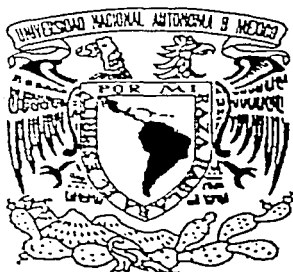


49



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Micorrización in vitro de Bletia urbana
(Orchidaceae)

como una estrategia para su reintroducción

T E S I S

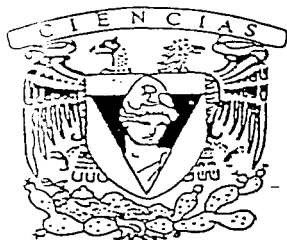
Que para obtener el título de :

B I O L O G A

P R E S E N T A:

Mireya Castillo Martínez

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Director de Tesis

Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae) como una estrategia para su reintroducción.

realizado por la P. de B. Mireya Castillo Martínez

con número de cuenta 09052191-5 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea

Propietario Dr. Víctor M. Chávez Avila

Propietario Dr. Alejandro Martínez Palacios

Suplente M. en C. Esthela Sandoval Zapotitla

Suplente Biól. Tania Terrazas Arana

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

*A mis padres con cariño
por su apoyo que me han brindado en mis estudios.*

*A mis hermanos Aristeo, Javier, Arturo, Lorena y Carlos
por su impulso en la continuación de mis estudios.*

*A mi esposo Javier e hijos Javier Edson y Erick
por participar en mis estudios.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea del Instituto de Geología de la UNAM, por su constante apoyo y dirección en el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por las correcciones en la estructuración del presente trabajo.

Al Dr. Alejandro Martínez Palacios del Instituto Nacional de Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por las correcciones en la estructuración del presente trabajo.

A la Biól. Tania Terrazas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por el apoyo brindado en el invernadero, así como por las correcciones en la estructuración del presente.

A la M. en C. Estela Sandoval del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por la orientación en la preservación de los tejidos vegetales, al igual que por las correcciones en la estructuración del presente trabajo.

A la Biól. Bárbara Estrada del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por la ayuda en el trabajo de laboratorio.

Al M. en C. Alejandro Martínez del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por el apoyo en la toma del material fotográfico.

Al Biól. Oswaldo Núñez de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por su asistencia en la recolecta en campo.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto de la Facultad de Ciencias de la UNAM por el apoyo en cómputo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM.

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCION	4
2.1. Micropropagación de orquídeas por cultivo de tejidos vegetales (CTV)	6
2.2. Cultivo simbiótico de orquídeas en terrestres	7
2.3. Reintroducción de orquídeas a su habitat	9
3. ANTECEDENTES	
3.1. Caracterización del habitat de <i>Bletia urbana</i>	12
3.2. Micropropagación de <i>B. urbana</i> en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM	15
3.3. Cultivo simbiótico de <i>B. urbana</i>	16
4. OBJETIVOS	16
5. MATERIALES Y METODOS	17
6. RESULTADOS Y DISCUSION	
a. Germinación simbiótica y asimbiótica de <i>B. urbana</i>	21
b. Desarrollo <i>in vitro</i> de las plantas de <i>B. urbana</i>	23
c. Trasplante a suelo	27
d. Aclimatización de <i>B. urbana</i> en invernadero	30
e. Reintroducción de <i>B. urbana</i> a su hábitat	32
7. CONCLUSIONES	40
8. RECOMENDACIONES	42
9. ANEXOS	
1. Medios de cultivo y soluciones	43
2. Datos de individuos reintroducidos	45
10. LITERATURA CITADA	49

1. RESUMEN

Se establecieron los cultivos simbióticos y asimbióticos *in vitro* de *Bletia urbana*, especie en peligro de extinción endémica de México, a partir de una colección de germoplasma de semillas recolectadas en 1984 y 2001. Se comprobó su viabilidad y capacidad regenerativa a través de la germinación y desarrollo en dos medios asimbióticos, Medio Knudson C enriquecido con 10% de agua de coco y 3% de sacarosa (MKC) y Medio de Kew A (MKA), y un medio simbiótico, Medio Básico de Avena (MBA). Los mayores porcentajes de germinación cuantificados a los 32 días (75%) ocurrieron en el medio KC; mientras que en los medios MKA y MBA fueron alrededor de 40%. A pesar de esto, el posterior desarrollo de las plantas fue varias veces mayor en el medio simbiótico, siendo más altas y vigorosas y desarrollando una mayor longitud de raíces y hojas en un tiempo significativamente menor de cultivo *in vitro* (de 52 a 91 días comparado con los 127 a 212 días para los individuos asimbióticos).

Estos resultados tuvieron repercusiones en la aclimatización de los individuos en condiciones de invernadero durante el trasplante *ex vitro*. La sobrevivencia de las plantas cultivadas en los medios asimbióticos fue menor al 5% comparada con el 90% de las que provenían del medio simbiótico. Del número de semillas sembradas originalmente, se propagó solamente el 24% en el medio simbiótico, en contraste con el 5 al 11% en ambos medios simbióticos.

Las plantas micorrizadas fueron reintroducidas a su habitat natural en un periodo de 81 días desde el momento de su germinación. Se obtuvo una sobrevivencia del 61.9% al cabo de un año. Los resultados anteriores permiten proponer el cultivo simbiótico de esta especie como una estrategia muy adecuada para su reintroducción.

2. INTRODUCCION

Las orquídeas son plantas de ornato altamente cotizadas debido a su extraordinaria belleza y valor comercial. En el mundo se ha calculado que existen entre 25 a 30 mil especies y 788 géneros (Mabberly, 1997) de las cuales aproximadamente 6% (IUCN, 1997) se encuentran amenazadas o en peligro de extinción. En México su diversidad abarca alrededor de 950 especies, entre las cuales alrededor de 180 se encuentran en peligro de extinción (SEMARNAP, 1996).

Las orquídeas producen grandes cantidades de semillas, de 100 mil a 4 millones en cada cápsula (Mitchell, 1989; Chávez, 1980; Lee y Lee, 1991). Sin embargo, a pesar de esta gran cantidad, la reproducción sexual de estas plantas se dificulta debido al tamaño de las semillas que tan sólo miden 0.25 a 1.2 mm de longitud y de 0.09 a 0.27 mm de diámetro, lo que limita su contenido de reservas al carecer de cotiledones y endospermo (Lee y Lee, 1991). Es por esto que naturalmente, las semillas necesitan en gran medida de una asociación simbiótica con un hongo para germinar y llegar al estadio de planta adulta; esta asociación es llamada endomicorriza orquidácea (Rasmussen, 1998). Las orquídeas en su hábitat presentan esta simbiosis en cualquiera de sus formas de crecimiento; como epífitas (plantas que crecen sobre otras plantas), terrestres (que crecen en suelo) o litófilas (que crecen sobre rocas) (Goh *et al.*, 1992; Rasmussen, 1998; Rivas *et al.*, 1998). La principal función que cumple el endófito (hongo asociado) dentro de la planta (hospedero) es que la provee de nutrimentos, tales como carbohidratos, polisacáricos (azúcares; almidón), minerales y otras sustancias no identificadas (Arditti, 1992). Estas sustancias son necesitadas por las orquídeas para germinar y desarrollarse hasta los estados en que las plantas puedan producir y almacenar nutrimentos que les permitan sobrevivir por sí mismas (Ramsay *et al.*, 1986). Los hongos en cambio, se sabe que en algunos casos obtienen por parte de la planta, complejos orgánicos como vitaminas, hormonas vegetales y algunos productos de carbono, aún cuando esta evidencia no es conclusiva (Arditti, 1992).

En algunas orquídeas terrestres, las semillas presentan especificidad por el la especie de hongo con el que se asocian (Clements, 1988; Arditti *et al.*; 1990; Rasmussen, 1998; Batty *et al.*, 2001). Esto se ha podido establecer a través de numerosas

investigaciones en laboratorio en las que la mayoría de los aislados altamente efectivos o afines al desarrollo de las plantas pertenecen al género anamórfico *Rhizoctonia* (Hadley, 1982; Currah *et al.*, 1987; Dijk y Eck, 1994; Tan *et al.*, 1998; Tomira y Konno, 1998; Carling *et al.*, 1999). Aún cuando los hongos de este género son patógenos altamente infectantes en cultivos como la papa, no ocasionan daño alguno en las orquídeas. Algunos aislados de *Rhizoctonia* o de otras especies de hongos micorrízicos (*v. gr. Thanatephorus pennatus, Ceratobasidium obscurum, Sebacina vermifera, Waitea circinata*) no producen ningún efecto en la germinación de algunas especies de orquídeas como *Nigritella nigra, Neottia nidus-avis, Platanthera orbiculata, Spiranthes sinensis*, etc. (Williams, 1984; Smreciu y Currah, 1989; Masuhara *et al.*, 1993). En algunas ocasiones se ha observado, inclusive, que hongos incompatibles con las orquídeas pueden causar un efecto antagónico sobre el crecimiento de sus protocormos (el primer estado pseudo diferenciado de una plántula de orquídea que dará origen a las raíces, tallos y hojas), llevándolos inclusive, hasta su muerte (Muir, 1989).

El desarrollo de la simbiosis orquídecea comienza por la penetración de una hifa al embrión a través del suspensor (Clements, 1988; Peterson *et al.*, 1998). La colonización, o invasión de los tejidos del embrión por el hongo continúa durante la germinación con el desarrollo del protocormo (Miyoshi y Mii, 1995). En muchas ocasiones, casi la totalidad de las células del protocormo están colonizadas por estructuras fúngicas denominadas pelotones, ovillos o cordones hifales. Estas estructuras son las que caracterizan a este tipo de simbiosis micorrízica y son los sitios en donde se lleva a cabo el intercambio de nutrimentos entre ambos simbiosiontes. Los pelotones son estructuras tridimensionales que se originan a partir de una hifa que penetra la pared celular vegetal y se divide invaginando la membrana celular. De esta forma, la pared celular del hongo no tiene contacto con el citoplasma del hospedero y esta estructura ocupa casi todo el volumen celular. Las orquídeas regulan la invasión o colonización del hongo en sus tejidos por medio de la producción de *orchinol* (sustancia tóxica para el endófito) y a través de la digestión enzimática intracelular de las hifas (Arditti, 1992). Cuando el protocormo diferencia en su estructura a las raíces, el tejido que se forma de éstas es rápidamente invadido por el hongo. Un proceso similar sucede con las raíces de las plantas adultas que inmediatamente después de su formación, son re-colonizadas tras periodos de sequía. Muchas especies de orquídeas

desarrollan raíces nuevas al comenzar la temporada de crecimiento y la colonización del hongo rápidamente ocupa las células corticales de la raíz (Hadley, 1982).

2.2. Micropropagación de orquídeas por cultivo de tejidos vegetales (CTV).

El cultivo de tejidos vegetales es una tecnología altamente exitosa y muy usada para llevar a cabo la propagación masiva de orquídeas. La aplicación de esta técnica surgió como la única solución que resolvió las dificultades de germinar naturalmente las semillas de estas plantas que se consideraban estériles a principios del siglo pasado, debido a su pequeño tamaño y ausencia de endospermo por lo que debían obtener del exterior los nutrimentos para lograr su desarrollo. Knudson (1922) basado en los descubrimientos de Noel Bernard, fue el primero en deducir la necesidad que tenían estas plantas del suministro de una fuente externa de carbono y que éste era proporcionado por el hongo (Hadley, 1982). Este descubrimiento fue de gran valor en el desarrollo de la orquideología. Posteriormente, en 1957, Thomale cultivó en condiciones asépticas el bulbo de *Orchis maculata* y observó la rápida regeneración del tallo y la raíz. En 1960, Morel fue el primero en regenerar estas plantas por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales (CTV)¹, al utilizar el meristemo apical de *Cymbidium*. Más tarde Evans *et al.* (1981) regeneraron exitosamente orquídeas a partir de explantes de cotiledón, tallo, hoja, etc.

En general el CTV ha demostrado ser la base de la biotecnología actual, pues sin el establecimiento de los procedimientos de regeneración de plantas completas, las aplicaciones que posteriormente se desarrollaron en la biotecnología vegetal, no serían posibles (Litz, 199) y que se resumen de manera muy general en los siguientes aspectos:

- a) La micropropagación masiva clonal en corto tiempo.

¹ La regeneración de plantas por ésta técnica se basa en la totipotencialidad de todas y cada una de las células somáticas que contienen toda la información genética requerida para generar un nuevo individuo (Luckwill, 1979). Un ejemplo de totipotencialidad celular se encuentra en la orquídea *Malaxis paludosa* en la que las células terminales de la hoja presentan actividad meristemática, desarrollando un embrión foliar que después de ser separado de la hoja, se desarrolla en una nueva planta (Taylor, 1989).

- b) La obtención y recuperación de plantas libres de patógenos (fundamentalmente de virus).
- c) El desarrollo de nuevos métodos de fitomejoramiento.
- d) El almacenamiento de germoplasma (Murashige, 1974; Evans *et al.*; 1981).

2. 3. Cultivo simbiótico de orquídeas terrestres.

A principios del siglo antepasado, Salisbury fue el primero en observar la germinación de orquídeas en semillas de la especie *Bletilla hyacinthina* (Chávez, 1980). Sin embargo, esto no se repetía en otras especies y no se sabía porqué. Años más tarde, Link observó la constante invasión de un hongo en la germinación de semillas que aparentemente no estaban parasitadas pero no adjudicó ninguna importancia a este proceso. Es hasta 1885, cuando Albert Bernhard Frank identificó la universalidad de la interrelación simbiótica hongo-semilla en diversas especies de plantas y particularmente en orquídeas, a lo que le dió el término de micorrizas, quedando este descubrimiento nuevamente en el olvido (Lee y Lee, 1991). No fue sino hasta 1899 cuando Noel Bernard descubrió finalmente la importancia del hongo como indispensable para iniciar y promover la germinación de las orquídeas. Una de las observaciones que permitieron confirmar el papel de los hongos en la germinación de las semillas de orquídeas, fue que éstas germinaban al ser sembradas cerca de la base de la planta madre (Arditti, 1967). De este modo, Bernard fue el primero en dar a conocer en 1909, un método simbiótico de cultivo *in vitro*: para tener una mayor certeza en el papel del hongo en la germinación, preparó un medio a partir de tubérculos subterráneos de la orquídea terrestre del género *Ophrys* llamándolo "salep" (Lee y Lee, 1991). Años más tarde, en 1921, Lewis Knudson, interesado en la germinación de semillas de orquídeas, analizó el "salep" y dedujo que era el contenido de azúcares y sales minerales solubles lo que promovía la germinación de las semillas y que el papel del hongo era el de proporcionarles los almidones, pentosas y sustancias nitrogenadas necesarias. Knudson preparó un medio de cultivo con azúcar y minerales solubles solidificándolo con agar, sembró en éste semillas de los géneros *Cattleya*, *Laelia* y *Epidendrum* logrando con esto hasta un 100% de germinación. De esta manera, Knudson

fue el primero en dar a conocer un medio exitoso y reproducible de cultivo asimbiótico, el cual se sigue utilizando hasta hoy con sólo algunas modificaciones en su composición (Lee y Lee, 1991).

