



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas
terrestres de la reserva “El Pedregal” de San Ángel,
México, DF.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

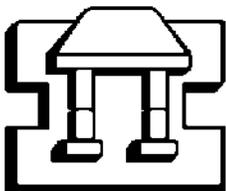
B I O L O G O

P R E S E N T A:

Mónica Rangel Villafranco

Director de Tesis:

Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea



Los Reyes Iztacala. Estado de México

Noviembre 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Quien no haya experimentado la seducción que la ciencia ejerce sobre una persona, jamás comprenderá su tiranía. En otros estudios se puede llegar al mismo nivel que llegaron otros antes, sin poder dar un paso más; pero en la investigación científica, por el contrario, quedan siempre nuevas maravillas por descubrir y estudiar.

Mary W. Shelley, Frankenstein.

*A Mi,
por nunca darme por vencida y
seguir en el camino que me había trazado*

*A mis Padres
por la fe que depositaron en mi y
su constante apoyo*

*A mis Hermanos
por crecer con migo y
estar a mi lado*

*A mi Compañero Amigo, Novio,
y Esposo Israel
por no dejarme desfallecer
y estar siempre conmigo
compartiendo la vida*

AGRADECIMIENTOS

A la Dr. Maria del Pilar Ortega Larrocea, por aceptarme bajo su dirección, por el tiempo invertido en la concepción del presente trabajo, apoyo en el laboratorio, así como en el trabajo de campo, apoyo moral, paciencia y comprensión a lo largo de él y lo más importante... por creer en mi.

Al M. en C. Ernesto Aguirre León, M. en C. Francisco López Galindo, M. en C. Daniel Muños Iniestra y Dr. Sergio Chazado Olvera, por dedicarle tiempo a la revisión de este trabajo, así como por sus comentarios y sugerencias que llevaron al mejoramiento del mismo.

A la M. en C. María de los Ángeles Aída Téllez Velasco del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por su asistencia en el trabajo de campo y determinación taxonómica de las orquídeas, así como su colaboración académica. En lo personal por el interés en la realización de esta tesis y por su amistad.

Al Dr. Gerardo A. Salazar, Jefe del Herbario Nacional, Instituto de Biología de la UNAM, por su invaluable opinión sobre la determinación taxonómica de las orquídeas.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por su invaluable asesoría académica, por permitirnos hacer uso de la infraestructura del laboratorio a su cargo, así como por el apoyo para la realización de esta tesis.

A la M. en C. Esthela Sandoval Zapotitla del laboratorio de Apoyo a la Investigación del Jardín Botánico de la UNAM, por su apoyo en la toma de microfotografías en el microscopio óptico y asesoría académica.

Al Dr. Luigui Solari Investigador del Instituto Geología por permitirnos amablemente el acceso y utilización del microscopio estereoscópico del laboratorio de Separación de Minerales.

Al Biól. Israel Cárdenas Camargo por su ayuda en el trabajo en campo y sus comentarios sobre el mismo.

A la M. en C. Andrea F. Herre y a la M. en C. Kumiko Shimada Miyasaka del Laboratorio de Edafología Ambiental del Instituto de Geología de la UNAM por su apoyo técnico en las actividades de laboratorio. A la Biól. Bárbara Estrada del Jardín

Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por su apoyo técnico en las actividades de laboratorio.

Al Dr. C. Walker de Biological Research and Imaging Laboratory, Royal Botanic Garden, Edinburgh por la donación de la base de datos del cepario.

A mis maestros que me enseñaron el amor a la carrera y sus múltiples e inimaginables caminos en especial a la M. en C. Martha Salcedo y al Dr. Diódoro Granados y al M. en C. Ismael Aguilar.

A mis compañeras de laboratorio Microcosmos, a las biólogas Cristal Pérez y Angélica Morales por su apoyo y compañía en este largo camino.

A mis amigos de toda la carrera Eufrosina Hinojosa, Manuel Ayala, David Godínez, José Luis Zárate, Edgar Oaxaca, Patricia Chaires, Moisés Aguilar, Luis Enrique Avila, Gillian López, Eduardo Jiménez, Rigoberto Romualdo, por todas las experiencias compartidas y su invaluable amistad.

A los amigos que encontré en el museo UNIVERSUM, que me enseñaron otras formas de ver el mundo y sus distorsiones Liliana Ruvalcaba, Abigail González, Cristal Pérez, Nicole Fuentes, Rosa Curiel, Juan Manuel Sánchez.

Esta tesis contó con el apoyo del Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL), Dirección General de Evaluación, UNAM.

ÍNDICE

RESUMEN.	7
I. INTRODUCCIÓN.	
1.1. Generalidades de las orquídeas.	9
1.1.1. Germinación de orquídeas.	10
1.2. Las orquídeas en México.	12
1.3. Cultivo de orquídeas.	12
1.3.1. Cultivo asimbiótico de orquídeas.	12
1.3.2. Cultivo simbiótico de orquídeas.	13
1.3.3. Micorriza orquidácea.	16
1.4. Importancia de los bancos de germoplasma.	20
II. ANTECEDENTES.	
2.1. Estudios florísticos de orquídeas en la Reserva.	23
2.2. Propagación y Conservación de Orquídeas de “El Pedregal”	25
2.2.1. Cultivo Asimbiótico de Orquídeas.	25
2.2.2. Aislamiento de Hongos micorrizicos de orquídeas de la reserva y su cultivo simbiótico.	26
III. JUSTIFICACIÓN.	28
IV. OBJETIVOS.	
4.1. Objetivo general.	29
4.2. Objetivos particulares.	29
V. ÁREA DE ESTUDIO.	
5.1. Localización.	30
5.2. Suelo.	32
5.3. Clima.	32
5.4. Vegetación.	33
VI. MATERIALES Y MÉTODO.	
6.1. Recolección del material biológico.	35
6.2. Aislamiento de hongos micorrizicos.	36
6.3. Viabilidad de las semillas y estandarización de la siembra.	37
6.4. Inoculo de semillas (Diseño Experimental).	38
6.5. Análisis estadístico.	39

6.6. Creación de un cepario de hongos micorrízicos.	40
---	----

VII RESULTADOS.

7.1. Recolecta del material biológico.	41
7.2. Aislamiento de hongos micorrízicos.	41
7.2.1. Caracterización morfológica de las simbiosis <i>in situ</i> .	41
7.2.2. Aislamiento de los hongos micorrízicos.	46
7.3. Viabilidad de las semillas y estandarización de la siembra.	46
7.4. Pruebas de germinación y desarrollo simbiótico.	51
7.5. Creación de un cepario de hongos micorrízicos de orquídeas.	74

VIII DISCUSIÓN.

8.1. Germoplasma de orquídeas.	81
8.2. Caracterización morfológica de las simbiosis <i>in situ</i> .	81
8.3. Aislamiento de los hongos micorrízicos.	84
8.4. Viabilidad de las semillas y estandarización de la siembra.	85
8.5 Germinación y desarrollo simbiótico	86
8.2 Relación orquídea – hongo (especificidad).	89

IX CONCLUSIONES.	90
------------------	----

X LITERATURA CITADA.	92
----------------------	----

Anexo 1 Descripción de las especies.	98
--------------------------------------	----

Anexo 2 Base de datos del cepario.	106
------------------------------------	-----

Anexo 3 Base de datos del banco de germoplasma.	111
---	-----

RESUMEN

Se llevó a cabo el aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres de la Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Ángel, México D. F. Se caracterizó la simbiosis micorrízica *in situ* de seis especies (*Bletia campanulata*, *Bletia urbana*, *Bletia* sp., *Dichromantus cinnabarinus*, *Habenaria novemfida*, y *Stenorrhynchos aurantiacus*) por vez primera para este edafosistema. Se encontró que las especies pertenecientes al género *Bletia* presentaron un patrón de micorrización intenso a lo largo de toda la raíz y ancho del córtex, sin que se apreciaran zonas de digestión de los pelotones, pero si, pelotones degradados en patrones irregulares. En *H. novemfida* se encontró una misma micorrización homogénea a lo largo de la raíz. *D. cinnabarinus* presentó un patrón similar a ésta última pero más localizado que fue concéntrico pero en las primeras capas celulares del córtex, subepidérmicamente y en *S. aurantiacus* su micorrización fue únicamente en un lado de la raíz. Se aislaron 15 cepas distintas de 4 especies de orquídeas y se logró probar su efectividad en formar la asociación micorrízica *in vitro* en semillas de siete especies de orquídeas incluyendo a *M. myurus*. Se probaron previamente a este análisis, condiciones de germinación para las especies y se encontró que las especies pertenecientes al género *Bletia* presentaron un comportamiento fotoblástico, mientras que las especies restantes, son inhibidas por la luz para su germinación y requieren de un proceso previo de oscuridad. Además de que las primeras germinan fácil y rápidamente en condiciones asimbióticas, pudiendo ambos, ser mecanismos de adaptación a la supervivencia en su habitat. No se lograron establecer condiciones óptimas de germinación para *M. myurus*. Se estandarizó un método de siembra de semillas por peso y de inoculación simbiótica *in vitro*.

Las pruebas de germinación simbiótica fueron efectivas para demostrar la capacidad simbiótica de los aislados obtenidos, lo cual fue demostrado para los cuatro aislados probados. Sin embargo, se demostró que no son suficientes para determinar la eficacia de los aislados en el posterior desarrollo de las semillas. Se vio para varias especies (*B. campanulata*, *B. urbana* y *Bletia* sp.) que algunos aislados en particular promovieron el desarrollo posterior a la germinación y que algunas especies (v. gr. *H. novemfida*) presentaron una elevada micotrofia y especificidad para su aislado. La especie *S. aurantiacus* presentó un patrón muy heterogéneo de respuesta en la germinación y desarrollo que quizá se deba a condiciones de inmadurez de los embriones de algunas semillas o a la propia variabilidad genética de las semillas en las cápsulas.

Se demostró tanto la especificidad de algunas especies para su aislado, como la inespecificidad de otras para los aislados probados, así como la micotrofia de algunas semillas para germinar y desarrollarse. Esto plantea que se deben continuar con las estrategias de propagación simbiótica con los endófitos naturales como un mecanismo de conservación del germoplasma de hongos y plantas. En el presente trabajo, se estableció por vez primera, un banco de germoplasma de hongos, con 106 cultivos y 16 aislados distintos y de semillas con 55 cápsulas de 5 especies de orquídeas diferentes. Ambos bancos cuentan con un extenso registro y documentación fotográfica, datos de campo, preparaciones de respaldo, etc.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de las orquídeas.

Las orquídeas son plantas que han sido admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones: Confucio menciona a las orquídeas en sus escritos. Los griegos y romanos las utilizaban por sus propiedades medicinales (Larsson, 1988). Mientras que en el México prehispánico, se utilizaba a la vainilla como saborizante, además de otras orquídeas por sus cualidades medicinales (Soto y Hågsater, 1990).

En la actualidad las orquídeas son importantes para la horticultura, la vainilla sigue siendo muy apreciada en la industria de los sabores; algunos productos de las orquídeas se cree que tienen propiedades medicinales y afrodisíacas. También son consideradas fascinantes para los científicos por su gran diversidad, extraordinarias formas florales, su complejo e inusual ciclo de vida y bizarros métodos de polinización (Smith y Read, 1997).

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae, la cual es cosmopolita, de gran diversificación y especialización; presentan amplios rangos de hábitat desde selvas hasta desiertos, incluyendo diversas formas de vida; algunas son terrestres (enraizadas en la tierra), otras son epífitas (que crecen en los tallos de otras plantas), algunas litofitas (que crecen en la superficie de una roca) y algunas crecen como lianas. Incluso algunas como el género *Rhizanthella* son completamente subterráneas incluyendo su floración (Peña, 1990; Smith y Read, 1997).

La familia Orchidaceae pertenece a la clase de las monocotiledóneas, es considerada como una de las familias más grandes de plantas con flor que existen.

Esta familia contiene cerca de 19 300 especies distribuidas en 725 géneros (Wells y Willems, 1991).

Las características más distintivas de este grupo de plantas son según Peña (1990):

- generalmente tienen un solo estambre fértil;
- la flor presenta tres sépalos y tres pétalos, uno de los cuales se ha modificado y es denominado labelo;
- sus órganos sexuales forman la columna (fusión de los órganos);
- la flor presenta zigomorfismo (simetría bilateral);
- los granos de polen se agrupan en masas compactas o polineas;
- producen una gran cantidad de semillas muy pequeñas y sin endospermo.

1.1.1. Germinación de orquídeas.

Las semillas de orquídeas miden entre 0.005 y 6.0 mm aproximadamente y se producen en gran cantidad (Arditti y Ghani, 2000). El embrión de las semillas es relativamente indiferenciado, no presentan cotiledones y tienen escasas reservas alimenticias (sin endospermo) (Dressler, 1993). Sin embargo, pueden contener una inclusión aceitosa que puede ser suficiente para la respiración pero no para desarrollarse (Arditti y Ghani, 2000), se postula que esta es la principal causa por la que necesitan en su medio natural de una simbiosis micorrízica¹ para completar su germinación y desarrollo (Smith y Read, 1997).

La germinación de las orquídeas, marca la transición del estado del embrión latente a una forma metabólicamente activa, en donde se producen eventos como el aumento de la tasa de respiración, la síntesis de enzimas y ácidos nucleicos, la división celular e hidratación de proteínas (Pritchard, 1993). Estos eventos dependen de la luz, el agua y la temperatura. El proceso de germinación se inicia con la imbibición (movimiento del agua al interior del embrión) produciendo un aumento de volumen que rompe la testa. A partir de este evento, comienza la

¹ Se escribe micorrizico (a) o micorrízico (a) con “z” de acuerdo con el Diccionario de Botánica de P. Font Que, Ed. Labor. España, p 714

división celular, formando una estructura esférica denominada protocormo en donde se puede distinguir un meristemo, el vástago en la parte superior y por otro lado, los rizoides (Fig. 1) (Arditti, 1992).

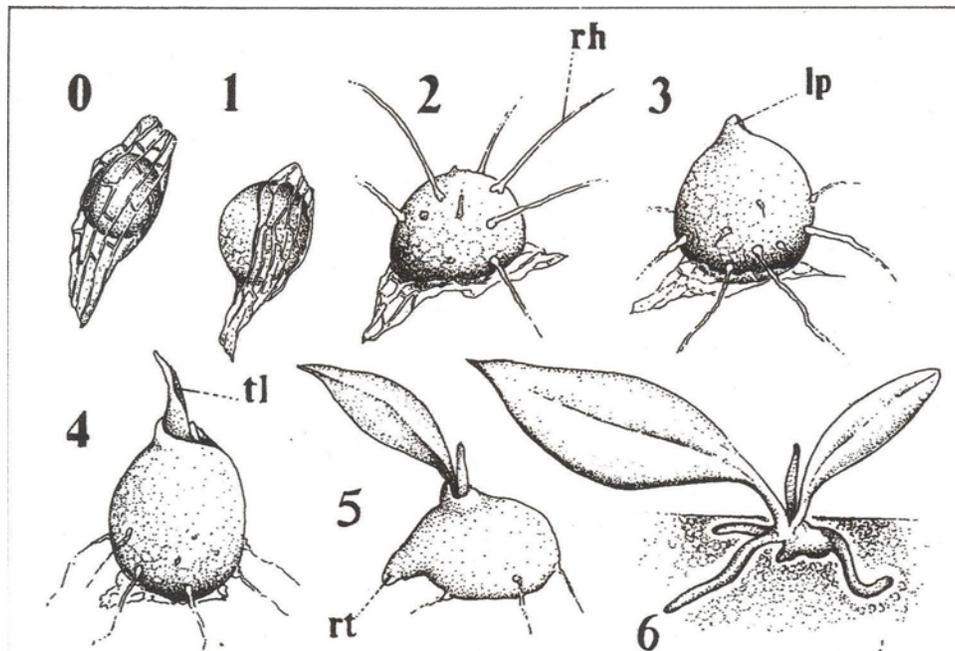


Figura 1. Etapas de desarrollo y crecimiento propuestas por Zettler y McInnis (1993), utilizadas para la evaluación de este trabajo: 0 no germinación, 1 ruptura de testa, 2 protocormo con presencia de rizoides, 3 protocormo con primordio foliar, 4 aparición de primera hoja verdadera, 5 elongación de la hoja y aparición de raíz, 6 plántula. (rh rizoides, lp primordio foliar, tl hoja verdadera, rt raíz).

Esta familia es una de las más amenazadas como consecuencia de la pérdida y/o fragmentación así como por el deterioro de los hábitats en donde se distribuyen, debido al cambio de uso de suelo, urbanización, tala inmoderada y sobre recolecta de organismos silvestres. Esto hace importante su estudio en diferentes áreas para planear su conservación (Wells y Willems, 1991).

1.2. Las orquídeas en México.

En México existen alrededor de 1 200 especies descritas de orquídeas, están distribuidas en 144 géneros de los cuales 11 son endémicos; México es considerado centro de diversificación de los géneros *Barkeria*, *Bletia*, *Clowesia*, *Deiregyne*, *Encyclia*, *Laelia* y *Schiedeella* (Soto, 1988).

El número de especies endémicas es aproximadamente 308, es decir, alrededor del 35% de la orquideoflora del país. Así, la proporción de taxa endémicos sólo es superada por la orquideoflora brasileña (Soto, 1988). En especial, las orquídeas terrestres en México están representadas por los géneros *Spiranhtes*, *Bletia*, *Govenia*, *Habenaria* y *Malaxis* (Soto, 1988; IUCN, 1996).

En la Norma Oficial Mexicana, NOM-059-ECOL-2001, se incluyen 181 especies con alguna categoría de amenaza pertenecientes a esta familia, de las cuales, una especie está probablemente extinta en su medio silvestre (*Laelia gouldiana*), 15 en peligro de extinción, 58 amenazadas y las restantes (107) sujetas a protección especial.

1.3. Cultivo de orquídeas.

1.3.1. Cultivo asimbiótico de orquídeas.

Las orquídeas fueron una de las primeras plantas en ser propagadas *in vitro* a partir de semillas. Sin embargo, los cultivos asimbióticos fueron posibles después del descubrimiento del papel de los hongos en medios simbióticos, establecidos por Noël Bernard en Francia en 1900 (Arditti, 1992). Posteriormente, Lewis Knudson en Estados Unidos, comienza la propagación asimbiótica en medios enriquecidos con azúcares en 1922 (Arditti, 1992).

