

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Básicas
Escuela de Biología

Tesis presentada para optar por el grado de
Licenciatura en Biología con énfasis en Botánica

**Biología reproductiva y mecanismo de atracción de polinizadores de
Phragmipedium longifolium (Orchidaceae: Cypripedioideae) en Costa Rica**

Melissa Díaz Morales

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica
2017

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Mario A. Blanco Coto, Ph.D.

Director de tesis

Jorge Lobo Segura, Ph.D.

Miembro del tribunal examinador

Alfredo M. Cascante Marín, Ph.D.

Lector de tesis

Germán Vidaurre Fallas, Dr.

Presidente del tribunal examinador

Adam P. Karremans Lok, Ph.D.

Lector de tesis

Melissa Díaz Morales

Postulante

DEDICATORIA

Laurus nobilis, in memoriam.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, especialmente a mis padres por siempre apoyarme, motivarme y enseñarme la importancia del trabajo arduo.

A Franco Pupulin y Mario Blanco les agradezco por compartir conmigo las ideas que convergieron en este proyecto, por depositar en mí la confianza para llevarlo a cabo y al igual que Adam Karremans y Alfredo Cascante por apoyarme con sus invaluable observaciones, ideas y comentarios que permitieron moldearlo. Agradezco infinitamente a Melania Fernández por el apoyo académico y moral en las etapas más complicadas del proyecto y a Diego Bogarín por todas las discusiones sobre orquídeas que se transformaron en ideas aplicadas al mismo.

Agradezco especialmente a David Villalobos por tener la paciencia de ayudarme con los análisis estadísticos, pero sobre todo por aconsejarme, acompañarme e incentivarme. A Miguel Benavides por la gran ayuda en el trabajo de laboratorio. Paul Hanson por las discusiones entomológicas que me ayudaron a entender mis observaciones desde una perspectiva diferente a la de las plantas. Manuel Zumbado colaboró con la identificación de los sírfidos.

Los análisis anatómicos se realizaron en el Jardín Botánico Lankester y el Laboratorio de Microtécnicas de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (UCR), y en el Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con la colaboración de Estela Sandoval. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se realizaron en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la UCR con la colaboración de Ethel Sánchez y Cynthia Barboza.

El Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE) y el Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) otorgaron los permisos con los que se colectaron los especímenes de este estudio. Esta investigación fue financiada por la Vicerrectora de Investigación de la Universidad de Costa Rica como parte del proyecto “814-B5-200 - Éxito reproductivo y anatomía para la atracción de polinizadores en el género *Phragmipedium* (Orchidaceae: Cypripedioideae)”. Stephen Kirby, y la familia González Sotela de la Reserva Biológica Bosque de Paz ayudaron a financiar los viáticos de algunas giras de campo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	01
1.1. Marco teórico	01
1.2. Antecedentes	02
1.2.1. Polinización en Orchidaceae	02
1.2.2. Polinización en Cyripedioideae	04
1.2.3. Anatomía floral asociada a la polinización en Cyripedioideae	07
1.2.4. Biología reproductiva y polinización en <i>Phragmipedium</i>	09
1.3. Justificación	10
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Sitios y especies de estudio	12
3.2. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la producción de frutos de <i>Phragmipedium longifolium</i>	13
3.3. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la viabilidad de semillas de <i>Phragmipedium longifolium</i>	15
3.4. Fenología y visitantes florales de <i>Phragmipedium longifolium</i>	16
3.5. Importancia funcional de estructuras florales en <i>Phragmipedium longifolium</i>	17
3.6. Caracterización de tricomas glandulares en los pétalos de tres especies de <i>Phragmipedium</i>	17
3.7. Morfología y contenidos celulares de los tricomas glandulares en flores de <i>Phragmipedium longifolium</i>	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la producción de frutos	

de <i>Phragmipedium longifolium</i>	20
4.2. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la viabilidad de semillas de <i>Phragmipedium longifolium</i>	20
4.3. Fenología y visitantes florales de <i>Phragmipedium longifolium</i>	21
4.4. Importancia funcional de estructuras florales en <i>Phragmipedium longifolium</i>	23
4.5. Caracterización de tricomas glandulares en los pétalos de tres especies de <i>Phragmipedium</i>	24
4.6. Morfología y contenidos celulares de los tricomas glandulares en flores de <i>Phragmipedium longifolium</i>	24
5. DISCUSIÓN	27
5.1. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la producción de frutos de <i>Phragmipedium longifolium</i>	27
5.2. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la viabilidad de semillas de <i>Phragmipedium longifolium</i>	28
5.3. Fenología y visitantes florales de <i>Phragmipedium longifolium</i>	29
5.4. Importancia funcional de estructuras florales en <i>Phragmipedium longifolium</i>	34
5.5. Caracterización de tricomas glandulares en los pétalos de tres especies de <i>Phragmipedium</i>	35
5.6. Morfología y contenidos celulares de los tricomas glandulares en flores de <i>Phragmipedium longifolium</i>	36
6. CONCLUSIONES	38
7. BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resultados de la regresión logística binomial para evaluar el efecto de diferentes tratamientos de polinización sobre la producción de frutos en <i>Phragmipedium longifolium</i>	51
Cuadro 2. Resultados de la regresión logística binomial para evaluar el efecto de diferentes tratamientos de polinización sobre la viabilidad de semillas en <i>Phragmipedium longifolium</i>	51
Cuadro 3. Insectos visitantes de flores de <i>Phragmipedium longifolium</i> observados desde las 5:00 hasta las 18:00 hrs por periodos de 15 minutos cada hora, una vez al mes durante tres meses (para un total de 9 horas y 45 minutos de observación)	52
Cuadro 4. Resultados de la regresión logística binomial para evaluar el efecto de diferentes tratamientos de remoción de estructuras florales sobre la producción de frutos en <i>Phragmipedium longifolium</i>	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Flor de <i>Phragmipedium longifolium</i> (izquierda) y corte longitudinal de la flor sin los pétalos ni sépalos (derecha), mostrando la columna (c), abertura principal del saco (a), los pliegues del labelo (p), el orificio de salida (o) y el túnel del labelo (t)	54
Figura 2. Moscas de la familia Syrphidae en los orificios de salida de flores de Cypridioideae. A. Hembra de <i>Allogragta</i> sp. saliendo del labelo de <i>Phragmipedium longifolium</i> en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica; B. Mosca de la familia Syrphidae atrapada en el orificio de salida de una flor de <i>Paphiopedilum dianthum</i> cultivada en el Jardín Botánico Lankester; el individuo murió dentro de la flor sin conseguir escapar	55
Figura 3. Flor de <i>Phragmipedium longifolium</i> mostrando sus diferentes estructuras	56
Figura 4. Flores de <i>Phragmipedium longifolium</i> mostrando los tratamientos de remoción de estructuras florales para determinar su efecto en la producción de frutos: A. control (flor completa); B. pétalos removidos; C. sépalo dorsal removido; D. estaminodio removido; E. sinsépalo removido; F. todos los sépalos removidos	57
Figura 5. Porcentaje de frutos producidos en los tratamientos de autopolinización, polinización cruzada, polinización abierta (control) y exclusión de polinizadores en una población de <i>Phragmipedium longifolium</i> en Costa Rica (n= 100 flores por tratamiento). Las líneas verticales representan la desviación estándar	58
Figura 6. Porcentaje de semillas viables producidas para los tratamientos de autopolinización, polinización cruzada y polinización abierta (control) en una población de <i>Phragmipedium longifolium</i> en Costa Rica (n= 500 semillas provenientes de 5 frutos para los tratamientos de polinización abierta y	

autopolinización; 500 semillas provenientes de 3 frutos para el tratamiento de polinización cruzada). Las líneas verticales representan la desviación estándar	59
Figura 7. Fenología de <i>Phragmipedium longifolium</i> en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica, durante el año 2015. Las barras oscuras indican el número de flores observadas para cada uno de los meses del año 2015, las barras claras indican la precipitación registrada en la estación pluviométrica más cercana a la población (Agencia de Extensión Agrícola, Zarcero) para el mismo año (n= 50 plantas)	60
Figura 8. Porcentaje de visitas de insectos observadas a diferentes horas en <i>Phragmipedium longifolium</i> en la Reserva Biológica Boque de Paz, Costa Rica. Para cada hora, el tiempo total de observación fue de 45 minutos, no se muestran las horas en las que no se vieron visitantes (total de visitas= 57)	61
Figura 9. Potenciales polinizadores de <i>Phragmipedium longifolium</i> en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. A. hembra de <i>Allograpta</i> sp. (Syrphidae) cargando una masa polínica de <i>P. longifolium</i> y con dos huevos sobre el labelo; B. hembra de <i>Allograpta</i> sp. con masa polínica de <i>P. longifolium</i> sobre su tórax, vista dorso-lateral; C. huevo de <i>Allograpta</i> sp.; D. hembra de <i>Allograpta</i> sp. con masa polínica de <i>P. longifolium</i> sobre su tórax, vista dorsal	62
Figura 10. Hembra de <i>Allograpta</i> sp. (Syrphidae) intentando escapar por la abertura principal del labelo de <i>Phragmipedium longifolium</i> . Se señala con una flecha un huevo, posiblemente ovipositado por el mismo individuo antes de caer dentro del labelo	63
Figura 11. Porcentaje de frutos producidos en los tratamientos de remoción de estructuras florales en una población de <i>Phragmipedium longifolium</i> en Costa Rica (n= 100 flores por tratamiento). Las líneas verticales representan la desviación estándar	64
Figura 12. Cortes transversales de las partes apical, media y basal de los pétalos de <i>Phragmipedium humboldtii</i> , <i>P. wallisii</i> y <i>P. longifolium</i> teñidos con azul de	

toluidina al 1%. Todos los cortes muestran la superficie adaxial hacia arriba. Se señalan con flechas negras algunos tricomas glandulares y con flechas rojas el surco abaxial que se extiende a lo largo del pétalo en las tres especies	65
Figura 13. Variaciones morfológicas de los tricomas glandulares TG1, TG2 y TG3 presentes en los pétalos de <i>Phragmipedium longifolium</i> , <i>P. humboldtii</i> y <i>P. wallisii</i>	66
Figura 14. Margen lateral del estaminodio de <i>Phragmipedium longifolium</i> donde se ubican los tricomas. A. sin teñir; B. teñido con ácido peryódico de Schiff; C. teñido con Sudán IV; D. detalle en MEB	67
Figura 15. Superficie adaxial del labelo de <i>Phragmipedium longifolium</i> cerca de los orificios de salida bajo la columna (dentro del túnel). A. sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle en MEB	68
Figura 16. Superficie abaxial de los pliegues del labelo de <i>Phragmipedium longifolium</i> donde se ubican las manchas verdes. A. sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle en MEB	69
Figura 17. Ápice del pétalo de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. superficie adaxial sin teñir; B. superficie abaxial sin teñir; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; E. superficie adaxial en MEB, mostrando tricomas TG2 y algunos TG3 cerca del margen; F. superficie abaxial en MEB, mostrando en detalle tricomas TG3	70
Figura 18. Parte media del pétalo de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. superficie adaxial sin teñir; B. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie abaxial en MEB	71
Figura 19. Superficie adaxial de la base del pétalo de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle en MEB	72
Figura 20. Ápice del sépalo dorsal de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. superficie	

adaxial sin teñir; B. superficie abaxial sin teñir; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; E y F. detalles de la superficie abaxial en MEB	73
Figura 21. Parte media del sépalo dorsal de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. superficie abaxial sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalles de la superficie abaxial en MEB; E. detalle de la superficie adaxial en MEB	74
Figura 22. Base del sépalo dorsal de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. superficie adaxial sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie abaxial en MEB	75
Figura 23. Ápice del sinsépalo de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. superficie abaxial sin teñir; B. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie abaxial en MEB	76
Figura 24. Parte media del sinsépalo de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. superficie abaxial sin teñir; B. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie adaxial en MEB	77
Figura 25. Base del sinsépalo de <i>Phragmipedium longifolium</i> . A. superficie adaxial sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie abaxial en MEB	78

RESUMEN

Phragmipedium es un género de 21 especies restringidas a los trópicos y subtrópicos del centro y sur de América. Al ser este un género que puede producir semillas tanto por autopolinización como por polinización cruzada, representa un sistema de estudio ideal para investigaciones sobre los componentes del éxito reproductivo. En esta investigación se describen algunos componentes del éxito reproductivo sexual y las estructuras florales asociadas a la atracción de polinizadores en *Phragmipedium*. Para estudiar el sistema reproductivo de *P. longifolium* se realizaron polinizaciones cruzadas y autopolinizaciones manuales. No se encontraron diferencias significativas en la producción de frutos entre ambos tratamientos. Se realizaron pruebas de viabilidad a las semillas producidas por autopolinización y por polinización cruzada, siendo las primeras las que presentaron una mayor viabilidad, lo que sugiere que esta especie es frecuentemente autopolinizada. Para determinar la importancia y posible función de diferentes partes del perianto en el éxito reproductivo de *P. longifolium* se realizaron experimentos de remoción de diferentes estructuras; todos los tratamientos de remoción redujeron la producción de frutos. Ninguna flor produjo frutos al remover sus pétalos, todos los otros tratamientos produjeron frutos, pero en menor porcentaje que el tratamiento control. Las flores de *P. longifolium* son principalmente visitadas entre las 10:00 y las 13:00 por dípteros. Se documentaron hembras de moscas del género *Allograpta* (Syrphidae) como polinizadoras, atraídas engañosamente mediante imitación de sitio de oviposición, pues estas ovipositan ocasionalmente sobre el labelo de la orquídea. Se estudiaron cortes transversales de los pétalos de *P. humboldtii*, *P. longifolium* y *P. wallisii* teñidos con Azul de Toluidina con microscopía de luz, para identificar y describir estructuras anatómicas y su posible importancia en la atracción de polinizadores. Se identificaron tres tipos de tricomas glandulares (TG1, TG2 y TG3) en los pétalos de las tres especies y en el resto del perianto de *P. longifolium*. En diferentes segmentos del perianto de *P. longifolium*, se detectó la presencia de lípidos en los tres tipos de tricomas glandulares al teñir con Sudán IV, y de carbohidratos en los TG2 y algunos TG1 al teñir con Ácido Peryódico de Schiff. La presencia de estructuras anatómicas

similares en *P. humboldtii* y *P. wallisii* sugieren que estas otras especies comparten el mismo mecanismo de polinización por engaño. La autocompatibilidad en *P. longifolium* podría compensar la baja visitación resultante del mecanismo de atracción por engaño que utiliza la especie.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Marco teórico

Orchidaceae es una de las familias más diversas de todas las angiospermas (Cozzolino & Widmer 2005, Jersáková *et al.* 2006). Aunque presentan características morfológicas que permiten distinguirlas fácilmente de otras familias de plantas, entre las orquídeas existe una variedad morfológica floral muy marcada. Se cree que esta diversidad ha sido en parte producto de la evolución de diversas estrategias reproductivas y del alto grado de especialización hacia polinizadores específicos, que no se encuentran en otras familias de plantas (Gravendeel *et al.* 2004).

Los sistemas reproductivos de las orquídeas pueden variar desde plantas autógamas que se reproducen por autopolinización (la unión de gametos femeninos y masculinos de una misma flor), por geitonogamia (la unión de gametos femeninos y masculinos de diferentes flores en un mismo individuo), o por cleistogamia (la unión de gametos femeninos y masculinos de una misma flor que no completa la antesis), hasta plantas que dependen de la exogamia o polinización cruzada (la transferencia del polen de un individuo al estigma de otro individuo de la misma especie para su reproducción). La autopolinización puede ser mediada o no por un agente polinizador; en los casos en que la autopolinización no es mediada por un polinizador, esta siempre resultará en autopolinización espontánea o en cleistogamia. La polinización cruzada y la geitonogamia siempre son mediadas por agentes polinizadores (van der Pijl & Dodson 1966, Eckert 2000, Culley & Klooster 2007).

La alta diversidad de morfologías florales en sus especies también le ha permitido a la familia Orchidaceae sacar provecho de una alta diversidad de polinizadores. Entre estos se reportan con mayor frecuencia diversas familias de aves e insectos, principalmente de los órdenes Hymenoptera, Diptera, Coleoptera y Lepidoptera. También se reportan agentes abióticos interviniendo en la polinización de orquídeas, aunque estos casos parecen ser esporádicos y exclusivamente asociados a autopolinización asistida por lluvia (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1981, Tremblay *et al.* 2005, Aguiar *et al.* 2011, Fan *et al.* 2012, Breitkopf *et al.* 2014) o autopolinización asistida por viento (Borba & Semir 1998). El

orden Diptera representa el segundo grupo de polinizadores más frecuente entre las orquídeas (superado únicamente por el orden Hymenoptera); se estima que hasta un 25% de las especies de orquídeas podrían ser polinizadas por moscas (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1981, Borba & Semir 2001, Azevedo *et al.* 2007, Karremans *et al.* 2015).

1.2. Antecedentes

1.2.1. Polinización en Orchidaceae

Las orquídeas utilizan básicamente dos estrategias para atraer a sus polinizadores: la recompensa y el engaño. Los casos mejor estudiados de especies de Orchidaceae que ofrecen recompensas a sus polinizadores son aquellos en los que la flor otorga fragancias a machos de abejas euglosinas que las utilizan para su reproducción (Dressler 1968, Hetherington-Rauth & Ramírez 2016). Sin embargo, hay otros casos como la polinización de algunas especies de *Bulbophyllum* Thouars donde también se ofrecen compuestos aromáticos para la atracción y como recompensa para machos de dípteros polinizadores que se alimentan de estos e incluso pueden sintetizarlos para utilizarlos como estimulantes de la actividad sexual (Tan & Nishida 2000, Tan *et al.* 2002). Recompensas en forma de ceras y resinas se han documentado en algunas especies de *Maxillaria* Ruiz & Pav. polinizadas posiblemente por himenópteros. Se ha sugerido que los polinizadores podrían coleccionar esas ceras para la construcción de sus nidos o como fuente alimenticia, aunque no se han documentado los polinizadores ni el mecanismo de polinización de estas especies (van der Pijl & Dodson 1966, Davies *et al.* 2003, Tremblay *et al.* 2005).

Otras recompensas alimenticias que ofrecen las orquídeas son néctar y pseudopolen (van der Cingel 2001). A modo de ejemplo, en los géneros *Aerangis* Rchb.f., *Angraecum* Bory, *Comparettia* Poepp. & Endl., *Maxillaria sensu lato* (s.l.) y *Specklinia* Lindl. se ha documentado el néctar como recompensa (Ackerman *et al.* 1994, Stpiczynska *et al.* 2004, Martins & Johnson 2007, Karremans *et al.* 2015). El pseudopolen que contiene sustancias como proteínas, almidón y ocasionalmente lípidos se ha encontrado en géneros como *Dendrobium* Sw., *Eria* Lindl., *Maxillaria sensu stricto* (s.s.), y

Polystachya Hook., los cuales se cree que son polinizados en su mayoría por abejas de diferentes géneros (Davies *et al.* 2000, Davies *et al.* 2002, Davies & Turner 2004a, 2004b, Davies *et al.* 2013). La producción de aceites como recompensa para polinizadores se ha documentado por ejemplo en los géneros africanos *Corycium* Sw., *Disperis* Sw. y *Pterygodium* Sw., en donde las hembras de abejas recolectan los aceites para ofrecerlos como alimento a sus larvas (Pauw 2006).

No obstante, lo que más hace destacar a las orquídeas son los variados síndromes de polinización por engaño que han evolucionado independientemente en diferentes linajes dentro de la familia. Se estima que hasta un tercio de sus especies son polinizadas por engaño (Tremblay *et al.* 2005, Case & Bradford 2009). Entre los engaños más comunes se encuentra la atracción por imitación de señales de flores de otras especies que sí ofrecen recompensas alimenticias. Estas señales pueden ser visuales por medio de la imitación de colores o patrones de coloración (ejemplos de esto se dan en *Anacamptis* Rich. creciendo entre especies productoras de néctar de los géneros *Geum* L. y *Allium* L.; *Eulophia* R.Br. imitando *Wahlenbergia* Schrad. ex Roth; y *Orchis* L. imitando coloraciones de diferentes especies de plantas de su entorno; ver Gumbert & Kunze 2001, Johnson *et al.* 2003b, Peter & Johnson 2008), o por la imitación de formas, tamaños o estructuras como en *Brownleea* Harv. ex Lindl. semejando flores de *Scabiosa* L. y *Orchis* imitando *Bellevalia* Lapeyr. (Johnson *et al.* 2003a, Galizia *et al.* 2005). También, la imitación de recompensas alimenticias pueden ser químicas, atrayendo a los polinizadores con aromas, que suelen combinarse con señales visuales (Kunze & Gumbert 2001, Salzmann *et al.* 2007).

Los sistemas mediados por engaños sexuales como estrategia para polinización están entre los mejor estudiados y más reconocido de la familia Orchidaceae (Cozzolino & Widmer 2005, Ellis & Johnson 2010, Schiestl 2010), a pesar de que también se ha encontrado en una especie de Asteraceae y otra de Iridaceae (Ellis & Johnson 2010, Vereecken *et al.* 2012). Aunque las estrategias difieren en cada caso, en esencia las flores imitan morfológica y químicamente a hembras receptivas de su respectivo polinizador, se han estudiado casos de estos en *Lepanthes* Sw., *Ophrys* L., *Chiloglottis*

R.Br., *Telipogon* Kunth, entre otros (Ayasse *et al.* 2000, Schiestl *et al.* 2003, Blanco & Barboza 2005, Martel *et al.* 2016). En el género *Cryptostylis* R.Br. se probó que el engaño es tan efectivo que incluso provoca la eyaculación del polinizador (Gaskett *et al.* 2008).

Otra estrategia de atracción por engaño utilizada por algunas orquídeas es a través de la imitación química y morfológica de sitios para la oviposición de sus polinizadores. Especies del género *Dracula* Luer, *Epipactis* Zinn y de la subfamilia Cyprripedioideae aparentemente imitan los sitios utilizados para oviposición por las hembras de los insectos que las polinizan (Ivri & Dafni 1977, Brantjes 1981, Shi *et al.* 2009, Endara *et al.* 2010, Stökl *et al.* 2011, Pemberton 2013, Policha *et al.* 2016). Para esto, las plantas deben emitir señales muy precisas para atraer eficientemente a sus polinizadores, por lo que es frecuente que las flores sean morfológicamente complejas y emitan señales aromáticas y mecano-sensoriales que los insectos suelen seguir cuando buscan sitios de oviposición (Urru *et al.* 2011).

1.2.2. Polinización en Cyprripedioideae

Cyprripedioideae es una subfamilia de Orchidaceae que abarca aproximadamente 180 especies distribuidas en 5 géneros. *Cyprripedium* L. se distribuye en zonas templadas del norte de Asia, América y Europa; *Paphiopedilum* Pfitzer se encuentra principalmente en los trópicos y subtropicos del sureste de Asia; *Selenipedium* Rchb.f. está restringido a Panamá y las regiones más al norte de Suramérica; la única especie del género *Mexipedium* V.A.Albert & M.W.Chase es endémica del sureste de México; y *Phragmipedium* Rolfe está restringido a los trópicos y subtropicos de Centro y Suramérica (Cox *et al.* 1997, Pemberton 2013, Edens-Meier *et al.* 2014).

A pesar de su amplia distribución geográfica, sus diversos hábitats y tamaños variables, casi todas las especies de la subfamilia Cyprripedioideae comparten la misma estructura floral básica y un mecanismo de polinización similar. Las especies de esta subfamilia pueden ser autocompatibles; sin embargo, en la mayoría de los casos

requieren de un insecto polinizador que transfiera las masas polínicas de la antera al estigma (Pemberton 2013).