Sin embargo, dadas las dificultades para establecer los medios simbióticos, éstos fueron pobremente desarrollados. Hasta el año de 1919, la dependencia micorrízica de las orquídeas por un determinado hongo (especificidad), fue uno de los problemas más importantes para el logro de los cultivos simbióticos. A pesar de esto, algunos trabajos han contribuido en demostrar que las distintas combinaciones hongo-orquídea, tienen resultados muy diversos (Hadley, 1982; Smreciu y Currah, 1989; Zettler y Hofer, 1998), lográndose combinaciones altamente afines o exitosas para llevar a cabo la propagación simbiótica *in vitro* (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos ejemplos de cultivo simbiótico de orquídeas.

Orquídea	Hongo	Referencia
<i>Listera ovata</i>	n. i.	Rasmussen <i>et al.</i> , 1991
<i>Goodyera pubescens</i>	n. i.	Zettler y McInnis, 1993
<i>Spiranthes cernua</i>	n. i.	Zettler y McInnis, 1993
<i>Cypripedium</i>	<i>Corticium catonii</i>	Arditti, 1992
<i>Didimoplexis minor</i>	<i>Marasmius coniatus</i>	Arditti, 1992
<i>Cymbidium canaliculatum</i>	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Arditti, 1992
<i>Epidendrum ibaguense</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Arditti, 1992
<i>Spathoglottis plicata</i>	<i>Tulasnella calospora</i>	Arditti, 1992
<i>Dactylorhiza purpurella</i>	<i>Thanatephorus sterigmaticus</i>	Arditti, 1992
<i>Goodyera repens</i>	<i>Ceratobasidium cornigerum</i>	Arditti, 1992
<i>Epidendrum radicans</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Arditti, 1992
<i>Platanthera clavellata</i>	<i>Epulorhiza</i> spp.	Zettler y Hofer, 1998

n. i. = no identificado

Actualmente existe la controversia acerca de la eficacia de la propagación de las orquídeas de manera asimbiótica vs. simbiótica. La polémica radica en que el cultivo asimbiótico es, en un gran porcentaje, un método reproducible y eficaz para la propagación

de la mayoría de las orquídeas. Mientras que, el cultivo simbiótico no siempre se logra, aún con aislados de hongos de la misma especie. Comercialmente, en donde el desarrollo de plántulas depende de la composición del substrato o del medio de cultivo, es justificable el producir plantas axenicamente y a gran escala con un (os) medio (s) definidos (s). Sin embargo, una vez logrado el cultivo simbiótico exitoso, las orquídeas en compatibilidad con el hongo son menos dependientes de los componentes del medio (Rasmussen *et al.*, 1991) y el establecimiento de la simbiosis puede traer múltiples ventajas en el caso del manejo de especies vulnerables. En la Tabla 2, se presentan las principales ventajas y desventajas de ambos métodos de propagación de las orquídeas *in vitro*.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la propagación simbiótica y asimbiótica de orquídeas.

	<i>Cultivo simbiótico</i>	<i>Cultivo asimbiótico</i>
Ventajas	<p>1) Cuando se aplica el endófito adecuado se promueve la germinación, el rápido desarrollo y crecimiento mejor que en los mejores medios asimbióticos.</p> <p>2) Se reducen considerablemente el número de insumos, tiempo de cultivo y trabajo durante la propagación.</p> <p>3) Aumenta la sobrevivencia con la aclimatización de las plantas y su reintroducción.</p>	<p>1) Se pueden germinar y desarrollar fácilmente un gran número de semillas y plántulas en un medio con sacarosa (inespecífico).</p> <p>2) El cultivo es axénico, libre de patógenos y parásitos facilitando su manejo.</p> <p>3) Se pueden inducir experimentalmente diversas vías de propagación (embriogénesis, micropropagación, desdiferenciación por callo, etc.).</p>
Desventajas	<p>1) En algunas ocasiones, es difícil aislar el hongo promotor.</p> <p>2) El hongo a través del subcultivo pierde el potencial micorrízico.</p> <p>3) Se debe tener cuidado con la manipulación del hongo ya que es un patógeno potencial de otros cultivos.</p>	<p>1) La dificultad de encontrar el medio o los nutrimentos adecuados para su cultivo <i>in vitro</i>.</p> <p>2) Es relativamente costoso en insumos, mano de obra y tiempo de propagación.</p> <p>3) Para lograr obtener la maduración de la planta hay que llevara a cabo sucesivos trasplantes, lo que aumenta las posibilidades de contaminación de los cultivos y ésta no se alcanza del todo en algunas especies.</p>

2. 4. Reintroducción de orquídeas a su hábitat.

En lo que respecta a la reintroducción a su hábitat natural de orquídeas en peligro de extinción, existen muchos aspectos biológicos que deben ser considerados para poderla practicar, como estudios genéticos y ecológicos, de densidad poblacional, distribución de especies, depredación, desplazamiento, equilibrio, etc. Hagemann (s. f.) estudió los factores indispensables para llevar a cabo la reintroducción en general de especies vulnerables y señaló que los programas que la practiquen deben apegarse estrictamente a los siguientes principios:

- a) Las especies para ser reintroducidas deben presentar una categoría de vulnerabilidad actual o anterior.
- b) El origen del material biológico, plantas o semillas, debe proceder de poblaciones cercanas sin causar daño o merma a las mismas.
- c) Las condiciones ambientales del área a ser repoblada, corresponderán a los requerimientos de la especie particular, la selección adecuada de los sitios y el número de individuos por sitio, entre otros.
- d) Cada reintroducción debe ser científicamente supervisada y documentada.
- e) Se debe asegurar el monitoreo futuro de las áreas recientemente re-instauradas.
- f) Otro de los aspectos importantes es la obtención de un permiso de las autoridades competentes para llevar a cabo la reintroducción, es decir que ésta sea establecida dentro de un programa oficialmente registrado y protegido.

De manera independiente a estos aspectos, que involucran conocimientos ecológicos profundos, una de las limitantes prácticas en los programas de reintroducción de plantas propagadas masivamente, es su sobrevivencia. Gran parte del éxito para lograr la sobrevivencia de una nueva población rescatada biotecnológicamente, es que sea capaz de mantenerse y propagarse por sí misma dentro de la comunidad y radica inicialmente, en el establecimiento exitoso de las plantas a las condiciones del suelo. Esto se debe a que los individuos enfrentan en el trasplante, a una nueva y compleja comunidad microbiológica tanto de organismos benéficos como de patógenos. Ecker (1989) mencionó como un requisito indispensable en la recuperación de especies, el establecimiento de asociaciones

microbiológicas naturales, es decir las que se encuentran originalmente en el hábitat de las plantas al momento de ser reintroducidas. A pesar de que ninguna especie ha sido totalmente recuperada, aún creando nuevas poblaciones que han sobrevivido por algunos ciclos (Pavlik *et al.*, 1993), los esfuerzos encaminados a estas prácticas parecen ser más prometedores en el presente, que inclusive, algunas de las prácticas conservacionistas del ambiente.

De este modo, dentro de las ventajas que confieren a las orquídeas el ser cultivadas simbióticamente, están no sólo alcanzar un mejor y más rápido desarrollo *in vitro*, sino también, la asociación micorrízica que es un mecanismo profiláctico al enfrentarse a su ambiente telúrico. A fines de la década de los noventa, se hizo incapié en desarrollar e implementar nuevamente el cultivo simbiótico en diversas plantas generadas por CTV, con el propósito de incrementar su sobrevivencia en la reintroducción (Ramsay y Stewart, 1998; Zettler y Hofer, 1998; Batty *et al.*, 2001b).

3. ANTECEDENTES

Bletia urbana es una orquídea que se describió inicialmente como endémica del Pedregal de San Angel (Dressler, 1968) y cuya distribución en este lugar se limita a grietas y sitios con abundantes pastos, principalmente del género *Muhlenbergia* spp. *Bletia urbana* se considera como una especie joven o de reciente aparición evolutiva debido a su endemismo; por lo que es probable que en esta zona se encuentre su sitio de origen (Caín, 1951). Esto podría deberse a la naturaleza catastrófica de la explosión del volcán Xitle, lo cual originó la formación de nuevos nichos ecológicos para ser colonizados, donde las comunidades de plantas vecinas fueron candidatas a ocuparlos, para lo cual debieron experimentar cambios adaptativos diversos.

3. 1. Caracterización del hábitat de *Bletia urbana*: Reserva ecológica “El Pedregal”.

La Reserva Ecológica “El Pedregal” de San Angel, está ubicada al sur de la Ciudad de México, dentro del campus de la Universidad Nacional Autónoma de México (Fig. 1). La Reserva está situada a una altitud de 2240 msnm, al SW del Valle de México, con una extensión de 124.5 ha (Valiente-Banuet y De Luna-García, 1994). Este nicho ecológico presenta grietas, fisuras y depresiones que surgieron hace 2500 años a partir de la erupción del volcán Xitle (Rzedowski, 1994). El incipiente suelo que se ha desarrollado a partir de entonces y que se encuentra sobre la capa de lava, es de origen cólico y orgánico y es del tipo arenoso-limoso, moderadamente ácido y rico en materia orgánica. El clima del lugar es templado, presentándose la época de secas en los meses de noviembre a mayo y la temporada de lluvias de junio a octubre (Fig. 2). La temperatura media anual es de 15.5 °C con variaciones que van desde los -6 °C hasta los 34.6° C (Valiente-Banuet y De Luna-García, 1994). La vegetación que se encuentra en el Pedregal es matorral xerófilo con *Senecio praecox*, *Schinus molle*, *Opuntia tomentosa*, *Agave ferox*, *Muhlenbergia robusta*, *Ipomoea hirsutula*, *Cologania biloba*, *Parmelia digitulata*, *Selaginella lepidophylla*, *Marchantia* sp. y *Tillandsia recurvata* como especies predominantes (Rzedowski, 1994).

La familia Orchidaceae en la Reserva se encuentra dentro de las familias con mayor número de géneros representados (11) y con las siguientes 22 especies descritas: *Bletia campanulata*, *Bletia punctata*, *Bletia purpurata*, *Bletia reflexa*, *Bletia urbana*, *Cranichis schaffneri*, *Cyrtopodium punctatum*, *Epidendrum anisatum*, *Govenia superba*, *Habenaria clypeata*, *Habenaria enthomantha*, *Malaxis carnosa*, *Malaxis fastigiata*, *Malaxis myurus*, *Schiedeella hyemalis*, *Schiedeella llaveana*, *Schiedeella pyramidalis*, *Spiranthes polyantha*, *Spiranthes schaffneri*, *Stenorrhynchos aurantiacum*, *Stenorrhynchos cinnabarium*, *Tiphora mexicana* (Valiente-Banuet y De Luna-García, 1994).

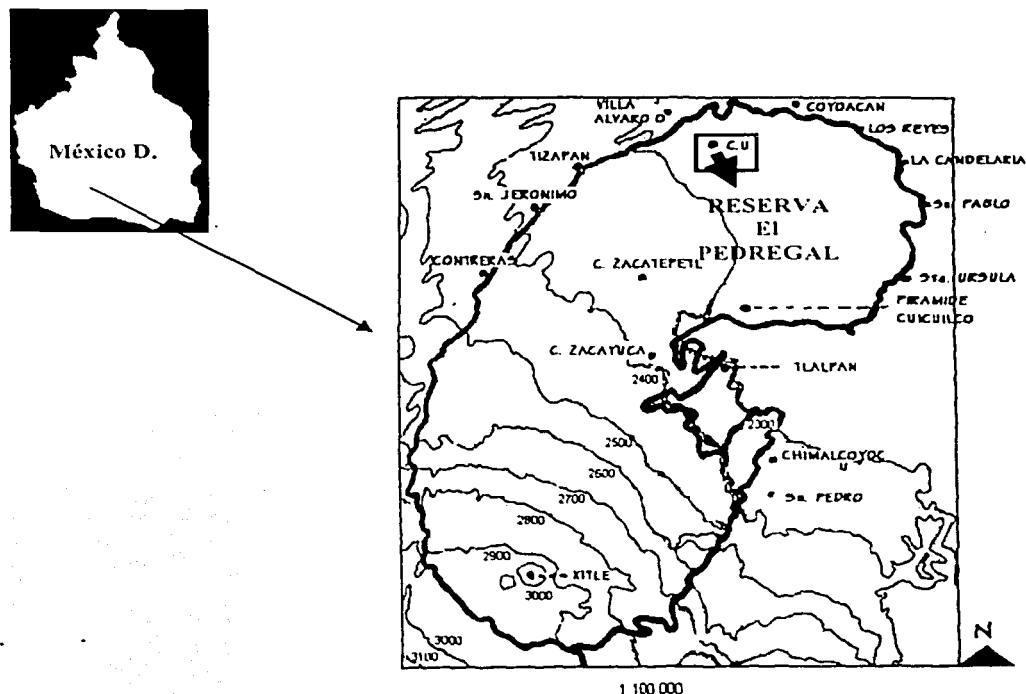


Figura 1. Localización de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Tomado de Rzedowsky (1994).

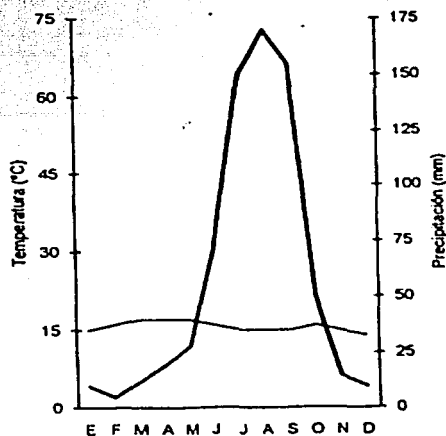


Figura 2. Esquema de temperatura y precipitación de la Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Ángel. Tomado de Soberón *et al.* (1994).

Actualmente, la urbanización al igual que la sobre recolecta, han contribuido a la destrucción y reducción de este hábitat, por lo que esta y otras orquídeas se encuentran amenazadas y en peligro de extinción (SEDESOL, 1994; I.U.C.N, 1997). Las especies vegetales y animales, han tenido que adaptarse para poder sobrevivir o restringirse a zonas donde la perturbación del ambiente natural no es tan intensa (Dodson, 1963). Valiente-Banuet y De Luna-García (1994) pronosticaron una tasa de disminución de especies en la Reserva de un aproximado calculado en 350 especies para 1914, a no menos de 340 en 1954 y cercanas a las 230 en 1987. Se desconocen los datos reales de desaparición de especies para principios de este siglo (XXI) debido a que no existen censos que documenten la abundancia de las mismas. Sin embargo, en el caso de las orquídeas y en particular de *B. urbana*, se puede afirmar que las poblaciones se encuentran muy mermadas; lo cual origina que estén restringiéndose únicamente a manchones o a muy pocos ejemplares dispersos en el paisaje. Causas anexas a este deterioro han sido los incendios, la depredación de las plantas, la construcción urbana en el espacio de la Reserva y la tala que se practica para evitar los incendios. A pesar de los esfuerzos desarrollados desde 1980 iniciados por Chávez para esta especie y que se han continuado hasta la fecha

por Ortega-Larrocea et al. (2002), no ha habido una continuidad en el desarrollo de trabajos ecológicos o biológicos para esta especie. A continuación se presenta una recopilación de los mismos.

