procedimiento de cromatografía en capa fina. A) Extractos de raíz, B) Aplicación de muestras, C) Corrimiento de la placa en la fase móvil, D) Aplicación del revelador y E) Calentamiento de la placa.

8.3.3 Separación cromatográfica por columna del extracto de acetato de etilo de *Catsetum integerrimum*

En virtud de que en trabajos previos realizados *C. integerrimum* tuvo actividad citotóxica en líneas celulares (Mendieta, 2017), se procedió en este trabajo a hacer la separación de los componentes de los extractos de acetato de etilo (2.98g), se realizó por cromatografía en columna convencional sobre gel de sílice 60 GF 254 (Merck), utilizando como disolventes hexano y polaridad creciente con acetato de etilo, hasta eluir con acetato de etilo (100%), posteriormente con mezclas de acetato de etilo-metanol (9:1,8:2, 7:3, 6:4, 1:1 y metanol al 100%). Finalmente, se obtuvieron 8 fracciones con etanol al 70%. Las fracciones de 50 ml se colectaron en matraces bola y se concentraron en un rota evaporador. En total se obtuvieron 171 fracciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica del extracto de acetato de etilo de raíz de *C. integerrimum*.

Sistema de elución	Proporción de disolventes	Fracciones obtenidas
Hexano	100%	4
Hexano:acetato de etilo	9:1	5-10
Hexano:acetato de etilo	7:3	11-16
Hexano:acetato de etilo	6:4	17-27
Hexano:acetato de etilo	1:1	29-44
Hexano:acetato de etilo	4:6	45-54
Hexano:acetato de etilo	3:7	55-57
Hexano:acetato de etilo	2:8	58-71
Hexano:acetato de etilo	1:9	72-87
Acetato de etilo	100	88-109
Acetato-metanol	9:1	110-124
Acetato-metanol	8:2	125-127
Acetato-metanol	7:3	128-139
Acetato-metanol	6:4	140-149
Acetato-metanol	1:1	150-159
Metanol	100 %	160-163
Etanol	70%	164-171

Por cromatografía en capa fina se detectó la complejidad y pureza de cada fracción reuniendo las fracciones semejantes (Fig. 20). Se purificaron los compuestos mediante la técnica de cristalización.

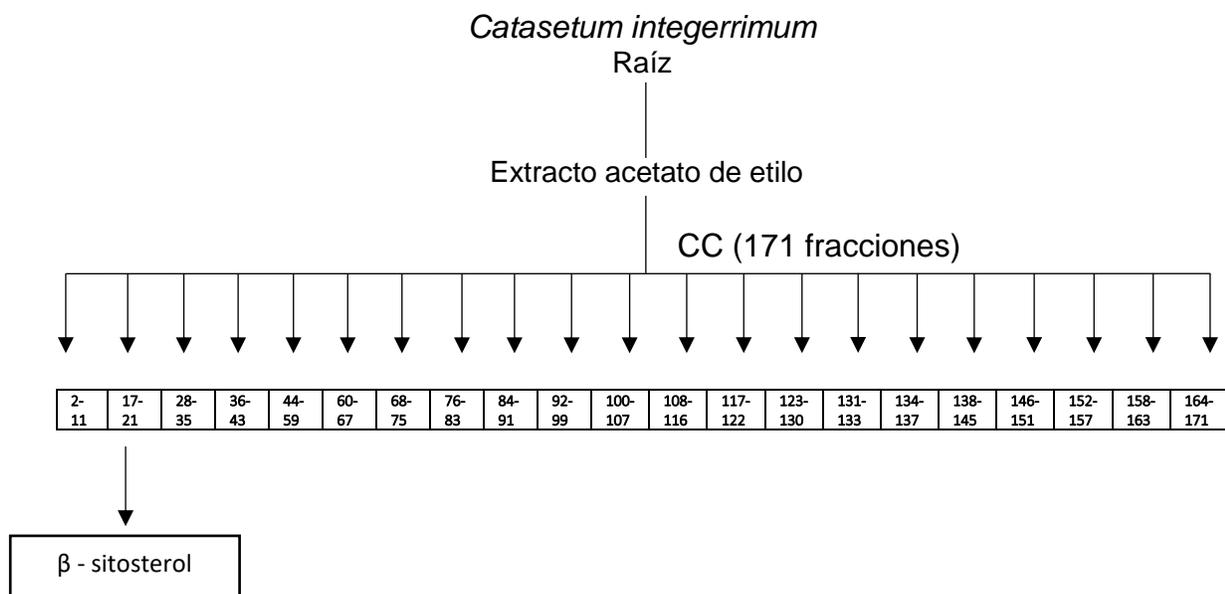


Figura 20. Reunión de fracciones del extracto de acetato de etilo de *Catasetum integerrimum*.

8.4 Cultivo *in vitro*

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

Se eligió entre varios, un fruto de 5 meses y otro de 7 meses, después de su polinización, proveniente de la localidad de Rancho la Güera, Huejutla, Hidalgo (Fig. 21) y los tallos jóvenes colectados en el municipio de Huautla. Ambos estuvieron bajo observación y cuidado donde solo los tallos se asperjaron durante 2 semanas con un fungicida (CAPTAN 1mg/l) cada 2 días, con la finalidad de eliminar hongos y bacterias que esta pudiera presentar en vida silvestre, así mismo las cápsulas se resguardaron en bolsas de papel para evitar la humedad.



Figura 21. Material vegetal para el cultivo *in vitro*. A) Fruto inmaduro, B) Tallos jóvenes.

8.4.1 Selección y preparación del medio

Se hizo la selección del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) (Fig. 22). Este se ha convertido en el medio más usado en el cultivo de tejidos vegetales, ya que es un medio apto para la mayoría de las especies excepto para las que son sensibles a la salinidad y tiene una concentración adecuada de todos los nutrientes, vitaminas, fitohormonas que son esenciales para el crecimiento de células y dando como resultado el proceso de germinación, crecimiento de plántulas, producción de protocormos (Cortez-Azenon, 2013).

Para la preparación de las soluciones concentradas el medio MS fue 50% en su concentración de inorgánicos y 100% de orgánicos, 30 g de sacarosa y 4 g de Gellan. Como base de los medios de cultivo se niveló el pH con sales y bases según las recomendaciones para el medio. Las semillas y tallos se cambiarán al mes de la germinación (Cuadro 4).

Cuadro 4. Medio de Murashige y Skoog, 1962 (rico en sales).

Componente	Gramos/1 Litro	Gramos/10 Litros
1 MACRONUTRIENTES		
(NH ₄)NO ₃	1.65	16.5
KNO ₃	1.9	19
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.37	3.7
KH ₂ PO ₄	0.17	1.7
2 solución		
CaCl ₂	0.44	4.4
3 MICRONUTRIENTES		
MnSO ₄ *H ₂ O	0.01689	1.1698
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.0086	0.086
H ₃ BO ₃	0.0062	0.062
KI	0.00083	0.0083
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.00025	0.0025
CUSO ₄ *5H ₂ O	0.000025	0.00025
CoCl ₂ *6H ₂ O	0.000025	0.00025
4 Solución		
FeSO ₄ 7H ₂ O*	0.0278	0.278
NA ₂ EDTA*	0.0373	0.373
5 VITAMINAS		
Tiamina *HCL	0.0001	0.001
Ac. Nicotínico	0.0005	0.005
Piridoxina *HCl	0.0005	0.005
6 Solución		
Inositol	0.10	1.0
7 AMINOACIDOS		
Glicina	0.002	0.02
Sacarosa	30	
Agar bacteriológico	8.5	

8.4.2 Desinfección del material vegetal

Frutos inmaduros

Se determinó el estado de cada cápsula haciendo una revisión de la superficie y de no observar grietas ni aberturas se prosiguió con la desinfección. Primero se eliminó el residuo floral muerto de la parte apical de la cápsula, después se lavó con agua y jabón antibacterial para eliminar las esporas, por último se desinfecto en hipoclorito de sodio al 10% por 25 minutos, siguiendo con un lavado con agua destilada esterilizada por 3 minutos. Y posteriormente se sumergió en etanol al 30% durante 20 minutos, los frutos se lavaron tres veces en agua destilada estéril. (Fig.22).