Es así como la técnica de cultivo *in vitro* de orquídeas, se ha desarrollado desde la implementación de un medio propicio para la germinación asimbiótica de semillas, elaborado por Knudson y denominado por esto medio Knudson. Morel en 1960, comienza con la propagación masiva y clonal, siendo el primero en obtener plantas a partir de meristemos apicales de *Cymbidium*. A partir de esto, la propagación de orquídeas por cultivo de tejidos ha tenido éxito a partir de explantes como meristemos, raíces, hojas jóvenes y maduras, inflorescencias jóvenes y maduras, embriones, nudos, entre nudos, nudos de inflorescencia, pedúnculos de flores, base de hojas, tallo con yemas axilares, etc. (Arditti y Krikorian, 1996).

El cultivo de tejidos vegetales es una tecnología altamente exitosa y muy usada para llevar acabo la propagación masiva de orquídeas. Sin embargo, algunas semillas de orquídeas terrestres son generalmente difíciles de germinar *in vitro*, ya que muchas dependen de su hongo micorrízico para llevar a cabo este proceso (Arditti et al., 1981; Oliva y Arditti, 1984; Smith y Read, 1997).

1.3.2. Cultivo simbiótico de orquídeas.

La naturaleza simbiótica de las orquídeas fue entendida desde hace casi un siglo: se le atribuye a Bernard en 1909 en Smith y Read (1997) el descubrimiento del hongo, como indispensable para iniciar y promover su germinación de las orquídeas. Warlich en 1886 y Janse en 1897, en Smith y Read (1997) examinaron un gran número de especies pertenecientes a esta familia y observaron que todas las raíces estaban “infectadas” por hongos, sin darse cuenta del papel que éstos jugaban en el desarrollo de las plantas. Bernard también en 1909 fue el primero en aislar un hongo micorrízico¹ desde una planta adulta y lo identifica como miembro del género *Rhizoctonia* (Smith y Read, 1997). Burgerff en el mismo año (1909), en Smith y Read (1997) aisló y nombró muchos hongos; estudió y desarrolló el concepto de “digestión” del hongo por la orquídea como su medio de nutrición.

Los estudios de fisiología contemporánea fueron iniciados por Clements en 1988 quien establece que la simbiosis entre las orquídeas y el hongo se inicia con la penetración de este a través del microporo de la testa de la semilla. Una vez adentro, una o más hifas penetran la pared celular de las células del suspensor en donde las hifas crecen y penetran hasta las células corticales del embrión. En este punto de la colonización, las hifas se ramifican a través del citoplasma de las células corticales, formando pelotones o estructuras tridimensionales a manera de ovillos. Estos son posteriormente digeridos por las células del embrión, acelerando la formación del protocormo debido a que diversos compuestos orgánicos y azúcares son traslocados de las hifas hacia el embrión de la orquídea (Peterson et al., 1996).

El método simbiótico o monoxénico de propagación de orquídeas no es tan usado como el método asimbiótico o axénico. Esto se debe a que cuando hay dos organismos involucrados, el control de los medios se vuelve más delicado. Sin embargo, el éxito de la propagación simbiótica en Australia indica que esta área debe ser explorada y explotada con mayor intensidad y cuidado para llevar a cabo la propagación de orquídeas terrestres de América (Clements, 1988; Smreciu y Currah 1989; Markovina y McGee, 2000; Batty et al., 2001a; Rasmussen, 2002).

El cultivo simbiótico proporciona varias ventajas a las plantas propagadas ya que por esta vía no dependen directamente de los componentes de los medios en los que se propagan y los beneficios de la simbiosis se dan desde la germinación, pero se acentúan en el desarrollo de las plántulas (Rasmussen et al., 1991). Por otro lado, el establecimiento de la simbiosis puede traer múltiples ventajas en el caso del manejo de poblaciones vulnerables ya que se obtienen plantas más vigorosas y resistentes (Castillo, 2002). En el cuadro 1, Castillo (2002) resume las principales ventajas y desventajas de ambos métodos de propagación de orquídeas *in vitro*.

Cuadro 1 .Ventajas y desventajas de la propagación simbiótica y asimbiótica de orquídeas según Castillo (2002).

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

1.3.3. Micorriza orquídeas.

Las micorrizas son simbiosis entre hongos y plantas en donde la relación de ambas partes proporciona un beneficio mutuo en su desarrollo y/o establecimiento (asociación mutualista). Las micorrizas se pueden clasificar morfológicamente en dos tipos generales: las que se forman fuera de la raíz, conocidas como ectomicorrizas y las que se desarrollan dentro de la misma, conocidas como endomicorrizas. En las ectomicorrizas, el hongo forma un manto de hifas que rodean la raíz. El desarrollo del hongo es intercelular, mientras que en las endomicorrizas, las hifas penetran en el interior de la pared vegetal de las células de la corteza. Sin embargo esta clasificación generalista, ha resultado insuficiente sobre todo en el caso de las endomicorrizas ya que son muy heterogéneas en su morfología interna, por lo que se éstas se subdividen en arbusculares y el grupo de las orquídeas, ericáceas y monotropáceas (Jackson y Mason, 1984).

La micorriza de las orquídeas sólo se establece entre este grupo de plantas y hongos del Phylum Basidiomycota (Ulloa y Hanlin, 2001). Esta relación se inicia desde la germinación hasta el estado adulto de la planta, donde el hongo penetra dentro de las paredes de las células de la orquídea (hospedero) y forma masas tridimensionales de hifas, que como se menciona anteriormente son conocidas en la literatura como pelotones u ovillos, las estructuras típicas de este tipo de micorriza (Fig. 2) (Jackson y Mason, 1984). El tejido micotrófico o área de desarrollo del hongo en las orquídeas se encuentra fundamentalmente en el córtex de las raíces, protocormos y rizoides, ocasionalmente en otros órganos como tubérculos (Rasmussen, 1995) (Fig. 3). Las zonas de colonización en las raíces de las orquídeas son variadas y en algunas de ellas se pueden distinguir por una coloración amarillenta en la epidermis (Mitchell, 1989). A nivel tisular, en algunas especies existen zonas de diferenciación de la colonización en donde subepidérmicamente se distinguen pelotones u ovillos íntegros y avanzando hacia el córtex, hay otras capas celulares en donde los pelotones están en degradación (Fig. 4) (Jackson y Mason, 1984).

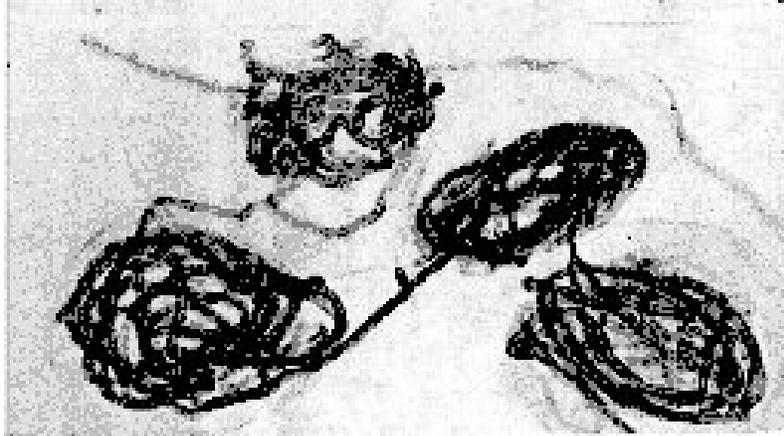


Figura 2. Pelotones de *Goodyera repens* donde se observa su estructura tridimensional (246X). Tomada de Arditti (1992).

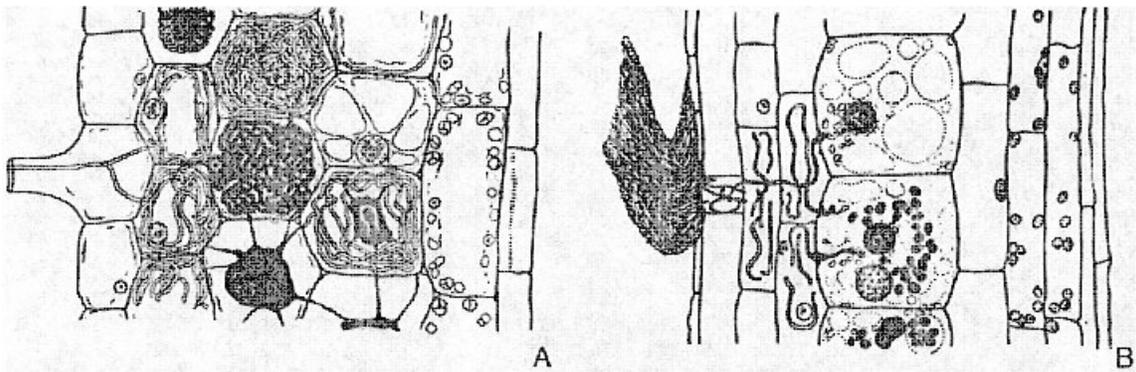


Figura 4. Esquema de colonización radical de las orquídeas. A **Tolipofagia.** Raíz de *Platenthera chlorantha*. Número de capas reducido. Fenómeno de la digestión de pelotones fúngicos, los cuales se muestran amontonados en unas cuantas células. Secuencia de izquierda a derecha. Epidermis con la base de una raíz vellosa. Capa de células hospedantes del hongo. Capa de células digestoras (fagocitos). Capa de almacenamiento. Endodermos. B **Ptiofagia.** Raíz de *Gastrodia callosa*. Secuencia de izquierda a derecha: epidermis colapsada; subepidermis con las células de paso perforadas por el hongo; dos capas de propagación del hongo; capa de grandes fagocitos penetrados por hifas espiraladas con su citoplasma dispersado y parcialmente reabsorbido y con ptiosomas espiraladas y colapsados; dos capas de almacenamiento con granos de almidón; endodermos. Ilustración original de Burgerff (1959) tomado de Reyes (1973).

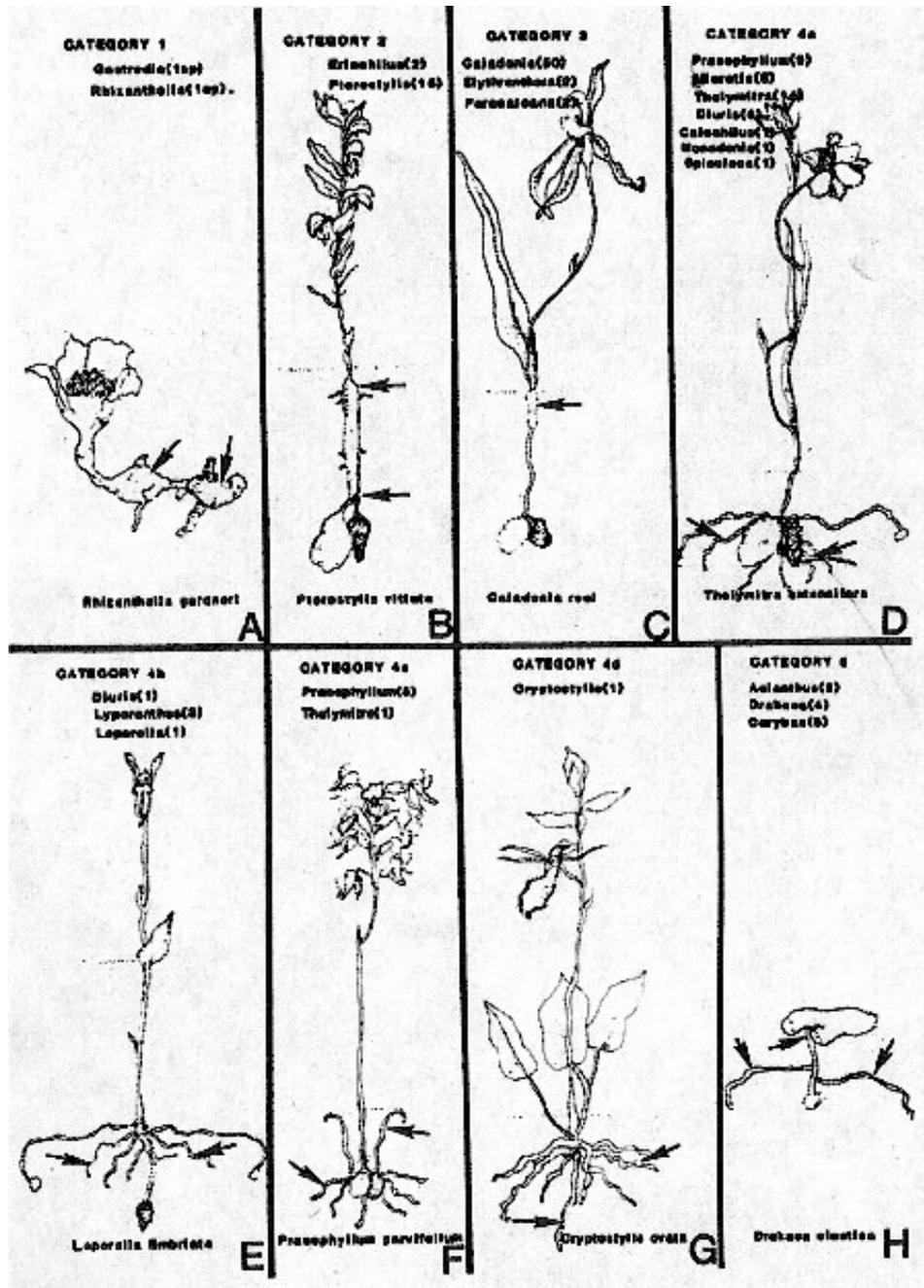


Figura 3. Partes de colonización del endófito (A) colonización en tallo y tubérculo; (B) colonización debajo del tallo; (C) en el tallo existe un collar de colonización; (D) colonización de raíces agrupadas encima del tubérculo; (E) colonización de raíces agrupadas lejos del tubérculo origen; (F) colonización de raíces agrupadas encima del tubérculo; (G) colonización en raíces agrupadas encima del tubérculo y raíz tubéculosa, (H) colonización en raíz y tallo. Tomado de Arditti (1992).

La nutrición de las orquídeas vía la simbiosis se ha descrito como tiofagia ó tolipofagia. En ambos procesos se lleva a cabo la deformación y lisis de las hifas en las células vegetales, liberando con esto los contenidos citoplasmáticos del hongo. La diferencia radica en que en la primera, la lisis de las estructuras es total sin formar capas con pelotones y en la segunda, se dan ciclos de lisis seguidos por otros de re-formación de ovillos intracelulares en el mismo tejido, observándose capas celulares hospederas y regiones di gestorías (Figura 4) (Reyes 1973).

La mayoría de los hongos aislados de la micorriza de orquídeas adultas corresponden al género forma *Rhizoctonia*, que es un género artificial de una variedad de telomorfos y menos frecuentemente miembros de los agaricales (Hadley, 1982) (Anexo 1). Algunas de las especies de este género, se han aislado de cultivos infectados de papa y otras especies comerciales, causantes de la enfermedad conocida como costra negra (Smerciu y Currah, 1989; Herrera y Ulloa, 1990; Alexopouls *et al.*, 1996; Agrios, 1997). Los aislados obtenidos a partir de orquídeas adultas han mostrado en algunos casos que estimulan la germinación de semillas de la misma especie y frecuentemente, pueden estimular la germinación de un amplio rango de géneros de orquídeas poco relacionadas. Sin embargo, también se encuentran casos en la literatura en los que los aislados no conservan un equilibrio simbiótico y pueden ser patógenos de ciertas especies (Warcup y Talbot, 1967; Smerciu y Currah, 1989).

Todos los hongos micorrízicos de las orquídeas son capaces de obtener carbohidratos de diversas fuentes externas (capacidad saprobia) como complejos polímeros como almidón, pectina, celulosa y en ocasiones, lignina, así como azúcares solubles. Los hongos de las orquídeas tienen requerimientos inespecíficos de carbono y utilizan diversas fuentes de compuestos nitrogenados que junto con el fósforo, son elementos importantes en la nutrición del hongo (Smith y Read, 1997). Algunos de estos hongos forman asociaciones con plantas ectomicorrizicas como gimnospermas, al mismo tiempo que con orquídeas, lo que se conoce como asociaciones tripartitas. Se ha observado en la naturaleza, que las orquídeas

pueden estar obteniendo los compuestos de carbono directamente de la traslocación de fotosintatos de los árboles vía el micelio de los hongos. Los basidiomicetos que forman micorrizas con las orquídeas también son importantes formadores de suelo ya que son descomponedores de materia orgánica, permitiendo la mineralización de elementos como el nitrógeno y el fósforo. Del mismo modo, su micelio contribuye en la estructura del suelo ya que permite la agregación de sus partículas minerales (Allen, 1991; Read *et al.*, 1992)

1.4. Importancia de los bancos de germoplasma.

Los bancos de germoplasma se definen como los reservorios genéticos de los organismos, a través del almacenamiento en condiciones ideales y prolongadas, de algunos de sus individuos o partes de los mismos, que permitirán conservar la diversidad genética. Esto puede lograrse de dos formas distintas: en reservas ecológicas *in situ* y en bancos de propágulos *ex situ* como semillas y esporas; bancos de tejidos conservados *in vitro*, como un sistema relativamente nuevo para conservar plantas (Martínez, 1991).

La conservación *in situ* se puede llevar a cabo en los campos de los agricultores, en pastizales y en parques nacionales u otros tipos de reservas naturales. En muchos países, los agricultores conservan la práctica la diversidad genética manteniendo variedades locales tradicionales obtenidas localmente. Los agricultores seleccionan las semillas en función de diversas características, cultivan las plantas y recogen y conservan las semillas para sembrarlas de nuevo. Dichas prácticas no se limitan a la simple conservación, sino que mejoran y obtienen recursos fitogenéticos. La única posibilidad real que tienen a menudo los agricultores se limita a mejorar y conservar sus propias variedades locales. Son más 1 000 millones de personas las que viven en familias de agricultores y la responsabilidad de la ordenación y mejoramiento de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura recae ahora en la propia familia (Rico, 2002).

Por otro lado, la conservación *ex situ*, contrariamente a la primera, surgió de la preocupación de observar que las variedades y las prácticas agrícolas modernas estaban haciendo desaparecer mucha biodiversidad en los campos. Esto indujo a actuar con rapidez en los años setenta, creando bancos de germoplasma de semillas para su conservación *ex situ* (FAO, 1996).

A comienzos de los años setenta eran menos de 10 los bancos de germoplasma de semillas agrícolas, y tal vez había en ellos menos de medio millón de muestras. Actualmente, en la base de datos del Sistema de información y alerta mundial hay ahora registrados en total 1 308 bancos de germoplasma y se calcula que hay 6.1 millones de muestras almacenadas en todo el mundo en colecciones de germoplasma *ex situ* (FAO, 1996).