3. 2. Micropropagación de *B. urbana* en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

Con el objeto de evitar la extinción y desarrollar prácticas de rescate de especies amenazadas, el grupo de investigación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, se ha avocado a aplicar estas técnicas en la propagación *in vitro* de diferentes grupos de plantas; entre los que destacan las cactáceas y orquídeas, como los más vulnerables a la depredación en nuestro país. En 1993, Rubluo *et al.* reintroducen a la Reserva, algunas poblaciones de orquídeas (*Bletia urbana*, *Lycaste skinneri*, *Lycaste alba*, *Lycaste aromática*, *Lemboglossum ehrenbergii*, *Oncidium stramineum*, *Laelia anceps*, *Encyclia citrina* y *Rhyncholaelia glauca*) y de cactáceas (*Mammillaria haageana*, *Mammillaria huitzilopochtli* y *Mammillaria san-angelensis*) propagadas por CTV. Si bien en muy pocos casos se logró documentar su sobrevivencia y desarrollo, se tenía conocimiento de que algunas especies se reprodujeron asexual y sexualmente en años posteriores (Martínez-Palacios *com. pers.*).

En el caso particular de *Bletia urbana*, los trabajos con esta especie comenzaron en 1980 por Chávez, con el estudio de la biología de su germinación asimbiótica *in vitro*. Posteriormente Martínez (1985) continuó con el cultivo asimbiótico logrando la brotación múltiple *in vitro* a partir de protocormos seccionados. Este último trabajo se complementó con la germinación de las semillas en distintos medios y condiciones de cultivo, publicado en 1989 por Rubluo *et al.* Los primeros intentos de reintroducción se llevaron a cabo a en 1993 por Rubluo *et al.* quienes incorporaron 133 plántulas micropropagadas, de las cuales no se obtuvo un registro de su sobrevivencia después del primer ciclo porque no fueron monitoreadas posteriormente. Algunos aspectos detallados de estos trabajos se discutirán en los Resultados.

3. 3. Cultivo simbiótico de *B. urbana*.

Todos los estudios anteriormente descritos estuvieron relacionados con el cultivo asimbiótico o axénico de *B. urbana*. El cultivo simbiótico se realizó por vez primera en 1998 a partir de un hongo aislado de raíces de un individuo de *Bletia* sp. que crecía en el mismo hábitat que *B. urbana* (Ortega-Larrocea *et al.*, 2000). Con el cultivo simbiótico, se alcanzó el 100% de germinación en semillas micorrizadas provenientes de la misma colección de germoplasma recolectada en 1984 y usada inicialmente por Martínez (1989). Además de esto, se obtuvieron plántulas con raíz en un periodo de tan sólo 28 días de cultivo *in vitro* y sin ningún subcultivo previo, acortando el tiempo de desarrollo *in vitro* logrado en medios asimbióticos, en más de 40 días. Estos resultados indicaron que el hongo aislado era un simbionte natural altamente compatible para la germinación y desarrollo de las semillas y permitieron proponer el cultivo simbiótico, como una estrategia altamente exitosa para la propagación masiva de esta especie.

Sin embargo, para utilizar esta nueva vía de propagación como un mecanismo reproducible, se planteó la interrogante de probar la efectividad de dicho aislado en semillas de germoplasma recientemente recolectado. Del mismo modo, surgió la inquietud de comparar el desarrollo de las plántulas en otros medios asimbióticos y de observar la sobrevivencia de plantas simbióticas después de su reintroducción en campo.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Llevar a cabo la reintroducción de plántulas de *Bletia. urbana* micorrizadas y micropropagadas *in vitro* a partir de semillas.

Objetivos particulares:

1. Comparar la germinación y el desarrollo *in vitro* simbiótico y asimbiótico de semillas de *B. urbana* recién recolectadas y con 14 años de almacenamiento.
2. Comparar su crecimiento y sobrevivencia *ex vitro* en condiciones de invernadero.

5. MATERIALES Y METODOS

a. Procedencia del material biológico.

Se utilizaron semillas de *Bletia urbana* recolectadas en 1984 y 2001. Las primeras procedieron de la colección de germoplasma de 1984 de Rubluo y colaboradores (1989), recolectadas por Martínez (1991) en la Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel, México D. F. y conservadas desde esta fecha a 6 °C. Las segundas fueron obtenidas a partir de dos cápsulas secas indehiscentes recolectadas en el mismo sitio en febrero del 2001. Estas últimas fueron abiertas, homogeneizadas y almacenadas a 6 °C hasta su siembra *in vitro*.

b. Desinfestación de semillas.

Se hicieron pruebas de desinfestación de semillas con hipoclorito de calcio saturado en paquetes de papel filtro según lo registrado por Mitchell (1989). Sin embargo, se obtuvo una mayor efectividad desinfectando las semillas en paquetes de tela de monofilamento de nylon (37 micras), sumergidas y agitadas en hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 15 minutos. Cada paquete contuvo 0.001 g de semillas que fueron enjuagadas tres veces en agua destilada estéril en condiciones de asepsia, previamente a su siembra.

c. Elaboración de los medios de germinación.

Se elaboraron tres medios de germinación que consistieron en dos medios asimbióticos, el Medio Knudson C (MKC) (Knudson, 1946) enriquecido con 10% de agua de coco (Rubluo *et al.*, 1989). El otro fue un medio utilizado comúnmente en los Jardines Botánicos de Kew para la propagación de orquídeas en general, denominado Medio de Kew-A (MKA) (Mitchell, 1989). El medio de tipo simbiótico consistió en Medio Básico de Avena (MBA) (Mitchell, 1989) en el que se inoculó el hongo micorrízico de *Bletia* sp. aislado por Ortega-Larrocea *et al.* (2000). Los componentes de cada medio se presentan en el Anexo 1.

d. Siembra de semillas en medios simbiótico y asimbióticos.

La siembra de las semillas de *B. urbana* en los medios se hizo bajo un procedimiento aleatorio en el que los tratamientos consistieron en los medios de cultivo (MBA, MKC y MKA) y las unidades experimentales consistieron en cajas de Petri con 30 mL de medio. Cada bloque experimental constó de 6 unidades con 8 repeticiones cada una y con las siguientes claves:

BU84MKC = *B. urbana* recolectada en 1984 e incubada en medio asimbiótico MKC.

BU84MKA = *B. urbana* recolectada en 1984 e incubada en medio asimbiótico MKA.

BU84MBA = *B. urbana* recolectada en 1984 e incubada en medio simbiótico MBA.

BU01MKC = *B. urbana* recolectada en el 2001 e incubada en medio asimbiótico MKC.

BU01MKA = *B. urbana* recolectada en el 2001 e incubada en medio asimbiótico MKA.

BU01MBA = *B. urbana* recolectada en el 2001 e incubada en medio simbiótico MBA.

Debido a que únicamente se trabajó con un aislado micorrízico previamente probado en esta especie (ver antecedentes), se utilizó solamente un medio simbiótico.

Las semillas fueron sembradas por bloques y cada caja fue sellada con una película plástica (*ega-pack*). Las cajas se incubaron en un cuarto de cultivo a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad y una iluminación de 1500 lux. Con el objeto de evitar cualquier efecto de la iluminación en el crecimiento de las plantas, los bloques fueron cambiados de lugar en forma rotatoria 2 veces por semana.

e. Obtención del aislado micorrízico.

Se llevó a cabo la resiembra del aislado micorrízico purificado y probado por Ortega-Larrocea y colaboradores en diciembre de 1998 (Ortega-Larrocea *et al.*, 2000). Se subcultivó previamente en medio PDA (Papa Dextrosa Agar) y se añadió una sección de aproximadamente 0.5 cm³ de este medio a cada una de las cajas de cultivo simbiótico.

f. Registro de la germinación y desarrollo.

Se hicieron observaciones semanales de las semillas bajo el microscopio estereoscópico (40 x). La germinación se registró hasta el día número 32 cuando hubo ruptura de testas, emergencia de la semilla y síntesis de clorofila. A partir de los 37 días de crecimiento se midió la altura de algunos de los protocormos ($n=30$).

g. Subcultivo de protocormos.

El subcultivo de los protocormos de *B. urbana* a los mismos medios de su correspondiente tratamiento, se llevó a cabo una vez en que éstos pudieron manipularse adecuadamente. Todos los subcultivos se trasplantaron a frascos comerciales de 150 mL con 50 mL del medio correspondiente. Se colocaron individuos por frasco que fueron incubados en las mismas condiciones descritas anteriormente.

h. Fijación del material biológico.

Con el objeto de corroborar la micorrización de *B. urbana*, se fijaron protocormos antes del primer subcultivo, así como las raíces de las plántulas antes de su trasplante a suelo. Se utilizó la fórmula fijadora de Navashin (Johansen, 1940) (Anexo 1) en la que se sumergieron los tejidos por 24 horas después de las cuales, se lavaron con agua corriente y se preservaron en una solución de alcohol etílico al 70%.

i. Trasplante a suelo.

Cuando las plantas de *B. urbana* desarrollaron raíces *in vitro* fueron trasplantadas a suelo bajo condiciones de invernadero. El suelo fue previamente recolectado en la Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel, secado al aire libre, tamizado (2 mm), homogeneizado y esterilizado en autoclave durante 30 min a 15 lb de presión. Las plantas se colocaron individualmente en macetas de 70 cm³ (100 g), llenadas en su base con 1/3 parte del volumen con tezontle y el resto con el suelo.

Previo al trasplante, se registró el largo de las hojas, de las raíces y el diámetro del bulbo. Una vez *ex vitro*, las plantas se aclimatizaron en la cámara de incubación de cultivo *in vitro* durante una semana. Posteriormente, 12 macetas por bloque fueron colocadas en un microambiente que consistió en charolas transparentes (27x 27 x 12 cm) con tapa.

j. Aclimatización en invernadero.

La aclimatización en invernadero se llevó a cabo en el microambiente generado en las charolas, a una temperatura de 32 ± 5 °C, humedad relativa mayor de 80% y regadas por aspersión con agua corriente 1 vez por semana. Las plantas simbióticas no presentaron contaminación en el sustrato, mientras que las asimbióticas requirieron además, de una aplicación del fungicida Captán 2 gl^{-1} .

k. Reintroducción a su habitat.

El ensayo de reintroducción a su habitat en la época de lluvias (11 de julio del 2001) se hizo únicamente con las plantas micorrizadas. Se reintrodujeron dos grupos de plantas, unas que habían sido aclimatizadas en el invernadero durante más de 1 año (Ortega *et al.*, en prensa) y las aclimatizadas en este trabajo durante 54 días.

Previo al trasplante a su hábitat, las plantas fueron pre-aclimatizadas al exterior del invernadero durante un día a la sombra y marcadas al azar con cintas plásticas numeradas, adjudicándoles aleatoriamente los sitios de reintroducción. La reintroducción consistió en el trasplante de las plantas en grupos de 10 individuos, mapeados con ayuda de un geoposicionador (GPS) y dispuestos en asociación con individuos adultos de *Mulhenbergia* sp. en cavidades rocosas con acumulación de suelo.

l. Monitoreo de las plantas.

Se hicieron cuatro visitas a los microhabitats a lo largo de un año, para observar la dinámica de las plantas. La primera fue recién finalizada la época de lluvias 42 días después de su reintroducción; la segunda en época de secas, 180 días después; la tercera precedente a la época de lluvias 270 días después y la cuarta en la época de lluvias, 371 y 416 días después. El monitoreo consistió únicamente en la identificación de los sitios y de los individuos, registro de información sobre depredación y cuantificación del número de individuos sobrevivientes y su altura en el año y su registro fotográfico.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

a. Germinación simbiótica y asimbiótica de *B. urbana*.

La germinación de semillas de *B. urbana* ocurrió tanto en los medios asimbióticos como en el simbiótico y en condiciones de iluminación (Chávez, 1980; Martínez, 1985; Rubluo *et al.*, 1989 y Ortega-Larrocea *et al.*, 1999). A 48 horas después de la siembra, la mayoría de éstas se tornaron verdes (clorofilicas) en los tres medios. Considerando que la germinación se inicia al romperse la testa y que la semilla germina tanto en el medio asimbiótico como en el simbiótico, *B. urbana* puede prescindir de las micorrizas o de los nutrimentos al inicio de este proceso. Esto se ha encontrado para otras especies de orquídeas como *Spiranthes magnicamporum* (Anderson, 1991).

El monitoreo de la germinación se realizó semanalmente, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas debidas al tiempo en los medios de cultivo hasta el día 32, cuando el mayor porcentaje ocurrió en el tratamiento asimbiótico Knudson C enriquecido (MKC) (Fig. 3). Esto ocurrió en las semillas recolectadas en 1984 y en las del 2001, siendo ligeramente mayor en las semillas recién recolectadas. Este medio fue seleccionado de acuerdo a lo publicado por Rubluo *et al.* (1989) quienes obtuvieron un 100% de germinación para el mismo germoplasma recientemente recolectado.

La germinación en el otro medio asimbiótico Kew A (MKA), recomendado para una gran diversidad de semillas de orquídeas, fue ligeramente menor que en el tratamiento simbiótico Medio Básico de Avena (MBA). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre ambos medios (Tabla 3). El porcentaje de germinación del tratamiento MKA de las semillas recolectadas en 1984 fue mayor (55%) con respecto a las recolectadas recientemente (35 %). Esto también se observó en el tratamiento simbiótico (MBA), en el que germinaron un mayor número de semillas recolectadas en 1984. Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tuckey para las medias no fueron significativos para el tiempo de recolecta de las semillas, es decir la edad de las mismas. Estas pruebas resultaron significativas únicamente entre los tratamientos asimbióticos MKC y MKA ($p < 0.001$) sin que existieran tampoco efectos por la interacción (Tabla 2). Esto significa que el tiempo de recolecta y/o de almacenamiento de las semillas no tiene un efecto ponderante en la germinación debido a que en ambas fechas, se observaron patrones de germinación similares (Fig. 3).

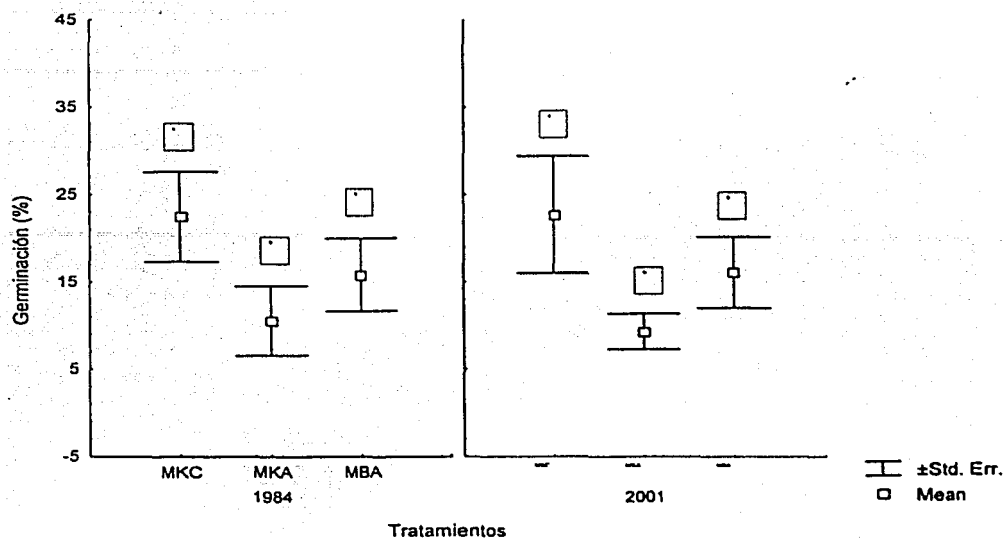


Figura 3. Germinación *in vitro* de *Bletia urbana* a los 32 días en diferentes medios: asimbióticos MKC (Medio Knudson C) y MKA (Medio Kew A) y simbiótico MBA (Medio básico de avena). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Semillas recolectadas en 1984 y en el año 2001.