Para Cyripedioideae no se conoce aún ninguna especie que ofrezca algún tipo de recompensa a los polinizadores, por lo que se considera que la atracción de polinizadores se da por engaño. Las orquídeas de este grupo se caracterizan por su hábito principalmente terrestre, ausencia de pseudobulbos, poseer un labelo modificado en forma de saco con una abertura principal (en la mayoría de las especies) y la presencia de dos estambres funcionales más un tercero infértil (estaminodio) generalmente con forma de escudo que cubre el resto de la columna o ginostemio (Dressler 1981, Cox *et al.* 1997). En la mayoría de especies de Orchidaceae el polen está agregado en estructuras compactas llamadas polinios; en subfamilias menos derivadas como Cyripedioideae esta compactación es menos evidente, sin embargo los granos de polen si se conglomeran en masas polínicas (Dressler 1981, Pridgeon *et al.* 1999). El túnel que se forma entre los pliegues del labelo y la columna desemboca en pequeños orificios de salida a cada lado del labelo por detrás y abajo de la columna (aberturas laterales). Por encima de estos orificios se encuentran las dos anteras, una a cada lado de la columna (Fig. 1) (Burns-Balogh & Hesse 1986, Pemberton 2013).

El labelo con forma de saco actúa como una trampa para los potenciales polinizadores. Los insectos que son atraídos a las flores entran por la abertura principal del labelo y quedan temporalmente atrapados dentro del mismo. Para escapar, deben subir por el túnel del labelo detrás de los pliegues y salir por alguna de las aberturas laterales; algunos de los insectos no pueden salir por la abertura principal debido al espacio insuficiente para desplegar sus alas para el vuelo, y a que las paredes que rodean la abertura principal del labelo son resbalosas y evitan que puedan salir caminando (Pemberton 2013: 68). Si el insecto lleva masas de polen en su cuerpo, antes de pasar por las aberturas laterales entra contacto con el estigma. Este está cubierto de papilas que recogen los granos de polen cargados por el insecto. Después de pasar por el estigma, el insecto es capaz de salir por las aberturas laterales si tiene el tamaño adecuado (Pemberton 2013: 69). Para ser un potencial polinizador, el insecto debe tener el tamaño

justo para que la parte dorsal de su cuerpo entre en contacto con las masas polínicas durante el movimiento de salida, de modo que desprenda de las anteras y queden unidas a su cuerpo (Fig. 2A), y no debe ser más grande que el espacio en los orificios de salida ya que podría quedarse atascado en estos (Fig. 2B) (Pemberton 2013).

Pese a que se han reportado varios de los polinizadores para las especies de la subfamilia Cypridioideae (Pemberton 2013), pocos de estos reportes son estudios que se enfocan en la biología reproductiva de sus especies y menos aún en aspectos de la anatomía floral involucrados en la atracción de polinizadores. La mayoría de las investigaciones realizadas en este grupo están limitadas a estudios sistemáticos y evolutivos (Cox *et al.* 1997, Li *et al.* 2011, Chochai 2014). Sin embargo, los estudios ecológicos que analizan los aspectos reproductivos de forma integral desde la atracción de los polinizadores hasta la producción de semillas en las flores polinizadas son escasos.

Cypridium es el género de la subfamilia con más estudios y reportes de polinizadores. Se han documentado los posibles polinizadores en aproximadamente un 44% de sus especies (Pemberton 2013, Edens-Meier *et al.* 2014). Se ha encontrado que las especies de *Cypridium* pueden ser polinizadas por abejas de al menos 13 géneros, avispa del género *Cinetus*, moscas de al menos cinco géneros (incluyendo dos pertenecientes a la familia Syrphidae) y escarabajos del género *Trichotinus* (Bänziger *et al.* 2005, Li *et al.* 2006, Ren *et al.* 2011, Edens-Meier *et al.* 2014, Catling 2015). En este género, además de la autopolinización espontánea reportada en *Cypridium passerinum* Richardson, se han podido identificar diferentes estrategias de polinización (van der Cingel 2001, Pemberton 2013). En *C. guttatum* Sw. se ha observado que algunas abejas se aproximan a la flor siguiendo un curso zigzagueante, que sugiere que están tratando de ubicar la fuente de un olor percibido (Bänziger *et al.* 2005). Es posible que los insectos sigan inicialmente una señal olfativa y conforme se aproximan se da un atractivo visual que provoca que el insecto ingrese al labelo.

A pesar de ser *Paphiopedilum* el género con más especies en la subfamilia Cypridioideae, solo se han reportado polinizadores (potenciales o reales) para un

aproximado de 14% de sus especies. Estos incluyen abejas de tres géneros y moscas sírfidas de al menos ocho géneros (Shi *et al.* 2007, Shi *et al.* 2009, Edens-Meier *et al.* 2014). Se ha sugerido que las especies de este género se pueden separar en dos grupos funcionales: las que atraen a sus polinizadores mediante imitación de sitios reproductivos y las que lo hacen mediante imitación de recursos alimenticios. Además pueden emplear tanto señales visuales como aromáticas para atraer los insectos (Bäzinger 1996, Shi *et al.* 2009).

Los estudios en especies de *Paphiopedilum* polinizadas por moscas sírfidas mediante la atracción por imitación de sitios reproductivos han mostrado que el síndrome consiste en un engaño en el que la flor emite señales que le hacen pensar a la mosca que este es un sitio óptimo para ovipositar (Pemberton 2013). Algunas especies de la familia Syrphidae ponen sus huevos cerca o sobre colonias de áfidos, ya que sus larvas se alimentan de los mismos (Thompson *et al.* 2010). Las señales emitidas por las flores le hacen creer a la mosca que en la flor hay áfidos (Edens-Meier *et al.* 2014). En algunas especies como *P. rothschildianum* (Rchb.f.) Stein, *P. callosum* (Rchb.f.) Stein y *P. hirsutissimum* (Lindl. ex Hook. f.) Stein se ha observado oviposición por parte de las moscas sobre las flores (Atwood 1985, Bäzinger 2002, Jun *et al.* 2009).

Para ninguna de las especies de los géneros *Mexipedium* y *Selenipedium* se han reportado polinizadores, aunque se asume que por su morfología el mecanismo de polinización debe ser similar a los de otros géneros de la subfamilia. La polinización en *Phragmipedium* se tratará a continuación con más detalle por ser el grupo de interés para este estudio.

1.2.3. Anatomía floral asociada a la polinización en Cypridioideae y otras Orchidaceae.

Vogel (1990) describió tricomas glandulares de los pétalos de *Phragmipedium* × *grande* (Rchb.f.) Rolfe (erróneamente como “*Phragmopedilum*”), que interpretó como tricomas productores de aromas. Stern y colaboradores (1986) realizaron tinciones con Rojo Neutro y Negro Sudán B para tratar de detectar glándulas de fragancia en

diferentes especies de orquídeas, entre estas *Paphiopedilum concolor* (Bateman) Pfitzer y *Phragmipedium caricinum* (Lindl. & Paxton) Rolfe, y aunque esta es la única referencia que se ha logrado encontrar en la literatura sobre posibles microestructuras anatómicas productoras de aromas que podrían estar cumpliendo alguna función en la atracción de polinizadores en la subfamilia Cypripedioideae. Aunque análisis aromáticos se han realizado en especies de *Cypripedium* polinizadas por abejas (Sugiura *et al.* 2002, Li *et al.* 2008), ninguno de estos incluye estudios anatómicos que permitan elucidar las estructuras productoras de estos aromas y tampoco reportan estructuras anatómicas que produzcan recompensas para los polinizadores.

Los osmóforos son glándulas productoras de aromas que pueden o no distinguirse anatómica y morfológicamente de sus tejidos adyacentes (Pridgeon & Stern 1983, van der Cingel 1995). En sus estudios sobre el rol de las glándulas aromáticas de las plantas en la polinización, Vogel (1990) identificó osmóforos por medio de tinciones hechas en tejidos frescos con Rojo Neutro; los tejidos que aparentemente cumplen la función de osmóforos se tiñeron de rojo, mientras los otros tejidos permanecieron sin teñir. Estos osmóforos pueden estar formados por una capa simple de células epidérmicas (osmóforos epidérmicos) o pueden tener papilas secretoras que pueden ser unicelulares o multicelulares (osmóforos glandulares) (Wiemer *et al.* 2008, Franken *et al.* 2016).

Algunos estudios más recientes sobre osmóforos en orquídeas han utilizado los métodos de Vogel o modificaciones de los mismos para localizar estas glándulas aromáticas en diferentes géneros. Algunos como *Restrepia* Kunth concentran los osmóforos en estructuras morfológicamente bien definidas (Pridgeon & Stern 1983); otros como *Gongora* Ruiz & Pav., requieren de técnicas histoquímicas para poder ser localizados (Stern *et al.* 1986). Otras técnicas histológicas se han utilizado para la detección de osmóforos en orquídeas, entre los que se pueden mencionar tinciones con Sudán III, Sudán IV, Negro Sudán B o Azul Nilo A (Stern *et al.* 1986, Pansarin *et al.* 2009, Franken *et al.* 2016). Sin embargo, no se ha encontrado aún un procedimiento histoquímico único que permita la identificación de osmóforos dentro de todo un grupo tan grande y diverso como lo es la familia Orchidaceae ya que los compuestos

aromáticos o sus precursores contenidos en las células del osmóforo pueden ser muy variables (Stern *et al.* 1986).

1.2.4. Biología reproductiva y polinización en *Phragmipedium*

El género *Phragmipedium* está compuesto por aproximadamente 21 especies (Cribb & Purver 2017). Solamente se han reportado polinizadores para tres de estas. En *P. pearcei* (Veitch ex J.Dix) Rauh & Senghas se reportó como polinizador una mosca sírfida del género *Ocyptamus* (Pemberton 2011, 2013, Edens-Meier *et al.* 2014). Para *P. longifolium* también se han reportado sírfidos pero del género *Syrphus*, y una abeja del género *Chlerogella* (Halictidae) removiendo las masas polínicas (Dodson 1966, van der Cingel 2001, Pemberton 2011, 2013, Edens-Meier *et al.* 2014). McCook (1989) observó una mosca *Syrphus* saliendo del labelo de *P. humboldtii* (Warsz.) J.T. Atwood & Dressler (reportada como *P. caudatum* (Lindl.) Rolfe) cargando una masa de polen en el tórax (Cribb & Purver 2017). Las flores de *P. boisserianum* (Rchb.f. & Warsz.) Rolfe, y *P. lindenii* (Lindl.) Dressler & N.H.Williams pueden autopolinizarse de forma espontánea (Pridgeon *et al.* 1999, Koopowitz 2008, Pemberton 2011, 2013, Edens-Meier *et al.* 2014, Cribb & Purver 2017).

Las especies de *Phragmipedium* polinizadas por moscas sírfidas suelen tener flores de colores opacos, entre café y verde, con puntos en los pliegues del labelo, que según se cree imitan la apariencia de colonias de áfidos, los cuales sirven de alimento para las larvas de muchas especies de moscas sírfidas (Jesáková *et al.* 2006, Thompson *et al.* 2010, Pemberton 2013, Hanson & Nishida 2016). Aunque en este género no se han hecho estudios detallados, es posible que los mecanismos de atracción de polinizadores sean engaños similares a los estudiados en *Paphiopedilum* ya que tampoco se han reportado que sus especies ofrezcan recompensas (Bäzinger 2002, Pemberton 2013, Edens-Meier *et al.* 2014).

1.3. Justificación

Al ser *Phragmipedium* un género en el que se ha documentado la producción de semillas tanto por autopolinización mediada por polinizadores, por autopolinización espontánea y por polinización cruzada (Pemberton 2011), representa un sistema de estudio ideal para determinar el papel de los componentes de su éxito reproductivo. Las especies de *Phragmipedium* se incluyen en el Apéndice I de las especies amparadas por CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), lo cual las cataloga como especies altamente amenazadas. En Costa Rica es frecuente la extracción de *P. longifolium* de su hábitat natural para el coleccionismo y el comercio ilegal, por lo que es importante realizar estudios que permitan entender detalladamente como se reproduce esta especie, desde cuales son sus polinizadores hasta los mecanismos que emplea para atraerlos. Los estudios histológicos permiten predecir y entender las funciones que podrían cumplir determinados órganos de las plantas, con base en las características de las células y sus contenidos. La literatura publicada en este tema es muy escasa y los resultados de este estudio permitirán que otros investigadores tengan acceso a los mismos para futuros estudios.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir a documentar la importancia de los componentes morfológicos y anatómicos en el éxito reproductivo sexual y los mecanismos de polinización en el género *Phragmipedium* (Orchidaceae), a través de experimentos de polinización y análisis anatómicos florales combinados con pruebas histoquímicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar los posibles efectos de la autopolinización y polinización cruzada en la producción de frutos de *P. longifolium*.

Identificar los posibles efectos de la autopolinización y polinización cruzada en la viabilidad de semillas de *P. longifolium*.

Documentar la fenología y los visitantes florales en una población de *P. longifolium*.

Identificar las estructuras florales que puedan ser de mayor importancia para la atracción de polinizadores en *P. longifolium*.

Describir la morfología de las estructuras asociadas con la atracción de polinizadores mediante la producción de aromas en pétalos de diferentes especies del género *Phragmipedium*.

Identificar posibles contenidos celulares de las estructuras asociadas con la atracción de polinizadores mediante la producción de aromas en diferentes partes florales de *P. longifolium*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sitio y especies de estudio

El estudio de la biología reproductiva de *Phragmipedium longifolium* se llevó a cabo en la Reserva Biológica Bosque de Paz (10°12'17.3"N 84°18'59.1"W, 1534 m), que protege un bosque montano maduro dominado por árboles de jaúl (*Alnus acuminata* Kunth); se ubica en el distrito Palmira, cantón de Zarcero, provincia de Alajuela, Costa Rica. El sitio cuenta con aproximadamente 110 plantas de esta especie en cultivo a poca distancia del bosque. Estas se mantienen en constante floración durante todo el año y frecuentemente producen frutos de forma natural, evidenciando la presencia de polinizadores en el sitio (M. Díaz 2008; JBL-spirit!).

Phragmipedium longifolium se caracteriza por su hábito terrestre; sus inflorescencias de una o raramente dos flores simultáneas; sus flores con el ovario trilocular, minutamente ciliado, persistente; el sépalo dorsal reflexo; los sépalos laterales unidos en un sinsépalo cóncavo; los pétalos sublineares, extendidos a una longitud mayor que la del labelo, usualmente morados a verdes con los márgenes blancos; el labelo sacciforme, con dos lóbulos laterales auriculados, obtusos, frecuentemente verde punteado marrón y con dos manchas verdes irregulares sobre los pliegues; columna corta, con dos anteras biloculares; polen agrupado en masas polínicas de aproximadamente 2 mm de longitud; el estaminodio con tricomas hacia los márgenes laterales; el estigma papiloso, trilobulado; sus frutos son cápsulas erectas, con tres líneas de dehiscencia; semillas oblongas con tegumento café oscuro (Fig. 3). Se distribuye desde Costa Rica hasta Ecuador. En Costa Rica se encuentra en las vertientes Caribe y Pacífica, cerca de la divisoria continental, en las Cordilleras de Tilarán y Central y al norte de la Cordillera de Talamanca. Habita bosques muy húmedos y pluviales, especialmente en laderas de acantilados entre los 500 y 1500 m de elevación (Dressler 2003, Muñoz & Warner 2007, Muñoz *et al.* 2010). De las dos especies del género en Costa Rica, *P. longifolium* posee las poblaciones más grandes, accesibles y de más amplia distribución (Muñoz & Warner 2007). Esto la convierte en una especie ideal para desarrollar experimentos en el campo sobre biología reproductiva.

Para la caracterización de estructuras anatómicas se trabajó con dos especies adicionales. *Phragmipedium humboldtii* (Warsz.) J.T. Atwood & Dressler subsp. *humboldtii* es la otra especie del género que se encuentra en Costa Rica; en el país se conoce únicamente de la Cordillera de Talamanca cerca de la frontera con Panamá (Dressler 2003), aunque la especie se distribuye desde el sur de México hasta el oeste de Panamá. Esta especie se distingue por tener pétalos péndulos y muy largos (Dressler 2003). *Phragmipedium lindenii* (Lindl.) Dressler & N.H. Williams subsp. *wallisii* (Rchb.f.) Stein se reconoce por su labelo bien desarrollado (contrario a *P. lindenii* subsp. *lindenii*) con una quilla angosta que rodea la entrada de este. Esta especie no crece naturalmente en Costa Rica, su distribución es suramericana y se conoce únicamente de Ecuador y Perú, aunque se cree que puede estar presente también en Colombia (Dressler & Pupulin 2011). De estas dos últimas especies se utilizaron plantas cultivadas en el Jardín Botánico Lankester (JBL) de la Universidad de Costa Rica (9°50'21.58"N 83°53'17.96"W, 1370 m), ubicado en el distrito de Dulce Nombre, cantón central de Cartago, provincia de Cartago, Costa Rica. Al contar el JBL con una de las mejores colecciones de plantas en cultivo pertenecientes al género *Phragmipedium* en el país, con no menos de 11 diferentes especies en cultivo, se pudo obtener de ahí el material necesario para la ejecución del presente estudio.

3.2. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la producción de frutos de *Phragmipedium longifolium*

Para identificar los posibles efectos de la autopolinización y polinización cruzada en la producción de frutos de *P. longifolium* se aplicaron 4 tratamientos: (1) autopolinización manual, (2) polinización cruzada manual, (3) exclusión de polinizadores y (4) polinización abierta (control); no se realizó un tratamiento de emasculación para comprobar si hay apomixis, ya que el tratamiento de exclusión de polinizadores no mostró resultados que coincidieran con esta; además esta forma de reproducción no se ha reportado en la subfamilia. Cada tratamiento se aplicó mensualmente en 10 flores de diferentes inflorescencias, durante los meses de junio del 2013 hasta marzo del 2014, para un total de 100 flores por tratamiento. Para aplicar los tratamientos se escogieron únicamente flores en

antesis temprana para asegurar que éstas no hubieran sido visitadas previamente por posibles polinizadores y procurar que el polen estuviera lo suficientemente maduro y el estigma receptivo para producir frutos; la flor se terminó de abrir manualmente sin ocasionar daños en la misma para poder acceder a las masas de polen con facilidad.

La autopolinización manual consistió en remover el polen de las dos anteras de una flor con una aguja de disección y depositarlo sobre el estigma de la misma flor; a la flor receptora del polen se le removió el labelo para evitar la llegada de insectos con polen de otras flores (de la misma planta o de otras plantas). Para la polinización cruzada manual se tomó el polen de las dos anteras de una flor y se depositó sobre el estigma de una flor de otro individuo; igualmente se removieron las anteras y el labelo de la flor receptora de polen para evitar la llegada de polen de otras plantas o incluso la misma. Para el tratamiento de exclusión de polinizadores se encerraron botones florales a punto de abrir en bolsas de malla con un poro de aproximadamente 500 μm , de forma que no permitiera el ingreso de ningún potencial polinizador a la flor. Finalmente, el tratamiento control consistió en dejar flores expuestas a las condiciones naturales de polinización en el sitio de estudio. Todas las flores de estos cuatro tratamientos se marcaron individualmente para el monitoreo correspondiente con una cinta de aproximadamente 25 $\times$ 5 mm enlazada a la base del pedicelo de la flor y al raquis de la inflorescencia mediante un alambre de 1 mm de grosor. Las flores manipuladas se dejaron expuestas a las condiciones naturales del ambiente, sin ningún tipo de protección. Un mes después de marcadas las flores, se contó el número de frutos producidos y se determinó la proporción de frutos resultantes en cada tratamiento.

Dado que la producción de frutos es una variable binomial y los tratamientos son variables categóricas, los resultados obtenidos se analizaron por medio de una regresión logística binomial con variables categóricas para evaluar las posibles diferencias entre el tratamiento de polinización cruzada con los tratamientos de autopolinización, exclusión y polinización abierta (variables predictoras) en términos de número de frutos producidos (variable respuesta). En el modelo de la regresión se utilizó como referencia para las comparaciones el tratamiento de polinización cruzada manual (intercepto) debido a que se

esperaba que fuera la forma de polinización con mayor producción de frutos en la población. A partir de los estimados de los coeficientes de la regresión se calculó la oportunidad relativa (“odds ratio”, OR) y los intervalos de confianza del 95% (I.C.) de cada uno de ellos para evaluar la razón entre las probabilidades de ocurrencia de los tratamientos, es decir, cual de los tratamientos tiene mayor o menor probabilidad de producir frutos en comparación con el tratamiento de polinización cruzada. Todos los análisis se realizaron utilizando la aplicación estadística RStudio 1.0.153 (R Development Core Team 2017).

3.3. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la viabilidad de semillas de *Phragmipedium longifolium*

Para identificar los posibles efectos de la autopolinización y polinización cruzada en la viabilidad de semillas de *P. longifolium*, después de al menos 16 semanas de desarrollo, en el momento que el fruto estuviera engrosado y con las líneas de dehiscencia bien marcadas (pero antes de que se abriera), se colectaron cinco frutos diferentes para cada uno de los tratamientos de autopolinización y polinización abierta, y se obtuvo una muestra de 100 semillas de cada uno de estos frutos. Los frutos producidos por autopolinización se cosecharon de plantas en cultivo en el JBL con el fin de realizar un monitoreo constante del desarrollo del fruto. Debido a que en el JBL no se contó con suficientes individuos para realizar polinizaciones cruzadas, la viabilidad de las semillas para este tratamiento se evaluó en frutos cosechados en la Reserva Biológica Bosque de Paz, donde el monitoreo constante del desarrollo del fruto no se pudo realizar, por lo que solo se cosecharon tres frutos de los cuales se obtuvo una muestra total de 500 semillas. Ya que casi no se produjeron frutos en el tratamiento de exclusión de polinizadores, no se evaluó la viabilidad de semillas para este tratamiento.

A partir de estas muestras se realizaron tinciones con cloruro de tetrazolio (1%, pH 6-7), la cual permite identificar las semillas viables por medio de una reacción redox que tiñe de rojo los embriones metabólicamente activos (Muñoz & Jiménez 2008). Las muestras con tetrazolio se colocaron en viales y se envolvieron en papel aluminio, los viales se colocaron

en un termobañó a 30 °C por 16 h. Las semillas teñidas se colocaron en un portaobjetos, y utilizando un microscopio Leica CME a un aumento de 4x, se contabilizó el número de semillas viables y no viables en cada muestra para determinar la proporción de semillas viables entre frutos producidos por diferentes tratamientos. Los resultados obtenidos se analizaron del mismo modo que los experimentos de polinizaciones manuales, pero utilizando el número de semillas viables como variable respuesta.

3.4. Fenología y visitantes florales de *Phragmipedium longifolium*

Se colectaron datos sobre la fenología de la floración de *P. longifolium*, contando el número de flores abiertas cada mes durante el año 2015 en una muestra de 50 plantas previamente marcadas y sobre la duración de la antesis de cada flor para 15 flores marcadas. Se registraron las condiciones ambientales durante cada periodo de observación y los milímetros de precipitación para cada uno de los meses en la estación pluviométrica más cercana al sitio de estudio (Agencia de Extensión Agrícola, Zarcero).

Con el fin de identificar los posibles polinizadores de *P. longifolium* se realizaron observaciones de los visitantes de las flores por lapsos de 15 minutos cada hora, durante 13 horas continuas (de 5:00 a 18:00), una vez al mes durante los meses de octubre, noviembre y diciembre del año 2015, para un total de 585 minutos efectivos de observaciones (9 h, 45 min). Las observaciones se realizaron en grupos aleatorios de 20 a 25 flores. Se contabilizó el total de visitas y el total de individuos. Las visitas se definieron como cada una de las veces en las cuales algún insecto se posó sobre alguna de las flores en observación. Cada vez que un insecto llegó a la flor se contó como un individuo diferente, excepto en los casos que el insecto se pudiera seguir visualmente durante visitas consecutivas. Utilizando el conocimiento previo de la entomofauna del sitio, se identificó visualmente en el momento de la visita al menor nivel taxonómico confiable cada uno de los visitantes. Se capturaron los insectos que cargaban masas polínicas de *P. longifolium*, los cuales son fácilmente distinguibles de polinarios de otras orquídeas también presentes en el sitio por su forma, tamaño y color. Además de estos, se colectó un insecto que se encontró muerto en el labelo debido a su similitud con los que cargaban polinarios.

