



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

“Propagación y reintroducción de algunas orquídeas terrestres de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, en un pedregal en restauración dentro de la Ciudad Universitaria”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

ILSE ALEJANDRA CARMONA REYES



DIRECTOR(A) DE TESIS: Dra. María del Pilar Ortega Larrocea

ASESOR INTERNO: Biól. Juan Romero Arredondo

CIUDAD DE MÉXICO

MARZO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **CARMONA REYES ILSE ALEJANDRA**, con número de cuenta **307071929**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **01 de marzo de 2016** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dr. ARCADIO MONROY ATA
- VOCAL** Dra. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA*
- SECRETARIO** Biól. JUAN ROMERO ARREDONDO
- SUPLENTE** M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES
- SUPLENTE** M. en C. GENARO MONTAÑO ARIAS

El título de la tesis que presenta es: **Propagación y reintroducción de algunas orquídeas terrestres de la reserva ecológica del pedregal de San Ángel, en un pedregal en restauración dentro de la Ciudad Universitaria.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 08 de diciembre de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las herramientas necesarias para poder cumplir con mis estudios de licenciatura.

Al programa de becas del Instituto de Geología de la UNAM, al proyecto DGAPA-PAPIIT IT101812 y DGAPA-PAPIME PE108915, por el financiamiento brindado para la realización de este trabajo. Este trabajo se realizó en las instalaciones del Invernadero, Microcosmos Bioedáfico y Microscopía del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM.

A la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea, mis agradecimientos infinitos por permitirme entrar a su maravilloso grupo de trabajo, por brindarme invaluable conocimientos en el trabajo de laboratorio y en campo, por ser un ejemplo de fortaleza ante los obstáculos que se presentan, por su entusiasmo y amor por la ciencia y sobre todo por el cariño, confianza y paciencia que me brindó durante esta importante etapa de mi desarrollo académico.

A la M. en C. Iris Suárez Quijada, por todo el apoyo técnico brindado en laboratorio durante todo el proceso del trabajo, por las técnicas enseñadas, los conocimientos compartidos y amistad brindada durante mi estadía.

A la Dra. Edith Garay Serrano, por el apoyo en el manejo de secuencias relacionadas con la caracterización molecular de los Hongos Micorrízicos Orquideoides.

Al M. en C. Miguel Castañeda Zárate por el germoplasma germinado de *H. novemfida*, al Ing. Agr. Néstor Tunal Sánchez y a la P. de Biól. Wuendoline Gómez Aguilar por las plántulas aclimatizadas de *Bletia*, donadas para la realización de este proyecto.

Al Biol. Juan Romero Arredondo, por los consejos brindados para la corrección del trabajo escrito y durante toda mi carrera en la FES Zaragoza.

Al M en C. Gregorio Reyes y al Ing. Agr. Mauricio Moreno, del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Instituto de Geología, UNAM, por toda la ayuda en el laboratorio, por los consejos y conocimientos compartidos durante mi estancia en el proyecto y por la amistad brindada.

A mis compañeros del proyecto Geopedregal: Juan Mendoza, Emmanuel Zeno, Hugo Morales, Pedro Alcántara y Felipe López, por la ayuda en campo, los consejos, la amistad y gratos momentos compartidos en el pedregal.

| INDICE | Página |
|--|---------------|
| RESUMEN | 1 |
| Palabras clave..... | 1 |
| I.INTRODUCCIÓN | 2 |
| II.MARCO TEÓRICO | 3 |
| 2.1 Generalidades de la Familia Orchidaceae..... | 3 |
| 2.1.1 Cultivo <i>In vitro</i> de orquídeas..... | 6 |
| 2.2 Hongos Micorrízicos Orquideoides (HMO)..... | 7 |
| 2.3 Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel..... | 9 |
| 2.3.1 Las orquídeas del Pedregal de San Ángel..... | 11 |
| III. ANTECEDENTES | 12 |
| IV. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| V. OBJETIVO GENERAL | 15 |
| 5.1 Objetivos particulares..... | 15 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| 6.1 Sitio de estudio..... | 16 |
| 6.1.1 Geopedregal..... | 16 |
| 6.2 Especies de estudio..... | 17 |
| 6.2.1 <i>Bletia campanulata</i> La Llave & Lex..... | 17 |
| 6.2.2 <i>Bletia urbana</i> Dressler..... | 18 |
| 6.2.3 <i>Habenaria novemfida</i> Lindl..... | 19 |
| 6.2.4 <i>Habenaria strictissima</i> Rchb.f..... | 20 |
| 6.3 Recolectade raíces y caracterización de la colonización micorrízica <i>in situ</i> de <i>Habenaria strictissima</i> Rchb.f..... | 21 |
| 6.4 Aislado de Hongos Micorrízicos Orquideoides de <i>Habenaria strictissima</i> Rchb.f..... | 22 |
| 6.4.1 Morfometría de aislados micorrízicos..... | 22 |
|6.4.2 Extracción de DNA de Hongos Micorrízicos Orquideoides..... | 23 |
| 6.4.3 Amplificación de DNA..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 6.4.4 Electroforesis de gel de agarosa 1%..... | 24 |
| 6.4.5 Identidad molecular de los aislados..... | 24 |
| 6.4.6 Tinción DAPI de núcleos de aislados de HMO de <i>H. strictissima</i> | 25 |
| 6.4.7 Almacenamiento de los HMO en el banco de hongos..... | 25 |
| 6.5 Recolecta y pruebas de germinación de <i>H. strictissima</i> y <i>H. novemfida</i> | 26 |
| 6.6 Reintroducción de <i>Bletia urbana</i> Dressler y <i>Bletia campanulata</i> La Llave & Lex en el Geopedregal..... | 27 |
| VII. RESULTADOS..... | 28 |
| 7.1 Colonización micorrízica <i>insitu</i> de <i>Habenaria strictissima</i> Rchb.f..... | 28 |
| 7.2 Hongos Micorrízicos Orquideoides de <i>Habenaria strictissima</i> Rchb.f..... | 30 |
| 7.2.1 Caracterización de la colonia y morfometría de los aislados..... | 31 |
| 7.2.2 Tinción de núcleos..... | 33 |
| 7.2.3 Extracción de DNA..... | 36 |
| 7.3 Germinación asimbiótica de <i>H. strictissima</i> y <i>H. novemfida</i> | 39 |
| 7.4 Reintroducción de <i>Bletia urbana</i> Dressler y <i>Bletia campanulata</i> La Llave & Lex en el Geopedregal..... | 41 |
| VIII DISCUSIÓN..... | 49 |
| 8.1 Colonización micorrízica de <i>Habenaria strictissima</i> Rchb.f..... | 49 |
| 8.2 Aislamiento de Hongos Micorrízicos Orquideoides de <i>H. strictissima</i> | 50 |
| 8.3 Germinación de <i>H. strictissima</i> y <i>H. novemfida</i> | 52 |
| 8.4 Reintroducción de <i>Bletia urbana</i> y <i>Bletia campanulata</i> en el Geopedregal..... | 54 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 56 |
| X. LITERATURA CITADA..... | 58 |
| XI. ANEXOS..... | 67 |

RESUMEN

Se describe el primer patrón de colonización, aislamiento axénico y la identificación molecular de un Hongo Micorrízico Orquideoide (HMO) del género *Sebacina* en *Habenaria strictissima*, una orquídea terrestre clorofílica que es ya casi inexistente para la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA). Este es el primer reporte de *Sebacina* asociado a una orquídea mexicana. La colonización micorrízica superó el 50% en todas las raíces; asimismo se presentó una colonización dominante de la base al ápice. Se lograron obtener dos cepas de aislados del HMO provenientes de pelotones, de los cuales se caracterizó la forma, color, tasa de crecimiento y morfometría de las hifas y se observaron características inusuales de crecimiento hifal *in vitro*.

La germinación asimbiótica de *Habenaria novemfida* se realizó a partir de semillas provenientes de dos tratamientos de polinización (autopolinización y polinización cruzada) en medio MS 50%, donde el porcentaje de germinación en las semillas provenientes de polinización cruzada fue mayor (88%) a las provenientes de la autopolinización (44%); de igual forma las primeras mostraron un mejor desarrollo alcanzando el estadio 6 (plántula) a los 86 días después de la siembra (dds).

También se realizó la reintroducción dentro de un pedregal en restauración (Geopedregal), de dos orquídeas terrestres: *Bletia urbana* y *B. campanulata*. Las plantas fueron germinadas asimbióticamente en medio MS 50% y aclimatizadas en invernadero por dos y un año, respectivamente. La supervivencia después de dos años de reintroducción para *B. urbana* fue de 5% y las de *B. campanulata* a un año fue del 3%. Se concluye que las plantas a las cuales se asociaron las plántulas reintroducidas (*Muhlenbergia robusta*, *Bouvardia ternifolia* y *Montanoa tomentosa*) tuvieron una influencia directa en la supervivencia de las orquídeas. El bajo porcentaje de supervivencia se asocia a la reintroducción asimbiótica.

Palabras clave: colonización micorrízica orquideoide, *Sebacina*, *Habenaria strictissima*, *Habenaria novemfida*, germinación asimbiótica, *Bletia urbana*, *Bletia campanulata*, Geopedregal.

I. INTRODUCCIÓN

La Restauración Ecológica se ha convertido en una herramienta muy utilizada para recuperar un ecosistema que ha sido dañado principalmente por causas antropogénicas, para poder detener la pérdida de sus poblaciones biológicas y rehabilitar la funcionalidad y autosuficiencia (Meffe y Carroll, 1994; De la Garza-López, 2012). Asimismo, una consecuencia de la urbanización es la fragmentación de los hábitats, convirtiéndolos en parches aislados (SEMARNAT). La reintroducción de plantas nativas en hábitats naturales se ha convertido en una de las estrategias principales dentro de la Restauración, ofreciendo una alternativa de conservación de los hábitats al disminuir la presión sobre las poblaciones ya existentes (Maunder, 1992). De igual forma, acelera el proceso de sucesión natural para poder recuperar las interacciones de las distintas especies que lo habitan (Mendoza, 2008).

Las orquídeas son especies de gran importancia, ya que ayudan a disminuir el deterioro de los ecosistemas dada la importancia que tienen por sus requerimientos especializados y por las interacciones específicas con polinizadores y hongos micorrízicos. Por esta razón, son consideradas como indicadores de la integridad o el nivel de fragmentación y deterioro de las comunidades vegetales donde crecen (Espejo-Serna *et al.*, 2005).

En el caso particular de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, ubicada al sur de la Ciudad de México, la fragmentación ha convertido a los pedregales remanentes en un refugio de la diversidad local, donde se han realizado esfuerzos por conservar la flora nativa como reintroducciones de diferentes especies de orquídeas nativas, *v. gr. Bletia urbana* y *Dichromantus aurantiacus* (Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco, 2007; Suárez-Quijada, 2010). Sin embargo, aún quedan muchas especies por propagar y reintroducir, con el objeto de no mermar las poblaciones de la REPSA. Otra forma de conservar el germoplasma nativo es a través de bancos de germoplasma y de hongos micorrízicos, que permitan la generación de protocolos de propagación adecuados para cada especie nativa de orquídeas terrestres de la Reserva.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de la Familia Orchidaceae

Las orquídeas constituyen uno de los grupos de plantas más diverso y más evolucionado, estimaciones recientes sugieren que deben de existir entre 20 000 y 30 000 especies a nivel mundial (Hágsater *et al.*, 2015). Se distribuyen en todos los continentes y su mayor diversidad se encuentra en las zonas tropicales; en México se pueden encontrar principalmente en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas, aunque todos los estados presentan por lo menos una especie (Téllez-Velasco, 2011). Se han registrado cerca de 1260 especies y 170 géneros de orquídeas mexicanas (Hágsater *et al.*, 2015) de las cuales se estima que cerca del 40% son endémicas (Soto-Arenas, 1996), siendo los bosques de neblina y selvas tropicales húmedas los ecosistemas más favorables (Salazar, 2009), aunque también se pueden encontrar en zonas áridas (Téllez-Velasco y Flores-Villanueva, 2007) o áreas con sequía estacional.

Esta familia de plantas tiene modificaciones estructurales y adaptaciones fisiológicas particulares que están relacionadas con su forma de vida (epifitas, litofitas o terrestres) (fig. 1). Las orquídeas terrestres presentan una anatomía muy especializada, pueden presentar raíces delgadas y ramificadas, cubiertas de pelos radicales, agrupadas alrededor de un cormo que funciona como órgano de reserva y nutrientes; o raíces cortas y engrosadas sin la presencia de un cormo (Téllez-Velasco y Flores-Villanueva, 2007). La mayoría son especies perennes con hojas que caen al llegar el periodo de reposo.



Figura 1. Lámina que muestran los diferentes tipos de crecimiento de las orquídeas: epifitas, terrestres y litofilas. Imagen adquirida de https://tillandsias.wordpress.com/2010/09/19/ilustraciones_grierson/ (fecha de última consulta: 11 de febrero del 2016).

Las orquídeas son consideradas como una de las familias más especializadas ya que cuentan con características muy avanzadas desde el punto de vista evolutivo (Salazar, 2009), principalmente por su morfología floral, la cual posee una gran variedad de tamaños y estructuras específicas de cada especie (Dressler, 1993); de estas especializaciones se han derivado adaptaciones particulares para polinizadores específicos (Sarmiento y Romero, 2000). La mayoría de las orquídeas están limitadas a una sola especie de polinizador, principalmente insectos (Dressler, 1993); las flores nacen siempre en la axila de una bráctea y generalmente se agrupan en espigas o racimos (fig. 2).

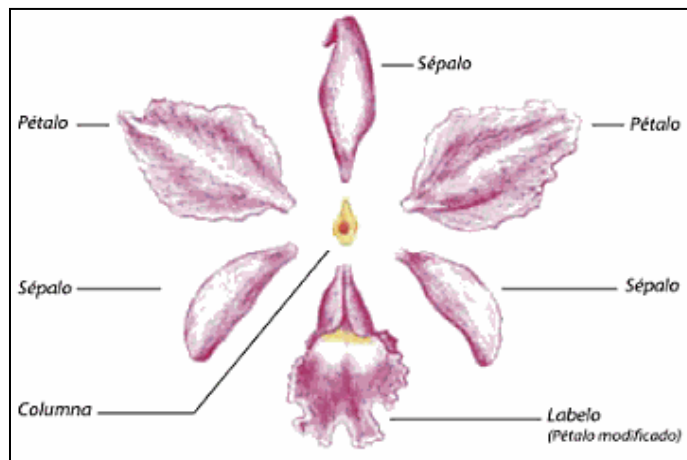


Figura 2. Morfología floral de las orquídeas (Imagen tomada de Freuler, 2008).

Otra de sus características muy particulares es la forma de sus semillas, son tan pequeñas que contienen pocas o ninguna reserva para llevar a cabo su germinación (Singh, 1981); su tamaño varía desde pocas micras hasta 5 mm y su peso va de 1 a 22 microgramos. Las semillas sólo están compuestas por la testa y el embrión, por lo que carecen de endospermo. Cada cápsula producida puede llegar a contener de 2 a 3 millones de semillas, de las cuales sólo de un 2 a 3% pueden llegar a germinar en condiciones naturales (Luan *et al.*, 2006). Esta condición hace indispensable la relación simbiótica con hongos para la germinación de las semillas quienes les proveen de la energía necesaria para germinar (Arévalo *et al.*, 2011).

La interacción de todos los caracteres específicos de las orquídeas, en combinación con las características reproductivas únicas de esta familia, ha facilitado su expansión y colonización a diversos ambientes (Árevalo *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de ser una de las familias más diversas y más exitosas, también es una de las más vulnerables debido principalmente a la destrucción de su hábitat y extracción de individuos. De las aproximadamente 1260 especies registradas en México, 181 son consideradas en alguna categoría de riesgo, de

las cuales 72 son especies son endémicas, 107 requieren de alguna protección especial, 58 están en categoría de amenazadas, 15 se encuentran en peligro de extinción y se documenta una especie ya extinta (Ávila y Salgado-Garciglia, 2006; NOM-059-SEMARNAT-2010).

2.1.1 Cultivo *in vitro* de orquídeas

Dentro de las técnicas de propagación más utilizadas para la conservación de orquídeas, está la propagación o cultivo *in vitro* de sus semillas la cual tiende a mejorar el éxito de cultivo para fines comerciales o de conservación (Otero y Bayman, 2009). El cultivo *in vitro* puede ser con un medio de cultivo que posea todos los nutrimentos (orgánicos e inorgánicos) y los azúcares necesarios para que la semilla pueda germinar (McKendrick, 2000). A este proceso se le denomina germinación asimbiótica. Sin embargo, como se destacó, las orquídeas carecen de endospermo lo que las obliga en su ambiente natural a asociarse con hongos micorrízicos que les permiten germinar. La relación con estos hongos se detallará más adelante. En la germinación simbiótica o asistida, las semillas se siembran con un hongo micorrízico específico, el cual colonizará a las semillas en proceso de germinación; técnica utilizada principalmente para la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas (Otero y Bayman, 2009). Para que las orquídeas cultivadas *in vitro* puedan ser reintroducidas en sus hábitats naturales, es necesario que pasen por una fase de aclimatización o endurecimiento; ésta suele ser la parte crítica ya que durante el crecimiento la planta adquiere nutrimentos directamente del medio de cultivo, limitando el proceso fotosintético. Al ser trasplantadas a invernadero o campo, su nutrición pasa a ser autotrofa y están expuestas a más factores ambientales limitantes como mayor intensidad lumínica, a cambios en la humedad y al ataque de patógenos (Ortega-Larrocea, 2012).

2.2 Hongos Micorrízicos Orquideoideos (HMO)

Las plantas han desarrollado numerosas estrategias para poder adaptarse a los diferentes ecosistemas terrestres, una de las más importantes es la capacidad que tienen las raíces para establecer relaciones simbióticas mutualistas benéficas con hongos (Camarena-Gutiérrez, 2012) (fig. 3).

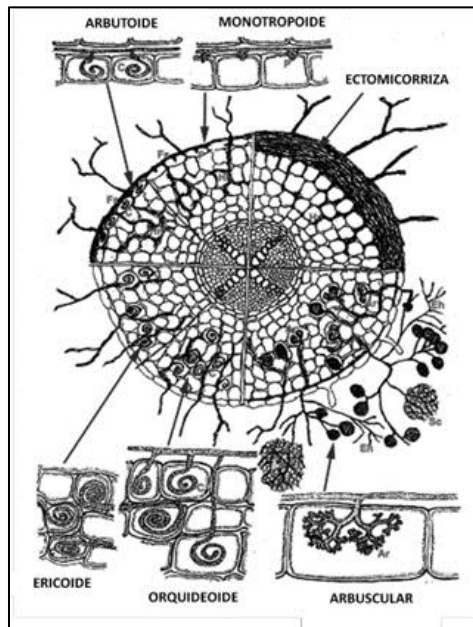


Figura 3. Diferentes asociaciones micorrízicas. Imagen tomada de <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/> (fecha de última consulta: 11 de febrero del 2016)

Como se indicó, debido a las características de sus semillas, las orquídeas se ven obligadas a crear una relación simbiótica con hongos micorrízicos durante la germinación como complemento de su alimentación micotrófica (Ortega-Larrocea *et al.*, 2009) siendo los hongos proveedores de azúcares y nutrimentos que necesitan los embriones para su desarrollo (McKendrick, 2000). Las orquídeas, en condiciones naturales tienen bajas tasas de germinación a pesar de su alta producción de semillas por lo que las interacciones micorrízicas también son importantes para el establecimiento exitoso de las plántulas (Arditti, 1992). Es importante conocer la simbiosis micorrízica de las orquídeas ya que la distribución y abundancia del hongo simbiótico puede ser determinante para la distribución y

diversidad de orquídeas en un ecosistema (Otero *et al.*, 2002). Esta asociación se da principalmente con hongos Basidiomicetos del grupo de *Rhizoctonia* (Rasmussen, 1995), el cual incluye tres géneros anamórficos (asexuales): *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* y *Moniliopsis* y a distintos géneros de teleomorfos (sexuales) como *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Thanatephorus* y *Sebacina* (Warcup y Talbot, 1996). *Sebacina* es un grupo polifilético diverso que incluye organismos patógenos, endofitos, saprofitos y hongos micorrízicos (Otero y Bayman, 2009; Steinfort *et al.*, 2010); está ampliamente distribuido encontrándose desde tierras de cultivo hasta bosques (Mashuhara y Kasuya, 1994). Estos hongos se caracterizan por poseer hifas basales relativamente anchas, con ramificación en ángulos rectos en los ejes principales, formación de un septo en el punto de división de las hifas bifurcadas (Warcup y Talbot, 1996). Los endofitos de las orquídeas pueden ser aislados de protocormos, raíces y ocasionalmente de rizomas o cormos. Una de las ventajas de aislar un hongo a partir de tejidos de protocormos es que éste tenga un rol importante en el desarrollo de las semillas, ya que los órganos de plantas adultas pueden ser hospederas de diversos tipos de hongos no micorrízicos (Rasmussen, 1995).