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA de dos vías) para la evaluación de la germinación de las semillas de *B. urbana* a los 32 días.

	df	MS	Df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
Recolecta	1	0.600568	48	180.5676	0.003326	0.95425
Tratamientos	2	708.4634	48	180.5676	3.923536	0.026411
1 x 2	2	3.347732	48	180.5676	0.01854	0.981638

1 = semillas recolectadas en 1984 y 2001, 2 = Medios MKC, MKA, MBA

Chávez (1980) y Rubluo *et al.* (1989) trabajaron con semillas de *B. urbana* recién recolectadas (menos de tres meses de almacenamiento) y demostraron que éstas eran viables y germinaban en un alto porcentaje (del 70 al 80 % en MKC no enriquecido y hasta el 100%

en MKC enriquecido, respectivamente). En este trabajo, también se demostró que las semillas del mismo germoplasma de los trabajos de Rubluo *et al.* (1989) y Ortega-Larrocea *et al.* (1999) germinaron sin presentar problemas de viabilidad y/o dormancia, después de 15 años de ser recolectadas. Sin embargo los porcentajes de germinación que encontramos en el presente nunca alcanzaron el 100% como en los trabajos anteriores. Estas diferencias pueden deberse probablemente a otras causas como la mayor contaminación que se presentó en las semillas recolectadas recientemente debido a que una de las cápsulas contenía partículas de suelo y que modificó los tiempos de desinfestación para todos los tratamientos. El aumento de los tiempos de desinfestación para todos los tratamientos pudo producir una mayor mortalidad que fue observada al microscopio estereoscópico cuando las semillas que presentaban el embrión nunca se imbibieron o se tornaron clorofilicas (Chávez, 1980). Dado que la siembra de las semillas fue completamente al azar entre los tratamientos y fueron sembradas el mismo día y bajo las mismas condiciones, es poco probable que las diferencias entre los mismos se deban a la prolongación de los tiempos de desinfestación o de imbibición en agua durante su siembra. En cuanto al efecto de la luz, también se evitaron efectos de borde entre los tratamientos al rotar las cajas de Petri para que todas las semillas tuvieran las mismas condiciones de iluminación.

El efecto prolongado de la viabilidad de las semillas de orquídeas terrestres se ha observado para otras especies como *Spiranthes cernua* y *Goodyera pubescens* (Zettler y McInnis, 1993) quienes señalan que las semillas son viables por más de tres años de almacenamiento. Martínez (1991) encuentra que la viabilidad se conserva siempre las semillas se encuentren almacenadas a una temperatura de 4 a 8°C. Otros estudios indican que la viabilidad se puede prolongar un mayor tiempo como en el caso de *Spiranthes lacera* en la que sus semillas germinaron después de cinco años de almacenamiento (Zelmer y Currah, 1997).

b. Desarrollo *in vitro* de las plantas de *B. urbana*.

El desarrollo de las plantas *in vitro*, se midió a través de su altura a los 37 días de cultivo en los tres diferentes medios (Fig. 4). Se puede observar que en los tratamientos asimbióticos (MKC y MKA) tanto de las semillas recolectadas en 1984 como en las del 2001, las alturas son similares, siendo ligeramente más altas las de MKC con semillas de 1984. En el tratamiento simbiótico (MBA), la altura de las plantas fue varias veces mayor que en las de los medios

asimbióticos y también ligeramente más altas en las semillas recolectadas en 1984 que en las del 2001. El ANOVA (Tabla 4) demostró diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre los tratamientos, sin embargo la prueba de Tuckey entre las medias tampoco resultó significativa para el tiempo de recolecta ni para la interacción, pero sí entre los tratamientos asimbióticos vs. simbiótico ($p < 0.001$).

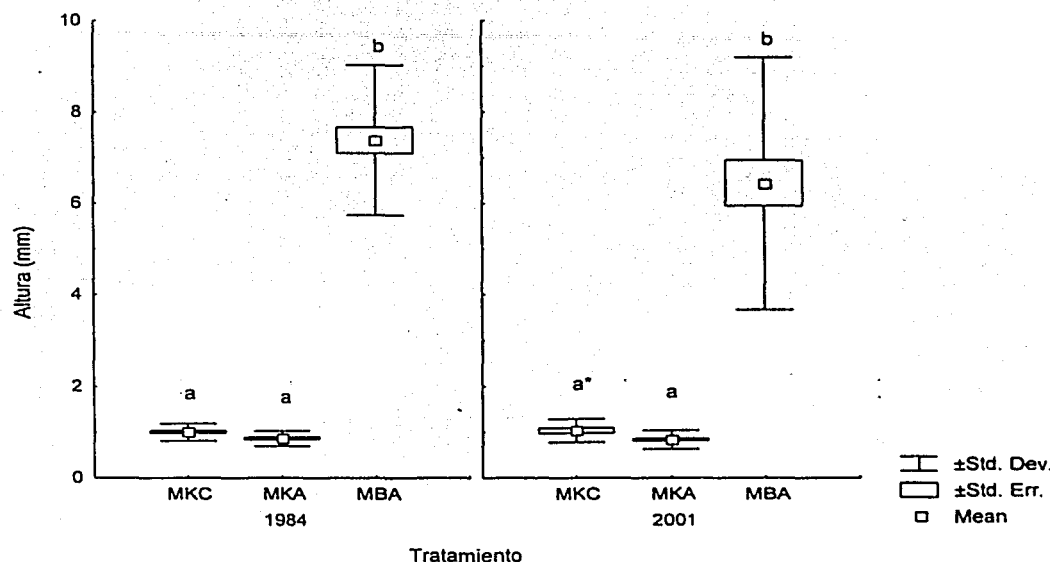


Figura 4. Altura promedio ($n=30$) de las plántulas de *Bletia urbana* *in vitro* a los 37 días de cultivo en diferentes medios: asimbióticos MKC (Medio Knudson C) y MKA (Medio Kew A) y simbiótico MBA (Medio básico de avena). Semillas recolectadas en 1984 y en el año 2001. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.001$). * $n=20$.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA de dos vías) para la evaluación de la altura en plántulas de *B. urbana* a los 37 días de cultivo *in vitro*.

	Df	MS	Df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
Recolecta	1	4.07277	164	1.846717	2.205411	0.139447
Tratamiento	2	689.3693	164	1.846717	373.2945	0
1 X 2	2	4.384478	164	1.846717	2.374202	0.096281

1 = semillas recolectadas en 1984 y 2001, 2 = Medios MKC, MKA, MBA

Si bien no se encontraron diferencias en la germinación propiamente entre los medios simbióticos y asimbióticos, la micorrización si repercutió definitivamente en el posterior crecimiento de los protocormos micorrizados desde los primeros días de desarrollo. De la misma manera que lo descrito por Ortega-Larrocea *et al.* (en prensa) para esta especie, se presentó un mejor desarrollo morfológico y tamaño comparado en las plantas micorrizadas, con respecto a las plántulas de los medios asimbióticos (Fig. 5a-c). Esto ocurrió aún cuando la mayor germinación se encontró en el medio asimbiótico MKC; sin embargo se observa que la formación de protocormos fue la más lenta comparada con los otros dos medios. Esto coincidió con lo observado por Tsutsui y Tomita (1990) y Light y MacConaill (1998) en *Spiranthes sinensis* y *Liparis nervosa*, respectivamente, donde los porcentajes de germinación no estuvieron relacionados con el posterior desarrollo de los protocormos.

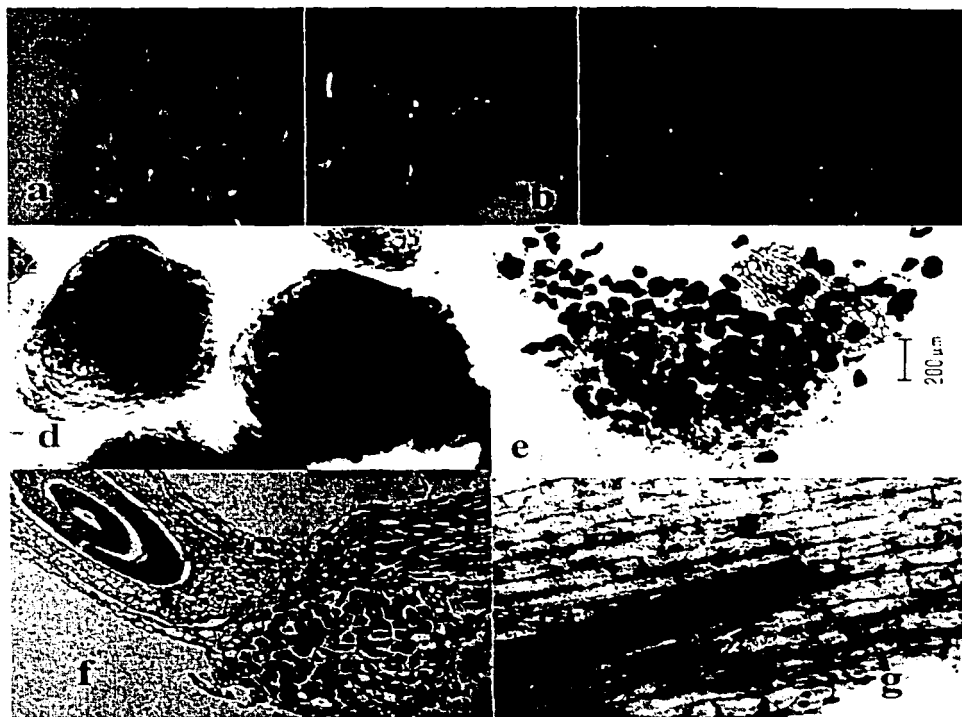


Figura 5. Desarrollo morfológico de *B. urbana* en medios asimbióticos (MKC y MKA) y simbiótico (MBA). a. Protocormos en MKC a los días 22 días (foto tomada a 25x). b. Protocormos en MKA a los días 22 días (foto tomada a 25x). c. Protocormos en MBA a los días 22 días (foto tomada a 16x). d. Pelotones intracelulares de *Rhizoctonia* sp. en un protocormo simbiótico. e. Protocormo de menos de 15 días invadido por estructuras fúngicas. f. Expansión del tejido simbiótico en la base del protocormo y raíz (flechas blancas). g. Tejido radical de una plántula en medio asimbiótico, nótese la ausencia de pelotones fúngicos (flecha negra indica el haz vascular).

Las enormes diferencias en la altura y desarrollo de las plántulas que se presentaron entre los medios asimbióticos y el simbiótico, son una consecuencia indudable del efecto de la micorriza (Ortega-Larrocea *et al.*, en prensa). Este efecto "acelerador, sinérgico o promotor" de las micorizas en las orquídeas, ha sido observado en muchos otros cultivos simbióticos y provoca que en poco tiempo desarrollen el estadio de protocormo, llegando así rápidamente a ser plántulas (Clements, 1988; Smerciu y Currah, 1989; Tsutsui y Tomita, 1990; Anderson, 1991; Zettler *et al.*, 1995; Markovina y McGee, 2000; Kulikov y Filippov, 2001). A través de la fijación y tinción de los diferentes estadios de los protocormos y las plántulas, se evidenció en todos ellos, la formación de las estructuras típicas de esta simbiosis (pelotones hifales) (Fig. 5d). Los pelotones son estructuras tridimensionales de hifas que se ramifican y anastomosan dentro de las células, entre la pared vegetal y la membrana celular (Arditti, 1992). Los pelotones se desarrollaron en casi todo el tejido de los protocormos (Fig. 5e) y fueron extendidos hacia las raíces cuando éstas emergieron (Fig. 5f). Se verificó la ausencia de estas estructuras en los tratamientos asimbióticos (Fig 5g).

Es posible que las semillas hayan agotado los recursos del medio para desarrollarse después de la germinación, dado que el primer subcultivo se realizó después de los tres meses. Esto se debió a que los tamaños de las plantas propagadas simbióticamente permitieron que el primer subcultivo se llevara a cabo a los 42 días y en las asimbióticas después de los 90. Dadas las enormes diferencias en el desarrollo de las plántulas entre los medios asimbiótico y simbiótico, la altura promedio (mm) *in vitro* alcanzada en el momento del primer subcultivo a los 88 días, fue considerada únicamente para los tratamientos asimbióticos (Tabla 5). La altura de las plantas en ambos medios asimbióticos fue significativamente mayor en el medio Kew A, comprobándose nuevamente que a pesar de haber sido MKC el mejor medio para la germinación, no lo fue para el posterior desarrollo de los protocormos. En esta Tabla también se observa que no existen diferencias atribuibles al tiempo de recolecta de las semillas en el desarrollo de las plántulas, como lo se ha observado desde la germinación y en los medios simbióticos.

Tabla 5. Altura promedio (mm) de plántulas de *B. urbana in vitro* en dos medios de cultivo asimbióticos: Knudson (MKC) y Kew A (MKA) y en dos tiempos de recolecta de las semillas (1984 y 2001) ($n= 30 \pm d. e.$).

Tratamiento	88 días
BU84MKC*	2.92 ± 0.45^a
BU01MKC	2.42 ± 0.82^a
BU84MKA	4.29 ± 1.28^b
BU01MKA	5.34 ± 1.29^b

* $n = 10$, letras diferentes indican diferencias a $p < 0.01$.

Sin embargo, cabe destacar que después del primer subcultivo en el medio asimbiótico MKA, los protocormos se tornaron café (posiblemente sufrieron necrosis por oxidación). Este efecto del medio también fue observado por Anderson (1991) en embriones de *Spirantes magnicamporum*, quien lo atribuye a la alta concentración de los nutrimentos en el medio de cultivo. Es posible que se deba a un efecto de toxicidad producido porque este medio contiene dos fuentes de Fe (citrato férrico y sulfato ferroso), la primera le dió una apariencia amarillenta al medio dada la baja solubilidad de este elemento en el agua.

c. Trasplante a suelo.

Una vez que las plántulas alcanzaron el estadio de plántula con cormo, raíz y hoja, se consideraron adecuadas para ser trasplantadas al suelo. El desarrollo radicular ocurrió antes de llevar a cabo el primer subcultivo, a los 42 días en las plántulas simbióticas (MBA) y a los tres meses, en las plántulas cultivadas en MKA. Por otro lado, muy pocas de las plántulas en MKC desarrollaron alguna raíz antes de este tiempo (3 meses). La Tabla 6 muestra el tiempo de cultivo *in vitro* que requirieron las diferentes semillas de *B. urbana* para poder ser aclimatizadas en invernadero. En esta tabla, también se muestra el número de individuos propagados *in vitro* del total de semillas que originalmente se sembraron en cada tratamiento. Se puede observar que para todos ellos, un porcentaje muy bajo del total de semillas sembradas inicialmente, alcanzó la etapa de trasplante a suelo. Ambos porcentajes fueron menores en las plántulas asimbióticas y entre éstas en las cultivadas en MKC. Las plántulas propagadas simbióticamente alcanzaron casi el doble numérico de las asimbióticas durante el cultivo *in vitro*. Cabe destacar que de las plantas asimbióticas, hubo un número limitado de individuos que no fueron trasplantados

debido a que sus condiciones de crecimiento después de seis meses *in vitro*, nunca les permitió alcanzar el estadio de plántula.