Sin embargo, el problema del mantenimiento de los bancos de germoplasma, incluso en condiciones óptimas de almacenamiento *ex situ*, es la viabilidad de las semillas que va disminuyendo con el tiempo. Por esto, se hace indispensable realizar prácticas de regeneración a fin de reponer las existencias. La FAO estima que en este momento puede ser necesario sembrar de nuevo hasta un millón de muestras con objeto de obtener nuevas semillas para su almacenamiento. La propia regeneración está llena de dificultades y puede favorecer la erosión genética (FAO, 1996; Rico, 2002).

Los bancos de germoplasma de uno u otro tipo, son y serán de suma importancia para la diversidad genética para la protección o recuperación de especies en peligro de extinción (Martínez, 1991).

Las orquídeas también han sido objeto de preocupación, por lo que sus semillas han sido almacenadas en diferentes condiciones y se ha probado su viabilidad, un ejemplo de esto es el caso de *Bletia urbana*, donde después de catorce años de almacenamiento en seco Ortega-Larrocea *et al.* (2000) de muestra que las semillas son viables. Se han estudiado las condiciones para lograr la óptima preservación de

las semillas de orquídeas, como las probadas por Batty *et al.* (2001a) a temperaturas de 22, 4, y -18 °C en oscuridad y con varios desecantes, obteniendo que los mejores resultados para conservar la viabilidad por doce meses fueron las temperaturas de 4 y 18 °C. Ellos observan que el contenido de humedad de las semillas previo al almacenamiento, es un factor importante en su preservación. Otros autores las almacenan en viales, con un desecante, en oscuridad y frío en un rango de 4 - 7 °C. (Zettler y McInnis, 1993; Zetter *et al.*, 1995; Markovina y McGee, 2000).

II. ANTECEDENTES

2.1. Estudios florísticos de orquídeas en la Reserva.

La reserva ecológica “El Pedregal”, cuenta con muchas especies de plantas y animales endémicos, por lo que ha sido un sitio de gran interés para destacados naturalistas y botánicos, como lo fueron G. C. Prinale, E. Beltrán y J. Rzedowski. Dentro de su flora, las familias con mayor número de géneros representados son: Compositae, Graminae, Leguminosae y Orchidaceae (Valiente-Banuet y De Luna-García, 1994).

Según Cano-Santana y Meave (1996), la alta diversidad florística dentro de la comunidad se puede explicar por la gran cantidad de microambientes producto de: a) la heterogeneidad topográfica debido a la existencia de numerosas hondonadas, hoyos, grietas y promontorios rocosos; b) la variación altitudinal; c) la exposición diferencial a la luz y al viento; d) la forma, superficie, grosor y textura de la roca y e) la cantidad de suelo formado. Estas características, han permitido el establecimiento de especies con diferentes requerimientos ambientales (Rzedowski, 1994).

Rzedowski en 1954 realizó el primer estudio sobre la flora del Pedregal de San Ángel y describe en su trabajo 19 especies de orquídeas. Valiente-Banuet y De Luna-García en 1994, describieron 20 especies (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especies de orquídeas descritas para la reserva “El Pedregal” de San Ángel, México D. F.

Género	Especie	Descriptor	Referencia
<i>Bletia</i>	<i>campanulata</i>	Llave & Lexarza	2
	<i>punctata</i>	Llave & Lexarza	2
	<i>purpurea</i>	(Lam.) DC.	2
	<i>reflexa</i>	Lindl.	1, 2
	<i>urbana</i>	Dressler	2
<i>Cranichis</i>	<i>shaffneri</i>	Rchb.f.	1, 2
<i>Cyrtopodium</i>	<i>punctatum</i>	(L.) Lindl.	2
<i>Dichromanthus</i>	<i>cinnabarinus</i>	Llave & Lexarza	1, 2
<i>Epidendrum</i>	<i>anisatum</i>	Llave & Lexarza	2
<i>Govenia</i>	<i>superba</i>	Lindl ex Loddi.	2
	<i>liliacea</i>	Lindl.	1
<i>Habenaria</i>	<i>clypeata</i>	Lindl.	1, 2
	<i>entomantha</i>	Lindl.	1
	<i>novemfida</i>	Lindl.	1
<i>Liparis</i>	<i>Vexillifera</i>	Cogn.	1
<i>Malaxis</i>	<i>carnosa</i>	C. Schweinf.	1, 2
	<i>corymbosa</i>	O. Kuntze	1
	<i>fastigiata</i>	O. Kuntze	1, 2
	<i>myurus</i>	O. Kuntze	1, 2
<i>Schiedeella</i>	<i>hyemalis</i>	(Lindl.) Balogh,	2
	<i>llaveana</i>	(Lindl.) Schltr.	1, 2
	<i>pyramidalis</i>	(Lindl.) Schltr.	1, 2
<i>Spiranthes</i>	<i>polyantha</i>	Reichb. f.	1, 2
	<i>schaffneri</i>	Reichb. f.	1, 2
<i>Stenorrhynchos</i>	<i>aurantiacus</i>	(Llave & Lexarza) Lindl.	1, 2

Rzedoswski, 1954 (1) y Valiente –Banuet y De Luna-García 1994 (2).

Téllez (2002) realizó una descripción de la fenología y ecología de los principales géneros de orquídeas presentes en la reserva, así describe al género *Bletia* con seis especies. Entre éstas, *B. urbana*, *B. campanulata* y *B. macristhmochila*, son endémicas de México y florecen en los meses de junio a agosto. Ella menciona que *B. campanulata* era utilizada en la época de la Colonia como medicinal para el tratamiento de la disentería; del género *Govenia*, la especie *G. superba* es también endémica de México, florece en los meses de junio y agosto, en el sur de México se que se extrae de esta orquídea una goma que se utiliza para la elaboración y reparación de instrumentos musicales. Las especies *Dichromantus cinnabarinus* y *Stenorrhynchos aurantiacus* florecen en los meses de septiembre y octubre siendo ambas de las especies más vistosas de “El Pedregal” por lo que tienen un valor ornamental y que es posible que por lo mismo, cada vez sean menos comunes en el (Téllez, 2002). Las especies *Sacoglottis schaffneri* y *Deiregyne pyramidalis* florecen a principios de mayo y entran en dormancia de noviembre a febrero y son las especies más abundantes en la Reserva.

2.2. Propagación y Conservación de Orquídeas de “El Pedregal”.

2.2.1. Cultivo Asimbiótico de Orquídeas.

Entre una de las misiones principales del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, está la de salvaguardar el germoplasma y la flora de la Reserva mediante el uso de la micropropagación y el cultivo de tejidos. A través de esta técnica, diversas especies de plantas han sido cultivadas *in vitro* y en algunos casos, hasta reintroducidas a su hábitat (Rubluo *et al.*, 1993).

El primer trabajo realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos con una orquídea de la Reserva, fue el de Chávez en 1980 con *Bletia urbana*, planta endémica de México y considerada como amenazada (NOM-059-ECOL-2001). Como una medida de protección para esta especie, estableció el cultivo asimbiótico *in vitro* desde semillas, utilizando el medio nutritivo Knudson C. Durante el establecimiento de las condiciones de cultivo, se descubre que *Bletia urbana* tiene semillas fotoblásticas o que germinan en presencia de luz. Este evento es poco común para especies terrestres y es posible que sea un mecanismo de germinación rápida (Rasmussen, 1995). Chávez también registra datos sobre la fenología y ecología de esta planta logrando establecer fechas de floración, datos sobre polinización, desarrollo de frutos y tamaño de semillas.

Posteriormente en 1985, Martínez continúa con el cultivo *in vitro* de la misma especie, logrando la brotación múltiple a partir de protocormos seccionados, donde la propagación masiva de esta orquídea supera los resultados obtenidos de la siembra de semilla. El número de plántulas obtenido es mayor, aunque se disminuye la variabilidad genética de las plantas por el método de protocormos seccionados. Rubluo y colaboradores en 1989 realizan la germinación de semillas de *Bletia urbana* en distintos medios y condiciones de cultivo asimbióticos, pero fue hasta 1993 que reintroducen a su hábitat 133 plántulas obtenidas asimbióticamente, logrando una sobrevivencia del 56 % después de 90 días de trasplante a campo y del 15 % después de un año.

2.2.2. Aislamiento de Hongos Micorrízicos de Orquídeas de la Reserva y su cultivo simbiótico.

Ortega-Larrocea *et al.* (2000) fueron los primeros en establecer el cultivo simbiótico de *Bletia urbana* una orquídea de la Reserva, a partir del aislamiento de su endófito natural y la germinación de sus semillas con el mismo. Los autores demostraron que la propagación simbiótica permitía obtener plántulas completas en un periodo de cultivo significativamente menor, en comparación al cultivo asimbiótico. También encontraron que se daba una sincronización de la germinación simbiótica y se desarrollaban

plántulas más vigorosas y resistentes al trasplante, reduciendo el número de subcultivos y de insumos de laboratorio. Otro de los logros de este trabajo, fue el de demostrar que después de un periodo de almacenamiento de 14 años, el 100 % de las semillas respondía al cultivo simbiótico, con las implicaciones que esto tiene para la conservación del germoplasma que se habían establecido anteriormente. Con el trabajo anteriormente citado y Ortega-Larrocea *et al.* (en prep.), propusieron al cultivo simbiótico como una estrategia para la conservación y reintroducción de orquídeas.

Estas observaciones alentaron a continuar las investigaciones sobre el cultivo simbiótico con germoplasma de diferentes épocas de recolecta. De este modo, Castillo (2002) continuó con el cultivo simbiótico de esta especie con el mismo aislado obtenido por Ortega-Larrocea *et al.* (2000) en semillas de dos periodos de recolecta diferentes (1984 y 2001). Los resultados mostraron que con el método simbiótico se incrementó la sobrevivencia de plántulas después de un año de ser reintroducidas a su habitat a un 70 % y en un 50 % en el segundo (Ortega-Larrocea *et al.*, b en prep.).

III. JUSTIFICACIÓN

La propagación simbiótica de orquídeas puede constituir una estrategia altamente efectiva para la recuperación de especies en peligro, permitiendo obtener plántulas más vigorosas en un medio de cultivo más pobre y en un menor tiempo, aumentando la sobrevivencia en campo de las plántulas propagadas y conservando al mismo tiempo al micobionte efectivo, como lo demostrado en el caso particular de *B. urbana*. Sin embargo, no existen otros ensayos de propagación simbiótica en otras especies de orquídeas de la Reserva, aún cuando la mayoría de sus poblaciones se encuentran gravemente disminuidas consecuencia de la creciente urbanización de Ciudad Universitaria (Téllez, *com. pers.*).

Cabe destacar que ni siquiera existe un estudio previo de la caracterización micorrízica de las orquídeas de la Reserva. Es por tanto importante, comenzar a realizar el aislamiento de hongos micorrízicos asociados a las orquídeas y el establecimiento de un cepario o una colección viva de estos hongos. Esto constituiría una base para futuros trabajos de propagación simbiótica y posible reintroducción. A su vez, un cepario de hongos micorrízicos permitirá preservar y caracterizar a los hongos asociados para desarrollar futuros estudios de la biología-ecología de la simbiosis en estas especies.

“En el presente estudio se hipotetizó que los aislados de diferentes especies de orquídeas son capaces de estimular la germinación y desarrollo de semillas de orquídeas.”

IV. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Realizar el aislamiento de cepas de hongos micorrízicos a partir de raíces de ejemplares adultos de algunas orquídeas terrestres de la Reserva Ecológica “El Pedregal” de San Ángel, México D. F.

5.2. Objetivos particulares:

1. Probar la capacidad simbiótica de algunos de los aislados purificados de los hongos micorrízicos en la germinación y desarrollo de algunas orquídeas de la Reserva a los 30 días de cultivo *in vitro*.
2. Establecer un cepario de hongos micorrízicos de orquídeas de la Reserva e iniciar un banco de datos, respaldado por ejemplares herborizados de los cultivos puros.
3. Iniciar un banco de germoplasma de semillas de algunas orquídeas terrestres de la Reserva.

V. AREA DE ESTUDIO

5.1. Localización.

El Pedregal de San Ángel se encuentra situado geográficamente en la parte suroeste de la cuenca endorreica conocida comúnmente como valle de México, que a su vez forma parte del eje Neovolcánico Transversal. Está constituido por el derrame de lava de composición basáltica del Cráter Xitle y conos adyacentes, con una antigüedad de formación que data de hace 2 500 años (Rzedowski, 1994). Este es uno de los pocos lugares en el mundo donde uno puede observar el desarrollo y evolución de una comunidad vegetal y animal en un derrame de lava, ya que los diferentes microclimas creados por la topografía, permite el crecimiento de una extraordinaria flora siendo mucha de ella, endémica (Cano-Santana y Meave, 1996; Téllez, 2002). Su extensión actual se limita únicamente a las zonas de la reserva “El Pedregal” y a la reserva de “Lomas de Seminario” en el camino al Ajusco (Carrillo-Trueba, 1995). El origen de la Reserva data de septiembre 30 de 1983, fecha en que se delimitó una área reservada a la conservación de este bioma, declarada zona ecológica protegida y siendo resguarda por la Universidad Autónoma de México ya que se encuentra localizada dentro de su periferia (Álvarez *et al.*, 1989) (Figura 5). La reserva ecológica “El Pedregal” está entre los paralelos 19°20’ 22” y 19° 08’ 26” N y 99° 14’ 03” E, sobre los 2 250 - 2 254 msnm con una extensión de 124.5 hectáreas (Rojo, 1994).

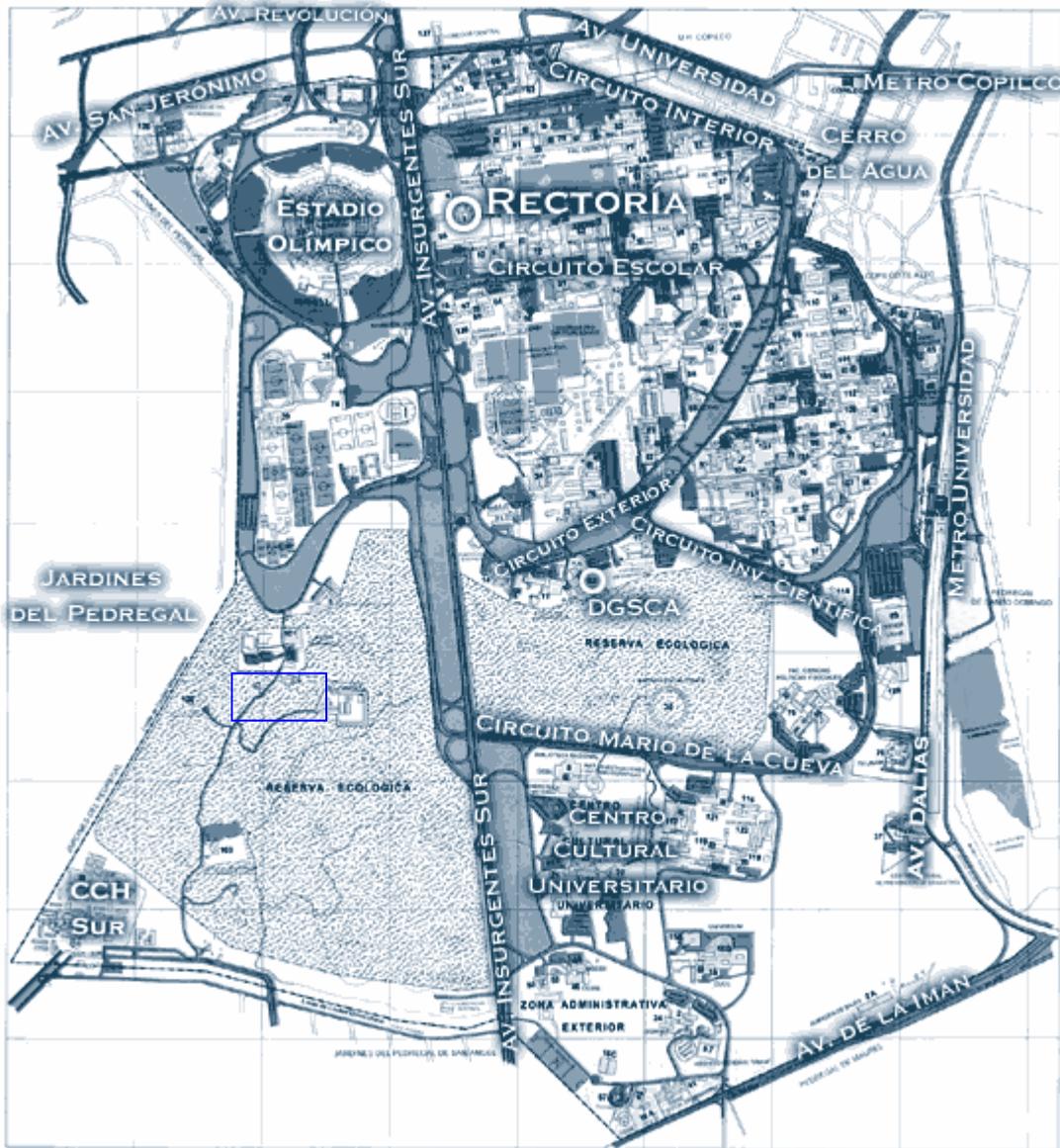


Figura 5. Mapa de Ciudad Universitaria en donde se aprecia el área destinada a la Reserva Ecológica (Fuente: www.unam.mx). Área donde se realizaron las recolecciones

5.2. Suelo.

El suelo en el Pedregal está en vías de formación. Pedológicamente se ha caracterizado, como un Lepsosol litico (FAO 1988), antes conocido como Litosol de origen principalmente eólico y orgánico. Su espesor es de pocos centímetros, pero se presentan diferencias de acuerdo a la topografía del lugar (Rzedowski, 1994). Siendo suelos moderadamente ácidos (pH 6.1), abundantes en materia orgánica (28 %), potasio y calcio (provenientes de la descomposición de feldespatos) y pobres en nitrógeno y fósforo disponibles, ya que están inmovilizados por la abundante materia orgánica (Rzedowski, 1994; Téllez, 2002).

5.3. Clima.

El clima de la Reserva es templado subhúmedo, con régimen de lluvias de verano Cb (w1) (w) según el sistema modificado de clasificación climática de Köppen (García, 1964). La temperatura media anual es de 15.5°C con variaciones que van desde los - 6°C hasta los 34°C y con una precipitación media anual de 843 mm (Camacho-Salazar *et al.*, 1993 a,b,c). La temperatura mínima se presenta en febrero y la máxima en abril (Camacho-Salazar *et al.*, 1993b) (Figura 6).