Varias especies de hongos pueden formar micorrizas con las raíces de una especie determinada, y una especie de hongo puede formar micorrizas con varias especies de plantas (Herrera y Ulloa, 2005). La germinación artificial de semillas de orquídeas terrestres es difícil y requiere de nutrientes muy específicos en medios asépticos de germinación, por lo que muchos cultivadores e investigadores utilizan hongos simbióticos para la propagación.

2.3. Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel

El pedregal se originó como producto de la erupción del volcán Xitle hace aproximadamente 1670 años (Siebe, 2009) con una extensión original de 80 km² que cubría una gran parte de la zona sur del valle de México (fig. 4). Los derrames descienden desde los 3000 m s. n. m., desde la parte media del volcán Ajusco, hasta los 2240 m en la parte lacustre del Valle, por lo que es posible encontrar un intervalo muy amplio de condiciones ambientales como temperatura, humedad y pendiente (Cano-Santana y Meave, 1996).



Figura 4. Área del derrame de lava del volcán Xitle donde se muestra la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Imagen tomada de Lot y Camarena (2009).

Al solidificarse la lava se formó un terreno accidentado con características diferentes a las del entorno en donde se originó un proceso de sucesión primaria; el paisaje fue lentamente modificado por los efectos del intemperismo, la acumulación de sedimentos y la colonización de plantas y animales del ecosistema circundante (Siebe, 2009). Debido a las características ambientales y del terreno pedregoso, surgió un mosaico muy complejo de comunidades vegetales que se componen principalmente por bosques de *Pinus*, *Abies*, *Alnus* y *Quercus*, matorral de *Quercus* y matorral de *Senecio praecox*. El matorral xerófilo se desarrolló en las partes más bajas de la derrama volcánica, entre los 2200 y 2500 m s. n. m. y que comprendía hasta lo que hoy es la Avenida Miguel Ángel de Quevedo en la Ciudad de México (Rzendowski, 1954). Al enfriarse la lava surgieron diferentes microambientes con características únicas, determinados por

su forma, profundidad de suelo, la incidencia solar, humedad relativa y pendiente; éstos se clasifican en: planos, oquedades, grietas, hondonadas, promontorios, paredes y cuevas (Castillo-Argüero *et al.*, 2007).

Este ecosistema único en el Distrito Federal permitió que se consagrara en una Reserva Ecológica que nació en 1983, cuando por iniciativa de profesores y estudiantes de la Universidad Nacional Autónoma de México, se decretó la protección de 1.24 km² del matorral *Senecioetum praecoxis* que circundaba los terrenos universitarios. Se le dio el nombre de “Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel” (Rojo, 1994), en 1990 la zona protegida se incrementó a 1.46 km². En el año de 1997 se adicionaron las llamadas zonas de amortiguamiento, externas a la reserva como camellones, dando un total de 1.77 km². En la actualidad la Reserva cuenta con 23.73 km² y representa el 33% del campus de Ciudad Universitaria (Lot y Camarena, 2009; Lot *et al.*, 2012) (fig. 5). La Reserva denominada actualmente REPSA está compuesta por zonas núcleo (Zona Núcleo Poniente, Zona Núcleo Oriente y Zona Núcleo Sur Oriente) y por zonas de amortiguamiento en diferentes partes dentro y fuera de Ciudad Universitaria (el Circuito Exterior Norte y Sur, Estadio de Prácticas, la Senda Ecológica y por pequeños pedregales resguardados por Facultades e Institutos).

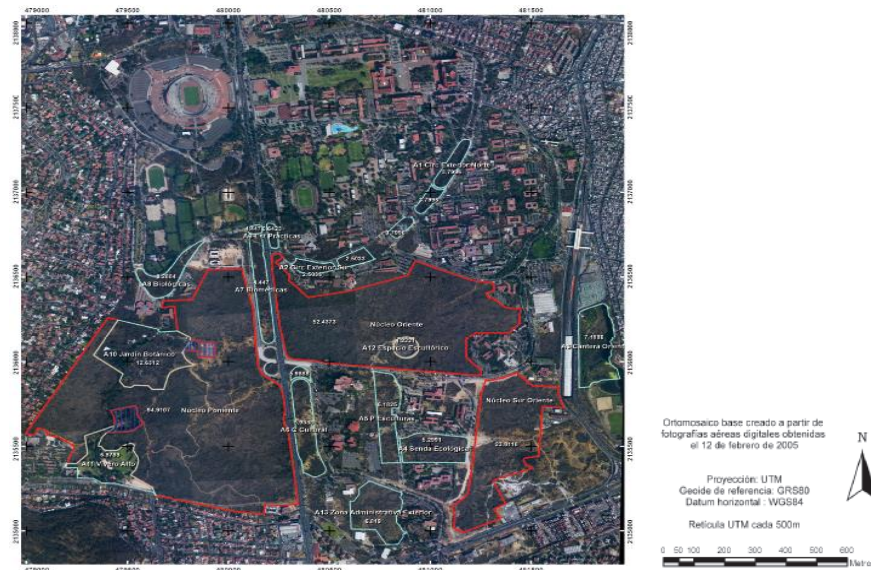


Figura 5. Reserva Ecológica el Pedregal de San Ángel dentro de la Ciudad Universitaria de la UNAM al sur de la Ciudad de México D.F. Color rojo: Zona Núcleo, color azul: Zona de Amortiguamiento. Imagen modificada de Lot *et al.* (2012).

Este ecosistema presenta un clima templado sub-húmedo con un régimen de lluvias en verano, la precipitación anual es de 833 mm y se distinguen dos épocas bien definidas, una de lluvias de junio a octubre y una de secas de noviembre a diciembre. La temperatura media anual es de 15.5° C (Castillo-Argüero *et al.*, 2004). El suelo es escaso, poco profundo, rocoso y en ocasiones inexistente (Rzendowski, 1954); su acumulación se debe principalmente al acarreo de partículas por el viento y la parte orgánica debido a la caída y descomposición de hojarasca lo que hereda un pH ligeramente ácido (5.4 ± 0.1 a 6.3 ± 0.2). La profundidad varía de 0 a 30 cm, con un promedio de 4.5 cm (Cano-Santana y Meave, 1996). Las características topográficas del ecosistema originaron una gran variedad de hábitats y microclimas ya descritos, que permiten la existencia y establecimiento de una gran riqueza florística. Debido a estas características dominan las formas de crecimiento arbustiva y herbácea y la mayoría de los organismos han desarrollado adaptaciones fisiológicas y morfológicas que les han permitido sobrevivir.

En los últimos 40 años el 90 % de este ecosistema se ha transformado; con el desarrollo urbano se comenzó un rápido proceso de destrucción y fragmentación de los sistemas ecológicos del pedregal. Debido al crecimiento de la ciudad y de la misma universidad sólo han quedado pequeños fragmentos aislados, estando dentro de Ciudad Universitaria uno de los últimos remanentes (Lot *et al.*, 2012).

2.3.1 Las orquídeas del Pedregal de San Ángel

La Reserva alberga una gran diversidad florística, en la que se consideran 337 especies de plantas vasculares pertenecientes a 74 familias y 193 géneros (Castillo-Argüero *et al.*, 2009). La familia Orchidaceae cuenta aproximadamente con 30 especies, todas terrestres; pierden sus hojas durante la temporada de sequía y presentan órganos especiales que les permiten sobrevivir durante este periodo (Salazar, 2009). El grupo taxonómico mejor representado es el género *Spiranthes* con 10 especies; otros géneros con número significativo de especies

representantes son *Bletia* con seis especies, *Malaxis* y *Habenaria* con cuatro especies, *Schiedeella* y *Dichromantus* con dos especies cada uno. Otros géneros encontrados que sólo cuentan con una sola especie son *Deiregyne*, *Aulosepalum*, *Cyrtopodium*, *Govenia*, *Liparis*, *Mesadenus*, *Microthelys*, *Ponthieva* y *Triphora* (Salazar, 2009).

III. ANTECEDENTES

El primer caso encontrado de la simbiosis de un hongo del género *Sebacina* en orquídeas, fue observado en *Neottia nidus-avis* por Bernard en 1899 (Oberwinkler *et al.*, 2013), aunque la identificación de este hongo micorrízico se realizó años después. Se ha identificado este género micorrizando orquídeas en casi todos los continentes; en Europa encontrado en bosques de Inglaterra, Francia, Alemania y Finlandia (Bidartondo y Read, 2008); en Asia se han obtenido aislados de China, Tailandia y Japón (Yagame, 2011; Matsuda *et al.*, 2009) y en Norte América (Shefferson *et al.*, 2005). Warcup (1971, 1981, 1988) realizó los primeros trabajos de aislamiento e identificación del hongo *Sebacina vermifera* como micobionte de *Caladenia dilatata*, orquídea terrestre australiana.

Stewart y Kane en 2006 lograron la germinación asimbiótica de *Habenaria macroceratitis* probando diferentes medios de cultivo, así como la germinación simbiótica de esta misma especie; de igual forma Keel y colaboradores en 2011 realizaron la germinación simbiótica de *Habenaria repens* donde también encontraron micobiontes; en ambos trabajos las asociaciones micorrízicas se dieron con un micobionte del género *Epulorhiza*.

En el caso particular de las orquídeas de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, *Bletia urbana* fue la primera en ser propagada asimbióticamente por Chávez en 1980. Rubluo y col. (1989, 1993) hicieron la reintroducción de plántulas propagadas asimbióticamente. En 1998 se estableció su cultivo simbiótico y la reintroducción por Ortega-Larrocea y col. (2000); en el 2004 Rangel-Villafranco realizó la propagación *in vitro* de *Bletia campanulata* y *Habenaria novemfida* y para el año 2010 se realizó la reintroducción de individuos simbióticos y asimbióticos de *Dichromanthus aurantiacus* (Suárez-Quijada, 2010).

Diferentes estudios de reintroducción de orquídeas en la Reserva Ecológica de la UNAM (Ortega-Larrocea y González, 2008; Suárez-Quijada, 2010) han demostrado que las técnicas simbióticas son las más adecuadas para garantizar la supervivencia de las especies a largo plazo. Estos estudios han indicado que la supervivencia tiende a estabilizarse alrededor de un 50% y las plantas han logrado fructificar después de cuatro años (Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco, 2007). Complementario a los esfuerzos de reintroducción en la REPSA, Tinoco (2014) realizó un estudio demográfico de poblaciones de orquídeas en este sitio, donde se demostró que las especies más abundantes (por el número de individuos en las colonias encontradas) fueron *Habenaria novemfida*, seguida por *Bletia campanulata* y *Bletia urbana*.

Para la realización de este trabajo se utilizaron plántulas de diferentes especies propagadas en trabajos anteriores aún sin publicar: de *Bletia urbana*, previamente germinadas bajo un protocolo de germinación de un banco de germoplasma (N. Tunal) ; plántulas de *B. campanulata* germinadas con diferentes fotoperiodos (W. Gómez) y semillas de *Habenaria novemfida* provenientes de cápsulas obtenidas de tratamientos de polinización cruzada y autopolinización (M. Castañeda).

IV. JUSTIFICACION

El ecosistema del Pedregal de San Ángel, es considerado como una de las zonas de mayor riqueza florística de toda la Cuenca de México. Se han registrado 337 especies de plantas vasculares, representa el 33% del campus de Ciudad Universitaria y se encuentra constantemente bajo la presión del crecimiento urbano tanto de la Universidad como de la Ciudad de México (Lot y Camarena, 2009, en Lot *et al.*, 2012). La fragmentación y deterioro ha producido la desaparición de 70% del área original del matorral xerófilo (Castillo-Argüero *et al.*, 2009); en los últimos años la Reserva ha estado sujeta a disturbios de diversa índole, como la acumulación de basura, construcción de caminos, la introducción de fauna y flora exóticas y el saqueo de especies. La colonización por especies exóticas es un proceso preocupante porque pone en riesgo tanto a algunos elementos de la flora propia del sistema como a la fauna nativa que pueden afectar su dinámica (Castillo-Argüero *et al.*, 2009). Se estima que han desaparecido alrededor de 150 especies de plantas y que se han introducido cerca de 100 especies dentro del pedregal (Rojo, 1994), lo que implica una amenaza latente en las poblaciones de orquídeas y otras especies vegetales que se han visto reducidas debido a su sensibilidad a cambios ambientales (Téllez-Velasco y Flores-Villanueva, 2007). La Reserva alberga las únicas poblaciones de orquídeas conocidas en la Cuenca de México, por lo que es importante para mantener su diversidad y a pesar de que es una zona bajo protección, la presencia humana ha alterado este hábitat y ha influido en gran medida en la desaparición o disminución de la orquideoflora resguardada en este sitio, por lo que urge implementar acciones que permitan su rescate y conservación a largo plazo.

Las zonas de amortiguamiento a lo largo del campus se han convertido en zonas prioritarias para la conservación biológica, ya que permiten el flujo de animales, insectos polinizadores, la dispersión vegetal y a que son un resguardo para especies nativas. La restauración de estos pedregales se debe realizar de manera urgente debido a que permiten el resguardo de biodiversidad y porque son una

fuerza importante de servicios ambientales como: captura de carbono y contaminantes atmosféricos, infiltración de agua de lluvia, disminución de ruido y de la isla de calor, así como su valor estético (Instituto de Geología, UNAM, 2015). Tal es el caso del sitio de estudio que es un pedregal en proceso de rehabilitación y presenta todos los microambientes descritos para la REPSA, por lo que se considera como un sitio idóneo para poder estudiar el comportamiento del matorral xerofítico. Una de las finalidades del proyecto del Geopedregal es reintroducir la mayor parte de especies nativas, en especial orquídeas y que sea un sitio de resguardo para albergar parte de la diversidad de la orquideoflora de la REPSA, preservando sus interacciones simbióticas y la salud del ecosistema.

V. OBJETIVO GENERAL

Generar conocimiento sobre los hongos micorrízicos y la germinación de semillas de dos especies de orquídeas no estudiadas en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (*Habenaria strictissima* y *H. novemfida*) y realizar la reintroducción de *Bletia urbana* y *B. campanulata* en un área de conservación de pedregales.

5.1 Objetivos particulares:

- Aislar y caracterizar morfológicamente y molecularmente a los hongos micorrízicos de *Habenaria strictissima*.
- Germinar asimbióticamente semillas de *H. novemfida* y *H. strictissima*.
- Realizar la reintroducción en un pedregal en restauración de dos especies de orquídeas, *Bletia urbana* y *B. campanulata*, propagadas *in vitro*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sitio de Estudio

6.1.1 Geopedregal

El 30 de abril del 2013, los institutos de Geología y Geografía de la UNAM, firmaron un convenio de colaboración para rehabilitar y restaurar un pedregal localizado entre ambos institutos. El convenio se encuentra circunscrito dentro del Programa de Adopción de Pedregales, iniciativa de la Secretaría Ejecutiva de la REPSA, cuya finalidad es la de promover a las dependencias y entidades universitarias (Facultades e Institutos), a que adopten y cuiden los fragmentos o zonas aledañas de la Reserva con los que colindan (SEREPSA, 2008). Al pedregal resguardado por estos institutos se le llamó Geopedregal para identificarlo con el área de las ciencias de la Tierra; éste cuenta con 3052 m² y presenta todos los microambientes descritos para la REPSA (fig. 6).



Figura 6. Localización del sitio de reintroducción en el pedregal en restauración (Geopedregal) de Ciencias de la Tierra, ubicado en el estacionamiento de los Institutos de Geología y Geografía de la UNAM. Foto tomada y modificada de Google Maps®.

6.2 Especies de estudio

6.2.1 *Bletia campanulata* La Llave & Lex (Hamer, 1982).

Las plantas llegan a medir hasta 60 cm de alto, presentan un tallo subterráneo o cormo que crece de manera horizontal, presentan de 1 a 2 hojas alargadas, de 20-35 cm × 1-3 cm. La inflorescencia es un racimo y las flores son de 2-3 cm de largo, se ha observado la autopolinización cuando hay ausencia de los agentes polinizadores como las abejas (fig. 7). La presencia de hojas y floración coinciden con la época de lluvias que generalmente es de los meses de julio a octubre (Téllez-Velasco y Flores-Villanueva, 2007).

La especie tiene una amplia distribución geográfica y se le ha encontrado en México, Honduras y el Salvador. Dentro de la REPSA se encuentra ampliamente representada dentro de dos de las zonas núcleo: Jardín Botánico y Espacio Escultórico (Tinoco, 2014).

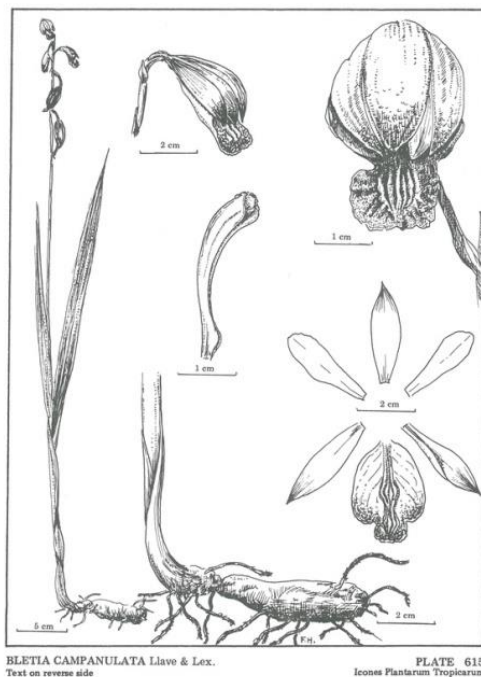


Figura 7. *Bletia campanulata* Llave & Lex. Imagen tomada de Swiss Orchid Foundation <https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/312686/Bletia/campanulata> (fecha de última consulta 11 de febrero del 2016)

6.2.2 *Bletia urbana* Dressler (Hágsater y Salazar, 1990)

Orquídea terrestre de 35-70 cm de alto, presenta cormos blanquecinos con crecimiento horizontal a la superficie terrestre de 2-4 × 1-2 cm. Hojas 2-3, presentes en la floración, elípticas con ápice agudo, color verde oscuro, 30-55 cm × 15-30 mm, los peciolo forman un pseudotallo. La inflorescencia es un racimo de 33-66 cm de largo, con 3-8 flores de color rosado-magenta, florece a principios del verano, se autopolinizan unos días después de abiertas o pueden llegar a ser polinizadas por abejas (fig. 8). El tamaño poblacional llega a ser menor a 20 individuos, posee una gran extensión clonal y un solo individuo puede medir decenas de metros cuadrados. La brotación de hojas comienza a finales de mayo y la floración en junio y julio. La maduración de cápsulas es rápida, para los meses de octubre a diciembre las plantas pierden sus hojas.