Tabla 6. No. de individuos, % del total de individuos sembrados y tiempo de cultivo *in vitro* de *Bletia urbana* al ser trasplantada a suelo.

Tratamiento	No. Individuos trasplantados	% del total de las semillas sembradas	Días de cultivo <i>in vitro</i>
BU84MKC	30	8.3	190 - 212
BU01MKC	12	4.8	205 - 212
BU84MKA	24	10.7	127 - 134
BU01MKA	23	6.7	127 - 134
BU84MBA	91	23.6	52 - 91
BU01MBA	73	21.7	74 - 91

Por otro lado, se observa nuevamente que fue menor el tiempo promedio que requirieron las plántulas simbióticas para que se pudiera llevar a cabo su aclimatización *ex vitro* en dos y medio meses (71.5 días). Para las plantas asimbióticas cultivadas en MKA fue de 4.4 meses (130 días) y para las cultivadas en MKC. de 6.7 meses (201 días). Las diferencias en estos tiempos son de un margen de dos meses, con las consecuentes implicaciones en el gasto de mantenimiento de los cultivos en la cámara de incubación y de espacio ocupado en la misma.

La altura de las plantas, su longitud y número de las raíces fueron registradas en el momento de ser trasplantadas al suelo. El ANOVA y las pruebas de Tuckey indicaron diferencias ($p < 0.001$) únicamente entre las plántulas micorrizadas y las no micorrizadas para las variables altura y longitud de raíces. Para el número de raíces no se encontró alguna diferencia. En cuanto a la altura, se observa nuevamente que las del medio simbiótico (MBA) fueron marcadamente más altas que las de los medios asimbióticos (MKC y MKA) y también que no hubo diferencias significativas debidas al tiempo de recolecta entre las plántulas provenientes de semillas de 1984 con respecto a las del 2001 (Fig. 6).

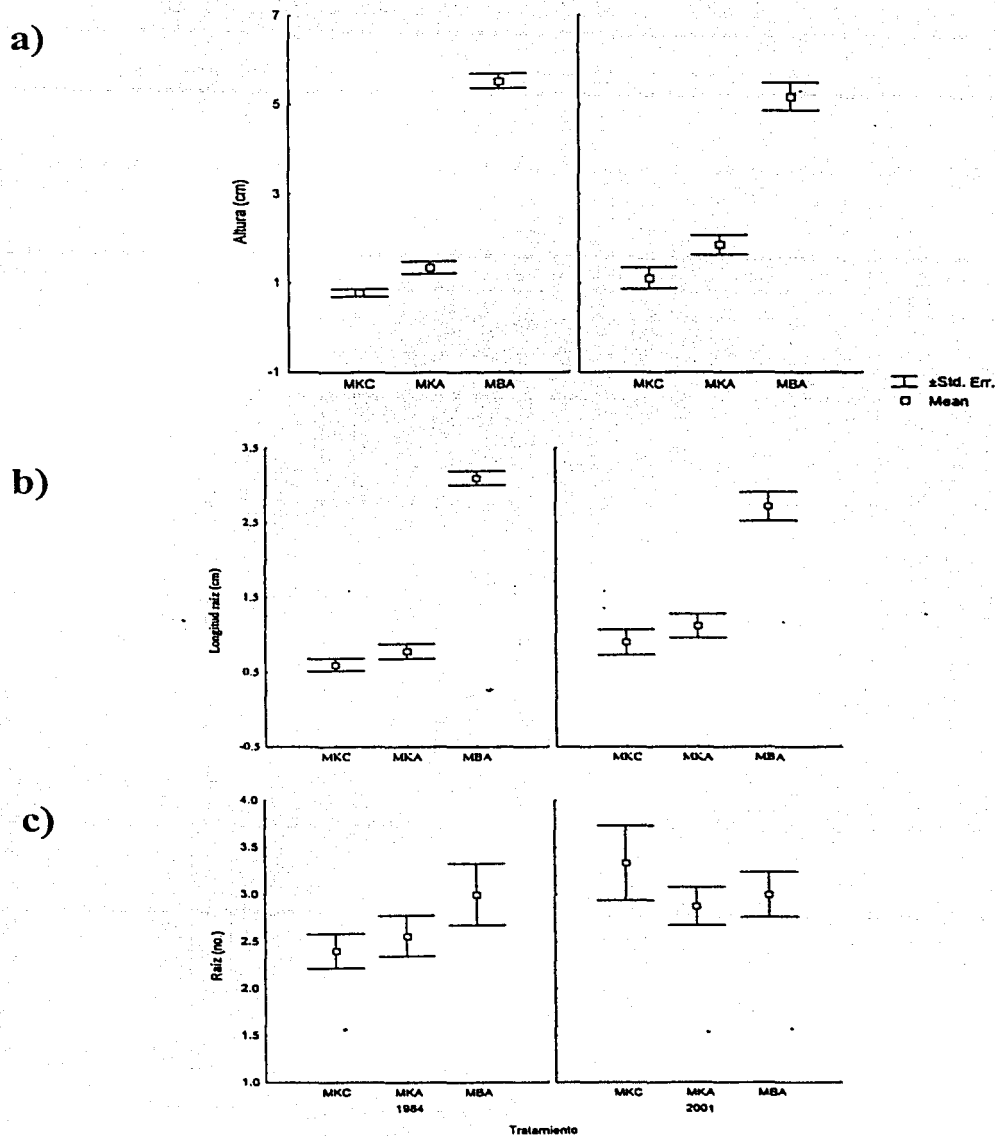


Figura 6. Altura plántulas (a), longitud de raíces (b) y no. de raíces (c) de *B. urbana* al ser trasplantada a suelo y aclimatizada en invernadero.

Por otro lado, la apariencia de las plantas en el momento de sacarlas del medio de cultivo *in vitro* fue muy distinta entre los tres tratamientos. Las plántulas asimbióticas en MKC fueron las más pequeñas y desarrollaron la bráctea y primer hoja, mientras que las cultivadas en MKA y MBA, desarrollaron la bráctea y las dos hojas. Es probable que el menor desarrollo en todas las etapas de las plantas cultivadas en MKC después de la germinación, pudo ser provocado a que la calidad del agua de coco no fue la misma entre los subcultivos (Martínez, 1985), o bien a que existe un azúcar o compuesto orgánico promotor de la germinación en la misma pero no así del desarrollo. El medio de Kew A es más rico en sales minerales, principalmente micronutrientes, lo que muy probablemente repercutió en el desarrollo de los protocormos (Smith, 1932).

Con relación a las raíces, aún cuando no hubo diferencias en el número, se pudo observar que un mayor número de plantas provenientes de semillas recolectadas en el 2001 en los tres tratamientos, desarrollaron 3 raíces. Esto se puede deber al vigor de las semillas, aunque el número de raíces en este estadio puede estar más regulado genética que fisiológicamente y sin embargo, no está influenciado por la formación de las micorrizas.

d. Aclimatización de *Bletia urbana* en invernadero.

El número de individuos sobrevivientes al trasplante a suelo y el tiempo de aclimatización en invernadero se muestran en la Tabla 7. El contraste con los medios asimbióticos continuó durante el proceso de endurecimiento, en donde las plantas simbióticas requirieron únicamente de 1.5 meses, mientras que con las asimbióticas, este proceso no se dio ni después de 5 meses para las cultivadas en MKA ni en 7.8 meses en las cultivadas en MKC. En el porcentaje de sobrevivencia, se obtuvo un mayor éxito en las plantas que fueron cultivadas en el medio MBA, donde el porcentaje de las plantas procedentes de semillas recolectadas en ambos años, fue mayor al 90%. En los medios asimbióticos, del total de los 88 individuos que fueron trasplantados sólo sobrevivieron 3. Anderson (1991) también obtuvo un muy bajo número de individuos asimbióticos sobrevivientes en plantas de *Spiranthes magnicamporum* (2 individuos de un total de 40). Sin embargo, estos resultados también contrastaron con lo obtenido por Rubluo *et al.* (1989) quienes con semillas asimbióticas del mismo germoplasma (recolectadas en 1984), obtuvieron 100% de sobrevivencia durante la

aclimatización. Cabe añadir que en el presente, se presentaron problemas de contaminación superficial por hongos, en el sustrato de las plantas propagadas asimbióticamente dada la alta humedad en las que fueron mantenidas las plantas. Aunado a esto, las plantas se mantuvieron en invernadero un mayor tiempo en el que resistieron menos los periodos de riego y deshidratación debido muy probablemente al tamaño y características con las que fueron sacadas *ex vitro*.

Tabla 7. No. de individuos sobrevivientes en invernadero, reintroducidos y tiempo

Tratamiento	No. Individuos Sobrevivientes	% de sobrevivencia	Días de aclimatización	No. individuos reintroducidos
BU84MKC	1	3.3	151	0
BU01MKC	0	0	151	0
BU84MKA	1	4.2	230	0
BU01MKA	1	4.4	230	0
BU84MBA	88	96.7	37-58	91
BU01MBA	68	93.2	29-58	58
BU84MBA*	n.c.	n.c.	>365	21

de aclimatización en invernadero de *Bletia urbana*.

* individuos aclimatizados durante 1 año, datos en Ortega-Larrocea *et al.* (en prensa), n.c. = datos no cuantificados.

Estos resultados ponen de manifiesto, la importancia que tienen las micorrizas en el desarrollo, sobrevivencia y capacidad de aclimatización de las plantas de *Bletia urbana* micropropagadas. Por estos motivos, en el presente se llevó a cabo la reintroducción a su habitat únicamente de las plantas micropropagadas de manera simbiótica (Tabla 8). Se llevó a cabo una comparación entre plántulas de semillas del mismo germoplasma recolectado en 1984 pero que fueron aclimatizadas en invernadero durante un mayor tiempo (1 año). Las plantas procedían del primer cultivo simbiótico logrado para esta especie (Ortega-Larrocea *et al.*, en prensa). Durante el tiempo que se mantuvieron en invernadero, sufrieron de un proceso de defoliación y permanecieron con su cormo subterráneo, volviendo a presentar las hojas nuevamente en el siguiente ciclo (Ortega-Larrocea *com. pers.*) (Rubluo *et al.*, 1989). Estas plantas fueron diferentes en altura, diámetro del cormo, largo y ancho de las hojas, con relación a las aclimatizadas únicamente de 1 a 2 meses en el presente trabajo. El ANOVA y la prueba de Tuckey demostraron diferencias ($p < 0.001$) entre estas variables para estos tiempos de

aclimatización en invernadero, pero también hubo diferencias entre el tiempo de recolecta de las semillas aclimatizadas por el menor tiempo.

Las diferencias debidas al tiempo de aclimatización pueden deberse únicamente a que las plantas que sobrevivieron el primer ciclo de vida y defoliación, almacenaron reservas en sus cormos subterráneos y alcanzaron un mayor estado de madurez fisiológica. Esto se puede comparar con los ejemplares de campo, en los que a menudo presentan poblaciones de varios individuos y tallas mayores a los 25 cm, indicando que la multiplicación de los cormos subterráneos se da a lo largo de varios ciclos anuales (Rubluo *et al.*, 1989; Rubluo *et al.*, 1993).

Por otro lado, las diferencias encontradas entre las plántulas de semillas recolectadas en distintos años, pudiera estar relacionada con el vigor de los embriones que se manifiesta en condiciones de estrés y no de cultivo *in vitro*, dado probablemente a su madurez, a las condiciones ambientales (Rubluo *et al.*, 1989).

Tabla 8. Algunas variables de crecimiento de las plántulas micorrizadas de *B. urbana* después de su aclimatización en invernadero y de un ciclo anual de sobrevivencia en campo después de su reintroducción. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

Variables de crecimiento	BU84	BUS4	BU01	BUS4 y BU01
	1 año <i>invernadero</i> *	1-2 meses <i>invernadero</i> **	1-2 <i>invernadero</i> ***	1 año en <i>campo</i> ****
Altura (cm)	12.33 ± 1.03 ^a	8.74 ± 1.03 ^b	7.41 ± 0.37 ^c	9.4 ± 0.47
Diámetro del cormo (mm)	84.45 ± 6.51 ^a	34.82 ± 3.47 ^b	20.66 ± 3.83 ^c	n.c.
Largo hojas (cm)	8.61 ± 0.79 ^a	5.80 ± 0.17 ^b	4.79 ± 0.31 ^c	n.c.
Ancho hojas (cm)	0.72 ± 0.06 ^a	0.59 ± 0.03 ^b	0.46 ± 0.03 ^c	n.c.

* $n = 21$, ** $n = 91$, *** $n = 60$, **** $n = 92$, ± e.s., n.c. no cuantificado

e. Reintroducción de *Bletia urbana* a su hábitat.

Se reintrodujeron a campo un total de 170 individuos de *B. urbana* procedentes de ambos periodos de aclimatización en invernadero (Tabla 8). Se plantaron en 17 sitios localizados en una extensión de aproximadamente 250 m² (Figs. 7-9). Como se indicó en la metodología, las plantas fueron integradas a cada grupo de una manera completamente aleatoria y los datos de

los individuos se presentan en el Anexo 2. Pasado un periodo de 42 días, casi la totalidad de las plantas (aproximadamente el 82%) habían perdido sus hojas, sin que se pudiera constatar en ese momento la integridad del corno enterrado. Únicamente tres plantas regeneraron hojas nuevas durante este tiempo y en 29, las mismas hojas se encontraban ligeramente más grandes. A los seis y nueve meses después de la reintroducción, en la época de sequía, ninguna planta conservó sus hojas. Al cabo de un año, después de la época de lluvias, el 61.9% de las plantas reintroducidas aparecieron nuevamente desarrollando casi todas las observadas dos hojas. Se registró la altura de las plantas de la base del suelo al extremo de la hoja; sin embargo, cabe destacar que no se cuantificó hasta la base del corno para no dañar a los ejemplares (Tabla 8, ver anexo 2, datos de reintroducción). En los datos anexos podemos observar que muchas plantas tienen una altura menor a la del año anterior, debido a que no se consideró su corno. Por otro lado, no fue posible constatar en muchos individuos su procedencia original, debido a que no se encontró la etiqueta, no fue posible identificar el número en la misma o permanecía enterrada junto con el corno, el cual no se quiso manipular.

Estos resultados mostraron que muchas de las plantas (las cuales sí pudieron identificarse correctamente), incrementaron su altura después de un año, en un promedio mayor a los 5 cm. Un individuo aumento su tamaño en más de 13 cm y correspondió a una *Bletia* aclimatizada durante más de un año en invernadero (individuo 155). Por otro lado, se observa que algunas otras plantas no alcanzaron su tamaño original, creciendo al año y dos meses (416 días) un promedio de 3 cm menos que cuando fueron reintroducidas. También hubo un individuo que alcanzó únicamente los 2 cm fuera del suelo de una talla original de 13 cm. Dado que muy pocos individuos reintroducidos por un periodo de aclimatización mayor al año, pudieron ser monitoreados, no fue posible correlacionar si los tamaños de las plantas que presentaron las alturas más grandes correspondieron a estos tratamientos. La mayoría de las plantas que no alcanzaron su tamaño original fueron individuos recolectados en 1984. De las plantas que incrementaron sus tamaños, hubo un número similar de semillas de ambas fechas de recolecta. Cabe destacar, sin embargo, que desde el comienzo el número de individuos reintroducidos de semillas de 1984 fue mayor, por lo que se puede inferir que la capacidad regenerativa de estas semillas fue muy buena y similar a la de germoplasma recientemente recolectado. Todos estos datos no pueden ser sometidos a estadística debido a que no se conocen con precisión los valores correctos. Finalmente, cabe destacar que se analizaron datos de recrecimiento en dos periodos (a los 371 y 416 días) después de la reintroducción y se

observó que aparecieron solamente 6 individuos más de la primera a la segunda fecha y 11 menos, sin que hubiera rastro de que las plantas sufrieran desecación o parasitismo, por lo que se puede pensar en algún tipo de depredación.