3.5. Importancia funcional de estructuras florales en *Phragmipedium longifolium*

Para identificar la posible importancia funcional de algunas estructuras florales en el éxito de producción de frutos en *P. longifolium* se aplicaron seis tratamientos que consistieron en la remoción de éstas: (1) control (flores completas), (2) pétalos, (3) sépalo dorsal, (4) estaminodio, (5) sinsépalo, y (6) sépalo dorsal y sinsépalo (Fig. 4). Cada tratamiento se aplicó a un mismo número de flores cada mes, variando mensualmente de 5 a 10 flores (de diferentes inflorescencias) por tratamiento dependiendo de la disponibilidad de flores en cada visita, durante los meses de noviembre del 2014 hasta noviembre del 2015, para un total de 100 flores por tratamiento. Se utilizaron únicamente flores que estuvieran comenzando a abrir y que conservaran los dos polinarios, esto con el fin de asegurar que no fueron previamente visitadas por algún insecto. Cada flor fue marcada individualmente. Para controlar el efecto de la presencia de otras flores abiertas en inflorescencias cercanas, que pudieran influir en la visitación de polinizadores a una flor manipulada, se removieron todas las flores abiertas que se encontraran 30 cm o menos de cada una de estas. Un mes después se contó el número de frutos producidos para cada tratamiento.

Los resultados obtenidos se analizaron del mismo modo que los experimentos de polinizaciones manuales, pero utilizando los tratamientos de remoción de estructuras como variables predictoras. En el modelo de la regresión se utilizó como referencia para las comparaciones el tratamiento control (intercepto) debido a que es la forma en que se presentan las flores normalmente. El tratamiento de remoción de pétalos se excluyó del análisis estadístico debido a que no se produjo ningún fruto.

3.6. Caracterización de tricomas glandulares en los pétalos de tres especies de *Phragmipedium*

Para caracterizar y describir los tricomas glandulares posiblemente involucrados en la atracción de polinizadores en *Phragmipedium longifolium*, *P. humboldtii* y *P. wallisii* se utilizaron plantas cultivadas en el JBL. Se prepararon muestras de un pétalo de cada una de las especies utilizando la técnica de fijación en Paraplast® descrita por Sandoval (2005) y

se realizaron cortes transversales en la parte apical, media y basal de 5 µm de grosor, con los micrótomos Leica RM2125 RTS y American Optical 820. Los cortes se tiñeron con Azul de Toluidina al 1% acidificada en solución de Ácido Bórico saturada utilizando el método indirecto descrito por Sandoval (2005). Se realizaron fotografías de los cortes con una cámara Leica ICC50 ajustada a un microscopio Leica DM500 y una cámara Sony Exwave HAD adaptada a un microscopio Carl Zeiss Axioskop.

3.7. Morfología y contenidos celulares de los tricomas glandulares en flores de *Phragmipedium longifolium*

Para estudiar los tricomas glandulares que Vogel (1990) determinó como productores de aromas en *Phragmipedium*, se cortaron segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, de pétalos, sépalos, labelo y estaminodio de una flor de *P. longifolium*. Para detectar la presencia de lípidos, los segmentos frescos se colocaron en dicromato potásico (0,2 g/l) por 10 min y se secaron posteriormente. Luego se colocaron en etanol al 70% por 2 min, se tiñeron con Sudán IV por 5 min y nuevamente en etanol al 70% por 2 min. Se lavaron con agua por 2 min y se contrastaron con hematoxilina de Harris por 2 min y se lavaron nuevamente con agua por 2 min (Sandoval 2005).

Para la detección de polisacáridos en las mismas estructuras florales, los segmentos frescos se oxidaron en una solución de ácido peryódico al 5%, se enjuagaron con H₂O destilada y se colocaron en el reactivo de Schiff de Coleman por 15 min. Se enjuagaron en agua a 60 °C por 5 min, se contrastaron con hematoxilina de Harris por 2 min y se lavaron con agua por 5 min (Feder & O'Brien 1968, Vieira *et al.* 2007, Kowalkowska *et al.* 2017). Los segmentos teñidos se fotografiaron con una cámara Leica DMC29000 adaptada a un estereoscopio Leica Z16 APO a diferentes aumentos.

Se obtuvieron imágenes por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) de partes de pétalos, sépalos, labelo y estaminodio de dos flores de *P. longifolium*, con el objetivo de determinar en cuales de estas partes se estos encuentran los tricomas glandulares que podrían funcionar como atrayentes químicos o visuales para polinizadores.

Para esto se fijaron segmentos de dichas partes florales en una solución de glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en un buffer de fosfato de sodio 0.1 M, con un pH de 7.4 (Karnovsky 1965). Se lavaron en el buffer de fosfato de sodio y se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% en el buffer de fosfato de sodio. Se lavaron con H₂O destilada y se deshidrataron con un gradiente de etanol de 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 95% por 15 min cada uno y dos de Etanol Absoluto por 20 min cada uno. Se realizaron cuatro lavados con alcohol terbutílico y las muestras se secaron por sublimación con un sublimador Eiko ID-2. El material se montó en bases de aluminio y se cubrieron con 20 nm de platino utilizando un cobertor iónico Eiko IB-5. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-570. Se prestó especial atención a la detección de tricomas semejantes a los observados por Vogel (1990: 145).

Todas las imágenes obtenidas a partir de los cortes, segmentos y demás material generado en el proyecto se depositaron en las colecciones físicas y digitales del Jardín Botánico Lankester.

IV. RESULTADOS

4.1. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la producción de frutos en *Phragmipedium longifolium*

Al realizar polinizaciones manuales para evaluar el efecto de la autopolinización y la polinización cruzada en la reproducción de *P. longifolium* se obtuvo que un 80% de las flores autopolinizadas produjeron frutos, contra un 69% de las flores polinizadas de forma cruzada. En el tratamiento de exclusión de polinizadores solamente un 1% de las flores produjo fruto y en el tratamiento de polinización abierta (control) produjeron frutos un 12% de las flores (Fig. 5). A partir de estas polinizaciones manuales se encontró además que la producción de frutos por polinización abierta ($p < 0.001$) y por exclusión de polinizadores ($p < 0.001$) difieren significativamente de la producción de frutos por polinización cruzada (Cuadro 1). Entre la autopolinización y la polinización cruzada no se detectó una diferencia significativa en la producción de frutos ($p > 0.05$; cuadro 1).

Al calcular la OR, no se pudo determinar la relación en la probabilidad de producir frutos entre la polinización cruzada manual y la autopolinización manual ya que el I.C. 95% incluye el valor nulo ($OR=1$) y es muy amplio, lo que indica una baja precisión del OR (Cuadro 1). En comparación con la polinización cruzada manual, la polinización abierta tiene una menor probabilidad de producir frutos ($OR= 0.0613$). Esta probabilidad es aún menor para la exclusión de polinizadores ($OR= 0.045$) (Cuadro 1).

4.2. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la viabilidad de semillas de *Phragmipedium longifolium*

Con las tinciones utilizando tetrazolio se obtuvo una viabilidad del 51.6% para las semillas producidas por autopolinización, un 29.6% de viabilidad para las semillas producidas por polinización cruzada y un 52% de viabilidad para las semillas del tratamiento de polinización abierta (control) (Fig. 6). Las viabilidades de las semillas producidas por autopolinización y por polinización abierta difieren significativamente ($p < 0.001$ para ambos tratamientos) de la viabilidad de las semillas producidas por

polinización cruzada (Cuadro 2). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el tamaño de muestra (el número de frutos) es muy bajo, y estos resultados podrían cambiar si éste se aumenta. Por lo tanto, estas diferencias no pueden considerarse como estrictamente significativas. Por medio de la OR se determinó que en comparación con el tratamiento de polinización cruzada, tanto la autopolinización (OR= 2.5356), como la polinización abierta (OR= 2.5766) tienen mayor probabilidad de producir semillas viables. Sin embargo, los I.C. 95% indican una baja precisión del OR.

4.3. Fenología y visitantes florales de *Phragmipedium longifolium*

Los datos indican que la población estudiada de *P. longifolium* permanece en floración durante todo el año, pero con fluctuaciones. La cantidad de flores abiertas presenta un máximo durante el mes de julio y disminuye durante los meses de octubre a febrero (Fig. 7). En promedio la antesis de esta especie tiene una duración de 19 ± 2 días mientras la flor no sea polinizada. Cada vástago produce una sola inflorescencia en la cual se encuentra normalmente una sola flor abierta a la vez, aunque ocasionalmente pueden encontrarse hasta dos. Sin embargo, un mismo individuo puede tener más de un vástago floreciendo de forma simultánea.

De las 13 horas totales de observación diaria, fue únicamente en el período comprendido entre las 9:00 y las 16:00 que se contabilizaron insectos visitando las flores, para un total de 57 visitas. El periodo comprendido entre las 10:00 y las 13:00 fue el de mayor actividad, con un total de 41 visitas (72% del total). Fue durante este periodo en el cual se observaron visitas de insectos cargando polinarios de *P. longifolium* y de insectos que cayeron dentro del labelo y removieron los polinarios al salir de la flor (Fig. 8).

Se registraron visitas de insectos de tres diferentes órdenes (Diptera, Hymenoptera y Hemiptera), pero las más frecuentes fueron de dípteros. También fue común observar insectos de la familia Curculionidae (orden Coleoptera), que no se contaron como visitantes ya que se encontraban permanentes en algunas de las flores como depredadores fitófagos. Del orden Hymenoptera solamente se documentaron visitas de una abeja de la especie *Apis mellifera*, una especie de la familia Vespidae y otras dos morfoespecies de avispa no

identificadas. Del orden Hemiptera solamente se observó una visita de una especie de heteróptero. Del orden Diptera se observaron dos morfoespecies de moscas identificadas de la subsección Calyptratae, dos morfoespecies de *Allograpta* (Syrphidae) y al menos seis morfoespecies de moscas pequeñas del suborden Brachycera (Cuadro 3).

De todos los insectos que visitaron las flores de *P. longifolium*, los únicos que se observaron removiendo o cargando polinarios fueron los de una de las morfoespecies del género *Allograpta*. En total se observaron cinco individuos de esta morfoespecie, todas identificadas como hembras, las cuales se distinguen de los machos por tener los ojos claramente separados (Thompson *et al.* 2010). De los cinco individuos observados de esta morfoespecie, dos cargaban polinarios de *P. longifolium* en el momento de la visita a la flor (individuos 1 y 2), pero ninguno de ellos se observó entrando al labelo y se observaron caminando sobre los pétalos, el sépalo dorsal y el sinsépalo antes de ser capturados; El individuo 1 ovipositó sobre la superficie abaxial del labelo (Fig. 9A). Otros dos individuos (individuos 3 y 4) removieron un polinario cada uno al momento de salir, el individuo 3 se observó desde que cayó dentro del labelo y el individuo 4 se observó cuando ya había caído en el labelo (Figs. 9B y 9D). Al salir se posaron brevemente en la base del pétalo, donde fueron capturados. En la flor donde se observó el individuo 4 se encontraron huevos sobre la superficie abaxial del labelo, por lo que es probable que la misma mosca los pusiera antes de caer en el labelo (Fig. 10). El individuo 5 visitó múltiples veces la misma flor, se posó sobre los pétalos y el sépalo dorsal sin mostrar interés evidente por algo en particular, ni preferencia por permanecer más en una estructura que en otra; caminó por el sinsépalo y el sépalo dorsal, pero finalmente se alejó volando sin caer dentro del labelo y se capturó en ese momento; una vez capturado, se observó al individuo ovipositando (Fig. 9C).

Se observó otra morfoespecie de *Allograpta* que se consideró diferente debido a que es ligeramente más grande que los individuos que lograron remover el polinario y por las diferencias en el patrón de coloración. De esta otra morfoespecie se observó un único individuo hembra visitando la flor. Horas después de registrada la visita el individuo se encontró muerto dentro del saco del labelo, sin polinarios adheridos.

Se observó que las moscas *Allograpta* se aproximan a las flores en un vuelo errático, sin

volar directamente hacia la flor sino en movimientos exploratorios, y sin dirigirse directamente hacia algún estímulo evidente. Al estar cerca de varias flores pasaron de una a otra en movimientos aparentemente exploratorios. Al posarse en las flores lo hicieron indiferentemente sobre los sépalos, pétalos o el labelo, aunque lo más común fue observarlas caminando sobre los pétalos y el sépalo dorsal. La mosca que se observó caminando por los bordes de la abertura principal del labelo, incluyendo los pliegues, resbaló y cayó en el interior del saco, pero no intentó volar hacia las manchas en los pliegues del labelo. Las moscas observadas dentro del labelo intentaron repetidas veces salir por la misma abertura principal; sin embargo, la superficie interna del labelo que rodea la abertura principal es resbalosa, lo que impidió su escape por esa vía. Algunas moscas permanecieron más de dos horas intentando escapar por la abertura principal sin lograrlo. Después de múltiples intentos fallidos de escape, las moscas eventualmente caminaron hacia el túnel del labelo que se forma entre la mitad basal del saco (donde hay tricomas visibles) y los pliegues del labelo (Fig. 1). Sobre la superficie adaxial del túnel hay tricomas, sobre los cuales la mosca logró caminar y subir hacia la base del labelo, donde logró escapar por los orificios de salida que se forman entre la columna y la base del labelo. Por encima de esos mismos orificios se localizan las anteras, y es por esto que al escapar de la flor por ahí, a la mosca se le adhirieron las masas polínicas dorsalmente entre el escuto y el escutelo (Figs. 9B y 9D).

4.4. Importancia funcional de estructuras florales en *Phragmipedium longifolium*

Ninguna de las flores a las que se le removió los pétalos produjo frutos. Al remover los tres sépalos (sépalo dorsal y sinsépalo) apenas un 1% de las flores produjo fruto. Cuando se removió únicamente el sinsépalo un 2% de las flores produjo fruto, pero al remover únicamente el sépalo dorsal la producción de frutos fue del 5%. La remoción del estaminodio resultó en un 2% de producción de frutos. El 10% de las flores en el tratamiento control produjo frutos (Fig. 11). En comparación con el tratamiento control, la producción de frutos de los tratamientos de remoción del sinsépalo, estaminodio y sépalos difieren significativamente ($p < 0.05$ para los tres tratamientos; Cuadro 4). La remoción del

sépalo dorsal no difiere significativamente del control en términos de producción de frutos ($p > 0.05$; Cuadro 4).

Al calcular la OR, se determinó que en comparación con la no remoción de estructuras (tratamiento control), la probabilidad de producir frutos es menor al remover el sinsépalo (OR= 0.1837), el estaminodio (OR= 0.1837), y los sépalos (OR= 0.0909). Para el tratamiento de remoción del sépalo dorsal no se pudo determinar como es esta relación debido a que el intervalo de confianza incluye el valor nulo (OR= 1).

4.5. Caracterización de tricomas glandulares en los pétalos de tres especies de *Phragmipedium*

Dado que los experimentos de remoción de estructuras del perianto mostraron que remover los pétalos de *P. longifolium* produce la mayor disminución en la producción de frutos (y por lo tanto, probablemente también en la atracción de polinizadores), se realizaron tinciones para detectar tricomas glandulares que pudieran estar involucrados en la atracción de polinizadores por medio de señales olfativas (Fig. 12).

Se encontraron tres diferentes tipos de tricomas glandulares cuyas paredes celulares tiñeron con Azul de Toluidina; se denominaron TG1, TG2 y TG3. En comparación con las células epidérmicas, las células de los tricomas glandulares frecuentemente tienen núcleos más grandes que pueden ocupar hasta más de la mitad del volumen celular. La morfología y contenidos celulares de los TG1 y TG2 sugieren que estos tienen la función de osmóforos. Los TG1 están formados por 2–6 células apiladas. Las células suelen ser cilíndricas y de tamaño similar excepto la célula apical, que es más larga y termina en un ápice agudo. Los TG2 tienen 5–8 células apiladas; la célula apical se distingue de las demás por ser ligeramente más pequeña y redondeada en el ápice. Finalmente, los TG3 tienen formas variables pero siempre son unicelulares (Fig. 13).

4.6. Morfología y contenidos celulares de los tricomas glandulares en flores de *Phragmipedium longifolium*

Se encontraron TG1 en todas las estructuras observadas. Los TG2 se observaron

únicamente en el labelo, en las partes apical y media del pétalo, y en la parte basal del sinsépalo. Los TG3 solamente se encontraron en el ápice del pétalo.

En el estaminodio los TG1 se encuentran en los márgenes, presentan una coloración morado oscuro por lo que se pueden detectar a simple vista (Fig. 14A). En estos tricomas se detectó carbohidratos (Fig. 14B) y lípidos (Fig. 14C). En las imágenes obtenidas por MEB se pudo observar que estos tricomas pueden estar formados por 3–6 células (Fig. 14D).

En el labelo los TG1 y los TG2 se encuentran en la superficie abaxial, incluyendo los pliegues con manchas verdes. En la superficie adaxial, donde se forma el túnel de salida para los polinizadores, hacia la base del labelo, hay tricomas alargados formados por 4–5 células apiladas (Fig. 15A). A diferencia de los tricomas glandulares observados en otras estructuras, estos tricomas no contienen carbohidratos (Fig. 15B), ni lípidos (Fig. 15C), y se caracterizan por tener las células de la base engrosadas. La mayoría de estos tricomas se erigen en orientación hacia la base del labelo, muchos de ellos además se pueden doblar formando ganchos sin orientación fija (Fig. 15D). Las imágenes de MEB no muestran diferenciación morfológica entre las células que forman las manchas verdes en los pliegues y el resto de células epidérmicas del labelo (Figs. 16A y 16D), además las tinciones resultaron negativas para carbohidratos (Fig. 16B) y lípidos contenidos en estas células (Fig. 16C).

En el pétalo los TG1 y TG2 se localizaron en la superficie adaxial (Figs. 17A, 17E, 18A, 19A y 19D), mientras que los TG3 se encontraron mayormente en la superficie abaxial de la región apical (Figs. 17B y 17F). Los TG1 y TG2 contenían lípidos (Figs. 17C, 18C y 19C), y carbohidratos (Figs. 17D, 18B y 19B) localizados principalmente en sus células apicales. En los TG3 solo se detectó lípidos (Fig. 17C). En la superficie abaxial del pétalo se forma un surco paralelo a la vena media (Fig. 12 y 18D), sin embargo no se detectaron lípidos ni carbohidratos en este tejido. Este surco también se puede observar en los cortes transversales de los pétalos de *P. humboldtii* y *P. wallisii* (Fig. 12).

En el sépalo dorsal los TG1 se observaron en ambas superficies (Figs. 20A, 20B, 21 A, 21D, 21E y 22A). Solamente se detectaron lípidos en las células apicales de estas estructuras (Figs. 20C, 21C y 22C), no se detectaron carbohidratos (Figs. 20D, 21B y 22B).

Se encontraron estomas en la superficie abaxial del ápice y la base (Figs. 20E, 20F y 22D).

En el sinsépalo los tricomas se observaron únicamente en la superficie adaxial (Figs. 23A, 24A, 24D, 25A); en los TG1 se detectaron lípidos (Figs. 23C, 24C y 25C), pero no carbohidratos (Figs. 23B y 24B). En los TG2 se detectaron lípidos (Figs. 23C, 24C y 25C) y carbohidratos (Fig. 25B). En la superficie abaxial del ápice y la base se observaron estomas (Fig. 23D y 25D).

V. DISCUSIÓN

5.1. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la producción de frutos en *Phragmipedium longifolium*

A partir de los tratamientos de polinización se comprobó que *P. longifolium* es autocompatible, pero que requiere de un vector biótico para transferir el polen al estigma. Aunque no se encontraron diferencias significativas en la producción de frutos entre la autopolinización y la polinización cruzada, si se observó un porcentaje más alto de frutos producidos por autopolinización. Algunos autores han argumentado que la polinización por engaño hace que la autopolinización sea menos probable, ya que el polinizador se aleja para evitar caer nuevamente en el engaño en forma inmediata o porque al no recibir recompensa pierde interés en las flores (Muñoz *et al.* 2010, Walsh & Michaels 2017). Sin embargo, otros sugieren que la autocompatibilidad puede ser resultado de la adaptación de las plantas a su síndrome de polinización por engaño, ya que al aceptar su propio polen la orquídea aumenta las probabilidades de ser fecundada aunque esto pueda afectar la variabilidad genética de la población (Liu *et al.* 2006).

Frecuentemente se ha observado que especies de orquídeas favorecen el exocruzamiento como forma de reproducción. Un estudio genético poblacional sugiere que en *P. longifolium* de Costa Rica el exocruzamiento podría estarse dando mayoritariamente basado en que la diversidad genética de las poblaciones fue mayor a la esperada (Muñoz *et al.* 2010). Sin embargo, algunas especies de orquídeas también pueden favorecer la autopolinización para su reproducción, en este estudio se muestra una tendencia a favorecer esta forma de reproducción en *P. longifolium*. La autopolinización puede ser favorablemente seleccionada como una estrategia para asegurar la reproducción en poblaciones que se han reducido por un efecto de cuello de botella, en el que los individuos que permanecen comienzan a autopolinizarse para mantener la reproducción y eventualmente recuperar la población (Lande & Schamske 1985, Schoen *et al.* 1996).

Otro factor que podría favorecer la autopolinización es que en plantas colonizadoras se puede dar una selección hacia esta forma de reproducción por un efecto fundador de la

especie, que permite a las plantas pioneras un aseguramiento reproductivo en estos hábitats (Lande & Schemske 1985, González-Díaz & Ackerman 1988). En Costa Rica se han identificado poblaciones de *P. longifolium* de varios individuos pero relativamente aisladas entre si, ya que colonizan sitios perturbados como paredones producidos por deslizamientos o cortes de carretera (Muñoz & Warner 2007). Es probable que este efecto fundador se esté dando en las poblaciones de *P. longifolium*, en las que a pesar de que es infrecuente encontrar inflorescencias con más de una flor, un mismo individuo puede tener diferentes inflorescencias floreciendo de forma simultánea, lo que permitiría la geitonogamia en estas poblaciones aisladas.

En las orquídeas polinizadas por engaño es común encontrar frecuencias de visitación bajas que se traducen en bajas tasas de polinización (Parra-Tabla & Vargas 2007, Bernhardt & Edens-Meier 2010). *Phragmipedium longifolium* no es la excepción, pues el tratamiento de polinización abierta resultó en que solamente el 12% de las flores desarrollan frutos. Sin embargo, estas bajas tasas de producción de frutos se reportan a menudo en orquídeas que requieren un vector para su polinización, independientemente del mecanismo que empleen para atraer a sus polinizadores (Zimmerman & Aide 1989, Ackerman & Montalvo 1990, Primack & Hall 1990).

5.2. Efecto de la autopolinización y polinización cruzada en la viabilidad de semillas de *Phragmipedium longifolium*

Al evaluar la viabilidad de las semillas producidas por autopolinización, polinización cruzada y polinización abierta se encontró que el número de semillas viables fue significativamente menor en los frutos producidos a partir de flores polinizadas de forma cruzada en comparación con los otros tratamientos. Esto es contrario a lo esperado, ya que se cree que la autopolinización puede afectar negativamente tanto la producción de frutos como la calidad de las semillas (Tremblay *et al.* 2005, Jersáková *et al.* 2006). Por otro lado, Pansarin *et al.* (2008) sugiere que una alta viabilidad de semillas producidas por autopolinización es esperada en un sistema de polinización por engaño ya que deben compensar la baja producción de frutos. Sin embargo, la menor viabilidad de las semillas

producidas por polinización cruzada es inesperada ya que para *P. longifolium* se han reportado hasta un 45% de semillas viables para frutos producidos por exocruzamiento en condiciones de cultivo (Muñoz & Jiménez 2008).

Al evaluar la viabilidad de las semillas es importante tomar en cuenta el tiempo en que se cosechan los frutos. Los de *P. longifolium* tardan aproximadamente 16 semanas en alcanzar la madurez (Muñoz & Jiménez 2008). La viabilidad de estas semillas pudo verse afectada por el tiempo de cosecha de los frutos, las visitas al sitio de muestreo fueron durante cuatro días al mes, lo que dificultaba un monitoreo constante del desarrollo de los mismos. Es posible que aunque los frutos cosechados estuvieran engrosados y con las líneas de dehiscencia marcadas, sus semillas aún no hubieran completado la madurez. Desafortunadamente, la cantidad de individuos disponibles para el tratamiento de polinización cruzada y la cantidad de frutos producidos fueron limitantes para obtener un tamaño de muestra apropiado para el tratamiento.