Se establece en climas templados subhúmedos con lluvias en verano. Distribuida actualmente en el Distrito Federal (Pedregal de San Ángel), el corredor Ajusco-Chichinautzin y en el estado de Oaxaca, encontrándose principalmente en sitios abiertos con gramíneas, matorral xerófilo o a los bordes del bosque de encinos. (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007). Para la Reserva del Pedregal es ampliamente observada dentro de las tres zonas núcleo, siendo más abundante en la zona del Jardín Botánico (Tinoco, 2014). Para esta especie existen estudios de reintroducción simbiótica y asimbiótica a largo plazo (Ortega-Larrocea y González, 2008, Ortega-Larrocea *et al.*, 2009).

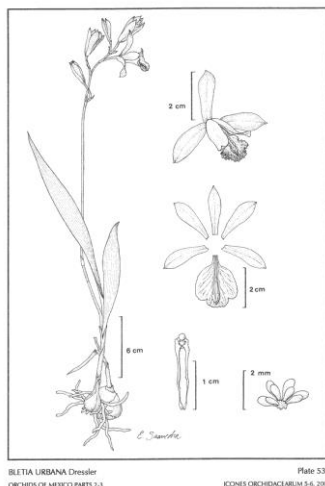


Figura 8. *Bletia urbana* Dressler. Imagen tomada de Swiss Orchid Foundation

https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/319705/Bletia/urbana/Dressler_Robert_Louis (fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016)

6.2.3 *Habenaria novemfida* Lindl. (Hamer, 1983)

Planta de 10-50 cm de alto, las hojas oblongas-elíptica a lineares-lanceoladas, con nervaduras que se ven como líneas paralelas muy marcadas, cada individuo presenta de 5 a 15 hojas (Téllez-Velasco y Flores-Villanueva, 2007), tiene raíces más o menos engrosadas o tuberosas que funcionan como órganos de perennación durante la época de sequía (Salazar, 2009). Las flores se presentan en una inflorescencia racemosa densa de 5-12 cm de largo, la coloración de las flores varía de blancas, verdosas o amarillentas, de 2.6 cm (fig. 9). Su polinización es realizada por lepidópteros (Van der Pijl y Dodson, 1996). La formación de frutos se inicia en el mes de agosto.

Habita en bosques de pino-encino y en el matorral xerófilo de la Reserva del Pedregal, donde es considerada como una especie muy abundante (Téllez-Velasco y Flores-Villanueva, 2007); según el censo realizado por Tinoco (2014) encontró cerca de 5000 plantas dentro y fuera del área de muestreo.

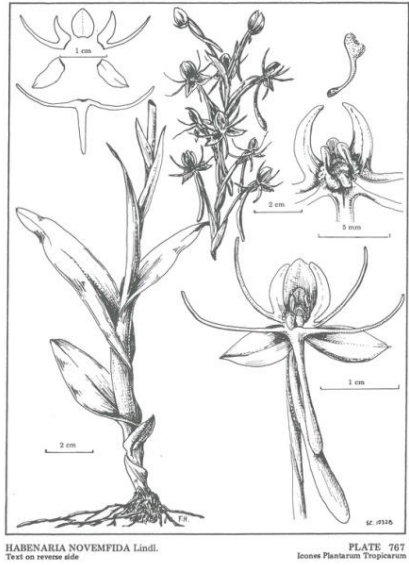


Figura 9. *Habenaria novemfida* Lindl. Imagen tomada de Swiss Orchid Foundation

<https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/310702/Habenaria/novemfida> (fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016).

6.2.4 *Habenaria strictissima* Rchb.f (Hamer, 1984)

Planta delgada y alta. Hojas ovaladas-lanceoladas a oblongas elípticas de 4-14 cm × 1.5-5 cm. Inflorescencia en racimo de 8-30 cm, con flores 2.5-4 cm de diámetro de color amarillo verdosas, ovario delgado de aproximadamente 1.5 cm de largo (fig. 10).

Se encuentra en suelos ricos de bosques, colinas rocosas y planicies, crece a los 2000 metros de altitud y aparentemente restringida a México, Guatemala y Nicaragua (Ames y Stewart, 1985). En México se encuentra en los estados de Chiapas, estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Veracruz y el Distrito Federal (González-Tamayo y Hernández-Hernández, 2010). Hágstater y colaboradores (2015) reportaron la desaparición de esta especie en el Pedregal de San Ángel debido a la presión por el crecimiento urbano. Salazar (2009) describe que esta especie puede ser observada con mayor frecuencia en localidades cercanas a la Reserva, como el Bosque de Tlalpan, que forma parte del mismo derrame volcánico.

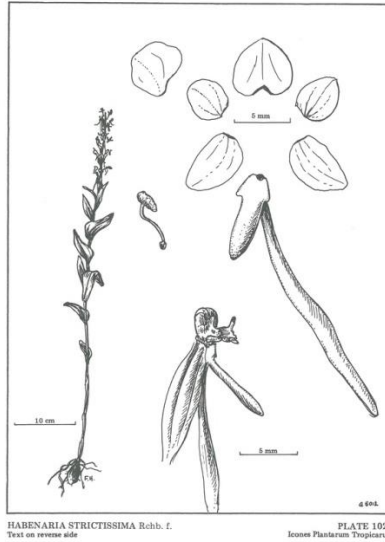


Figura 10. *Habenaria strictissima* Rchb. f. Imagen tomada de Swiss Orchid Foundation

https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/310256/Habenaria/strictissima/Reichenbach_Heinrich_Gustav
(fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.)

6.3 Recolecta de raíces y caracterización de la colonización micorrízica *in situ* de *Habenaria strictissima* Rchb.f

Dado que de esta especie existen muy pocos individuos localizados en la REPSA, se seleccionó un individuo del cual se disectaron tres raíces turgentes, recolectadas en el mes de agosto del 2014 que corresponde a la época de floración del género. Las raíces se cortaron de la base y se transportaron al laboratorio, en frío y envueltas en papel aluminio, resguardadas de la sequedad con un poco de suelo rizosférico, conservando la orientación base-ápice. En el laboratorio, se lavaron con agua corriente para eliminar toda la materia orgánica adherida. Una vez limpias, se realizaron cortes transversales a mano, a lo largo de cada raíz aproximadamente cada 0.5 cm. Los segmentos se montaron en preparaciones semipermanentes teñidas con fucsina ácida (0.01% en ácido láctico y glicerol) y alcohol polivinílico. Se hicieron observaciones en un microscopio óptico a 40× aumentos para identificar en el córtex los sitios de colonización micorrízica.

6.4 Aislado de Hongos Micorrízicos Orquideoides de *Habenaria strictissima* Rchb.f

Los segmentos que presentaron colonización micorrízica fueron seleccionados para el aislamiento de sus hongos. Bajo condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar horizontal, teniendo siempre las raíces en placas frías e hidratadas, se realizó la desinfestación de las mismas con una solución de NaOCl (hipoclorito de sodio comercial 6%) al 10% (v:v) por cinco minutos y tres enjuagues posteriores con agua destilada esterilizada.

Bajo un microscopio estereoscópico y con ayuda de un escalpelo, se “rasuró” cuidadosamente la raíz conteniendo los pelos radicales para liberar el córtex. Una vez teniendo los fragmentos del córtex limpios, se desgarraron cuidadosamente con agujas de insulina añadiéndole un par de gotas de agua destilada estéril, para liberar los pelotones en el agua. Con una micropipeta se tomaron los pelotones y se esparcieron superficialmente en cajas de Petri con Medio de Aislamiento Fúngico (MAF) (Mitchell, 1989) (Anexo 1). Los aislados se mantuvieron en obscuridad dentro de una cámara de incubación a 25 ± 1 °C. Bajo un microscopio estereoscópico se realizó la observación diaria del crecimiento de hifas a partir de los pelotones y los que mostraron recrecimiento se subcultivaron en Medio Papa Dextrosa Agar (PDA) Sigma-Aldrich®, para el cual se disolvieron 39 g/L y se ajustó el pH a 6.8 y se incubaron bajo las mismas condiciones.

Se hizo la caracterización de los aislados para corroborar que tuvieran características coloniales del anamorfo *Rhizoctonia* (color de la colonia, tasa de crecimiento y aspecto del crecimiento). Los aislados en PDA que presentaran fructificaciones, colores no hialinos y recrecimientos no pertenecientes a *Rhizoctonia* fueron descartados.

6.4.1 Morfometría de aislados micorrízicos

Bajo esterilidad, se tomaron muestras de micelio en diferentes sitios de la caja Petri que se montaron en laminillas en PVLG-Fucshina ácida para observar caracteres taxonómicos. Se observaron bajo un microscopio óptico a 110 × y se documentaron microfotográficamente. Se midió el ancho de las hifas y el tamaño del septo basal, se verificó que los ángulos de bifurcación correspondieran a los 90° y en caso de desarrollo de células moniloides, se midió el largo x ancho de las mismas y el número de células que conformaron las cadenas, con el programa Image-Pro Plus®.

6.4.2 Extracción de DNA de Hongos Micorrízicos Orquideoides

Previo a la extracción de DNA de los aislados, éstos se subcultivaron en medio Caldo Papa Dextrosa Broth (PDB) Difco® para el que se disolvieron para su elaboración 24 g/L, agitados a 120 rpm e incubados a 25 ± 1° C con una iluminación de 50 µmol m⁻² s⁻¹. Recrecido el aislado aproximadamente un mes después, se tomó en campana de flujo laminar una muestra del micelio de aproximadamente 3 mm³, el cual se enjuagó con agua destilada esterilizada y se colocó en tubos Eppendorf de 200 µL.

La extracción se hizo con el Kit de Extracción de DNA de plantas RedExtrac-N-AmptmPlant PCR (QIAGEN®). A cada muestra de micelio se le adicionaron 10 µL de solución de extracción y se colocó en el termociclador Axygen® Maxygene 2 con un programa de 10 min a 65°C y 10 min a 95°C. Terminado el proceso se agregaron 30 µL de solución buffer de dilución y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una hora. Finalizado el procedimiento se almacenaron las muestras a -20°C hasta la amplificación.

6.4.3 Amplificación de DNA

Para la amplificación de DNA se utilizaron dos iniciadores: ITS1-ITS4 Tul (Anexo 2) e ITS1- ITS4 (Anexo 3), ambos diseñados para hongos micorrízicos

orquideoides (Taylor y McCormick, 2008); la reacción de PCR se realizó en volúmenes de 25 μ L.

6.4.4 Electroforesis de gel de Agarosa 1%

Para hacer el gel, se disolvió 1 g de agarosa en 100 mL de solución Tris-Borato-EDTA (TBE), cuando la solución aún se encontraba líquida, se adicionaron 2 μ L de colorante Midori Green®. En cada pozo se agregaron 2 μ L de cargador Dye y 5 μ L de productos de la PCR. El gel corrió con solución TBE 1 \times a 77 voltios por 40 min.

6.4.5 Identidad molecular de los aislados

Los productos de la PCR se mandaron a secuenciar al laboratorio de la unidad de genómica de la Universidad de Washington, Seattle; se enviaron 10 μ L de los primers con una concentración de 3 μ M y 10 μ L del producto de PCR con una concentración de 5 ng/ μ L. Obtenidas las secuencias, se descargaron y ensambló la secuencia consenso. Las secuencias consenso se compararon con la base de datos en la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ncbi.nlm.nih.gov) y Unite (unite.ut.ee) usando el programa web BLAST. Posteriormente se integró una matriz con las secuencias de los aislados junto con las secuencias más parecidas del Gen Bank y algunas otras secuencias de especies de *Sebacina* y se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa web Mafft. Una vez alineadas las secuencias se realinearon en el programa Phylogenetic Data Editor (PhyDE) y por último en el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA 6) se determinó el mejor modelo evolutivo para analizar las secuencias (Kimura 2) con una distribución Gamma (K2+G), con el que se pudo construir un árbol filogenético usando el método de Máxima verosimilitud con un bootstrap de 1,000 remuestreos.

6.4.6 Tinción DAPI (4'-6-Diamino-2-fenilindole) de núcleos de aislados de HMO de *H. strictissima*

En campana de flujo se tomó un poco del micelio de los medios de cultivo PDB, al cual se le hizo un lavado con agua destilada estéril. Se utilizó un sistema de filtrado (Millipore®) conectado a una bomba de vacío. Sobre la placa del sistema se colocaron con pinzas filtros Millipore® 1.2 µm; sobre el papel filtro se colocó el micelio limpio en el centro del papel disgregándolo con agujas de insulina.

A todas las muestras se les adicionaron 200 µL de formaldehído-agua al 2% (v:v), durante 20 min, retirando el formaldehído con vacío. Se adicionaron 200 µL de reactivo DAPI por al menos 20 minutos en completa oscuridad (Martin, 1987; Shan *et al.*, 2002). De igual forma, se eliminaron los restos de DAPI con agua destilada por filtrado a vacío.

Los filtros se montaron en portaobjetos con 100 µL de glicerina-agua 1:1 (v:v) y se almacenaron en cajas de Petri cubiertas de papel aluminio al resguardo de la luz hasta su observación en un microscopio petrográfico Olympus® BX51, con lámpara de fluorescencia con filtros WU para luz Ultra Violeta de 330 a 385 nm.

6.4.7 Almacenamiento de los HMO en el banco de hongos del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico.

Los aislados cuyas características y secuencia pertenecieron a HMO se resguardaron en el Banco de Germoplasma de Hongos Micorrízicos Orquideoides del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los resguardos se hicieron con 1 cm³ aprox. de las hifas apicales de cada aislado en PDA en tubos de vidrio sellados con aceite mineral esterilizado y almacenados en oscuridad a 25° C.

6.5 Recolecta y pruebas de germinación de *H. strictissima* y *H. novemfida*.

Dos individuos de *H. strictissima* fueron constantemente observados dentro de un pedregal en recuperación de la UNAM. Se realizó la polinización cruzada intraespecífica el 6 de agosto del 2014 de las flores basales. Las cápsulas alcanzaron la madurez y fueron recolectadas el 28 de noviembre del mismo año, antes de la dehiscencia.

Cada cápsula fue documentada fotográficamente y las semillas se sacaron con agujas, en un microscopio estereoscópico. De cada individuo se hizo una mezcla de todas las semillas recuperadas de todas las cápsulas y se colocaron en tubos Corning® de 2 mL, resguardados a 3 °C dentro de un desecador con 6% de humedad relativa. Se hizo una evaluación de la calidad del germoplasma montando en portaobjetos una muestra representativa del homogeneizado, fijándolo con PVLG. Las semillas se registraron microfotográficamente en un microscopio óptico a 40× para evaluar la calidad de las semillas y la presencia de residuos o posibles contaminantes como partículas, esporas, hifas, etc.

Para las pruebas de germinación se pesaron 0.5 mg de semillas homogeneizadas de *H. strictissima* y el total de cada cápsula de *H. novemfida*, estas últimas obtenidas de un experimento previo de polinización (autopolinización y polinización cruzada). Éstas fueron colocadas en sobres de papel filtro Whatman® no. 1, doblados y engrapados por los extremos. La desinfestación de las semillas se realizó con hipoclorito de sodio comercial (NaOCl con 6% de cloro activo) al 15% (v:v) por 15 min, seguida de tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Las semillas fueron diseminadas uniformemente cortando los sobres con tijeras y con unas pinzas estériles sobre las cajas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) (1962) (Anexo 4) modificado al 50%. Se incubaron a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ en obscuridad hasta la germinación y posteriormente se pasaron a un fotoperiodo de 16 h con iluminación de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La germinación se consideró para ambas especies cuando hubo polarización del embrión, con o sin ruptura de testa. El número de semillas germinadas y de sus

diferentes estadios propuestos por Zettler y McInnis (1993) y modificados para ambas especies, fueron cuantificados bajo un microscopio estereoscópico a 2.5× durante un periodo de 20 días después de la siembra (dds).

6.6 Reintroducción de *Bletia urbana* Dressler y *Bletia campanulata* La Llave & Lex, en el Geopedregal

Antes de la reintroducción se seleccionaron los microambientes adecuados para poder colocar las plántulas, dentro del Geopedregal, principalmente se buscaron sitios donde se encontrara el pasto *Muhlenbergia robusta*, así como otras plantas adultas que pudieran funcionar como nodrizas para las orquídeas, proporcionándoles suficiente humedad para sobrevivir. Se seleccionaron un total de 27 sitios, 17 para *B. urbana* y 10 para *B. campanulata*; la mayoría asociados con *Muhlenbergia robusta* y algunos asociados a *Bouvardia ternifolia*, todos ellos se ubicaron en la zona plana del Geopedregal.

Los grupos de plántulas a reintroducir en cada microambiente se seleccionaron de acuerdo a tratamientos de un trabajo previo (N. Tunal, *com. pers.*) que fueron específicos para cada especie y de los cuales tuvieron supervivencias distintas por lo que cada sitio contó con un número diferente de individuos, siendo el mínimo de 10 individuos, el máximo de 60 y la mayoría contaba con 15 a 20 plántulas en promedio.

La reintroducción de *B. urbana* se realizó en junio del 2013 y la de *B. campanulata* en junio del 2014. En algunos de los sitios donde fueron reintroducidas las plántulas, se registraron las condiciones microambientales con ayuda de sensores HOBO® U23 Pro v2 de temperatura (°C) y humedad relativa. Se llevó un monitoreo mensual de la supervivencia y el crecimiento de las plantas en cada sitio durante un año para *B. urbana* y de seis meses para *B. campanulata*. Posteriormente se tomaron los datos de supervivencia anualmente.

VII. RESULTADOS

7.1 Colonización micorrízica *in situ* de *Habenaria strictissima* Rchb.f

La observación de la colonización micorrízica de *H. strictissima* se realizó en seis raíces de dos individuos (planta 1, 57.0 cm de altura, escapo de 13 cm de largo; planta 2 de 36.4 cm de altura, escapo de 11 cm) (fig.11). En el Cuadro 1 se presentan los resultados del porcentaje de colonización micorrízica por segmento. La mayoría de los pelotones se encontraban degradados y algunos otros en proceso de digestión (Fig. 12).



Figura 11. A-Planta 1 de *Habenaria strictissima* y raíces recolectadas para aislamiento de Hongos Micorrízicos Orquideoides; B-raíz 1, C-raíz 2, D-raíz 3, E-planta 2, F-raíz 4, G-raíz 5, H-raíz 6. Fotos: Carmona (2015)

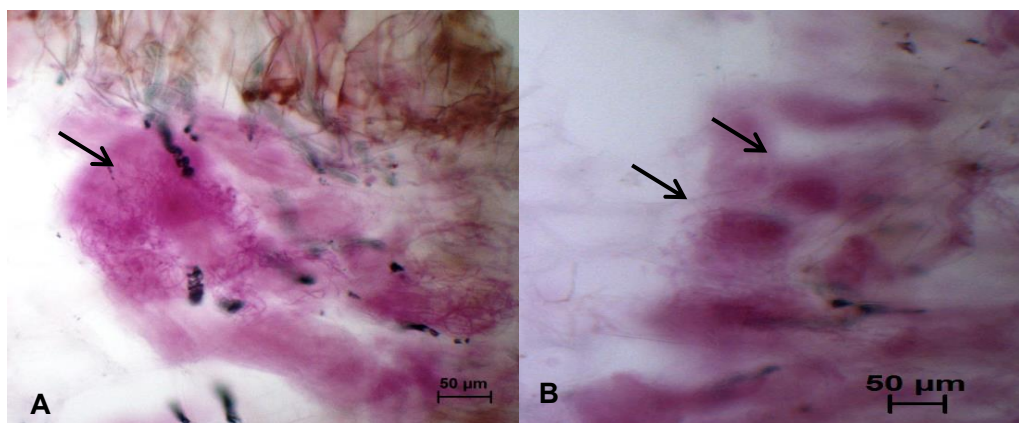


Figura 12. Pelotones degradados (A) y en proceso de degradación (B) encontrados en las raíces de *Habenaria strictissima*. Fotos Carmona (2015).

