

**“Análisis de cromosomas meióticos en orquídeas costarricenses del género
Sobralia para establecer su viabilidad”**

José Enrique Mora Calderón

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

2020

**“Análisis de cromosomas meióticos en orquídeas costarricenses del género
Sobralia para establecer su viabilidad”**

José Enrique Mora Calderón

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA



Pablo Alberto Bolaños Villegas. Ph.D

DIRECTOR DE TESIS



Luis Barboza Barquero. Ph.D

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Jorge Warner Pineda. M.Sc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Izayana Sandoval Carvajal. Lic

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Luis Gómez Alpízar. Ph.D

DIRECTOR DE ESCUELA



José Enrique Mora Calderón. Bach

SUSTENTANTE

2020

Dedicatoria

“Este trabajo lo dedico a mis padres que constantemente se esforzaron en brindarme las herramientas y ayudas necesarias para lograr cursar los estudios universitarios, pero también a todos mis amigos y amigas, colegas y conocidos que con su apoyo lograron recordarme que muchas veces la diferencia entre el éxito y el fracaso es no rendirse”

José Enrique Mora Calderón

Agradecimientos

Agradezco el apoyo constante de mi padre Enrique y mi madre Maritza, quienes desde siempre se preocuparon porque estuviera constantemente estudiando en las aulas y no en otros caminos.

A mi director de tesis Pablo Bolaños, por ser mi mentor en este trabajo y permitirme seguir creciendo como profesional.

A todos los profesores y profesoras de la escuela de agronomía de la UCR quienes durante todo este proceso, se tomaron un momento para brindarme consejos no como profesores, si no como colegas y amigos.

A la Universidad de Costa Rica por permitir la educación profesional a personas de bajos recursos, de manera que se pueda optar por mejorar la calidad de vida.

A mis amigos más cercanos, quienes en momentos de duda y fragilidad me recordaron que los límites no existen, si no que uno mismo los inventa.

Finalmente, quiero agradecer a todos los colegas y nuevos amigos que logré obtener a lo largo de esta carrera universitaria.

Índice general	
Índice de figuras	v
Índice de cuadros	vi
Resumen	viii
Introducción.....	1
Objetivos	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Marco Teórico	4
Materiales y Métodos	13
Material vegetal.....	13
Recolección del material vegetal	14
Preparación de las muestras	15
Frecuencia en la formación de tétradas y conteo de cromosomas.....	15
Viabilidad y germinación del polen	15
Obtención de datos	16
Frecuencia en la formación de tétradas.....	16
Viabilidad del polen.....	16
Germinación del polen.....	16
Número de cromosomas.....	17
Compatibilidad entre especies.....	17
Resultados	18
Formación de tétradas	18
Número de cromosomas.....	23
Discusión.....	29
Conclusiones.....	39
Recomendaciones.....	39
Referencias bibliográficas	40
Anexos	49
Anexo 1. Especies de <i>Sobralia</i> utilizadas para realizar cruces inter específicos.	49

Índice de figuras

- Figura 1.** Morfología de meiocitos que formaron tétradas (A) y triadas (B), como producto final de la meiosis en especies del género *Sobralia*. A) *S. fenzliana*, B) *S. bradeorum*. Tinción con DAPI, barra = 10 μ m. Alajuela, Costa Rica, 2019. 18
- Figura 2.** Células de polen de *Sobralia geminata* sometidas a prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio: A) células viables, B) células no viables. Visualización a 10x. San Pedro, San José, Costa Rica, 2020. 20
- Figura 3.** Viabilidad de polen de plantas de *Sobralia* (*S. helleri*, *S. geminata* e Híbrido 30), mediante tinción con cloruro de tetrazolio. Prueba de separación de medias DGC, letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$). Barras verticales representan la desviación estándar. San José, Costa Rica, 2020. 20
- Figura 4.** Células de polen de *Sobralia geminata*, (A) germinadas, y (B) no germinadas, tras ser sometidas a medio de cultivo BK modificado. Visualización a 10 x. San Pedro, San José, Costa Rica, 2020. 21
- Figura 5.** Germinación de polen de plantas de *Sobralia* (*S. helleri*, *S. geminata* e Híbrido 30), en medio de cultivo BK modificado. Prueba de separación de medias DGC, letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$). Barras verticales representan la desviación estándar. San Pedro, San José, Costa Rica, 2020. 22
- Figura 6.** Representación del ciclo meiótico de las especies de *Sobralia* analizadas. (A) Cigoteno (*S. bouchei*), (B) Diploteno (*S. amparoe*), (C) Metafase I temprana (*S. bradeorum*), (D) Anafase I temprana (*S. bradeorum*), (E) Telofase I (*S. fenzliana*) y (F) Telofase II (*S. geminata*). Tinción con DAPI, barra = 10 μ m. Alajuela, Costa Rica, 2019. 23
- Figura 7.** Morfología y número de cromosomas meióticos en metafase I de las especies de *Sobralia*: A) *S. amparoe*: $2n = 30$, B) *S. atropubescens*: $2n = 6$, C) *S. bouchei*: $2n = 34$, D) *S. bradeorum*: $2n = 48$, E) *S. crispissima*: $2n = 16$, F) *S. danjanzenii*: $2n = 32$, G) *S. fenzliana*: $2n = 28$, H) *S. geminata*: $2n = 32$, I) *S.*

<i>helleri</i> : 2n = 24, y J) <i>S. rosea</i> : 2n = 24. Imágenes tratadas con ImageJ, barra = 10 µm. Alajuela, Costa Rica, 2019.....	25
Figura 8. Formación de cápsula tras realizar cruce entre <i>S. mutisii</i> (<i>Brasolia</i> de Colombia) x <i>S. biflora</i> . Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.....	27
Figura 9. Formación de cápsula tras realizar cruce entre <i>S. silveira</i> x <i>S. chrysostoma</i> . Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.....	28
Figura 10. Formación de cápsula tras realizar cruce entre <i>S. chrysostoma</i> x <i>S. helleri</i> . Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.	29
Figura 11. Diagrama de híbridos de <i>Sobralia</i> registrados y no registrados en la Royal Horticulture Society, y especies parentales. San José, Costa Rica, 2020. Un cuadro negro representa un híbrido registrado, mientras que un cuadro gris representa un híbrido cuyo nombre no ha sido registrado.	34
Figura 12. Invernadero especializado para el cultivo de plantas de <i>Sobralia</i> del Jardín Botánico Lankester. Fotografía tomada por Pablo Bolaños Villegas. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.	49
Figura 13. Flores de <i>Sobralia atropubescens</i> utilizadas para realizar cruces con <i>Sobralia decora</i> y <i>Sobralia kerryae</i> . Fotografía tomada por Pablo Bolaños Villegas. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.	50
Figura 14. <i>Sobralia kerryae</i> utilizada en la realización de cruces. Fotografía tomada por Pablo Bolaños Villegas. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.	50
Figura 15. <i>Sobralia silveira</i> utilizada en la realización de cruces. Fotografía tomada por Pablo Bolaños Villegas. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.	51
Figura 16. Flor del presunto Híbrido 30 de <i>Sobralia</i> . Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.....	51

Índice de cuadros

Cuadro 1. Híbridos de <i>Sobralia</i> registrados, parentales, creador, y año de registro. Fuente: (Real Horticulture Society 2010).	9
Cuadro 2. Descripción floral y botánica de las especies de <i>Sobralia</i> estudiadas. San José, Costa Rica, 2019.	11

Cuadro 3. Producción de tétradas en distintas especies de orquídeas del género <i>Sobralia</i> , Alajuela, Costa Rica, 2019.....	19
Cuadro 4. Número de cromosomas en especies de orquídeas del género <i>Sobralia</i> , Alajuela, Costa Rica, 2019.....	24
Cuadro 5. Cruces entre especies de orquídeas del género <i>Sobralia</i> y su formación de cápsulas. San José, Costa Rica, 2020.....	26

Resumen

Se estudió la fertilidad de once especies del género *Sobralia* (*S. amparoe*, *S. atropubescens*, *S. bouchei*, *S. bradeorum*, *S. carazoi*, *S. crispissima*, *S. danjanzenii*, *S. fenzliana*, *S. geminata*, *S. helleri*, *S. rosea*), con el objetivo de determinar la capacidad reproductiva, el número de cromosomas y predecir la compatibilidad entre estas especies antes de realizar cruces inter específicos. La capacidad reproductiva se determinó mediante el conteo de células de polen (meiocitos) en la fase de tétrada al final de la meiosis, mediante el análisis de la progresión del ciclo meiótico, y mediante pruebas de viabilidad y germinación de polen. El número de cromosomas, se determinó mediante su conteo en meiocitos en metafase. La predicción de compatibilidad entre especies se realizó con base en la fertilidad de los especímenes, el número de cromosomas y resultados obtenidos al realizar cruces inter específicos. Todas las especies analizadas mostraron alta fertilidad y capacidad reproductiva, porcentajes de formación de tétradas de más del 80%, además de ciclos meióticos normales. El número de cromosomas fue variable $2n = 6$ a 48. La especie que mostró menor número de cromosomas fue *S. atropubescens*: $2n = 6$, y la que mostró mayor número de cromosomas fue *S. bradeorum*: $2n = 48$. Se observó la formación de cápsulas al realizar los cruces: *S. mutisii* (*Brasolia* de Colombia) \times *S. biflora*, *S. silveira* \times *S. chrysostoma* y *S. chrysostoma* \times *S. helleri*. Se presume que los cruces *S. danjanzenii* \times *S. geminata* ($2n = 32$), y *S. helleri* \times *S. rosea* ($2n = 24$), podrían generar híbridos fértiles debido a la similitud en cuanto a su número de cromosomas. Se sugiere que cruces entre especies con grandes diferencias entre el número de sus cromosomas, podrían generar esterilidad, por ejemplo: *S. atropubescens*: $2n = 6$ \times *S. bradeorum*: $2n = 32$, sin embargo, es necesario realizar dichos cruces para responder a esta hipótesis. Se desconoce el efecto de mecanismos de autoincompatibilidad presentes en el género *Sobralia* lo cual podría afectar la formación de híbridos en este género.

Introducción

La familia Orchidaceae es una de las familias de plantas angiospermas monocotiledóneas más grandes del mundo, la cual está representada por aproximadamente 25 000 especies. Sin embargo aún existen regiones no exploradas que podrían conllevar al aumento de esta cifra (Freuler 2008).

En Costa Rica crecen aproximadamente 1400 especies, de las cuales se estima que el 20% son endémicas, donde los principales géneros con mayor número de especies son *Epidendrum*, *Maxillaria*, *Lepanthes*, *Pleurothallis* y *Stelis* (JBL 2016). Estas 1400 especies representan el 5,6% del total de orquídeas reportadas en el mundo (Freuler 2008, JBL 2016).

En el país crecen orquídeas de reconocimiento mundial como la “Guaria de Turrialba” (*Cattleya dowiana*), reconocida como una de las orquídeas más bellas del mundo (Blanco 2015). El Jardín Botánico Lankester cultiva más de la mitad de las especies nativas de Costa Rica, cerca de 12 000 especímenes, pero además cuenta con una amplia colección de orquídeas exóticas de los géneros *Coelogyne*, *Dendrobium*, *Miltoniopsis* y *Vanda* entre otros, producto del intercambio con coleccionistas e instituciones botánicas (JBL 2016).

La taxonomía y filogenia de estas plantas es aún confusa. El género se describió por primera vez en 1798 por Ruiz y Pavón, y desde entonces ha sido dividido y ubicado en diferentes grupos conforme la ciencia ha permitido identificarlas con más precisión (Dressler 2009, Dressler et al. 2011). Recientemente se extrajeron algunas especies del género con caracteres específicos, para conformar un nuevo género llamado *Brasolia* (Baranow et al. 2017). Actualmente el género *Sobralia* comprende aproximadamente 125 especies (Neubig et al. 2011).

Debido a la variabilidad morfológica y a características específicas o exclusivas que presentan las orquídeas, como pigmentaciones atípicas, aromas o tamaños de órganos florales poco comunes, se consideran plantas con potencial ornamental. El género *Sobralia* es un claro ejemplo de esto, ya que presenta alta variabilidad entre especies. Las plantas de este género poseen flores grandes, característica que más llama su atención, además de una alta diversidad de colores

que van desde tonos blancos, rosados, violetas, púrpura, amarillos, hasta combinaciones de estos (Baranow et al. 2017). Es factible encontrar Sobralias desde el sur de México hasta Brasil (Klein y Piedade 2019). Se les encuentra en diferentes ambientes desde el nivel del mar hasta las zonas montañosas, lo cual muestra adaptación a diferentes climas (Dressler 2009). Se establecen sobre piedras, cortezas de árboles, y en la mayoría de los casos sobre el suelo conformando grandes poblaciones, conocidas como enjambres (Neubig et al. 2011). Todas estas cualidades específicas de las Sobralias las convierten en plantas con alto potencial para realizar mejoramiento genético, debido a que su capacidad de adaptación y diversidad morfológica, sugieren un acervo genético grande.

Su floración puede ser terminal o axilar. En especies se da de manera sincronizada, es decir todas las plantas florecen al mismo tiempo, lo cual no sucede en híbridos ya que no presentan sincronización en la floración (Neubig et al. 2011, Baranow et al. 2017). Una característica propia de este género es lo efímero de sus flores (Dressler y Pupulin 2014). Debido a esto, se les conoce popularmente como orquídeas de flor de un día (Neubig et al. 2011), aunque en algunos casos sus flores pueden durar hasta casi una semana (Dressler 2009).

Para este género de orquídeas, aún no se conoce la capacidad reproductiva y su compatibilidad con otras especies que podrían conferir características de valor comercial, como mayor tamaño de órganos florales, diferentes pigmentaciones o mayor longevidad de sus flores.

La disponibilidad de especies nativas o exóticas y la capacidad para su reproducción, han sido los principales factores reportados como limitantes para realizar mejoramiento genético, como fue el caso de Hawái, en donde se realizó mejoramiento genético con el género *Dendrobium*, una vez superados estos obstáculos (Kamemoto et al. 1999). En Costa Rica no existen estas limitaciones, dado que se cuenta con disponibilidad de especies nativas y exóticas, además de la capacidad para reproducirlas sexual y vegetativamente (Freuler 2008, Blanco 2015, PROCOMER 2017). A pesar de que el Jardín Botánico Lankester cuenta con una amplia colección de Sobralias en un invernadero especializado, y que es factible

encontrarlas a lo largo del territorio costarricense, en el país no existen iniciativas relacionadas con su domesticación y mejoramiento genético.