Las diferencias encontradas entre los tratamientos de autopolinización y polinización abierta en comparación con el tratamiento de polinización cruzada sugieren que esta especie practica la endogamia frecuentemente. En plantas que crecen en poblaciones aisladas y que pueden reproducirse por autopolinización y polinización cruzada se pueden mantener altas frecuencias de autopolinización durante varias generaciones, esto puede eventualmente provocar una purga de la carga genética, reduciendo así la depresión endogámica por medio de la eliminación de genes deletéreos recesivos en la población (Lande & Schamske 1985, Smithson 2006).

5.3. Fenología y visitantes florales de *Phragmipedium longifolium*

A pesar de que el mayor número de visitas a las flores de *P. longifolium* se registró para el grupo Brachycera se debe tomar en cuenta que este es un grupo taxonómico muy grande, con muchas familias y especies de dípteros. Todos los visitantes incluidos dentro de Brachycera eran muy pequeños, lo que dificultó poder identificarlos a un menor nivel taxonómico sin haberlos capturado. Sin embargo, por este mismo motivo se puede descartar que fueran potenciales polinizadores de *P. longifolium*, ya que cada uno de ellos

tenía el tamaño aproximado de un polinio de la orquídea; esto hace altamente improbable que estos insectos fueran capaces de cargar el peso de los mismos. Además, al ser insectos pequeños, podrían fácilmente salir por la abertura principal del labelo o por los orificios de salida sin siquiera hacer contacto con las anteras. No obstante, no se puede descartar que estos insectos estén siendo atraídos a la flor por el mismo mecanismo que utiliza la orquídea para atraer a los polinizadores efectivos.

Otro grupo de insectos del que se registraron varias visitas fueron las moscas calípteras (Caliptratae). Aunque estas tienen tamaños más similares a las moscas sírfidas que se observaron removiendo polinarios, ningún individuo ingresó al labelo y la mayoría de visitas fueron breves. Es posible que estas moscas sean atraídas a las flores por los aromas que estas emiten, pero que el mecanismo de atracción no sea tan eficiente como para conseguir que ingresen al labelo y remuevan o transfieran las masas polínicas.

Los polinizadores de *P. longifolium* pertenecen al género *Allograpta*. Las larvas de este, como las de otros géneros dentro de la familia Syrphidae, se alimentan de áfidos (Thompson *et al.* 2000). Debido a esto, las hembras adultas buscan poner sus huevos cerca de colonias de áfidos para las larvas puedan acceder al alimento (Thompson *et al.* 2010, Hanson & Nishida 2016). La evidencia sugiere que *P. longifolium* atrae a sus polinizadores mediante engaño, posiblemente imitando señales que las hembras de moscas sírfidas siguen para detectar las colonias de insectos en el suborden Sternorrhyncha.

El mecanismo de polinización encontrado en la población de *P. longifolium* estudiada asemeja el mecanismo empleado por otras especies de Cyripedioideae. En los trópicos asiáticos, *Paphiopedilum barbigerrum* T.Tang & F.T. Wang es igualmente polinizada por moscas sírfidas de los géneros *Allograpta* y *Episyrphus* utilizando un mecanismo de atracción por engaño de sitio de oviposición (Shi *et al.* 2009). Esto muestra una posible evolución convergente del mecanismo de polinización entre los dos géneros. Según Shi y colaboradores (2009), en *P. barbigerrum* las señales visuales son más importantes para la atracción de polinizadores que las aromáticas ya que no pudieron extraer aromas de las flores mediante análisis de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas. En *P. longifolium* se observó que aunque es posible que el efecto visual de la flor sea importante

en la atracción de polinizadores, las señales aromáticas podrían tener una mayor importancia. Aunque no se ha estudiado la composición química del aroma producido por las flores de *P. longifolium*, fácilmente se puede percibir un aroma úrico, lo cual puede indicar la presencia de compuestos nitrogenados y altos contenidos de ácidos. Este tipo de aromas ya se ha encontrado en flores de la familia Apocynaceae que también utilizan un mecanismo de engaño por sitio de oviposición para atraer a sus polinizadores (Jürgens *et al.* 2006, Urru *et al.* 2011).

En *Paphiopedilum barbigerum*, cuando los polinizadores se aproximan al estaminodio volando, sus alas golpean los lóbulos laterales del labelo, lo que los desestabiliza y provoca que caigan hacia atrás dentro del labelo (Shi *et al.* 2009). En otras especies de *Paphiopedilum* se han observado comportamientos similares que provocan que el polinizador resbale dentro del labelo después de intentar caminar o posarse sobre el estaminodio (Bäzinger *et al.* 2005). En algunas especies de *Cypripedium* polinizadas por himenópteros, el polinizador ingresa dentro del labelo caminando sobre los bordes de la abertura principal, los cuales no son resbalosos; en otras especies como *C. guttatum* el estaminodio actúa como pivote para provocar que el insecto caiga dentro del labelo resbalando hacia adelante y no hacia atrás a diferencia de lo que sucede en *Paphiopedilum* (Bäzinger *et al.* 2005). En *P. longifolium* se observó que los polinizadores se posan sobre el borde de la abertura principal del labelo y al intentar caminar por el margen resbalan hacia adelante y quedan atrapados dentro del labelo; no se observó a ninguna de las moscas *Allograpta* intentar aproximarse hacia el estaminodio aunque es recomendable realizar más observaciones del comportamiento de estos insectos para entender en detalle el mecanismo que las hace caer dentro del labelo.

Fuera de Cyripedioideae, se ha encontrado un mecanismo similar de atracción de polinizadores en *Epipactis veratrifolia* Don., que también es polinizado por moscas sírfidas (Ivri & Dafni 1977, Stökl *et al.* 2011). Al igual que en *P. longifolium*, las hembras atraídas a la flor son engañadas y ponen sus huevos sobre las flores, donde las larvas difícilmente podrán encontrar alimento para desarrollarse (Ivri & Dafni 1977, Stökl *et al.* 2011). Sin embargo, *Epipactis veratrifolia*, a diferencia de *P. longifolium* también es capaz de atraer a

machos de moscas sírfidas que llegan a la flor a alimentarse de azúcares secretados en el labelo y en busca de hembras con las cuales copular (Ivri & Dafni 1977). Stökl y colaboradores (2011) encontraron además que *E. veratrifolia* emite compuestos químicos que imitan las feromonas de alarma de áfidos, las cuales atraen e inducen el comportamiento de oviposición en hembras de moscas sírfidas; estudiar la composición química de los aromas emitidos por *P. longifolium* y compararla con lo encontrado en *E. veratrifolia* permitirá entender mejor los factores que atraen a las hembras de *Allograpta* y que inducen en ellas la oviposición. Aparte de *Epipactis*, no se encontró en la literatura otros casos de orquídeas fuera de la subfamilia Cypripedioideae que presente un mecanismo de atracción similar o que sea polinizada mediante engaño por moscas sírfidas.

Es importante tener en consideración que de las cerca de 4300 especies descritas de áfidos que existen en el mundo, pocas de estas se encuentran en el neotrópico y aún menos son las especies nativas, ya que la mayoría han sido introducidas como plagas en cultivos (Hanson & Nishida 2016). Por lo tanto, es probable que los hábitos alimenticios de las larvas de los sírfidos neotropicales no estén restringidos específicamente a áfidos, sino a otros insectos también pertenecientes al surborden Sternorrhyncha (Thompson *et al.* 2010, Hanson & Nishida 2016). Estudiar a futuro la historia natural de estos dípteros permitirá entender mejor el sistema de atracción de polinizadores en *Phragmipedium*.

En este estudio se reporta por primera vez moscas sírfidas del género *Allograpta* como polinizadores de *Phragmipedium*. Al mismo tiempo es el primer estudio que documenta la oviposición de las hembras polinizadoras sobre las flores de *Phragmipedium*, siendo esto evidencia a favor de que la especie es polinizada por engaño mediante imitación de sitio de oviposición. Existen observaciones casuales de oviposición en tres especies de *Paphiopedilum* por parte de sírfidos (Atwood 1985, Bänzinger 2002, Jun *et al.* 2009).

Utilizar la polinización por engaño como estrategia reproductiva puede traer tanto ventajas como desventajas para la planta. Por una parte, se ha probado que, aunque la polinización por engaño puede disminuir la visitación floral (lo que puede a su vez disminuir el porcentaje de flores polinizadas), puede favorecer la probabilidad de exocruzamiento debido a la tendencia de los insectos a alejarse de las flores una vez que

logran escapar de ellas (Bernhardt & Edens-Meier 2010, Walsh & Michaels 2017). Una desventaja de utilizar la atracción por engaño de sitio de oviposición del modo que lo hacen estas especies de la subfamilia Cypridioideae es que a largo plazo, si la proporción de huevos puestos por la población de moscas sírfidas sobre las flores es mayor en comparación con la proporción de huevos puestos en sitios óptimos, la reproducción del polinizador y por ende la de la planta se pueden ver comprometidos, ya que los huevos que los sírfidos pongan sobre la flor no podrán desarrollarse al no contar con fuentes alimenticias, lo que implica que esos individuos no dejarán descendientes que sean potenciales polinizadores para la orquídea (Borba & Semir 2001). El efecto real que pueda tener el engaño sobre la población de *Allograpta* sp. y consecuentemente de *P. longifolium* es algo que solamente se podrá medir con estudios poblacionales a largo plazo

Pasar mucho tiempo en las flores es desventajoso para las moscas; posiblemente la primera vez que estas caen dentro de la trampa les tome más tiempo salir del labelo. En el presente estudio se registraron moscas *Allograpta* dentro del labelo por más de dos horas; no obstante podrían utilizar una primera experiencia como aprendizaje de forma que al caer una segunda vez lograrían escapar más rápido del labelo. Se debe tener en consideración que las moscas sírfidas son insectos de vida corta. En una especie de *Allograpta* se ha reportado que pueden vivir cerca de 12 días como adultos (Arcaya *et al.* 2017), en este corto periodo de tiempo intentarán alimentarse y reproducirse tan eficientemente como sea posible. Es por esto que los mecanismos de polinización por engaño deben ser muy refinados, ya que el insecto invierte muchos recursos en discriminar señales engañosas que puedan afectar su reproducción (Urru *et al.* 2011).

La población estudiada de *P. longifolium* se mantiene en floración a lo largo del año. Se ha sugerido que esto, junto con una alta longevidad de las flores antes de ser polinizadas, la prolongada viabilidad del polen removido y la extendida receptividad del estigma son condiciones que se dan en Orchidaceae para promover la polinización ante la limitación de polinizadores potencialmente causada por el engaño como estrategia reproductiva (Cozzolino & Widmer 2005). Aunque la viabilidad del polen y la duración de la receptividad estigmática no se evaluaron en esta investigación, estas condiciones parecen

ser consistentes con lo observado en *P. longifolium* donde las visitas de los polinizadores son poco frecuentes.

5.4. Importancia funcional de estructuras florales en *Phragmipedium longifolium*

La remoción de estructuras florales afecta significativamente la reproducción de *P. longifolium*. La pérdida de estructuras florales en plantas puede provocar (entre otras cosas no asociadas directamente con la atracción de polinizadores) que las señales que estas emiten para atraer a sus polinizadores, ya sean visuales o químicas, se vean interrumpidas al perder la fuente que las produce. También es posible que ante el daño mecánico que recibe, la orquídea emita señales químicas distintas que sus polinizadores pueden detectar y provoquen que las visitas disminuyan (Malo *et al.* 2001, Tan *et al.* 2002, Cuartas-Domínguez & Medel 2010).

Aunque es probable que la afectación en la visitación de sírfidos involucre también un efecto visual, la historia natural de estos insectos parece indicar que las señales aromáticas son las más importantes para atraerlos por engaño a las flores de *Phragmipedium*. Estudios sobre las señales que atraen a las moscas sírfidas a sus sitios de oviposición se han hecho en *Episyrphus balteatus*, una especie utilizada para control biológico de plagas. Leroy y colaboradores (2011) encontraron que estas señales suelen ser químicas en forma de compuestos volátiles que el díptero es capaz de percibir. Estos compuestos pueden ser emitidos por colonias de bacterias que crecen en excretas de áfidos que tienen altos contenidos de azúcares ('honeydews') y que los sírfidos son capaces de asociar con la presencia de áfidos. Por otro lado, Verheggen y colaboradores (2008) encontraron que tanto las feromonas de alerta emitidas por los áfidos como los compuestos volátiles liberados por las plantas ante daños en sus tejidos, pueden atraer a hembras de *E. balteatus* e inducir las a ovipositar, incluso cuando se les expone a estos compuestos en ausencia de áfidos. También se han hecho experimentos en trampas artificiales que apoyan la importancia de las señales químicas para la atracción de moscas sírfidas de los géneros *Melanostoma* y *Melagyna* ya que las visitas a las trampas, principalmente de hembras, aumentan al agregar aromas florales (Laubertie *et al.* 2006).

La mayoría de los tratamientos de remoción de piezas florales en *P. longifolium* difirieron significativamente del tratamiento control (no remoción) en cuanto a la proporción de flores que produjeron fruto. Además, se observó que remover los pétalos afecta su reproducción al punto que ninguna de flores sometidas a este tratamiento produjo frutos. Remover algunas estructuras florales podría estar afectando las señales visuales y químicas que utiliza la orquídea para atraer a los polinizadores. Observaciones casuales en otras especies de *Phragmipedium* evidenciaron la secreción de sustancias de estos tricomas en todas las estructuras florales (observación personal, 7 de noviembre de 2017, Ecuador) pero hacen falta futuros estudios para documentar y caracterizar químicamente estas secreciones. Los resultados anatómicos respaldan la importancia de las estructuras florales en la atracción química de polinizadores ya que en todas se detectaron tricomas glandulares, cuya posible función e importancia se discutirá más adelante.

5.5. Caracterización de tricomas glandulares en los pétalos de tres especies de *Phragmipedium*

En los pétalos de las tres especies estudiadas de *Phragmipedium* se encontraron los tricomas glandulares que Vogel (1990) había detectado antes para *P. longifolium*, acá denominados TG2. Adicionalmente se encontraron otros dos tipos de tricomas glandulares. Aunque para *P. longifolium* no se encontró TG3 en los cortes transversales fijados en Paraplast®, si se pudieron detectar en las imágenes de MEB del ápice del pétalo. Es posible que al ser los TG3 unicelulares, estos se degradaran durante el proceso de fijación. Con esto como ejemplo, se puede destacar la importancia de combinar diferentes técnicas de preparación al realizar estudios a nivel anatómico. Vogel (1990) en sus estudios también encontró que en las células de los TG2 (llamados por él “pelos productores de aromas”) los núcleos suelen ser más grandes que en las células epiteliales relacionado a un aumento de la eucromatina (típico de los tejidos glandulares) y a un aumento de la actividad metabólica del tejido; esto se pudo observar también en los tres tipos de tricomas glandulares presentes en los pétalos de las tres especies de *Phragmipedium*.

Dadas las similitudes morfológicas y anatómicas entre las tres especies de

Phragmipedium, se puede esperar que los polinizadores de las otras dos especies sean también moscas sírfidas atraídas engañosamente mediante imitación de sitios de oviposición. McCook (1989) observó una mosca del género *Syrphus* (también Syrphidae) removiendo polinarios en *P. humboldtii*. Sin embargo, estudios *in situ* adicionales son necesarios para confirmar si la oviposición ocurre en estas y otras especies del género.

5.6. Morfología y contenidos celulares de los tricomas glandulares en flores de *Phragmipedium longifolium*

Se detectaron diferencias en los contenidos celulares de los diferentes tipos de tricomas glandulares en diferentes partes de las flores de *P. longifolium*. Los TG1 siempre contenían lípidos, pero únicamente los localizados en los pétalos y en el estaminodio dieron positivo para la presencia de carbohidratos. En todos los TG2 se detectaron tanto lípidos como carbohidratos independientemente de su localización en la flor. Mientras que los TG3 solamente tiñeron positivo para la presencia de lípidos. Es común encontrar tricomas con diferentes contenidos celulares dependiendo de la función que estos cumplan, esto implica que no necesariamente los tres tipos de tricomas glandulares emiten compuestos volátiles que participen en la atracción de polinizadores (Pridgeon & Stern 1983, Stpiczynka 1993, 2001). En el canal abaxial que se observó en los pétalos de las tres especies de *Phragmipedium* no se detectaron ni lípidos ni carbohidratos; además, los insectos visitantes no mostraron interés particular en este canal, por lo que es probable que no sea de importancia para la atracción de los polinizadores.

Contrario a lo reportado por Vogel (1990), los tricomas del estaminodio al igual que los del resto de la flor si podrían estar emitiendo fragancias. La presencia de lípidos y carbohidratos en estos tricomas se pueden ligar a la secreción de compuestos volátiles ya que las fragancias florales pueden estar formadas por terpenos, aminos y otras sustancias lipídicas como se ha evidenciado en los estudios sobre osmóforos hechos por Vogel (1990), y otros posteriores (Stern *et al.* 1986, Pridgeon & Stern 1983, Pridgeon *et al.* 1999). Del mismo modo, la presencia de carbohidratos acumulados se asocia a los tejidos de reserva y secreción de sustancias, ya que muchos de estos son necesarios para la síntesis de los

compuestos secretados (Vogel 1990). Debido a que los resultados anatómicos y ecológicos en este estudio no respaldan la secreción de néctar u otro tipo de recompensa, es probable que lo que se esté secretando en estos tricomas glandulares sean compuestos volátiles y que estos participen en la atracción de polinizadores, al menos en *Phragmipedium longifolium*.

VI. CONCLUSIONES

Por primera vez se reportan moscas sírfidas del género *Allograpta* como polinizadoras de *Phragmipedium*, y se evidencia la efectividad del engaño que ofrece la planta al punto que provoca la oviposición del díptero en un sitio que no es óptimo para el desarrollo de sus larvas. Estudiar la biología reproductiva de *P. longifolium* en una población equivalente a una *in situ* permite entender que la reproducción de la orquídea es completamente dependiente de la presencia de *Allograpta* sp., por lo que esfuerzos de conservación integrales son los que deben aplicarse para mantener esta y posiblemente otras poblaciones de *Phragmipedium* en Costa Rica. Estudios para caracterizar los compuestos volátiles en las flores de *Phragmipedium longifolium* son necesarios para confirmar la relación entre estas plantas y sus polinizadores y la evolución de este síndrome de polinización. No obstante, esta investigación provee evidencia que apoya la hipótesis de la importancia de las señales químicas para la atracción de polinizadores en *P. longifolium*, al mismo tiempo que presenta evidencia anatómica de que el síndrome se podría extrapolar al menos a otras dos especies del género, *P. humboldtii* y *P. wallisii*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, J. D. & Montalvo, A. M. (1990). Short and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology*, 71(1), 263–272.
- Ackerman, J. D., Rodríguez-Robles, J. A. & Meléndez, E. J. (1994). A meager nectar offering by an epiphytic orchid is better than nothing. *Biotropica*, 26(1), 44–49.
- Aguilar, J. M. R. B. V., Pansarin, L. M., Ackerman, J. D., Pansarin, E. R. (2011). Biotic versus abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae). *Plant Species Biology*, 27(1), 86–95.
- Arcaya, E., Pérez-Bañón, C., Mengual, X., Zubcoff-Vallejo, J. J. & Rojo, S. (2017). Life table and predation rates of the syrphid fly *Allograpta exotica*, a control agent of the cowpea aphid *Aphis craccivora*. *Biological Control*, 115, 74–84.
- Atwood, J. T. (1985). Pollination of *Paphiopedilum rothschildianum*: brood-site imitation. *National Geographic Research*, 1, 247–254.
- Ayasse, M., Schiestl, F. P., Paulus, H. F., Löfstedt, C., Hanson, B., Ibarra, F. & Francke, W. (2000). Evolution of reproductive strategies in the sexually deceptive orchid *Ophrys sphegodes*: how does flower-specific variation of odor signals influence reproductive success? *Evolution*, 54(6), 1995–2006.
- Azevedo, M. T. A., Borba, E. L., Semir, J. & Solferini, V. N. (2007). High genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153, 33–40.
- Bänziger, H. (1996). The mesmerizing wart: the pollination strategy of epiphytic lady slipper orchid *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121, 59–90.
- Bänziger, H. (2002). Smart alecs and dumb flies: natural pollination of some wild lady slipper orchids (*Paphiopedilum* spp., Orchidaceae). En J. Clark, W. M. Elliott, G. Tingley, & J. Biro (Eds), *Proceedings of the 16th World Orchid Conference Vancouver* (pp. 165–169). Vancouver: Vancouver Orchid Society.

- Bänziger, H., Sun, H. & Luo, Y-B. (2005). Pollination of a slippery lady slipper orchid in south-west China: *Cypripedium guttatum* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 148, 251–264.
- Bernhardt, P. & Edens-Meier, R. (2010). What we think we know vs. what we need to know about orchid pollination and conservation: *Cypripedium* L. as a model lineage. *The Botanical Review*, 76(2), 204–219.
- Blanco, M. A. & Barboza, G. (2005). Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae) by fungus gnats. *Annals of Botany*, 95, 763–772.
- Borba, E. L. & Semir, J. (1998). Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian Campos Rupestres. *Lindleyana*, 13(3), 203–218.
- Borba, E. L. & Semir, J. (2001). Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany*, 88, 75–88.
- Brantjes, N. B. M. (1981). Ant, bee and fly pollination in *Epipactis palustris* (L.) Crantz (Orchidaceae). *Acta Botanica Neerlandica*, 30(1/2), 59–68.
- Breitkopf, H., Onstein, R. E., Cafasso, D., Schlüter, P. M. & Cozzolino, S. (2014). Multiple shifts to different pollinators fuelled rapid diversification in sexually deceptive *Ophrys* orchids. *New Phytologist*, 207(2), 377–389.
- Burns-Balogh, P. & Hesse, M. (1986). Pollen morphology of the cypripedioid orchids. *Plant Systematics and Evolution*, 158, 165–182.
- Case, M. A. & Bradford, Z. R. (2009). Enhancing the trap of lady's slippers: a new technique for discovering pollinators yields new data from *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160, 1–10.
- Catling, P. M. (2015). *Osmia* species (Megachilidae) pollinate *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae) and *Packera paupercula* (Asteraceae): a localized case of Batesian mimicry? *The Canadian Field-Naturalist*, 129, 38–44.

- Chochai, A. (2014). Phylogenetics, genome size evolution and population genetics of slipper orchids in the subfamily Cyripedioideae (Orchidaceae). PhD thesis, Birkbeck, University of London.
- Cox, A. V., Pridgeon, A., Albert, V. A. & Chase, M. W. (1997). Phylogenetics of the slipper orchids (Cyripedioideae, Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 208, 197–223.
- Cozzolino, S. & Widmer, A. (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution*, 20(9), 487–494.
- Cribb, P. & Purver, C. (2017). *Slipper orchids of the Tropical Americas*. Kota Kinabalu, Laguna Niguel, Kew: Natural History Publications, The Orchid Digest Corporation, Kew Royal Botanical Gardens.
- Cuartas-Domínguez, M. & Mendel, R. (2010). Pollinator-mediated selection and experimental manipulation of the flower phenotype in *Chloraea bletioides*. *Functional Ecology*, 24(6), 1219–1227.
- Culley, T. M. & Klooster, M. R. (2007). The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution and ecology in Angiosperms. *The Botanical Review*, 73(1), 1–30.
- Davies, K. L., & Turner, M. P. (2004a). Pseudopollen in *Dendrobium unicum* Seidenf. (Orchidaceae): reward or deception? *Annals of Botany*, 94, 129–132.
- Davies, K. L., & Turner, M. P. (2004b). Pseudopollen in *Eria* Lindl. Section *Mycaranthes* Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 94, 707–715.
- Davies, K. L., Winters, C. & Turner, M. P. (2000). Pseudopollen: its structure and development in *Maxillaria* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 85, 887–895.
- Davies, K. L., Roberts, D. L. & Turner, M. P. (2002). Pseudopollen and food-hair diversity in *Polystachya* Hook. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 90, 477–484.
- Davies, K. L., Stpiczynska, M. & Kaminska, M. (2013). Dual deceit in pseudopollen-producing *Maxillaria* s.s. (Orchidaceae: Maxillariinae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173, 744–763.