Cuadro 1. Porcentaje de colonización micorrízica por segmento y total de *Habenaria strictissima*.

| Raíz | | | | | | | | | Promedio (%) |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| | 1 0-0.5 | 2 0.5-1 | 3 1-1.5 | 4 1.5-2 | 5 2-2.5 | 6 2.5-3 | 7 3-3.5 | 8 3.5-4 | |
| Segmentos (cm) | | | | | | | | | |
| Planta 1 | | | | | | | | | |
| R1 | 70 | 75 | 80 | - | - | - | - | - | 75 |
| R2 | 90 | 70 | 35 | 70 | - | - | - | - | 66 |
| R3 | 90 | 75 | 60 | 60 | - | - | - | - | 71 |
| | | | | | | | | | 71 % |
| Planta 2 | | | | | | | | | |
| R4 | 65 | 80 | 70 | 50 | 70 | - | - | - | 67 |
| R5 | 55 | 40 | 75 | 60 | - | - | - | - | 58 |
| R6 | 55 | 70 | 65 | 75 | 60 | 30 | 50 | 55 | 58 |
| | | | | | | | | | 60% |

7.2 Hongos Micorrízicos Orquideoides de *Habenaria strictissima* Rchb.f.

Dado que en todos los segmentos se encontraron altos porcentajes de colonización, se realizaron aislamientos de todos ellos. En la figura 13 se muestran algunos de los pelotones con recrecimiento.

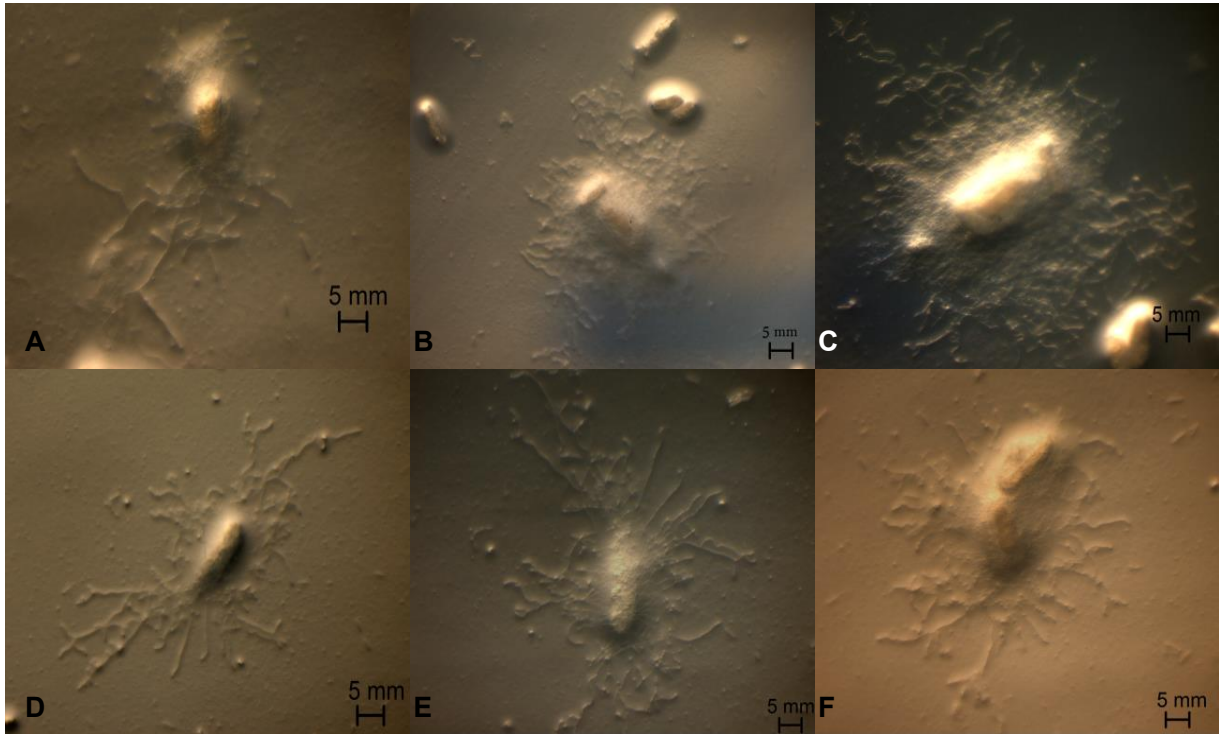


Figura 13. Microfotografías de pelotones con recrecimiento aislados de raíces de *Habenaria strictissima* obtenidos de la planta 1 (A,B, C) y de la planta 2 (D, E, F), en Medio de Aislamiento Fúngico a los 10 días después de la siembra. Fotos: Carmona (2015)

En total de la planta 1 se realizaron 11 aislamientos y de la planta 2, 18, de los cuales sólo se obtuvieron recrecimientos de dos pelotones de la raíz 1 (segmento 2), dos de la raíz 2 (segmento 2) y cuatro de la raíz tres (segmentos 2 y 3) de la planta 1 y de la planta 2 únicamente un pelotón de la raíz 1 (segmento 1) y otro de la raíz 2 (segmento 3). El subcultivo en PDA para la verificación del aislado se realizó a los 30 días después de la siembra. De los diez pelotones que recrecieron, solamente dos formaron una colonia, ambos provenientes de la Planta 1, raíz 2, segmentos 1 y 2 (fig. 14).

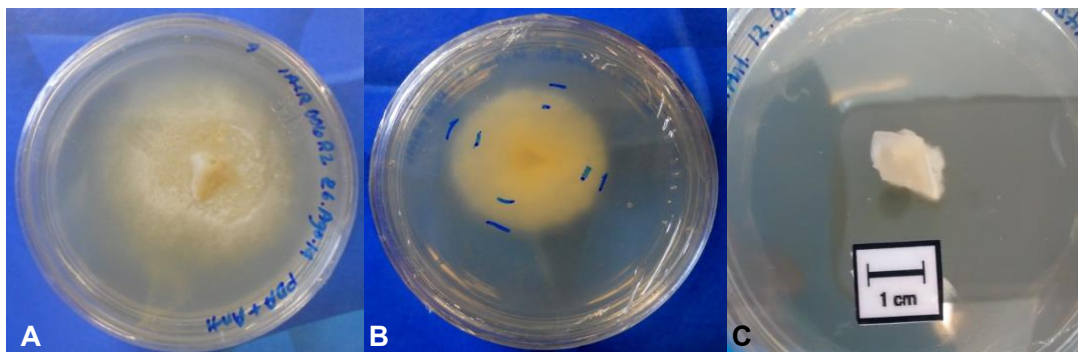


Figura 14. Aspecto de las colonias formadas por el aislado 1 (A y B) y 2 (C) de hongos micorrízicos orquideoides de *Habenaria strictissima*. Fotos Carmona (2015).

7.2.1 Caracterización de la colonia y morfometría de los aislados

La tasa de crecimiento de la colonia en medio PDA fue muy lenta, registrándose un promedio de 2.1 cm a un mes después de la siembra; a este tiempo la colonia comenzó a presentar una coloración más oscura, de color marrón y su apariencia se tornó menos esponjosa.

Cuadro 2. Caracterización morfológica de los aislados de *Habenaria strictissima*.

| Código del aislado | Apariencia de la colonia | Tasa de crecimiento (cm/mes) | Ancho hifas Tipo 1 (µm) | Ancho hifas Tipo 2 (µm) | Distancia del septo basal (µm) | Ancho monilias (µm) | Largo monilias (µm) |
|--------------------|--|------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| IACR006R2-A | Colonia amarilla-blanquecina hialina, apariencia costrosa semisumergida con poco micelio emergente | 2.5 ± 0.6 | 2.8 ± 0.6 | 1.5 ± 0.3 | 1.6 ± 0.7 | 5.1 ± 1.7 | 3.5 ± 3.5 |
| IACR006R2-B | Colonia amarilla-blanquecina hialina, apariencia costrosa semisumergida con poco micelio emergente | 1.7 ± 0.6 | 2.5 ± 0.4 | 1.7 ± 0.2 | 1.4 ± 0.5 | 4.8 ± 0.8 | 3.6 ± 0.08 |

Las colonias mostraron características similares a las del género *Rhizoctonia*, hifas con septo simple, ramificación en ángulo recto y presencia de células monilioides. Las hifas eran muy pequeñas y sólo se alcanzaron a distinguir al ser observadas en microscopio óptico a 100 ×; se observaron dos tipos de hifas, distinguidas por su ancho, siendo unas más delgadas (aprox. 1.5 µm) y otras más gruesas (2-3 µm) (Cuadro 2), en ambos aislados se destacó el crecimiento de las hifas más delgadas dentro de las hifas gruesas en algunos sitios, formando la ramificación en 90° y pequeñas células monilioides, sin romper su hifa guía (figs. 15 y 16).

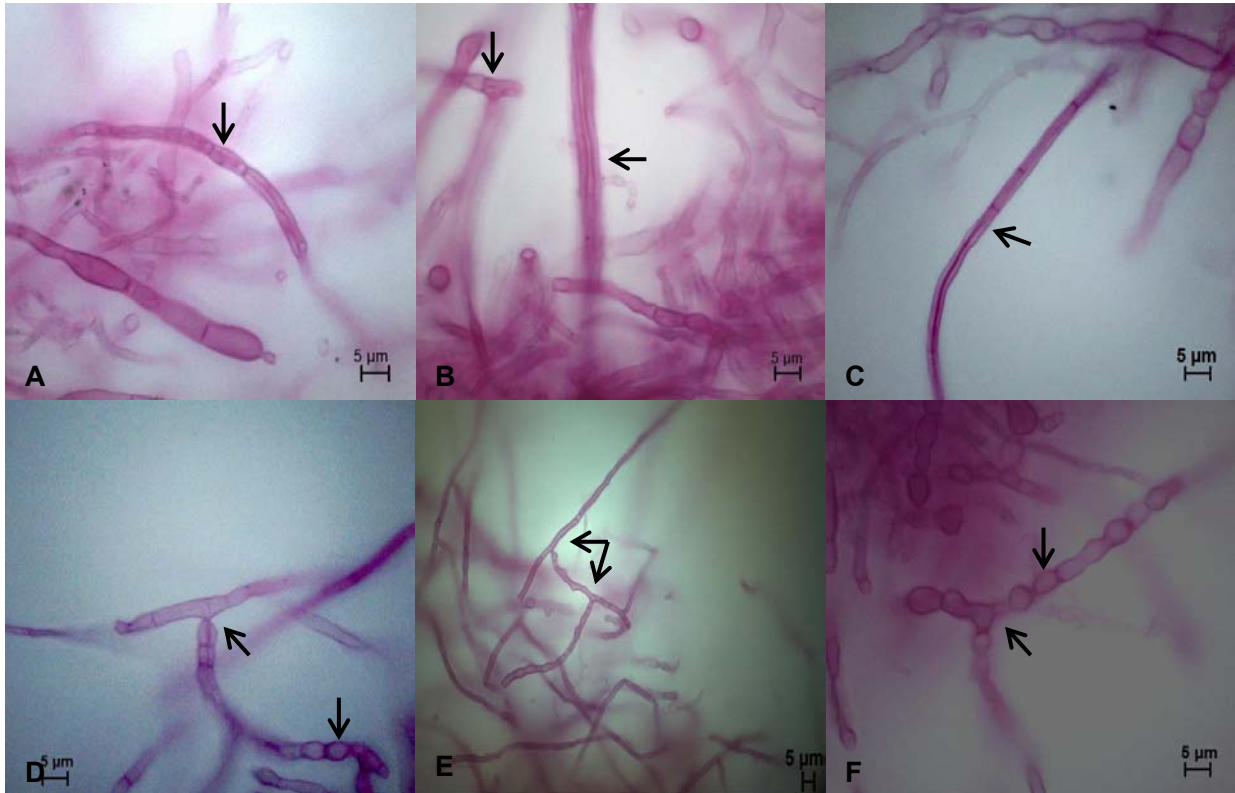


Figura 15. Tinción con fucsina ácida del aislado 1 obtenido de *Habenaria strictissima*, en microscopio óptico donde se observaron las hifas teñidas de los hongos micorrízicos orquideoides. Se observó el crecimiento de una hifa dentro de la otra mostrado en las flechas negras (A, B, C y D) del mismo hongo donde se apreció claramente el crecimiento característico en 90° (D, E y F) y las células monilioides formadas interiormente (imagen F). Fotos: Carmona (2015).

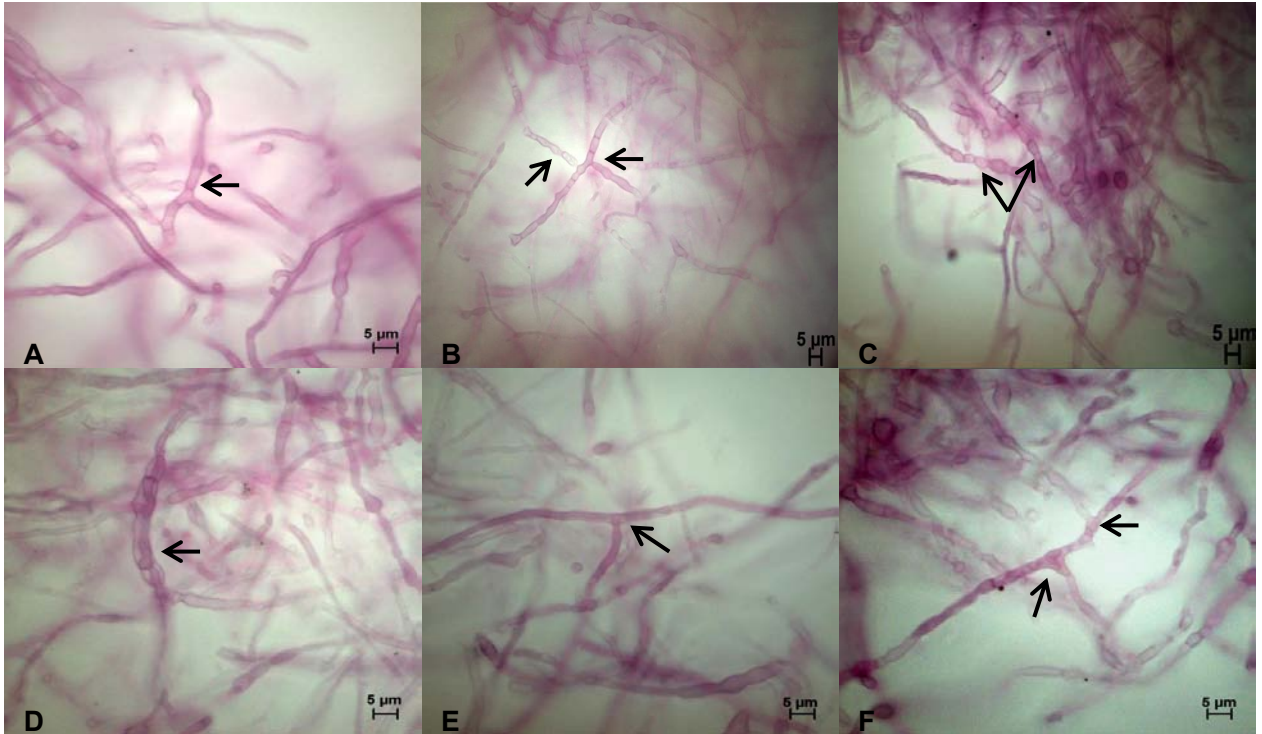


Figura 16. Tinción con fucsina ácida del aislado 2 obtenido de *Habenaria strictissima* en microscopio óptico donde se observaron las hifas del hongo micorrízico orquideoide que se desarrollaron en bifurcaciones a 90° (A, B, E y F) indicadas con las flechas negras y las células monilioides (B y C). Se documentó el crecimiento de hifas delgadas dentro de otras (D, E y F) a 90° y formando pequeñas monilias dentro de las hifas más grandes (D y F). Fotos: Carmona (2015).

7.2.2 Tinción de núcleos

En las figuras 17 y 18 se observa que ambos aislados únicamente presentaron un núcleo dentro de las hifas, se pueden reconocer los contenidos celulares y las vacuolas, así como el crecimiento de las hifas a 90° donde se distingue también como en la tinción con fucsina, el crecimiento de hifas intracelulares con núcleos independientes.

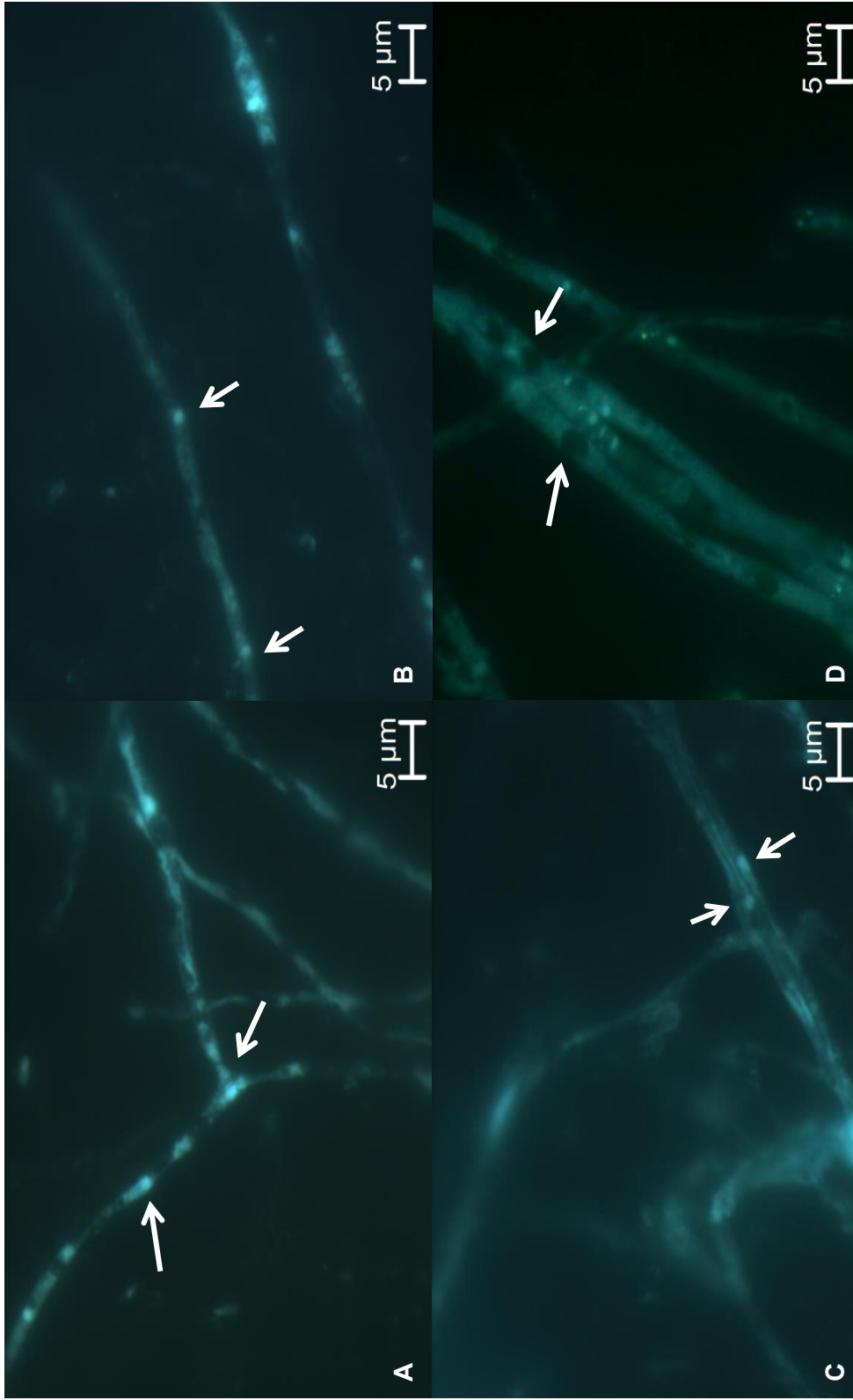


Figura 17. Tinción de núcleos (DAPI) bajo luz UV (330 a 385 nm) del aislado 1 de un hongo micorrízico orquideoide obtenido de *Habenaria stricissima*. En la imagen A se observan los núcleos fluorescentes y el crecimiento en 90° de las hifas (flechas blancas); en B varios núcleos a lo largo de una hifa; en C se muestra el crecimiento de una hifa dentro de otra donde se pueden distinguir las paredes celulares de cada hifa y sus respectivos núcleos; en D se observaron las vacuolas de color oscuro dentro de las hifas. Fotos: Carmona (2015).