El mercado de orquídeas en Costa Rica se encuentra en constante crecimiento, sin embargo, sus principales actividades se concentran en la reproducción sexual e *in vitro* de orquídeas para la venta interna y para exportación. Además, el negocio se ha concentrado en la venta de los géneros exóticos más comunes como *Dendrobium*, *Oncidium* y *Phalaenopsis* entre otros (PROCOMER 2017). En cuanto a la comercialización de orquídeas nativas, solo se conoce el caso de *Cattleya dowiana* (Blanco 2015).

Según Marco Córdoba, Ingeniero agrónomo gerente de la compañía Flores y Follajes del Caribe y profesor de la UNED, en Costa Rica no se tienen registros de compañías ni instituciones que realicen mejoramiento genético en orquídeas. Además, existe una importante necesidad de realizar mejoramiento genético, ya que en el mercado ornamental solo se comercializan las mismas especies y se requiere diversificar la oferta en función de ser más competitivos a nivel mundial (Comunicación personal¹).

Esta investigación caracteriza genéticamente a este género mediante el estudio de los cromosomas, el ciclo meiótico, la viabilidad del polen, y la compatibilidad entre especies a la hora de hacer cruces. Siendo esta la primera investigación en Costa Rica de este tipo con el género *Sobralia*, se busca generar el conocimiento necesario para iniciar eventualmente un programa de mejoramiento genético que conlleve al desarrollo de orquídeas que diversifiquen la oferta agrícola de Costa Rica en el marco ornamental.

¹ Córdoba, M. 9 sep. 2019. Mejoramiento genético y mercado de las orquídeas en Costa Rica (Llamada telefónica). San José, Costa Rica, UNED y Flores y Follajes del Caribe.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la capacidad reproductiva en once especies de orquídeas del género *Sobralia* (*S. amparoe*, *S. atropubescens*, *S. bouchei*, *S. bradeorum*, *S. carazoi*, *S. crispissima*, *S. danjanzenii*, *S. fenzliana*, *S. geminata*, *S. helleri*, *S. rosea*), para identificar cuáles especies se podrían someter a un programa de mejoramiento genético.

Objetivos específicos

- Determinar eficiencia en la producción de tétradas en polen de especies de orquídeas del género *Sobralia*.
- Determinar el número de cromosomas para cada especie.
- Predecir compatibilidad entre especies a la hora de hacer cruces.

Marco Teórico

Costa Rica es un país que alberga una amplia diversidad de especies de orquídeas nativas y exóticas, a pesar de ello su conservación no deja de ser tema de importancia, ya que muchas de estas especies se encuentran amenazadas por factores como el tráfico ilegal y la deforestación (Lahaye et al. 2008).

Las orquídeas del género *Sobralia* son organismos con alto nivel de dificultad para clasificarlos en términos de taxonomía y filogenia. Esta situación se debe a aspectos como su alta diversidad, flores delicadas y de corta duración. Esto ocasiona que sea prácticamente imposible conservar las flores inclusive por algunas horas, lo que dificulta la investigación de estos organismos (Dressler y Pupulin 2014). La única alternativa viable para superar este obstáculo, ha sido que los investigadores estudien a estas flores en el lugar donde las encuentran y justo en el momento en que se da la floración (Dressler 2009).

Se considera que este género en específico presenta un carácter polifilético, ya que en términos morfológicos se observa mucha variabilidad, por lo cual se estima que este género podría derivarse de varios ancestros comunes (Dressler

2009, Dressler et al. 2011). Los otros géneros que conforman la tribu Sobralieae, se consideran monofiléticos (Neubig et al. 2011).

Sobralieae Pfitzer, es una tribu neo tropical de orquídeas que comprende aproximadamente 200 especies. Esta tribu representa a los géneros *Elleanthus* C.Presl, *Epilyna* Schltr, *Sertifera* Lindl. & Rchb.f., *Sobralia* Ruiz y Pav y recientemente *Brasolia* (Baranow et al., 2017). Pridgeon et al. (2001), caracterizaron morfológicamente a la tribu Sobralieae como un grupo de orquídeas de raíces carnosas, tallos parecidos a pequeñas cañas, con inflorescencias terminales o axilares y pequeñas, exceptuando al género *Sobralia* debido a que presenta flores grandes en la mayoría de los casos, y efímeras.

Lo efímero de la floración y el tamaño de los órganos florales, posiblemente sean las características que mejor distinguen a las Sobralias de otras orquídeas. Dicha floración oscila entre periodos que van desde pocas horas, hasta tres días en algunos casos (Dressler 2009, Neubig et al. 2011, Dressler y Pupulin 2015). Se ha reportado que en especies la floración sucede de manera sincronizada, lo que significa que todas las plantas de una misma especie florecen simultáneamente (Dressler y Pupulin 2015).

Franco Pupulin, investigador del Jardín Botánico Lankester, ha mencionado que es factible observar como poblaciones de una misma especie que se ubican en dos regiones distintas, florecen simultáneamente. Los mecanismos que inducen la floración en el género *Sobralia* son aún desconocidos, sin embargo, observaciones de este tipo sugieren que el clima podría no ser uno de los factores que influyen de manera importante sobre la floración de este género, ya que es factible observar la floración de una misma especie ubicada en climas distintos de manera sincronizada (Comunicación personal²).

Dressler (2009), sugiere que la sincronía de la floración en una misma especie, podría ser un mecanismo que evita la polinización inter-específica, además en plantas donde la floración ocurre durante pocas horas, no podría haber polinización cruzada si su antesis sucediera en días diferentes o no fuera sincronizada. Sin

² Pupulin, F. 11 sep. 2019. Aspectos varios de la floración en el género *Sobralia* (conversación personal). Cartago, Costa Rica, Jardín Botánico Lankester.

embargo, se podrían formar híbridos naturales si dos especies con floración sincronizada florecen al mismo tiempo. Este mecanismo de sincronización durante la floración, no está presente en híbridos (Dressler 2009, Neubig et al. 2011).

Algunos autores sugieren que el flujo de genes en orquídeas mesoamericanas es reducido debido a baja capacidad reproductiva y poca producción de semillas, ya que el número de individuos capaz de reproducirse es bajo (Tremblay y Ackerman 2001). También se ha mencionado que la falta de polinizadores y el aislamiento geográfico, limitan la polinización de orquídeas (Waterman y Bidartondo 2008). No obstante, Dressler (2009) sugiere que en la naturaleza las sobralias pueden ser polinizadas por abejas de la tribu Euglossini a manera de polinizador generalista, y o por colibríes. También se conocen plantas de este género que se auto polinizan al cabo de tres días post anthesis (Dressler 2009).

Se tiene entonces que el género *Sobralia* muestra alta diversidad entre las especies que lo componen, además de comportamientos biológicos muy específicos, como la sincronización de especies al momento de la floración y la corta duración de esta. Sin embargo, se desconocen las razones evolutivas que han forjado el comportamiento reproductivo de estos organismos, su capacidad reproductiva o fertilidad, y en algunos casos se desconoce si la planta en estudio es un híbrido o una especie.

Una manera de abordar estas hipótesis es mediante comparaciones experimentales de poblaciones, lo cual generalmente es poco viable debido a ciclos reproductivos lentos y poca o ninguna divergencia genética entre los individuos muestreados (Lahaye et al. 2008). Sin embargo, la caracterización de especies para entender sus relaciones evolutivas y su capacidad reproductiva, también se puede abordar por medio del estudio de los cromosomas sexuales (Kao et al. 2007, Moraes et al. 2017).

Los cromosomas son complejos de ácidos nucleicos y proteínas cuya morfología y número varía según la especie, lo que permite utilizarlos en estudios evolutivos (Kao et al. 2007, Lee et al. 2011). En orquídeas, los cromosomas sexuales se encuentran en células de polen inmaduro también llamadas meiocitos (Bolaños-Villegas et al. 2008).

Otra alternativa para estudiar la capacidad reproductiva de las especies, es analizar la progresión del ciclo meiótico y la viabilidad del polen (Bolaños-Villegas et al. 2008, Stanley y Linskens 2012, Mercier et al. 2015). Es posible observar defectos en la sinapsis y el emparejamiento de cromosomas homólogos de orquídeas durante el cigonema y paquiteno (profase), o durante la alineación y segregación de bivalentes (metafase, anafase, telofase I y II), lo cual se traduce en baja formación de tétradas y baja viabilidad del polen (Bolaños-Villegas et al. 2008, Mercier et al. 2015, Moraes et al. 2017). Un ciclo meiótico normal resulta en la formación de tétradas, es decir cuatro células haploides con material genético recombinado (Mercier et al. 2015).

Bolaños-Villegas et al (2008), encontraron una alta tasa en la formación de tétradas al analizar especies de los géneros *Phalaenopsis* Blume y *Doritis* Lindl., mayor al 80%, sin embargo, lo contrario sucedió al analizar híbridos de *Doritaenopsis*, en los cuales en la mayoría de los casos menos del 10% de los meiocitos formaron tétradas. Además, encontraron un alto porcentaje de micro-núcleos (segmentos de ADN que se pierden durante la meiosis) en híbridos infértiles, los cuales presentaron poca o nula formación de semillas.

La fertilidad y viabilidad del polen en orquídeas se puede determinar de diversas maneras. Las dos técnicas utilizadas con mayor frecuencia son, la determinación del porcentaje de formación de tétradas al final del ciclo meiótico, y las pruebas de viabilidad del polen mediante tinción con cloruro de tetrazolio (Kao et al. 2007, Bolaños-Villegas et al. 2008), ambas brindan información distinta.

La viabilidad del polen suele estar influenciada por factores ambientales, genéticos y morfológicos, y esta viabilidad puede durar desde pocas horas hasta varios días. Debido a que en los programas de mejoramiento genético se requiere del polen para la realización de cruces, se vuelve importante estudiar la viabilidad del polen mediante técnicas rápidas y eficientes (Dafni et al. 2012), como por ejemplo la tinción con cloruro de tetrazolio (Gisbert Domenech y Picó Sirvent 2014). Mediante este análisis, es posible identificar problemas de esterilidad masculina en un escenario de incompatibilidad al realizar cruces, así como determinar la viabilidad del polen cuando se pretende almacenarlo (Gisbert Domenech y Picó Sirvent 2014).

Además, la detección de la disminución de la viabilidad del polen en las plantas, comúnmente se utiliza para identificar híbridos inter específicos (Zonneveld y Duncan 2003, Randell et al. 2004, Lihova et al. 2007, Rotreklová 2008).

Dentro del amplio grupo de angiospermas que se han investigado, se ha reportado que especies de orquídeas son las plantas que han mostrado mayor viabilidad de polen a largo plazo (hasta 50 días en *Dactylorhiza* spp) (Neiland y Wilcock 1995). Para el caso de la familia Orchidaceae, se considera que la viabilidad de polen prolongada, se debe a que los granos de polen suelen estar más protegidos ya que están empaquetados en unidades de dispersión (polinios), y además están rodeados de elastoviscina, la cual es una sustancia pegajosa que garantiza la cohesión de los granos de polen (Pacini y Hesse 2002).

Para realizar mejoramiento genético en plantas, además de la fertilidad del genotipo, a menudo se requiere conocer el número y tamaño de los cromosomas (Kamemoto et al. 1999). Esta información es de vital importancia a la hora de predecir la compatibilidad entre especies antes de realizar cruces (Bolaños-Villegas et al. 2008).

Cruzar organismos con número y tamaño de cromosomas similares, aumenta las posibilidades de obtener éxito en un programa de mejoramiento genético (Kamemoto et al. 1999). No obstante, una correcta segregación de pares de cromosomas homólogos no solo depende de procesos como el emparejamiento, la sinapsis y la recombinación en etapas previas, sino también de la morfología de los cromosomas, proteínas unidas al ADN y patrones de condensación de la cromatina entre otros (Armstrong y Jones 2003, Schwarzacher 2003).

Además, procesos meióticos desequilibrados también repercuten en el desarrollo de los gametos (Singh 2016), la diferencia en el número de cromosomas y en la ploidía pueden afectar este proceso, y por ende representar un desafío para el desarrollo de híbridos (Singh y Hymowitz 1987, Bolaños-Villegas et al. 2008).

Cruces inter-específicos en orquídeas del género *Paphiopedilum* Pfitzer son comunes en el marco hortícola para formar híbridos, sin embargo, a menudo se obtiene esterilidad y baja fertilidad producto de mal emparejamiento de sus cromosomas al cruzar especies filogenéticamente distanciadas. Sin embargo, al

cruzar especies filogenéticamente cercanas, la esterilidad y baja fertilidad de los híbridos disminuye (Lee y Chung 2010).

En cuanto al desarrollo de híbridos en el género *Sobralia*, "Royal Horticulture Society, 2010" (RHS, por sus siglas en inglés), reporta que el primer híbrido inter específico natural en este género (*S. wiganiae*, apodado *S. veitchii*), se registró formalmente en 1898, aunque se menciona que ya existía desde 1856. Estos autores reportan que la hibridación en el género *Sobralia*, se popularizó a comienzos del siglo XX, sin embargo, el número de híbridos registrados desde entonces es bajo (Cuadro 1), lo cual sugiere que la hibridación en el género *Sobralia* no ha sido una actividad común.

Cuadro 1. Híbridos de *Sobralia* registrados, parentales, creador, y año de registro. Fuente: (Real Horticulture Society 2010).

Nombre del Híbrido	Especie receptora de polen	Especie donadora de polen	Creador y año de registro
<i>S. wiganiae</i>	<i>S. macrantha</i>	<i>S. xantholeuca</i>	Híbrido natural, 1898.
<i>S. amanecer</i>	<i>S. atropubescens</i>	<i>S. sessilis</i>	Hoosier, 2000.
<i>S. amesiae</i>	<i>S. wilsoniana</i>	<i>S. xantholeuca</i>	Sanders, 1895.
<i>S. amesiana</i>	<i>S. wilsoniana</i>	<i>S. xantholeuca</i>	S., 1895.
<i>S. baron ohara</i>	<i>S. amesiae</i>	<i>S. macrantha</i>	Jardines Botánicos de Tokio, 1923.
<i>S. colmaniae</i>	<i>S. veitchii</i>	<i>S. xantholeuca</i>	Colman, 1907
<i>S. dellensis</i>	<i>S. leucoxantha</i>	<i>S. lowii</i>	Schroder, 1907.
<i>S. edina</i>	<i>S. holfordii</i>	<i>S. xantholeuca</i>	Jardines Botánicos de Edimburgo, 1926.
<i>S. gatton lily</i>	<i>S. holfordii</i>	<i>S. lucasiana</i>	Colman, 1915
<i>S. inverleith</i>	<i>S. lowii</i>	<i>S. xantholeuca</i>	Jardín Botánico de Edimburgo, 1926.