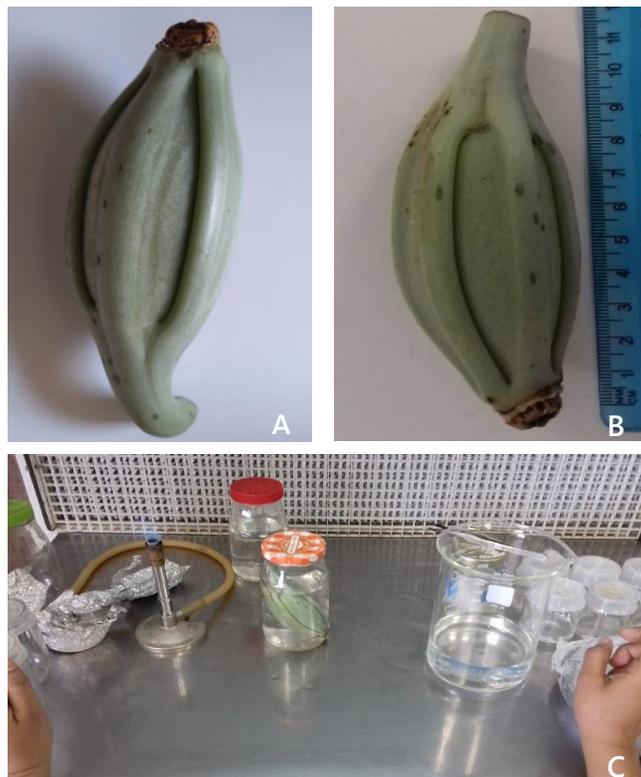


Figura 22. Selección de fruto inmaduro. A) Fruto de 7 meses, B) Fruto de 5 meses, C) Desinfección.

Tallos jóvenes

Se eliminaron hojas y el resto de raíces a los tallos en agua corriente, se tomó en cuenta una serie de soluciones para llevar acabo la desinfección debido a las

probabilidades de contaminación son más altas en tallos, raíces y hojas. Estos órganos se encuentran expuestos al sustrato y al aire, donde pueden obtener fácilmente un mayor número de bacterias.

Para la desinfección se trabajó en una cámara de flujo laminar donde se prepararon las soluciones con agua destilada esterilizada mismas que fueron depositadas en frascos y se preparó una solución de jabón antibacterial al 15%, durante 20 minutos, se trataron con etanol al 96% durante 1 minuto, posteriormente se cambió en agua oxigenada al 3% durante un minuto, y se pasó al hipoclorito de sodio al 15% durante 20 minutos. Finalmente, se lavó con agua destilada estéril, enseguida se realizó la siembra, los tallos se colocaron en cajas Petri donde se efectuaron cortes para la siembra.



Figura 23. Elección de tallos jóvenes para el cultivo *in vitro*.

8.4.3 Siembra *in vitro*

Frutos inmaduros

La siembra se realizó en condiciones asépticas, en una cámara de flujo laminar utilizando: bisturí, espátulas, pinzas y plato de aluminio previamente esterilizados, dentro de un plato de aluminio se colocó la cápsula, primeramente se cortó transversalmente las partes exteriores y se realizó un corte longitudinal para sacar las semillas. Con una espátula se fue tomando una cantidad proporcional de 0.1162 g aproximadamente de semillas, y estas se esparcieron en frascos que contenían 25 mL de medio de cultivo MS (50% de inorgánicos y 100% de orgánicos, con 30 g de Sacarosa y 4 g de Gellan). Posteriormente se etiquetaron y se sellaron para

evitar abrir los frascos y fueron colocados en una cámara de incubación a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 16/8 e intensidad luminosa. Las semillas se observaron durante los 30 días posteriores a la siembra y se cambió de medio al observar la germinación de las semillas (Fig. 24).

La segunda siembra de las semillas se hizo con una cápsula de 7 meses después de su polinización, la metodología tanto de desinfección y siembra fue la misma. Sin embargo, en esta ocasión el medio fue adicionado con reguladores de crecimiento BAP 0.1mg/l y GA₈₄₊₇ 0.1mg/l.

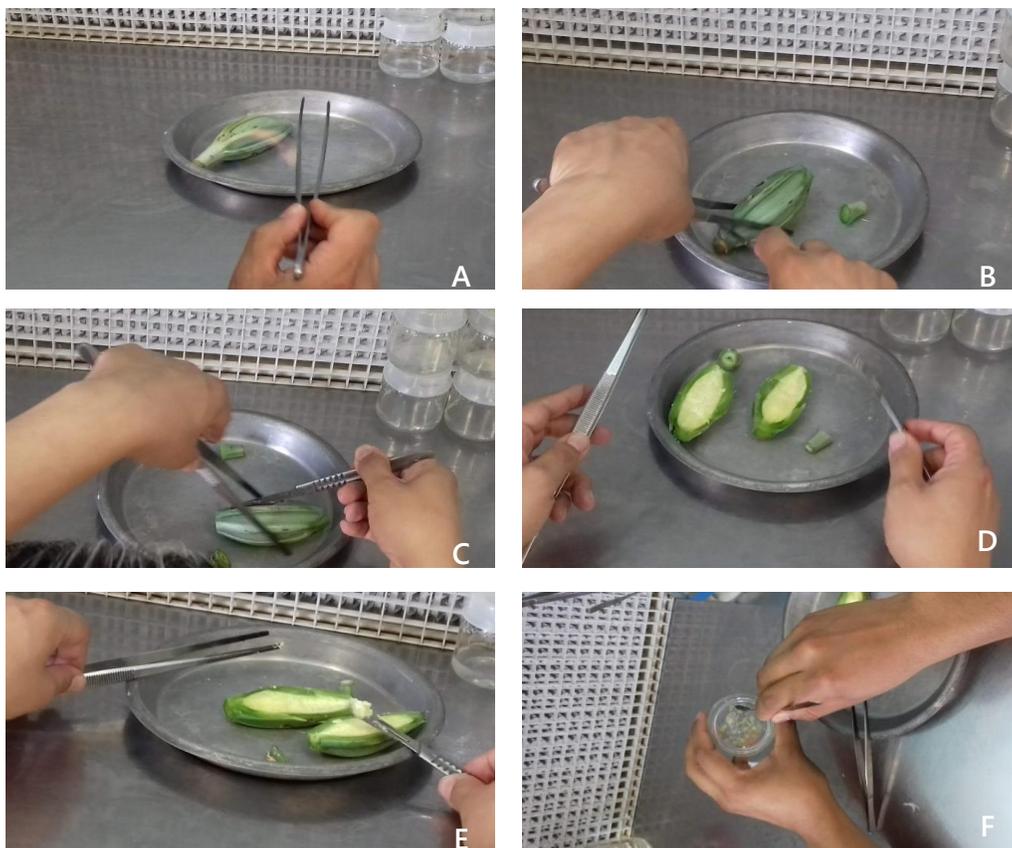


Figura 24. Procedimiento de siembra de semillas. A) Flameado de semilla, B) Corte transversal, C) Corte longitudinal, D) Cápsula abierta, E) Extracción de semillas inmaduras, F) Siembra de semillas.

Tallos jóvenes

Se trabajó asépticamente en el interior de una cámara de flujo laminar con tres pseudobulbos jóvenes de *C. integerrimum*, utilizando cajas Petri donde se colocó un bulbo de 4cm de longitud, con un bisturí y una pinza estériles se retiró un fragmento de la corteza gruesa del bulbo, agregándole una pequeña cantidad de cloro al 2%. Para evitar alguna contaminación o alguna presencia de bacteria, que pueda ocasionar contaminación estando sembrada en el medio. Se le realizaron cortes transversales al tallo, y cada fragmento se depositó en frascos de Gerber, donde se le colocó 5mL de medio líquido MS 50/100 aplicando hormonas: auxina (ácido naftalenacético ANA 0.2 mg/l) citoxina (benzil-amino-purina BAP 1.0 mg/l), agregando una pequeña cantidad de fungicida (terminafica 3ml) y antibiótico (cefotaxima 30µl) al medio correspondido con reguladores de crecimiento BAP (3 mg/l) y ANA (5 mg/l). Se colocaron 9 frascos, sellados y cubiertos con papel aluminio, manteniéndolos en agitación en un periodo de 24 h para ser observados si presentaban alguna contaminación.

IX. RESULTADOS

9.1 Aspectos ecológicos y etnobotánicos

En la región Huasteca Hidalguense a esta orquídea se le conoce comúnmente como trompa de puerco, sin embargo, también se hace referencia a otros nombres como cola de pato, concha de armadillo y flor de astronauta, en la literatura botánica es conocida como “entera sin dientes”. Es una orquídea epífita dioica caracterizada por un tallo fusiforme de coloración verde y grisáceo, presentan flores masculinas y femeninas dimórficas que pueden encontrarse en la misma inflorescencia o inflorescencias e individuos separados (Fig. 25). Las hojas tiene forma lanceolada, presentan una coloración verde-tierno y son caducas, presentan variación en el tamaño.



Figura 25. Ejemplares de *Catasetum integerrimum* en vida silvestre (©Luis Angel F. Martínez Espinoza).