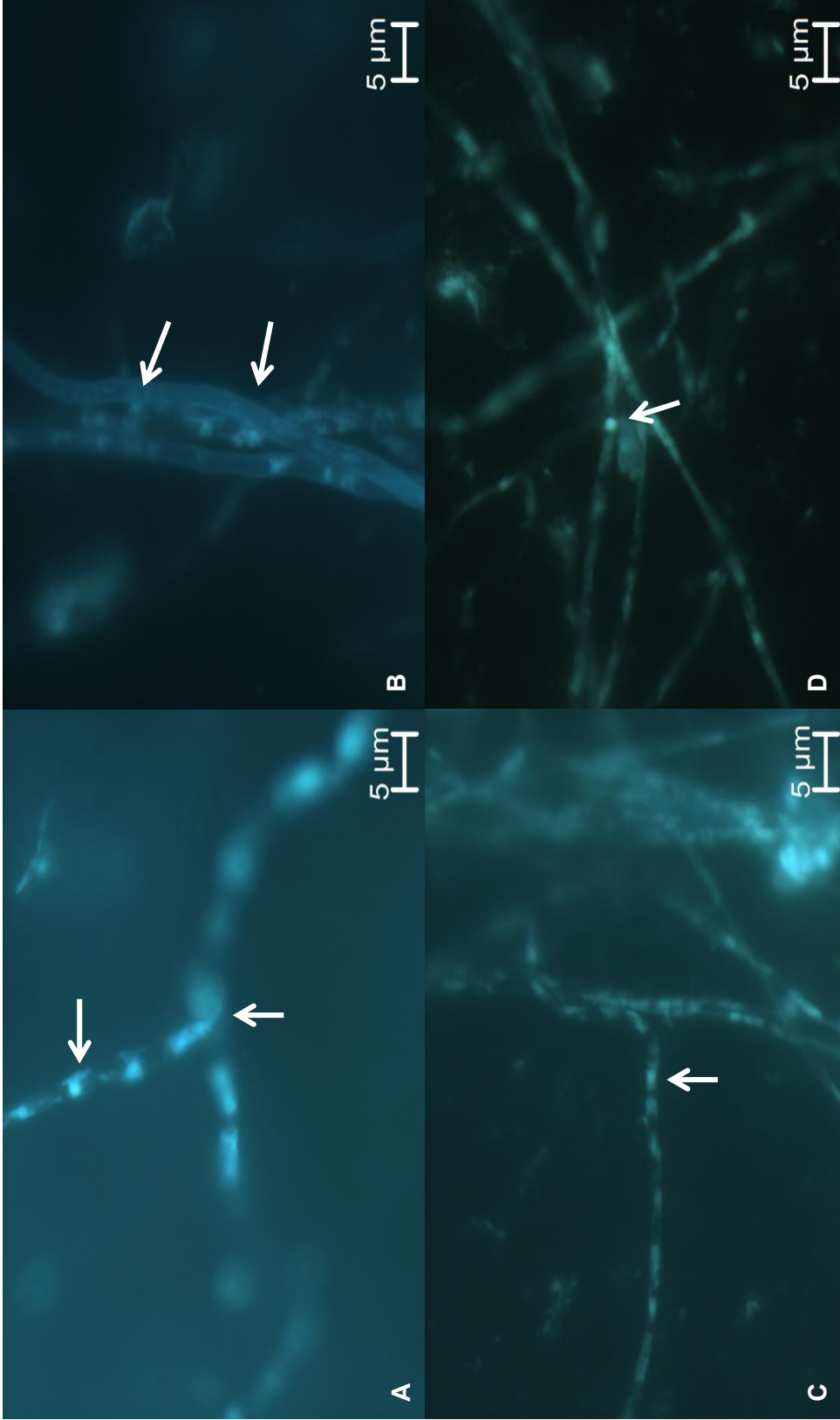


Figura 18. Tinción de núcleos (DAPI) bajo luz UV (330 a 385 nm) de un hongo micorrízico orquideoide de *Habeneria strictissima*. En la imagen A se observan los núcleos fluorescentes y el crecimiento en 90° de las hifas (flechas blancas); en B varios núcleos a lo largo de una hifa; en C y D se observaron contenidos celulares en un tono fluorescente dentro de las hifas. Fotos: Carmona (2015).

7.2.3 Extracción de DNA

En la figura 19 se muestra la placa de agarosa en la que se corrieron los productos de la extracción de DNA de los aislados de los HMO. Se tuvo como control para el primer ITS1- ITS4 Tul, específico para amplificar hongos en la familia Tulasnellaceae, al DNA de un hongo previamente amplificado obtenido de *Bletia roezlii* Rchb. f. cuya secuencia se conoce como *Tulasnella*. Por otro lado, se amplificó el DNA también con primers no específicos a familia (ITS1-ITS4) con los que amplificaron todas las muestras.

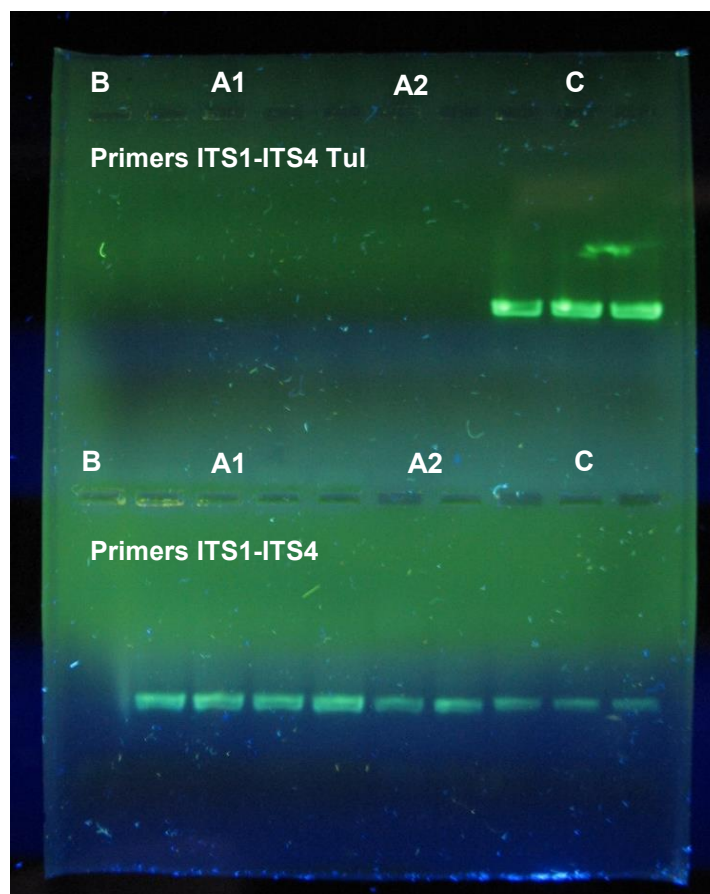


Figura 19. Placa de agarosa 1% para observar la amplificación del DNA de un hongo micorrízico orquideoide aislado de *H. Strictissima*. Superior: B-blanco (primer carril), A1- Aislado 1 (subsecuentes tres carriles); A2- Aislado 2 (subsecuentes tres carriles); C- muestra control para primers específicos ITS1-ITS4 Tul. Inferior: amplificación con el primer ITS1-ITS4; primer carril blanco; carriles 2-4 aislado A1; carriles 5-7 aislado A2; carriles finales, muestra control. Foto: Carmona (2015).

Las secuencias de los aislados amplificadas con el primer ITS1-ITS4 coincidieron con la región de lo hasta ahora identificado dentro del género *Sebacina* para ambos aislados obtenidos de *Habenaria strictissima* (fig. 20). Se observan las relaciones filogenéticas que presentaron los aislados con otras secuencias del GenBank y Unite donde se enraizó el árbol con secuencias de HMO de otra familia de basidiomicetos; para construir el árbol se siguió una parsimonia (bootstrap) de 1000 remuestreos. En los Cuadros 3 y 4 se presenta la identidad molecular de los aislados.

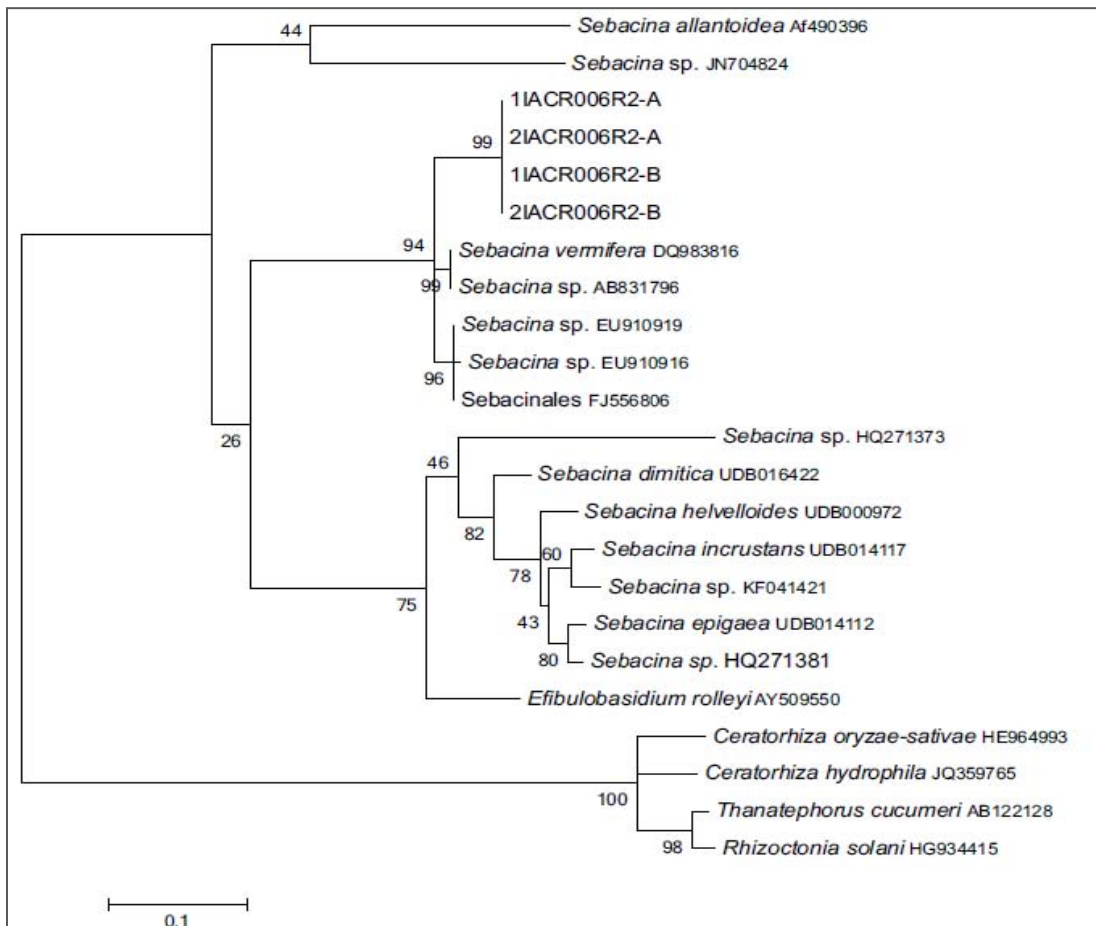


Figura 20. Relaciones filogenéticas de los aislados de HMO obtenidos de *Habenaria strictissima* (IACR006R2-A y IACR006R2-B) con otras secuencias obtenidas del Gen Bank.

Cuadro 3. Identidad molecular de los aislados de hongos micorrízicos orquideoides obtenidos de *H. strictissima*, comparados con secuencias del Gen Bank que se mostraron más cercanas en la figura 20.

| Aislado | Largo de Secuencia (pb) | Relación filogenética | Especie hospedera | Número de acceso | Cobertura (%) | Identidad de la secuencia (%) |
|----------------------------|-------------------------|---|-----------------------------|------------------|---------------|-------------------------------|
| IACR006R2-A IACR006R2-B | 522 528 | <i>Sebacina vermifera</i> , Australia (Deshmukh <i>et al.</i> , 2006) | <i>Caladenia tessellata</i> | DQ983816 | 100 | 89 |
| | | <i>Sebacina</i> sp., Japón (Yagame <i>et al.</i> , 2013) | <i>Neottia</i> sp. | AB831796 | 93 | 89 |
| | | Uncultured <i>Sebacina</i> , Alemania (Garnica <i>et al.</i> , 2009) | <i>Vicia cracca</i> | EU910916 | 100 | 88 |
| | | Uncultured Sebacinales clone, Italia (Weiss <i>et al.</i> , 2011) | <i>Medicago lupulina</i> | FJ556806 | 100 | 88 |

Cuadro 4. Identidad molecular de los aislados de *H. strictissima* comparada con otras secuencias del género *Sebacina* mostradas en la fig. 20.

| Aislado | Largo de Secuencia (pb) | Relación filogenética | Especie hospedera | Número de acceso | Cobertura (%) | Identidad de la secuencia (%) |
|----------------------------|-------------------------|---|--|------------------|---------------|-------------------------------|
| IACR006R2-A IACR006R2-B | 522 528 | Uncultured <i>Sebacina</i> clone, México (Kennedy <i>et al.</i> , 2011) | <i>Alnus acuminata</i> <i>Alnus jorullensis</i> | HQ271373 | 29 | 97 |
| | | <i>Sebacina dimitica</i> Estonia (Tedersoo, 2012a) | - | UDB016422 | 10 | 98 |
| | | <i>Sebacina helvelloides</i> Estonia (Parmasto, 1996) | - | UDB000972 | 32 | 98 |
| | | <i>Sebacina incrustans</i> Estonia (Tedersoo, 2012b) | - | UDB014117 | 11 | 98 |
| | | Uncultured <i>Sebacina</i> sp., México (Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, 2013) | <i>Abies religiosa</i> | KF041421 | 30 | 97 |
| | | <i>Sebacina epigea</i> Estonia (Tedersoo, 2012c) | - | UDB014112 | 10 | 98 |
| | | <i>Efibulobasidium rolleyi</i> , Canada (Wells <i>et al.</i> , 2003) | - | AY509550 | 13 | 99 |

7.3 Germinación asimbiótica de *H. strictissima* y *H. novemfida*.

Para *H. strictissima*, se realizó la polinización manual cruzada intraespecífica de las flores basales para la Planta 1, las demás flores del escapo fueron polinizadas naturalmente, al igual que todas las flores del escapo de la Planta 2. Tres meses después se recolectaron los escapos con 66 y 30 cápsulas, para la Planta 1 y 2 respectivamente (fig. 21). El germoplasma no mostró buen aspecto, ya que la mayoría de las semillas eran vanas o no mostraron un embrión bien desarrollado. Se realizó la siembra de las semillas a los 4 meses después de la polinización con dos repeticiones de cada germoplasma debido al poco material recolectado. A los 45 dds no se registró la germinación de ninguna semilla.



Figura 21. Escapo de *H. strictissima* (A), cápsula dehiscente (B) y semillas con embrión (flechas superiores) y vanas (inferior derecha) (C) de la Planta 1. Escapo (D), cápsula dehiscente (E) y semillas vanas (flechas en lado derecho) y con embrión (flecha izquierda) (F) de la Planta 2. Fotos: Carmona (2015).

Para el caso de *H. novemfida*, el germoplasma donado tuvo dos tratamientos de polinización; polinización cruzada intraespecífica (OUT) y autopolinización (SELF), con tres repeticiones para cada tratamiento. Las semillas se sembraron el día 10 de diciembre del 2014, la primera revisión se realizó a los 60 dds, se contabilizaron las semillas vanas, con embrión y las germinadas (cuadro 5). En la gráfica 1 se observa el porcentaje de germinación de cada tratamiento. La máxima germinación (96 %) y el máximo desarrollo de las plántulas se dio a los 86 dds (fig. 22).

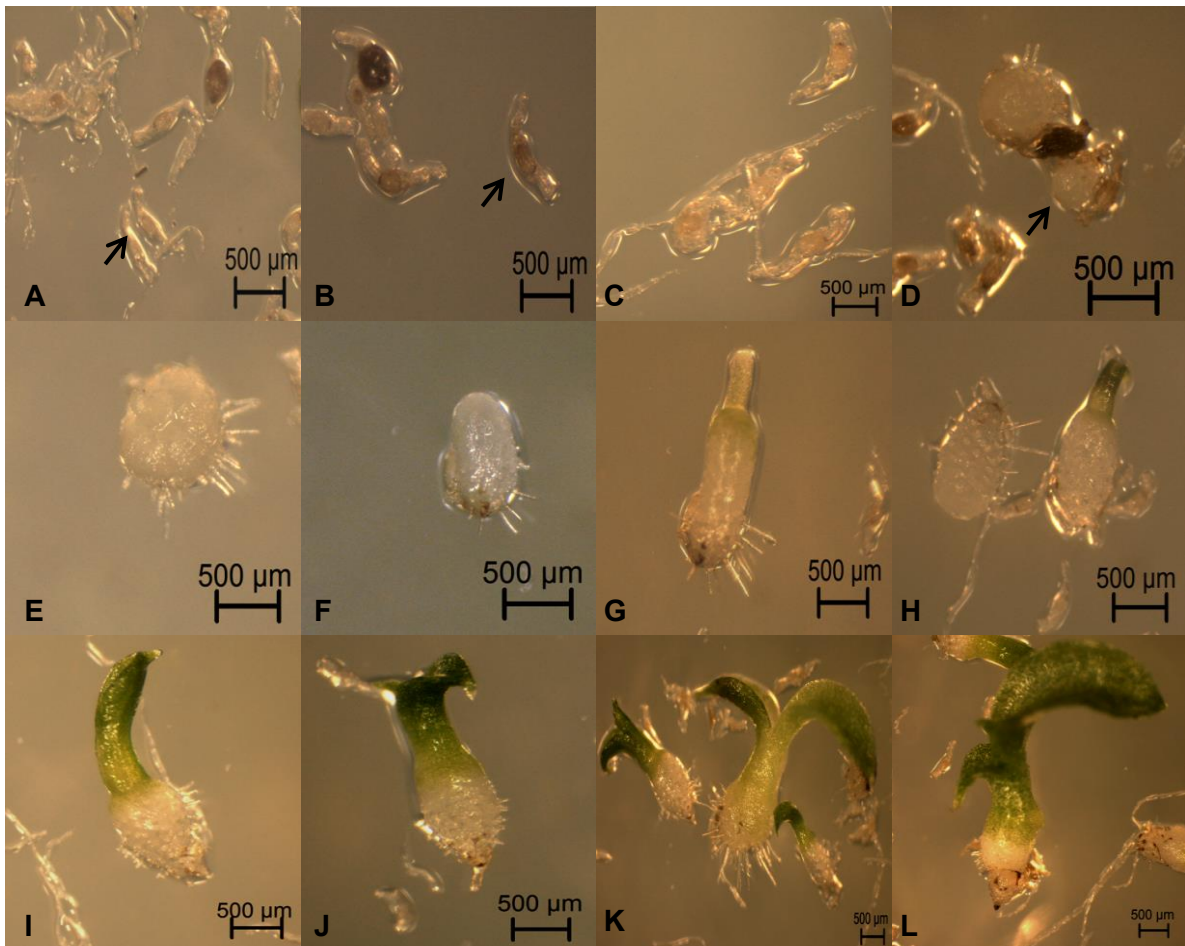
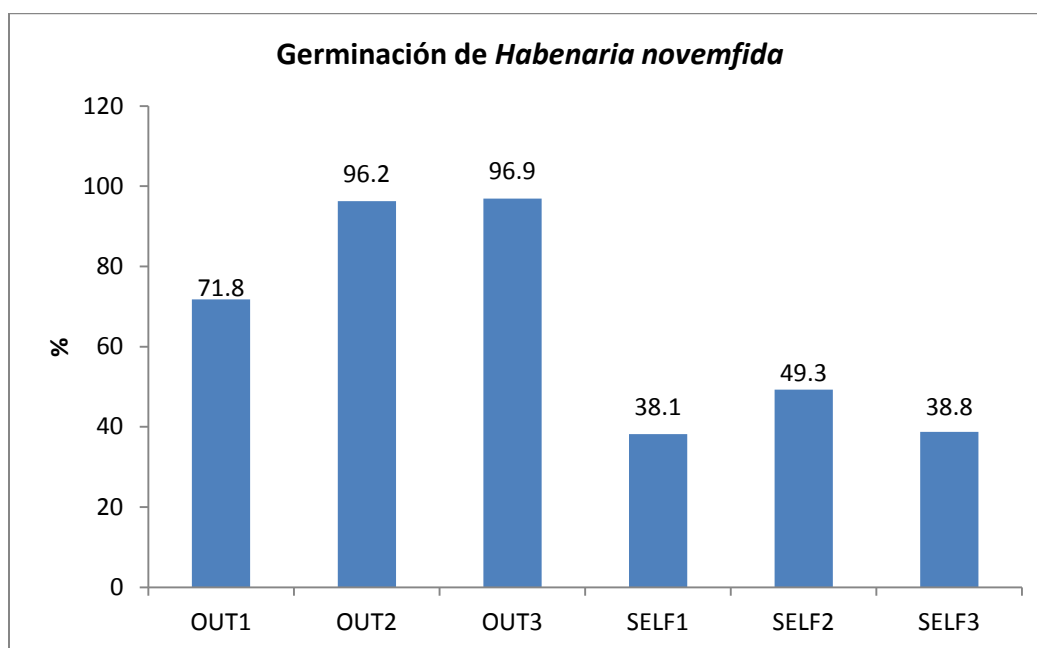


Figura 22. Germinación asimbiótica de semillas y etapas de desarrollo de *Habenaria novemfida*. A y B) Estadio 0-semilla; C) estadio 0a- semilla embebida sin ruptura de testa; D) estadio 1-semilla embebida con ruptura de testa sin polarización; E) estadio 1a- protocormo sin polarización con rizoides; F) estadio 2- protocormo polarizado con rizoides; G) estadio 3- protocormo con ápice foliar y rizoides; H) estadio 4- protocormo con lámina foliar en desarrollo; I) estadio 5- protocormo con una lámina foliar y rizoides; J y K) estadio 5a- protocormo con dos láminas foliares y rizoides; L) estadio 6-plántula con primordio de raíz. Fotos: Carmona (2015).