<i>S. jeanette</i>	<i>S. charlesworthii</i>	<i>S. veitchii</i>	Charlesworth, 1926.
<i>S. la folie</i>	<i>S. leucoxantha</i>	<i>S. xantholeuca</i>	E.Young, 2009.
<i>S. luminosa</i>	<i>S. holfordii</i>	<i>S. wilsoniana</i>	Sanders, 1903.
<i>S. lydia</i>	<i>S. xantholeuca</i>	<i>S. frimbriata</i>	Bruce Rogers, 2008.
<i>S. lyoth</i>	<i>S. charlesworthii</i>	<i>S. macrantha</i>	Charlesworth, 1919.
<i>S. mirabilis</i>	<i>S. macrantha</i>	<i>S. veitchii</i>	Sanders, 1903.
<i>S. modestia</i>	<i>S. biflora</i>	<i>S. decora</i>	Ted Green, 2007.
<i>S. nina rach</i>	<i>S. veitchii</i>	<i>S. mirabilis</i>	Bruce Rogers, 2008.
<i>S. puanani</i>	<i>S. macrantha</i>	<i>S. violacea</i>	Ted Green, 2008.
<i>S. raymond</i>	<i>S. violacea</i>	<i>S. powellii</i>	Bruce Rogers, 2008.
<i>S. roseo-macrantha</i>	<i>S. macrantha</i>	<i>S. rosea</i>	Veitch, 1897.
<i>S. shoenbrunnensis</i>	<i>S. macrantha</i>	<i>S. xantholeuca</i>	Schoenbrunn, 1913.
<i>S. sedenii</i>	<i>S. macrantha</i>	<i>S. rosea</i>	Veitch, 1897.
<i>S. shinjik</i>	<i>S. dellensis</i>	<i>S. macrantha</i>	Jardines Botánicas de Tokio, 1923.
<i>S. siebertiana</i>	<i>S. hodgkinsonii</i>	<i>S. macrantha</i>	Sanders, 1908.
<i>S. songbird</i>	<i>S. macrantha</i>	<i>S. mirabilis</i>	PC Elfleet, 2004.
<i>S. yellow kiss</i>	<i>S. xantholeuca</i>	<i>S. mirabilis</i>	Santa Barbara Orchid Estate, 1999.
<i>S. ecuadoriana*</i>	<i>S. gentryi</i>	<i>S. powellii</i>	Híbrido natural, 2002.
<i>Sobralia*</i>	<i>S. powellii</i>	<i>S. mirabilis</i>	Orchidnuts, año desconocido.

<i>Sobralia</i> *	<i>S. decora</i>	<i>S. leucantha</i>	Universidad de Connecticut, año desconocido.
-------------------	------------------	---------------------	--

* Nombres de híbridos no registrados

Debido a que esta investigación buscó describir genéticamente el número de cromosomas, la fertilidad y predecir la compatibilidad entre especies de *Sobralia*, con el objetivo de generar información valiosa para programas de mejoramiento genético, se presenta mediante el Cuadro 2 las características generales de estas plantas y sus órganos florales; carácter de mayor importancia en términos económicos en el marco de las orquídeas.

Cuadro 2. Descripción floral y botánica de las especies de *Sobralia* estudiadas. San José, Costa Rica, 2019.

Especie	Descripción floral	Descripción botánica
<i>S. amparoe</i> Schltr	Sépalos color púrpura claro, pétalos color púrpura oscuro. Labelo de bordes ondulados color púrpura oscuro con amarillo pálido en el interior (Schlechter 1923).	Plantas de entre 1,8 y 2 m de altura (observación personal)*, tallos delgados en forma de caña, hojas lanceoladas acuminadas y coráceas, terrestre.
<i>S. atropubescens</i> Ames y C. Schweinf	Flor de 3 cm de diámetro, sépalos de color "oro" o café marrón con tinción crema en las puntas. Labelo con tonos púrpura y una línea crema en el centro (Ames y Schweinf 1930a).	Planta de entre 15 y 35 cm de altura (observación personal)*, vainas pubescentes, hojas lanceoladas acuminadas, tallos en forma de caña, terrestre.
<i>S. bouchei</i> Ames y C. Schweinf	Flor de 1 cm de diámetro. Labelo con bordes altamente ondulados de color púrpura oscuro, con sangrado púrpura claro y amarillo. Pétalos de color púrpura claro y sépalos del mismo color (Ames y Schweinf 1930b).	Planta de entre 80 y 120 cm de altura (observación personal)*, hojas lanceoladas acuminadas, tallos en forma de caña, terrestre.
<i>S. bradeorum</i> Schltr	Pétalos grandes de borde ondulado color púrpura	Planta de entre 1 y 1,2 m de altura (observación

	claro. Sépalos del mismo color, labelo con bordes ondulados color púrpura pero con amarillo pálido en el interior (Ames y Schweinf 1930).	personal)*, tallos simples en forma de caña, hojas lanceoladas, elípticas, terrestre.
<i>S. carazoi</i> Lank. y Ames	Flor de 1 cm de diámetro, pétalos blancos oblongos, sépalos dorados. Labelo blanco con borde crenulado (Lankester y Ames 1924).	Hojas lanceoladas acuminadas, estrechamente elípticas y coráceas. Tallos en forma de caña, terrestre.
<i>S. crispissima</i> Dressler	Flor de 3 cm de diámetro, con pétalos y sépalos color blanco. Labelo blanco-anaranjado con manchas rojas y borde ondulado	Planta de entre 30 y 40 cm de altura (observación personal)*, tallos en forma de caña, hojas lanceoladas acuminadas, terrestre.
<i>S. danjanzenii</i> Dressler y Pupulin	Flor de 5 cm de diámetro, pétalos blancos estrechamente obtusos. Sépalos blancos con nervadura verdosa media y ápice más oscuro. Labelo blanco con amarillo en el interior y borde crenulado (Dressler y Pupulin 2014).	Planta de entre 70 y 80 cm de altura (observación personal)*, hojas lanceoladas, acuminadas, tallos con forma de caña, terrestre.
<i>S. fenzliana</i> Rchb.f	Flor de 6 cm de diámetro, pétalos y sépalos color rosado claro a púrpura. Labelo púrpura de borde crestado, presenta un tono marrón oscuro en el interior y una mancha blanca en el borde (Reichenbach 1852).	Planta de entre 1,5 y 2 m de altura (observación personal)*, tallos con forma de caña, erectos. Hojas lanceoladas, acuminadas. Terrestre.
<i>S. geminata</i> Dressler y Bogarín	Flor de 3 cm de diámetro (dos flores por ápice), sépalos de color crema a verde con venación verde, y ápices verdes. Pétalos blancos, labelo blanco de borde crestado, con el interior amarillo y manchas o rayas color marrón pálido (Dressler y Bogarín 2009).	Planta de entre 1,5 y 2 m de altura (observación personal)*, tallos erectos en forma de caña color púrpura verdoso. Hojas elípticas, lanceoladas. Terrestre.
<i>S. helleri</i> A.D. Hawkes	Flor de 5 cm de diámetro, con sépalos y pétalos color blanco. Labelo color rojo con mancha blanca debajo de la columna (Rach 2007a).	Planta de entre 1 y 2,2 m de altura (observación personal)*, tallos en forma de caña, erectos. Hojas lanceoladas y acuminadas. Terrestre.

S. <i>rosea</i> Poepp y Endl	Flor de 9 cm de diámetro, sépalos y pétalos son color blanco a rosa. El labelo es blanco con manchas púrpura oscuro, formando un sangrado blanco, con borde ondulado (Rach 2007b).	Planta de entre 1 y 1,4 m de altura (observación personal)*, tallos en forma de caña, erectos. Hojas lanceoladas, acuminadas y coráceas.
---------------------------------	--	--

*Medición realizada en los especímenes ubicados en el invernadero de Sobralias del Jardín Botánico Lankester, Dulce Nombre Cartago, 2019.

Materiales y Métodos

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio de biología molecular de la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica, ubicado en barrio San José, Alajuela, en el Jardín Botánico Lankester de la Universidad de Costa Rica, ubicado en Dulce Nombre de Cartago, y en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas de la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro, San José, Costa Rica.

Material vegetal

Los meiocitos se recolectaron de una colección de plantas de *Sobralia* que posee el Jardín Botánico Lankester, el cual cuenta con un invernadero especializado para estas orquídeas (Figura 12, anexo 1). De las especies de *Sobralia* recolectadas y estudiadas por el Jardín Botánico Lankester, fue factible encontrar aproximadamente 30 especies representadas por plantas vivas.

El número de cromosomas y la frecuencia en la formación de tétradas, se determinó para once especies: *S. amparoe*, *S. atropubescens*, *S. bouchei*, *S. bradeorum*, *S. carazoi*, *S. crispissima*, *S. danjanzenii*, *S. fenzliana*, *S. geminata*, *S. helleri* y *S. rosea*. El criterio de selección de estas especies se basó en la disponibilidad de botones florales sanos a la hora de realizar los muestreos. Adicionalmente se realizaron cruces entre especies, y ensayos de germinación y viabilidad de polen, de acuerdo a la disponibilidad de flores.

Recolección del material vegetal

La recolección de las muestras para la determinación del número de cromosomas, y la frecuencia en la formación de tétradas, consistió en visitar el invernadero de Sobralias del Jardín Botánico Lankester en repetidas ocasiones, para extraer los polinios del botón floral cuando este aún se encontraba cerrado. Este proceso se realizó entre los meses de enero y octubre del 2019. Estos polinios se extrajeron de botones florales cerrados con distinto grado de desarrollo o longitud. Esto para garantizar la recolección de meiocitos en diferentes fases de la meiosis.

Después de recolectar los polinios y clasificarlos según especie y longitud de botón floral, se procesaron según Lee y Chung (2010). Para esto se colocaron los polinios en tubos de micro-centrífuga que contenían una solución de 8-hidroxiquinolina (Sigma-Aldrich) 2 mM, durante 5 horas a 25 °C, para inducir condensación de cromosomas y mejorar su morfología al momento de analizarlos en el microscopio. Posteriormente mediante el uso de pinzas, los polinios fueron trasladados a otros tubos de micro-centrífuga que contenían una solución fijadora de etanol/ácido acético glacial en una relación 3:1 v/v, durante 12 horas para luego ser congelados a -20 °C.

Para realizar las pruebas de viabilidad y germinación de polen, se visitó el Jardín Botánico Lankester en febrero 2020 con el objetivo de extraer polinios de flores que recién realizaran la antesis. Estas fueron pruebas preliminares con las especies *S. helleri*, *S. geminata* y un híbrido etiquetado como H30 (Figura 16, anexo 1). Estas flores se cortaron por el pedúnculo, se colocaron en una caja de cartón con orificios para ventilación, y de inmediato se trasladaron al Centro para Investigaciones en Granos y Semillas.

Para la realización de cruces, se utilizaron las especies que presentaron flores abiertas y sanas en el Jardín Botánico Lankester, durante el periodo de noviembre 2019 y febrero 2020: *S. atropubescens* (Figura 13, anexo 1), *S. kerryae* (Figura 14, anexo 1), *S. decora*, *S. dorbiguyana*, *S. mutisii* (*Brasolia* de Colombia), *S. bifolia*, *E. karremans*, *S. fragans*, *S. blancoi*, *S. bouchei*, *S. mucronata*, *S. chrysostoma*, *S. silveira* (Figura 15, anexo 1) y *S. helleri*.

Preparación de las muestras

Frecuencia en la formación de tétradas y conteo de cromosomas

Para la determinación de la frecuencia en la formación de tétradas y el número de cromosomas, se siguió el procedimiento según Bolaños-Villegas et al (2008). Para esto se colocó un polinio sobre un cubre-objetos y se maceró sobre una gota de solución de ácido acético al 40%. Posteriormente y sin permitir que el ácido acético se secase, se adicionaron 2 gotas de 4', dihidrocloruro de 6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich), para lograr la tinción de ADN fluorescente. Seguidamente se colocó un cubre-objetos y se fijaron los bordes del cubre objetos junto al porta objetos aplicando esmalte transparente para uñas, esto para evitar que el cubre-objetos se moviera de lugar al ser manipulado en el microscopio. Cada porta-objetos se etiquetó con el nombre de la especie y longitud del botón floral del cual provenía el polinio macerado.

Viabilidad y germinación del polen

Para analizar la viabilidad del polen, se siguió el procedimiento con cloruro de tetrazolio utilizado por Gisbert Domenech y Picó Sirvent (2014). Para esto se colocó medio polinio y 5 gotas de cloruro de tetrazolio al 1%, en un tubo de ensayo de micro-centrífuga de 1,5 ml, y se incubó a 25 °C por 24 horas.

Para la germinación del polen, se preparó un medio de cultivo BK modificado según Chen y Fang (2016), el cual se compuso de 100 mg/l de H_3BO_3 , 100 mg/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 100 mg/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, y 100 mg/l KNO_3 , suplementado con sacarosa al 20% y ajustado a pH de 5,7. El medio de cultivo se esterilizó y se introdujo 200 μ l por tubo de ensayo de micro centrífuga de 1,5 ml. Se colocó medio polinio de cada especie analizada en su respectivo tubo de micro-centrífuga y se incubó a 25 °C por 24 horas.

Obtención de datos

Frecuencia en la formación de tétradas

Para estimar la frecuencia en la formación de tétradas, los polinios fueron analizados en un microscopio de epifluorescencia BX53 Olympus, Tokio, conectado a una cámara CCD Color Q5 Olympus, Tokio, y una computadora Dell Precision Tower T7810 (Dell, Round Rock, TX).

Se fotografiaron al menos 100 meiocitos con 3 repeticiones biológicas (cada repetición biológica representó un porta-objetos) por especie en la fase final del proceso meiótico, y se contabilizó en términos de porcentaje la formación de tétradas.

Viabilidad del polen

Para estimar el porcentaje de viabilidad del polen, se colocó 100 μ l de la solución de cloruro de tetrazolio con polen sobre un portaobjetos, y se realizaron 600 conteos de células de polen por porta objetos (incluyendo viables e inviables) a través de un microscopio de luz Olympus CX31 a 10x, por especie. Se realizaron 3 repeticiones por especie. Se consideraron células viables aquellas que mostraron un color rosado sólido, e inviables aquellas que no mostraron tinción, o una tinción leve. Este proceso se realizó un día después de la antesis.

Germinación del polen

La estimación del porcentaje de germinación del polen, se realizó mediante el conteo de 1000 células de polen (incluyendo células con y sin emisión de tubo polínico), y se consideró germinación de polen efectiva cuando el tubo polínico fuera igual o más largo al diámetro de la célula de polen (Stanley y Linskens 2012). Se realizaron 3 repeticiones por especie. Este proceso se realizó un día después de la antesis.