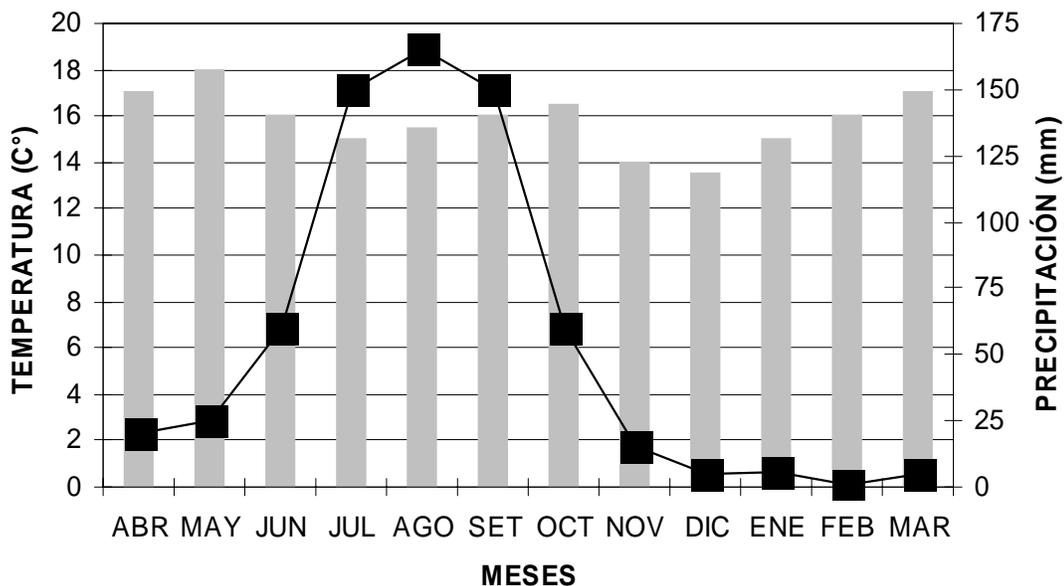


Figura 6. Esquema de temperatura media anual y precipitación de la Reserva ecológica “El Pedregal”, Datos tomados de Rojo (1994).

5.4 Vegetación.

La vegetación que se encuentra en “El Pedregal” es matorral xerófilo denominada así por Rzedowski (1994) con *Senecionetum praecox*, *Opuntia tomentosa*, *Agave ferox*, *Muhlenbergia robusta*, *Ipomoea hirustula*, *Cologania biloba*, *Parmelia digitulata*, *Selaginella lepidophylla*, *Marchantia* sp. y *Tillysia recurvata* como especies predominantes. Existen además, algunos árboles introducidos como son: *Echinus molle* (pirúl), *Quercus* spp. (encino), *Eucalyptus* spp. (eucalipto) y *Buddleia cordata* (tepozán) (Rzedowski, 1994; Téllez, 2002). La Reserva está constituida predominantemente por un estrato herbáceo bien desarrollado, uno arbustivo menos importante y ligeramente desarrollado y con pocos elementos arbóreos (Rzedowski, 1994). Como se había mencionado, las familias mejor representadas son Compositae, Gramineae, Leguminoseae y Orchidaceae (Herrera y Almeida, 1994).

El elevado número de especies de la familia Orchidaceae (Cuadro 2) está representada por 20 especies, que hace al Pedregal un refugio para las orquídeas del Valle de México (Téllez, 2002). Los géneros encontrados son: *Bletia*, *Brachystele*, *Deiregyne*, *Dicromanthus*, *Govenia*, *Habenaria*, *Malaxis*, *Sarcoglotis*, *Schiedeella*, *Stenorhynchos* y *Spiranthes* (Rzedowski, 1994; Valiente-Banuet y De Luna-García, 1994).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Recolecta del material biológico.

En la Reserva existen dos épocas climáticas contrastantes, secas (noviembre-mayo) y lluvias (junio-octubre) en las que fisonomía vegetal cambia abruptamente (Fig. 6). La floración de la mayoría de las orquídeas ocurre en época de lluvias por lo que se seleccionó esta temporada para recolectar plantas y determinarlas taxonómicamente. En el cuadro 3 se muestran las especies seleccionadas para este estudio, con base en los ejemplares que se encontraron en diversas exploraciones someras en la localidad. El material biológico fue determinado por la M en C. Aída Téllez y el Dr. Gerardo Salazar del Instituto de Biología de la UNAM. Se presenta su descripción taxonómica en el anexo 1 (Figs. 11 -16).

Cuadro 3- Especies de orquídeas terrestres de la Reserva “El Pedregal” seleccionadas en este trabajo.

Género	Especie	Localización (coordenadas UTM)	Floración
<i>Bletia</i>	<i>campanulata</i> (Llave & Lexarza)	14479718E 2136049N 2 324msnm	Junio - Agosto*
	<i>urbana</i> (Dressler)	14479647E 2136003N 2 323msnm	Junio - Agosto*
	sp.	14479736E 2136043N 2 297msnm	Junio - Agosto*
<i>Dichromanthus</i>	<i>cinnabarinus</i> (Llave & Lexarza) Garay	14480763E 2136767N 2 302msnm	Agosto*
<i>Habenaria</i>	<i>novemfida</i> (Lindl.)	14479784E 2136095N 2 321msnm	Agosto**
<i>Malaxis</i>	<i>myurus</i> (Lindl.)O. Ktze.	14479784E 2136095N 2 321msnm	Junio - Agosto*
<i>Stenorrhynchos</i>	<i>aurantiacus</i> (Llave & Lexarza) Lindl.	14479825E 2136402N 2 324msnm	Agosto*

*Datos tomados de Téllez (2002), ** datos de campo.

Una vez identificadas en campo y geoposicionadas, fueron monitoreadas desde el mes de agosto hasta noviembre del 2002, en donde se observó la fructificación y maduración de las cápsulas. Algunas de estas fueron recolectadas para corroborar la efectividad del aislado en pruebas de germinación y para respaldar el banco de germoplasma de los hongos micorrízicos asociados.

6.2. Aislamiento de hongos micorrízicos.

Una vez seleccionadas las especies, se llevó a cabo la recolecta de sus raíces para el aislamiento de los hongos micorrízicos durante los meses de agosto y septiembre del 2002.

Las raíces recolectadas se lavaron con agua corriente hasta retirar el suelo adherido. Se hicieron cortes transversales y longitudinales secuenciales a partir del ápice, los cuales fueron vistos bajo un microscopio estereoscópico al ser teñidos con azul de Tripán 0.05% en lactoglicerol. La caracterización de la asociación micorrízica se hizo mediante la identificación de las zonas colonizadas. Las preparaciones se fijaron con alcohol polivinílico (PVLG) de manera semi-permanente y fueron ingresadas a la colección del Laboratorio de Microcosmos del Departamento de Edafología, Instituto de Geología de la UNAM. Se realizaron registros fotográficos (con el microscopio óptico Zeiss Axioskop y la cámara de digitalización Sony Exwave Had del laboratorio de Apoyo a la Investigación del Jardín Botánico de la UNAM) de la simbiosis *in situ* para su caracterización.

Con ayuda de la descripción antes descrita, se aislaron los hongos micorrízicos siguiendo el método propuesto por Mitchell (1989). Este consiste en el lavado de las raíces, desinfección con hipoclorito de sodio al 20% durante 15 m y enjuagado tres veces con agua destilada estéril. Se realizaron cortes transversales de 0.5 cm de largo, a los cuales se les retiró la epidermis para ser posteriormente seccionados y colocados en cajas de Petri conteniendo 20 mL de medio de aislamiento fúngico (MAF). Estos

procedimientos se llevaron a cabo dentro de una campana de flujo laminar en condiciones asépticas.

Las cajas se sellaron con egapack y se incubaron en luz durante 24 h a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Se registro el crecimiento de las hifas a partir de las 24 h de siembra, transplantando los ápices de los hongos que crecieron a partir de los explantes a cajas de tres compartimentos con MAF. Los hongos que crecieron en este puente, se sembraron en medio de papa-dextrosa-agar (PDA) BIOXON®. Se seleccionaron con ayuda de preparaciones en portaobjetos, los aislados que presentaron características afines al género-forma *Rhizoctonia* (Anexo 1; Fig. 17), por ejemplo, la formación de células monilioides y color hialino o marrón de la colonia (Rasmussen, 1995; Zelmer y Currah, 1995; Currah *et al.*, 1997). Se hicieron preparaciones de respaldo de los aislados con estas características.

6.3. Viabilidad de las semillas y estandarización de la siembra.

Previo a efectuar la propagación simbiótica, se realizaron pruebas de germinación del germoplasma recolectado para verificar su viabilidad y/o dormancia. Estas consistieron en diferentes ensayos dependiendo de la especie (incubación en condiciones de luz u oscuridad y preincubación en frío).

Las diferentes especies se desinfectaron en hipoclorito de calcio 7 %, se lavaron con agua destilada estéril tres veces y se sembraron en un medio asimbiótico, Knudson C (KC) (Knudson, 1946). Se incubaron con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad (iluminación promedio de 880 Lux, 35 % humedad relativa y temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$) hasta registrar su germinación (ruptura de testa y protocormo) bajo el microscopio estereoscópico.

Se hicieron pruebas para estandarizar el peso y la siembra de las semillas. Estas consistieron en la contabilización de las semillas para obtener un rango de entre 50 a 300 semillas, a partir de un peso inicial de 0.001 g. Las pruebas de siembra consistieron en colocar las semillas en sobres de papel filtro Whatman® no. 1 y frotarlo sobre la superficie del medio de cultivo distribuyendo las semillas con ayuda de una espátula estéril de manera circular a la mitad de la caja de Petri.

6.4. Inoculación de semillas (Diseño Experimental).

El diseño experimental consistió en probar los aislados seleccionados con semillas de las 7 especies de orquídeas simbióticamente en el medio básico de avena (MBA), además de un control asimbiótico (medio KC) y un testigo (medio MBA sin inóculo). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones sembradas de manera aleatoria: las semillas en paquetes eran escogidas al azar para su siembra y a su vez, eran sembradas en los distintos medios de manera consecutiva por repetición, siendo éstos últimos designados al azar. Esto evita que se presenten mayores tiempos de imbibición de las semillas cuando son sembradas por tratamientos. Los medios que contenían los aislados fueron inoculados el mismo día de la siembra con cubos de agar de aproximadamente 0.5 cc que fueron obtenidos a partir del extremo distal de una colonia en recrecimiento (Fig. 7). Las semillas se incubaron en cajas Petri con 20 mL de cada medio en las condiciones arriba explicadas durante 30 días. Posteriormente, se clasificaron y cuantificaron de acuerdo con el estadio de germinación propuesto por Zettler y McInnis (1993).

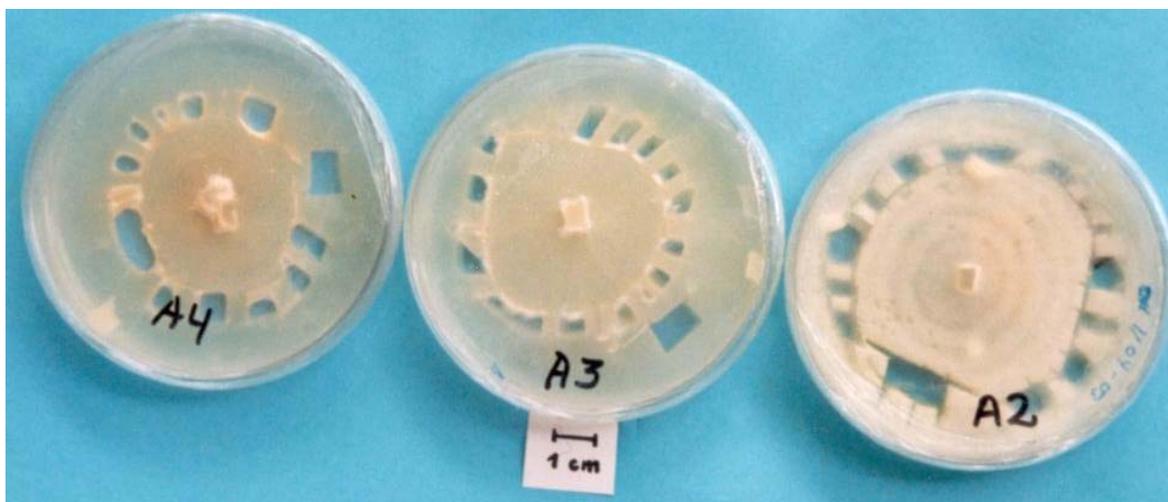


Figura 7. Estandarización de la siembra de los aislados en los medios de cultivo de los tratamientos simbióticos (MBA). Cada rectángulo es un segmento de agar tomado equidistante a partir del inoculo central. (La foto se tomo días después de la siembra por lo que se observa que la colonia cubrió por completo la caja Petri).

6.5. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (medio X especie). Esto permitió comparar la germinación de las semillas de la misma especie con los distintos aislados y a su vez para comparar la efectividad de los aislados en las distintas especies. Se corroboró la normalidad de los datos bajo un test de Kolmogorov-Smirnov y se hicieron pruebas de Tukey- Kramer entre tratamientos. Los datos de germinación se obtuvieron como resultado de la sumatoria de los conteos de los estadios observados a partir del protocormo con o sin rizoides (estadio 2) a los 30 días de cultivo *in vitro*. Una de las especies no pudo ser cuantificada debido a la escasez de las semillas para llevar a cabo las repeticiones (*Habenaria novemfida*).

6.6. Creación de un cepario de hongos micorrízicos.

De las cajas que contenían los hongos aislados con características afines a *Rhizoctonia*, se subcultivaron dos resiembras en tubos de cultivo de 15.0 x 2.5 cm con 15 mL de medio PDA. Los tubos fueron incubados durante 30 días en las mismas condiciones anteriormente descritas y fueron preservados a 4°C debidamente etiquetados. A cada tubo le fue asignado un código en una base de datos conteniendo datos de fecha de siembra, persona que subcultivó, medio de cultivo, origen del aislado, etc. (Anexo 2). Las dos resiembras fueron divididas y se almacenan en el Laboratorio de Micrococosmos del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM, a cargo de la Dra. M. P. Ortega-Larrocea, en distintos refrigeradores.

VII. RESULTADOS

7.1. Recolecta del material biológico.

Se hizo un registro fotográfico de las siete especies seleccionadas, las cuales fueron referenciadas geográficamente (Cuadro 3.). Desde el mes de julio, se hizo un seguimiento semanal de su floración hasta su fructificación que se ilustran en el cuadro 4. El seguimiento de las especies se continuó hasta la maduración de las cápsulas, para su ingreso en el banco de germoplasma (Anexo 3 y Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de cápsulas de orquídeas ingresadas al banco de germoplasma.

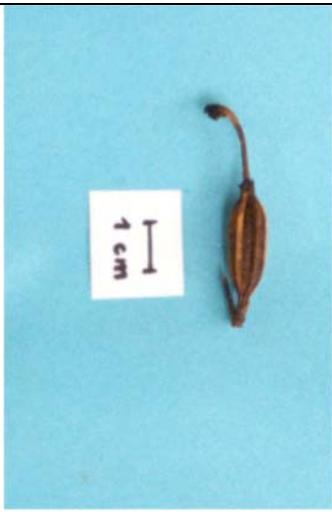
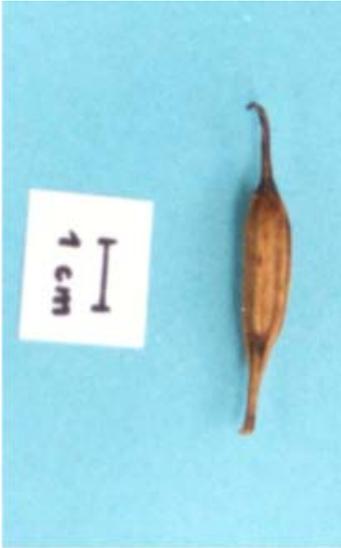
Espece	Número de cápsulas
<i>Bletia campanulata</i>	17
<i>Bletia urbana</i>	5
<i>Bletia</i> sp.	1
<i>Malaxis myurus</i>	5
<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	27

7.2. Aislamiento de hongos micorrízicos.

7.2.1. Caracterización morfológica de las simbiosis *in situ*.

La morfología radical de las orquídeas terrestres se caracteriza por la ausencia de velamen y la descripción de sus cormos está dada en el Anexo 1 (Fig. 12 -16). A partir de las raíces recolectadas en campo se elaboraron un total de 44 laminillas (Anexo 3). En el género *Bletia*, las morfologías de la colonización es muy similares entre ellas, debido a que sus raíces fibrosas crecen adventicias al corno en las tres especies (Anexo 1). Los pelotones (ovillos hifales) se encuentran en todo el espesor

Cuadro 4. Monografía de las especies de orquídeas en su hábitat (columna izquierda), cápsulas (columna central) y semillas (columna izquierda). Las fotografías de campo fueron tomadas por Ortega-Larrocea, Rangel y Cárdenas en el 2002.

		
<p><i>Bletia campanulata</i></p>		<p>200X</p>
		
<p><i>Bletia urbana</i></p>		<p>100X</p>

		
<p><i>Bletia</i> sp.</p>		<p>100X</p>
		
<p><i>Dichromantus cinnabarinus</i></p>		<p>100X</p>



Habenaria novemfida



100X



Malaxis myurus



12X



200X

		
<i>Stenorhynchos aurantiacus</i>		100X

y largo del córtex de la raíz, a excepción de la zona meristemática (Cuadro 6). Estos se encontraron intactos, con una estructura tridimensional inalterada en sus hifas; así como digeridos, en los que se observó una masa central irregular en las células del hospedero.

Las especies *Stenorhynchos aurantiacus* y *Dichromanthus cinnabarinus*, desarrollan una morfología radical similar entre ellas, con raíces fasciculadas y carnosas. Los pelotones en ambas especies sólo se encontraron en la mitad transversal del córtex y en zonas localizadas de la raíz, en donde son abundantes y subepidérmicos, correspondiendo a zonas que se observaron amarillas en campo (Cuadro 6). En el caso de *S. aurantiacus*, la zona de colonización se encontró en una franja lateral a lo largo de la raíz y en el caso de *D. Cinnabarinus*, unas zonas presentaron al hongo sólo en una franja y en otras a lo largo de la misma raíz, casi en toda la circunferencia vista en un corte transversal.