Cuadro 5. Germinación asimbiótica *in vitro* de *Habenaria novemfida* con dos tratamientos de polinización: cruzada (OUT) y autopolinización (SELF).

| Tratamiento | Total de semillas | Semillas vanas | Semillas germinadas | Germinación (%) | Promedio del porcentaje de germinación |
|-------------|-------------------|----------------|---------------------|-----------------|--|
| OUT1 | 507 | 66 | 364 | 71.8 | |
| OUT2 | 160 | 6 | 154 | 96.2 | |
| OUT3 | 196 | 6 | 190 | 96.9 | |
| | | | | | 42 ± 6 |
| SELF1 | 427 | 96 | 163 | 38.1 | |
| SELF2 | 365 | 87 | 180 | 49.3 | |
| SELF3 | 281 | 44 | 109 | 38.8 | |
| | | | | | 88 ± 14 |



Gráfica 1. Porcentaje de germinación de semillas de *Habenaria novemfida* con dos tratamientos y tres repeticiones de polinización cruzada (OUT) y autopolinización (SELF).

7.4 Reintroducción de *Bletia urbana* Dresslery *Bletia campanulata* La Llave & Lex, en el Geopedregal

- *Bletia urbana* Dressler

Para la reintroducción de *Bletia urbana* se eligieron 17 sitios asociados principalmente al pasto *Muhlenbergia robusta* con el que es muy común ver a esta especie asociada en el pedregal. También se eligieron otras plantas como *Bouvardia ternifolia* y una especie de helecho del género *Pellaea* (fig. 23). El número de individuos reintroducidos fue variado debido a que se asociaron a un tratamiento previo que se les dio y al espacio disponible dentro del microambiente. En el cuadro 6 se ve la vegetación asociada y el tamaño de cada sitio de reintroducción.



Figura 23. Microambientes de reintroducción en el Geopedregal de *Bletia urbana* con diferente vegetación asociada y supervivencia de las plántulas en un mismo sitio a un año de la reintroducción: A) sitio asociado a *Muhlenbergia robusta* en octubre 2013 (B) y julio 2014 (C); D) sitio asociado a *Muhlenbergia robusta* y *Bouvardia ternifolia* en noviembre 2013 (E) y septiembre 2014 (F); G) sitio asociado a *Bouvardia ternifolia* en octubre 2013 (H) y septiembre 2014 (I). Fotos: Carmona (2014 y 2015).

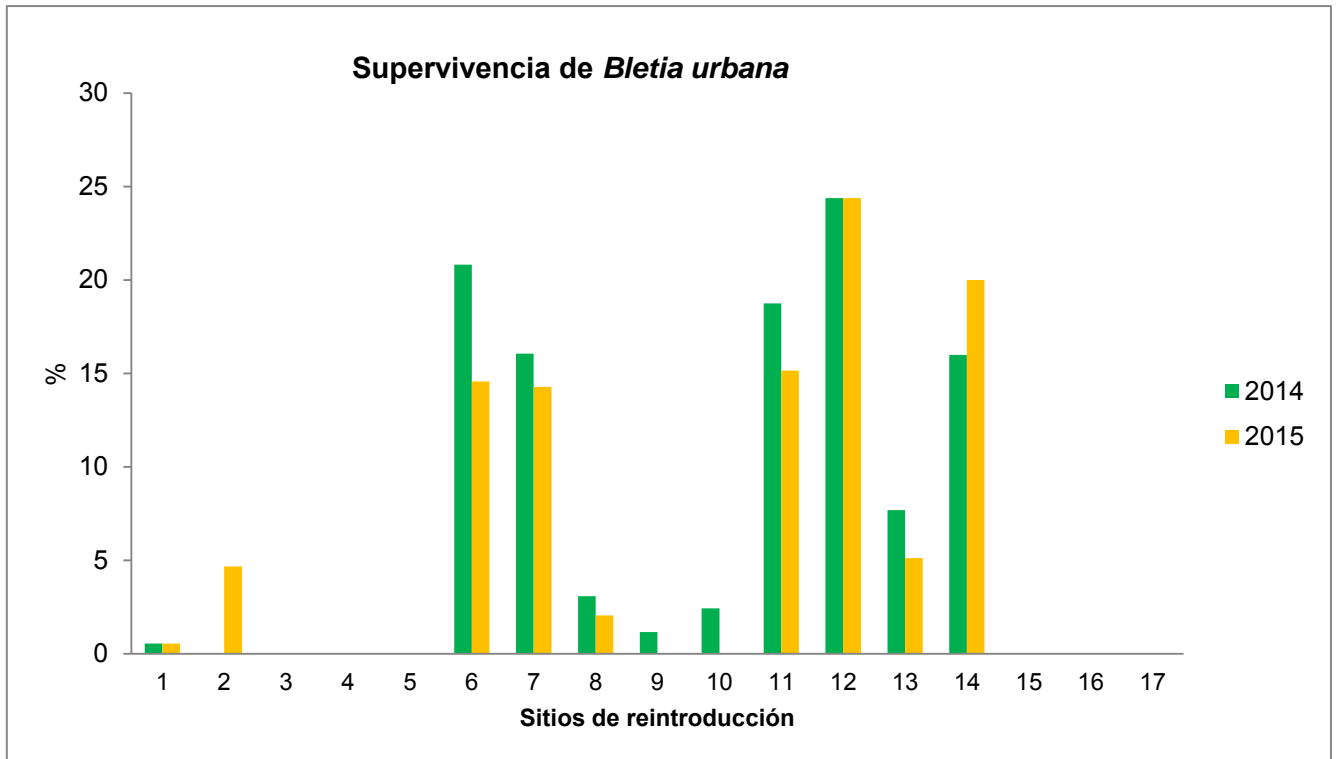
Debido a la variación de las lluvias en el año 2013 algunos sitios expuestos al sol se mantuvieron unos días con mallas para sombra. En el Cuadro 7 se muestra el número inicial de individuos reintroducidos en junio del 2013, el porcentaje de supervivencia de los individuos para finales de la época de lluvias (noviembre) del mismo año. El número de plantas que lograron sobrevivir un año después de la reintroducción y el porcentaje de supervivencia con respecto al número inicial de plántulas se muestra en la gráfica 2.

Cuadro 6. Caracterización de los microambientes de reintroducción de *Bletia urbana* en un pedregal en restauración dentro de la Ciudad Universitaria de la UNAM (Geopedregal).

| Sitio | Vegetación asociada | Medidas (cm) |
|-------|---|--------------|
| 1 | <i>Muhlenbergia robusta</i> | 60×43 |
| 2 | <i>M. robusta</i> y <i>Opuntia</i> sp. | 40×28 |
| 3 | <i>Bouvardia ternifoliay Montanoa tomentosa</i> | 50×43 |
| 4 | <i>M. robustay Manfreda scabra</i> | 34×26 |
| 5 | <i>M. robustay helechos (Pellaea sp.)</i> | 34×29 |
| 6 | <i>M. robusta</i> | 38×29 |
| 7 | <i>M. robusta</i> | 44×20 |
| 8 | <i>M. robusta</i> | 45×38 |
| 9 | <i>M. robusta, Opuntia</i> sp. y <i>Ma. scabra</i> | 56×45 |
| 10 | <i>B. ternifolia</i> y <i>Mo. tomentosa</i> | 37×32 |
| 11 | <i>Mo. tomentosa, Ma. scabra</i> y <i>Opuntia</i> sp. | 36×27 |
| 12 | <i>B. ternifolia</i> y <i>Ma. scabra</i> | 34×30 |
| 13 | <i>M. robusta, Ma. scabra</i> y <i>Buddleja cordata</i> | 34×27 |
| 14 | <i>M. robusta</i> y <i>B. ternifolia</i> | 32×29 |
| 15 | <i>Ma. scabra</i> y <i>B. ternifolia</i> | 32×26 |
| 16 | <i>B. ternifolia</i> y <i>Zephyranthes longifolia</i> | 32×24 |
| 17 | <i>B. ternifolia</i> y <i>Z. longifolia</i> | 30×28 |

Cuadro 7. Condiciones iniciales y porcentaje de supervivencia de *Bletia urbana* en el año 2014 y 2015 en un pedregal en restauración dentro de la Ciudad Univrsitaria de la UNAM (Geopedregal).

| Sitio | Núm. inicial de plantas 2013 | Núm. plantas 2014 | Supervivencia 2014 (%) | Núm. plantas 2015 | Supervivencia 2015 (%) |
|-------|------------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| 1 | 183 | 1 | 0.5 | 1 | 0.5 |
| 2 | 64 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| 3 | 102 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 34 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 48 | 9 | 19 | 7 | 15 |
| 7 | 56 | 8 | 14 | 8 | 14 |
| 8 | 97 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| 9 | 171 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 10 | 41 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 11 | 32 | 6 | 18 | 5 | 15 |
| 12 | 41 | 9 | 22 | 10 | 24 |
| 13 | 39 | 3 | 8 | 2 | 5 |
| 14 | 25 | 4 | 16 | 5 | 20 |
| 15 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |



Gráfica 2. Porcentaje de supervivencia de plántulas de *Bletia urbana* reintroducidas en 17 microambientes en un pedregal en restauración dentro de la Ciudad Universitaria de la UNAM (Geopedregal) en junio del 2013, a uno y dos años después de su reintroducción.

- *Bletia campanulata* La Llave & Lex

Las plántulas de *B. campanulata* tuvieron un periodo de aclimatización en invernadero de un año; de igual forma se seleccionaron siete sitios de reintroducción únicamente asociados a *Muhlenbergia robusta* debido a que para *B. urbana* estudios previos de supervivencia a largo plazo demuestran que hubo una mejor aceptación por parte de las plantas a esta especie (fig. 24). En el Cuadro 8 se muestra la vegetación asociada y el tamaño de cada sitio de reintroducción.



Figura 24. Supervivencia y desarrollo foliar de plántulas de *Bletia campanulata* reintroducidas en un pedregal en restauración (Geopedregal) asociadas a *Muhlenbergia robusta*, en un sitio con alto porcentaje de supervivencia (A-C) y uno con poca supervivencia (D-F), a cinco meses de su reintroducción (noviembre 2014). Fotos: Carmona (2014 y 2015).

En el Cuadro 9 se muestra en número de plantas reintroducidas en junio del 2014, el número de individuos para finales de la época de lluvias (noviembre) del mismo año y el porcentaje de supervivencia con respecto al número inicial (gráfica 3) y en la gráfica 4 se muestra la supervivencia para el 2015.

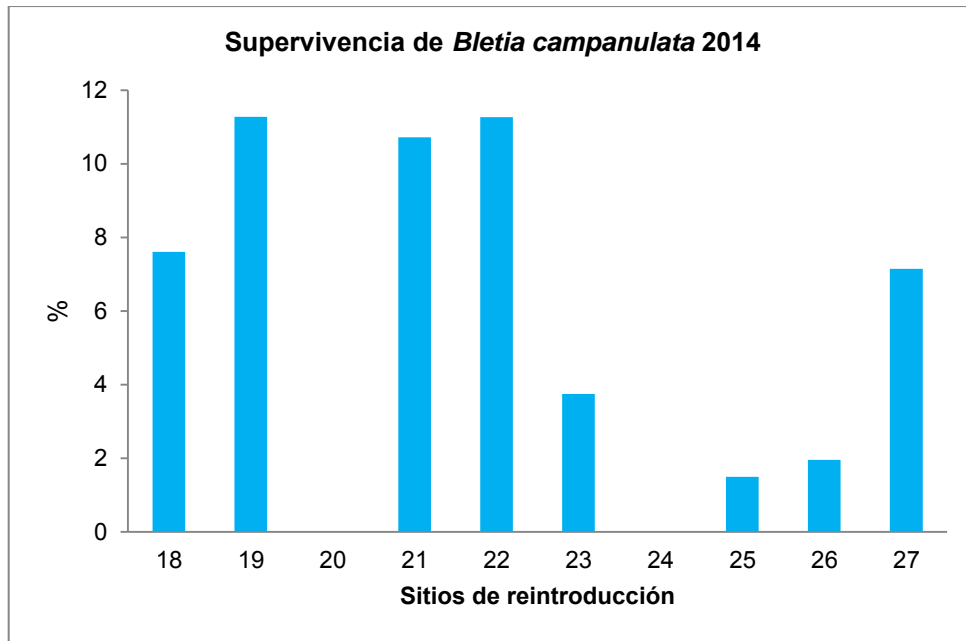
Cuadro 8. Caracterización de los microambientes de reintroducción de *Bletia campanulata* en un pedregal en restauración (Geopedregal) dentro de la Ciudad Universitaria de la UNAM.

| Sitio | Vegetación asociada | Medidas (cm) |
|-------|---|--------------|
| 18 | <i>Muhlenbergia robusta</i> | 55×47 |
| 19 | <i>M. robusta</i> y <i>Montanoa tomentosa</i> | 60×42 |
| 20 | <i>M. robusta</i> y <i>Bouvardia ternifolia</i> | 40×35 |
| 21 | <i>M. robusta</i> | 35×35 |

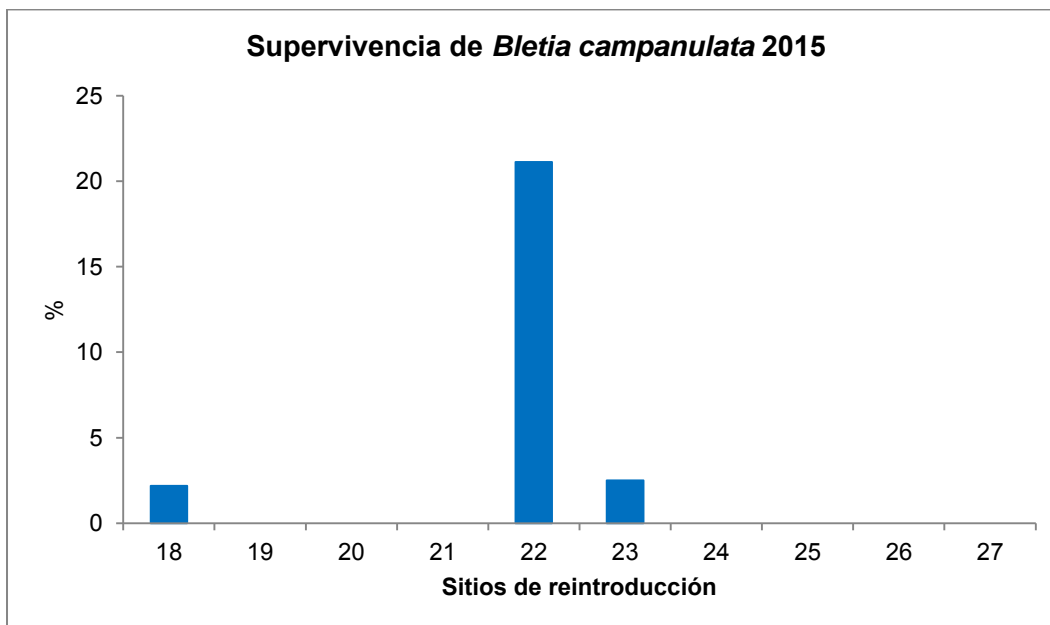
| | | |
|-----------|---|-------|
| 22 | <i>M. robusta</i> y <i>B. ternifolia</i> | 50×42 |
| 23 | <i>M. robusta</i> y <i>Milla biflora</i> | 53×35 |
| 24 | <i>Verbesina virgata</i> y <i>Portulaca mexicana</i> | 30×27 |
| 25 | <i>M. robusta</i> | 50×40 |
| 26 | <i>M. robusta</i> y <i>Manfreda scabra</i> | 45×30 |
| 27 | <i>M. robusta</i> y helecho (<i>Phlebodium areolatum</i>) | 39×38 |

Cuadro 9. Número inicial de individuos reintroducidos y supervivencia de *Bletia campanulata* en diez microambientes dentro de un pedregal sujeto a restauración (Geopedregal) en Ciudad Universitaria de la UNAM en el año 2013.

| Sitios | Núm. inicial | Núm. plantas 2014 | Supervivencia 2014 (%) | Núm. plantas 2015 | Supervivencia 2015 (%) |
|---------------|---------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 18 | 92 | 7 | 8 | 2 | 2 |
| 19 | 133 | 15 | 11 | 0 | 0 |
| 20 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 56 | 6 | 11 | 0 | 0 |
| 22 | 71 | 8 | 11 | 15 | 21 |
| 23 | 80 | 3 | 4 | 2 | 2 |
| 24 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 67 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 26 | 51 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 27 | 28 | 2 | 7 | 0 | 0 |



Gráfica 3. Porcentaje de supervivencia en diez microambientes de plántulas de *Bletia campanulata* reintroducidas en un pedregal en restauración (Geopedregal) en Ciudad Universitaria de la UNAM en junio del 2014.



Gráfica 4. Porcentaje de supervivencia de plántulas de *Bletia campanulata* reintroducidas en junio del 2014 en diez microambientes en un pedregal sujeto a restauración (Geopedregal) en la Ciudad Universitaria de la UNAM un año después (2015).