En los 13 sitios de fragmentos de bosque tropical subcaducifolio de la zona de estudio se determinaron 12 hospederos naturales de *C. integerrimum*: *Bursera simaruba* (chaca), *Guazuma ulmifolia* (guácima), *Cedrela odorata* (cedro), *Pscidia piscipula* (chijol), *Inga vera* (chalahuite), *Cecropia obtusifolia* (trompetillo), *Trichilia havanensis* (palo cuchara) y *Carpodiptera ameliae* (telcón), *Parmentiera aculeata* (chote), *Tabuebia rosae* (palo de rosa), *Quercus oleoides* (encino) y *Sabal mexicana* (palma real). Estos hospederos muestran variación en la corteza que puede ser lisa,

escamosa, fisurada e incluso formada por las bases de las hojas en el caso de la palma (Cuadro 5; Fig. 26).



Figura 26. Hospederos a los que se encuentra asociada la orquídea *Catasetum integerrimum*. A) *Bursera simaruba*, B) *Guazuma ulmifolia*, C) *Trichilia havanensis*, D) *Carpodiptera ameliaeae*, E) *Cecropia obtusifolia*, F) *Sabal mexicana*.

Se registra a *Sabal mexicana* como el hospedero con mayor abundancia de individuos en la zona, seguido de *Bursera simaruba* y *Quercus oloeides* (Fig. 27).

Cuadro 5. Lista de hospederos y los tipos de corteza que presentan. *Tallo cubierto por las bases persistentes de las hojas.

Hospedero	Corteza lisa	Corteza escamosa	Corteza fisurada
<i>Bursera simaruba</i>		X	
<i>Cedrela odorata</i>			X
<i>Carpodiptera ameliae</i>		X	
<i>Guazuma ulmifolia</i>			X
<i>Parmentiera aculeata</i>			X
<i>Pscidia piscipula</i>			X
<i>Tabebuia rosea</i>			X
<i>Trichilia havanensis</i>			X
<i>Quercus oloeides</i>			X
<i>Pithecellobium dulce</i>	X		
<i>Sabal mexicana</i> *			
<i>Cecropia obtusifolia</i>	X		

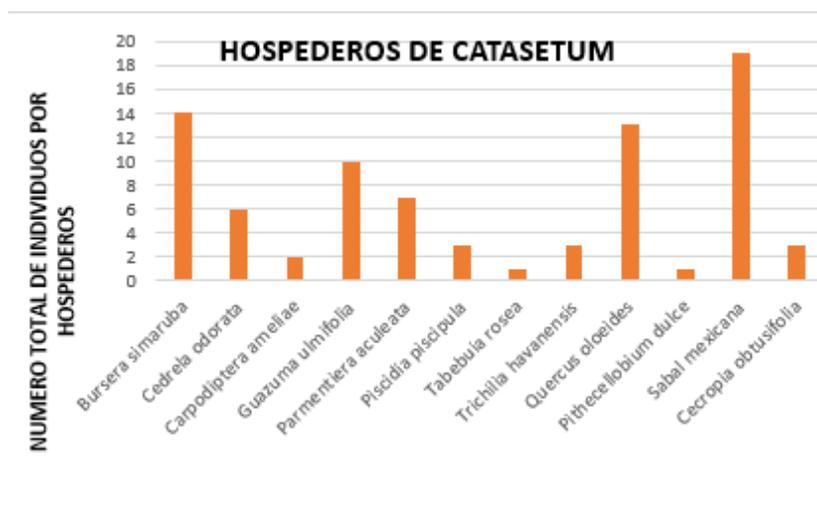


Figura 27. Abundancia de individuos de la orquídea por hospedero, identificados en la zona de estudio.

En los fragmentos del bosque tropical subcaducifolio de la zona de estudio se detecta que las poblaciones de *C. integerrimum* tienen una abundancia similar en los municipios de Huautla y Huejutla, mientras que, para Atlapexco se registró una menor cantidad de individuos (Fig. 28). Sin embargo, se encontró que en las poblaciones silvestres hay mayor abundancia de individuos masculinos en comparación con los femeninos (Fig. 28).

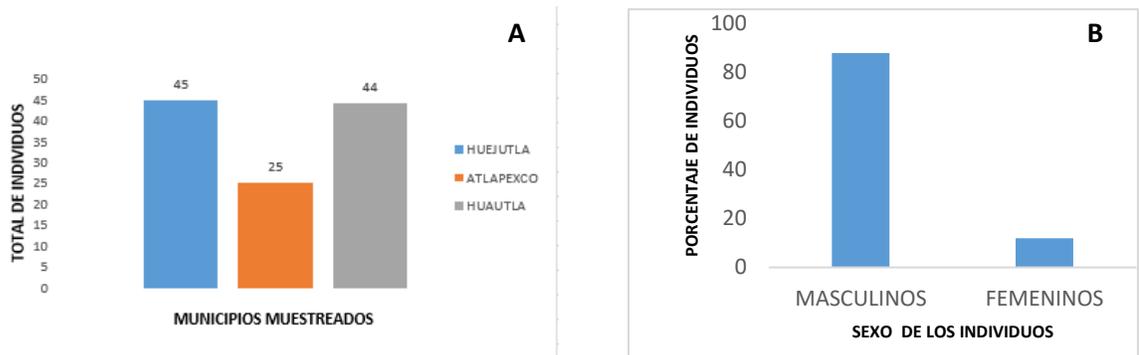


Figura 28. Gráficas de abundancia: A) Abundancia de la especie en la zona de estudio, B) Abundancia por sexo en las poblaciones silvestres.

Se registraron los siguientes visitantes florales: hormigas, escarabajos y se encontró el polinizador de esta orquídea el abejorro macho de *Eulaema cingulata* (Apidae) (Fig. 29).



Figura 29. Macho de *Eulaema cingulata* visitando la flor masculina de *Catasetum integerrimum* (©Dorismilda Martínez Cabrera).

Las entrevistas realizadas a los pobladores y vendedores de esta especie de orquídea, nos permiten confirmar que en parte de la zona Huasteca Hidalguense que tiene diversos usos en la medicina tradicional como son: curar heridas y llagas en la piel, tratamientos de colitis, diabetes, hipertensión arterial, afecciones del riñón e incluso en cáncer de la matriz y próstata (Fig. 30).

Los órganos de la planta utilizados son: pseudobulbo, hojas, raíz, flores y frutos siendo predominante el uso del primero (Fig. 31), según los pobladores se consume en forma de infusión o licuado en agua y se bebe en ayunas.

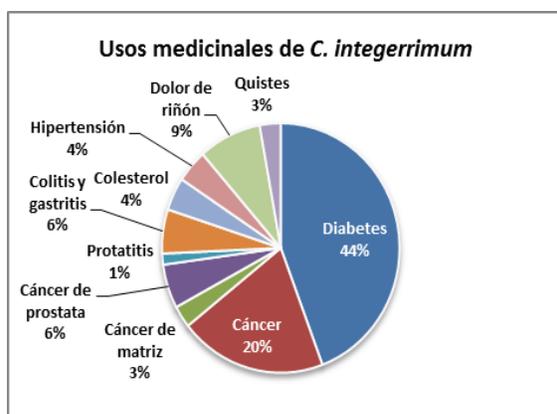


Figura 30. Usos medicinales de *Catasetum integerrimum*.

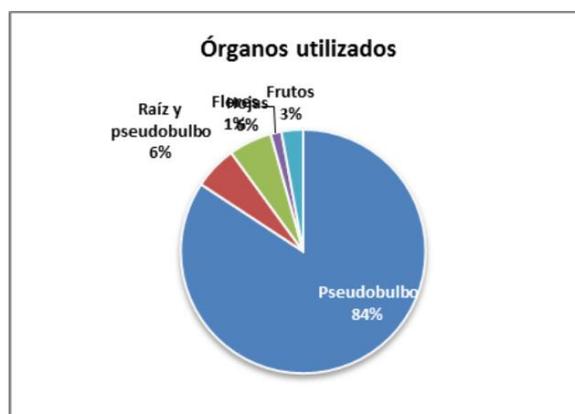


Figura 31. Porcentaje de los órganos de la planta utilizados.

9.2 Análisis fitoquímico

9.2.1 Identificación de metabolitos secundarios de *C. integerrimum* por (CCF)

Se calculó el rendimiento de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de la raíz de *C. integerrimum*, como podemos observar en el cuadro 6, el extracto de acetato de etilo tuvo el mayor rendimiento.

Cuadro 6. Rendimiento de los extractos obtenidos de la raíz de *C. integerrimum*.

Raíz de <i>C. integerrimum</i> Hook. Peso seco (g)	EXTRACTOS					
	Hexano		Acetato de etilo		Metanol	
	Peso (g)	%	Peso (g)	%	Peso (g)	%
119,5 g	0.04	0.33	1.13	9.45	0.31	2.59

El perfil cromatográfico de las muestras de *C. integerrimum* mostró la presencia de los terpenos β -sitosterol y estigmasterol en los extractos de hexano y acetato de etilo (Fig. 32).