Los datos de viabilidad y germinación de polen, se sometieron a las pruebas estadísticas de Shapiro-wilks y Levin, y se realizó una prueba paramétrica de separación de medias DGC con el software InfoStat.

Número de cromosomas

El número de cromosomas se determinó a partir de meiocitos en metafase y anafase I. Para esto se fotografiaron al menos 20 meiocitos por especie con los cuales se realizó el conteo de cromosomas mediante el software libre ImageJ, (Schneider et al. 2012). Finalmente, las imágenes se ajustaron por medio del software Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, San José, CA).

Compatibilidad entre especies

Como se mencionó anteriormente, la realización de cruces dependió de la disponibilidad de flores abiertas de diferentes especies que pudieran ser utilizadas como donadores o receptores de polen. Para esto, mediante el uso de pinzas se extrajo el polinio de una especie y se colocó en el estigma de otra especie, en algunos casos esto se realizó de manera recíproca.

Este proceso se realizó entre las distintas especies que mostraron floración entre noviembre 2019 y febrero 2020: *S. atropubescens* × *S. kerryae*, *S. atropubescens* × *S. decora*, *S. atropubescens* × *S. dorbiguyana*, *S. dorbiguyana* × *S. atropubescens*, *S. mutisii* (Brasolia de Colombia) × *S. biflora*, *S. biflora* × *S. mutisii* (Brasolia de Colombia), *S. dorbiguyana* × *S. kerryae*, *S. kerryae* × *S. dorbiguyana*, *S. dorbiguyana* × *S. kerryae*, *S. kerryae* × *S. dorbiguyana*, *S. dorbiguyana* × *S. fragans*, *S. fragans* × *S. dorbiguyana*, *S. chrysostoma* × *S. Silveira*, *S. silveira* × *S. chrysostoma*, *S. mucronata* × *S. bouchei*, *S. mucronata* × *S. blancoe*, *S. blancoe* × *S. bouchei*, *S. decora* × *S. chrysostoma*, *S. chrysostoma* × *S. decora*, *S. helleri* × *S. chrysostoma*, *S. chrysostoma* × *S. helleri* y *E. karremans* × *S. kerryae*.

Se consideró un cruce compatible aquel que como resultado mostrara la formación de cápsulas. Para predecir la compatibilidad entre especies, se tomó en consideración el número de cromosomas de cada especie, la viabilidad de su polen y la evidencia en la formación de cápsulas al realizar cruces recíprocos.

Resultados

Formación de tétradas

El porcentaje de formación de tétradas varió entre las distintas especies. La tinción con DAPI fue efectiva para observar las tétradas (Figura 1). El análisis de eficacia en la formación de tétradas mostró porcentajes mayores al 80% en todas las especies (Cuadro 3). La especie que presentó menor formación de tétradas normales fue *S. atropubescens* con $80,0 \pm 6,6\%$, y la especie que mostró mayor porcentaje de formación de tétradas fue *S. danjanzenii* con $93,5 \pm 0,7\%$.

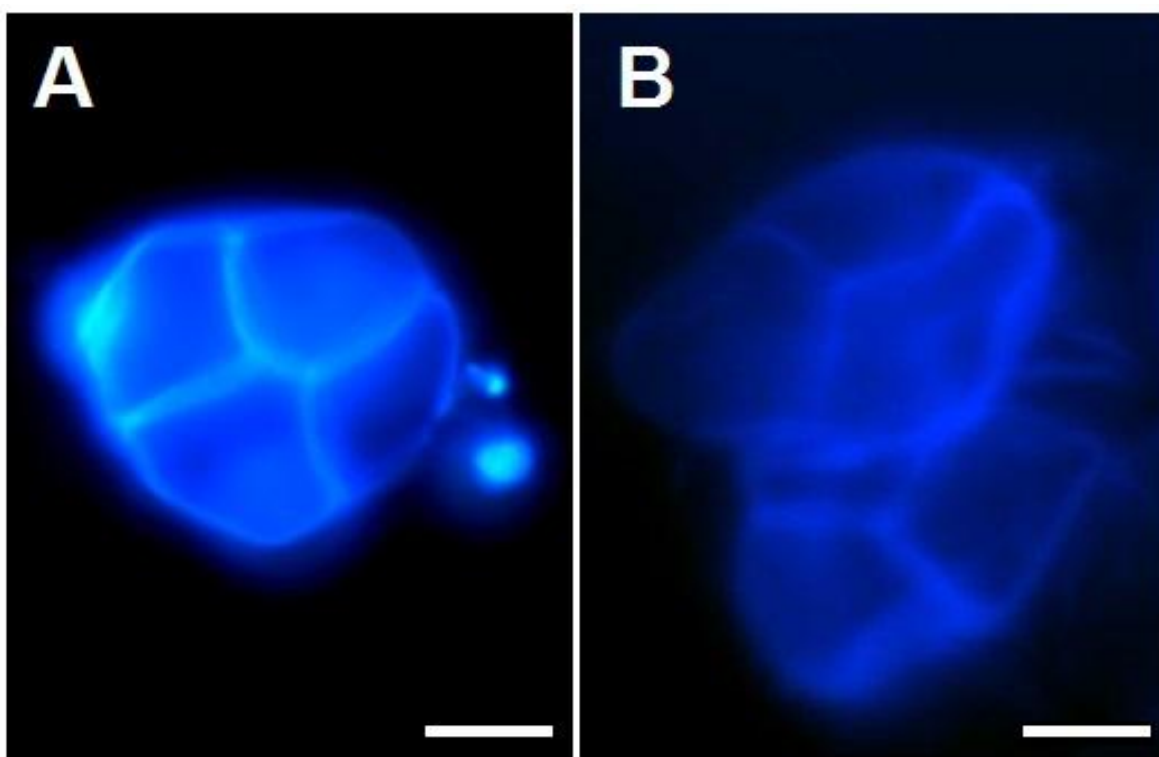


Figura 1. Morfología de meiocitos que formaron tétradas (A) y triadas (B), como producto final de la meiosis en especies del género *Sobralia*. A) *S. fenzliana*, B) *S. bradeorum*. Tinción con DAPI, barra = 10 μm . Alajuela, Costa Rica, 2019.

Cuadro 3. Producción de tétradas en distintas especies de orquídeas del género *Sobralia*, Alajuela, Costa Rica, 2019.

Especies	Tétradas (%)*
<i>S. amparoe</i>	89,3 ± 8,5
<i>S. atropubescens</i>	80,0 ± 6,6
<i>S. bouchei</i>	88,4 ± 5,3
<i>S. bradeorum</i>	89,7 ± 1,8
<i>S. carazoi</i>	85,7 ± 5,1
<i>S. crispissima</i>	83,1 ± 10,2
<i>S. danjanzenii</i>	93,5 ± 0,7
<i>S. fenzliana</i>	87,5 ± 1,0
<i>S. geminata</i>	89,5 ± 1,0
<i>S. helleri</i>	86,0 ± 2,1
<i>S. rosea</i>	93,1 ± 2,1

*Datos reportados con \pm desviación estándar de tres repeticiones biológicas, cada una con n=100.

Mediante la tinción con tetrazolio se cuantificó la viabilidad del polen. Se observó una coloración rosado sólido en células de polen de *S. geminata* viables (Figura 2A), y una ausencia de coloración (o coloración muy tenue) en las no viables (Figura 2B). Para las especies *S. helleri*, *S. geminata* y el Híbrido 30, se cuantificó el porcentaje de viabilidad (Figura 3). Se observaron diferencias significativas entre las tres especies ($p < 0,05$). El mayor porcentaje de células de polen viables se observó en *S. geminata* con 89%. *S. helleri*, mostró el menor porcentaje de células de polen viables (36%), el híbrido 30 mostró un porcentaje de viabilidad de células de polen de 53%.

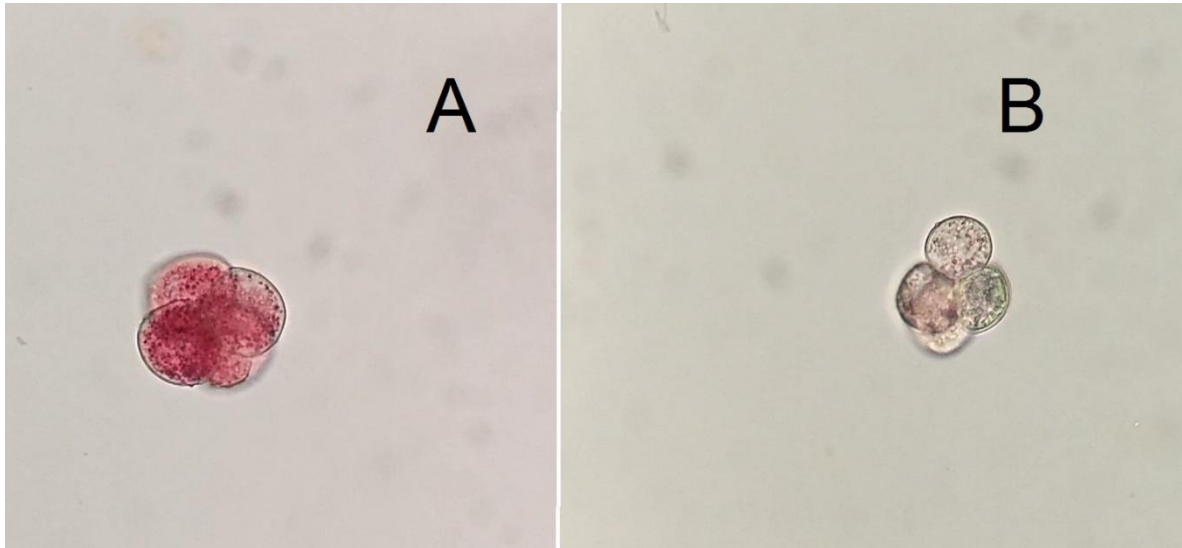


Figura 2. Células de polen de *Sobralia geminata* sometidas a prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio: A) células viables, B) células no viables. Visualización a 10x. San Pedro, San José, Costa Rica, 2020.

Los porcentajes de viabilidad de células de polen se pueden observar en la Figura 3.

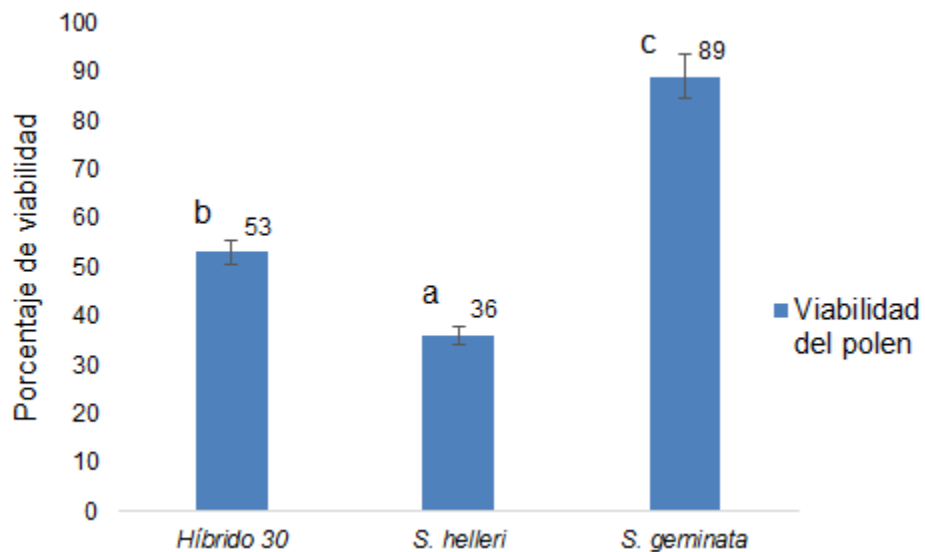


Figura 3. Viabilidad de polen de plantas de *Sobralia* (*S. helleri*, *S. geminata* e Híbrido 30), mediante tinción con cloruro de tetrazolio. Prueba de separación de medias DGC, letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$). Barras verticales representan la desviación estándar. San José, Costa Rica, 2020.

La germinación y elongación de tubos polínicos de células de polen de *Sobralia*, se pudieron observar 24 horas después de ser sometidas a un medio de cultivo BK modificado (Figura 4A). También se observaron tétradas sin germinar (Figura 4B). El híbrido 30 presentó el menor porcentaje de germinación, en comparación con *S. helleri* y *S. geminata*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de germinación de *S. helleri* y *S. geminata* ($p > 0,05$) (Figura 5).



Figura 4. Células de polen de *Sobralia geminata*, (A) germinadas, y (B) no germinadas, tras ser sometidas a medio de cultivo BK modificado. Visualización a 10 x. San Pedro, San José, Costa Rica, 2020.

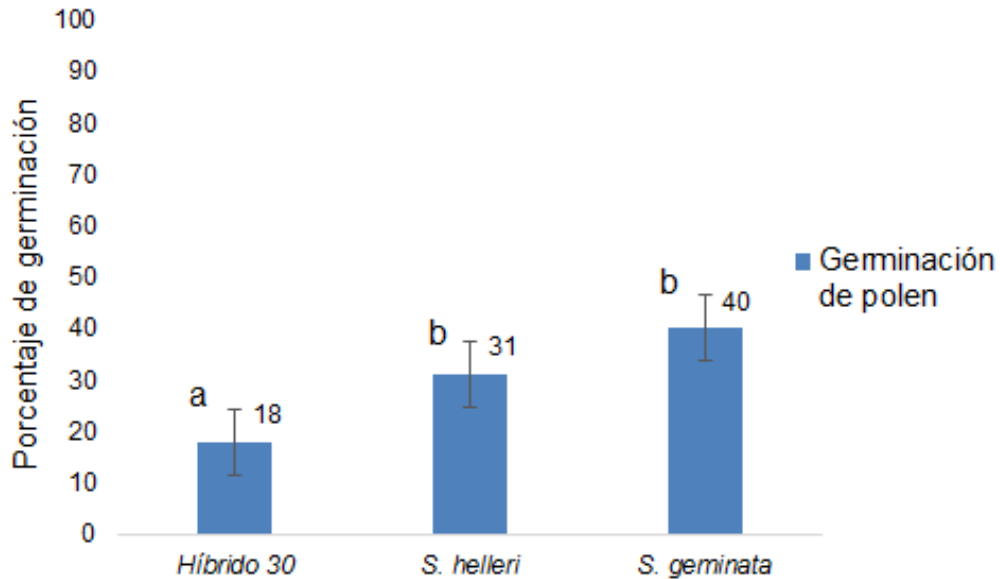


Figura 5. Germinación de polen de plantas de *Sobralia* (*S. helleri*, *S. geminata* e Híbrido 30), en medio de cultivo BK modificado. Prueba de separación de medias DGC, letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$). Barras verticales representan la desviación estándar. San Pedro, San José, Costa Rica, 2020.