- Davies, K. L., Turner, M. P. & Gregg, A. (2003). Lipoidal labellar secretions in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 91, 439–446.
- Dodson, C. (1966). Studies in orchid pollination: *Cypripedium*, *Phragmipedium* and allied genera. *American Orchid Society Bulletin*, 35, 125–128.
- Dressler, R. L. (1968). Pollination by euglossine bees. *Evolution*, 22(1), 202–210.
- Dressler, R. L. (1981). *The orchids. Natural history and classification*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Dressler, R. L. (2003). Orchidaceae. En Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C., & Zamora, N. (Eds.), *Manual de Plantas de Costa Rica. Volumen III. Monocotiledóneas* (Orchidaceae – Zingiberaceae). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 93.
- Dressler, R. L. & Pupulin, F. (2011). *Phragmipedium* section *Phragmipedium*. The long-petaled Tropical American lady's-slipper orchids. *Orchids*, 80(10), 626–631.
- Eckert, C. G. (2000). Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology*, 81(2), 532–542.
- Edens-Meier, R., Luo, Y. B., Pemberton, R. & Bernhardt, P. (2014). Pollination and floral evolution of slipper orchids (subfamily Cypripedioideae). En Edens-Meier, R. & Bernhardt, P. (Eds.), *Darwin's Orchids: Then and Now* (265–287). Chicago: The University of Chicago Press.
- Ellis & Johnson (2010). Floral mimicry enhances pollen export: the evolution of pollination by sexual deceit outside of the Orchidaceae. *The American Naturalist*, 176, E143–E151.
- Endara, L., Grimaldi, D. A. & Roy, B. A. (2010). Lord of the flies: pollination of *Dracula* orchids. *Lankesteriana*, 10(1), 1–11.
- Fan, X.-L., Barrett, S.C. H., Lin, H., Chen, L.-L., Zhou, X. & Gao, J.-Y. (2012). Rain pollination provides reproductive assurance in a deceptive orchid. *Annals of Botany*, 110(5), 953–958.
- Feder, N. & O'Brien, T. P. (1968). Plant Microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55(1), 123–142.

- Franken, E. P. Pansarin, L. M. & Pansarin, E. R. (2016). Osmophore diversity in the *Catasetum cristatum* alliance (Orchidaceae: Catasetinae). *Lankesteriana*, 16(3), 317–327.
- Galizia, C. G., Kunze, J., Gumbert, A., Borg-Karlson, A.-K., Sachse, S., Markl, C. & Menzel, R. (2005). Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system. *Behavioral Ecology*, 16(1), 159–168.
- Gaskett, A. C., Winnick, C. G. & Herberstein, M. E. (2008). Orchid sexual deceit provokes ejaculation. *The American Naturalist*, 171(6), E206–E212.
- González-Díaz, N. & Ackerman, J. D. (1988). Pollination, fruit set, and seed production in the orchid, *Oeceoclades maculata*. *Lindleyana*, 3(3), 150–155.
- Gravendeel, B., Smithson, A., Slik, F. J. W. & Schuitman, A. (2004). Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 359, 1523–1535.
- Gumbert, A. & Kunze, J. (2001). Colour similarity to rewarding model plants affects pollination in a food deceptive orchid, *Orchis boryi*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72, 419–433.
- Hanson, P. E. & Nishida, K. (2016). *Insects and other arthropods of Tropical America*. New York: Cornell University Press.
- Hetherington-Rauth, M. C. & Ramírez, S. R. (2016). Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of Botany*, 118(1): 135–148.
- Ivri, Y. & Dafni, A. (1977). The pollination ecology of *Epipactis consimilis* Don (Orchidaceae) in Israel. *New Phytologist*, 79, 173–177.
- Jesáková, J., Johnson, S. D. & Kindlmann, P. (2006). Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews*, 81, 219–235.
- Johnson, S. D., Alexandersson, R. & Linder, H. P. (2003a). Experimental and phylogenetic evidence for floral mimicry in a guild of fly-pollinated plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80(2), 289–304.

- Johnson, S. D., Peter, C. I., Nilsson, A. & Ågren, J. (2003b). Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology*, 84(11), 2919–2927.
- Jun, S., Yibo, L., Jin, C., Fazhi, S. & Zhenhai, D. (2009). The pollination of *Paphiopedilum hirsutissimum*. *The Orchid Review*, 117, 78–81.
- Jürgens, A., Dötterl, S. & Meve, U. (2006). The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae–Asclepiadoideae–Ceropegieae). *New Phytologist*, 172, 452–468.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 27, 137.
- Karremans, A. P., Pupulin, F., Grimaldi, D., Beentjes, K. K., Butôt, R., Fazzi, G. E., Kaspers, K., Kruizinga, J., Roessingh, P., Smets, E. F. & Gravendeel, B. (2015). Pollination of *Specklinia* by nectar-feeding *Drosophila*: the first reported case of a deceptive syndrome employing aggregation pheromones in Orchidaceae. *Annals of Botany*, 116(3), 437–455.
- Koopowitz, H. (2008). The tropical slipper orchids: *Paphiopedilum* and *Phragmipedium* species and hybrids. Oregon: Timber Press.
- Kowalkowska, A. K., Turzyński, S., Kozieradzka-Kiszkurno, M. & Wiśniewska, N. (2017). Floral structure of two species of *Bulbophyllum* section *Cirrhopetalum* Lindl.: *B. weberi* Ames and *B. cumingii* (Lindl.) Rchb.f. (Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae). *Protoplasma*, 254(3), 1431–1449.
- Kunze, J. & Gumbert, A. (2001). The combined effect of color and odor on flower choice behavior of bumble bees in flower mimicry systems. *Behavioral Ecology*, 12(4), 447–456.
- Lande, R. & Schemske, D. W. (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*, 39(1), 24–40.
- Laubertie, E. A., Wratten, S. D. & Sedcole, J. R. (2006). The role of odour and visual cues in the pan-trap catching of hoverflies (Diptera: Syrphidae). *Annals of Applied Botany*, 148, 173–178.

- Leroy, P. D., Sabri, A., Heuskin, S., Thonart, P., Lognay, G., Verheggen, F. J., Francis, F., Brostaux, Y., Felton, G. W. & Haubruge, E. (2011). Microorganism from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies. *Nature Communications*, 2:348. doi: 10.1038/ncomms1347.
- Li, J.-H., Liu, Z.-J., Salazar, G. A., Bernhardt, P., Perner, H., Tomohisa, Y., Jin, X.-H., Chung, S.-W. & Luo, Y. B. (2011). Molecular phylogeny of *Cypripedium* (Orchidaceae: Cypripedioideae) inferred from multiple nuclear and chloroplast regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 308–320.
- Li, P., Luo, Y., Bernhardt, P., Kou, Y. & Perner, H. (2008). Pollination of *Cypripedium plectrochilum* (Orchidaceae) by *Lasioglossum* spp. (Halictidae): the roles of generalist attractants versus restrictive floral architecture. *Plant Biology*, 10, 220–230.
- Li, P., Luo, Y. B., Bernhardt, P., Yang, X. Q. & Kou, Y. (2006). Deceptive pollination of the Lady's Slipper *Cypripedium tibeticum* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 262, 53–63.
- Liu, K.-W., Liu, Z.-J., Huang, L. Q., Li, L.-Q., Chen, L.-J. & Tang, G.-D. (2006). Self-fertilization strategy in an orchid. *Nature*, 441, 945.
- Malo, J. E., Leirana-Alcocer, J. & Parra-Tabla, V. (2001). Population fragmentation, florivory, and the effects of flower morphology alterations on the pollination success of *Myrmecophila tibicinis* (Orchidaceae). *Biotropica*, 33(3), 529–534.
- Martel, C., Cairampoma, L., Stauffer, F. W. & Ayasse, M. (2016). *Telipogon peruvianus* (Orchidaceae) flowers elicit pre-mating behavior in *Eudejeania* (Tachinidae) males for pollination. *PloS ONE*, 11(11), e0165896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165896>.
- Martins, D. J. & Johnson, S. D. (2007). Hawkmoth pollination of aerangoids orchids in Kenya, with special reference to nectar sugar concentration gradients in the floral spurs. *American Journal of Botany*, 94(4), 650–659.
- McCook, L.M. (1989). Systematics of *Phragmipedium* (Cypripedioideae, Orchidaceae), Ph.D. dissertation. Ithaca, New York: Cornell University.

- Muñoz, M. & Jiménez, V. (2008). Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. *Lankesteriana*, 8(2), 23–31.
- Muñoz, M. & Warner, J. (2007). Distribución de poblaciones y descripción del hábitat de *Phragmipedium* en Costa Rica. *Lankesteriana*, 7(1–2), 66–70.
- Muñoz, M., Warner, J. & Albertazzi, M. (2010). Genetic diversity analysis of the endangered slipper orchid *Phragmipedium longifolium* in Costa Rica. *Plant Systematics and Evolution*, 290, 217–223.
- Pansarin, L. M., Moraes Castro, M. & Sazima, M. (2009). Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159, 408–415.
- Pansarin, L. M., Pansarin, E. R. & Sazima, M. (2008). Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. *Plant Biology*, 10, 650–659.
- Parra-Tabla, V. & Vargas, C. F. (2007). Flower synchrony and floral display size affect pollination success in a deceit-pollinated tropical orchid. *Acta Oecologica*, 32, 26–35.
- Pauw, A. (2006). Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil-collecting bee (*Rediviva peringueyi*, Melittidae) in a guild of South African orchids (Coryciinae). *American Journal of Botany*, 93(6), 917–926.
- Pemberton, R. W. (2011). Pollination studies in phragmipediums: flower fly (Syrphidae) pollination and mechanical selfpollination (autogamy) in *Phragmipedium* species (Cyrtipedioideae). *Orchids*, 80, 364–367.
- Pemberton, R. W. (2013). Pollination of slipper orchids (Cyrtipedioideae): a review. *Lankesteriana*, 13, 65–73.
- Peter, C. I. & Johnson, S. D. (2008). Mimics and magnets: the importance of color and ecological facilitation in floral deception. *Ecology*, 89(6), 1583–1595.
- Primack, R. B. & Hall, P. (1990). Cost of reproduction in the Pink Lady's slipper orchid: a four-year experimental study. *The American Naturalist*, 136(5), 638–656.

- Policha, T., Davis, A., Barnadas, M., Dentinger, B. T. M., Raguso, R. A. & Roy, B. A. (2016). Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking *Dracula* orchids using realistic three-dimensional printed flowers. *New Phytologist*, 210(3), 1058–1071.
- Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. (1999). *Genera Orchidacearum: Vol. 1. Apostasioideae, Cypripedioideae*. New York: Oxford University Press.
- Pridgeon, A. M. & Stern, W. L. (1983). Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 70(8), 1233–1243.
- R Development Core Team. (2017). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. www.R-project.org/. Accesado el 5 de enero 2017.
- Ren, Z.-X., Li, D.-Z., Bernhardt, P. & Wang, H. (2011). Flowers of *Cypripedium fargesii* (Orchidaceae) fool flat-footed flies (Platypezidae) by faking fungus-infected foliage. *PNAS*, 108(18), 7478–7480.
- Salzmann, C. C., Cozzolino, S. & Schiestl, F. P. (2007). Floral scent in food-deceptive orchids: species specificity and sources of variability. *Plant Biology*, 9, 720–729.
- Sandoval, E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. México: Universidad Autónoma de México.
- Schiestl, F.P. (2010). Pollination: Sexual mimicry abounds. *Current Biology*, 20, R1020–R1022.
- Schiestl, F. P., Peakall, R., Mant, J. G., Ibarra, F., Schulz, C., Franke, S. & Francke, W. (2003). The chemistry of sexual deception in an orchid-wasp pollination system. *Science*, 302, 437–438.
- Schoen, D. J., Morgan, M. T. & Bataillon, T. (1996). How does self-pollination evolve? Inferences from floral ecology and molecular genetic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 351, 1281–1290.

- Shi, J., Cheng, J., Luo, D., Shangguan, F. Z. & Luo Y. B. (2007). Pollination syndromes predict brood-site deceptive pollination by female hoverflies in *Paphiopedilum dianthum* (Orchidaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 45, 551–560.
- Shi, J., Luo, Y-B., Bernhardt, P., Ran, J-C., Liu, Z-J. & Zhou, Q. (2009). Pollination by deceit in *Paphiopedilum barbigerrum* (Orchidaceae): a staminode exploits the innate colour preferences of hoverflies (Syrphidae). *Plant Biology*, 11, 17–28.
- Smithson, A. (2006). Pollinator limitation and inbreeding depression in orchid species with and without nectar rewards. *New Phytologist*, 169, 419–430.
- Stern, W. L., Curry, K. J. & Whitten, W. M. (1986). Staining fragrance glands in orchid flowers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 113(3), 288–297.
- Stökl, J., Brodmann, J., Dafni, A., Ayasse, M. & Hansson, B. S. (2011). Smells like aphids: orchid flowers mimic aphid alarm pheromones to attract hoverflies for pollination. *Proceedings of the Royal Society B*, 278, 1216–1222.
- Stpiczynska, M. (1993). Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 62(1-2), 5–9.
- Stpiczynska, M. (2001). Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 70(2), 91–96.
- Stpiczynska, M., Davies, K. L. & Gregg, D. A. (2004). Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 93(1), 87–95.
- Sugiura, N., Goubara, M., Kitamura, K. & Inoue, K. (2002). Bumblebee pollination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae); a possible case of floral mimicry of *Pedicularis schistostegia* (Orobanchaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 235, 189–195.
- Tan, K.-H. & Nishida, R. (2000). Mutual reproductive benefits between a wild orchid, *Bulbophyllum patens*, and *Bactrocera* fruit flies via floral synomone. *Journal of Chemical Ecology*, 26(2), 533–546.

- Tan, K.-H., Nishida, R. & Toong, Y.-C. (2002). Floral synomone of a wild orchid *Bulbophyllum cheiri*, lures *Bactrocera* fruit flies for pollination. *Journal of Chemical Ecology*, 28(6), 1161–1172.
- Thompson, F. C., Thompson, B. J. & Fairman, J. E. (2000). Only in Costa Rica: new Neotropical flower flies (Diptera: Syrphidae). *Studia dipterologica*, 7, 33–43.
- Thompson, F. C., Rotheray, G. E. & Zumbado, M. A. (2010). Syrphidae (flower flies). En Brown, B. V., Borkent, A., Cumming, J. M., Wood, D. M., Woodley, N. E. & Zumbado, M. A. (Eds.), *Manual of Central American Diptera. Volume 2.* (763–792). Ontario: National Research Council of Canada.
- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K. & Calvo, R. N. (2005). Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 84, 1–54.
- Urru, I., Stensmyr, M. C. & Hansson, B. S. (2011). Pollination by brood-site deception. *Phytochemistry*, 72, 1655–1666.
- van der Cingel, N.A. (1995). *An atlas of orchid pollination: European orchids*. Rotterdam: A. A. Balkema.
- van der Cingel, N.A. (2001). *An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia*. Rotterdam: A. A. Balkema.
- van der Pijl, L. & Dodson, C. H. (1966). *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral Gables, Florida: The Fairchild Tropical Garden and the University of Miami Press.
- Vereecken, N. J., Wilson, C. A., Hötling, S., Schulz, S., Banketov, S. A. & Mardulyn, P. (2012). Pre-adaptations and the evolution of pollination by sexual deception: Cope's rule of specialization revisited. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 4786–4794.
- Verheggen, F. J., Arnaud, L., Bartam, S., Goby, M. & Haubruge, E. (2008). Aphid and plant volatiles induce oviposition in an aphidophagous hoverfly. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 301–307.
- Vieira, M. F., Andrade, M. R. S., Bittencourt Jr, N. S. & Carvalho-Okano, R. M. (2007). Flowering phenology, nectary structure and breeding system in *Corymborkis flava*

- (Spiranthoideae: Tropidieae), a terrestrial orchid from a Neotropical forest. *Australian Journal of Botany*, 55, 635–642.
- Vogel, S. (1990). *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Washington, U.S.A.: Smithsonian Institution Libraries, and the National Science Foundation.
- Walsh, R. P. & Michaels H. J. (2017). When it pays to cheat: Examining how generalized food deception increases male and female fitness in a terrestrial orchid. *PloS ONE*, 12(1), e0171286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171286>
- Wiemer, A. P., Moré, M., Benitez-Vieyra, S., Cocucci, A. A., Raguso, R. A. & Sérsic, A. N. (2008). A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology*, 11, 506–514.
- Zimmerman, J. K. & Aide, T. M. (1989). Patterns of fruit production in a Neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany*, 76(1), 67–73.

Cuadro 1. Resultados de la regresión logística binomial para evaluar el efecto de diferentes tratamientos de polinización sobre la producción de frutos en *Phragmipedium longifolium* ($P < 0.001 = **$).

Coefficiente	Estimado	Error	Valor Z	P > (Z)	OR	Intervalo 95% de confianza
Cruzada (intercepto)	0.8001	0.2162	3.700	0.0002**	2.2258	1.4712 – 3.4453
Autopolinización	0.5862	0.3305	1.773	0.0762	1.7971	0.9462 – 3.4751
Abierta	-2.7925	0.3761	-7.425	1.13^{-13**}	0.0613	0.0282 – 0.1241
Exclusión	-5.3952	1.0280	-5.248	1.54^{-07**}	0.0045	0.0003 – 0.0219

Cuadro 2. Resultados de la regresión logística binomial para evaluar el efecto de diferentes tratamientos sobre la viabilidad de semillas de *Phragmipedium longifolium* ($P < 0.001 = **$).

Coefficiente	Estimado	Error	Valor Z	P > (Z)	OR	Intervalo 95% de confianza
Cruzada (intercepto)	-0.8664	0.0980	-8.844	$< 2^{-16**}$	0.4205	0.3461 – 0.5083
Autopolinización	0.9304	0.1327	7.012	2.34^{-12**}	2.5356	1.9576 – 3.2938
Abierta	0.9465	0.1327	7.132	9.88^{-13**}	2.5766	1.9892 – 3.3472

Cuadro 3. Insectos visitantes de flores de *Phragmipedium longifolium* observados desde las 5:00 hasta las 18:00 hrs por periodos de 15 minutos cada hora, una vez al mes durante tres meses (para un total de 9 horas y 45 minutos de observación). Se destacan en un recuadro los visitantes que removieron polinario.

Visitante	Número de morfoespecies	Individuos observados	Individuos que removieron polinario	Total de visitas
<i>Allograpta</i> sp. 1 (Diptera)	1	5	4	16
<i>Allograpta</i> sp. 2 (Diptera)	1	1	0	3
Calypttratae (Diptera)	2	10	0	10
Brachycera varios (Diptera)	6	25	0	25
<i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera)	1	1	0	1
Vespidae (Hymenoptera)	1	2	0	2
Avispas (Hymenoptera)	2	2	0	2
Heteróptero (Hemiptera)	1	1	0	1
Total	14	47	4	57

Cuadro 4. Resultados de la regresión logística binomial para evaluar el efecto de diferentes tratamientos de remoción de estructuras florales sobre la producción de frutos en *Phragmipedium longifolium*. ($P < 0.05 = *$; $P < 0.001 = **$).

Coefficiente	Estimado	Error	Valor Z	P > (Z)	OR	Intervalo 95% de confianza
Control (intercepto)	-2.1972	0.3333	-6.592	$4.35^{-11} **$	0.1111	0.0542 – 0.2030
Sépalo dorsal	-0.7472	0.5671	-1.318	0.1877	0.4737	0.1429 – 1.3873
Sinsépalo	-1.6946	0.7882	-2.150	0.0316*	0.1837	0.0277 – 0.7204
Estaminodio	-1.6946	0.7882	-2.150	0.0316*	0.1837	0.0277 – 0.7204
Sépalos	-2.3979	1.0589	-2.265	0.0235*	0.0909	0.0049 – 0.4885



Figura 1. Flor de *Phragmipedium longifolium* (izquierda) y corte longitudinal de la flor sin los pétalos ni sépalos (derecha), mostrando la columna (c), abertura principal del saco (a), los pliegues del labelo (p), el orificio de salida (o) y el túnel del labelo (t).

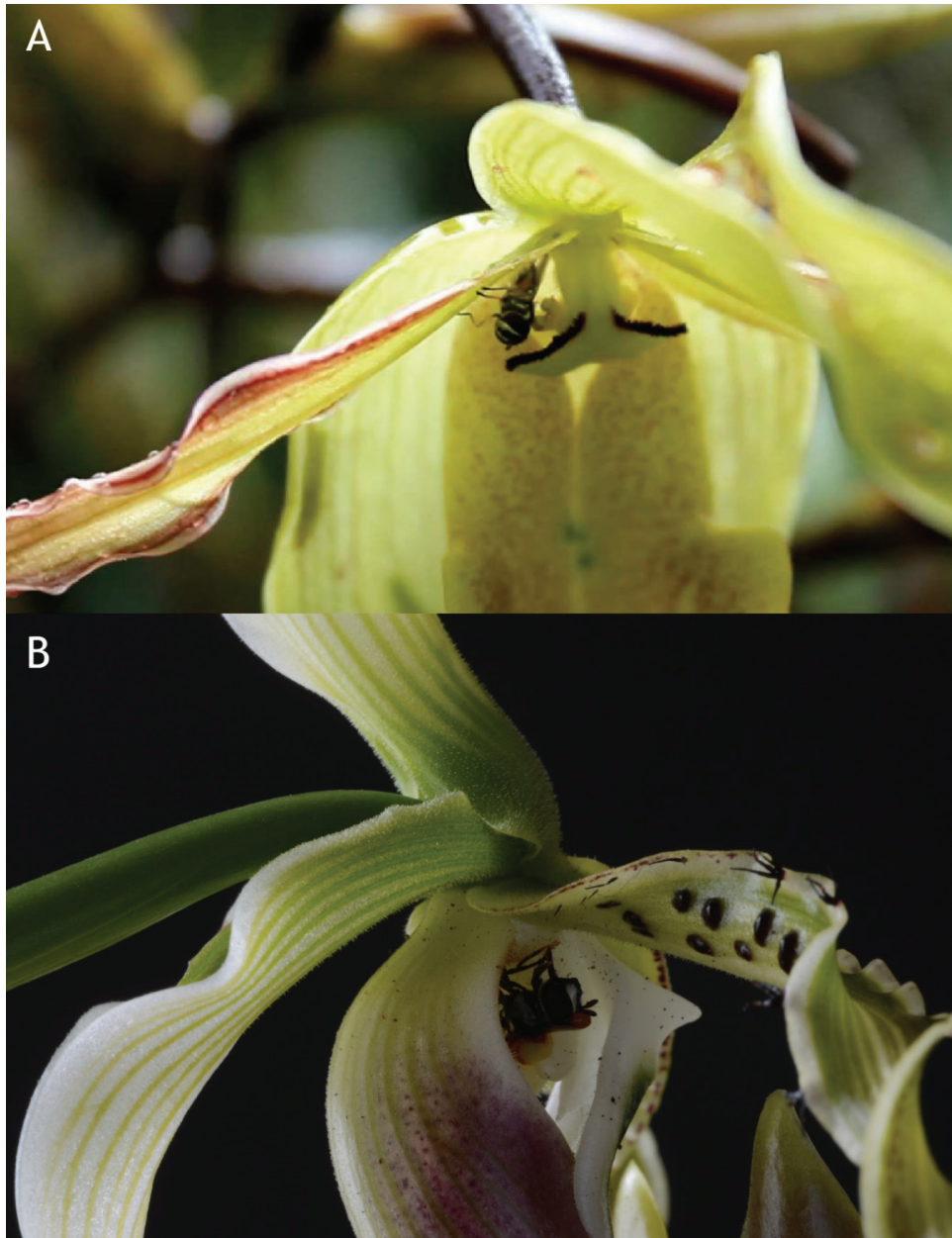


Figura 2. Moscas de la familia Syrphidae en los orificios de salida de flores de Cyripedioideae. A. Hembra de *Allogragta* sp. saliendo del labelo de *Phragmipedium longifolium* en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica; B. Mosca de la familia Syrphidae atrapada en el orificio de salida de una flor de *Paphiopedilum dianthum* cultivada en el Jardín Botánico Lankester; el individuo murió dentro de la flor sin conseguir escapar.