Por otro lado, la altura y morfología de las plantas reintroducidas fue muchas veces menor que los individuos pertenecientes a las poblaciones naturales (Fig. 7k), cuyas hojas miden alrededor de 25 cm de largo por 3.5 cm de ancho. Otra diferencia fue que las plantas reintroducidas no florecieron, lo que permite suponer que necesitan de algunos periodos de crecimiento antes de que las plantas incorporen suficientes reservas para hacerlo. Rubluo *et al.* (1993) encontraron que plantas de la misma especie micropropagadas y que sobrevivieron en campo durante tres años, desarrollaron protocormos laterales y gruesas raíces.

Por otro lado, la sobrevivencia de *B. urbana* al cabo de un año de haber sido reintroducida a su habitat, puede ser comparada con la citada por estos mismos autores en 1993 para plantas propagadas asimbióticamente. Los autores obtuvieron un 15% de sobrevivencia de un total de 133 individuos aclimatizados en invernadero durante un tiempo no menor a los 30 días. En el presente trabajo, las plantas micorrizadas sobrevivieron cuatro veces más que las no micorrizadas. Es poco probable que estas diferencias puedan deberse al estado de madurez de las semillas con las que las plantas fueron propagadas en su momento, ya en el presente se trabajó también con germoplasma recolectado recientemente. Otros factores que pudieron influir son diferentes condiciones ambientales prevalecientes en ambos tiempos (casi 15 años después), a las características topográficas y de sitio en las que las plantas fueron colocadas.

Esta tesis mostró aspectos importantes de la biología de la propagación simbiótica de *Bletia urbana*. No sólo se pudo demostrar nuevamente lo ya descrito por Ortega-Larrocea *et al.* (en prensa) acerca de la efectividad del hongo aislado y la formación de la simbiosis, después de ser subcultivado durante varios ciclos. También se pudo comprobar la habilidad para formar la simbiosis y la dependencia micorrízica de las semillas recién recolectadas. Se demostró que no existen diferencias significativas en la germinación y crecimiento de las plantas por el periodo de almacenamiento, lo cual tiene, junto con el punto anterior, importantes ventajas en la viabilidad de los bancos de germoplasma para esta especie. Por otro lado, se pudo comparar el cultivo simbiótico con otros medios asimbióticos que permitieron nuevamente poner a prueba las bondades del primer método en cuanto a la propagación masiva. No se descarta que existan otros medios asimbióticos más competentes como puede ser los enriquecidos con extractos orgánicos como el plátano (Martínez, com. pers.). En este sentido, este trabajo también

aporta información acerca de la efectividad del medio Knudson C enriquecido con agua de coco para la germinación de las semillas, pero también se obtuvo un medio asimbiótico mejor como el Kew A.

De acuerdo a lo propuesto por Rubluo *et al.* (1993), la propagación asimbiótica *in vitro* para esta especie por distintas vías morfogénicas es una estrategia para su rescate. En el presente se propone que la micorrización masiva *in vitro*, es otra vía altamente exitosa de propagación, que si bien no pretende sustituir el cultivo simbiótico, pero que si debe ser considerada *como una estrategia más para su reintroducción*.



Figura 7. Aspecto de las plantas de *B. urbana* reintroducidas y de los sitios de reintroducción. Vista general de las plantas aclimatadas durante (a) 1-2 meses y (b) un año de aclimatización en invernadero. Tamaño y aspecto de las plantas aclimatizadas durante (c) 1-2 meses y (d) un año, en el momento del trasplante. Aspecto del trabajo de campo en el momento del trasplante (e) y en campo (f). Vista general de las plantas reintroducidas en diferentes sitios, (g) sitio 1 y (h) sitio 17. Marcaje del sitio 7 (i). Aspecto general de la vegetación de la Reserva Ecológica "El Pedregal" la época del trasplante (j). Individuos re-emergentes después de un año de haber sido reintroducidos, sitio (k).

a)

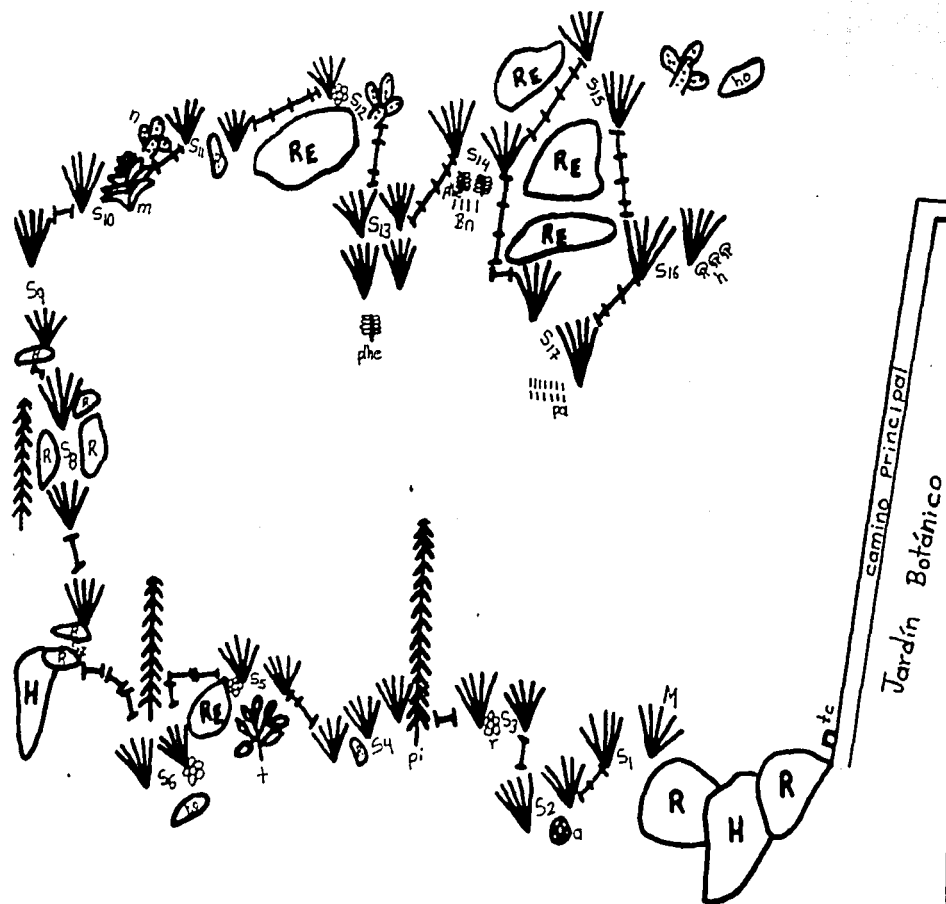
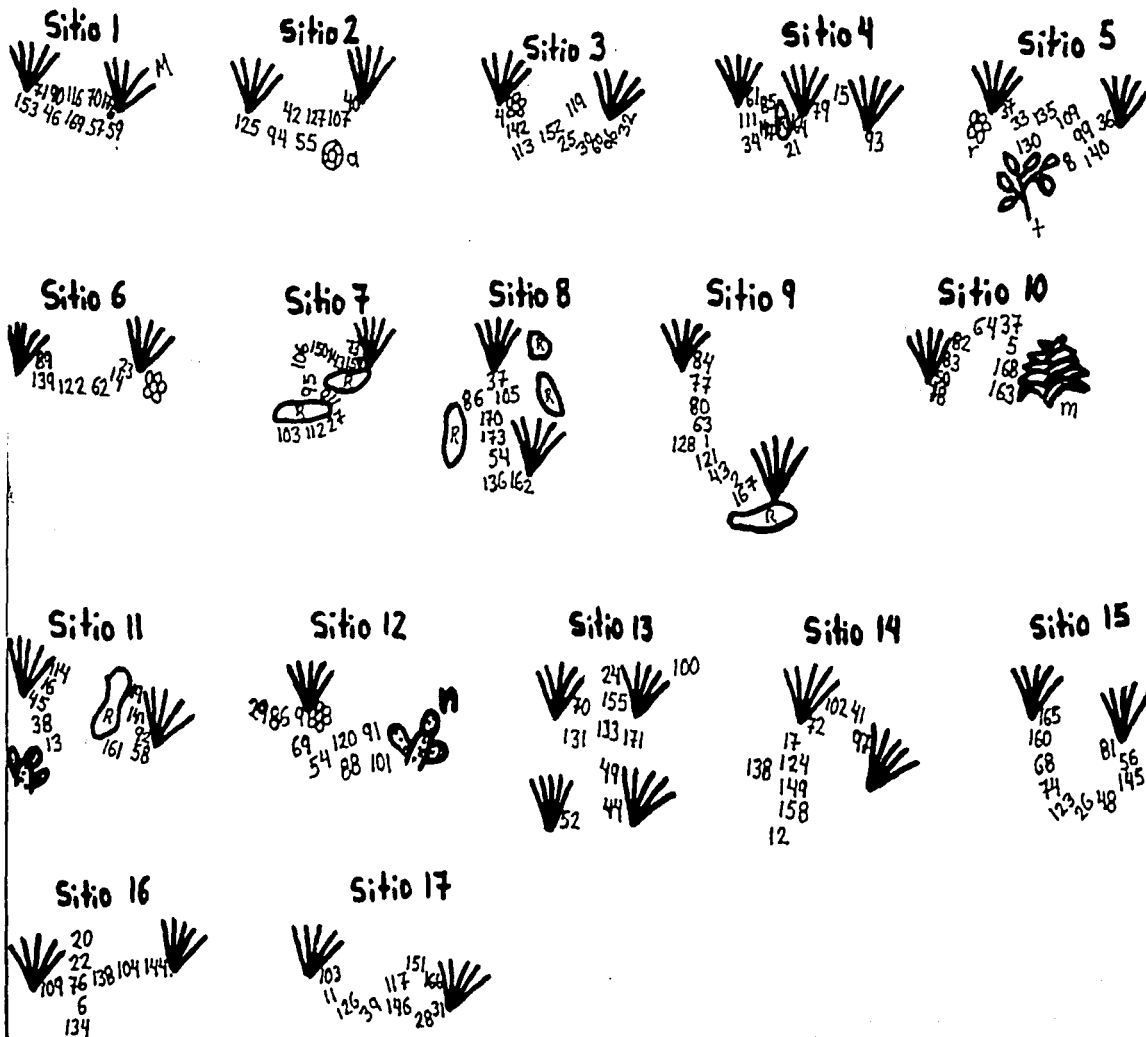


Figura 8. a. Esquema de la localización de los 17 sitios en los que fueron reintroducidos distintos grupos de plantas (b) de *B. urbana* en la Reserva Reológica "El Pedregal" de San Ángel, México D. F. durante el mes de julio del 2001. H = hondonada, R = roca, RE = Roca en explanada, pi = pino, a = Acacia, h = hongo, ho = hondonada pequeña, plhe = helechos, M = *Moulenbergia*, m = maguay, r = roseta, tc = tanque

de concreto, t = tepozán, Bn= *Bletia* natural, pa = pasto, n = nopal

b)

Disposición de las plantas por sitio



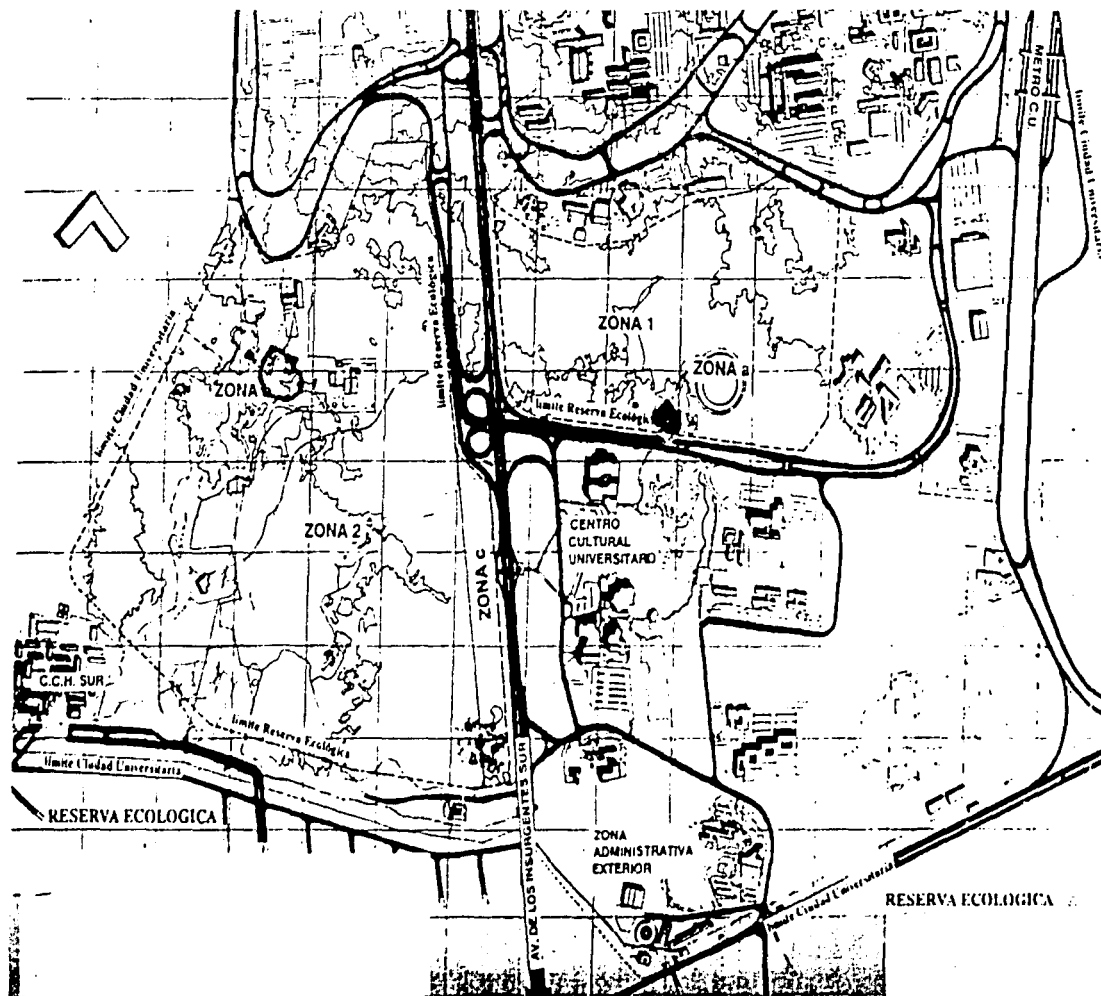


Figura 9. Localización de la zona de reintroducción en la Reserva Ecológica "El Pedregal". Tomado de Rojo, 1994b.