En las especies de *Sobralia* se pudo observar la progresión del ciclo meiótico (Figura 6). Se observaron las fases de Cigoteno (Figura 6A), Diploteno (Figura 6B), Metafase I temprana (Figura 6C), Anafase I temprana (Figura 6D), Telofase I (Figura 6E) y Telofase II (Figura 6F).

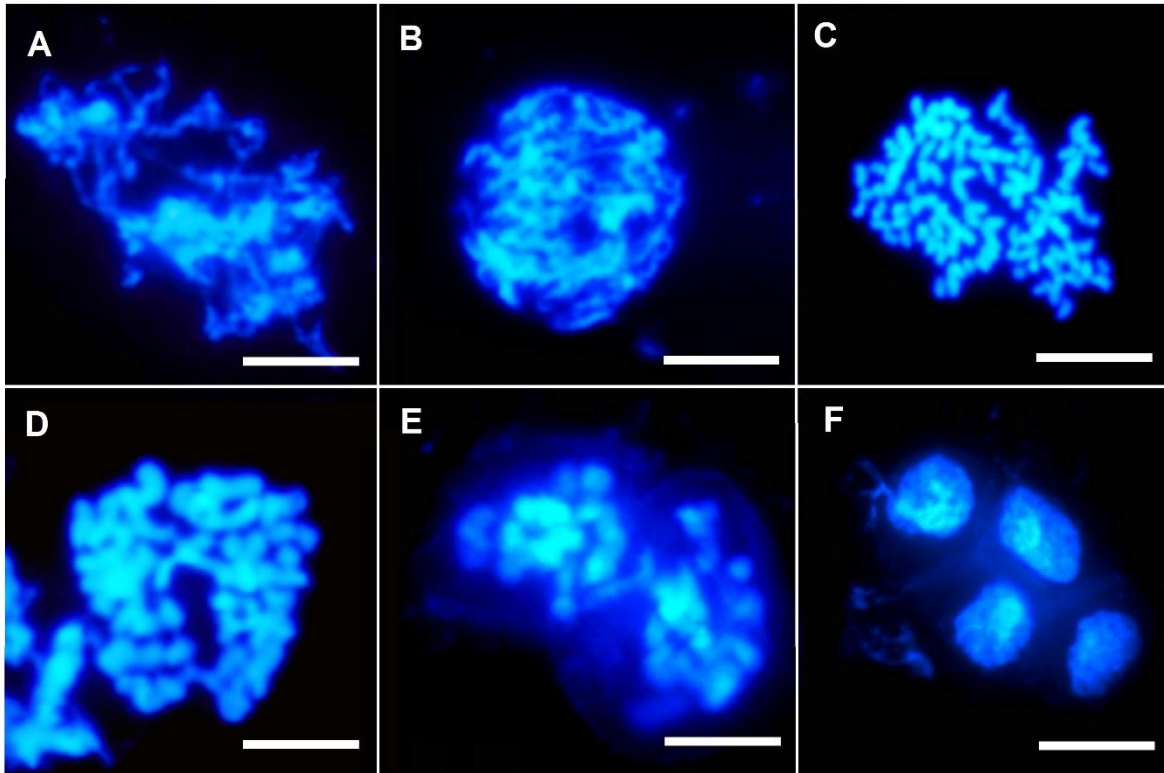


Figura 6. Representación del ciclo meiótico de las especies de *Sobralia* analizadas. (A) Cigoteno (*S. bouchei*), (B) Diploteno (*S. amparoe*), (C) Metafase I temprana (*S. bradeorum*), (D) Anafase I temprana (*S. bradeorum*), (E) Telofase I (*S. fenzliana*) y (F) Telofase II (*S. geminata*). Tinción con DAPI, barra = 10 μm . Alajuela, Costa Rica, 2019.

Número de cromosomas

El número de cromosomas observado en las especies de *Sobralia* analizadas, fue variable entre $2n = 6$ a $2n = 48$ (Cuadro 4, Figura 7). Se observó la siguiente ploidía: *S. amparoe*: $2n = 30$, *S. atropubescens*: $2n = 6$, *S. bouchei*: $2n = 34$, *S. bradeorum*: $2n = 48$, *S. crispissima*: $2n = 16$, *S. danjanzenii*: $2n = 32$, *S. fenzliana*: $2n = 28$, *S. geminata*: $2n = 32$, *S. helleri*: $2n = 24$, y *S. rosea*: $2n = 24$ (Figura 2). No se logró obtener el número de cromosomas de *S. carazoi* debido a escasez de muestra.

Cuadro 4. Número de cromosomas en especies de orquídeas del género *Sobralia*, Alajuela, Costa Rica, 2019.

Especies	Número de cromosomas (2n)*
<i>S. amparoe</i>	30 ± 1
<i>S. atropubescens</i>	6 ± 0
<i>S. bouchei</i>	34 ± 2
<i>S. bradeorum</i>	48 ± 0
<i>S. carazoi</i>	-
<i>S. crispissima</i>	16 ± 1
<i>S. danjanzenii</i>	32 ± 2
<i>S. fenzliana</i>	28 ± 1
<i>S. geminata</i>	32 ± 2
<i>S. helleri</i>	24 ± 1
<i>S. rosea</i>	24 ± 1

* Datos reportados con ± desviación estándar de 20 conteos por especie.

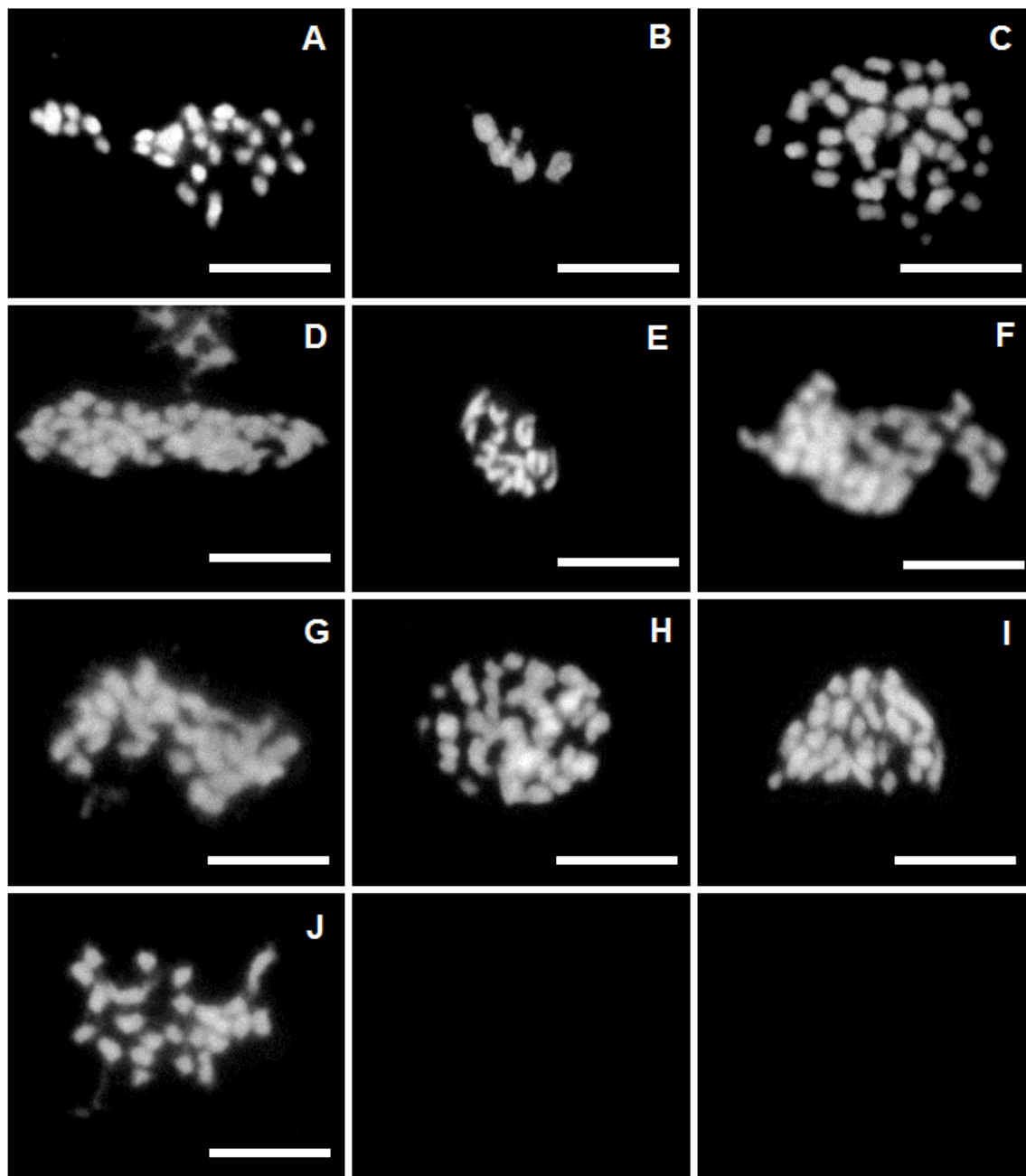


Figura 7. Morfología y número de cromosomas meióticos en metafase I de las especies de *Sobralia*: A) *S. amparoe*: $2n = 30$, B) *S. atropubescens*: $2n = 6$, C) *S. bouchei*: $2n = 34$, D) *S. bradeorum*: $2n = 48$, E) *S. crispissima*: $2n = 16$, F) *S. danjanzenii*: $2n = 32$, G) *S. fenzliana*: $2n = 28$, H) *S. geminata*: $2n = 32$, I) *S. helleri*: $2n = 24$, y J) *S. rosea*: $2n = 24$. Imágenes tratadas con ImageJ, barra = 10 μm . Alajuela, Costa Rica, 2019.

Se realizaron 22 cruces entre distintas especies de *Sobralia* (Cuadro 5). Se observó la formación de cápsulas en tres de los cruces: *S. mutisii* (*Brasolia* de Colombia) × *S. biflora* (Figura 8), *S. silveira* × *S. chrysostoma* (Figura 9), y *S. chrysostoma* × *S. helleri* (Figura 10).

Cuadro 5. Cruces entre especies de orquídeas del género *Sobralia* y su formación de cápsulas. San José, Costa Rica, 2020.

Cruce	Formación de cápsula
<i>S. atropubescens</i> × <i>S. kerryae</i>	No
<i>S. atropubescens</i> × <i>S. decora</i>	No
<i>S. atropubescens</i> × <i>S. dorbiguyana</i>	No
<i>S. dorbiguyana</i> × <i>S. atropubescens</i>	No
<i>S. mutisii</i> (<i>Brasolia</i> de Colombia) × <i>S. biflora</i> 13577*	Sí
<i>S. biflora</i> 13577* × <i>S. mutisii</i> (<i>Brasolia</i> de Colombia)	No
<i>S. dorbiguyana</i> 16222* × <i>S. kerryae</i> 28279*	No
<i>S. kerryae</i> 26395* × <i>S. dorbiguyana</i> 16222*	No
<i>S. dorbiguyana</i> 16222* × <i>S. kerryae</i> 26395*	No
<i>S. kerryae</i> 28279* × <i>S. dorbiguyana</i> 16222*	No
<i>S. dorbiguyana</i> 16222* × <i>S. fragans</i> 760*	No
<i>S. fragans</i> 760* × <i>S. dorbiguyana</i> 16222*	No
<i>S. chrysostoma</i> 17403* × <i>S. silveira</i> 25680*	No
<i>S. silveira</i> 25680* × <i>S. chrysostoma</i> 17403*	Sí
<i>S. mucronata</i> 15827* × <i>S. bouchei</i> 24862*	No
<i>S. mucronata</i> 15827* × <i>S. blancoe</i> 28804*	No
<i>S. blancoi</i> 28804* × <i>S. bouchei</i> 24862*	No
<i>S. decora</i> 25742* × <i>S. chrysostoma</i> 14703*	No
<i>S. chrysostoma</i> 14703* × <i>S. decora</i> 25742*	No
<i>S. helleri</i> 11797* × <i>S. chrysostoma</i> 14703*	No
<i>S. chrysostoma</i> 14703* × <i>S. helleri</i> 11797*	Sí



Figura 8. Formación de cápsula tras realizar cruce entre *S. mutisii* (*Braselia* de Colombia) x *S. biflora*. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.

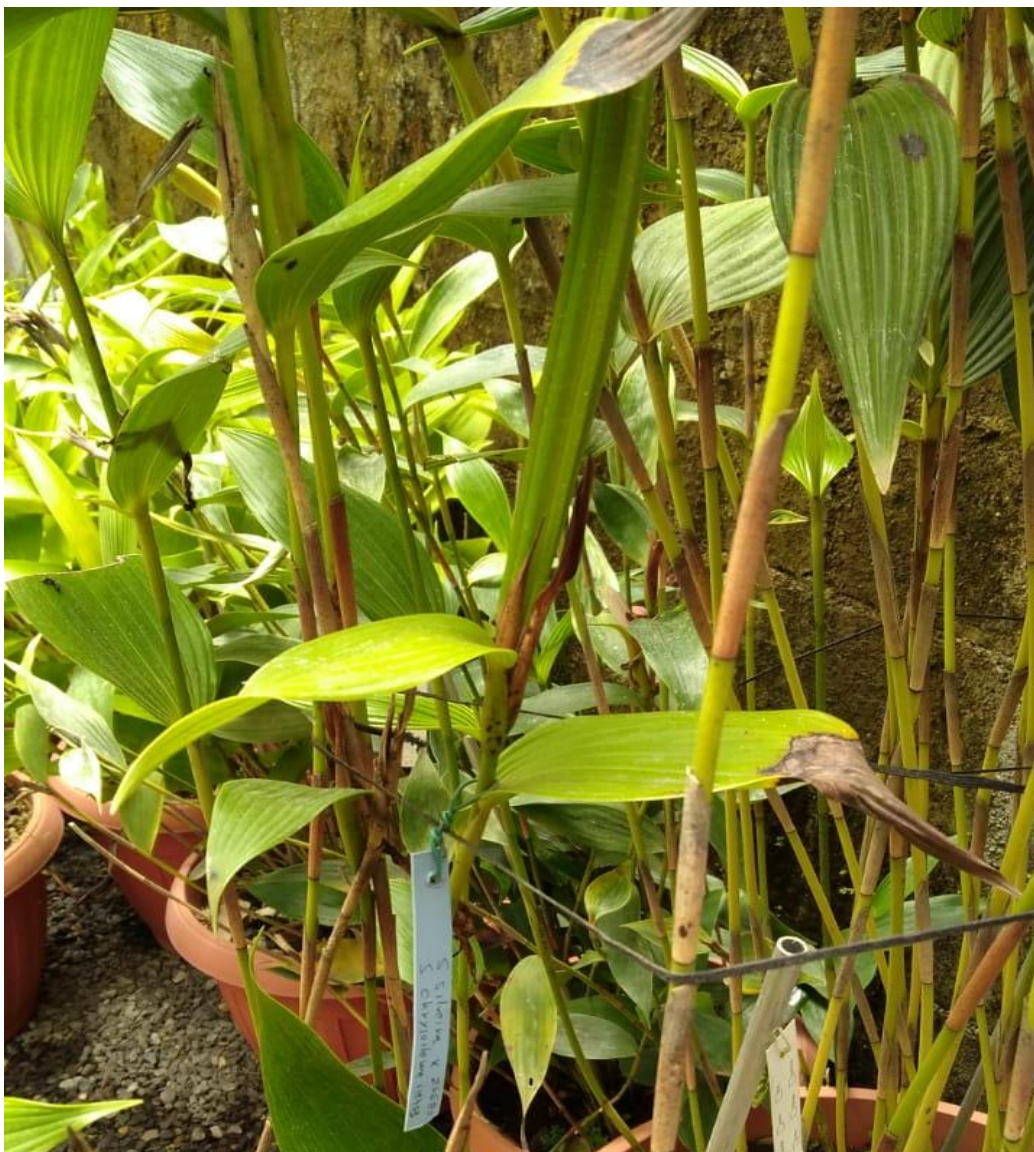


Figura 9. Formación de cápsula tras realizar cruce entre *S. silveira* x *S. chrysostoma*. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.