No se intentaron realizar los aislados de las especies *Habenaria novemfida*, *Malaxis myurus* y *Bletia* sp. en la época de lluvias. Estos se intentaron aislar en secas (febrero, 2003) y sólo se logró aislar el de ésta última, dado que no se lograron obtener raíces

de *Malaxis myurus*, mientras que la colonización en *Habenaria novemfida*, sólo se encontró a lo largo de algunas raíces que se observaron amarillas en campo (Cuadro 6).

7.2.2. Aislamiento de los hongos micorrízicos.

La caracterización de las asociaciones micorrízicas se hizo con la finalidad de realizar el aislamiento de los hongos a partir de los pelotones no digeridos. Se aislaron 15 cepas puras, con características afines al género-forma *Rhizoctonia*, el cual se caracteriza por la presencia de células monilioides y color hialino o marrón de las hifas en cultivo puro (Arditti, 1992; Herrera y Ulloa, 1990; Rasmunssen, 1995; Alexopoulos et al., 1996; Agrios, 1997). Las características de las colonias (color y textura de los aislados) en medio enriquecido se presentan en el Cuadro 7, Anexo 2.

En el caso de *D. cinnabarinus* y *Habenaria novemfida* aún cuando se encontraron raíces colonizadas con pelotones en buen estado, no se logró el recrecimiento de las hifas a partir de los mismos en los medios probados.

Para probar que los aislados obtenidos fueran micorrízicos y capaces de estimular la germinación, se llevaron a cabo cultivos simbióticos con las especies anteriormente descritas. Se seleccionó un solo aislado por especie. En el Cuadro 8, se muestran algunas características morfológicas microscópicas de los aislados seleccionados.

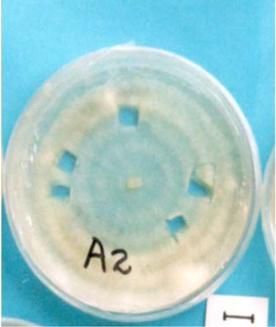
7.3. Viabilidad de las semillas y estandarización de la siembra.

Para las especies del género *Bletia* se realizaron en presencia de luz, sin pretratamientos de almacenamiento en frío y en una incubación de 25 °C. Estas condiciones de incubación ya se habían ensayado simbióticamente

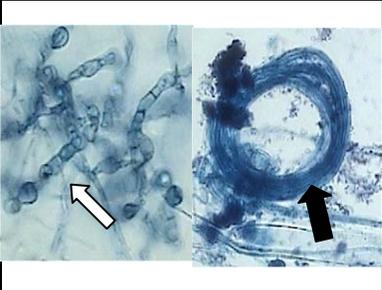
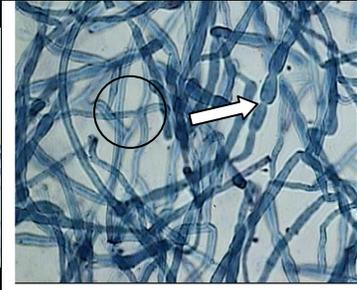
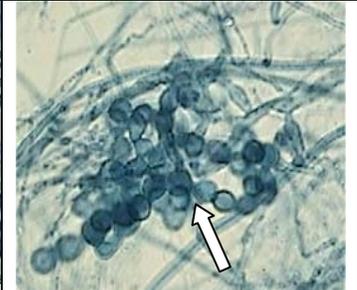
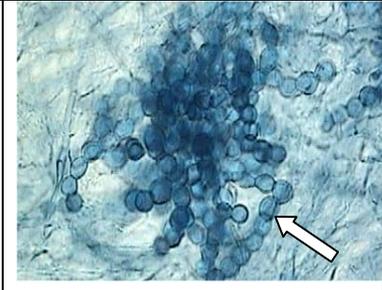
Cuadro 6. Monografía microscópica de la asociación micorrizica de las orquídeas *in situ*. Las flechas blancas indican pelotones conservados estructuralmente, las grises en vías de digestión y las negras muestran los cristales de oxalato. Tinción en azul Tripán.

<p><i>Bletia campanulata</i> corte longitudinal 100X</p>	<p><i>Bletia urbana</i> corte transversal 200X</p>	<p><i>Bletia</i> sp. corte longitudinal 100X</p>
<p><i>Habenaria novemfida</i> corte transversal 200X</p>	<p><i>Dichromanthus cinnabarinus</i> corte transversal 100X</p>	<p><i>Stenorrhynchos aurantiacus</i> corte longitudinal 100X</p>

Cuadro 7. Características físicas de las cepas de hongos micorrízicos aislados según Huynh et al. (2003).

Aislado	Especie de procedencia	Número de aislados obtenidos	Características	Imágenes de los aislados
Morfotipo 1	<i>Bletia campanulata</i> (A3) <i>Bletia urbana</i>	3 5	Colonia con crecimiento radial de color amarillo pálido (2.5Y 8/2), con textura lustrosa sin volumen.	
Morfotipo 2	<i>Bletia urbana</i> (A5) <i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	2 1	Colonia con crecimiento radial de color amarillo pálido o hialino (2.5Y 7/4), con textura algodonosa blanca en el centro.	
Morfotipo 3	<i>Bletia urbana</i> (A1) <i>Bletia</i> sp.	1 1	Colonia con crecimiento radial de color amarillo (2.5Y 7/4), con textura lustrosa con costras y algodonosa en crecimiento.	
Morfotipo 4	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	2	Colonia con crecimiento concéntrico de color blanco (2.5Y 8/1), con textura algodonosa en toda la colonia.	

Cuadro 8. Monografía de los aislados utilizados en la propagación simbiótica de las semillas de orquídeas. Las flechas blancas indican las células moniloides (en rosario) típicas del género-forma *Rhizoctonia*; las negras indican el crecimiento anillado encontrado en algunos aislados, también se observa la bifurcación a 90° de las hifas en los círculos. Tinción con azul Tripán. Microfotografías tomadas a 400X por Sandoval y Rangel, 2003.

				
<p>A1. <i>Bletia urbana</i> (control)</p>	<p>A2. <i>Stenorrhynchos aurantiacus</i></p>	<p>A3. <i>Bletia campanulata</i></p>	<p>A4. <i>Bletia</i> sp.</p>	<p>A5. <i>Bletia urbana</i></p>

para *B. urbana* (Ortega-Larrocea *et al.*, en preparación; Castillo, 2002), además de que ya se sabía que esta especie es fotoblástica (Chávez, 1980) y permitieron la germinación favorable de las otras dos especies.

Sin embargo para las cuatro especies restantes se desconocían las condiciones necesarias para su germinación, por lo que se sometieron a diversas pruebas. En el caso de *D. cinnabarinus*, *H. novemfida* y *S. aurantiacus*, respondieron mejor a una incubación en oscuridad durante los primeros quince días, en donde comenzaron a germinar hasta la aparición del primordio foliar. Pasado este tiempo, los protocormos fueron transferidos a iluminación. La especie *M. myurus* fue la única especie que necesitó un periodo de incubación de 3 semanas en oscuridad para lograr observar un incremento en el volumen. Las condiciones de almacenamiento en frío previas a la germinación, no tuvieron efecto importante para esta especie.

Por otro lado, de las diferentes pruebas que se hicieron para el sembrado de las semillas, resultó ser la más efectiva, la siembra por el método de distribución con espátula estéril, lográndose un sembrado uniforme, a diferencia de la distribución mediante el filtro indicada por Mitchel (1989). El rango en el número de semillas que se obtuvieron en las siembras calculadas según el peso específico de cada especie se muestra en el cuadro 9. Se observa que únicamente *B. urbana* y *Bletia* sp. tuvieron rangos menores de semillas de las esperadas, ninguna de las especies sobrepasó a las 300 semillas. Es probable que los errores se deban a la precisión de la balanza utilizada para este trabajo. Otros autores que utilizan este método para la siembra de semillas son Batty *et al.* (2001b) quienes pesan 0.5 g y obtiene un rango de 400 a 600 semillas y Zettler y Hofer (1997) utilizan un rango de 50 -200 semillas para la siembra aunque no aclaran como lo obtienen.

Cuadro 9. Calibración del peso de semillas de las distintas especies para obtener un rango entre 50 a 300 semillas.

Espece	No. de semillas	Peso de las semillas (g)
<i>Bletia campanulata</i>	80-296	0.0006
<i>Bletia urbana</i>	32-157	0.0007
<i>Bletia</i> sp.	31-163	0.0004
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	42 - 98	0.0060
<i>Habenaria novemfida</i>	54-108	0.0007
<i>Malaxis myurus</i>	40-178	0.0001
<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	51-159	0.0010

7.4. Pruebas de germinación y desarrollo simbiótico.

Las pruebas de germinación de las siete especies se llevaron a cabo con cuatro aislados, escogidos al azar del total de aislados logrados y determinados como afines a Rhizoctonias. Estos fueron obtenidos de cuatro diferentes especies de orquídeas y se incluyó otro aislado que fue probado anteriormente y que demostró ser efectivo en la germinación de *B. urbana* (Ortega *et al.*, 2000; Castillo, 2002; Ortega-Larrocea *et al.*, en preparación a y b). Este aislado se consideró como un control positivo y se denominó A1; el aislado obtenido de *S. aurantiacus* se nombró A2, el de *B. campanulata* A3, el de *Bletia* sp. A4 y de *B. urbana* A5. Además se incluyó un control (KC) y un testigo (MBA) asimbióticos.

La germinación se evaluó a los treinta días y se consideraron germinadas las semillas cuando comenzó a desarrollar un protocormo. El análisis estadístico (ANOVA) mostró un efecto significativo debido a los tratamientos ($p < 0.001$), así como entre las especies ($p < 0.001$) y la interacción entre ambas componentes ($p < 0.05$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza de dos vías para la evaluación de la germinación simbiótica y asimbiótica de las semillas de las diferentes especies a los 30 días de cultivo *in vitro*.

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
Especies (1)	5	20668.11	100	418.2034	49.42119	< 0.001
Tratamientos (2)	6	2090.009	100	418.2034	4.99759	< 0.001
1 X 2	30	656.5855	100	418.2034	1.570015	0.05

La especie *B. campanulata* logró germinar en un medio testigo sin azúcar ni hongo micorrízico. La germinación en esta especie fue elevada (> 80 %) en todos los tratamientos por lo que no hubo diferencias significativas entre la germinación de los medios asimbióticos ni simbióticos (Fig. 8). Sin embargo, cuando se analiza el desarrollo entre los diferentes tratamientos, sí se observan diferencias considerables entre los estadios alcanzados que no fueron sometidos al estadístico (Fig. 9 y Cuadro 11). Con el tratamiento testigo (MBA), el 83% de las semillas alcanzaron el estadio de protocormo; mientras que con los aislados A2 y A3, más del 90% de las semillas alcanzaron este estadio. La morfogénesis fue similar para el resto de los aislados, A1, A4 y A5, desarrollando hojas verdaderas con tallo en el 35 % de las semillas durante el primer mes. En contraste con el medio asimbiótico control (KC), en el que se observa que cerca del 80% de las semillas desarrollaron el primordio foliar. A los 60 días de cultivo, el desarrollo de las hojas en los tratamientos con los aislados anteriores continuo aumentando de talla en contraste con el medio KC en donde no se acabó de desarrollar completamente la lámina foliar de la primera hoja. A los 60 días de cultivo *in vitro*, los protocormos en los tratamientos A2 y A3 desarrollaron hasta el primordio foliar mientras que en el tratamiento sin azúcares (MBA) el desarrollo parece estacionarse en protocormo (Cuadro 12).

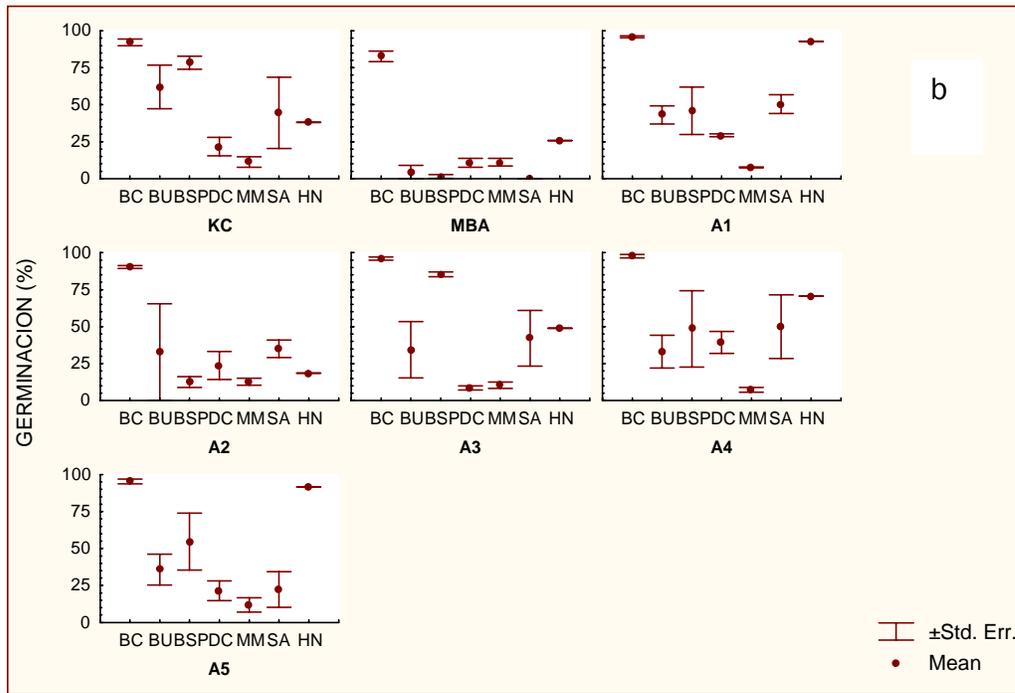
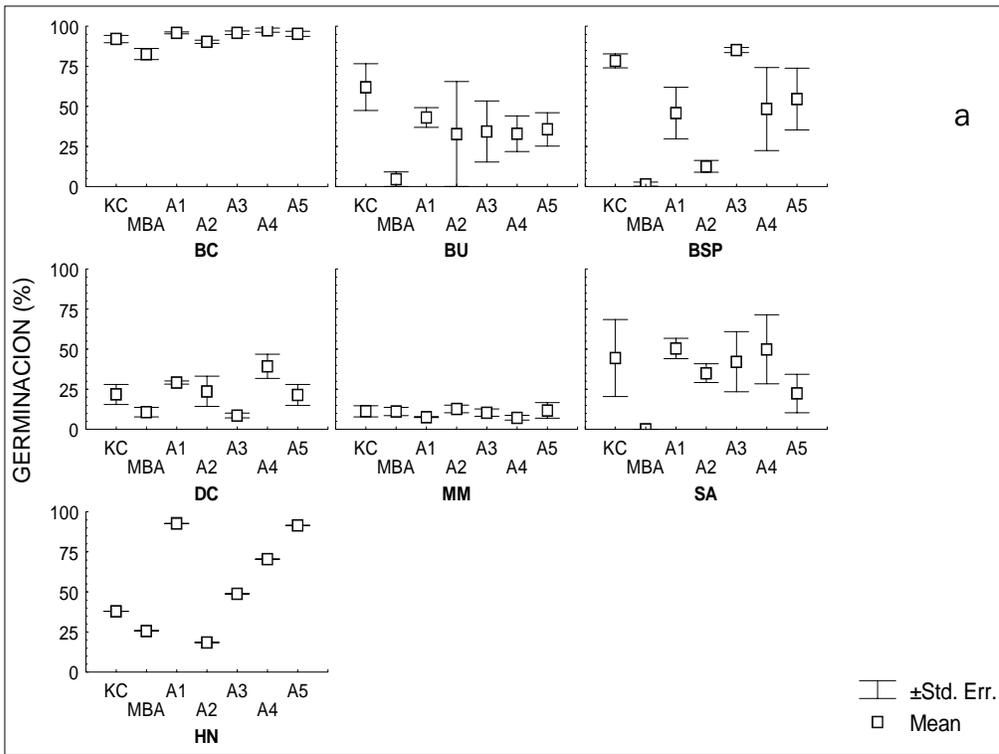


Figura 8. a), porcentaje de germinación de las diferentes especies (*Bletia campanulata*, BC; *Bletia urbana*, BU; *Bletia* sp. BSP; *Dichromanthus cinnabarinus*, DC; *Habenaria novemfida*, HN; *Malaxis myurus*, MM; *Stenorrhynchus aurantiacus*, SA) con los aislados A1 (*B. urbana*), A2 (*S. aurantiacus*), A3 (*B. campanulata*), A4 (*Bletia* sp.), A5 (*B. urbana*), contrastando con un control asimbiótico KC y un testigo asimbiótico MBA. b) representa la germinación producida por los aislados en las diferentes especies.