VIII DISCUSIÓN

8.1 Colonización micorrízica de *Habenaria strictissima* Rchb.f

Los porcentajes de colonización de las raíces muestreadas de *Habenaria strictissima* fue alto, superando el 50% en todas las raíces. La colonización se presentó principalmente en la base de las raíces y disminuyó hacia los ápices o zonas de elongación. La intensidad de la colonización varió en esta zona, pudiendo ser más intensa en la región media de la raíz. Las orquídeas terrestres de raíces finas y alargadas, como es el caso para esta especie, presentaron patrones similares, al igual que el de las otras especies de *Bletia* que crecen en el mismo ecosistema (Rangel-Villafranco, 2004). Esto implica que muy probablemente, los hongos que iniciaron el proceso de micorrización cuando se generaron nuevas raíces en la época de crecimiento, fueron invadiendo el tejido radical conforme éste se va desarrollando en el suelo. No se encontraron zonas intermedias sin micorrización, por lo que posiblemente no se den comúnmente puntos de colonización conforme va creciendo la raíz. Este es el primer trabajo que describe el patrón de colonización de una orquídea colonizada por un HMO de la familia Sebacinaceae. Según Matsuda y col. (2009), la colonización micorrízica de una orquídea terrestre clorofílica se da de forma errática en las raíces, en la parte basal, central y/o apical.

La mayoría de los pelotones observados en los cortes de raíces se encontraron aún sin digestión por parte de la orquídea, a pesar de que el muestreo se llevó a cabo en la época de floración de la planta. Rasmussen (1995) mencionó que la degradación del micelio de las micorrizas en algunas orquídeas corresponde a las épocas donde la planta necesita más energía y esto está en función de la estacionalidad (Smith y Read, 2008). Para algunas especies de orquídeas terrestres, la floración coincide con la máxima degradación de pelotones en la raíz, aunque esto no siempre es necesario, ya que puede haber una mayor digestión de los HMO en plena época de crecimiento previo a la formación de frutos. En el caso *H. strictissima*, la época de floración no se encuentra registrada para la REPSA, pero corresponde a la de especies del mismo género en este ecosistema como

Habenaria novemfida que va de julio a septiembre y *Habenaria entomata* que se prolonga hasta el mes de octubre (Téllez-Velasco y Flores-Villanueva, 2007). Existen registros de floración de *H. strictissima* en individuos de bosque xerófito y bosque de encino, los cuales indican que corresponden del mes de septiembre a inicios de octubre (González-Tamayo y Hernández-Hernández, 2010). Los hongos aislados en esta especie presentaron hifas con tamaños muy pequeños que fueron de los 3 a 5 μm de diámetro y presentaron una coloración café a hialina como otros descritos anteriormente para el anamorfo (Matsuda *et al.*, 2009).

8.2 Aislamiento de Hongos Micorrízicos Orquideoides de *H. strictissima*

Se lograron aislar solamente dos colonias de HMO. Esto después del segundo muestreo dado que en el primero, las muestras sufrieron de algunos problemas de contaminación en donde se ajustaron los tiempos y procedimientos finales mostrados en la metodología. La caracterización de la colonia (tasa de crecimiento lenta, morfología de hifas sumergidas, color hialino amarillento y datos merísticos como hifas menores a 4 μm) indicaron que el HMO aislado pertenecía al anamorfo *Epulorhiza*. Sin embargo, realizando las pruebas de núcleos, se encontró que las hifas fueron mononucleadas y se verificó lo que se había observado en la microscopía óptica que algunas hifas crecían consistentemente dentro de otras. Posteriormente con la identidad molecular se pudo reconocer que el aislado no correspondía a la descripción morfológica del anamorfo *Epulorhiza* si no al género *Sebacina*, en donde ambos aislados no amplificaron con primers específicos para *Tulasnella* (Taylor y McCormick, 2008). Ma y colaboradores (2003) hicieron la identificación molecular de aislados de *Epulorhiza* obtenidos de orquídeas tropicales, donde se observó que los micobiontes comprendían a los géneros *Tulasnella* y *Sebacina* que muestran un gran parecido en su aspecto morfológico y la única manera de conocer su identidad es a través de la identificación molecular.

Actualmente se sabe con las herramientas moleculares que varios anamorfos caracterizados dentro del género *Epulorhiza*, incluían especies no exclusivas de

Tulasnellaceae que es el recíproco de este anamorfo (Andersen, 1990). Los HMO pertenecientes a las epulorrizas por lo general son de lento crecimiento y muchas veces de muy difícil aislamiento (Zelmer *et al.*, 1996; Moreno-Camarena 2013, Ortega-Larrocea *com. pers.*), de ahí que en ocasiones, los medios generales como el PDA no sean los mejores para obtener aislados de estos hongos. Por estos motivos, al conocer la identidad del teleomorfo, se explicó por qué no recrecían los pelotones en medios convencionales y se decidió subcultivar a los hongos en medios para especies ectomicorrízicas o para especies de hongos con requerimientos especiales como el medio de chícharo (Griffiths *et al.*, 2003). Los aislados mostraron un crecimiento más rápido principalmente en el medio Czapek-Dox en el cual la sacarosa se suple por celulosa. Warcup (1971, 1981) describió por primera vez el hongo *Sebacina vermifera* que fue encontrado en madera en descomposición y que es un endofito de orquídeas ampliamente distribuido en Australia.

Las características de las colonias y la morfometría de los aislados coincidieron con las descripciones realizadas por Warcup (1988) para este género: colonia de color blanco y algodonosa con crecimiento superficial, cuando el micelio empieza a envejecer se torna de color café y de apariencia mucilaginoso y con otras descripciones de *Sebacina* (Warcup, 1971; Kottke y Suárez, 2009) que indicaron la presencia de hifas muy delgadas (valores máximos de 3 y mínimos de 1.5 μm) y un número muy variado de células moniloides. Además, como se mencionó anteriormente, se encontró la característica particular de hifas intracelulares con diámetros más pequeños como lo observado por Wilcox (1971) quien describió el crecimiento de hifas dentro de otras en aislados de ectendomicorrizas de *Pinus resinosa*, llamando a este fenómeno una aparente autólisis. Andersen (1990) también constata que algunos aislados de *Sebacina* pueden ser uninucleados.

Las especies del género *Sebacina*, se caracterizan por ser hongos formadores de ectomicorrizas (siendo en este grupo uno de los linajes más antiguos), micorrizas orquideoides (Tedersoo *et al.*, 2014) y ectendomicorrizas (Oberwinkler *et al.*, 2013). Una característica de los Sebacinales es que se dividen en dos grupos

distintos, A y B (Weiss *et al.*, 2004); las especies pertenecientes al grupo B (ej. *Sebacina vermifera*) se asocian con orquídeas autotróficas que crecen en pastizales, mientras que aquellas del grupo A (ej. *Sebacina incrunstans* y *Sebacina epigaea*) se asocian principalmente a orquídeas mixotróficas y en hábitats de bosques micorrízicos (Kottke y Suárez, 2009). Al hacer la filogenia de los aislados obtenidos de HMO, se observó que éstos se agrupan más cercanamente a *Sebacina vermifera* del grupo B de una orquídea terrestre autotrofa (*Caladenia tessellata*) de Australia más que de *S. allantoidea* aislada de una orquídea mixotrofa (*Neottia nidus avis*) de Alemania.

No se encontraron secuencias del género *Sebacinales* asociadas con orquídeas terrestres mexicanas, ni con especies del género *Habenaria* cuya distribución se da en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Pridgeon *et al.*, 2001), siendo Brasil, África central y el este Asiático, sus principales centros de diversificación. Algunos micobiontes encontrados para este género de orquídeas son *Ceratobasidium* sp. (Mosquera-Espinosa *et al.*, 2010), *Epulorrhiza* (Stewart y Kane, 2006a; Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea, 2007; Keel *et al.*, 2011) e inclusive *Thanatephorus* (Cowden y Shefferson, 2013). En el caso de Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea (2007), estudiaron dos especies de *Habenarias* mexicanas, una de ellas, *H. novemfida* que se encuentra también presente en la REPSA creciendo en un bosque de pino cercano (Sierra del Chichinautzin), de la cual aislaron dos *Epulorrhizas*. Cowden y Shefferson (2013) describieron a una especie de *Habenaria* asociada al menos a tres géneros distintos de HMO. Este género tiene actualmente imprecisiones en su resolución taxonómica además de su distribución mundial que posiblemente sea un resultado de ser poco específica con su HMO (Cowden y Shefferson, 2013; Waterman y Bidartondo, 2008).

8.3 Germinación de *H. strictissima* y *H. novemfida*

La germinación de semillas representa el método más eficiente para la propagación de orquídeas terrestres con fines de conservación dado que involucra

la salvaguarda de la variabilidad genética. Para el Pedregal de San Ángel, *Habenaria strictissima* es una de las cinco especies más vulnerables o amenazadas y que no han sido estudiadas (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea, 2007) por lo que su cultivo *in vitro* es una prioridad. Por otro lado, *H. novemfida*, aunque su distribución es muy amplia y es una orquídea abundante en la REPSA, es importante conocer los factores por los cuales esta especie se comporta de manera contraria a la anterior, aún siendo del mismo género, esto permitirá generar mecanismos de conservación y contribuirá con conocer el desarrollo de estas especies.

Uno de estos aspectos está relacionado con la polinización. Poco se sabe de los polinizadores de las orquídeas del Pedregal. En el caso de *H. strictissima* se sabe que la polinización del género es realizada principalmente por diferentes especies de polillas y mariposas (Dressler, 1993; Singer, 2001; Salazar, 2009). El germoplasma de este estudio se obtuvo al realizar previamente la polinización cruzada de flores de la misma planta y producto de polinización natural, lo que podría haber incrementado la probabilidad de que la germinación prosperara. Sin embargo, no se obtuvieron datos positivos que se avisaron por la mala calidad del germoplasma, obtenido con muchas semillas vanas y embriones que no se formaron. Esta puede ser una de las causas por las cuales exista un nulo reclutamiento de individuos de esta especie dentro de la REPSA. En el caso de *H. novemfida* se tuvieron dos tratamientos (autopolinización y polinización cruzada) en donde se observó que las cápsulas del tratamiento de polinización cruzada tuvieron un porcentaje de germinación más alto que las de autopolinización, como mencionaron Borba y colaboradores (2001). Los autores atribuyeron que existen mecanismos de autoincompatibilidad causantes de que los frutos autopolinizados generalmente contengan semillas sin embriones o que los embriones sean abortados en diferentes etapas.

Pocos estudios hay sobre la germinación de especies de este género. Stewart y Kane (2006b) probaron varios medios de cultivo asimbióticos y condiciones de iluminación en la germinación y desarrollo (emergencia y elongación de lámina

foliar) de *H. macroceratitis*. Obtuvieron después de cuatro meses en completa oscuridad en un medio cuya fuente de N provino sólo de aminoácidos, la máxima germinación (92%). La germinación simbiótica ha sido registrada para esta especie y para *H. repens* (Stewart y Kane 2006a; Keel *et al.*, 2011). En el caso de *H. novemfida*, la máxima germinación (96%) y el máximo desarrollo de plántula fue obtenido a los 86 días dds. Contrario a lo encontrado en la germinación asimbiótica para *H. macroceratitis*, en *H. novemfida* se observó un alto porcentaje de oxidación, el cual es un problema común en el cultivo de tejidos debido a la producción de fenoles que inhiben la actividad enzimática de la planta y llevan a la necrosis de los tejidos (Jiménez, 1998). En otras especies de la REPSA, Rangel-Villafranco (2004) y Suárez-Quijada (2010) observaron altos porcentajes de oxidación en los mismos medios de cultivo asimbióticos. Es posible que probando otros medios para la propagación de estas orquídeas terrestres, se evite este problema, como se ha resuelto con el cultivo simbiótico, lo que deja de manifiesto, que aún falta mucha investigación de biología básica para la propagación y consecuente conservación de estas especies (Ortega-Larrocea *et al.*, 2009).

8.4 Reintroducción de *Bletia urbana* Dressler y *B. campanulata* La Llave & Lex, en el Geopedregal

La germinación simbiótica de orquídeas de la REPSA ha demostrado ser altamente efectiva en la propagación de especies como *B. urbana*, *B. campanulata*, *Dicrhomanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *Habenaria novemfida* (Rangel-Villafranco, 2004; Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco, 2008; Suárez-Quijada, 2010). Si bien se sabe que los hongos simbiotes les permiten asegurar la nutrición de las plantas en suelos incipientes (Steinfort *et al.*, 2010), la producción asimbiótica es una alternativa de producción y conservación de especies (Rubluo *et al.*, 1993). Se eligieron estas dos especies ya que *B. urbana* se encuentra en la NOM-059-ECOL-2010 como una especie amenazada (Soto-Arenas *et al.*, 2007), aunque estudios recientes de Tinoco (2014) y Flores-Villanueva (2006) han indicado que tiene una distribución más amplia de la que se

creía, fue la primera orquídea propagada y reintroducida asimbióticamente vía cultivo de tejidos (Rúbulo *et al.*, 1989; 1993) y se han establecido otros protocolos de reintroducción con plantas simbióticas (Ortega-Larrocea *et al.* 2009). Se utilizaron plántulas asimbióticas y como se esperó, los porcentajes de supervivencia para ambas especies fue muy bajo debido a que no se encontraban asociadas a su micobionte. Las plántulas de *B. urbana* presentaron una supervivencia mayor a *B. campanulata* por haber tenido un tiempo menor de aclimatización en invernadero. Tinoco (2014), mencionó que ésta especie se asocia a helechos, *Agave spp.*, *Mulhembergia robusta*, *Opuntia spp.* y *Buddleja cordata* que les brindan la sombra y humedad necesarias para crecer. En el caso de las plántulas de *B. urbana* reintroducidas y asociadas a helechos, la humedad era excesiva y la radiación muy poca y el caso contrario con las asociadas a *Bouvardia ternifolia*, con poca humedad y alta radiación solar, todo esto no permitió su supervivencia.

En el caso específico de *B. urbana* para el año 2015 se observó que en algunos sitios hay un mayor número de individuos a los que habían para el 2014, Rúbulo y colaboradores (1993) mencionaron que es una especie que sobrevive a las épocas de sequía gracias a sus órganos de latencia (cormos), por lo que se infiere que las plántulas que no se presentaron en 2014 se encontraban en estado de latencia. Las plántulas de *B. campanulata* al ser asimbióticas y con poco tiempo de aclimatización tuvieron un bajo o nulo porcentaje de supervivencia. Las orquídeas propagadas por vía simbiótica tienen una mayor supervivencia en campo lo que faltaba corroborar en plántulas propagadas asimbióticamente y que se demuestra en este trabajo para esta especie (Ortega-Larrocea y González, 2008; Ortega-Larrocea *et al.*, 2009). Ortega-Larrocea (2012) mencionó que es fundamental llevar estudios a largo plazo que permitan asegurar el establecimiento de las poblaciones hasta su madurez reproductiva, para que puedan generar propágulos que les permitan perpetuarse y que actualmente sólo se ha logrado después de 15 años de reintroducción para *B. urbana* en plantas simbióticas (Ortega-Larrocea *com. pers.*).

IX. CONCLUSIONES

- Se realizó la primera descripción de la colonización micorrízica e identidad de su hongo asociado de *Habenaria strictissima* de la REPSA. La colonización micorrízica se presentó en todas sus raíces y fue más intensa en la base de las mismas, superando el 50%. Los hongos aislados de *H. strictissima* correspondieron al género *Sebacina* y no han sido reportados como micobiontes para ninguna especie de orquídea terrestre del género *Habenaria*, ni para otra orquídea mexicana. Esto demuestra que aún no se tienen conocidas todas las asociaciones de orquídeas terrestres de la REPSA ya que este es el primer reporte que menciona a un hongo de esta familia. La viabilidad de las semillas de *H. strictissima* fue nula por lo que aunado con la rareza del hongo simbionte, pueden ser las causas de que esta especie se encuentre prácticamente extinta dentro de la REPSA.
- Por otro lado, el aislamiento y cultivo de los aislados obtenidos de esta especie, contribuyó con la descripción de características no descritas anteriormente para una micorriza orquideoide si no para una ectendomicorriza muy poco estudiada. Nuevamente, se concluye que el estudio de los HMO en especies de la REPSA tiene un gran potencial para descubrir asociaciones nuevas y por ende, la importancia de conservar este ecosistema y la orquideoflora que protege.
- Las semillas de *H. novemfida* tuvieron un mayor porcentaje de germinación y mejor desarrollo cuando provinieron de una polinización cruzada en comparación a aquellas que se autopolinizaron. Sin embargo, presentaron un alto grado de oxidación durante su cultivo *in vitro*, por lo que es recomendable utilizar medios de cultivo con agentes antioxidantes o intentar la germinación simbiótica.
- Se demostró que la orquídea *Bletia urbana* tuvo una muy baja supervivencia en campo al ser reintroducida y propagada de manera asimbiótica, aún cuando se prolongaron las condiciones de aclimatización en

invernadero. Esto pone de manifiesto la importancia de haber desarrollado protocolos simbióticos para garantizar la supervivencia a largo plazo de esta especie.

- Este es el primer estudio de reintroducción de plántulas propagadas asimbióticamente de *B. campanulata* en campo. En comparación con *B. urbana*, para esta especie se obtuvo una menor supervivencia debido a que tuvo un año menos de aclimatización en invernadero.
- En general, para ambas especies, los microambientes de reintroducción determinaron la supervivencia de las plántulas reintroducidas, jugando las asociaciones un papel importante en la conservación de la humedad, radiación; protegiéndolas como en el caso del zacatón (*Moulebergia robusta*) o haciéndolas vulnerables, como el caso de aquellas especies que desaparecen por completo en época seca (*Bouvardia ternifolia*).

X. LITERATURA CITADA

- Ames, O., Stewart, D. 1985. Orchids of Guatemala and Belize. Dover Publications, UK. 44 p.
- Andersen, T. F. 1990. A study of hyphal morphology in the form genus *Rhizoctonia*. Mycotaxon 37: 25-46.
- Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons, New York, USA. 691p. 704.
- Arévalo R., Figueroa, J., Madriñán, S. 2011. Anatomía foliar de ocho especies de orquídeas epífitas. Lankesteriana 11(1): 39-54.
- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R. 2013. Ectomycorrhizal fungi from monodominant *Abies religiosa* forest in neotropical Mexico. Unpublished (Gen Bank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF041421.1?report=GenBank>) Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Ávila, I., Salgado-Garciglia, R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Biológicas 8: 138-149 (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México).
- Bernard, N. 1899. Sur la germination de *Neottia nidus-avis*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 128: 1253-1255.
- Bidartondo M, Read, D. 2008. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. Molecular Ecology 17: 3707-3716.
- Borba, E., Semir, J., Shepherd, G. 2001. Self-incompatibility, Inbreeding Depression and Crossing Potential in Five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) Species. Annals of Botany 88: 89-99.
- Camarena-Gutiérrez, G. 2012. Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 18: 409-422.
- Cano-Santana, Z., Meave, J. 1996. Sucesión primaria en derrames volcánicos: el caso del Xitle. Ciencias 41: 58-68.
- Castillo-Argüero, S., Martínez, O., Meave, J., Hernández, A. M., Núñez, C., Santibañez, A., Guadarrama, C. 2009. Flora: susceptibilidad de la comunidad a la invasión de malezas nativas y exóticas. Pp.: 107-117. En: Lot, A., Cano-Santana Z. (ed.) Biodiversidad del ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Castillo-Argüero, S., Martínez, Y., Romero, M. A., Chávez, P., Nuñez, O., Sánchez, I., Meave, J. 2007. La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Aspectos florísticos. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 294 p.