Figura 10. Formación de cápsula tras realizar cruce entre *S. chrysostoma* x *S. helleri*. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.

Discusión

La frecuencia en la formación de tétradas reportada en esta tesis sugiere que la formación de polen viable es alta en todas las especies de *Sobralia* analizadas. Bolaños-Villegas et al. (2008), consideraron como especímenes fértiles a aquellos que mostraron al menos un 60% en la frecuencia de formación de tétradas. *S. atropubescens*, resultó ser el espécimen con menor fertilidad si se compara con el resto de especies estudiadas, sin embargo según Bolaños-Villegas et al. (2008), esta especie se consideraría un organismo de alta fertilidad. Por ejemplo, estos

autores consideraron una frecuencia en la formación de tétradas de menos del 40% como baja, el cual fue el caso de híbridos de *Doritaenopsis* que además mostraron una segregación cromosómica asimétrica, baja viabilidad de polen y aberraciones cromosómicas producto del mal emparejamiento de sus cromosomas homólogos. Como resultado final, estos híbridos mostraron aborto de cápsulas y baja o nula productividad de semillas (Bolaños-Villegas et al. 2008). Con base en lo anterior, se sugiere que las once especies de *Sobralia* analizadas son especímenes fértiles con alta capacidad para formar tétradas.

En esta investigación se estudió preliminarmente la viabilidad y germinación del polen de tres genotipos del género *Sobralia*: *S. helleri*, *S. geminata* y una planta que se considera un posible híbrido de *Sobralia* (Figura 16, anexo 1), etiquetado como Híbrido 30. La prueba de viabilidad se realizó mediante tinción con cloruro de tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio), el cual es un compuesto incoloro que, en presencia de deshidrogenasas se reduce a formazán (1, 3, 5-trifenilformazán), mostrando un color rojo o rosado oscuro. Un tejido que ha reducido su actividad metabólica, generalmente evidencia degradación o desnaturalización de enzimas, por lo cual al ser sometido a cloruro de tetrazolio, no muestra la tinción rojo-rosado oscuro (Gisbert Domenech y Picó Sirvent 2014).

Los resultados obtenidos mediante la prueba de tinción con cloruro de tetrazolio, sugirieron que *S. geminata* tuvo el mayor porcentaje de polen viable de los tres genotipos analizados, mientras que *S. helleri* mostró la menor viabilidad y el híbrido 30 mostró una viabilidad intermedia (Figura 3).

Bureš et al (2010), estudiaron la viabilidad del polen en el género *Cirsium* (Asteraceae), y encontraron que todas las especies puras mostraron una alta viabilidad de polen en comparación con los híbridos, por lo que sugieren que el análisis de viabilidad de polen puede ser usado en la identificación de híbridos de *Cirsium*. Sin embargo, hacen referencia a que en algunas ocasiones algunos híbridos mostraron índices de viabilidad también altos en casos donde los parentales de estos híbridos eran filogenéticamente cercanos. Esta información, en contraste con los resultados de viabilidad de polen observados en el híbrido 30 de

Sobralia, podría indicar que los parentales de dicho híbrido podrían ser dos especies filogenéticamente cercanas capaces de formar híbridos relativamente fértiles.

Según Rieseberg y Willis (2007), la hibridación inter-específica es un mecanismo importante para el desarrollo de especies, sin embargo al mismo tiempo podría significar la desintegración genética de especies establecidas (Levin 2002). Es por esto que algunos autores sugieren que la existencia de barreras que eviten la hibridación natural, es un mecanismo para preservar la existencia de especies separadas (Arnold 1997, Rieseberg et al. 2006, Rieseberg y Willis 2007). La pérdida de la viabilidad del polen en híbridos, es un mecanismo que reduce la efectividad de retro cruzamiento y la desintegración de especies parentales (Rieseberg et al. 1999). La hibridación frecuente disminuye la viabilidad del polen (Bureš et al. 2010).

En cuanto a la capacidad germinativa del polen de los tres genotipos de *Sobralia* analizados, se observó que entre *S. helleri* y *S. geminata*, no hubo diferencias significativas en los porcentajes de germinación. Sin embargo, en comparación con el híbrido 30, las dos especies mostraron mayores porcentajes de germinación de polen *in vitro* (Figura 5). Esta tendencia preliminar, concuerda con los resultados obtenidos por Lee y Chung (2010), Bureš et al. (2010) y Lee et al. (2011), quienes observaron menor fertilidad y germinación de polen en híbridos en comparación con especies.

Por otro lado, Bonilla-Sánchez y Mosquera-Mosquera (2019), reportaron bajos porcentajes de germinación *in vitro* del polen en orquídeas de las tribus Cymbidieae y Epidendreae (menos del 50%). Sin embargo, estos porcentajes de germinación de polen aumentaron al utilizar un medio de cultivo que incluía mucílago del estigma de la flor, lo cual sugirió alta especificidad del polen para germinar.

En contraste, Bellusci et al. (2010), quienes estudiaron la viabilidad y germinación de polen en orquídeas mediterráneas de los géneros *Orchis*, *Anacamptis*, *Dactylorhiza* y *Serapias*, obtuvieron porcentajes de germinación de polen del 100% hasta 5 días post-antesis, y se mantuvo un 50% de germinación de polen incluso 35 días después de la antesis. Ordoñez (2014), sugiere que el éxito en la germinación *in vitro* es muy variable, y depende en gran medida del genotipo que se evalúe.

A pesar de no haber diferencias significativas entre *S. helleri* y *S. geminata*, el dato más alto de germinación observado en *S. geminata* fue de tan solo un 40% un día después de la antesis. Esto podría sugerir que el medio de cultivo BK modificado utilizado para la germinación de polen en esta investigación, podría no ser el más adecuado para el género *Sobralia*. Rejón García et al. (2010), sugieren que la germinación de polen en medio de cultivo *in vitro*, no es igual a las germinaciones que suceden en el pistilo, por lo cual los porcentajes obtenidos en laboratorio podrían ser diferentes a los que se obtienen *in situ*. La floración en el género *Sobralia* es efímera, razón por la cual se podría especular que la viabilidad y capacidad germinativa del polen también se reduce de manera rápida.

En relación al ciclo meiótico, de acuerdo con Bolaños-Villegas et al. (2008), Lee et al. (2011), y Mercier et al. (2015), los patrones de división meiótica normales se observan con mayor frecuencia en especies, en comparación con híbridos, y esto se atribuye a que el correcto apareamiento de cromosomas homólogos es menos frecuente en híbridos.

En un ciclo meiótico desequilibrado, comúnmente se observan alteraciones como: profase I ausente, cromátidas hermanas en anafase I que migran hacia un solo polo, segregación cromosómica anormal en la que segmentos de ADN no migran hacia ningún polo, ausencia de citocinesis en telofase I, formación de diadas o triadas en lugar de tétradas en telofase II, o presencia de tétradas con micro núcleos entre otras anomalías meióticas (Caetano 2003, Bolaños-Villegas et al. 2008, Mercier et al. 2015).

Considerando lo anterior y el análisis del ciclo meiótico de las especies de *Sobralia* estudiadas, se sugiere que los patrones de división meiótica son normales (Figura 6). Fue posible observar estadios meióticos de la profase I como cigoteno, diploteno (Figura 6A y 6B, respectivamente) o leptoteno y paquiteno (datos no mostrados), que evidencian la existencia de profase I. El estadio meiótico apreciable en la Figura 6D, sugiere una anafase I temprana en la cual se evidencia una correcta segregación cromosómica hacia ambos polos. Finalmente, en la Figura 6E y 6F, se observa la citocinesis en telofase I y la formación de tétradas en telofase II respectivamente. En el estadio de telofase II no se observa la presencia de micro-

núcleos. Los patrones de división meiótica normales observados en este estudio, concuerdan con los altos porcentajes en la formación de tétradas, viabilidad y germinación de polen.

El número de cromosomas observado en los especímenes de *Sobralia* estudiados, es variable (Cuadro 4, Figura 7). Las especies que mostraron el menor y el mayor número de cromosomas respectivamente fueron *S. atropubescens*: $2n = 6$, y *S. bradeorum*: $2n = 48$; esta variabilidad podría representar un factor de riesgo en el desarrollo de híbridos inter-específicos fértiles en el género *Sobralia*.

Arends (1970), sugirió que la esterilidad observada en algunos híbridos de orquídeas podría ser causada por la divergencia entre los genomas de los parentales o grandes diferencias filogenéticas, ya que diferencias en el número y tamaño de los cromosomas afectan el desarrollo de gametos (Singh y Hymowitz 1987). Esto se atribuye a que cromosomas incompatibles no realizan una recombinación y sinapsis completa, y como consecuencia no se forman quiasmas, y se generan univalentes en lugar de bivalentes. Los univalentes pueden no alinearse correctamente en la anafase I, y por lo tanto segregan incorrectamente (Ma 2006). La mala segregación de cromosomas, ocasiona desequilibrios en la meiosis y como resultado se afecta el desarrollo de gametos (Mercier et al. 2015, Singh 2016). En *Arabidopsis thaliana* (L.), se encontró que mutantes de los genes *Zip4/Spo22* desarrollaron univalentes con los cuales se obtuvo baja formación de semillas después de la fertilización (Chelysheva et al. 2007). Bolaños-Villegas et al. (2008), encontraron univalentes como consecuencia de mal emparejamiento de cromosomas homólogos, en híbridos de *Doritaenopsis* con baja o nula fertilidad.

Para el género *Sobralia*, se ha reportado hasta el momento la formación de 32 híbridos inter específicos (Cuadro 1), de los cuales 29 se encuentran formalmente inscritos en la (Real Horticulture Society 2010). Sin embargo, en estos registros no se reporta información sobre la fertilidad de estos híbridos. En la presente investigación, se realizaron 22 cruces inter-específicos (Cuadro 5), de los cuales únicamente *S. mutisii* (*Brasolia* de Colombia) \times *S. biflora*, *S. silveira* \times *S. chrysostoma*, y *S. chrysostoma* \times *S. helleri*, mostraron la formación de cápsulas

(Figura 8, 9 y 10, respectivamente). Hasta el momento no existen reportes previos sobre la realización de estos cruces.

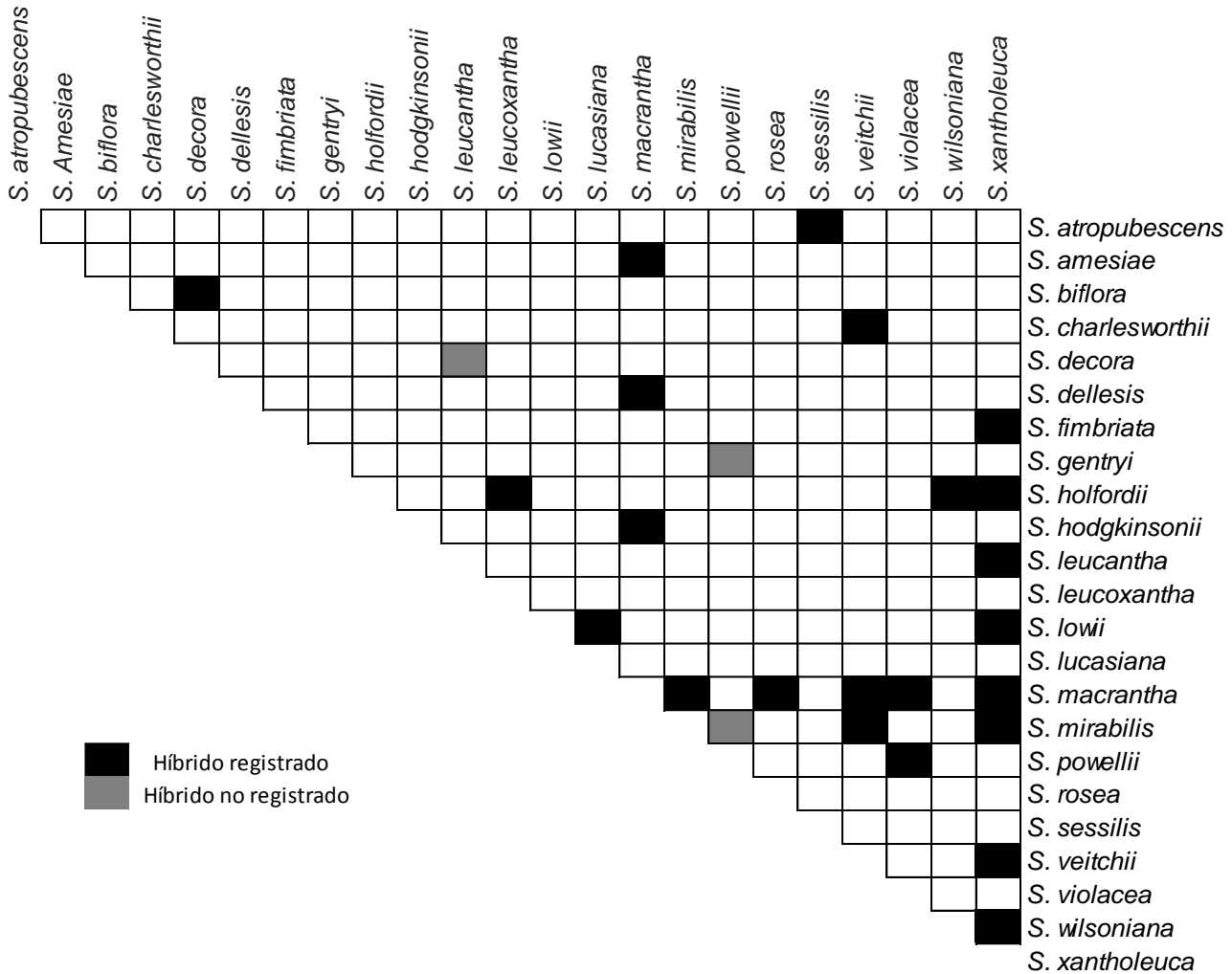


Figura 11. Diagrama de híbridos de *Sobralia* registrados y no registrados en la Royal Horticulture Society, y especies parentales. San José, Costa Rica, 2020. Un cuadro negro representa un híbrido registrado, mientras que un cuadro gris representa un híbrido cuyo nombre no ha sido registrado.