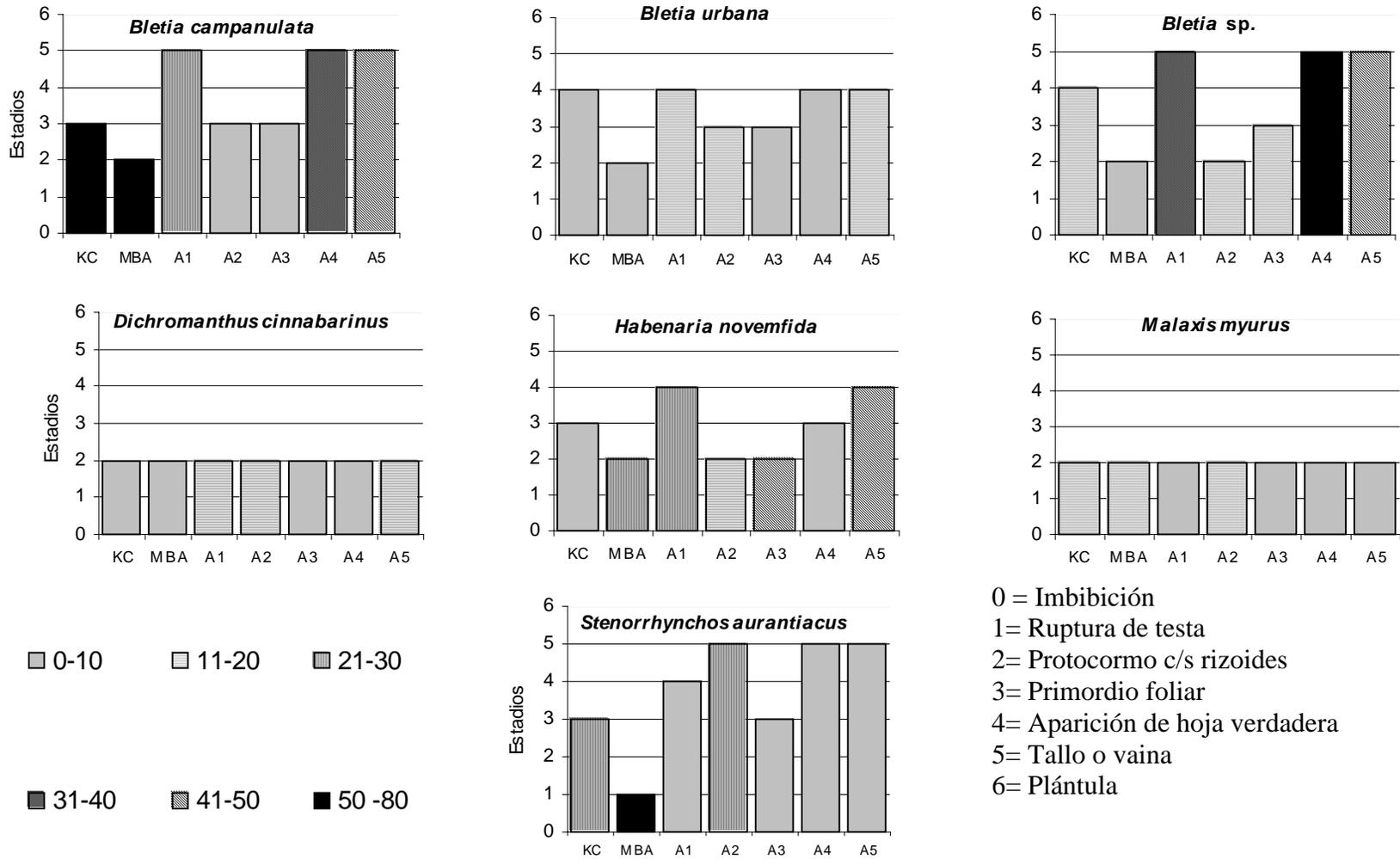


Figura 9. Máximos estadios de desarrollo alcanzados por las diferentes especies (*B. campanulata*, BC; *B. urbana*, BU; *Bletia sp.* BSP; y *D. cinnabarinus*, DC; *H. novemfida*, HN; *M. myurus*, MM; *S. aurantiacus*, SA) con los diferentes aislados A1 (*B. urbana*), A2 (*S. aurantiacus*), A3 (*B. campanulata*), A4 (*Bletia sp.*), A5 (*B. urbana*), contrastando con un control asimbiótico KC y un testigo asimbiótico MBA. Con la trama se indica el porcentaje de plántulas que alcanzan cada estadio a los 30 días de cultivo *in vitro*.

Cuadro 11. Porcentaje de germinación de las diferentes especies por estadio don de el estadio 0 imbibición; 1 ruptura de testa; 2 protocormo c/s rizoides; 3 primordio foliar.; 4 aparición de hoja verdadera; 5 tallo o vaina; 6 plántula y 7 oxidación, a los 30 días de cultivo *in vitro*.

ESPECIE	ESTADIOS	AISLADOS						
		KC	MBA	A1	A2	A3	A4	A5
<i>Bletia campanulata</i>	0	6.73	16.18	4.17	8.93	3.28	1.96	4.03
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	12.06	83.81	3.75	90.02	96.14	0.32	1.58
	3	78.68	0	39.03	0.51	0.57	2.73	4.46
	4	0	0	27.34	0	0	59.01	43.80
	5	0	0	25.67	0	0	35.62	44.52
	6	0	0	0	0	0	0	0
	7	2.50	0	0	0	0	0.32	1.58
<i>Bletia urbana</i>	0	25.64	62.5	56.09	38.98	38.04	65.10	59.19
	1	0	34.61	0	28.81	5.85	0	0.73
	2	6.55	1.923	9.75	15.25	49.26	3.95	6.25
	3	51.85	0	18.90	16.94	1.95	11.51	14.70
	4	10.25	0	11.58	0	0	8.99	11.76
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
	7	5.69	0.96	3.65	0	4.87	10.43	7.35
<i>Bletia sp</i>	0	22.25	51.73	50.48	33.54	16.66	24.80	37.85
	1	0	46.63	0	53.41	2.32	0.26	0
	2	7.59	1.62	1.20	13.04	68.99	0.26	1.75
	3	50.52	0	3.60	0	12.01	2.63	4.37
	4	17.27	0	3.60	0	0	7.91	10.72
	5	0	0	37.25	0	0	63.85	45.29
	6	0	0	0	0	0	0	0
	7	2.35	0	3.84	0	0	0	0

Continuación del Cuadro 11.

ESPECIE	ESTADIOS	AISLADOS						
		KC	MBA	A1	A2	A3	A4	A5
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	0	35.53	30.11	27.08	34.05	37.34	29.67	32.56
	1	43.65	60.22	43.75	41.08	53.61	30.76	48.16
	2	10.65	0	15.62	18.91	1.20	30.76	15.13
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
	7	10.15	9.65	13.54	5.94	7.83	8.79	4.12
<i>Habenaria novemfida</i>	0	22.22	9.27	7.14	51.85	22.34	17.89	8.45
	1	39.81	64.94	0	29.62	28.72	11.57	0
	2	25	21.64	5.71	18.51	48.93	66.31	22.53
	3	1.85	0	55.71	0	0	1.05	25.35
	4	0	0	25.71	0	0	0	43.66
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
	7	11.11	4.12	5.71	0	0	3.15	0
<i>Malaxis myurus</i>	0	56.84	88.72	60.12	88.71	89.94	91.17	84.90
	1	31.50	0	32.08	0	0	1.63	4.24
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
	7	11.64	11.27	7.78	11.28	10.05	7.18	10.84
<i>Sthenorrhynchus auratiacus</i>	0	50.36	48.11	47.51	64.37	31.98	34.46	25.88
	1	0	51.88	0	0	26.61	4.25	49.23
	2	11.98	0	40.68	1.87	26.61	9.78	4.82
	3	22	0	10.24	2.5	0.80	37.87	7.10
	4	0	0	1.55	0	0	0	0.25
	5	0	0	0	21.87	0	5.95	0.25
	6	0	0	0	0	0	0	0
	7	15.64	0	0	9.37	13.97	7.65	12.43

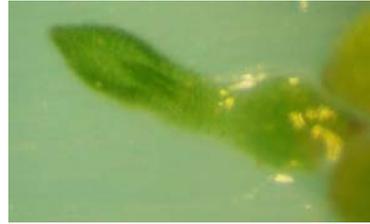
Cuadro 12. Monografía de la germinación simbiótica (A1-A5) y asimbiótica (KC, MBA) de *Bletia campanulata* a los 60 días de cultivo *in vitro*.

Tratamientos	Panorámica	Menor respuesta	Mayor respuesta
A1 <i>B. urbana</i>	 8X	 63x	 12X
A2 <i>S. aurantiacus</i>	 10X	 80X	 50X
A3 <i>B. campanulata</i>	 16X	 100X	 50X

A4
Bletia sp.



8X



40X

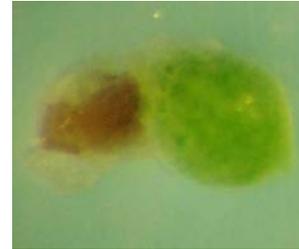


16X

A5
B. urbana



8X



63X



12.5X

KC



8X



63X



25X

MBA



12.5X



50X

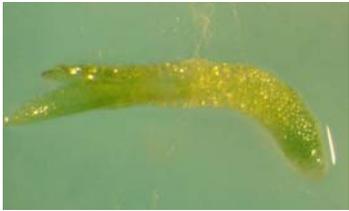
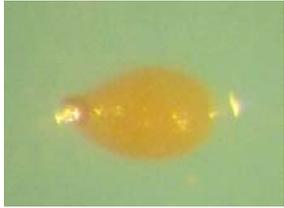


50X

B. urbana es una especie que depende para su germinación del hongo micorrízico o de los azúcares del medio, siendo casi nula su germinación en el medio testigo (MBA) (Fig. 8). La germinación más alta de todos los tratamientos se registró en el medio control (KC) que fue del 62 % y para el resto de los aislados el porcentaje fue en promedio del 35 % no existiendo diferencias significativas. La morfogénesis a los 30 días en el medio KC y los tratamientos con los aislados A1, A4 y A5 fue similar en el porcentaje de semillas (≈ 11 %) que llegaron al estadio de aparición de hoja verdadera (Fig. 9 y Cuadro 11). Sin embargo la diferencia se hace notoria a los 58 días de cultivo *in vitro* ya que con el medio control (KC) el desarrollo se limita a la aparición de una segunda hoja, mientras que con los aislados anteriores, desarrollan dos hojas y una bráctea. Con los aislados A2 y A3, las plantas a los treinta días de cultivo llegan aun mismo estadio de primordio foliar (Figura 9 y Cuadro 11) y los protocormos sólo se siguen desarrollando con el aislado A2 hasta alcanzar la aparición de hoja verdadera a los 58 días de cultivo (Cuadro 13).

En *Bletia* sp., se alcanzó un elevado porcentaje de germinación con el aislado A3 y de manera similar en el medio asimbiótico control (KC) (Fig. 8). Mientras que los aislados A1, A4 y A5 promueven la germinación en un promedio de alrededor del 50 % y A2 logró un menor estímulo de la misma. Las diferencias significativas se presentaron entre el medio control y testigo, así como con el control y el aislado A3 ($p < 0.01$). Aunque esta especie logró germinar muy poco con en el medio testigo sin azúcares (MBA) si alcanzó el estadio de protocormo con primordio foliar a los 60 días (Fig. 9 y Cuadros 11 y 14). Con los aislados A1, A4 y A5 se promovió el mayor desarrollo alcanzado, tanto a los treinta días como a los 58, llegando un gran porcentaje de semillas al estadio de plántula con tallo. A pesar de que con el medio control (KC) las plántulas también alcanzaron este estadio a los 58 días se aprecia que son morfológicamente diferentes a las obtenidas simbióticamente ya que la lámina foliar no se ha diferenciado completamente. Con los aislados restantes, el desarrollo fue mayor a los 30 días con el A3, aunque a los 58 días, el A2 estimula una mayor morfogénesis hasta hoja verdadera y con el primero los protocormos parecieron detenerse en el mismo estadio.

Cuadro 13. Monografía de la germinación simbiótica (A1 –A4) y asimbiótica (KC,MBA) de *Bletia urbana* a los 58 días de cultivo *in vitro*.

Tratamientos	Panorámica	Menor respuesta	Mayor respuesta
A1 <i>B. urbana</i>			
	12.5X	12.5X	10X
A2 <i>S. aurantiacus</i>			
	12.5X	63X	25X
A3 <i>B. camapanulata</i>			
	10X	63X	25X

A4
Bletia sp.



10X



63X

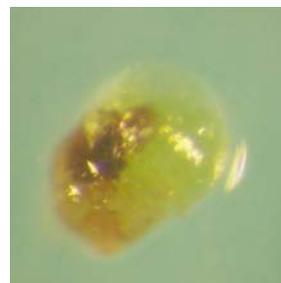


16X

A5
B. urbana



8X



50X



10X

KC



10X



12.5X



50X

MBA



A 8X

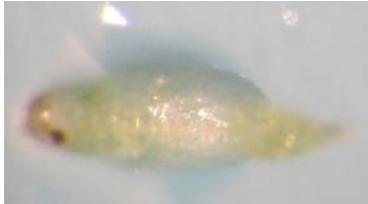


A 50X

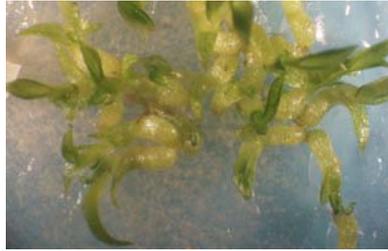


A 25X

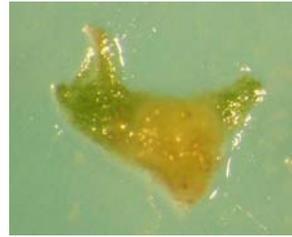
Cuadro 14. Monografía de la germinación simbiótica (A1 –A5) y asimbiótica (KC, MBA) de *Bletia* sp.a los 58 días de cultivo *in vitro*.

Tratamientos	Panorámica	Menor respuesta	Mayor respuesta
A1 <i>B. urbana</i>	 8X	 20X	 12.5X
A2 <i>S. auraantiacus</i>	 12.5X	 63X	 25X
A3 <i>B. campanulata</i>	 10X	 20X	 40X

A4
Bletia sp.



20x



32X



12.5X

A5
B. urbana



5X



50X

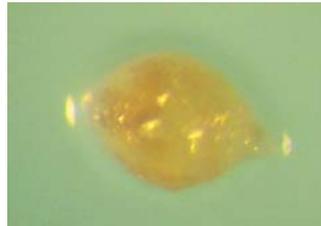


12.5X

KC



8x



8X



12.5X

MBA



8X



100x



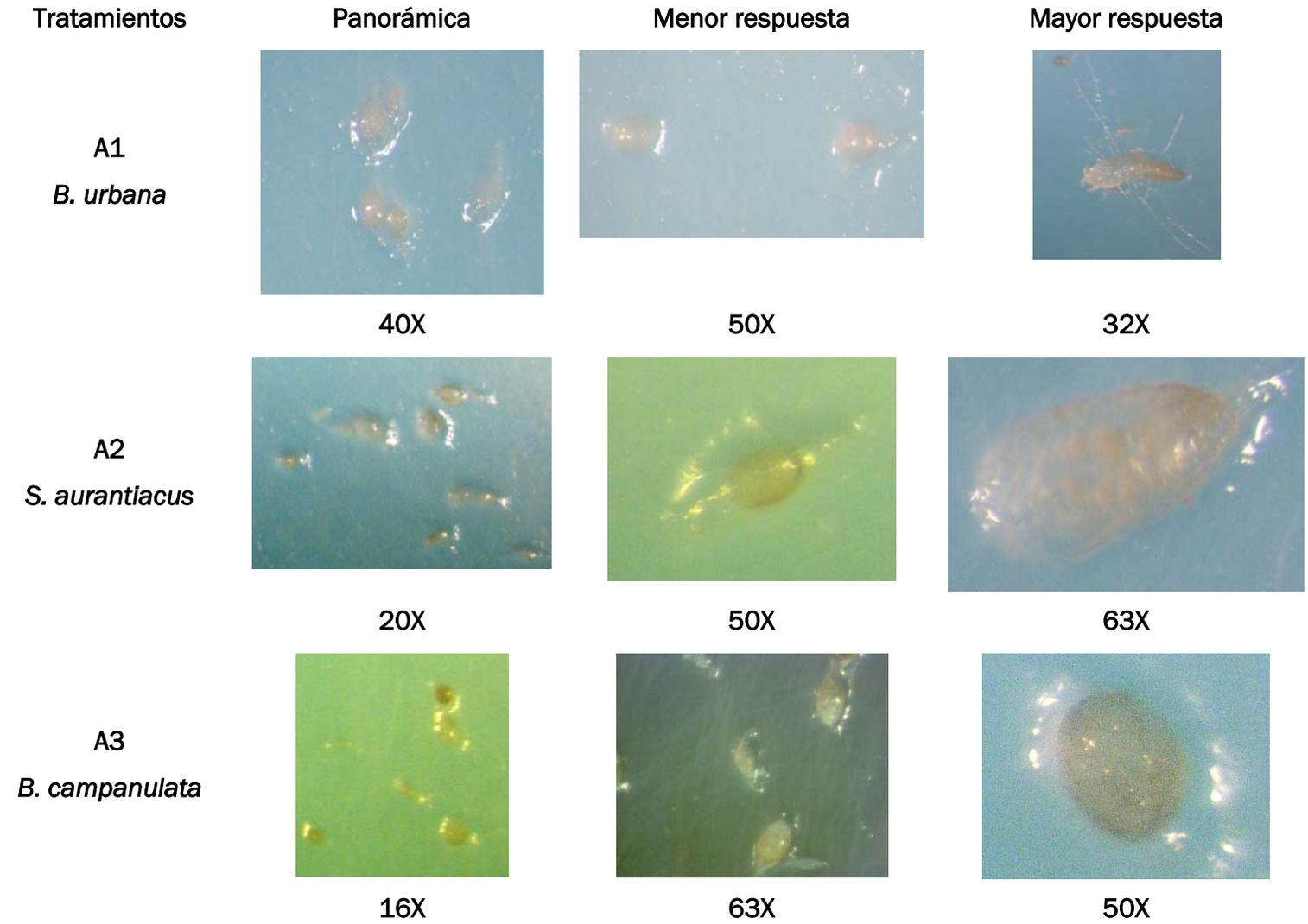
50X

La especie *D. cinnabarinus* no presentó diferencias significativas en la germinación con los distintos tratamientos ya que todos llegan a un porcentaje que no supera el 30% (Fig. 8). A los 30 días de cultivo las semillas llegan a protocormo en todos los casos (Fig. 9 y Cuadro 11) y a los 60 días existieron diferencias para la morfogénesis observándose que en el medio control (KC) y con los aislados A1 y A4, los protocormos fueron de mayor tamaño (Cuadro 15). Para el resto de los tratamientos aún a los 51 días, no se logró un mayor desarrollo.

En el caso de *H. novemfida*, debido a la escases de material recolectado, se contó solamente con una repetición. Sin embargo, se pudo apreciar una elevada micotrofia ya que su germinación se ve más estimulada con los tratamientos simbióticos que con el medio control (KC) (Fig. 8). Además de que la morfogénesis llegó al 25% en el estadio 4 para A1 y al 43% para A5 (Fig. 9, Cuadro 11). Sin embargo, aún cuando la germinación se estimuló considerablemente con los hongos A3 y A4, en comparación a los tratamientos asimbióticos, a los 54 días de cultivo, se destaca la micotrofia de la especie ya que las semillas casi completan el estadio de plántula con A1 y A5, en contraste con los aislados anteriores que no lograron promover ningún avance en el desarrollo y éste fue similar, al medio testigo (MBA)(Cuadro 16). Con el medio KC se alcanzó el desarrollo de protocormo pero se observan diferencias claras en su forma de los protocormos no guardan la misma proporción en la relación pseudobulbo: hoja foliar, ni tampoco las vainas fueron similares a las de los medios simbióticos, siendo inclusive, aclorótica (Cuadro 16).