Figura 3. Flor de *Phragmipedium longifolium* mostrando sus diferentes estructuras.



Figura 4. Flores de *Phragmipedium longifolium* mostrando los tratamientos de remoción de estructuras florales para determinar su efecto en la producción de frutos: A. control (flor completa); B. pétalos removidos; C. sépalo dorsal removido; D. estaminodio removido; E. sinsépalo removido; F. todos los sépalos removidos.

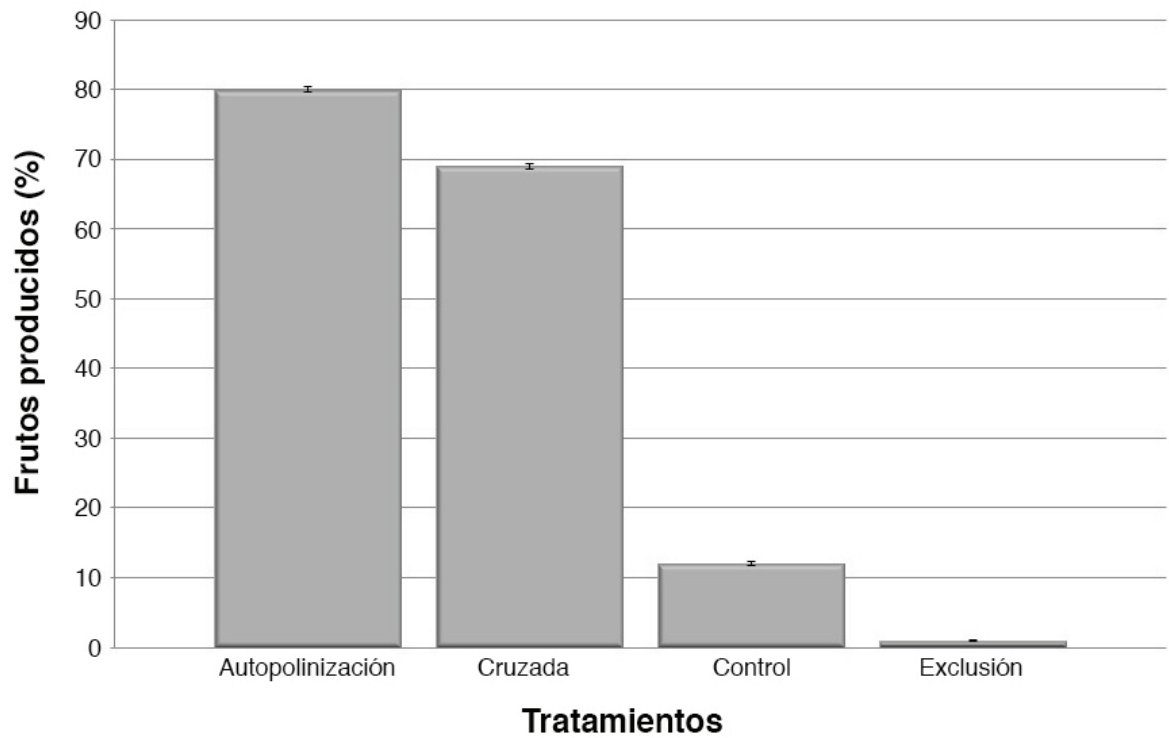


Figura 5. Porcentaje de frutos producidos en los tratamientos de autopolinización, polinización cruzada, polinización abierta (control) y exclusión de polinizadores en una población de *Phragmipedium longifolium* en Costa Rica (n= 100 flores por tratamiento). Las líneas verticales representan la desviación estándar.

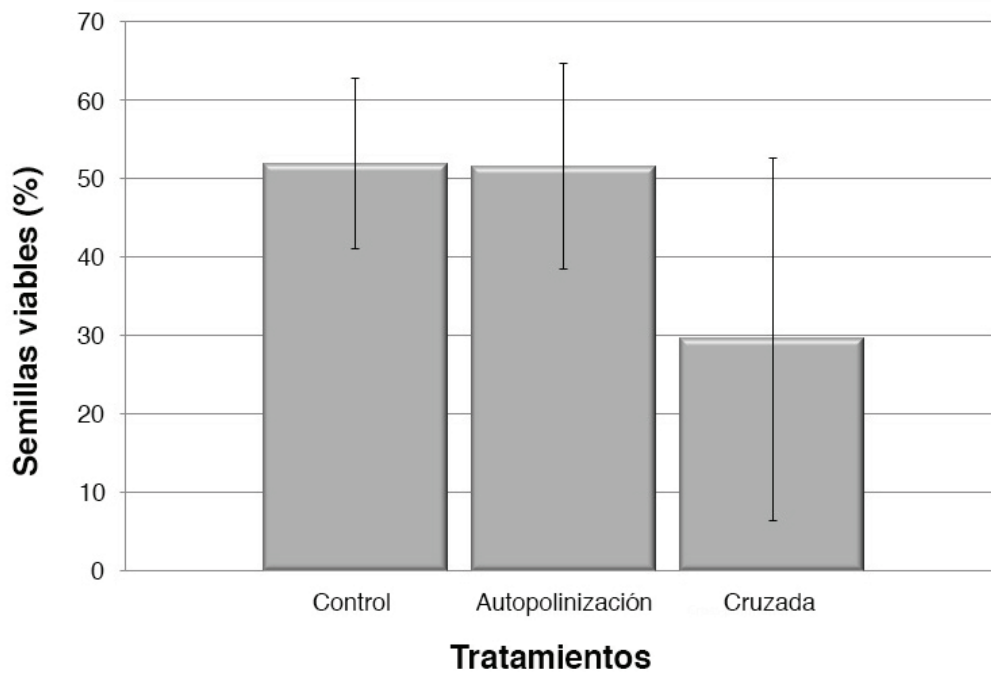


Figura 6. Porcentaje de semillas viables producidas para los tratamientos de autopolinización, polinización cruzada y polinización abierta (control) en una población de *Phragmipedium longifolium* en Costa Rica (n= 500 semillas provenientes de 5 frutos para los tratamientos de polinización abierta y autopolinización; 500 semillas provenientes de 3 frutos para el tratamiento de polinización cruzada). Las líneas verticales representan la desviación estándar.

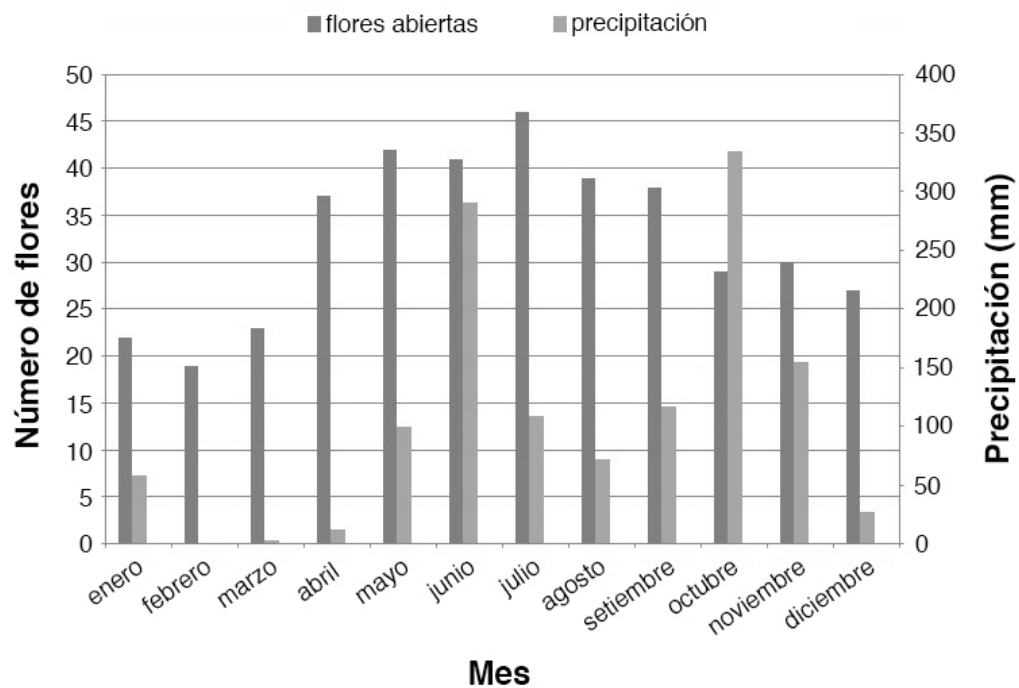


Figura 7. Fenología de *Phragmipedium longifolium* en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica, durante el año 2015. Las barras oscuras indican el número de flores observadas para cada uno de los meses del año 2015, las barras claras indican la precipitación registrada en la estación pluviométrica más cercana a la población (Agencia de Extensión Agrícola, Zarcero) para el mismo año (n= 50 plantas).

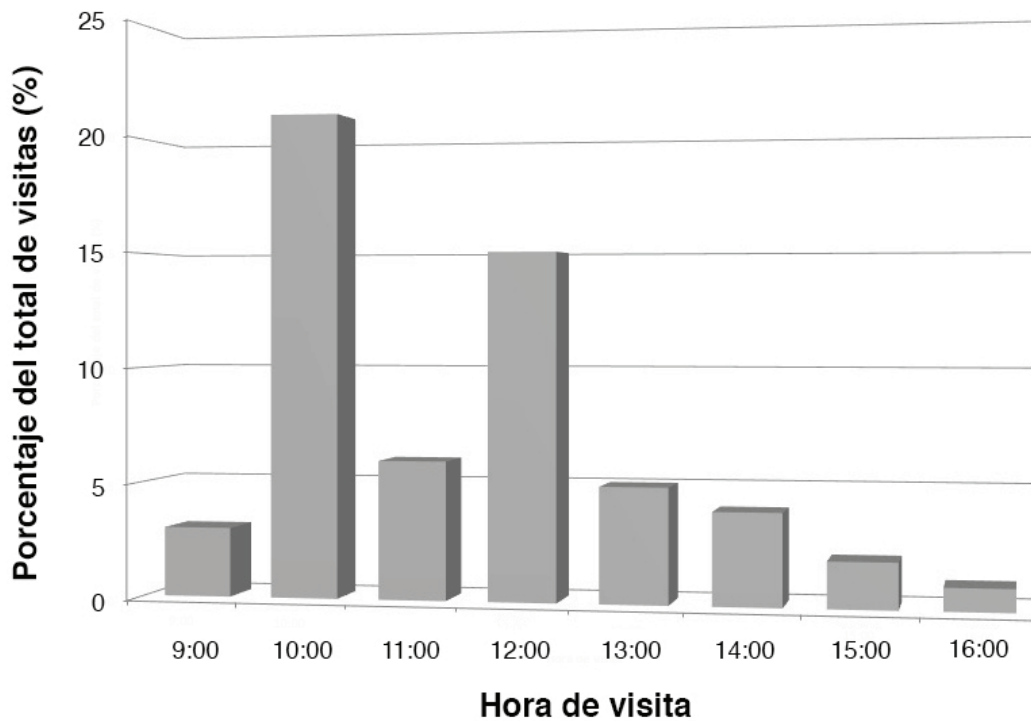


Figura 8. Porcentaje de visitas de insectos observadas a diferentes horas en *Phragmipedium longifolium* en la Reserva Biológica Boque de Paz, Costa Rica. Para cada hora, el tiempo total de observación fue de 45 minutos, no se muestran las horas en las que no se vieron visitantes (total de visitas= 57).

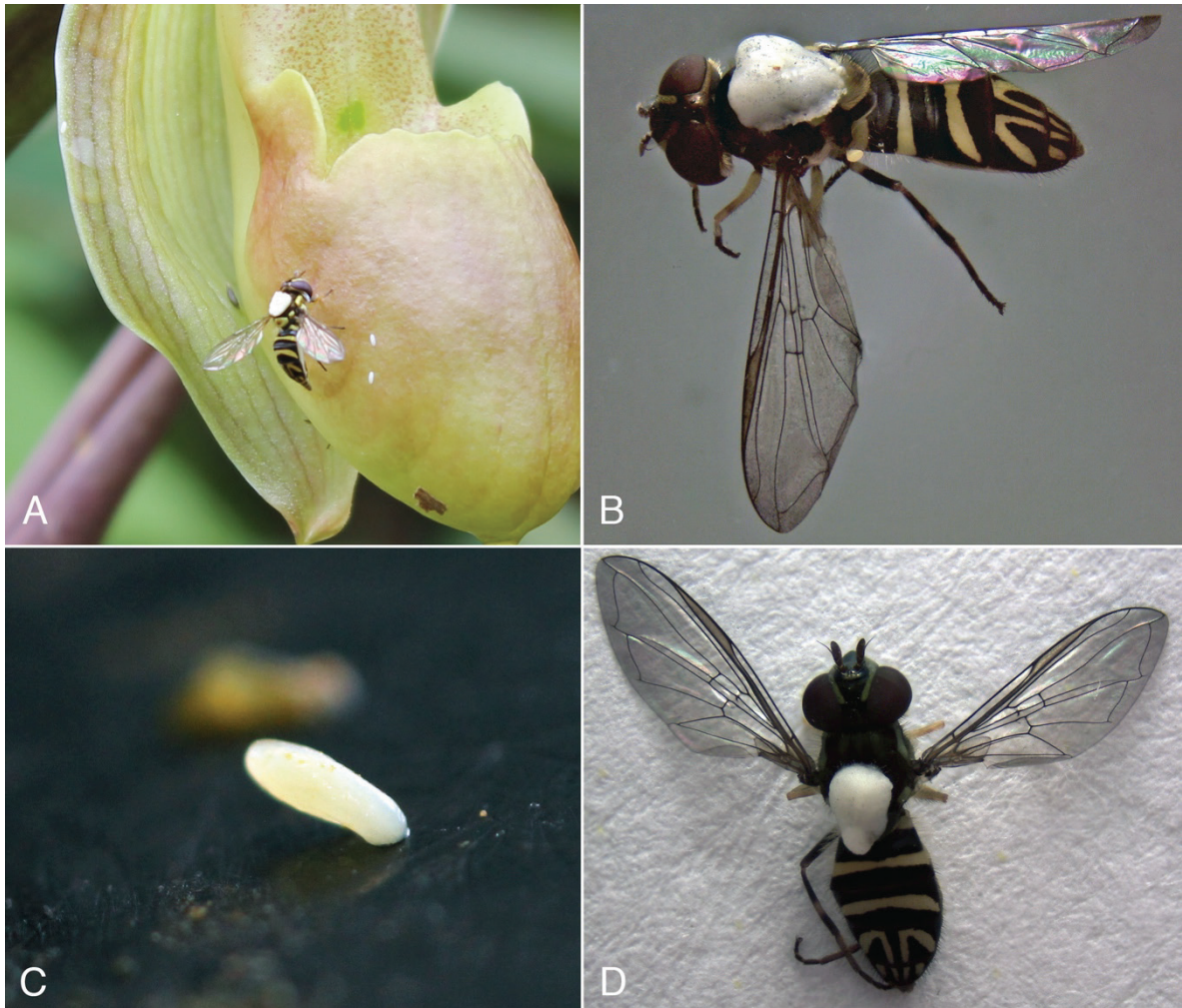


Figura 9. Potenciales polinizadores de *Phragmipedium longifolium* en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. A. hembra de *Allograpta* sp. (Syrphidae) cargando una masa polínica de *P. longifolium* y con dos huevos sobre el labelo; B. hembra de *Allograpta* sp. con masa polínica de *P. longifolium* sobre su tórax, vista dorso-lateral; C. huevo de *Allograpta* sp.; D. hembra de *Allograpta* sp. con masa polínica de *P. longifolium* sobre su tórax, vista dorsal.



Figura 10. Hembra de *Allograpta* sp. (Syrphidae) intentando escapar por la abertura principal del labelo de *Phragmipedium longifolium*. Se señala con una flecha un huevo, posiblemente ovipositado por el mismo individuo antes de caer dentro del labelo.

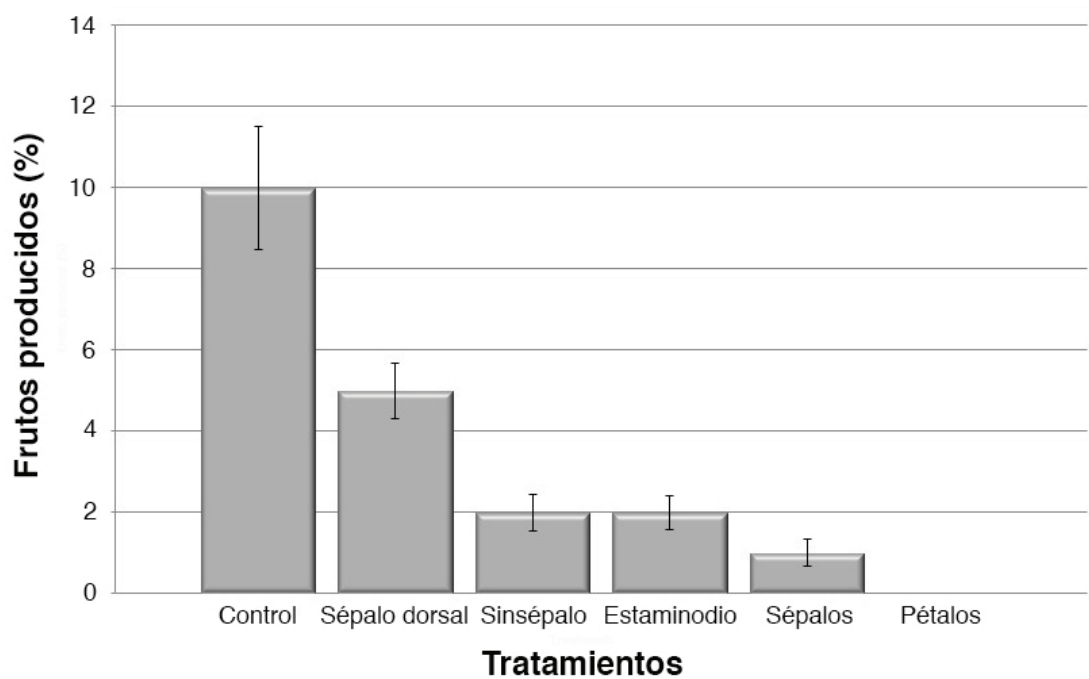


Figura 11. Porcentaje de frutos producidos en los tratamientos de remoción de estructuras florales en una población de *Phragmipedium longifolium* en Costa Rica (n= 100 flores por tratamiento). Las líneas verticales representan la desviación estándar.

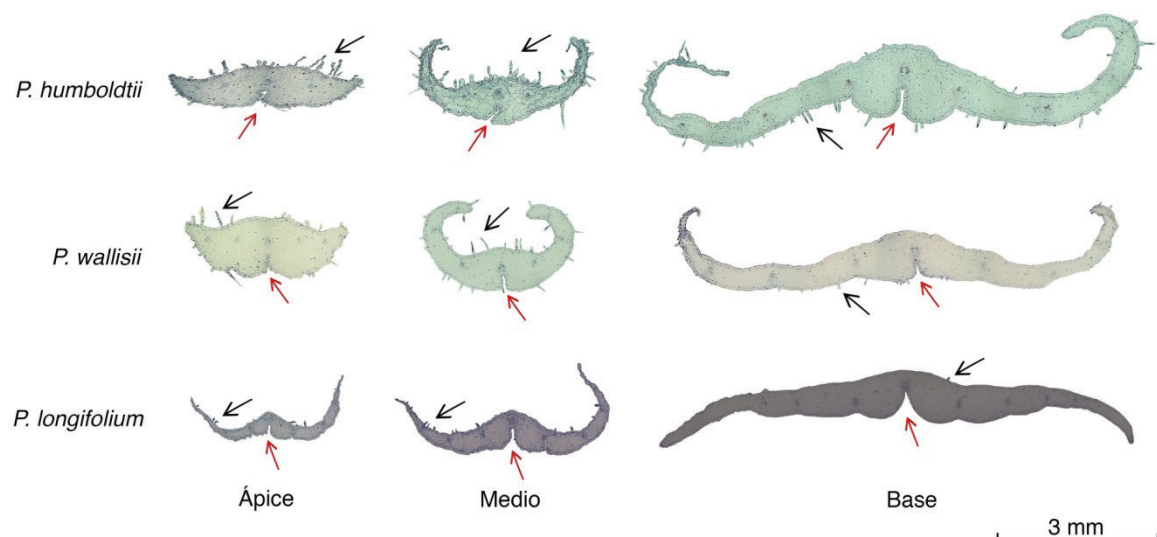
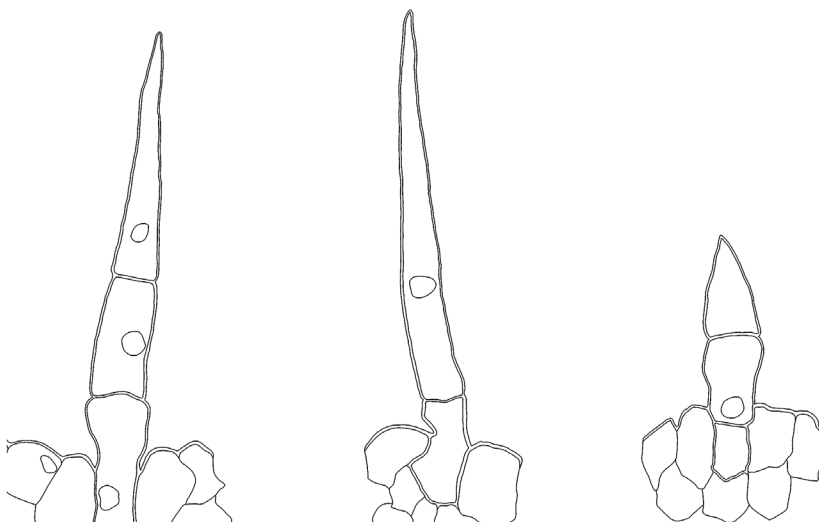
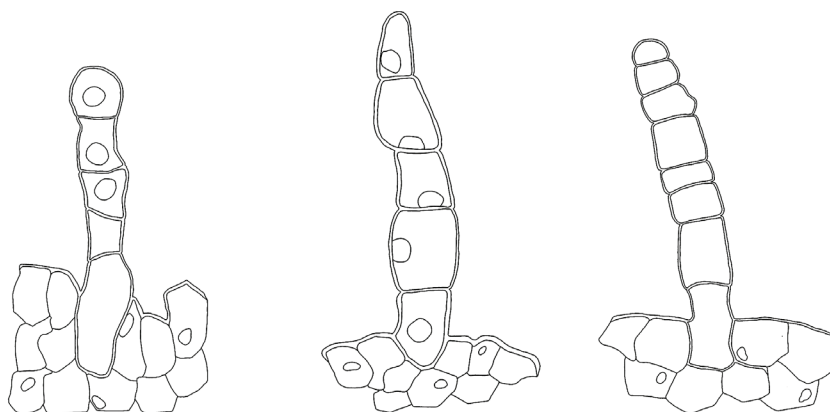


Figura 12. Cortes transversales de las partes apical, media y basal de los pétalos de *Phragmipedium humboldtii*, *P. wallisii* y *P. longifolium* teñidos con azul de toluidina al 1%. Todos los cortes muestran la superficie adaxial hacia arriba. Se señalan con flechas negras algunos tricomas glandulares y con flechas rojas el surco abaxial que se extiende a lo largo del pétalo en las tres especies.