- Castillo-Argüero, S., Montes-Cartas, G., Romero-Romero, M. A., Martínez-Orea, Y., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallén, I., Núñez-Catillo, O. 2004. Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (D. F., México). Bol. Soc. Bot. Méx. 74: 51-75.
- Chávez, A. 1980. Cultivo asimbiótico de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Ángel. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 81 p.
- Cowden, C., Shefferson, R. 2013. Diversity of root-associated fungi of mature *Habenaria radiata* and *Epipactis thunbergii* colonizing manmade wetlands in Hiroshima Prefecture, Japan. Mycoscience 54: 327-334.
- De la Garza-López, M. P. 2012. Introducción a la restauración. Pp.: 255-261. En: Téllez, M. A. (Comp.). Conservación de Orquídeas en México. Instituto de Biología. UNAM. México D.F.
- Deshmukh, S., Huckelhoven, R., Schafer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F., Kogel, K. 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 103 (49): 18450-18457.
- Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Dioscorides Press, Protland, Oregon. USA. 314 p.
- Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A. R., Jiménez-Machorro, R., Sánchez-Saldaña, L. 2005. Las orquídeas de los cafetales en México: una opción para el uso sostenible de ecosistemas tropicales. Revista de Biología Tropical 53: 73-84.
- Flores-Villanueva, L. 2006. Contribución al estudio de la familia Orchidaceae en la Reserva del Pedregal de San Ángel y en algunas zonas perturbadas por la urbanización de la Ciudad Universitaria UNAM, México D. F. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. 110 p.
- Freuler, M. 2008. Orquídeas. Ed. Albatros. Argentina. 47 p.
- Garnica, S., Krause, C., Bauer, R., Weiss, M. 2009. Molecular phylogenetic analysis of sebacinoid fungi associated with herbs. Sometido a New Phytologist.
- González-Tamayo, R., Hernández-Hernández, L. 2010. Las orquídeas del Occidente de México. Vol. 1. Ed. COECYTJAL. México D. F. 303 p.
- Griffiths, R. G., Dancer, J., O'Neill, E., Harwood, J. L. 2003. Effect of culture conditions on the lipid composition of *Phytophthora infestans*. New Phytologist 158: 337-344.
- Hágsater, E., y Salazar, G. A. 1990. Icones Orchidacearum, Orchids of Mexico, Part 1-3. Asociación Mexicana de Orquideología (AMO).

- https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/319705/Bletia/urbana/Dressler_Robert_Louis Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Hágsater, E., Soto, M. A., Salazar, G., Jimenez, M. A., López, M. A., Dressler, R. 2015. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, A. C., México. 302 p.
- Hamer, F. 1982. Icones Plantarum Tropicarum, Vol. 7. Orchids of Nicaragua, Part. 1. The Marie Selby Botanical Gardens.
- <https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/312686/Bletia/campanulata>. Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Hamer, F. 1983. Icones Plantarum Tropicarum, Vol. 8. Orchids of Nicaragua, Part. 2. The Marie Selby Botanical Gardens.
- <https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/310702/Habenaria/novemfida> Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Hamer, F. 1984. Icones Plantarum Tropicarum, Vol. 11. Orchids of Nicaragua, Part. 4. The Marie Selby Botanical Gardens.
- https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/310256/Habenaria/strictissima/Reichenbach_Heinrich_Gustav , fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Herrera, T., Ulloa, M. 2005. El reino de los hongos, micología básica y aplicada. Ed. Fondo de Cultura Económica, México D. F. 552 p.
- Instituto de Geología, UNAM .<http://www.geologia.unam.mx:8080/igl/index.php/proyectos-extra/311-proyectos-ambientales/geopedregal>. Fecha de última consulta 11 de febrero del 2016.
- Jiménez, E. G. 1998. Cultivo de Ápices y Meristemas. Pp.: 45-46. En: Ponce, J. N., (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Vol. 1. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.
- Keel, B., Zettler, L., Kaplin, B. 2011. Seed Germination of *Habenaria repens* (Orchidaceae) *in situ* beyond its range, and its potential for assisted migration imposed by climate change. *Castanea* 76(1): 43-54.
- Kennedy, P., Garibay-Orijel, R., Higgins, L., Angeles-Arguiz, R. 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forests support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeography. *Mycorrhiza* 21(6): 559-568.
- Kottke I., Suárez, J.P. 2009. Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids identification and functional types. Pp.: 84-99. En: Pridgeon A. M, Suárez, J.P. (eds.) Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.

- Lot, A., Camarena, P. 2009. El Pedregal de San Ángel de la ciudad de México: Reserva Ecológica Urbana de la Universidad Nacional. Pp.: 19-25. En: Lot, A., Cano-Santana Z. (ed.) Biodiversidad del ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Lot, A, M. Pérez, G. Gil, S. Rodríguez, Camarena, P. 2012. La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Atlas de Riesgos. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 51 p.
- Luan, V., Thien, N., Khiem, D., Nhut, D. 2006. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture. Nong Lam University Ho Chi Minh City, Vietnam. 175-177 pp.
- Ma, M., Tan, T. K., Wong, S. M. 2003. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. Mycological Research 107: 1041-1049.
- Martin, B. 1987. Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. Plant Disease 71: 47-49.
- Mashuhara, G; Kasuya, K. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). New Phytologist 127: 711-718.
- Matsuda, Y., Amiya, A., Ito, S. 2009. Colonization patterns of mycorrhizal fungi associated with two rare terrestrial orchids, *Cephalanthera falcate* and *C. erecta*. Ecol. Rest. 24: 1023-1031.
- Maunder, M. 1992. Plant reintroduction: an overview. Biodiversity and Conservation 1: 51-61.
- McKendrick, S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation, Ecuador. 17 p.
- Meffe, G., Carroll, C. (eds.). 1994. Principles of Conservation Biology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachusetts, USA. 600 p.
- Mendoza, E. 2008. Elementos de rehabilitación ecológica: primeros pasos en la reintroducción de especies. Pp.: 61-69. En: Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica El Pedregal de San Ángel (SEREPSA). Manual de Procedimientos. Programa de Adopción de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Secretaría Ejecutiva REPSA, Coordinación de la Investigación Científica, UNAM, México.
- Mitchell, R. 1989. Growing Hardly Orchids from seed at Kew. The Plants man 3(2): 152-169.
- Molina, R., Palmer, J. G. 1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. Pp.: 115-119. En: Method and principles of mycorrhizal research. (Ed. Schenck, NC). American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. USA. 244 p.

- Moreno-Camarena, M. 2013. Aislamiento de hongos micorrízicos orquideoides de algunas especies del género *Bletia* en dos municipios del Estado de México. Tesis de Licenciatura Ingeniería Agronómica en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. 189 p.
- Mosquera-Espinosa A., Bayman P., Túpac-Otero, J. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. Acta Agronómica 59(3): 316-326. Universidad Nacional de Colombia.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15(1): 473-497.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental- Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación del 30 de diciembre.
- Oberwinkler, F., Reiss, K., Bauer, R., Selossé, M. A., Weiss, M., Garnica, S., Zucaro, A. 2013. Enigmatic Sebaciales. Mycol. Progress 12: 1-27.
- Ortega-Larrocea, M. P. 2012. Conservando las orquídeas a través de sus hongos micorrízicos. Pp. 193-198. En: Téllez, M. A. (Comp.), Conservación de Orquídeas en México. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.
- Ortega-Larrocea, M. P., Martínez A., Chávez, V. M. 2009. Conservación y propagación de orquídeas. Pp: 483-495. En: Lot, A., Cano-Santana Z. (ed.) Biodiversidad del ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Ortega-Larrocea, M. P., González, D. 2008. Los hongos asociados a las orquídeas terrestres en la restauración. Pp. 219-227. En: Heredia, G. (ed.). Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica. Instituto de Ecología. México. 371 p.
- Ortega-Larrocea, M. P., Rangel-Villafranco, M. 2007. Fungus-assisted reintroduction and long-term survival of two Mexican terrestrial orchids in the natural habitat. Lankesteriana 7(1-2): 317-321.
- Ortega-Larrocea, M. P., Luna-Rosales, B. S, Chávez-Ávila, V. M. 2000. Potencialidad de la micorrización masiva *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae). Pp: 28. En: Resúmenes de la I Reunión Iberoamericana y III Simposio Nacional sobre Micorriza. México.
- Otero, J., Bayman, P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. Acta Agronómica 58 (4): 270-276. Colombia.
- Otero, J., Ackerman, J., Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. American Journal of Botany 89: 1852-1858.
- Parmasto, E. 1996. UNITE database: https://unite.ut.ee/bl_forw.php?nimi=UDB000972 Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.

- Pridgeon, A. M., Cribb P., Chase, M., Rasmussen, F. 2001. *Genera Orchidacearum* vol. 2, Orchidoideae, Part 1. Oxford University Press Inc. New York. 438 p.
- Rangel-Villafranco, M., Ortega-Larrocea, M. P. 2007. Efforts to conserve endangered terrestrial orchids *in situ* and *ex situ* at two natural reserves within Central Mexico. *Lankesteriana* 7(1-2): 326-333.
- Rangel-Villafranco, M. 2004. Aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres de la reserva "El Pedregal" de San Ángel, México, D.F. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México. 98 p.
- Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, U.K.444 p.
- Rojo, A. (comp.). 1994. Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Ángel: Ecología, Historia Natural y Manejo. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 410 p.
- Rzedowski, J. 1954. Vegetación del pedregal de San Ángel (Distrito Federal, México). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 8(1-2): 59-129.
- Rubluo, A., Chávez, V., Martínez-Palacios, A. 1989. *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana* 4(2): 68-73.
- Rubluo, A., Chávez, V., Martínez, A., Martínez, V. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation* 63: 163-169.
- Salazar, G. A. 2009. Orquídeas. Pp: 153-169. En: Lot, A., Cano-Santana Z. (ed.) Biodiversidad del ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Sarmiento, M., Romero, C. 2000. Orquídeas mexicanas. Banco Nacional de Obras y Servicios Públicos, Miguel Ángel Porrúa. México. 148 p.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Restauración ecológica. <http://www.inecc.gob.mx/con-eco-ch/386-hc-restauracion>. Fecha de última consulta 11 de febrero del 2016.
- Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica El Pedregal de San Ángel (SEREPSA). 2008. Manual de Procedimientos. Programa de Adopción de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Secretaría Ejecutiva REPSA, Coordinación de la Investigación Científica, UNAM, México. 108 p.
- Shan, X. C., Liew, E. C. Y., Weatherhead, M. A., Hodgkiss, I. J. 2002. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia* 94: 230-239.
- Shefferson, R., Weiss, M., Kull, T., Taylor, L. 2005. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* 14: 613-626.

- Siebe, C. 2009. Pp: 43-49. En: Lot, A., Cano-Santana Z. (ed.) Biodiversidad del ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *Am. Orchid Soc. Bull* 50: 416-418.
- Singer, R. 2001. Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in southeastern Brazil. *Darwiniana* 39(3-4): 201-207.
- Smith, S., Read, D., 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd ed. Academic Press, London. UK. 800 p.
- Soto-Arenas, M. 1996. Mexico [tratamiento regional]. Pp 53-58. En: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids-status survey and conservation action plan. IUCN, Gland y Cambridge.
- Soto-Arenas, M., Solano-Gómez, R., Hågstadter, E. 2007. Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana* 7(1-2): 114-121.
- Soto-Arenas, M. A, Solano-Gómez, A. R. 2007. Ficha técnica de *Bletia urbana*. En: Soto-Arenas M. A. (comp.). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México, D.F. <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Bletiaurbana00.pdf>. Fecha de última revisión, 11 de febrero del 2016.
- Stewart, S., Kane, M. 2006a. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86: 159-167.
- Stewart, S., Kane, M. 2006b. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86: 147-158.
- Steinfort, U., Verdugo, G., Besoani, X., Cisternas, M. A. 2010. Mycorrhizal association and symbiotic germination of terrestrial orchid *Bpinnulaa fimbriata* (Poepp.) Johnst (Orchidaceae). *Flora* 205: 811-817.
- Suárez-Quijada, I. 2010. Alternativas simbióticas de conservación (micropropagación y reintroducción) de *Dichromantus aurantiacus* (Orchidaceae), como especie modelo en la Reserva Ecológica El Pedregal de San Ángel. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 148 p.
- Taylor, D. L., McCormick, M. K. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of Basidiomycetous orchid micorrizas. *New Phytologist* 177: 1020-1033.
- Tedersoo L., Bahram M., Ryberg M., Otsing E., Koljalg U., Abarenkov K. 2014. Global biogeography of the ectomycorrhizal/ sebacina lineage (Fungi, Sebaciniales) as revealed from comparative phylogenetic analyses. *Molecular Ecology* 23: 4168-4183.

- Tedersoo, L. 2012a. UNITE database: https://unite.ut.ee/bl_forw.php?nimi=UDB016422, Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Tedersoo, L. 2012b. UNITE database: https://unite.ut.ee/bl_forw.php?nimi=UDB014117, Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Tedersoo, L. 2012c. UNITE database: https://unite.ut.ee/bl_forw.php?nimi=UDB014112, Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Téllez-Velasco, A., Flores-Villanueva, L. 2007. Orquídeas Terrestres del Pedregal de San Ángel. UNAM. México. 75 p.
- Téllez-Velasco, A. (comp.). 2011. Análisis del diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México, Estado de México. 169 p.
- Tinoco, S. 2014. Levantamiento de un censo poblacional actual de la especie en peligro *Bletia urbana* y otras orquídeas en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, México, D. F. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 67 p.
- Van der Pijl, L., Dodson C. 1966. Orchid flowers: their pollination and evolution. University of Miami Press, USA. 214 p.
- Warcup, J. H. 1971. Specificity of Mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. *New Phytologist* 70: 41-46.
- Warcup, J. H. 1981. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New Phytologist* 87: 371-81.
- Warcup, J. H. 1988. Mycorrhizal associations of isolates of *Sebacina vermifera*. *New Phytologist* 110: 227-231.
- Warcup J. H., Talbot, P. 1996. Perfect states of some Rhizoctonias. *Transactions British Mycological Society* 49(3): 427-435.
- Waterman, R. J., Bidartondo, M. I. 2008. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of Orchids. *Journal of Experimental Botany* 59(5): 1085-1096.
- Weiss, M., Sykorova, Z., Garnica, S., Riess, K., Martos, F., Krause, C., Oberwinkler, F., Bauer, R., Redecker, D. 2011. Sebacinales Everywhere: Previously Overlooked Ubiquitous Fungal Endophytes.
- Weiss, M., Selossé, M. A., Rexer, K. H., Urban, A., Oberwinkler, F. 2004 *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research* 108 (9): 1003-1010.
- Wells, K., Bandoni, R., Lim, S., Berbee, M. 2003. Observations on Some Species of *Maxirium* and reconsideration of the Auriculariaceae and Hyaloriaceae (Auriculariales). Unpublished. 54-68 pp.

- Wilcox, H. E. 1971. Morphology of Ectendomycorrhizae in *Pinus resinosa*. Pp: 54-68. En: Wessel, J. 1971. Mycorrhizae: Proceedings, Volume 1. U. S. Govt. Print. 255 p.
- Yagame, T., Ogura-Tsujita, Y., Yukawa, T. 2013. Fungal partner shifts during the evolution of mycoheterotrophy in *Neottia* (Orchidaceae).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB831796.1?report=GenBank>, Fecha de última consulta, 11 de febrero del 2016.
- Yagame, T. 2011. Study on mycorrhizal symbioses in Orchidaceae. Japanese Journal of Mycology 52: 11-18.
- Zelmer C., Cuthbertson L., Currah R. S. 1996. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. Mycoscience 37: 439-446.
- Zettler L., McInnis T. 1993. Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes odorata cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). Lindleyana 8 (3): 142-148.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Medio de Aislamiento Fúngico (MAF).

| Reactivo | g/L |
|---|-----|
| Nitrato de Calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ | 0.5 |
| Fosfato de Potasio KH_2PO_4 | 0.2 |
| Cloruro de Potasio KCl | 0.1 |
| Sulfato de Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 |
| Extracto de Levadura | 0.1 |
| Agar bacteriológico | 8.5 |

Anexo 2. Reactivos y programa para extracción de DNA con los primers ITS1-ITS4 Tul

0.35 μL Tag polimerasa AXYGEN
2.5 μL Buffer mix (Buffer A) 10x
2.5 μL Cloruro de Magnesio (MgCl_2)
0.5 μL Leche descremada 5%
2.5 μL dnTp mix 2 μM
0.13 μL Primer ITS1
0.13 μL Primer ITS4 Tul
3 μL DNA dilución 1/10
13.39 μL agua Pisa

Amplificación para ITS1- ITS4 Tul

| | | | |
|-----------------------|------|-------|-------------|
| Pre-desnaturalización | 96°C | 2 min | } 35 ciclos |
| Segmento 1 | 94°C | 1 min | |
| Segmento 2 | 54°C | 1 min | |
| Segmento 3 | 72°C | 1 min | |
| Elongación | 72°C | 8 min | |

Anexo 3. Reactivos y programa para extracción de DNA con los primers ITS1-ITS4.

0.35 μ L Tag polimerasa AXYGEN
 2.5 μ L Buffer mix (Buffer A) 10x
 2.5 μ L Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)
 0.5 μ L Leche descremada 5%
 2.5 μ L dnTp mix 2 μ M
 0.25 μ L Primer ITS1
 0.25 μ L Primer ITS4
 3 μ L DNA dilución 1/10
 13.15 μ L agua pisa

Amplificación para ITS1- ITS4

| | | | |
|-----------------------|------|-------|-------------|
| Pre-desnaturalización | 95°C | 2 min | } 35 ciclos |
| Segmento 1 | 95°C | 1 min | |
| Segmento 2 | 55°C | 1 min | |
| Segmento 3 | 72°C | 1 min | |
| Elongación | 72°C | 8 min | |

Anexo 4. Medio de cultivo Murashige and Skoog (MS) 1962.

| Componentes | g/L |
|----------------------------|------|
| MACRONUTRIENTES | |
| (NH_4) NO_3 | 1.65 |
| KNO_3 | 1.90 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.37 |
| KH_2PO_4 | 0.17 |
| | |
| CALCIO ($CaCl_2$) | 0.44 |
| | |

| | |
|---|-------------|
| MICRONUTRIENTES | mg/L |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 16.89 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.60 |
| H ₃ BO ₃ | 6.20 |
| KI | 0.83 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 |
| | |
| FIERRO | mg/L |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 |
| Na ₂ EDTA | 37.3 |
| | |
| VITAMINAS | mg/L |
| Tiamina HCl | 0.1 |
| Ácido Nicotínico | 0.5 |
| Pirodoxina HCL | 0.5 |
| | |
| INOSITOL | 0.10 g/L |
| | |
| GLICINA | 2 mg/L |
| | |
| CARBOHIDRATOS | |
| Sacarosa | 30 g/L |

Anexo 5. Medio de cultivo Czapeck-Dox modificado (Warcup, 1971).

| Reactivo | g/L |
|--|------------|
| Nitrato de Sodio (NaNO ₃) | 2.0 |
| Fosfato Dipotásico (K ₂ HPO ₄) | 1.0 |
| Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 0.5 |
| Cloruro de Potasio (KCl) | 0.5 |
| Sulfato Ferroso (FeSO ₄) | 0.01 |
| Extracto de levadura (0.05%) | 0.5 |
| Celulosa (2%) | 20 |
| Agar Bacteriológico | 15 |

Anexo 6. Medio de cultivo Hagem (Molina y Palmer, 1982).

| Reactivo | g/L |
|--|------------|
| Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl) | 0.5 |
| Fosfato de Potasio (K ₂ HPO ₄) | 0.5 |
| Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 0.5 |
| Cloruro Férrico (1%) | 1.2 mL |
| Extracto de malta | 5.0 |
| Glucosa | 5.0 |
| Agar Bacteriológico | 15 |

Anexo 7. Medio de cultivo Melin Norkrans modificado (Molina y Palmer, 1982).

| Reactivo | g/L |
|---|------------|
| Cloruro de Calcio (CaCl ₂) | 0.05 |
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 0.025 |
| Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄) | 0.5 |
| Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 0.15 |
| Fosfato de Amonio(NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0.5 |
| Cloruro Férrico(1%) | 1.2 mL |
| Extracto de malta | 3 |
| Glucosa | 10 |
| Tiamina | 0.5 mg/L |
| Agar bacteriológico | 15 |