7. CONCLUSIONES

1. La germinación de las semillas de *Bletia urbana* estuvo influenciada por el medio de cultivo ($p < 0.05$), siendo el medio asimbiótico Knudson C enriquecido con 10% de agua de coco y 3% de sacarosa, el que promovió una mayor germinación a los 32 días de cultivo *in vitro*. Esto permitió corroborar nuevamente lo encontrado por Rubluo *et al.* (1989) para este medio en la misma especie. Los otros medios probados, el asimbiótico Medio de Kew A y el simbiótico Medio básico de avena, fueron igualmente efectivos en la germinación de las semillas. Con relación a la fecha de recolecta, no se presentaron diferencias en la germinación de las semillas de 1984 y 2001, por lo que cabe mencionar que después de un periodo de 14 años de almacenaje, éstas conservaron su viabilidad y capacidad regenerativa, mostrando inclusive un patrón de germinación similar en todos los medios probados.
2. Aún cuando el medio simbiótico no fue el mejor para la germinación, el desarrollo de las plántulas durante su cultivo *in vitro*, cuantificado a través de la altura, fue significativamente en las plantas micorrizadas ($p < 0.001$). Entre los medios asimbióticos, no se encontraron diferencias en relación a este parámetro ni tampoco para ninguno de los tres medios, en los años de recolecta de las semillas.
3. El tiempo de cultivo *in vitro* simbiótico de *B. urbana* fue de 52 a 91 días y de 127 a 212 días en el asimbiótico, requiriendo las plantas no micorrizadas de hasta 150 días más de cultivo. El número de individuos simbióticos trasplantados a suelo fue de 164 simbióticos con la mitad de tratamientos (un sólo medio) y 89 asimbióticos con el doble de tratamientos (dos medios probados). Del número de semillas sembradas originalmente, el 24% de las cultivadas simbióticamente, fueron trasplantadas exitosamente al invernadero, en contraste con el 5 al 11% de las obtenidas de manera asimbiótica. Por otro lado, se presentaron diferencias considerables en la altura y longitud de las raíces de las plantas cultivadas simbióticamente al momento del trasplante *ex vitro*, pero no así en el número de raíces. Se observaron ligeras diferencias en las primeras dos variables en las plantas cultivadas asimbióticamente siendo mayores en el medio de Kew A en relación al Knudson C enriquecido sin que esto modificara el número final de individuos aclimatizados en invernadero.
4. Respecto a la sobrevivencia en invernadero, no se observaron diferencias atribuibles a la época de recolecta de las semillas en las plantas micorrizadas. En el caso de las plantas no micorrizadas, hubo una mayor sobrevivencia de las plantas procedentes de las semillas recolectadas en 1984.

5. Por los largos tiempos de cultivo y aclimatización de las plantas en los medios asimbióticos obtenidos en este trabajo, no fue posible llevar a cabo la reintroducción de las mismas. Después de 230 días de aclimatización en invernadero, se obtuvo menos del 5% de sobrevivencia de estas plantas; situación contrastante con los resultados obtenidos en las plantas micorrizadas cuyo periodo de aclimatización fue de un máximo de 60 días, con una sobrevivencia cercana al 97%. Más aún, la sobrevivencia en el invernadero de plantas micorrizadas por un periodo mayor al año, fue también mayor que la de las estas plantas no micorrizadas. Esto permitió llevar a cabo la reintroducción de este lote que, inclusive, había cumplido un ciclo estacional de cultivo en invernadero. Es muy probable que estas diferencias hayan sido debidas a la gran desventaja en tamaño con las que fueron aclimatizadas las plantas asimbióticas, que hubiera podido evitarse con un mayor número de subcultivos durante su cultivo *in vitro*.
6. Se llevó a cabo la reintroducción en la Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel, de 170 plantas de *B. urbana*; 12% de las cuales procedían de un periodo de aclimatización mayor al año. Al cabo de un año de sobrevivencia en condiciones naturales, se registró el recrecimeitno de 99 de las plantas a partir de los bulbos subterráneos (61.9%). No fue posible correlacionar a qué individuos reintroducidos originalmente correspondían muchas de estas plantas, debido a que muchos de los marcadores plásticos sufrieron pérdida o deterioro. Sin embargo, fue posible reconocer de forma muy aproximada, la localización de los individuos de acuerdo al croquis realizado inicialmente y la localización de todos los sitios, lo que servirá para su posterior monitoreo.
7. Se comprobó satisfactoriamente que la propagación simbiótica *in vitro* de esta especie, es una estrategia altamente exitosa para ser considerada en futuros programas de reintroducción y restauración ecológica: se comprobó la viabilidad de las semillas después de 15 años de almacenamiento; la eficacia del hongo simbionte en semillas frescas y almacenadas durante largo tiempo; la disminución de los tiempos de propagación y aclimatización *in vitro* y *ex vitro* de las plantas simbióticas, la disminución del trabajo e insumos de laboratorio, y lo más importante, un alto porcentaje de sobrevivencia en campo que es muy alentador para llevar a cabo el rescate de esta especie en sus condiciones naturales. Este trabajo puede servir como un modelo para la reintroducción de otras especies de orquídeas.

8. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el probar otros medios asimbióticos que pueden ser más competitivos con el aislado micorrízico, como los enriquecidos con extractos orgánicos como el plátano. Por otro lado, también se sugiere llevara a cabo subcultivos más frecuentes en los cultivos asimbióticos de manera que las plantas puedan alcanzar tamaños similares a los alcanzados en los medios simbióticos y no sea el tamaño o el tiempo una desventaja para su aclimatización en invernadero. Esto podría incrementar de manera considerable su sobrevivencia como lo demostrado por Rubluo *et al.* en 1993.
2. En relación al monitoreo en campo, se recomienda probar lugares dentro de su habitat menos perturbados o accesibles para poder trasplantar a los individuos en sitios más despejados, tal y como se encuentran muchas poblaciones en campo. Por otro lado, se deberá rediseñar un método de marcaje más eficaz para identificación individual de las plantas y con esto tener una mayor información acerca del éxito en su sobrevivencia o desarrollo, de acuerdo a sus características en el momento del trasplante.

9. ANEXOS.

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

A. Medio de cultivo Knudson C (1946) adicionado con extractos orgánicos (Rubluo *et al.*, 1989).

	g L ⁻¹
Macronutrientes	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.0075
KH ₂ PO ₄	0.25
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1.0
Micronutrientes	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0278
Na ₂ EDTA	0.0373
Sacarosa	30 g
pH	5.04
Agua de coco	100 mL

B. Medio de cultivo Kew-A (Muir y Mitchel citado por Mitchel, 1989).

	mg L ⁻¹
Macroelementos	
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O	400
KH ₂ PO ₄	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100
KNO ₃	100
KCL	50
Microelementos	
Citrato férrico	12.50
MnSO ₄ ·7H ₂ O	5.89
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72
H ₃ BO ₃	1.24
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.05
MoNa ₂ O ₄	0.05
FeSO ₄	5.56
Na ₂ EDTA·H ₂ O	7.46

Vitaminas

Biotina	0.005
Acido nicotínico	2.5
Inositol	0.1

Complejos aditivos

Extracto de levadura	0.05 g
Peptona	2.5 mg
Extracto de papa	2.0 g
Sacarosa	16 g
Agar	8 g
pH	5.0

C. Medio Básico de Avena (Clements *et al.*, 1986).

	g L ⁻¹
Avena en polvo	3.5
Extracto de levadura	0.1
Agar	6.0
pH	6.0

D. Solución Fijadora Navashin (Johansen, 1940).

Solución A: Acido crómico	1 g
Acido acético glaciado	7 mL
Agua destilada	92 mL
Solución B: Formalin neutral	30 mL
Agua destilada	70 mL

Mezclar proporciones exactamente iguales de solución A y B antes de usar, fijar por 24 h, enjuagar con agua corriente y conservar en alcohol etílico 70%

ANEXO 2. DATOS DE REINTRODUCCION.

Tabla A. Características de las plantas de *Bletia urbana* reintroducidas a la Reserva Ecológica "El Pedregal", México D. F. (11-07-01)(19° 19'061" (sitio 5)- 19° 18'782" LN, 99° 11'625" (sitio 5)- 99° 11'210" LS, 7 600 pies) y su localización en la misma (ver Figs. 9 y 10 cap. Resultados y discusión).* Al año, dos meses de su reintroducción (31-08-02) (sin considerar el cormo subterráneo).

Clave del tratamiento	No. planta en campo	No. de grupo (sitio)	Altura de la planta (cm)	Diámetro del cormo (mm)	No. hojas	Largo de la hoja (cm)	Ancho de la hoja (cm)	Altura de la planta (cm)*
BU84MBA37G3	46	1	11	6	3	7	0.9	9.2
BU01MBA42D2	57	1	9	52	3	6.5	0.3	7.6
BU01MBA42D4	59	1	8	63	3	5	0.2	9.2
BU84MBA35A3	70	1	5	3	2	3	0.2	-
BU84MBA35A4	71	1	7	44	2	4	0.4	2.0
BU84MBA34C3	90	1	7	3.6	2	7.4	0.2	6.2
BU01MBA43B3	116	1	8	6.7	3	5	0.2	-
1MBAM+4	153	1	9.5	75	2	7	0.9	9.6
9MAEM+5	169	1	7	90	3	2.3	0.2	-
BU01MBA35A3	174 (6)	1	10	57	2	7.5	0.4	3.7
BU84MBA39D1	40	2	11	8	3	8	1	8
BU84MBA39D3	42	2	9	60	3	6	0.4	-
BU84MBA37B4	51	2	8	60	2	5	0.3	-
BU84MBA39I2	53	2	9	5	3	7	0.7	10.0
BU84MBA39I4	55	2	7	5	3	4.5	0.4	7.0
BU84MBA37D3	94	2	10	74	2	7	1	-
BU01MBA42E2	107	2	10	1	3	7	0.6	12.5
BU84MBA40B3	125	2	5.5	8.4	2	3.5	0.5	7.6
BU84MBA39B1	127	2	10	9	2	6.5	0.9	11.2
3aMAEM+4	156	2	13.5	120	2	10	1	-
BU84MBA34B4	4	3	7	73	3	5	0.5	3.5?
BU84MBA37C2	25	3	9	75	1	7	0.6	7.0
BU01MBA42B3	30	3	10	5.5	2	6.5	0.3	-
BU84MBA39H1	32	3	10.7	7.4	2	8	0.7	-
BU01MBA42C1	60	3	9	5.8	2	7	0.4	-
BU84MBA39E1	96	3	11.5	5	2	7	0.5	-
BU84MBA33aA4	113	3	9	8.7	3	6	0.6	17.0
BU84MBA39C1	119	3	6	7.6	2	3	1.2	5.20
BU01MBA48B4	142	3	6	6.3	3	4.5	1	-
SMBAM+2	152	3	6	60	1	5	1	5.0
BU84MBA33aB3	15	4	7	70	3	5	0.5	3.4?
BU84MBA36A2	21	4	9	82	3	6.5	0.6	10.3?
BU84MBA39H3	34	4	10	6	3	7.5	1	11.5
BU01MBA42C2	61	4	10.5	5.8	2	7	0.5	-
BU01MBA44A3	79	4	8.5	4.6	2	6.5	0.6	-
BU01MBA41C2	85	4	9	4.6	3	6	0.2	-
BU84MBA37D2	93	4	9	75	2	7	1.2	15.5
BU84MBA33aA2	111	4	9.5	9	3	6	0.5	19.5
BU01MBA48D1	147	4	4	5.5	3	2	0.7	-
1MAEM+5	164	4	11	80	2	8	0.7	18.2?

Clave del tratamiento	No. planta en campo	No. de grupo (sitio)	Altura de la planta (cm)	Diámetro del cormo (mm)	No. hojas	Largo de la hoja (cm)	Ancho de la hoja (cm)	Altura de la planta (cm)*
BU84MBA39A4	8	5	10	78	2	7	1	14.5
BU84MBA39H2	33	5	9	50	2	5	0.3	-
BU84MBA39H4	35	5	8.5	80	2	5.5	0.7	8.2
BU84MBA38C1	36	5	9	1	2	7	1	10.4
BU01MBA42A2	65	5	10.5	6.5	2	7	0.3	8.5
BU01MBA41C4	87	5	9	50	3	6	0.2	-
BU84MBA39E4	99	5	9	6	2	6	0.7	-
BU01MBA41D2	130	5	5	4	3	3	0.4	-
BU01MBA48A1	135	5	5.5	6	3	3	0.4	11.4
BU01MBA48B2	140	5	8.5	8.6	2	6	0.7	-
BU84MBA34B3	3	6	9	64	3	6	0.6	13.2
BU84MBA33aB2	14	6	8.5	62	3	6	0.5	-
BU84MBA36A4	23	6	10.5	80	3	8	0.7	11.5
BU84MBA37G4	47	6	6	64	3	2	0.2	3.5?
BU01MBA42C3	62	6	9	6.4	2	6	0.5	12.3?
BU84MBA34C2	89	6	11	6	2	8.5	0.7	8.3?
BU01MBA43B2	115	6	5	7	3	2.5	0.3	8.5
BU84MBA39C4	122	6	8	7.5	2	5	0.5	3.2
BU01MBA48B1	139	6	5	7	3	2	0.2	5.9
3MAEM+4	157	6	15	120	3	10	0.5	12.9?
BU84MBA37C4	27	7	11	67	2	8.5	1	7.1
BU84MBA38A1	73	7	10.5	63	3	5.5	0.2	2.2+3.0?
BU84MBA37D4	95	7	6	66	3	4	0.3	11.9
BU01MBA42E1	106	7	10	67	3	7	0.4	5.2
BU84MBA33aA1	110	7	10	7.8	3	6	0.5	-
BU84MBA33aA3	112	7	8	7	2	5	0.7	7+3
BU01MBA48C1	143	7	6.5	7	2	4	0.4	9.9
BU01MBA48D4	150	7	3	3.4	2	1	0.2	5.3
4aMAEM+4	159	7	6	55	2	4	0.8	-
BU84MBA34A2	10	8	9	80	3	6	0.6	15.6?
BU84MBA39E3	98,86?	8	11	7.6	2	6.8	0.7	-
BU84MBA34D2	105	8	7	6	3	4	0.2	-
BU01MBA48A2	136	8	7	6.3	3	5.5	0.6	14.4
BU01MBA48A3	137	8	8.5	7.3	2	5.3	0.7	5.0
BU01MBA48D2	148	8	2.1	1.8	2	0.7	0.5	12+1.5?
1MAEM+4	154	8	11	70	2	8	1	15.0
6MAEM+4	162	8	16	125	2	12	1.2	-
10MAEM+5	170	8	14	110	3	10	0.7	6.0?
BU01MBA42A3	173	8	7	92	1	4.5	1.1	-
BU84MBA34B1	1	9	6	70	2	4	0.5	9.0
BU84MBA34B2	2	9	7	70	3	4	0.3	-
BU84MBA39D4	43	9	8.5	67	2	6	0.9	-
BU01MBA42C4	63	9	10.5	70	2	7	0.3	7.4
BU01MBA44A1	77	9	13	1	2	10	0.5	2.0
BU84MBA38A1	80	9	11	6.5	2	8.5	0.3	-
BU01MBA41C1	84	9	13	1	3	10	0.4	7.7
BU84MBA39C3	121	9	8	1.1	3	5	0.6	-
BU84MBA39B2	128	9	2.5	3.8	2	1.5	1.1	-
6MAEM+5	167	9	13	5.5	2	11	0.7	-