TG1



TG2



TG3

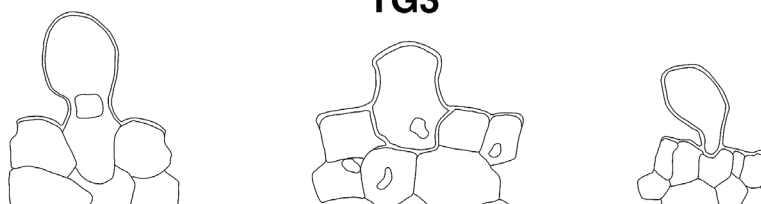


Figura 13. Variaciones morfológicas de los tricomas glandulares TG1, TG2 y TG3 presentes en los pétalos de *Phragmipedium longifolium*, *P. humboldtii* y *P. wallisii*.

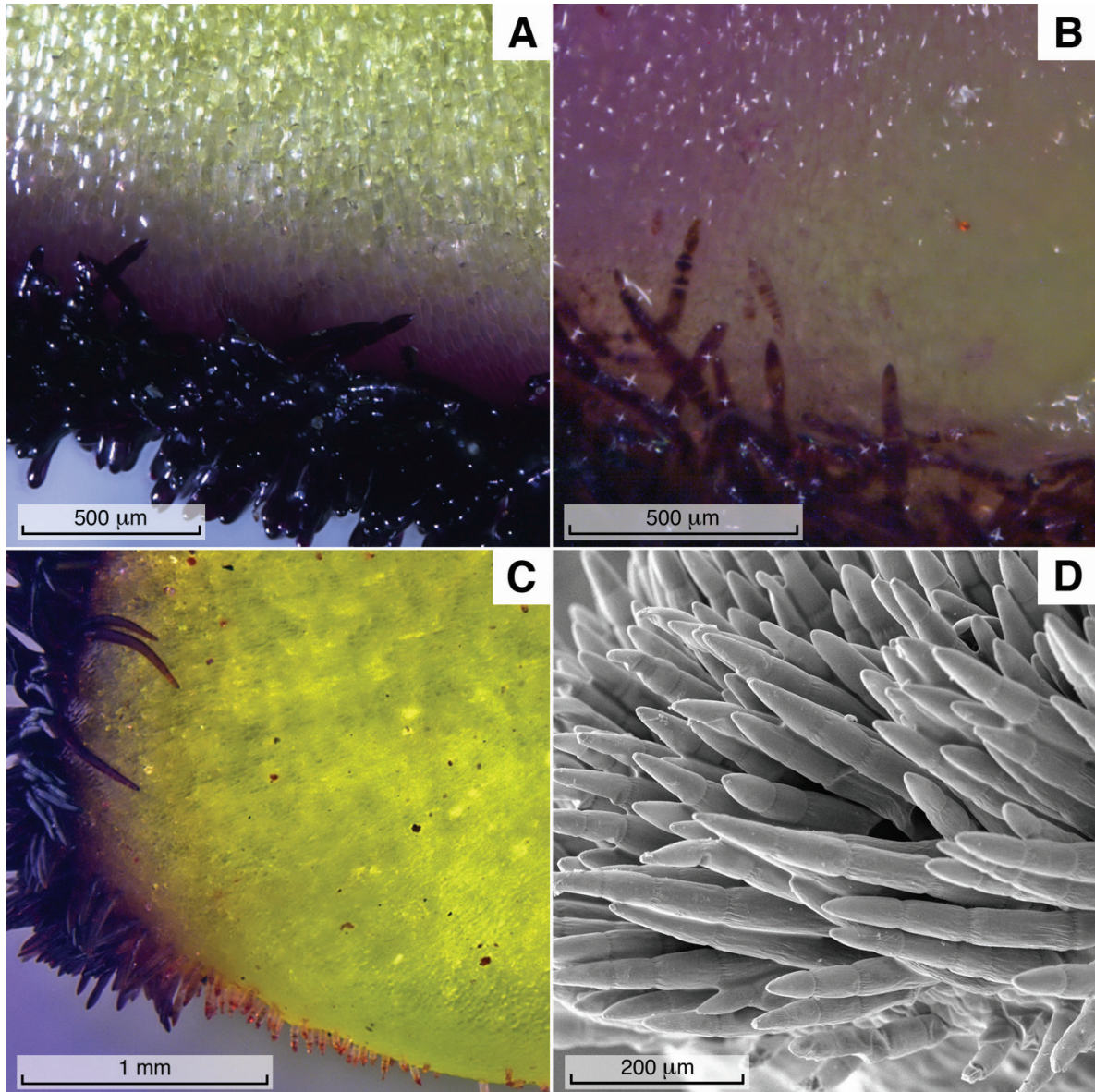


Figura 14. Margen lateral del estaminodio de *Phragmipedium longifolium* donde se ubican los tricomas. A. sin teñir; B. teñido con ácido peryódico de Schiff; C. teñido con Sudán IV; D. detalle en MEB.

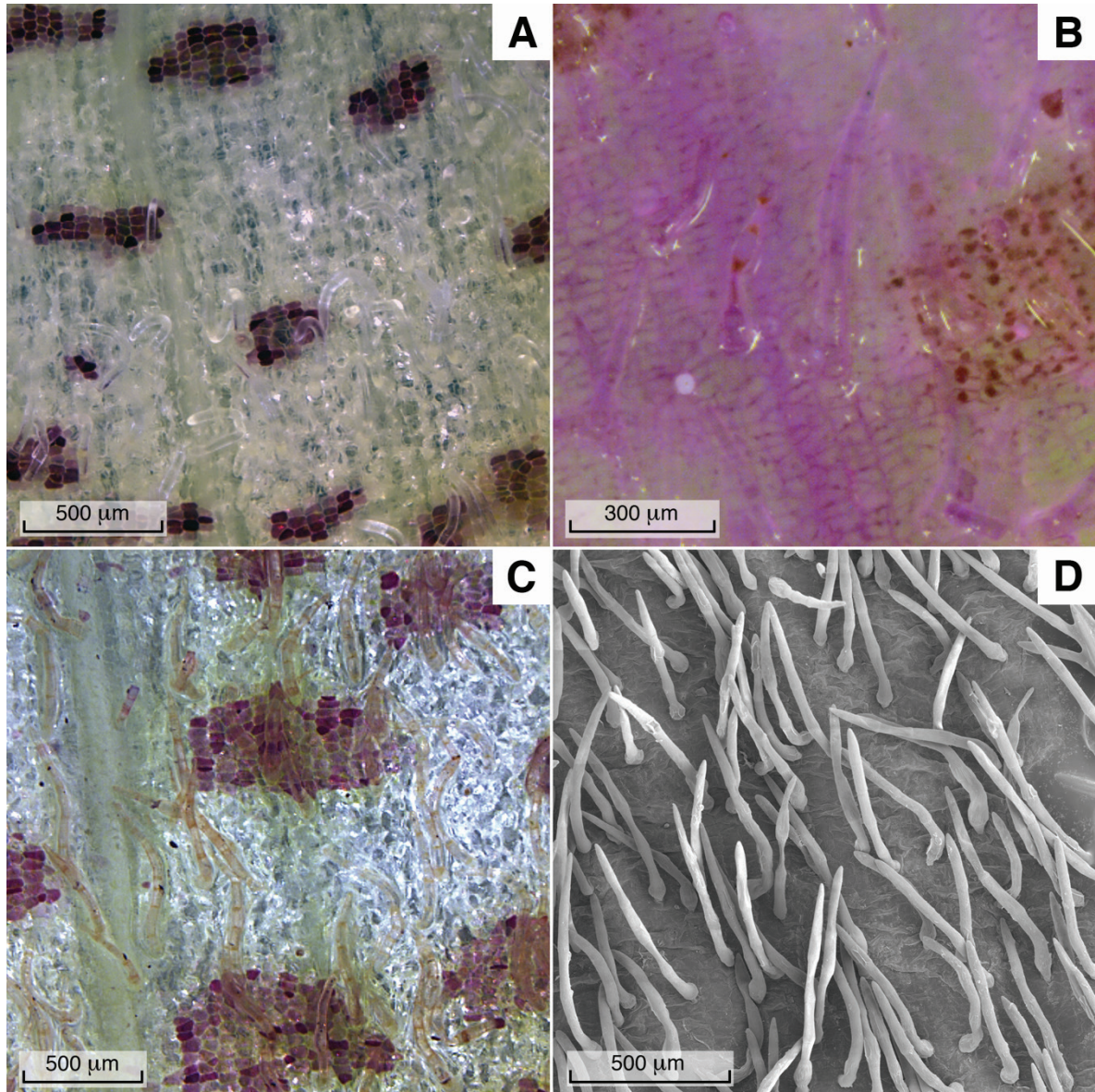


Figura 15. Superficie adaxial del labelo de *Phragmipedium longifolium* cerca de los orificios de salida bajo la columna (dentro del túnel). A. sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle en MEB.

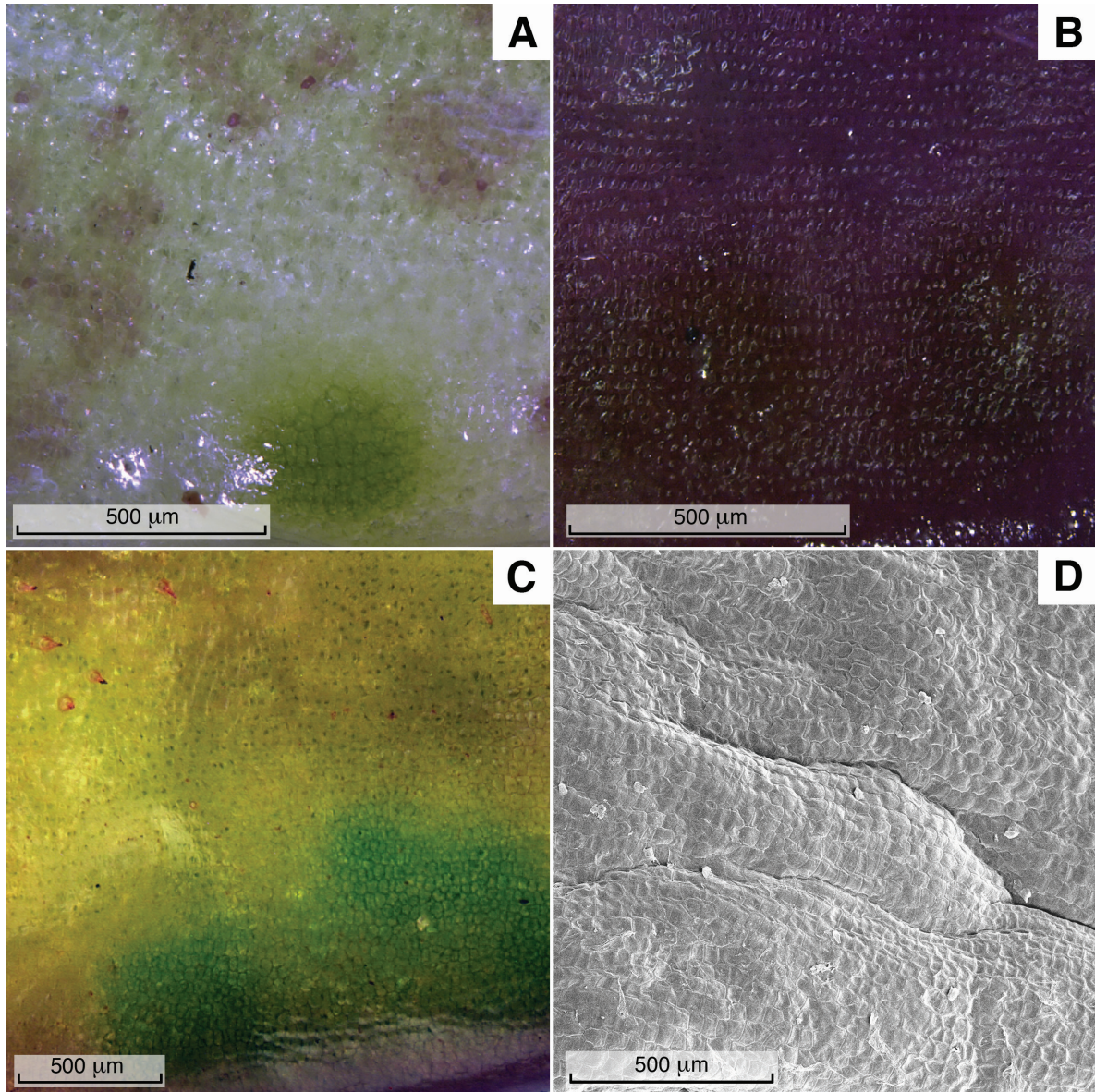


Figura 16. Superficie abaxial de los pliegues del labelo de *Phragmipedium longifolium* donde se ubican las manchas verdes. A. sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle en MEB.

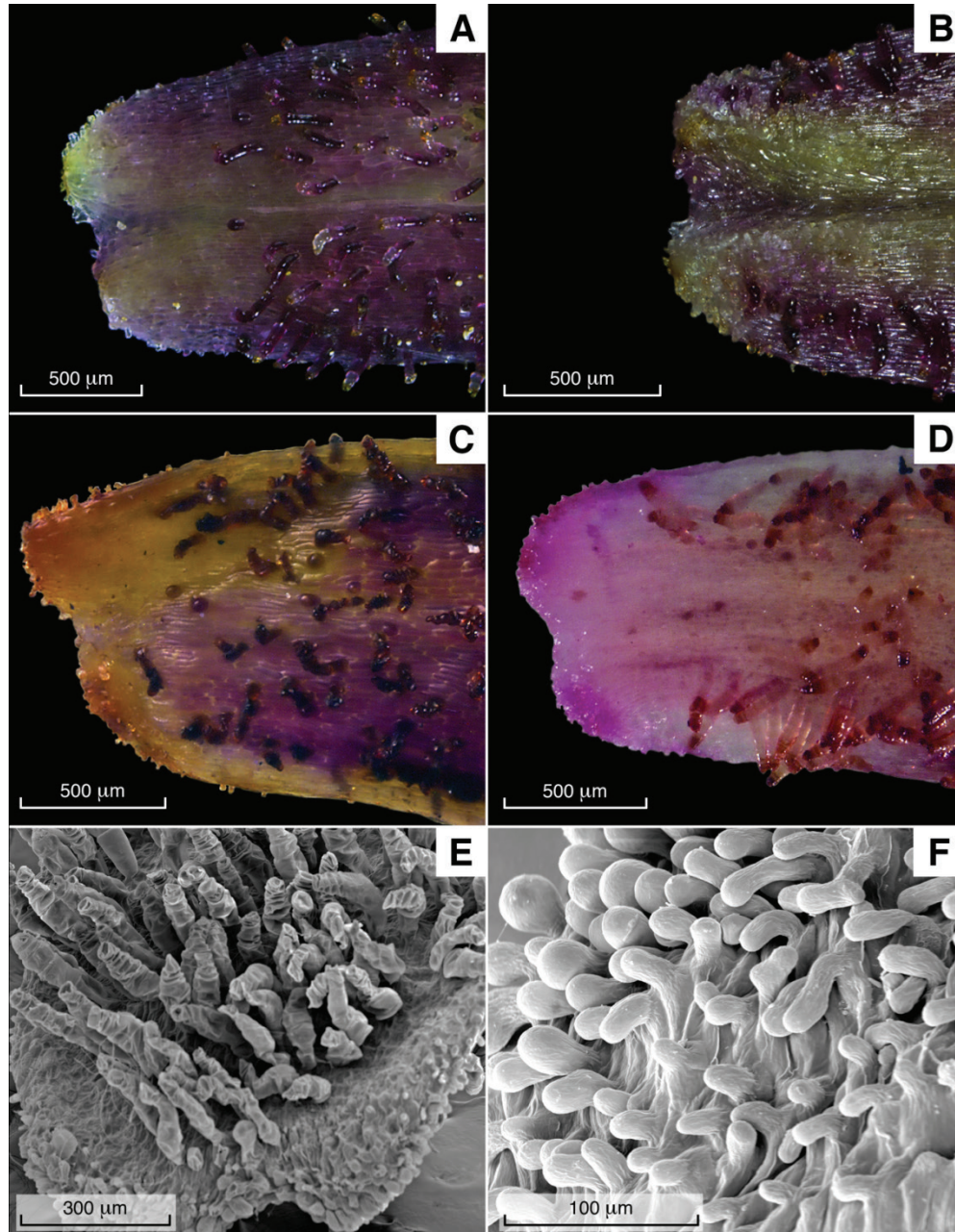


Figura 17. Ápice del pétalo de *Phragmipedium longifolium*. A. superficie adaxial sin teñir; B. superficie abaxial sin teñir; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; E. superficie adaxial en MEB, mostrando tricomas TG2 y algunos TG3 cerca del margen; F. superficie abaxial en MEB, mostrando en detalle tricomas TG3.

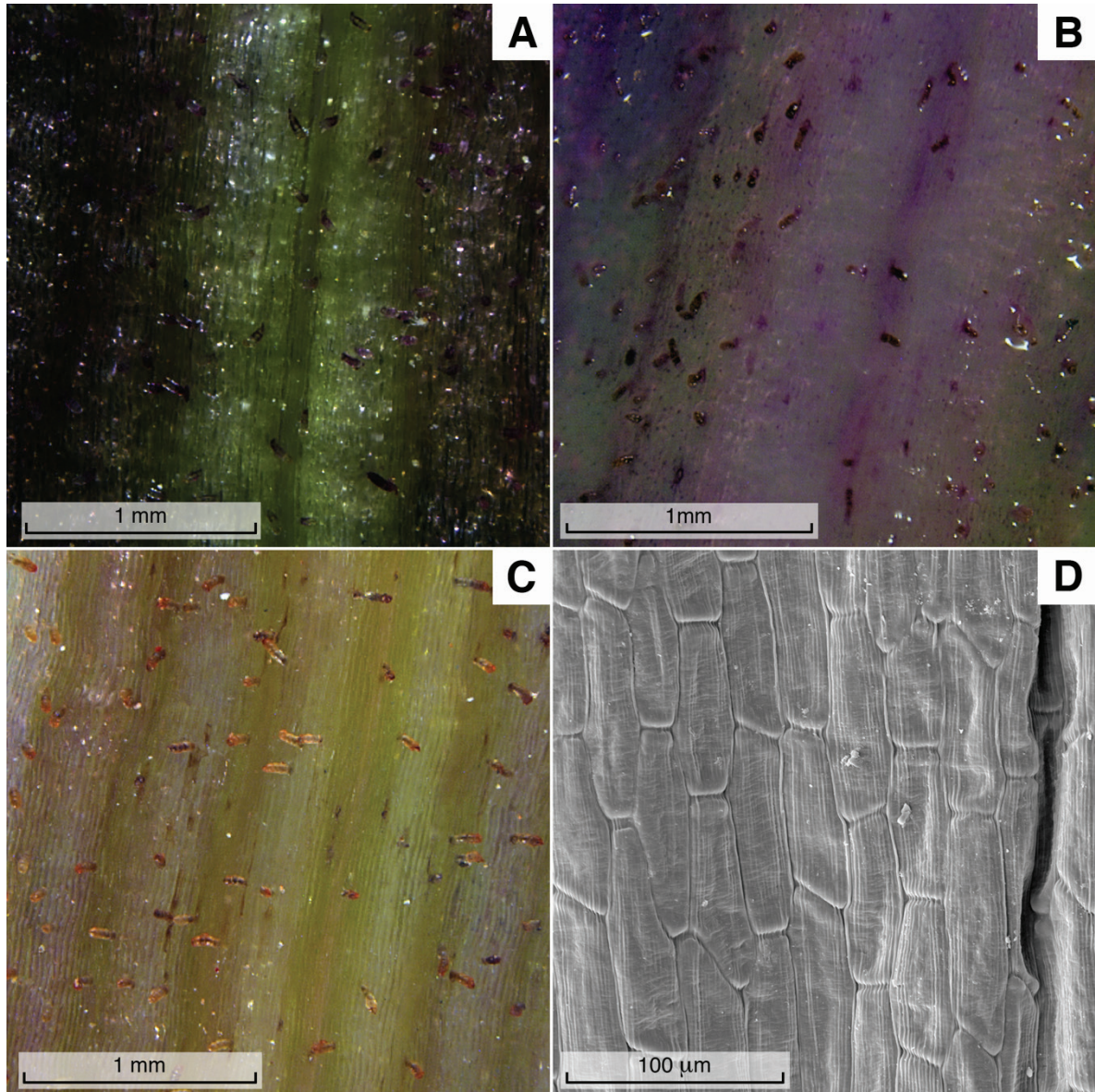


Figura 18. Parte media del pétalo de *Phragmipedium longifolium*. A. superficie adaxial sin teñir; B. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie abaxial en MEB.

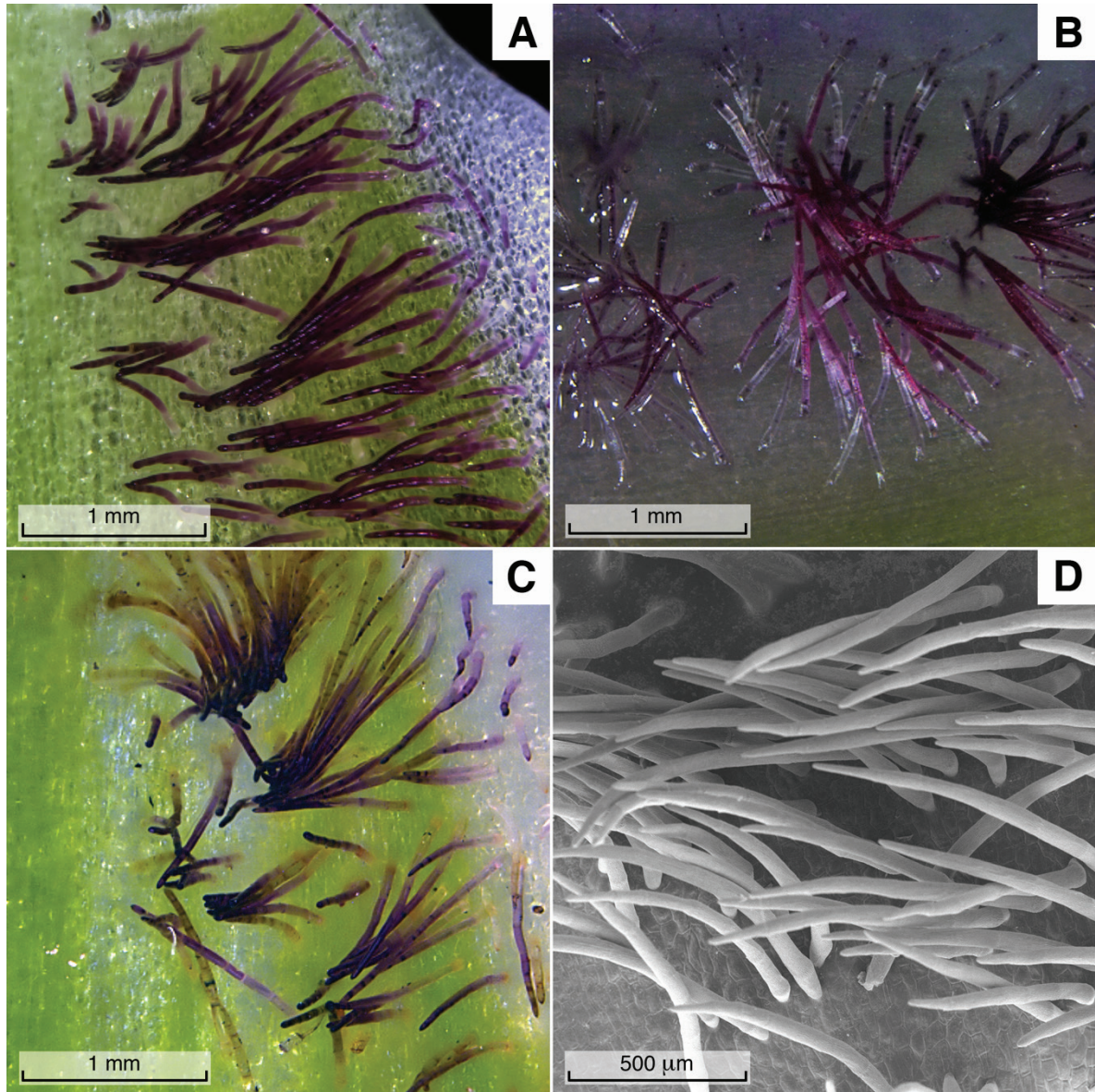


Figura 19. Superficie adaxial de la base del pétalo de *Phragmipedium longifolium*. A. sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle en MEB.