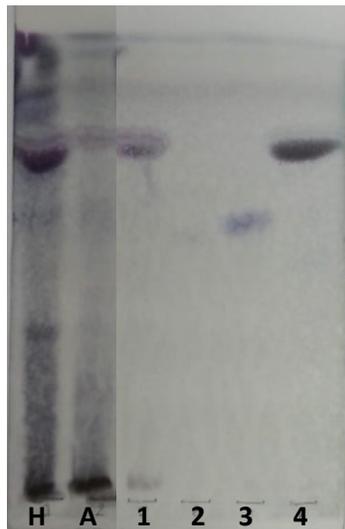


Figura 32. Identificación de terpenos en extractos de hexano y acetato de etilo de *Catsetum integerrimum*. H=Hexano, A=Acetato de etilo, 1= β -sitosterol, 2=Ácido ursólico, 3=Ácido oleanólico, 4=Estigmasterol.

Los resultados obtenidos por CCF de la presencia de flavonoides agliconas indican que el canferol, quercetina y naringenina se encuentran tanto en el extracto de acetato de etilo como en el de metanol (Fig. 33).

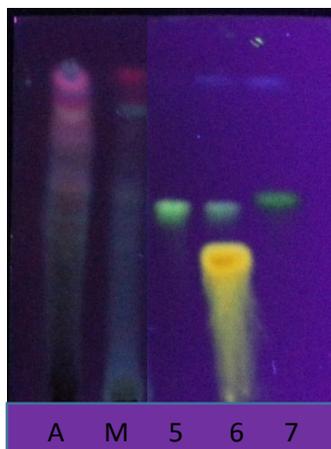


Figura 33. Identificación de flavonoides de los extractos de acetato de etilo y metanol de *C. integerrimum*. A=Acetato de etilo, M=Metanol, 1=Canferol, 6=Quercetina, 7=Naringenina.

El análisis de flavonoides glicosilados mostró la presencia de rutina y naringina en los extractos de acetato de etilo y metanol (Fig. 34).

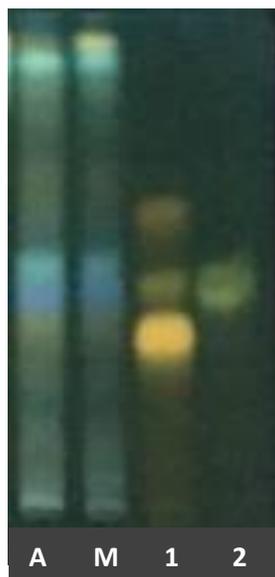


Figura 34. Identificación de flavonoides glicosilados de los extractos de acetato de etilo y metanol. A=Acetato de etilo, M=Metanol, 1=Rutina, 2=Naringina.

9.2.2 Cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo de *Catasetum integerrimum*

El fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo permitió purificar de las fracciones 19-21, un sólido blanco, el cual mediante CCF fue identificado como β -sitosterol (Fig. 35).



Figura 35. Identificación del β -sitosterol por CCF en las fracciones 19-21 del extracto de acetato de etilo de *C. integerrimum*. 1=fracciones 19-21, 2=estándar β -sitosterol, 3= β -sitosterol purificado.

Por otro lado, de las fracciones 84 a la 116, reunidas en 4 grupos, se purificaron varios sólidos amarillentos, cuyos perfiles cromatográficos muestran que son mezclas de metabolitos, razón por la cual, no se pudo realizar otro tipo de análisis para determinar su estructura (Fig. 36).



Figura 36. Perfiles cromatográficos de los precipitados de las fracciones 84-116 obtenidas del extracto de acetato de etilo de *C. integerrimum*. 1=fracciones 84-91, 2=fracciones 92-99, 3=fracciones 100-107 y 4=fracciones 108-116.

9.3 Cultivo *in vitro*

9.3.1 Germinación de semillas inmaduras

Antes de iniciar las pruebas de germinación, se contabilizó el número de semillas de la cápsula de siete meses de desarrollo. Para ello, se tomó una cantidad pequeña que pesó 0.11627 g, de éstas solo se tomaron 0.56 mg para contabilizarlas. Se determinó que una capsula de *Catasetum integerrimum* producen casi 8, 000 000 millones semillas. También se midieron las semillas, determinando un promedio en su tamaño de 0.5 mm de longitud y 0.2 mm de ancho (Cuadro 7, Fig. 37).

Cuadro 7. Número de semillas de *C. integerrimum*.

	Peso	Semillas
	0.65mg	1 177
	0.11627g	244 227
36 fcos		8 792 172

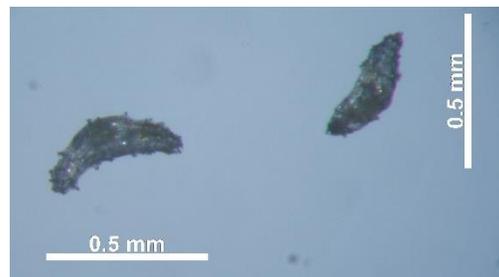


Figura 37. Semillas de *Catasetum integerrimum*.

Se trabajó con dos cápsulas en diferente estado de madurez: 5 y 7 meses. La primera presentó un peso de 60.187 g y una longitud de 11.6 cm. Esta se utilizó en la primera siembra, en la que se obtuvieron 36 frascos con 25 ml de medio de cultivo MS. En la primera semana algunas semillas comenzaron oxidarse y otras a tomar un color amarillento y blanco. Se logró el 10% de la germinación después de 28 días de efectuada la siembra, por lo que se efectuó un cambio a medio de cultivo nuevo, con la misma concentración de los componentes empleados en la germinación, sin la necesidad de aplicar reguladores de crecimiento (Fig. 38).

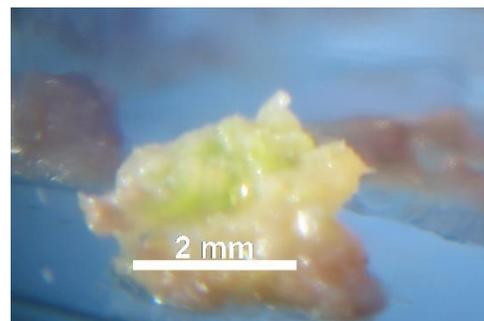


Figura 38. Germinación de semillas del fruto inmaduro

Se documentó la germinación de las semillas hasta la formación de los protocormos, con base en lo publicado en trabajos previos en los que se incluye a las orquídeas (Fig. 39). A la semana posterior de la siembra se presentó un exceso de oxidación en las semillas, sin embargo, el color blanco que presentaban algunas semillas indicaban la posible germinación de ellas. Al término de la segunda semana ocurrió el rompimiento de la testa, en las que el embrión quedó expuesto en el medio MS (sin reguladores de crecimiento). A los 28 días estas tomaron un color verde y los primeros protocormos con pelos absorbentes Después de 54 días de la siembra las semillas formaron cuerpos parecidos a protocormos en un 20% (Fig. 40).

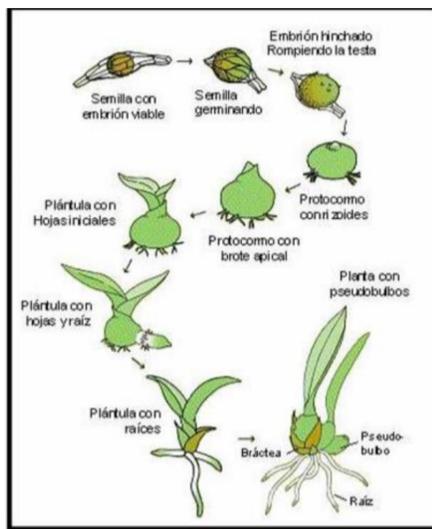


Figura 39. Estadios ontogénicos de orquídea, según Seaton y Ramsay (2005).

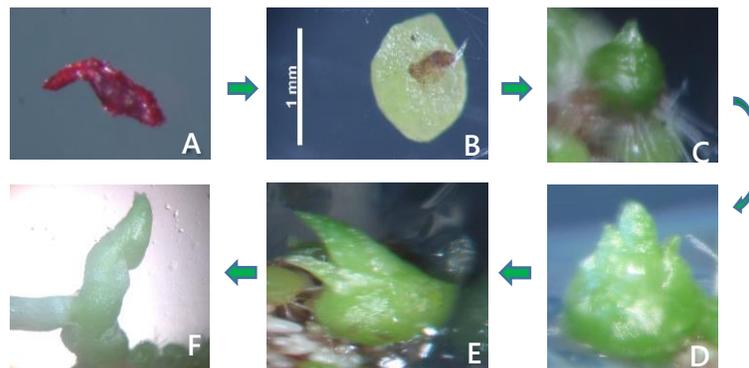


Figura 40. Fases de germinación de semillas *Catasetum integerrimum*. A) Semilla con embrión, B) Embrión hinchado, C) Protocorno con rizoides o pelos absorbentes, D) Protocorno con brote apical E) Plántula con hojas iniciales F) Plántula con raíz.