La única especie que no logró ser estimulada en su germinación por ningún tratamiento asimbiótico ni simbiótico fue *M. myurus* ya que el porcentaje de germinación en todos los tratamientos no superó el 12 %. Se destaca que todas las semillas se lograron imbibir y aumentar considerablemente su tamaño, hasta en cinco veces su volumen y que las que progresaron a esta fase sufrieron oxidación lo que no permitió su desarrollo posterior (Fig. 8 y Cuadro 11). La morfogénesis a los 51 días no avanzó, encontrándose que únicamente el aislado A1 pudo promover la pigmentación clorofílica similar al medio KC (Cuadro 17).

Cuadro 15. Monografía de la germinación simbiótica (A1 – A5) y asimbiótica (KC, MBA) de *Dichromanthus cinnabarinus* a los 51 días de cultivo *in vitro*.



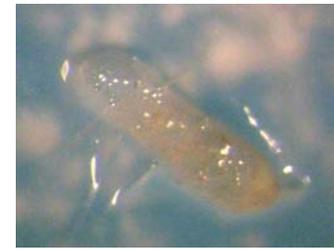
A4
Bletia sp.



16X



63X



50X

A5
B. urbana



16X



63X



63X

KC



20X



50X



50X

MBA



32X



8X



8X

Cuadro 16. Monografía de la germinación simbiótica (A1 – A5) y asimbiótica (KC, MBA) de *Habenaria novemfida* a los 54 días de cultivo *in vitro*.

Tratamientos	Panorámica	Menor respuesta	Mayor respuesta
A1 <i>B. urbana</i>	 8X	 100X	 8X
A2 <i>S. aurantiacus</i>	 12.5X	 100X	 32X
A3 <i>B. campanulata</i>	 25X	 50X	 50X

A4
Bletia sp.



10X



80X



10X

A5
B. urbana



8X



80X



8X

KC



12.5X



80X

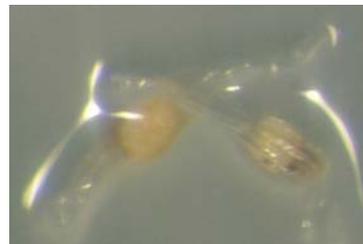


32X

MBA



32X



100X



50X

Cuadro 17. Monografía de la germinación simbiótica (A1 – A5) y asimbiótica (KC, MBA) de *Malaxis myurus* a los 51 días de cultivo *in vitro*.

Tratamientos	Panorámica	Menor respuesta	Mayor respuesta
A1 <i>B. urbana</i>	 25x	 80x *	 80x
A2 <i>S. aurantiacus</i>	 50x	 50x	 80x
A3 <i>B. camapanulata</i>	 16x	 80x	 80x

A4
Bletia sp.



25x



100x



63x

A5
B. urbana



25x



80x



63x

KC



32x



32x



100x

MBA



16x



50x



63x

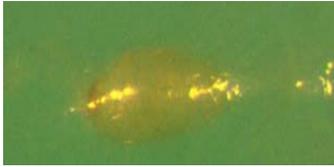
* es la misma imagen que la de mayor respuesta ya que en ambas la respuesta era igual

La especie *S. aurantiacus* fue estimulada significativamente por los hongos en su germinación, que fue similar al medio control (KC) sin que lograra germinar en un medio asimbiótico sin azúcares (MBA) (Fig. 8 y 9). Se presentó una morfogénesis muy diversa para esta especie con los distintos hongos a los treinta días, aún cuando los errores estándar fueron muy grandes, se encontraron diferencias únicamente con el medio MBA y el resto de los tratamientos. El aislado A2 permitió que las plantas se desarrollaran hasta el estadio 5 en un 21%. En esta especie también se presentó oxidación de los protocormos (Cuadro 11). A los 54 días se observa un completo desfazamiento de los medios asimbióticos con el resto: el medio control (KC) promueve el desarrollo pero también altera la morfología de los protocormos, se observa una desproporción en la relación pseudobulbo: hoja, cierta clorosis y la ausencia de rizoides. Por otro lado, se observó también especificidad dado que el aislado A3 no logró ningún estímulo en el desarrollo (Cuadro 18).

Analizando de manera global el efecto de los aislados en la germinación, se facilita visualmente su observación en la figura 8b. En esta figura se observa que el aislado A4 de *Bletia* sp. fue el que más estimuló la germinación de todas las especies. Sin embargo, el aislado A1 de *B. urbana* fue el que logró estimular más la germinación de dos especies y de manera general de las otras. A éstos les siguen los aislados A2 y A5 de *S. aurantiacus* y *B. urbana*, respectivamente. El aislado A3 de *B. campanulata*, fue muy específico para ciertas especies.

En cuanto al desarrollo de los protocormos después de los 50 días de cultivo *in vitro* la simbiosis, permitió diferencialmente que la mayoría de las especies continuaran desarrollándose hacia plántulas (Cuadros 12-18). El aislado A2, sólo permitió un buen desarrollo para *S. aurantiacus*. El aislado A3 no promovió la continuación del desarrollo en ninguna de las especies. El aislado A4 permitió una buena morfogénesis para cuatro de las siete especies. El aislado A5 tuvo los mismos efectos que el anterior, únicamente que influyó más en el desarrollo de *H. novemfida* y A4 a *S. aurantiacus* en igual o mayor desarrollo que el medio enriquecido (KC) la mayoría de los aislados promovieron más el desarrollo que el medio sin azúcares (MBA).

Cuadro 18. Monografía de la germinación simbiótica (A1 y A5) y asimbiótica (KC, MBA) de *Stenorrhynchos aurantiacus* a los 54 días de cultivo *in vitro*.

Tratamientos	Panorámica	Menor respuesta	Mayor respuesta
A1 <i>B. urbana</i>	 10X	 20X	 25X
A2 <i>S. aurantiacus</i>	 8X	 40X	 12.5X
A3 <i>B. campanulata</i>	 20X	 100X	 40X

A4
Bletia sp.



12.5X



10X



10X

A5
B. urbana



10X



10X



10X

KC



20X



50X



20X

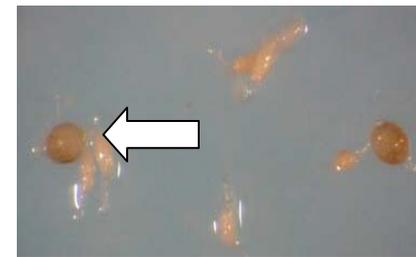
MBA



10x



10x



10x*

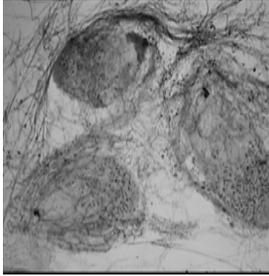
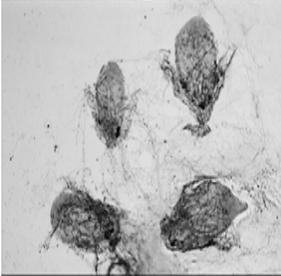
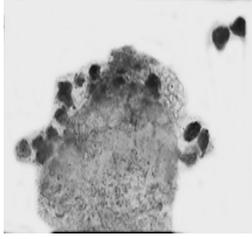
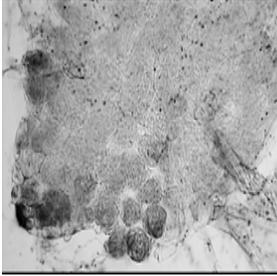
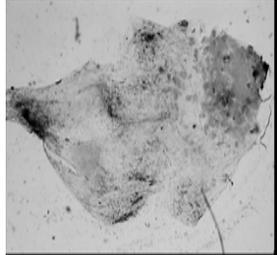
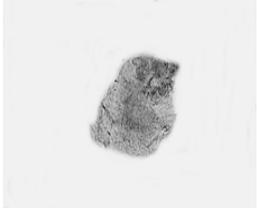
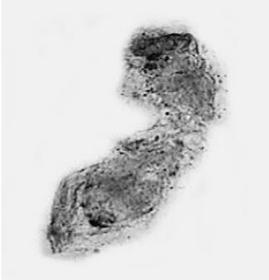
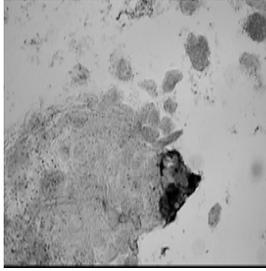
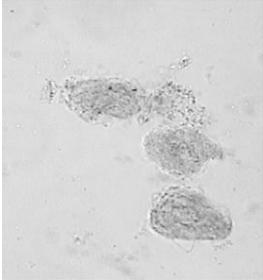
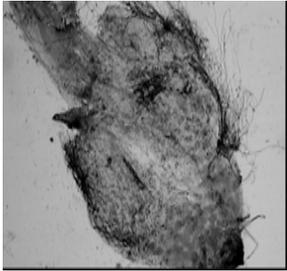
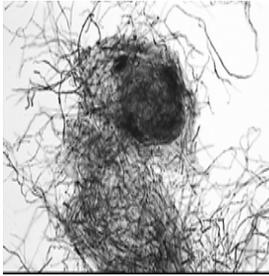
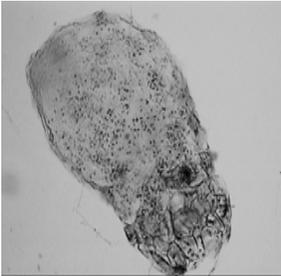
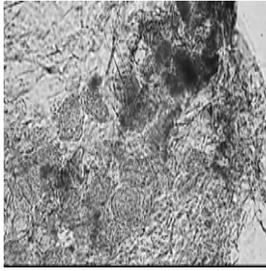
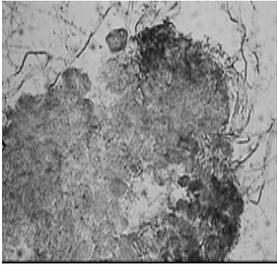
La flecha indica el efecto;* es la misma foto que la panorámica.

Cabe destacar que se hizo la verificación de que las plantas hubieran formado la asociación. Para esto, se realizaron preparaciones de los protocormos a los 30 días de cultivo simbiótico. De éstas se obtuvo un registro fotográfico que se muestra en el cuadro 19 aunque de algunas especies con ciertos aislados no se logra observar en este registro el establecimiento de la simbiosis.

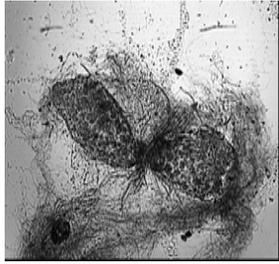
7.5. Creación de un cepario de hongos micorrízicos de orquídeas.

Con todos los aislados obtenidos en este trabajo, se inició un cepario que consta de 16 aislados distintos, así como de diferentes subcultivos de estos aislados: los obtenidos inicialmente denominados de origen (O) y los que fueron probados en la germinación de algunas especies y que dieron resultados estimulándola. Cada uno de estos subcultivos a su vez, cuenta con una preparación de respaldo y su información capturada en una base de datos donada por el Dr. C. Walker (Biological Research and Imaging Laboratory, Royal Botanic Garden, Edinburgh), al laboratorio de Microcosmos del Instituto de Geología de la UNAM. Esta fue generada para bancos de germoplasma de hongos micorrízicos arbusculares (BEG database). En los esquemas A-M de la figura 10 se observan las rutas de ingreso de los diferentes aislados y sus subcultivos que se describen como historias de los ensayos de la base BEG. Se obtuvieron un total de 116 tubos con cultivos en el cepario (58 aislados, con su repetición).

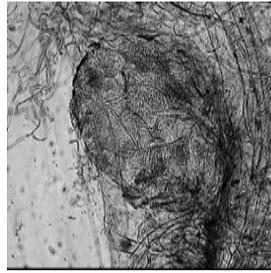
Cuadro 19. Protocormos simbióticos de orquídeas terrestres a los 30 días de cultivo *in vitro*. Tinción con azul Tripán. Las lestras A1...A5 corresponden a los aislados probados. s.r. = sin registro.

Especie	A1 <i>B. urbana</i>	A2 <i>S. aurantiacus</i>	A3 <i>B. campanulata</i>	A4 <i>Bletia</i> sp.	A5 <i>Bletia urbana</i>
<i>Bletia campanulata</i>	 100X	 100X	 100X	 100X	 100X
<i>Bletia urbana</i>	 50X	 25X	 25X	 10X	 100X
<i>Bletia</i> sp.	 50X	 200X	 200X	 200X	 100X

*Dichromanthus
cinnabarinus*

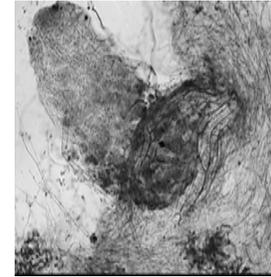


50X

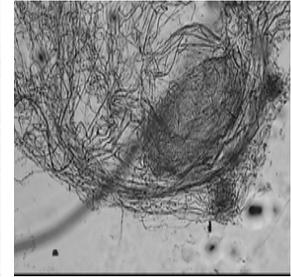


100X

s. r.



100X



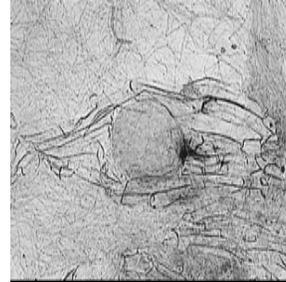
200X

*Habenaria
novemfida*



100X

s. r.