Los factores involucrados en la formación de cápsulas al realizar cruces inter específicos, pueden ser muy variados, incluyendo incompatibilidades genéticas, estrés fisiológico, factores ambientales o inclusive la sumatoria de todos (Ackerman

y Montalvo 1990, Calvo 1993, Bartareau 1995, Baek et al. 2015, Bedinger et al. 2017, Qin et al. 2018).

Nuevamente considerando la naturaleza efímera de la floración en el género *Sobralia*, una de las razones que podrían explicar la poca formación de cápsulas en los cruces realizados, sería la pérdida temprana de viabilidad de las flores para reproducirse. En este trabajo no se estudió por cuanto tiempo el polen de *Sobralia* se mantiene viable, sin embargo, se podría especular que por períodos cortos ya que sus flores se marchitan rápidamente. Los cruces se realizaron de acuerdo a la disponibilidad de flores abiertas, escenario en el cual algunas especies podrían haber mostrado diferencias en su vida post antesis, y causar diferencias de viabilidad reproductiva al momento de realizar los cruces. Los cruces *S. silveira* × *S. chrysostoma*, y *S. chrysostoma* × *S. helleri*, tuvieron en común que la planta de *S. chrysostoma* que se usó, tiene el mismo código de trazabilidad y registro del Jardín botánico Lankester “14702” (Cuadro 5), es decir que se trató de la misma planta. Esto podría significar que esta planta de *S. chrysostoma*, se encontraba en un periodo de alta viabilidad reproductiva, similar a las flores de *S. silveira* y *S. helleri*. Bartareau (1995), reportaron que los tiempos de polinización fueron determinantemente significativos en la producción de cápsulas en *Dendrobium*, las flores que ya presentaban algún tiempo post-antesis, disminuyeron las probabilidades de formar cápsulas. Bellusci et al. (2010), realizaron cruces inter-específicos utilizando polen fresco, en todos los casos observaron formación de cápsulas, sin embargo, no observaron formación de cápsulas al utilizar polen mayor a 20 días.

Otro posible factor involucrado en la formación de cápsulas, podría ser el estado fisiológico de las plantas. Bartareau (1995), reportaron que una baja tasa en la formación de cápsulas en orquídeas del género *Dendrobium*, se atribuyó en mayor medida al costo energético para formar la cápsula. Mediante la polinización manual, estos autores inicialmente observaron un mayor número de cápsulas en comparación con la formación de cápsulas por polinización natural. Sin embargo, el aborto temprano de cápsulas fue mayor cuando se realizó polinización manual, lo que sugirió que las plantas no eran capaces de sostener el costo energético de

producir las cápsulas. Otros autores también han reportado resultados similares, sugiriendo que un adecuado vigor energético y fisiológico de las plantas, es esencial para la correcta formación de cápsulas en orquídeas (Ackerman y Montalvo 1990, Calvo 1993).

Para el género *Sobralia* no se ha reportado información sobre auto incompatibilidad intra o inter-específica. En otras plantas, los mecanismos de incompatibilidad inter-específica siguen siendo desconocidos en gran medida, a diferencia de los mecanismos de incompatibilidad intra-específica, que han sido ampliamente estudiados (Baek et al. 2015, Bedinger et al. 2017, Qin et al. 2018).

Según Baek et al. (2015), generalmente las especies auto-incompatibles solo muestran compatibilidad cuando reciben polen de otra especie también auto incompatible. Se ha evidenciado incompatibilidad al cruzar especies auto incompatibles por especies auto-compatibles; y esto se conoce como incompatibilidad intra-específica unilateral (Baek et al. 2015, Bedinger et al. 2017, Qin et al. 2018). En este escenario, el polen de plantas auto compatibles se rechazaría en los pistilos de plantas con auto incompatibilidad, a pesar de ser polen que proviene de otra especie. Sin embargo, el polen de plantas auto-incompatibles, no se rechazaría en el pistilo de plantas auto-compatibles (Bedinger et al. 2017).

Otra hipótesis mecánica para explicar la formación de cápsulas al realizar cruces entre especies de *Sobralia*, sería la presencia de auto incompatibilidad intra-específica y unilateral en este género. En este modelo hipotético los cruces posibles serían: auto-incompatible \times auto-incompatible, auto-compatibile \times auto-compatibile, y auto-compatibile \times auto-incompatibile. El cruce que no sería posible sería: auto-incompatibile \times auto-compatibile.

De acuerdo a Lowe (2000), en la mayoría de las orquídeas los mecanismos de polinización fomentan la polinización cruzada, lo cual se evidencia en la morfología de sus flores que es atractiva para la entomofauna. No obstante, existen especies que son capaces de realizar autopolinización en caso de que la polinización cruzada no se efectúe (Lowe 2000). Por ejemplo en *Ophrys apifera*, si ningún insecto ha polinizado la flor antes de su marchitez, la misma flor pone en contacto los polinios con su propio estigma.

Por otra parte Conde (2016), menciona que a pesar de la diferencia en el número de cromosomas parentales, los híbridos pueden completar su desarrollo pero, ser parcial o totalmente estériles. Son capaces de mostrar vigor híbrido, pero sus gametos suelen presentar esterilidad cromosómica o segregacional. Por ejemplo, al cruzar rábano (*Raphanus sativus*) y con col (*Brassica oleracea*), ambos con 18 cromosomas en su cariotipo, se obtienen híbridos de 18 cromosomas pero con incompatibilidades morfológicas entre los cromosomas progenitores. En lugar de generar gametos haploides de 9 cromosomas, se generan gametos con entre 6 y 12 cromosomas, lo cual ocasiona esterilidad (Curtis y Schnek 2006).

Considerando que la diferencia en el número de cromosomas causa apareamiento ectópico e irregular entre cromosomas homólogos, defectos en la segregación meiótica, baja formación de tétradas y pobre formación de semillas (Ma 2006, Chelysheva et al. 2007, Bolaños-Villgas et al. 2008), se sugiere que un cruce hipotético entre *S. atropubescens*: $2n = 6$, \times *S. bradeorum*: $2n = 48$, podría generar híbridos infértiles ya que habría una diferencia de 42 cromosomas entre estas dos especies. Por otra parte, un cruce entre *S. danjanzenii*: $2n = 32$ \times *S. geminata*: $2n = 32$, o *S. helleri*: $2n = 24$, \times *S. rosea*: $2n = 24$, posiblemente daría como resultado la formación de híbridos con relativa fertilidad, ya que estas especies presentan el mismo número de cromosomas y un alto grado de fertilidad. Suponiendo que las posibilidades de éxito para formar híbridos fértiles, disminuyen a medida que aumenta la diferencia entre el número de cromosomas de los parentales (Bolaños-Villegas et al. 2008, Lee et al. 2011), se esperaría mayor éxito al realizar un cruce entre *S. amparoe*: $2n = 30$ \times *S. fenziiana*: $2n = 28$, en comparación con un cruce entre *S. crispissima*: $2n = 16$ \times *S. bouchei*: $2n = 34$, ya que la diferencia entre el primer cruce sería de solo 2 cromosomas mientras que en el segundo cruce sería de 18 cromosomas. Cabe mencionar que además de estas hipótesis, sería importante dilucidar con detalle los posibles mecanismos de auto incompatibilidad que podrían operar en *Sobralia*.

También es posible que aspectos como el número y morfología de cromosomas, así como la fertilidad de los parentales no sean los únicos factores involucrados en la formación exitosa de híbridos inter-específicos fértiles en el

género *Sobralia*. Es posible que se requiera comprender con más detalle la homología entre los genomas involucrados en un eventual cruce. Lee et al. (2011), reportaron que el apareamiento cromosómico en los híbridos de *Paphiopedilum*, no está solo regulado por el número y la morfología de los cromosomas de sus parentales, sino que además está sujeto a la homología del genoma de los parentales.

Por ejemplo mediante la técnica de *Genomic In Situ Hybridization* (GISH) Lee et al. (2011), encontraron irregularidades en la meiosis de híbridos de *Paphiopedilum* con alta divergencia en sus genomas parentales, es decir al cruzar especies filogenéticamente distanciadas. La técnica de GISH brinda información sobre la homología de los genomas de los parentales o especies, la cual es información importante para los programas de mejoramiento genético (Anamthawat-Jónsson et al. 1990, Anamthawat-Jónsson y Reader 1995, Lee et al. 2011). Al cruzar dos especies y observar el apareamiento de sus cromosomas, se apreciaron diferencias entre los cromosomas homólogos de parentales evolutivamente distanciados, paralelamente, no se observaron diferencias entre los cromosomas homólogos de parentales evolutivamente cercanos (Lee et al. 2011).

Otro factor genético que podría estar involucrado en el correcto emparejamiento de cromosomas homólogos, y por ende influir en el desarrollo de híbridos inter específicos de orquídeas, sería la existencia de un locus similar al *Ph1* del trigo (Griffiths et al. 2006). Este gen regula la meiosis permitiendo el apareamiento entre cromosomas homólogos provenientes de diferentes genomas parentales, a pesar de diferencias en el número y morfología, estabilizando la fertilidad de híbridos (Moore 2014, Martín et al. 2017). Sin embargo, se desconoce si ortólogos de este gen se encuentran en el género *Sobralia*.

En resumen, no se podría descartar del todo la posibilidad de que en *Sobralia* ocurra hibridación natural inter-específica, como en el caso de *S. wiganiae*, que fue reportado en 1898 como un supuesto híbrido natural (Cuadro 1). Por la naturaleza de la floración efímera en este género, se ha sugerido que la formación de híbridos naturales podría ser un evento poco frecuente, y sin embargo posible (Dressler 2009).

Conclusiones

- Todas las especies de *Sobralia* analizadas en esta investigación, mostraron alta frecuencia en la formación de tétradas, por lo que se considera que la meiosis de estos organismos es normal.
- Resultados preliminares sugieren una alta capacidad germinativa y alta viabilidad del polen para las especies *Sobralia helleri*, *Sobralia geminata*, y el híbrido 30.
- El número de cromosomas observado en las once especies estudiadas de *Sobralia*, es variable entre $2n = 6$ a $2n = 48$.
- Los cruces *S. mutisii* (*Brasolia* de Colombia) \times *S. biflora*, *S. silveira* \times *S. chrysostoma*, y *S. chrysostoma* \times *S. helleri*, sí mostraron formación exitosa de cápsulas, sin embargo se desconoce si operan mecanismos de auto incompatibilidad en estas especies.

Recomendaciones

- Se recomienda realizar investigación sobre mecanismos de auto incompatibilidad en el género.
- Se recomienda realizar los cruces entre *S. danjanzenii* \times *S. geminata* y *S. helleri* \times *S. rosea*, ya que presentan números de cromosomas similares. Con el objetivo de realizar análisis cromosómicos y citogenéticos de eventuales híbridos de *Sobralia*, así como germinar los eventuales embriones de dichos cruces.
- Considerando que *S. mutisii* muestra una floración más prolongada en comparación con el resto de *Sobralias* estudiadas (Castellanos-Castro y Gastelbondo-Medina (2016), y que esta especie mostró la formación de una cápsula al recibir polen de otra *Sobralia*, se recomienda utilizar este genotipo con el objetivo de prolongar el periodo de floración de eventuales híbridos comerciales de *Sobralia*.
- Se recomienda analizar eventuales híbridos de *Sobralia* mediante técnicas como GISH, que permitan comprender las relaciones filogenéticas entre las

especies involucradas y determinar si este factor tiene influencia en la formación de híbridos fértiles en el género *Sobralia*.

- Finalmente se recomienda investigar la presencia de ortólogos del locus *Ph1* en el género *Sobralia*.

Referencias bibliográficas

Ackerman, JD; Montalvo, AM. 1990. Short-and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* 71(1):263-272. doi: 10.2307/1940265

Ames; Schweinf. 1930a. *Sobralia atropubescens* (en línea, sitio web). Consultado 30 sep. 2019. Disponible en <http://epidendra.org/taxones/Sobralia/Sobralia atropubescens/Sobralia atropubescens.pdf>.

Ames; Schweinf. 1930b. *Sobralia bouchei* (en línea, sitio web). Consultado 30 sep. 2019. Disponible en <http://epidendra.org/taxones/Sobralia/Sobralia bouchei/Sobralia bouchei PROT.pdf>.

Anamthawat-Jónsson, K; Reader, SM. 1995. Pre-annealing of total genomic DNA probes for simultaneous genomic in situ hybridization. *Genome* 38(4):814-816. doi: 10.1139/g95-104

Anamthawat-Jónsson, K; Schwarzacher, T; Leitch, AR; Bennett, MD; Heslop-Harrison, JS. 1990. Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe. *Theoretical and Applied Genetics* 79(6):721-728. doi: 10.1007/bf00224236

Arends, JC. 1970. Cytological observations on genome homology in eight interspecific hybrids of *Phalaenopsis*. *Genetica* 41(1):88-100.