Se efectuó la comparación de las etapas de desarrollo posteriores a la germinación de la semilla hasta la formación de protocormos de *C. integerrimum* con otras especies en las se ha empleado el medio de cultivo MS (cuadro 8).

Cuadro 8. Etapas de desarrollo posteriores a la germinación de las semillas en algunas especies de orquídeas.

	Germinación de semillas	Protocormos	Primordio foliar	Primeros rizoides	Referencias
<i>Catasetum integerrimum</i>	28 días	54 días	84 días	134 días	Este trabajo
<i>Cattleya mendelii</i>	30 días	60 días	90 días	120 días	Mercado (2012)
<i>Prosthechea chacaoensis</i>	30 días	60 días	90 días	120 días	Alvarado (2011)
<i>Brassolaeliocattleya</i>	15 días	48 días	72 días	125 días	Andrade <i>et al.</i> (2015)

La siembra del fruto de 7 meses con un peso de 69.811 g y una longitud de 12.3 cm con el mismo medio de cultivo pero adicionando reguladores de crecimiento, no se obtuvo germinación después de un mes de haber sido sembradas

9.3.2 Establecimiento del cultivo *in vitro* de tallos jóvenes de *Catasetum integerrimum* Hook.

Mediante el CTV es posible obtener brotes y callo a partir de explantes de distintos órganos vegetales. El callo es una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células (callo), la cual bajo las condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes es capaz de generar órganos o embriones somáticos. El cultivo de callos puede derivarse de una variedad de órganos de planta (raíz, tallo, hoja), usados como explantes y colocados en un medio sólido o semisólido, generalmente se utiliza el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), (Dixon, 1991).

Se estableció un método de cultivo utilizando tallos jóvenes de *Catasetum integerrimum* colectados en vida silvestre, mismos que fueron sembrados en un

medio MS líquido, agregando fungicida y antibiótico con reguladores de crecimiento. En el proceso de establecimiento se realizaron evaluaciones, en las que se detectó contaminación en el medio de cultivo en tres ocasiones y demás en algunos casos hubo oxidación de los tejidos, por lo que se procedió a cambiar el medio y agregar una concentración más alta de fungicida y antibiótico, para lograr erradicar la proliferación de bacterias y hongos. Una vez que se logró controlar la contaminación se colocaron en un medio solido MS con reguladores de crecimiento.

Se efectuó una segunda siembra en las mismas condiciones de desinfección y de medio de cultivo sólido que la primera siembra, esto para confirmar que las condiciones eran las idóneas debido que ya no hubo oxidación y contaminación en los explantes de tallo. Después de un mes no se obtuvo la formación de callos a partir del pseudobulbo de *C. integerrimum* (Fig. 39).

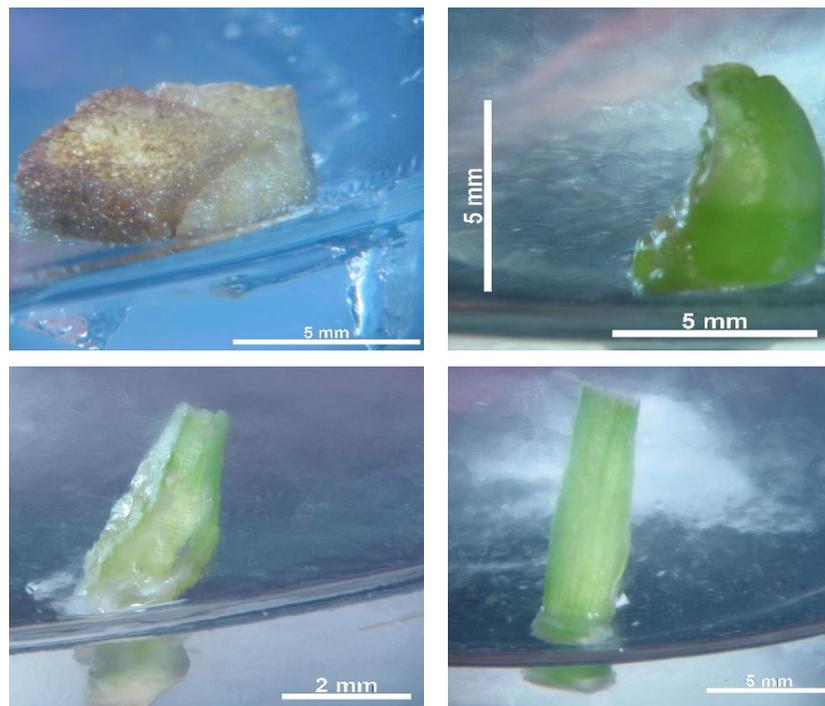


Figura 41. Establecimiento de tallos jóvenes. A) Capa interna del primer tallo, B-C-D) Establecimiento del segundo siembra de tallos.

X. DISCUSION

Desde una perspectiva ecológica, podemos decir que la Huasteca Hidalguense presenta fragmentos de bosque tropical subcaducifolio (BTSC *sensu* Rzedowski, 1978), en algunos casos con cierto grado de perturbación principalmente, por los asentamientos humanos y la deforestación. En el estrato superior o dosel del BTSC se encuentran árboles de 20-30 m de altura a los que se asocian numerosas epífitas entre ellas, *Catasetum integerrimum*, orquídea que en los últimos cinco años está siendo extraída de su hábitat para uso en la medicina tradicional. En este contexto, se identificaron 12 especies arbóreas como hospederos, éstos presentan variación en las características morfológicas de la corteza: lisa (*Cecropia obtusifolia* y *Pithecellobium dulce*), escamosa (*Bursera simaruba* y *Carpoditera amelleae*) y fisurada (*Cedrela odorata*, *Quercus oleoides*, *Tabebuia rosea* y *Piscidia piscipula*). Se confirmó que *C. integerrimum* tienen una mayor asociación a hospederos de corteza fisurada, siendo *Sabal mexicana* el hospedero con mayor abundancia de individuos. En el último caso posiblemente se relaciona con las características peculiares de las palmas que retienen las bases de las hojas en el tallo, facilitando el establecimiento de las plántulas de la orquídea, la retención de agua y nutrientes, además de asegurar mayor exposición a la luz lo que permite el mejor desarrollo de las plantas. Sin embargo, *C. integerrimum* también logra establecerse en árboles de corteza lisa como la chaca (*B. simaruba*), lo que sugiere una amplia adaptación para su germinación y establecimiento. Esto también se presenta en algunas orquídeas como *Acronia diabolica*, *Dryadella dodsonii* y *Lepanthes vibrissa* donde la corteza de los hospederos no parece ejercer ninguna influencia en la abundancia de las tres especies (Sánchez, 2016).

Por otra parte, en las poblaciones silvestres se encontró que el 87% es de individuos masculinos y solo el 13 % de individuos femeninos. Aún se desconocen los factores que inciden para esta proporción en el sexo de las plantas, posiblemente están determinadas genéticamente, sin embargo, se sugerimos indagar si los factores ambientales ejercen alguna influencia, debido a que en algunos individuos se logró observar que la misma planta puede producir flores

masculinas y femeninas en épocas distintas. Aunado a ello, se encontró a *Eulaema cingulata* como único polinizador en la zona, esto indica la alta especificidad que la planta tiene con dicho polinizador. Esta especie se ha registrado como el polinizador de *C. integerrimum* en la literatura (Hágsater y Salazar, 1990), también se ha señalado que los machos de las abejas Euglossini reciben como recompensa el néctar, polen e incluso ceras, aceites y fragancias (Dressler, 1993). La alta especificidad de polinizador (entendida como una relación de una especie de planta a un polinizador), es muy común en la familia Orchidaceae, debido a que cerca del 60% de especies solo se les ha reportado un solo polinizador (Tremblay, 1992). Sin embargo, no ocurre en todos los grupos de orquídeas, por ejemplo en *E. xanthinum* se presentan 9 polinizadores la mayoría lepidópteros (Farfán, 2008).

El bajo porcentaje de individuos femeninos y la alta especificidad del polinizador, podría reflejarse en la formación de una menor cantidad de frutos. La baja producción de frutos en muchas especies de orquídeas tiene consecuencias sobre los tamaños poblacionales (Calvo, 1990). En este sentido, las estrategias reproductivas en *C. integerrimum* se ven compensadas con la reproducción asexual por formación de pseudobulbos, además de la formación de cápsulas grandes ≥ 10 cm, con un elevado número de semillas (en promedio 8,000 000) para asegurar la reproducción sexual.