Clave del tratamiento	No. planta en campo	No. de grupo (sitio)	Altura de la planta (cm)	Diámetro del cormo (mm)	No. hojas	Largo de la hoja (cm)	Anch o de la hoja (cm)	Altura de la planta (cm)*
BU84MBA39A1	5	10	9.5	100	3	6	1	11.80?
BU84MBA38C2	37	10	9	65	2	6.5	1	7.20
BU84MBA37B3	50	10	11	62	3	7	0.5	7.10
BU01MBA42A1	64	10	11	8.7	2	7	0.5	15.00
BU01MBA44A2	78	10	10	7.5	2	7	0.5	7.20
BU84MBA38A3	82	10	11	6	3	5	0.2	-
BU84MBA38A4	83	10	10	6.7	2	7.5	0.5	4.90
BU01MBA42E3	108	10	4	2.5	2	2	0.3	-
7aMAEM+4	163	10	10	60	3	5	0.3	11.5
7MAEM+5	168	10	8.5	93	2	6	1	7.50
BU84MBA33aB1	13	11	9.5	67		6	0.4	-
BU01MBA41E1	16	11	7	78	2	5	0.4	-
BU01MBA41E4	19	11	2	45	2	1	0.4	-
BU84MBA38C3	38	11	10	7	3	6.5	0.2	9.10
BU84MBA37G2	45	11	8	6.3	2	6	0.7	8.60
BU01MBA42D3	58	11	9	7	3	6	0.4	-
BU84MBA37D1	92	11	9	7	2	6.5	0.6	-
BU01MBA43B1	114	11	6	6	1	3.5	0.7	5.30
BU01MBA48B3	141	11	6	8.5	2	4	0.5	11.50
5aMAEM+4	161	11	10	70	2	7	0.9	-
BU84MBA34A1	9	12	8.5	1	3	5	0.8	**
BU84MBA34A4	12	12	9	90	3	6	0.7	**
BU01MBA42B2	29	12	10.5	105	3	7	0.9	**
BU84MBA35A2	69	12	8	6.5	2	5	0.2	**
BU01MBA41C3	86	12	8	6	2	3	0.3	**
BU84MBA34C1	88	12	9	5.6	3	5	0.3	**
BU84MBA34C4	91	12	5	5	2	3.5	1	**
BU84MBA37F2	101	12	8	6.2	2	5	0.4	**
BU84MBA39C2	120	12	8	1.8	2	5.3	0.6	**
BU01MBA41E3	18	13	RIP					-
BU84MBA37C1	24	13	8	70	3	4.5	0.5	9.10
BU84MBA37G1	44	13	11	7.2	2	8	0.6	7.50+3.50
BU84MBA37B2	49	13	9	99	3	6	0.7	10.90
BU84MBA39I1	52	13	9	67	2	5.5	0.5	7.50
BU84MBA37F1	100	13	10.5	4.5	2	7	0.7	-
BU01MBA43A1	131	13	7	8	2	5	1	7.50
BU01MBA43A3	133	13	4.5	4.6	2	3	0.2	5.60
1aMAEM+4	155	13	10.5	64	2	7.5	0.6	23.70
13MAEM+5	171	13	5.5	50	3	4	0.2	-
BU84MBA39A3	7	14	7	76	2	5	0.4	17.0?
BU01MBA41E2	17	14	7.5	90	3	5.5	0.9	-
BU84MBA39D2	41	14	10.5	7.3	3	7.3	0.5	8.7?
BU84MBA39I3	54	14	8.5	70	2	6	0.7	17.3?
BU84MBA35A5	72	14	7	58	3	4.5	0.2	-
BU84MBA39E2	97	14	11	75	2	8	0.8	9.40
BU84MBA37F3	102	14	9	5	2	7	0.6	5.6?
BU01MBA42F2	118	14	1.3	1.6	2	0.5	0.2	-
BU84MBA40B2	124	14	5	6.4	2	3	0.5	-
BU01MBA48D3	149	14	3	28	2	0.7	0.3	-
4MAEM+4	158	14	15	94	3	10.5	0.7	27.1?

Clave del tratamiento	No. planta en campo	No. de grupo (sitio)	Altura de la planta (cm)	Diámetro del cormo (mm)	No. hojas	Largo de la hoja (cm)	Ancho de la hoja (cm)	Altura de la planta (cm)*
BU84MBA37C3	26	15	7.5	7	3	4	0.6	
BU84MBA37B1	48	15	8	9	2	3	0.5	
BU01MBA42D1	56	15	8	7.5	3	2	0.2	
BU84MBA35A1	68	15	12	6.6	2	8.5	0.4	
BU84MBA38A2	74	15	11	5.8	2	9	0.8	
BU84MBA38A2	81	15	10	6.5	2	8	0.9	
BU84MBA40B1	123	15	7	6.5	2	4.5	0.5	
BU01MBA48C3	145	15	5.5	4.7	3	3	0.3	
5MAEM+4	160	15	23	117	3	16.5	0.9	
3MAEM+5	165	15	19	110	2	13	0.6	
BU84MBA39A2	6	16	8.5	60	2	6	0.7	-
BU84MBA36A1	20	16	9	88	3	7	0.6	7.7
BU84MBA36A3	22	16	11	55	2	4	0.3	-
BU84MBA38A4	76	16	9	60	2	5	0.4	8.10
BU84MBA34D1	104	16	8	6.5	2	5.7	0.9	3.60?
BU01MBA41D1	129	16	5.5	3.5	2	3	0.3	-
BU01MBA43A2	132	16	6	7	3	1	0.1	5+2
BU01MBA43A4	134	16	5	5.5	2	3.5	0.6	-
BU01MBA48A4	138	16	7.5	6.2	2	5	0.6	4.70?
BU01MBA48C2	144	16	4	4	2	3	0.6	3.80?
BU84MBA34A3	11	17	9	80	3	6.5	0.7	3.8?
BU01MBA42B1	28	17	11	85	3	7.5	0.4	6.50
BU01MBA42B4	31	17	8	65	3	5	0.3	-
BU84MBA38C4	39	17	10.5	4.2	3	5	0.2	-
BU84MBA37F4	103	17	9	0.5	2	6	0.2	11.0
BU01MBA42F1	117	17	10	1.1	2	7	1	-
BU84MBA40B4	126	17	7	6	2	4	0.3	-
BU01MBA48C4	146	17	4	5.3	2	3.7	0.8	-
2MAEM+1	151	17	18	105	2	14	0.8	-
4MAEM+5	166	17	17.5	100	3	10	0.5	12.60

** no se encontró sitio

10. LITERATURA CITADA

Anderson, A. B. 1991. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae). *Lindleyana* 6 (4): 183-186.

Arditti, J. 1967. Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. *Bot. Rev.* 33: 1-97.

Arditti, J. R., T. Ernst, W. Yam y Ch. Glabe. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana* 5 (4): 249-255.

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley and Sons. USA. 691 p.

Batty, A. L., K. W. Dixon, M. Brundrett y K. Sivasithamparam. 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. *New Phytol* 152 (3): 511-520.

Batty, A. L., K. W. Dixon, M. Brundrett y K. Sivasithamparam. 2001b. Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered western Australian terrestrial orchids. *Austral. Journal of Botany* 49 (5): 619-628.

Caín, A. S. 1951. *Fundamentos de Fitogeografía*. ACME Agency. Buenos Aires. 659 p.

Carling, D. E., E. J. Pope, K. A. Brainard y D. A. Carter. 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopathology* 89 (10): 942-946.

Clements, M. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3 (2): 73-86.

Currah, R. S., L. Sigler y S. Hambleton. 1987. New record and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Can. J. Bot* 65: 2473 - 2482.

Chávez, A. V. M. 1980. Cultivo asimbiótico de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Angel. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 81 p.

Dijk, E. y N. D. Eck. 1994. Effects of mycorrhizal fungi on *in vitro* nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species. *Canadian Journal of Botany* 73: 1203-1211.

Dodson, E. O. 1963. Evolución, Proceso y Resultado. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 425 p.

Dressler, R. L. 1968. Notes on *Bletia* (Orchidaceae). *Brittonia* 20: 182 - 190.

Ecker, L. 1989. Young term maintenance of desert diversity: rare plant reintroductions. *Agave* 3: 6 - 8.

Evans, J. A., W. R. Sharp y C. F. Flick. 1981. Growth Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. Páginas 45-113. In: T. A. Thorp (ed.), *Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York.

Goh, C. J., A. A. Sim y G. Lim. 1992. Mycorrhizal associations in some tropical orchids. *Lindleyana* 7 (1): 13-17.

Hagemann, I. (s. f). The Species reintroduction programme at the Berlin-Dahlem Botanic Garden. Páginas 1-7. <http://www.rbgekew.org.uk/BGCI/hagemann.htm>, última revisión 30 agosto del 2002.

Hadley, G. 1982. Orchid Mycorrhiza. Páginas 83-118. In: J. Arditti (ed.), *Orchid Biology. Reviews and Perspectives II*. Cornell University Press, New York.

IUCN (International Union in Conservation Nature) 1997. Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN - The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. lxiv + 862pp.

Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York , London.

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

Kulikov, P. V. y E. G. Filippov. 2001. Specific features of mycorrhizal symbiosis formation in the ontogeny of orchids of the temperature zone. *Russian Journal of Ecology* 32 (6): 408-412.

Lee, Z. J. y E. H. Lee. 1991. Micropropagación de orquídeas a partir de semillas. *FIRA*. 24 (232):15-25.

Light, M. H. S. y M. MacConaill. 1998. Factors affecting germinable seed yield in *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Wild) Correll y *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (Orchidaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 126 (1-2): 3-26.

Litz, 199.

Luckwill, L. C. 1979. *Growth Regulators in Crop Production*. Arnold Publ. London.

Mabberly, D. J. 1997. *The plant book*. Cambridge Univ. Press., Cambridge. 2a. edición.

Markovina, A. L y P. A. McGee. 2000. Comparison of symbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandaeacea, Orchidacea). *Lindleyana* 15 (2): 68-72.

Masuhara, G., K. Katsuya y K. Yamaguchi. 1993. Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* y *Rhizoctonia binucleata* with seeds of *Spirantes sinensis* var. *amoena* *in vitro*. *Mycol. Res.* 97 (6): 746-752.

Martínez, P. A. 1985. Inducción *in vitro* de brotación múltiple en *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) a partir de protocormos seccionados. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 66 p.

Martínez, P. A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 107 p.

Mitchell, R. 1989. Growing Hardy Orchids from seed at Kew. *In the Plants man.* 3 (2): 152 - 169.

Miyoshi, K. y M. Mii. 1995. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. *Scientia Horticulture* 63 (3-4): 263-267.

Morel. 1960.

Muir, H. J. 1989. Germination and mycorrhizal fungus compatibility in European orchids. Páginas 39-55. In: H. W. Pritchard. *Modern Methods in orchid conservation. The role of physiology, ecology and management*. Cambridge University Press, Cambridge.

Murashige, T. 1974. Plant Propagation through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol* 25: 135-166.

Ortega-Larrocea, M. P., S. Luna-R., V. M. Chávez-Avila. 2000. Potencialidad de la micorrización masiva *in vitro* en la micropropagación de *Bletia urbana* (Orchidaceae). Página 28. In: Resúmenes de la I Reunión Iberoamericana y III Simposio Nacional sobre Micorriza celebrado en Guanajuato, Guanajuato, México. 27-29 de septiembre del 2000.

Ortega-Larrocea, M. P. y S. V. M. Luna-Rosales, V. M. Chávez Avila, R. Bye. *In vitro* symbiotic development of *Bletia urbana*, a mexican endangered orchid. *Enviado a Biol. Conservation*. Julio, 2002.

Pavlik, M. C, D. L. Nickrent y A. M. Howald. 1993. The recovery of an Endangered Plant. I. Creating a New Population of *Amsinckia grandiflora*. *Conserv. Biol.* 7 (3): 510-526.

Peterson, R. L., Y. Uetake y C. Zelmer. 1998. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* 25 (1-3): 29-25.

Ramsay, M. M. y J. Stewart. 1998. Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126 (1-2): 173-181.

Ramsay, R. R., K. W. Dixon y K. Sivasithamparam. 1986. Patterns of infection and endophytes associated with western Australian orchids. *Lindleyana* 1 (3): 203-214.

Rasmussen, H. N, B. Johansen y T. F. Andersen. 1991. Symbiotic *in vitro* culture embryos and seeds from *Listera ovata*. *Lindleyana* 6 (3): 134-139.

Rasmussen, H. N. 1998. The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126 (1-2): 49-64.

Rivas, M., J. Warner y M. Bermudez. 1998. Occurrence of orchid mycorrhizae in a neotropical botanical garden. *Revista de Biología Tropical*. 46 (2): 211-216.

Rojo, A. (comp.) 1994a. *Reserva ecológica "El Pedregal" de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo*. UNAM. México. 410 p.

Rojo, A. 1994b. Plan de manejo Reserva ecológica El Pedregal de San Angel. Páginas 371-382. In: Rojo A. (comp.). *Reserva ecológica "El Pedregal" de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo*. UNAM. México.

Rubluo, A., V. Chávez y A. Martínez. 1989. *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana* 4 (2): 68-73.

Rubluo, A., V. Chávez, A. P. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation* 63: 163-169.

Rzedowski, J. 1994. Vegetación del Pedregal de San Angel (Distrito Federal, México). Páginas 9-65. In: A. Rojo (Comp.), *Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo*. UNAM, México.

SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social). 1994. Las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras, y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial de la Federación publicado el 16 de Mayo, México D. F.

SEMARNAP (Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca). 1996. Los recursos forestales no maderables en México. www.semarnap.gob.mx, 28 de mayo del 2001.

Smith, F. E. V. 1932. Raising orchid seedlings asymbiotically under tropical conditions. *Gard. Chron.* 91: 9-11.

Smreciu, E. A. y R. S. Currah. 1989. Symbiotic germination of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana* 4 (1): 6-15.

Soberón J. M., M. C. Rosas y G. Jiménez. 1994. Ecología hipotética de la Reserva del Pedregal de San Angel. Páginas 129-148. In: A. Rojo (Comp.), *Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo*. UNAM, México.

Tan, T. K., W. S. Loon, E. Khor y C. S. Loh. 1998. Infection of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds by mycorrhizal fungus. *Plant Cell Rep.* 18 (1-2): 14-19.

Taylor, A. S. 1989. *Patterns in Plant Development*. Cambridge University Press, New York.

Thomale . 1964.

Tomira, M. y S. Cono. 1998. A preliminary report on the symbiotic germination of nine Japanese terrestrial orchids. *Journal of Jap. Soc. of Hort. Science* 67 (5): 696-698.

Tsutsui, K. y M. Tomita. 1990. Suitability of several carbohydrates as the carbon sources for symbiotic seedling of two orchid species. *Lindleyana* 5 (2): 134-139.

Valiente-Banuet A. y E. De Luna-García. 1994. Una lista florística para la reserva del Pedregal de San Angel, México D. F. Páginas 67-89. In: A. Rojo (Comp.), *Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo*. UNAM, México.

Zelmer, C. D. y R. S. Currah. 1997. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. *Lindleyana* 12 (3): 142-148.

Zettler, L. W. y T. M. McInnis, Jr. 1993. Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana* 8 (3): 155-162.

Zettler, L. W., F. V. Barrington y T. M. McInnis, Jr. 1995. Developmental morphology of *Spiranthes odorata* seedlings in symbiotic culture. *Lindleyana* 10 (3): 211-216.

Zettler, L. W. y C. J. Hofer. 1998. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*. 39 (3): 189-195.

Williams, P. G. 1984. Orchidaceous rhizoctonias in pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 63: 1329-1333.