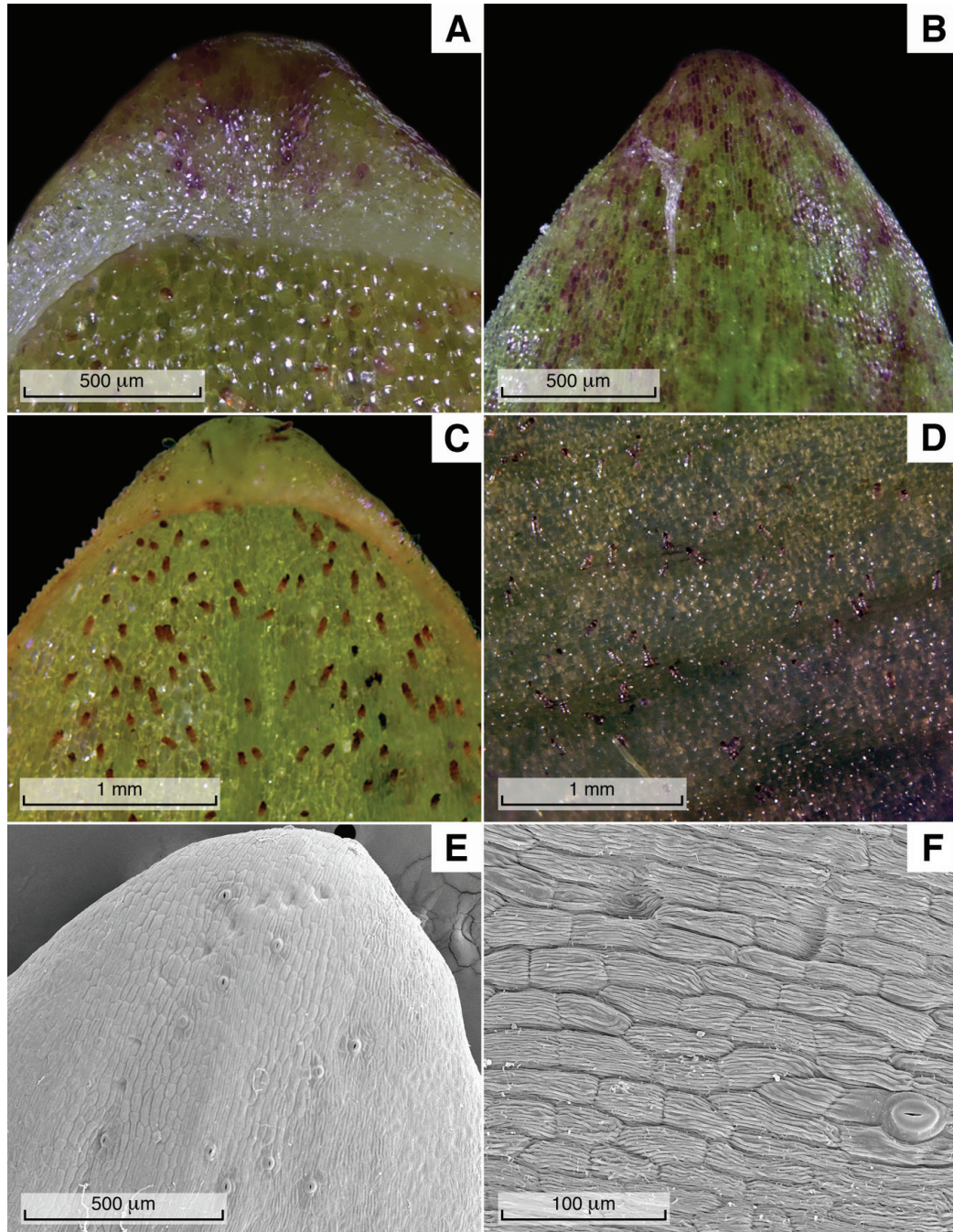


Figura 20. Ápice del sépalo dorsal de *Phragmipedium longifolium*. A. superficie adaxial sin teñir; B. superficie abaxial sin teñir; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; E y F. detalles de la superficie abaxial en MEB.

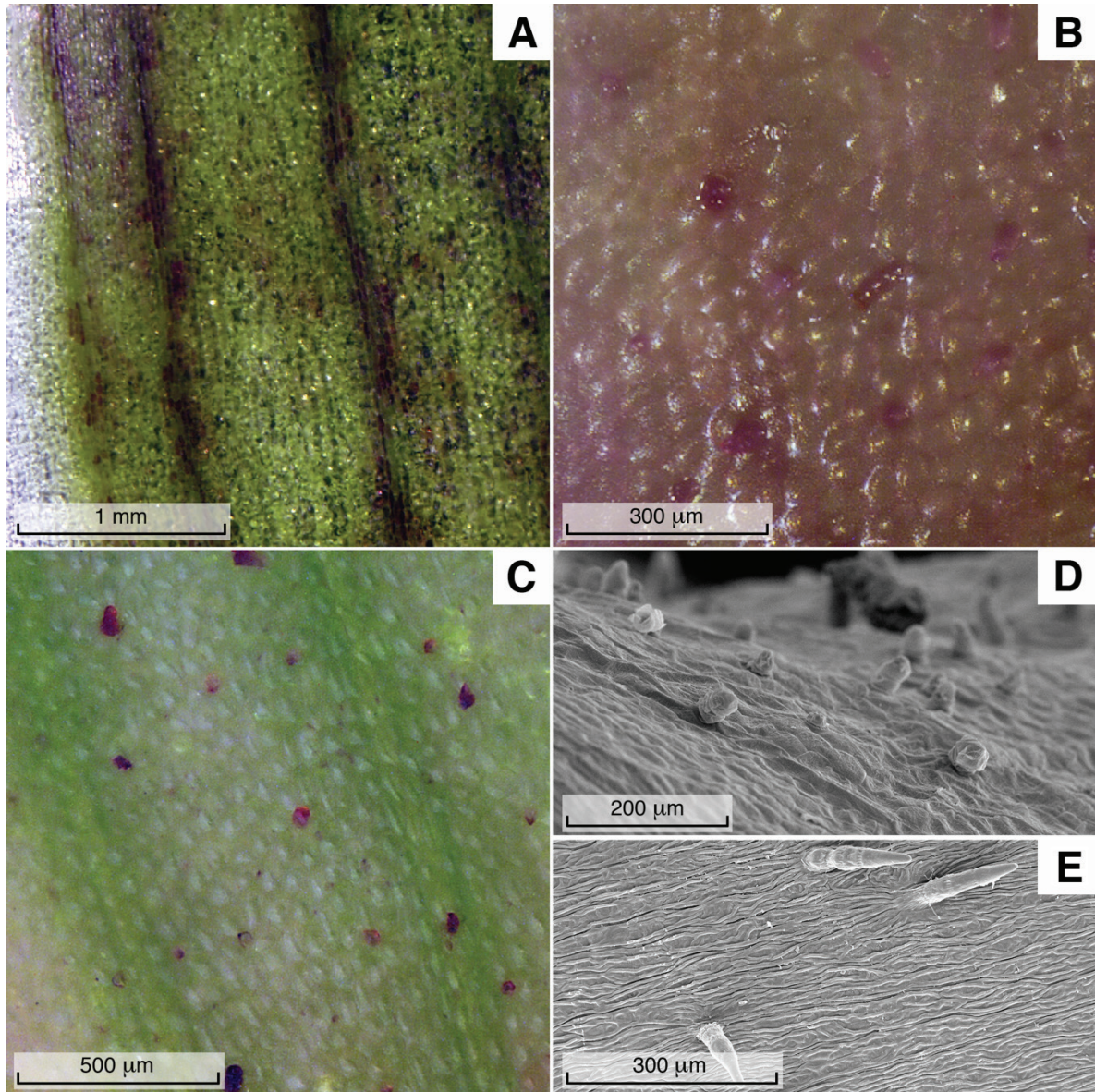


Figura 21. Parte media del sépalo dorsal de *Phragmipedium longifolium*. A. superficie abaxial sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalles de la superficie abaxial en MEB; E. detalle de la superficie adaxial en MEB.

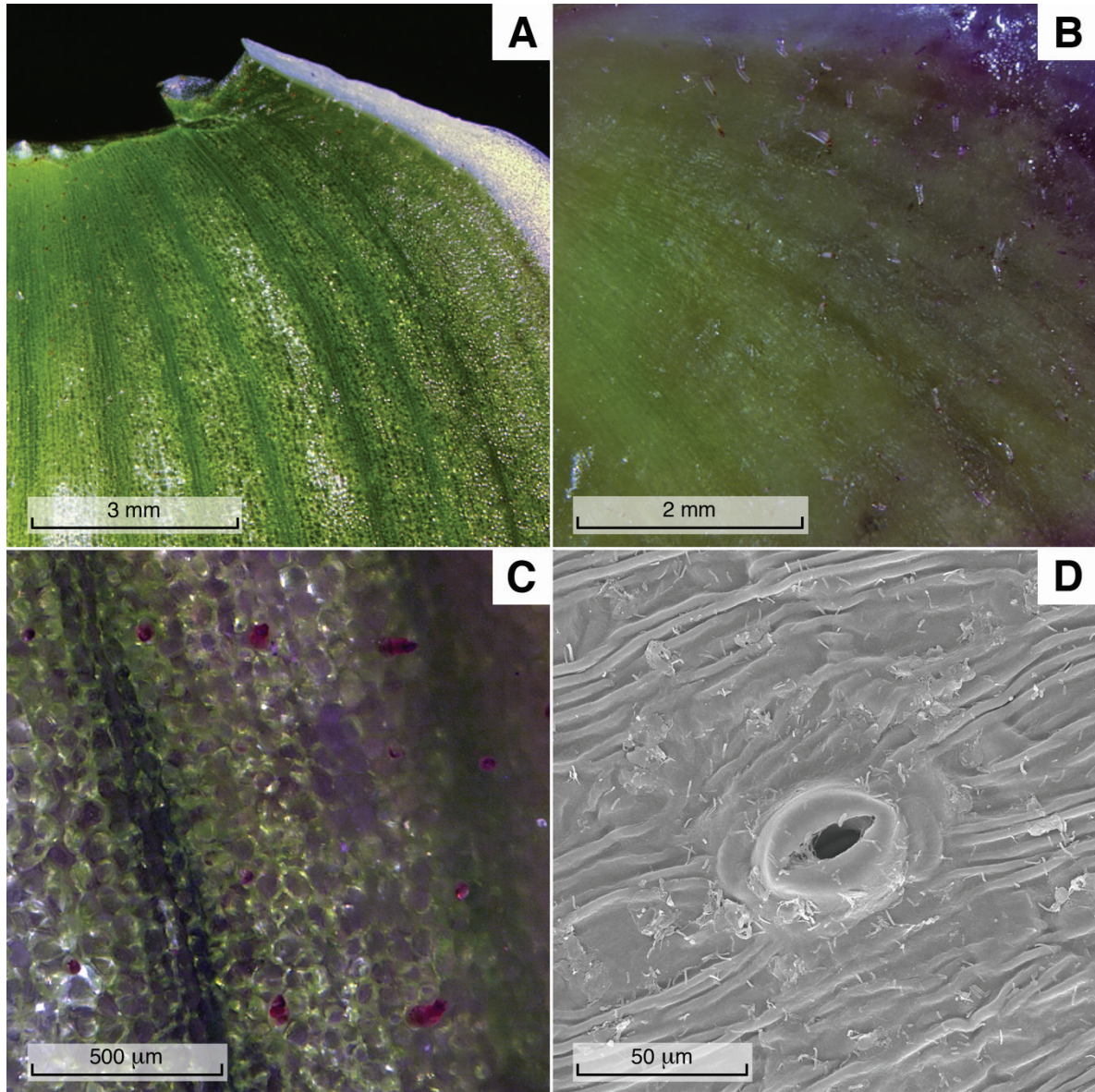


Figura 22. Base del sépalo dorsal de *Phragmipedium longifolium*. A. superficie adaxial sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie abaxial en MEB.

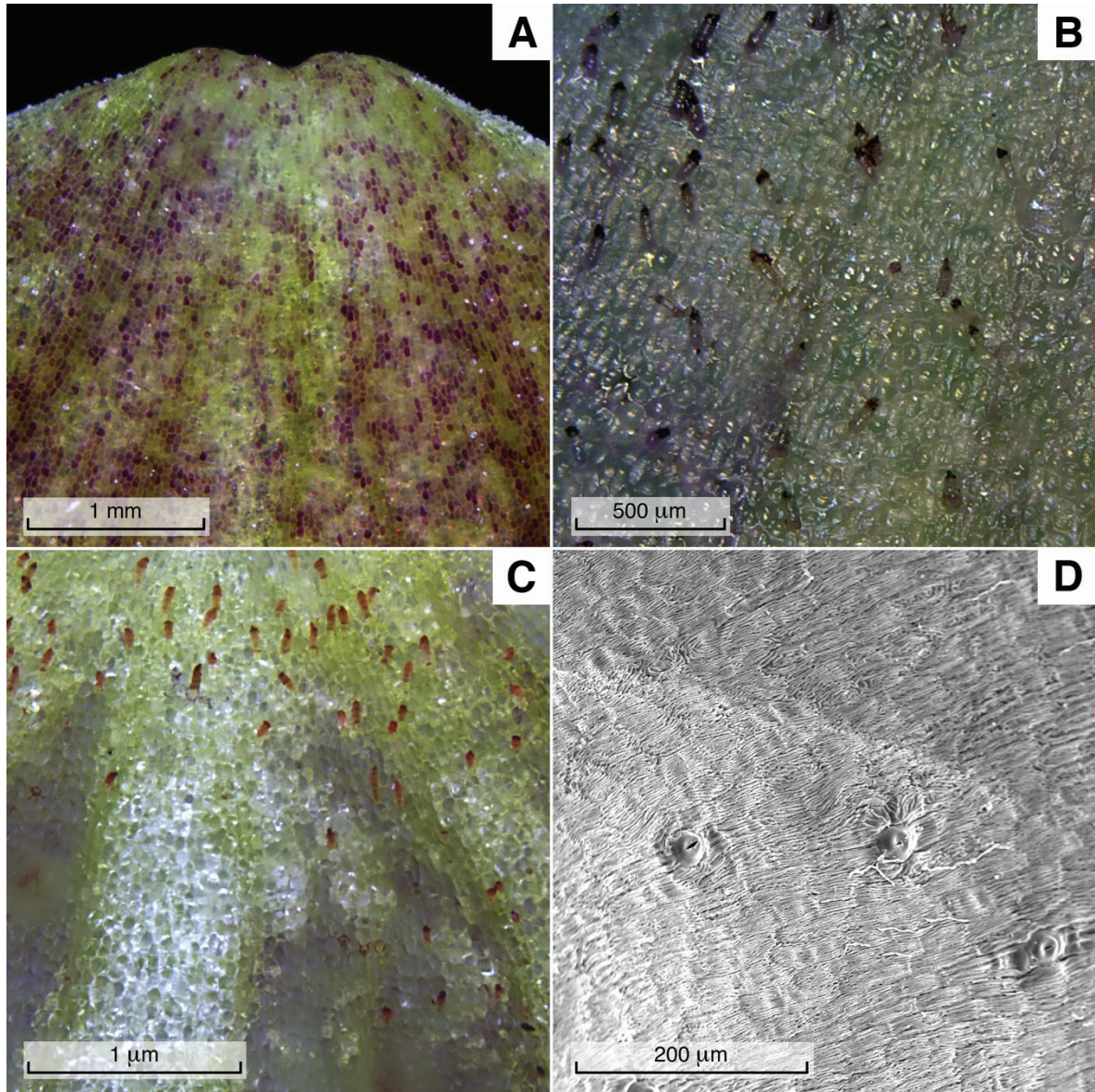


Figura 23. Ápice del sinsépalo de *Phragmipedium longifolium*. A. superficie abaxial sin teñir; B. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie abaxial en MEB.

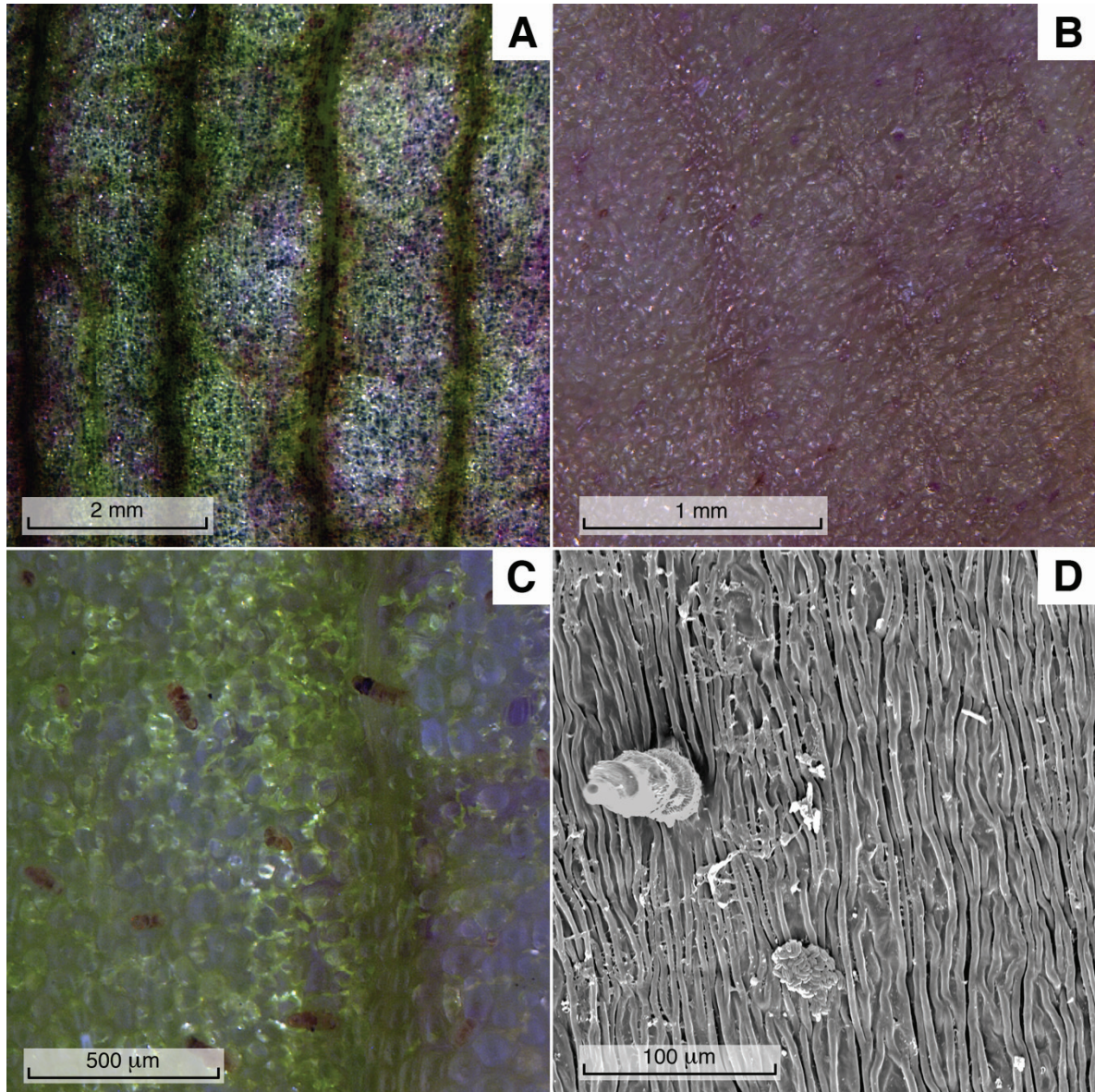


Figura 24. Parte media del sinsépalo de *Phragmipedium longifolium*. A. superficie abaxial sin teñir; B. superficie adaxial teñida con ácido peryódico de Schiff; C. superficie adaxial teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie adaxial en MEB.

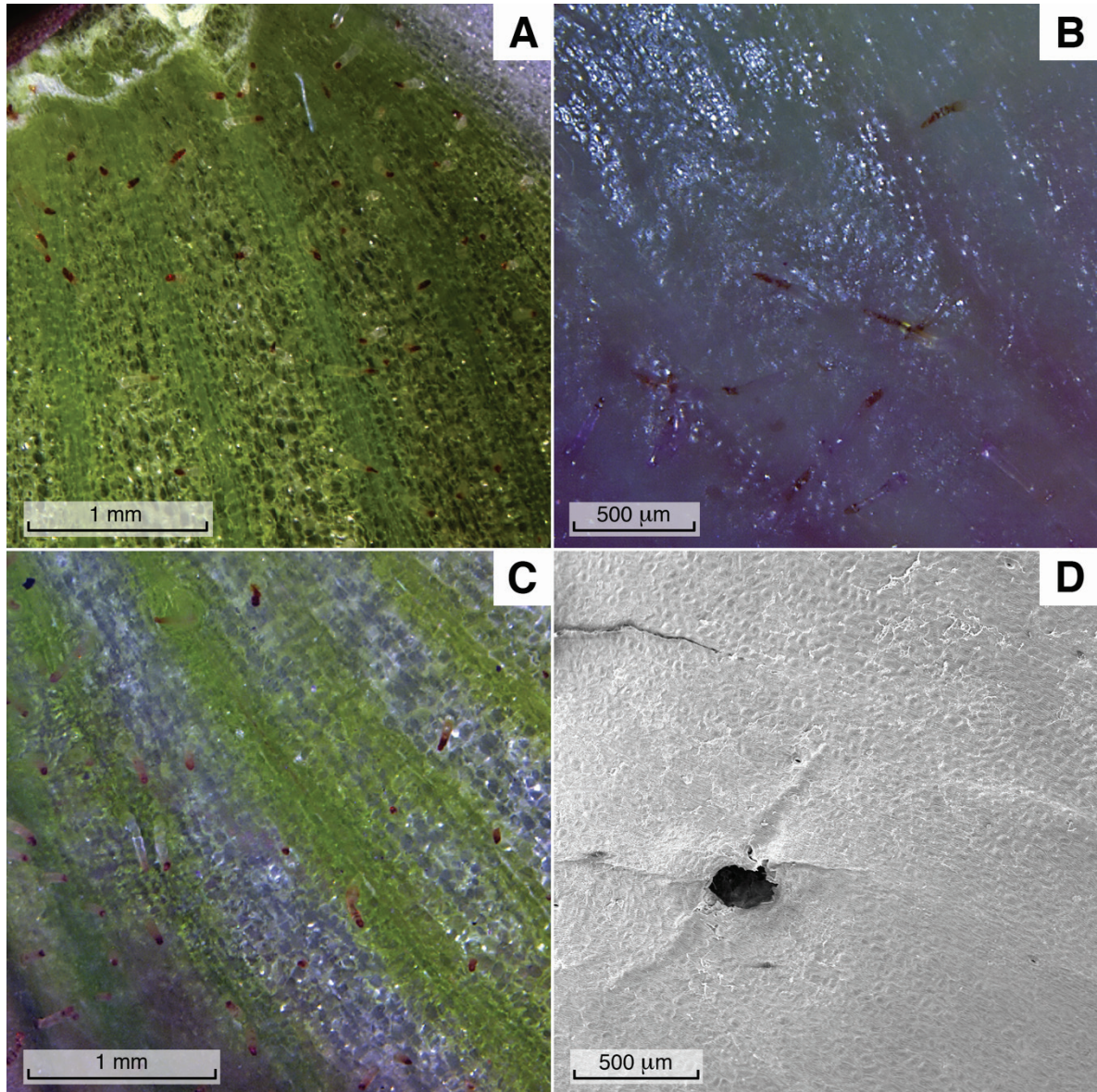


Figura 25. Base del sinsépalo de *Phragmipedium longifolium*. A. superficie adaxial sin teñir; B. teñida con ácido peryódico de Schiff; C. teñida con Sudán IV; D. detalle de la superficie abaxial en MEB.