Algunos trabajos de carácter etnobotánico (Hágsater *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2005), se han orientado en documentar los usos tradicionales de *C. integerrimum* Hook. Sin embargo, solo se había registrado su uso en la aplicación de cataplasmas para tratamiento de heridas y como antiinflamatorio, este uso se registra en otras especies como *Catasetum maculatum*, *Cyrtopodium macrobulbon*, *Bletia purpurea* y *Prostochea citrina* (García-Peña y Peña, 1981). Por otra parte, Aguilar *et al.* (1994), mencionan que *C. integerrimum* tiene uso anticonceptivo y antiinflamatorio. En este trabajo se incrementa el conocimiento sobre el uso medicinal de esta orquídea en la región Huasteca Hidalguense, los pobladores la emplean para tratar la colitis, diabetes, hipertensión arterial, afecciones del riñón y el cáncer en la matriz y la próstata. Cabe destacar, el uso medicinal ha traído como

consecuencia la extracción de poblaciones silvestres en la Huasteca, lo que posiblemente esté afectando el tamaño de las poblaciones.

En los resultados obtenidos del análisis cromatográfico de *C. integerrimum* en este estudio, así como en los previamente reportados muestran que esta orquídea sintetiza principalmente dos grupos de metabolitos: terpenoides (β -sitosterol y estigmasterol) y flavonoides (canferol, quercetina y naringenina). Estos compuestos se habían detectado en pseudobulbos y hojas de ésta orquídea (Mendieta, 2017). La concentración de los metabolitos que la planta sintetice dependerá de causas como el clima, el suelo y las interacciones de la planta con herbívoros, ya que estas moléculas son utilizadas por los vegetales para defenderse de los factores climáticos y depredadores, en este último caso, produciendo compuestos tóxicos, los cuales confieren protección contra plagas y enfermedades (Bourgaud *et al.*, 2001). Los terpenoides tienen propiedades aleloquímicas y los que son de consistencia cerosa permite controlar el balance de agua en hojas y tallos (Swan, 1963; Harborne y Tuner, 1984; Harborne y Tomas-Barberan, 1991).

La separación cromatográfica del extracto de acetato de etilo permitió la purificación e identificación del β -sitosterol, metabolito común en plantas y previamente identificado en otras orquídeas. En la que podemos mencionar a *Prosthechea michuacana* que se ha documentado compuestos químicos entre ellos se encuentra el β -sitosterol, ayudando a la prevención y tratamiento de cáncer (Vega *et al.*, 2015).

Sin embargo, en otras especies pertenecientes al género *Catasetum*, se reporte la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y triterpenos (Pérez-Rico *et al.*, 2007). Ramos *et al.* (2012), mencionan que *Catasetum macroglossum* posee glucomanano, fenantrenos y estilbenos los cuales participan en los efectos antiinflamatorios.

En el cultivo *in vitro* se logró la germinación del 10% de las semillas inmaduras de un fruto de 5 meses de *C. integerrimum* en el medio de cultivo MS sin adición de reguladores de crecimiento. Arenas y Aguirre (2012), también efectúan

la micropropagación de *Barkeria scandens* a partir de semillas inmaduras de un fruto de 5.5 meses con el medio MS pero adicionando como aditivo orgánico el almidón de papa, obteniendo 44.23 % de germinación en el MS con aditivo, 38 % sin aditivo y 30.4% en el control, confirmando el incremento en el porcentaje de la germinación y se acelera el tiempo de la misma. En este trabajo, se realizó una segunda siembra con semillas inmaduras de un fruto de 7 meses con el medio MS adicionando reguladores de crecimiento (BAP y GA), sin embargo, en este caso no se obtuvo germinación. Se esperaba que las semillas de este fruto con mayor desarrollo y con la adición de reguladores de crecimiento tuvieran mayor porcentaje de germinación, lo que se podría explicar en función del desarrollo del embrión y el vigor de la semilla. Un elevado porcentaje de las semillas no presentaban embrión por lo que no habría posibilidad de germinación.

En relación a las etapas de desarrollo después de la germinación, podemos confirmar que *C. integerrimum* presenta periodos similares a *Cattleya mendilli* y *Postrechea chacaoensis* en cuanto a la germinación (28-30 días), formación de protocormos (54-60 días) y formación de primordios foliares (84-90 días) como (Alvarado, 2011; Mercado, 2012). Sin embargo, en otras orquídeas como *Brassolaeliocattleya* muestran periodos más cortos en el desarrollo de estas etapas.

En las pruebas de cultivo *in vitro* de tallos jóvenes se logró establecer un medio de cultivo idóneo en medio MS líquido adicionando fungicida y antibióticos. En este caso no se obtuvo el desarrollo de callos, ya que solo se evaluó por un periodo corto de un mes. En otros trabajos de micropropagación de orquídeas, como el de se ha demostrado la multiplicación de 12-50 protocormos/explante, en medio MS adicionando ANA/BA y GA después de 21 días, en *C. pendua*, *E. adenocaula*, *P. cirina*, *L. speciosa*, *O. trigrimum* y *R. splendens* (Salgado *et al.*, 2012). Esto confirma que es posible obtener protocormos y plántulas a partir de los tejidos de pseudobulbo, por lo que se deberían probar la adición de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones para la micropropagación de *C. integerrimum*.

Las orquídeas son grupo de plantas que en el que se registran un elevado número de especies en alguna categoría de riesgo de la NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010), esto a consecuencia de la perturbación de los hábitats naturales y por la extracción de las especies de poblaciones silvestres. Es por ello, que el cultivo *in vitro* constituye una alternativa para la propagación y conservación *ex situ* de las especies y plantea la posibilidad de su reintroducción a los ecosistemas.

XI. CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo en el que se describen 12 hospederos de *C. integerrimum*, confirmando que la especie puede adaptarse a árboles de corteza lisa a fisurada, presentando mayor asociación a los de corteza fisurada e incluso tuvo mayor abundancia en *Sabal mexicana*, *Q. oleoides* y *B. simaruba*. En las poblaciones silvestres se detectó mayor abundancia de individuos masculinos (87%), y solo el 13 % de individuos femeninos. Así como, un solo polinizador *E. cingulata*. El bajo porcentaje de individuos femeninos y la alta especificidad del polinizador, se refleja en menor cantidad de frutos. En este sentido, las estrategias reproductivas en *C. integerrimum* se ven compensadas con la reproducción asexual por formación de pseudobulbos, además de la formación de cápsulas grandes con un elevado número de semillas para asegurar la reproducción sexual.

En relación a la parte etnobotánica, se incrementa el conocimiento sobre el uso medicinal de esta orquídea en la región Huasteca Hidalguense. Los pseudobulbos tienen mayor demanda para el tratamiento de la colitis, diabetes, hipertensión arterial, afecciones del riñón y el cáncer en la matriz y la próstata.

El análisis fitoquímico de la raíz permitió confirmar la presencia de terpenoides (β -sitosterol y estigmasterol) y flavonoides agliconas (Canferol, Quercetina y Naringenina) y glicosilados (rutina y naringina) en las muestras.

Se logró la micropropagación de *C. integerrimum* a partir de semillas inmaduras en un medio de cultivo MS sin adición de reguladores de crecimiento, obteniendo hasta un 10% de germinación a los 28 días. Asimismo, se estableció un medio de cultivo MS con adición de antibióticos, fungicidas y reguladores de crecimiento para la propagación a partir de explantes de tallos jóvenes.

Los aspectos que se abordan en esta investigación contribuyen en la generación de conocimientos que pueden ser aplicados en el manejo y conservación de *C. integerrimum* en la Huasteca Hidalguense.

XII. LITERATURA CITADA

- Alvarado, S. J. 2011. Regeneración *in vitro* de *Prosthechea chacaoensis* (Rchb. F.) Higgins W. E. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 125 p.
- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jácquez, P. y López, M. E. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D. F. 253 pp.
- Anderson, E. N., Cauich, C. J., Dzib, A., Flores, G. J. S., Islebe, G., Medina, T. F., Sánchez, S. O. y Valdéz, C. P. 2005. Las plantas de los mayas. Etnobotánica en Quintana Roo, México. CONABIO, ECOSUR. 206 pp.
- Andrade, R. M., Vargas, A. J., Villegas, T. O., López, M. V., Guillen-Sánchez, D., y Tejacal, I. 2015. Seed Germination and seedlings growth of *Cattleya (Brassolaeliocattleya) in vitro*. *Interciencia*, 40(8):549-553.
- Arenas, A. E. B. y Aguirre, L. E. 2012. Micropropagación aplicada a la conservación de *Barkeria scandens* (La Llave & Lex.) Dressler & Halb. (Orchidaceae) mediante el empleo de semillas inmaduras. En: Téllez, V. M. A. Conservación de orquídeas en México (compiladora y editora) (págs. 88-93). Instituto de Biología, UNAM. México, D.F.
- Arditti, J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley y Sons, Nueva York, USA. 691 pp.
- Ávila, D. I. y Salgado-Garciglia, R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas para colaborar en su conservación. *Biológicas*, 8:138-149.
- Ávila, I. A. 2015. La importancia de las Orquídeas en el medio ambiente. Proyecto GM México. Recuperado de <http://www.proyectogmmexico.blogspot.com>. Diciembre, 2018.