Armstrong, SJ; Jones, GH. 2003. Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 54(380):1-10. doi: 10.1093/jxb/erg034

- Arnold, ML. 1997. Natural hybridization and evolution. s.l., Oxford University Press on Demand. *Choice Reviews Online* 35(2):35-0883. doi: 10.5860/elección.35-0883
- Baek, YS; Covey, PA; Petersen, JJ; Chetelat, RT; McClure, B; Bedinger, PA. 2015. Testing the 'SI x SC rule': Pollen-pistil interactions in interspecific crosses between members of the tomato clade (*Solanum* section *Lycopersicon*, Solanaceae). *American Journal of Botany* 102(2):302-311. doi: 10.3732/ajb.1400484
- Baranow, P; Dudek, M; Szlachetko, DL. 2017. *Brasolia*, a new genus highlighted from *Sobralia* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 303(7):853-871. doi: 10.1007/s00606-017-1413-z.
- Bartareau, TAD. 1995. Pollination limitation, costs of capsule production and the capsule-to-flower ratio in *Dendrobium monophyllum* F. Muell. (Orchidaceae). *Australian Journal of Ecology* 20(2):257-265. doi: 10.1111/j.1442-9993.1995.tb00537.x
- Bedinger, PA; Broz, AK; Tovar-Mendez, A; McClure, B. 2017. Pollen-pistil interactions and their role in mate selection. *Plant Physiology* 173(1):79-90. doi: 10.1104/pp.16.01286
- Bellusci, F; Musacchio, A; Stabile, R; Pellegrino, G. 2010. Differences in pollen viability in relation to different deceptive pollination strategies in Mediterranean orchids. *Annals of botany* 106(5):769-774. doi: 10.1093/aob/mcq164
- Blanco, P. 2015. Jardín Lankester describe variedad de Guaria de Turrialba. La flor más bella del mundo (en línea, sitio web). Consultado 28 ago. 2019. Disponible en <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2015/04/21/jardin-lankester-describe-variedad-de-guaria-de-turrialba.html>.
- Bolaños-Villegas, P; Chin, SW; Chen, FC. 2008. Meiotic chromosome behavior and capsule setting in *Doritaenopsis* hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133(1):107-116. doi: 10.21273/jashs.133.1.107

- Bonilla-Sánchez, AP; Mosquera-Mosquera, HR. 2019. Viabilidad y germinación in vitro de taxones de las tribus Cymbidieae y Epidendreae (subfamilia Epidendroideae, Orchidaceae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 43(168):494-501. doi: 10.18257/raccefyn.888.
- Bureš, P; Šmarda, P; Rotreklová, O; Oberreiter, M; Burešová, M; Konečný, J; Knoll, A; Fajmon, K; Šmerda, J. 2010. Pollen viability and natural hybridization of Central European species of *Cirsium*. *Preslia* 82(4):391-422.
- Caetano, CM. 2003. La aplicabilidad de la citogenética en *Zea mays* L.: genes mutantes meióticos. *Revista de Ciencias Agrícolas* 20(1):27-49.
- Calvo, R. 1993. Evolutionary demography of orchids: intensity and frequency of pollination and the cost of fruiting. *Ecology* 74:1033-1042. doi: 10.2307/1940473
- Castellanos-Castro, C; Gastelbondo Medina, M. 2016. Priorización de especies de orquídeas nativas con potencial de aprovechamiento sostenible para productores de los municipios de San Antonio de Tequendama y Fusagasugá: documento metodológico. Consultado 24 jun. 2019. Disponible en: <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/9785>
- Chelysheva, L; Gendrot, G; Vezon, D; Doutriaux, M-P; Mercier, R; Grelon, M. 2007. Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* 3(5):e83. doi: 10.1371/journal.pgen.0030083
- Chen, J-C; Fang, S-C. 2016. The long pollen tube journey and in vitro pollen germination of *Phalaenopsis* orchids. *Plant reproduction* 29(1-2):179-188. doi: 10.1007/s00497-016-0280-z
- Conde, RV. 2016. *Biología 2*. s.l., Grupo Editorial Patria, vol.2.
- Curtis, H; Schnek, A. 2006. *Invitación a la biología/Invitation to Biology*. s.l., Ed. Médica Panamericana.

- Dafni, A; Hesse, M; Pacini, E. 2012. Pollen and pollination. s.l., Springer Science & Business Media.
- Dressler, R; Pupulin, F. 2015. *Sobralia lentiginosa*: an attractive new species from Costa Rica. *Orchids* (June):375-376.
- Dressler, RL. 2009. Can Sobralias be classified? The problems of identifying ephemeral flowers. *Orchids* 78(11):658-663.
- Dressler, RL; Blanco, MA; Pupulin, F; Neubig, KM. 2011. (2019) Proposal to conserve the name *Sobralia* (Orchidaceae) with a conserved type. *Taxon* 60(3):907-908.
- Dressler, RL; Bogarín, D. 2009. Some new Sobraliae from Costa Rica and Panama. *Lankesteriana International Journal on Orchidology* 9(3):475-485. doi: 10.15517/lank.v0i0.12109
- Dressler, RL; Pupulin, F. 2014. Two new white-flowered species of *Sobralia* (Orchidaceae) from Costa Rica. *Harvard Papers in Botany* 19(1):117-122. doi: 10.3100/hpib.v19iss1.2014.n8.
- Freuler, MJ. 2008. Orquídeas. s.l., Editorial Albatros.
- Gisbert Domenech, MC; Picó Sirvent, MB. 2014. Determinación de la viabilidad de polen y semillas. Universidad Politécnica de Valencia. Consultado 13 nov. 2019. Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/38344/Art%20docente%20viabilidad%20Gisbert_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Griffiths, S; Sharp, R; Foote, TN; Bertin, I; Wanous, M; Reader, S; Colas, I; Moore, G. 2006. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* 439(7077):749. doi: 10.1038/nature04434
- Horticulture Society, R. 2010. Híbridos de *Sobralia* (en línea, sitio web). Consultado 9 may 2020. Disponible en http://sobralia.autrevie.com/Sobralia_TheHybrids.html.

- JBL, (Jardín Botánico Lankester). 2016. Orquídeas nativas, exóticas y miniatura. (en línea, sitio web). Consultado 28 ago. 2019. Disponible en <http://www.jbl.ucr.ac.cr/orquideas>.
- Kamemoto, H; Amore, TD; Kuehnle, AR. 1999. Breeding *Dendrobium* orchids in Hawaii. s.l., University of Hawaii Press.
- Kao, Y-Y; Lin, C-C; Huang, C-H; Li, Y-H. 2007. The cytogenetics of *Phalaenopsis* orchids. s.l., World Scientific. p 115-128. doi: 10.1142/9789812775900_0007
- Klein, ViP; Piedade, MTF. 2019. Orchidaceae occurring in white-sand ecosystems of the Uatumã sustainable development reserve in Central Amazon. *Phytotaxa* 419(2):113-148. doi: 10.1111/btp.12293
- Lahaye, R; Van Der Bank, M; Bogarin, D; Warner, J; Pupulin, F; Gigot, G; Maurin, O; Duthoit, S; Barraclough, TG; Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(8):2923-2928. doi: 10.1073/pnas.0709936105.
- Lankester; Ames. 1924. *Sobralia carazoi* (en línea, sitio web). Consultado 1 oct. 2019. Disponible en http://epidendra.org/taxones/Sobralia/Sobralia_carazoi_/sobralia_carazoi_prot.pdf.
- Lee, Y-I; Chang, F-C; Chung, M-C. 2011. Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady's slipper orchids (*Paphiopedilum*). *Annals of botany* 108(1):113-121. doi: 10.1093/aob/mcr114
- Lee, Yi; Chung, MC. 2010. Karyomorphological observation on some *Paphiopedilum* hybrids. In *Acta Horticulturae*. s.l., s.e. p. 99-106. doi: 10.17660/ActaHortic.2010.878.10
- Levin, DA. 2002. Hybridization and extinction: in protecting rare species, conservationists should consider the dangers of interbreeding, which compound the more well-known threats to wildlife. *American Scientist* 90(3):254-261.

- Lihova, J; Kochjarova, J; Marhold, K. 2007. Hybridization between polyploids *Cardamine enneaphyllos* and *C-glanduligera* in the West Carpathians: evidence from morphology, pollen fertility and PCR-RFLP patterns. *Preslia* 79(2):101-125.
- Lowe, MR. 2000. Notas de orquídeas de Andalucía (España). *Acta Botanica Malacitana* 25:243-247. doi: 10.24310/abm.v25i0.8489
- Ma, H. 2006. A molecular portrait of *Arabidopsis* meiosis. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 4.
- Martín, AC; Rey, M-D; Shaw, P; Moore, G. 2017. Dual effect of the wheat *Ph1* locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma* 126(6):669-680. doi: 10.1007/s00412-017-0630-0
- Mercier, R; Mézard, C; Jenczewski, E; Macaisne, N; Grelon, M. 2015. The molecular biology of meiosis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 66(1):297-327. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035923.
- Moore, G. 2014. The control of recombination in wheat by *Ph1* and its use in breeding. s.l., Springer 1145:143-153. doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4_12
- Moraes, AP; Koehler, S; Cabral, JS; Gomes, SSL; Viccini, LF; Barros, F; Felix, LP; Guerra, M; Forni-Martins, ER. 2017. Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical *Maxillariinae* orchids. *Plant Biology* 19(2):298-308. doi: 10.1111/plb.12527.
- Neiland, MRM; Wilcock, CC. 1995. Maximisation of reproductive success by European Orchidaceae under conditions of infrequent pollination. *Protoplasma* 187(1-4):39-48. doi: 10.1007/bf01280231
- Neubig, KM; Whitten, WM; Blanco, MA; Endara, L; Williams, NH; Koehler, S. 2011. Preliminary molecular phylogenetics of *Sobralia* and relatives (Orchidaceae: Sobralieae). *Lankesteriana International Journal on Orchidology* 11(3):307-317. doi: 10.15517/lank.v11i3.18286
- Ordoñez, B. 2014. Determinacion de la viabilidad y fertilidad del polen. STC-INIA/CIP. Consultado 9 dic. 2019. Disponible en:

<https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/65230/78082.pdf?sequence=2>

- Pacini, E; Hesse, M. 2002. Types of pollen dispersal units in orchids, and their consequences for germination and fertilization. *Annals of Botany* 89(6):653-664. doi: 10.1093/aob/mcf138
- Pridgeon, AM; Cribb, PJ; Chase, MW; Rasmussen, FN. 2001. *Genera Orchidacearum*. Volume 2. Orchidoideae (part 1). s.l., Oxford University Press.
- PROCOMER, (Promotora del comercio exterior). 2017. Empresa de Guácimo crea orquídeas a través de un laboratorio de biotecnología (en línea, sitio web). Consultado 30 ago. 2019. Disponible en <https://www.procomer.com/es/noticias/empresa-de-guacimo-crea-orquideas-a-traves-de-un-laboratorio-de-biotecnologia>.
- Qin, X; Li, W; Liu, Y; Tan, M; Ganai, M; Chetelat, RT. 2018. A farnesyl pyrophosphate synthase gene expressed in pollen functions in S-RN ase-independent unilateral incompatibility. *The Plant Journal* 93(3):417-430. doi: 10.1111/tpj.13796
- Rach, N. 2007a. *Sobralia helleri* (en línea, sitio web). Consultado 1 oct. 2019. Disponible en http://sobralia.autrevie.com/Sobralia_helleri.html.
- Rach, N. 2007b. *Sobralia Rosea* (en línea, sitio web). Consultado 1 oct. 2019. Disponible en http://sobralia.autrevie.com/Sobralia_rosea.html.
- Randell, RA; Howarth, DG; Morden, CW. 2004. Genetic analysis of natural hybrids between endemic and alien *Rubus* (Rosaceae) species in Hawaii. *Conservation Genetics* 5(2):217-230. doi: 10.1023/b:coge.0000030006.30410.5d
- Reichenbach, H. 1852. *Sobralia fenzliana* (en línea, sitio web). Consultado 1 oct. 2019. Disponible en http://epidendra.org/taxones/Sobralia/Sobralia_fenzliana/Sobralia_fenzliana PROT.pdf.
- Rejón García, JD; Suárez, C; Alché Ramírez, J de D; Castro, AJ; Rodríguez García, MI. 2010. Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen

- en distintos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). *Polen* 20:61-72. doi: 10.14201/pol.v20i0.8921
- Rieseberg, LH; Whitton, J; Gardner, K. 1999. Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics* 152(2):713-727.
- Rieseberg, LH; Willis, JH. 2007. Plant speciation. *Science* 317(5840):910-914. doi: 10.1126/ciencia.1137729
- Rieseberg, LH; Wood, TE; Baack, EJ. 2006. The nature of plant species. *Nature* 440(7083):524-527. doi: 10.1038/nature04402
- Rotreklová, O. 2008. *Hieracium* subgen. *Pilosella*: pollen stainability in sexual, apomictic and sterile plants. *Biologia* 63(1):61-66. doi: 10.2478 / s11756-008-0019-x
- Schlechter. 1923. *Sobralia amparoe* (en línea, sitio web). Consultado 30 sep. 2019. Disponible en http://epidendra.org/taxones/Sobralia/Sobralia_amparoe/sobralia_amparoe_prot.PDF.
- Schneider, CA; Rasband, WS; Eliceiri, KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. s.l., s.e., vol.9. p. 671-675 doi: 10.1038/nmeth.2089.
- Schwarzacher, T. 2003. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent in situ hybridization data in plants. *Journal of Experimental Botany* 54(380):11-23. doi: 10.1093/jxb/erg042
- Singh, RJ. 2016. *Plant cytogenetics*. s.l., CRC press.
- Singh, RJ; Hymowitz, T. 1987. Intersubgeneric crossability in the genus *glycine* willd. *Plant breeding* 98(2):171-173. doi: 10.1111/j.1439-0523.1987.tb01111.x
- Stanley, RG; Linskens, HF. 2012. *Pollen: biology biochemistry management*. s.l., Springer Science & Business Media.

- Tremblay, RL; Ackerman, JD. 2001. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): A case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society* 72(1):47-62. doi: 10.1006/bijl.2000.0485.
- Waterman, RJ; Bidartondo, MI. 2008. Deception above, deception below: Linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. In *Journal of Experimental Botany*. s.l., s.e. p. 1085-1096. doi: 10.1093/jxb/erm366.
- Zonneveld, BJM; Duncan, GD. 2003. Taxonomic implications of genome size and pollen colour and vitality for species of *Agapanthus* L'Heritier (Agapanthaceae). *Plant Systematics and Evolution* 241(1-2):115-123. doi: 10.1007/s00606-003-0038-6

Anexos

Anexo 1. Especies de *Sobralia* utilizadas para realizar cruces inter específicos.



Figura 12. Invernadero especializado para el cultivo de plantas de *Sobralia* del Jardín Botánico Lankester. Fotografía tomada por Pablo Bolaños Villegas. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.



Figura 13. Flores de *Sobralia atropubescens* utilizadas para realizar cruces con *Sobralia decora* y *Sobralia kerryae*. Fotografía tomada por Pablo Bolaños Villegas. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.



Figura 14. *Sobralia kerryae* utilizada en la realización de cruces. Fotografía tomada por Pablo Bolaños Villegas. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.



Figura 15. *Sobralia silveira* utilizada en la realización de cruces. Fotografía tomada por Pablo Bolaños Villegas. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.



Figura 16. Flor del presunto Híbrido 30 de *Sobralia*. Dulce Nombre, Cartago, Costa Rica, 2020.