- Berlín, B., Breedlove, D. E. y Raven, P. H. 1974. An Introduction to the botanical ethnography of a mayan-speaking, people of highland, Chiapas. Academic Press, Nueva York. 684 pp.
- Bitácora Naturae. 2007. Esquema de la flor de una orquídea. Recuperado de <http://www.bitacoranaturae.blogspot.com>. Fecha de acceso: enero 2019.
- Bourgaud, F., Gravot, A. G., Millesi, S. y Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
- Bye, R. 1979. Hallucinogenic plants of the Tarahumara. *J. Ethnopharmacology* 1:23-48.
- Calvo, R. 1990. Inflorescence size and fruit distribution among individuals in three orchid species. *American Journal of Botany*, 77(10):1378-1381.
- Camargo, S., Montaña, M., De la Rosa, C. y Montaña, S. 2012. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista digital universitaria UNAM*, 13(7): 1067-6079.
- Cameron, K. M., Whitten, W. M., Kores, P. J., Jarrell, D. C., Albert, V. A., Yukama, T., Hills, H. G. y Golgman, D. H. 1999. A Phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *Amer. J. Bot.* 86:208-224.
- Carmona, B. J. C. y Aguirre, L. E. 2012. Micropropagacion de *Oncidium unguiculatum* Lindl. (Orchidaceae) con fines de conservacion *ex situ*. En: Téllez, V. M. A. Conservación de orquídeas en México (págs. 94-98). Instituto de Biología, UNAM. México, D. F.
- Carnevali, G. 2010. Orquídeas. En: Durán, R. y Méndez, M. 2010. Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán. CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, (págs.185-186).
- Ceja-Romero, J. 2010. Las epífitas vasculares del estado de Hidalgo, México: Diversidad y distribución. *Acta Botánica Mexicana*, 93:1-39.

- Chase, M. W. 1999. Molecular systematics, parsimony, and orchid classification. En: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. y Rasmussen, F.N. *General Orchidacearum* (págs. 81-88). Oxford University Press, Oxford.
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G. A., Van Den Berg, C. y Schuiteman, A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 177(2): 151-174.
- Chávez-Ávila, V. M., González-Caballero, O., Martínez, P. A., Ortega, L. P., Mata R. M., Peña, M. y Rubluo, A. 2012. Conservación *in vitro* de plantas mexicanas en peligro de extinción. En: Téllez, V. M. A. *Conservación de orquídeas en México* (págs. 104-119). Instituto de Biología, UNAM. México, F.
- Chinsamy, M., Finnie, J. y Van Staden, J. 2014. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterase activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. *South African Journal of Botany*, 91:88-98.
- Cortez-Azenon, M. 2013. Manual práctico de producción y manejo de orquídeas *Phalaenopsis*. El Salvador, Centro América: ENA. 84 pp.
- Cox, T. L. D. 2013. Orquídeas: Importancia y usos en México. *Bioagrocencias*, 6(2): 4-7.
- Cuevas, P., Vaca, S., González, A., Maldonado, Y. y Fernández, W. 2016. Importancia de los taninos en especies del género *Quercus* como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros. *Biológicas*, 18(1): 10–20.
- Del Amo, R. S. 1979. *Plantas Medicinales del Estado de Veracruz*. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Xalapa, Veracruz. 279 pp.
- Díaz-Toribio, M. H., Toledo, A. T., Mata-Rosas, M., Mehltreter, K., Hernández-Rojas, C. A., Mejía, A. J. y García-Franco, J. G. 2013. *Manual de cultivo de orquídeas, bromelias y helechos en cafetales de sombra*. Instituto de Ecología A.C Xalapa. 119 pp.

- Dixon, R. A. 1991. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. En: Dixon, R. A. *Plant Cell Culture: A Practical Approach*, (págs. 16-20). Washington, D.C.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of Orchid family*. Cambridge University Press. 315 pp.
- Escobar, A. 1999. *El final del salvaje. Naturaleza, cultura y política en la antropología contemporánea*. Santafé de Bogotá: CEREC-ICAN.
- Farfán, C. J. C. 2008. *Estrategias reproductivas de la orquídea E. xanthinum Lindl., en la cordillera occidental, Valle del Cauca*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Colombia. Bogotá Colombia. 74 p.
- Farnsworth, N. R. 1988. Screenic plants for new medicines. En: E. O. Wilsson. *Biodiversity* (págs. 83-97). National Academic Pres. Washington, D.C:
- Fay, M. F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. *Biodiversity and Conservation*, 3:176-183.
- Fischer, A. 2007. *Cultivo de orquídeas*. Buenos Aires, Argentina.
- Flores-Palacios, A. y Brewster, P. 2002. *Introducción al cultivo de orquídeas*. Instituto de Ecología A. C. y Asociación Mexicana de Orquídeología. Xalapa, Ver. 240 pp.
- Freuler, M. 2008. *Orquídeas*. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina. 126 pp.
- Fujiedaa, K., Shoyama, Y., Matsunaka, H. y Nishioka, I. 1988. Plant growth inhibiting poperties of phalarnopsine T from *Pharaenopsis* spp. *Phytochemistry*, 27 5): 1564-1566.
- García-Peña, M. del R. y Peña, M. 1981. Uso de las orquídeas en México desde la época prehispánica hasta nuestros días. *Orquídea*, 8(1):59-86.
- Guía Hidalgo. 2015. *Vegetación de la región Huasteca*. Recuperado de: www.guiahidalgo.com.mx. Enero, 2019.

- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. Á., Salazar, Ch. G. A., Jiménez, M. R., López, R. M. A. y Dressler, R. L. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, D. F. 304 pp.
- Hágsater, E. y Salazar, G.A. 1990. Icones Orchidacearum. En: E. Hágsater y G.A. Salazar. Orchids of México. (págs. 1-100). México: Asociación Mexicana de Orquideología A.C.
- Harborne, J. B. y Turner, B. L. 1984. Plant chemosystematics. Academic Press. London.
- Harborne, J. B. y Tomas-Barberan, F.A. 1991. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. The Phytochemical Society of Europe. Oxford University Press. New York. 439 pp.
- Hernández, H. J. C. y Hernández, F. J. 2011, Orquídeoflora de la región de la Huasteca Hidalguense. Informe técnico de residencia profesional. Licenciatura de Biología. Instituto Tecnológico de Huejutla.
- Hossain, M.M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances-an overview. *Fitoterapia*, 82: 102-140.
- INEGI. 1992. Síntesis Geográfica del Estado de Hidalgo. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx>. Acceso: febrero, 2019.
- Klimes, I. y Lamparsky, D. 1976. *Vanilla* volátiles a comprehensive analysis. *Int. Flavours Food Addit.* 7:272-291.
- Knudson, C. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73:1-25.
- Linares, M. E., Bye, R. A. y Flores, B. 1999. Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología UNAM, México, D.F. 155 pp.

- Lindquist, N., Battiste. M., Whiten W., Williams N. y Streckowski, L. 1985. Transcarvone oxide, a monoterpene epoxide from the fragrance of *Catasetum*. *Phytochemistry*, 24(4): 863-865.
- Llorente, B. J. y Ocegueda, S. 2008. Estado de conocimiento de la biota de México. En: J. Soberon, G. Halffter y J. Llorente. Capital natural de México, Vol. I. Conocimiento actual de la Biodiversidad (págs. 283-322). CONABIO, México.
- Marjoka, O. A. y Huda, M. K. 2016. Cribado de tres orquídeas epífitas de importancia medicinal de Bangladesh. Universidad de Jahangirnagar J. *Revista Universitaria de Ciencias Biológicas*, 5: 95-99.
- Martínez, M. 1959. Las plantas medicinales de México, 4ª. Ed. Ediciones Botas. Mexico, D. F. 621 pp.
- Mayo, M. A, Cázares, C. J. G., De la Cruz, L. E. y Flores, H. A. 2010. Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. Fondo Editorial Universitario. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 34 p.
- Mazid, M., Khan, T. A. y Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol. Med.*, 3: 232-249.
- Mendieta, M. R. y Del Amo R. S. 1981. Plantas medicinales del estado de Yucatán. México. D.F. 428 pp.
- Mendieta, G. E. M. 2017. Evaluación citotóxica de compuestos fenólicos de *Catasetum integerrimum* Hook. (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 42 p.
- Menchaca, G. R. A. 2011. Manual para la propagación de orquídeas. Comisión Nacional Forestal. México, D. F. 51 p.
- Menchaca, G. R. A. y Moreno M. D. 2011. Conservación de orquídeas una tarea de todos. Grupo publicitario imagen digital. Texcoco, México.

- Mercado, S. A. 2012. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agron.*, 61(1): 69-78.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-497.
- Millán, B., Bravo, R., Chocoe, M. y Coz, A. 2007. Evaluación poblacional, distribución y estado de conservación de *Phragmipedium kovachii* en el Perú. Serie de publicaciones flora y fauna silvestre. Instituto Nacional de Recursos Naturales, Lima, Perú. (en línea). http://www.inrena.gob.pe/iffs/iffs_biodiv_estud_flora_fauna_silvestre.htm. Acceso: Enero 2019.
- Murthy, H. N. y Pyati, A. N. 2001. Micropropagation of *Aerides macalosum* Lindl. (Orchidaceae). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37:223-226.
- Ossenbach, C. 2005. History of orchids in Central America. Part I: from prehispanic times to the independence of the new republics. The History of Vanilla. *Harvard Papers in Botany*, 2: 197-202
- Pant, B. 2013. Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of plant Science*, 7(10): 448-467.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S. y Bansal, Y. K. 2015. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 9: 293-304.
- Pennigton, T. D. y Sarukhán, J. 1998. Árboles tropicales de México. Segunda Edición. UNAM, Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 524 pp.
- Pérez-Rico, K. A., Villanueva, G. D. V., Correa, M. M. A., Fajardo, O. A., Urrea, A. M., Castro, T. E., y Triana, A. 2007 Análisis fitoquímico preliminar de *Catasetum* sp. (Orchidaceae). Universidad de la Amazonia, *Momentos de ciencia* 4(12): 26-28
- Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodríguez-Jiménez, G., Robles-

- Olvera, V., García-Alvarado, M. A. y Günata, Z. 2006. GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chem.* 99: 728-735.
- Pérez, G. R. M. 2010. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *J. Med. Plants Res.*, 4: 592-638.
- Ramírez, J. 1996. Orquídeas de México. *Biodiversitas*, 5:1-5.
- Ramos, P., Colareda, A. G., Rosella, A. M., Debenedetti, L. S., Spegazzini, D. E. y Consolini, E. A. 2012. Phytochemical profile and anti-Inflammatory effect of the orchid *Catasetum macroglossum*. *Latin American Journal of Pharmacy* 31(1): 62-7.
- Romero-González, G. A. 2012. Las flores unisexuales y dimórficas de *Catasetum* Rich. (Orchidaceae). *Herbario CICY*, 4: 32-36.
- Robles-García, M., Aguilar, A., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del Río, J., Guerrero-Medina, P. y Del Toro-Sánchez, C. 2016. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque *Sideroxylum capiri* Pittier. *Biotechnia*, 8(3): 3–8.
- Rzedowski, J. 1978. La vegetación de México. Limusa. México, D.F. 432 pp.
- Salgado, G. R., Hernández, G. A. y Ávila D. I. 2012. Propagación y conservación *in vitro* de siete orquídeas mexicanas en riesgo de extinción. En: Téllez, V. M. A. conservación de orquídeas en México (págs. 155-169). Instituto de Biología, UNAM. México. D. F.
- Sánchez, G. J. 2016. Abundancia de tres especies de orquídeas con relación a la humedad ambiental y a la humedad del hospedero en un bosque andino. Tesis de Licenciatura. Universidad de Antioquía. Medellín, Colombia. 26 p.

- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2008. Informe de la situación del medio ambiente en México. Recuperado de: <http://www.semarnat.gob.mx>. Enero, 2019.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF) <http://www.semarnat.gob.mx>. Enero, 2019.
- Seaton, P. y Ramsay, M. 2005. Growing orchids from seeds. Royal Botanic Garden, Ken. Londres, Inglaterra. 83 pp.
- Shanmugavalli, N., Umashankar, V. y Raheem, A. 2009. Antimicrobial activity of *Vanilla planifolia*. *India J. Sci. Technol.* 2(3): 37-40
- Sharma, A., Verma, S. C., Saxena, N., Chadda, N., Singh, N. P. y Sinha, A. N. 2006. Microwave and ultrasound assisted extraction of vanillin and its quantification by high performance liquid chromatography in *Vanilla planifolia*. *J. Sep. Sci.* 29: 613-619.
- Schultes, R.E. y Hofmann, A. 1980. Plant of the Gods. Ed. Hutchinson, Londres.
- Sinha, A. K. y Sharma, U. K. 2008. A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanilla and others constituents. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59: 299-326.
- Solano, G. R., Jiménez, M. R. y Damon, A. A. 2011. Two new records and one rediscovery for Orchidaceae of Mexico. *Acta Bot. Mex.*, 96:57-70.
- Soto-Arenas, M. A., Hágstaer, E., Jiménez, R., Salazar, G. A., Solano, R., Flores, R. y Contreras, E. 2007. Las orquídeas de México: catálogo digital. Instituto Chinoín A.C. México, D.F.
- Suárez, O. G. 2004. Algunas Orquídeas de Oaxaca. Instituto Estatal de Ecología de Oaxaca. México, D. F. 142 pp.
- Sut, S., Maggi, F., y Dall'Acqua, S. 2017. Bioactive secondary metabolites from orchids (Orchidaceae). *Chemistry & Biodiversity*, 14(11): 1-30.

- Swan, T. 1963. Chemical Plant Taxonomy. Academic Press. New York. 542 pp.
- Téllez, V. M. A. y Flores, L.V. 2007. Orquídeas terrestres del Pedregal de San Ángel. UNAM. México. D.F. 74 pp.
- Toledo, E. X. E., Orantes, G. C., y Verdugo, V. A. G. 2012. Cultivo *in vitro* de la orquídea *Chysis bractescens* Lindley. *Lacandonia*, 6 (2): 7-13.
- Tremblay, R. L. 1992. Trends in pollination biology of the Orchidaceae. Evolution and Systematics. *Canadian Journal of Botany*, 70: 642-650.
- Urbina, M. 1903. Notas acerca de los tzauhtli u orquídeas mexicanas. *Anuales del Museo Nacional de México*, 2 (1):54-84.
- Vega, H., Mo, E., Cetzal-Ix, W. y Carpenter, J., 2015 Usos tradicionales y medicinales de la orquídea matasequía (*Prosthechea michuacana*) en Honduras. *Herbario CICY*, 7:94-98.
- Villaseñor, J. L. 2003. Diversidad y distribución de las magnoliophyta de México. *Interciencia*, 28(3): 160-167.
- Villavicencio-Nieto, M. Á. y Pérez-Escandón, B. 2010. Vegetación e inventario de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua de Hidalgo. *Ciencia Universitaria*, 1: 23-33.
- Wagner, H. y Bladt, S. 1996. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. Springer-Verlag Berlín Heidelberg, Alemania. 384 pp.
- Williams, A., Toscano, B., Harbone. A., Eaglesa, J. y Watermand, P. 1994 Methylated C- glycosylflavones as taxonomic markers in orchids of the subtribe Ornithocephalinae. *Phytochemistry* 37(4): 1045-1053.
- Wright, N. P. 1963. Notas sobre orquídeas. En: R. Montes de Oca. Colibrías y orquídeas de México. Editorial Fournier. México, D. F.



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Huejutla

Huejutla de Reyes, Hidalgo, **20/Marzo/2019**

Oficio No. DIQB- 290/2019
Asunto: Liberación

ING. BLANCA FLOR ARGUELLES ARGUELLES
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
P R E S E N T E.

Por este medio le informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la Titulación por Tesis.

a) Nombre del Egresado (a):	Hernández Bautista Eleimy Martínez Espinoza Luis Ángel F.
b) Carrera	Licenciatura en Biología
c) No. de Control	14840067 14840198
d) Nombre del proyecto	"Aspectos ecológicos, etnobotánicos, análisis fitoquímico y cultivo <i>in vitro</i> de <i>Catasetum integerrimum</i> Hook. (Orchidaceae)"
e) Producto	TESIS

El Vocal Suplente para la presentación del Acto de recepción profesional será:

Vocal Suplente:	M.C López Mancilla Alejandra
-----------------	------------------------------

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

ATENTAMENTE

Concepción Zequera García
JEFE DE DEPTO. DE ING. QUÍMICA Y BIOQUÍMICA



Dra. Martínez Cabrera Dorismilda Presidente	Dra. Aguirre Hernández Eva Secretario	Ing. Galván Gutiérrez Rosalba Vocal



Km. 5.5 Carretera Huejutla-Chalahuiyapa, C. P. 43000.
Huejutla de Reyes, Hgo. Tel./Fax: 789 89 60648
Email: dir_huejutla@tecnm.mx
www.tecnm.mx | www.ithuejutla.edu.mx



RSGC-582 Alcance de la Certificación: Servicio educativo que comprende desde la inscripción hasta la entrega del Título y Cédula Profesional de licenciatura
Fecha de Actualización: 2018.09.13
Fecha de Terminación: 2021.08.30