50X

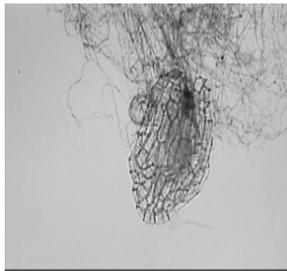


200X

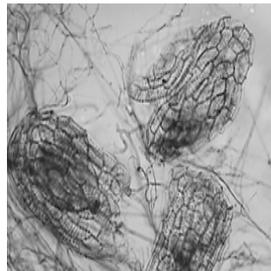


100X

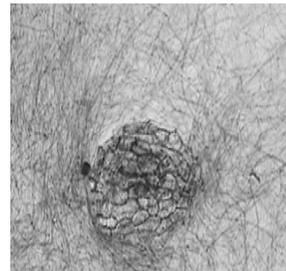
*Malaxis
myurus*



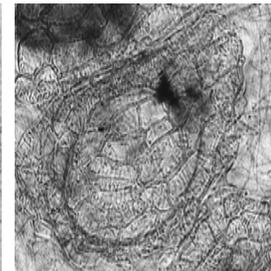
200X



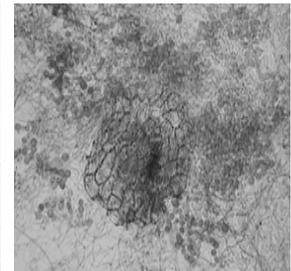
200X



200X

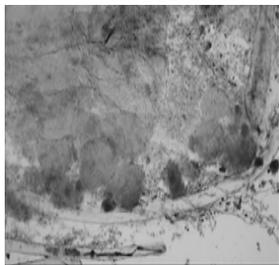


400X

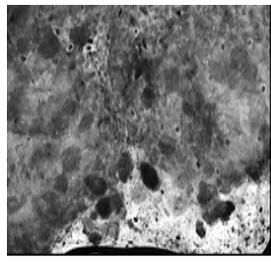


200X

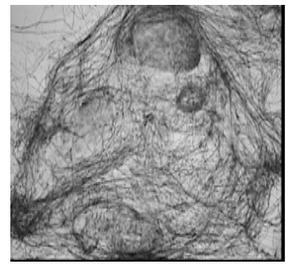
*Stenorrhynchos
aurantiacus*



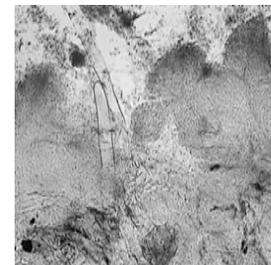
200X



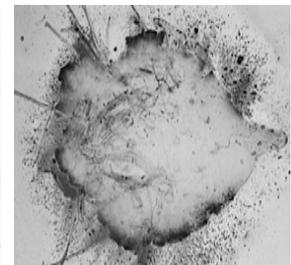
50X



100X



200X



50X

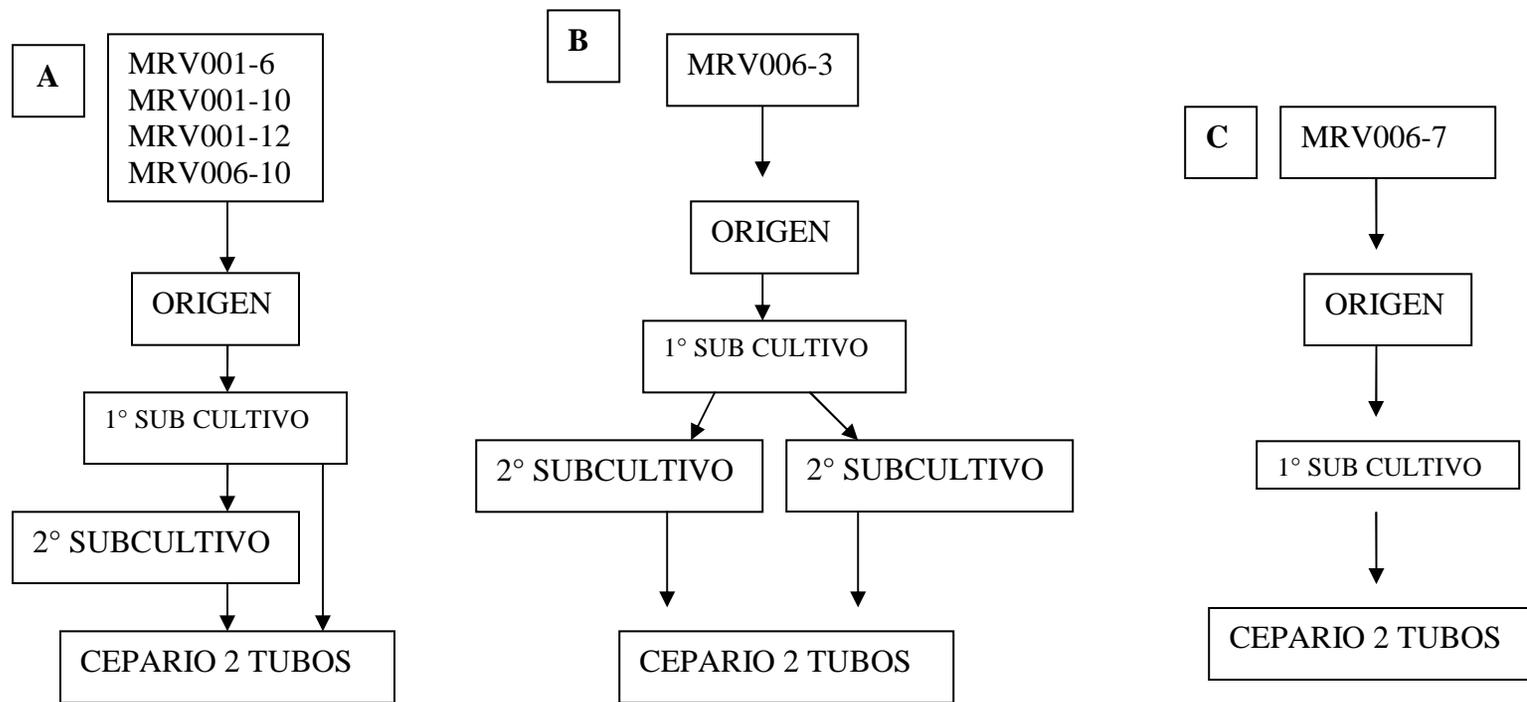
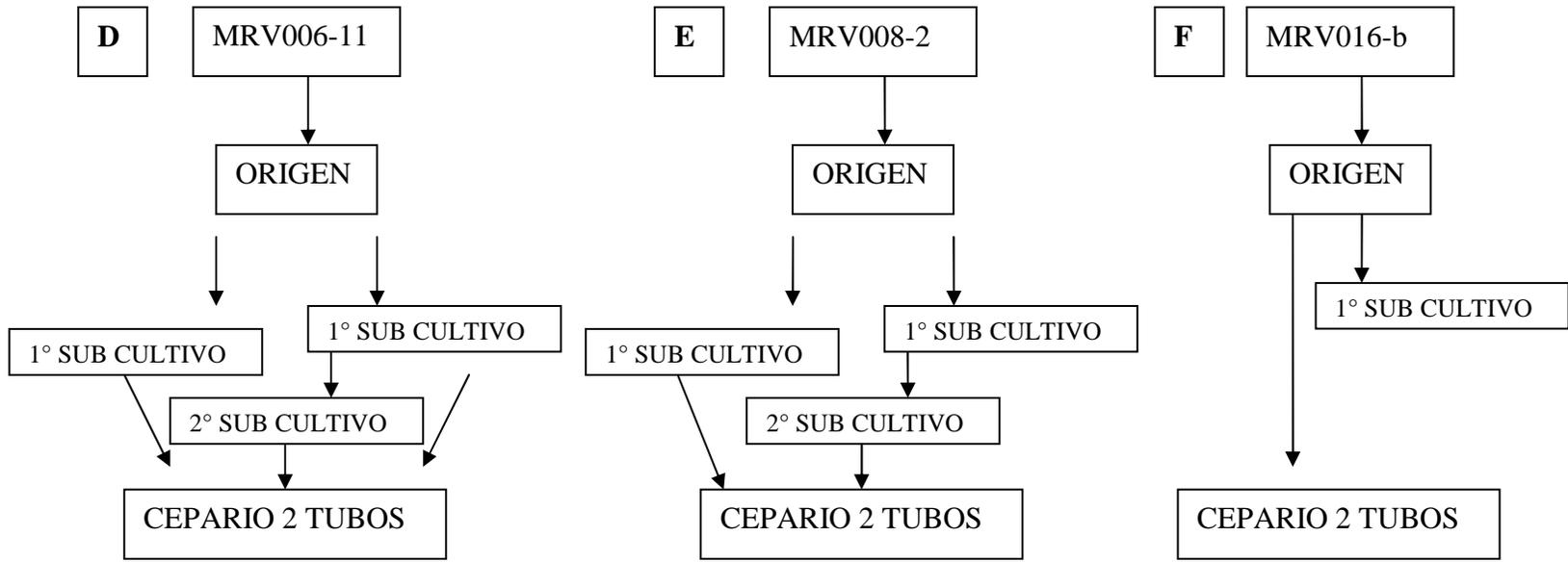
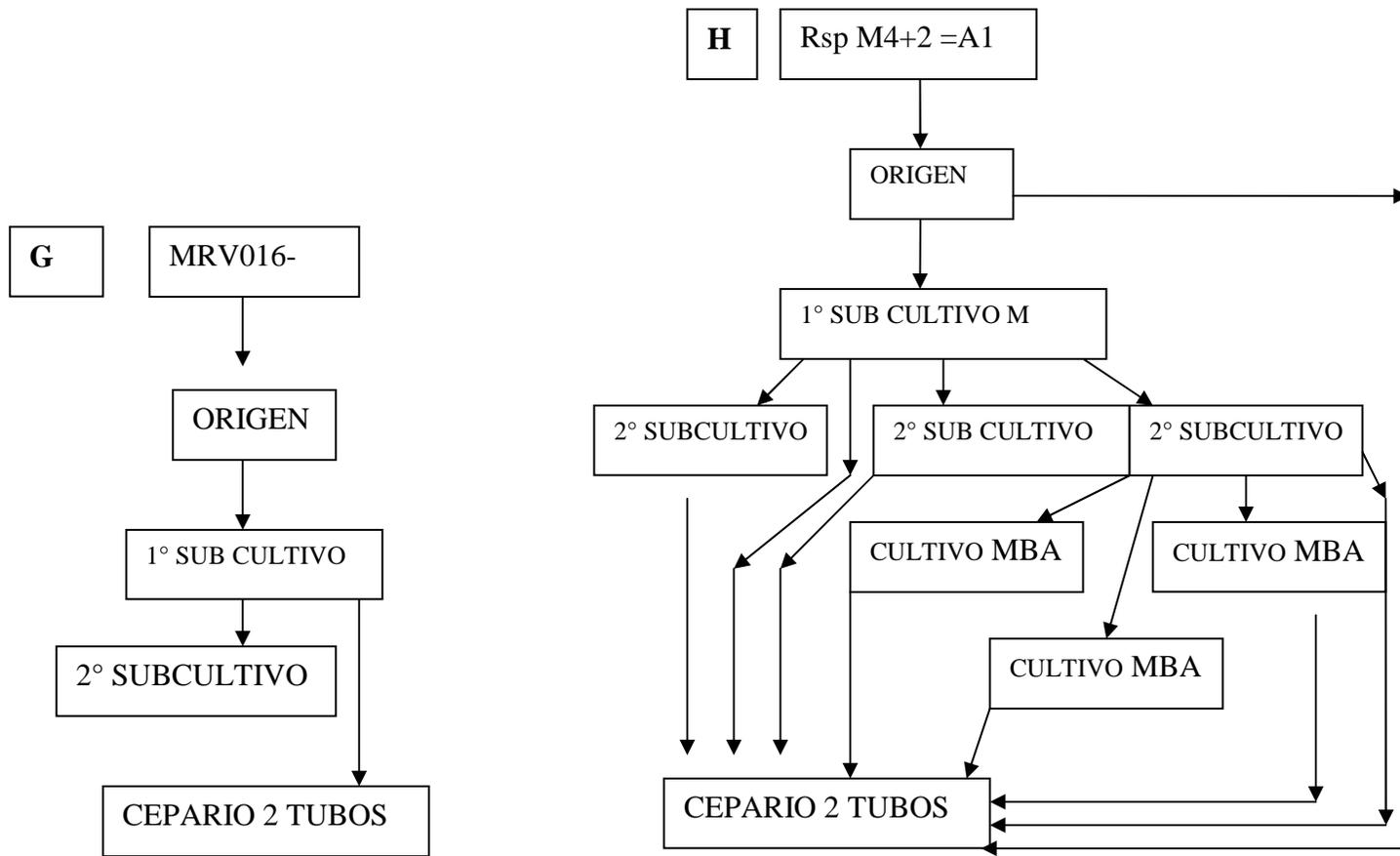


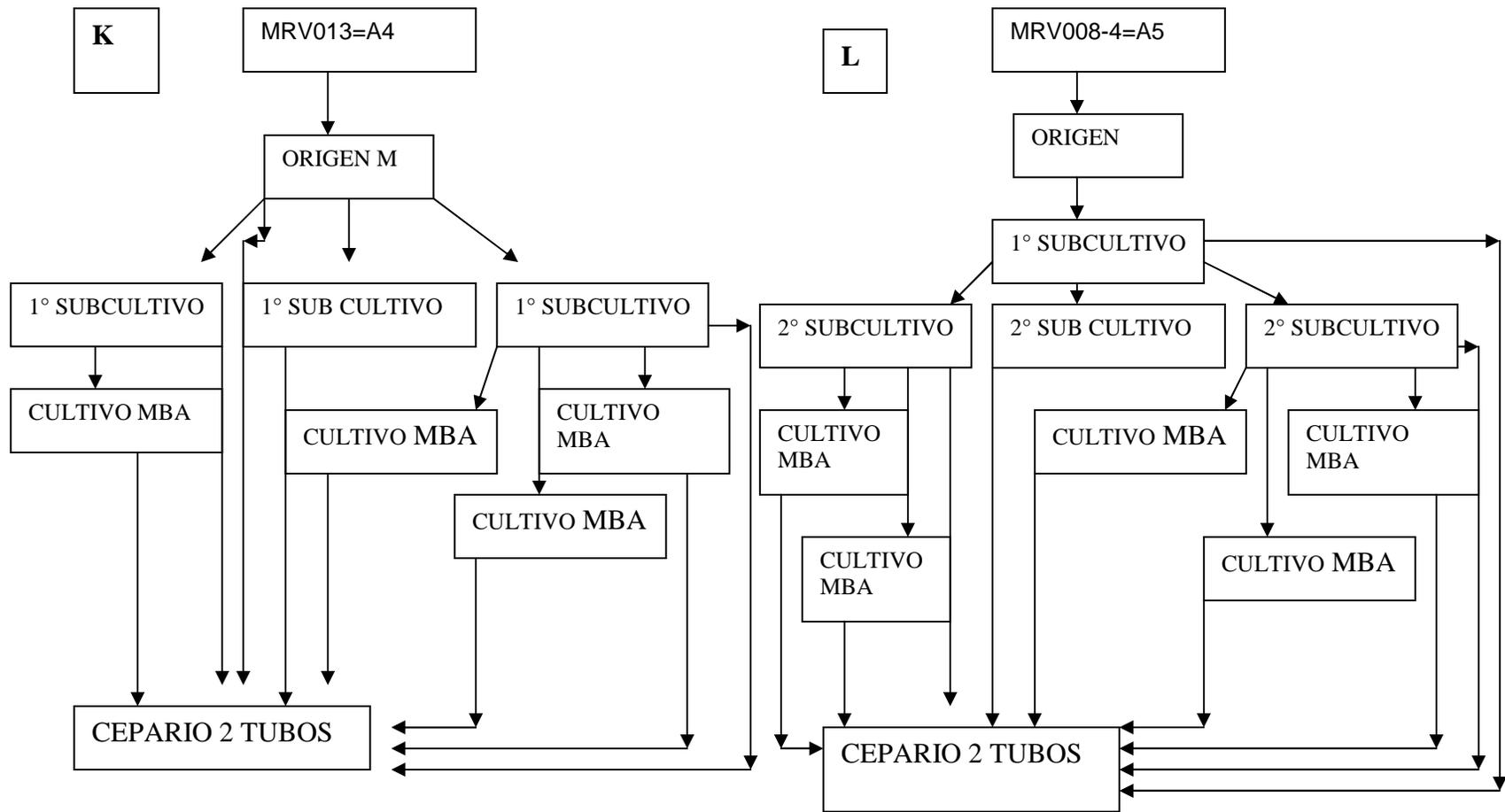
Figura 10. Diagramas del origen de los diferentes aislados de hongos micorrízicos de orquídeas que ingresaron al cepario. Información complementaria de la base de datos del anexo 2.



Continuación de la figura 10.

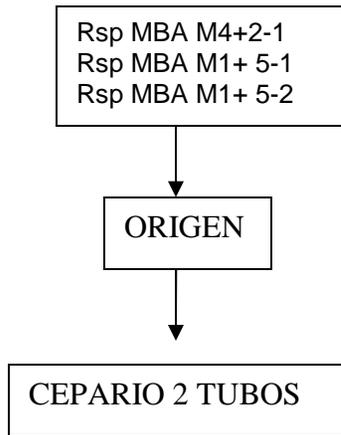


Continuación de la figura 10.



Continuación de la figura 10.

M



Continuación de la figura 10.

VIII. DISCUSIÓN

8.1. Germoplasma de orquídeas

Rzedowski (1954) describió para el Pedregal de San Angel, 19 especies de orquídeas, dato que posteriormente ha sido ampliado por otros. Estos datos han sido generados para todas las estaciones del año y para una extensa zona de muestreo. En el presente trabajo, la recolecta de cápsulas se hizo únicamente en la época de lluvias, así como un muestreo somero de una zona bien explorada por la especialista que apoyó la determinación de las especies. Es por esto que el número de especies encontradas no supera a siete, además de que el objetivo central del trabajo fue el aislamiento de los hongos asociados a las mismas. Aún con esto, se inició un banco de germoplasma en el que ingresaron un total de 55 cápsulas maduras.

8.2. Caracterización morfológica de las simbiosis *in situ*.

Para *S. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y para *H. novemfida* se encontraron zonas de colonización definidas que se observaban amarillas en el campo mientras que en las especies pertenecientes al genero *Bletia*, esta característica fue evidente solo en el laboratorio estas observaciones concuerdan con las descritas por Mitchell (1989).

Se encontró que las especies estudiadas solo presentaban colonización en las raíces que corresponde a la categoría cuatro de los patrones descritos por Ramsay *et al.* (1986). Cabe mencionar que en las especies estudiadas se encontraron patrones diferentes entre las mismas, ya que las pertenecientes al genero *Bletia* es colonizada a lo largo de las raíces que están bajo el bulbo correspondientes a la subcategoría 4a de las descritas por Ramsay *et al* (1986), mientras que para *H. novemfida* la colonización solo se encontró en algunas raíces pequeñas alejadas del bulbo similar a la subcategoría 4b, en *S. auratiacus* y *D. cinnabarinus* la

colonización se localizo en las raíces tubérculo, esto corresponde a una subcategoría 4d.

Se observó que la colonización del córtex de las diferentes especies es similar a la descrita en la literatura como tolipofagia descrito inicialmente por Burgeff (1959). En este patrón, la orquídea digiere el conjunto de hifas que forman al pelotón, dejándolas colapsadas y descargadas de su contenido citoplasmático, pero conservando encapsuladas en una masa central a las paredes celulares del hongo (Fig. 4, Cuadro 6). No se identificaron zonas definidas de células hospederas y de digestión. Es posible que esto se deba a que bajo las técnicas empleadas en este trabajo (microscopía óptica con cortes manuales), no fuera posible identificar las, o bien a que en la estación del año en la que los cortes fueron observados no se definieran estos patrones. La caracterización de Rasmussen (1995) para orquídeas terrestres no describe algún patrón similar al encontrado en el presente. Cabe destacar que las descripciones se han basado mayoritariamente en especies terrestres de climas templados por lo que las observaciones encontradas correspondan a la fisiología de especies de climas distintos.

8.3. Aislamiento de los hongos micorrízicos.

La obtención de los aislados de las diferentes especies, permitió hacer inferencias de la fisiología del crecimiento de los hongos. Se pudo apreciar que el recrecimiento de las hifas a partir de los pelotones en cultivo fue similar en las tres especies del género *Bletia*. Los hongos crecieron rápidamente en la mayoría de los explantes sembrados, lo que hizo posible obtener múltiples aislados que en el caso particular de *B. Urbana*, fueron distintos en su forma de crecimiento en PDA (Cuadro 7). Con las determinaciones microscópicas de este trabajo, no fue posible identificar los anamorfos taxonómicamente, siendo probable que pertenezcan a especies teleomórficas diferentes.

En contraste con *S. aurantiacus* y *D. cinnabarinus*, en los que se apreciaron zonas localizadas de colonización y pelotones aparentemente intactos o no digeridos, los

hongos presentaron mayor dificultad para recrecer en el medio de cultivo, haciéndolo más lentamente que los pelotones aislados de las especies del género *Bletia*. Esto indica que la morfología de los pelotones no está directamente relacionada con su actividad fisiológica y no es un indicador eficiente para llevar a cabo el aislamiento de cepas a partir de estructuras conservadas. Esto contradice a lo que menciona Mitchell (1989) ya que el menciona que la observación de un pelotón intacto es capaz de recrecer para lograr el aislamiento del hongo.

8.4. Viabilidad las semillas y estandarización de la siembra.

Bajo las condiciones de incubación probadas en este trabajo, fue posible evaluar la viabilidad de las semillas de las especies del género *Bletia*. Se demostró que, *B. campanulata* presenta el mismo comportamiento fotoblástico descrito por Chávez (1980) para *B. urbana*.

Rasmussen (1995) describe dos estrategias de germinación para orquídeas terrestres, una de las cuales corresponde a lo observado en el presente para las *Bletias*: germinación sincronizada e inmediata después de la imbibición en condiciones de luz. La segunda se caracteriza por estar inhibida por la luz y requerir más tiempo para germinar, correspondiendo a lo observado para *S. aurantiaca*, *D. cinnabarinus* y *H. novemfida* cuya germinación se estimuló incubándolas en la oscuridad. Esto podría indicar que las especies de orquídeas terrestres de la Reserva presentan diferentes estrategias de germinación y quizás se deba a que las fotoblásticas están más relacionadas filogenéticamente con especies epífitas (Salazar *com. pers.*) que son más autótrofas por su acceso a la luz. Zettler *et al.* (1995; 1997; 1998) observan un comportamiento no fotoblástico en *Spiranthes odorata*, *Spiranthes lacera* y *Epidendrum conopseum*, de las cuales las dos primeras era anterior mente clasificadas en el mismo genero que *S. auratiacus* y *D. cinnabarinus* especies no fotoblásticas estudiadas en este trabajo.

No fue posible establecer la viabilidad de las semillas de *M. myurus* bajo las condiciones de este trabajo, ni tampoco durante el tiempo de seguimiento del desarrollo. Se ha descrito la germinación de algunas especies de orquídeas (*Spiranthes odorata*, *Spirantes cernuda* y *Goodyera pubescens* Zettler et al. 1995; 1997; *Sarcochilus*, Markovina y McGee, 2000) en un periodo de incubación de hasta seis a nueve meses, tiempo con el que no se contó para evaluar diferencias en el momento de los registros. Sin embargo, muchos cultivos antes de las cuatro semanas, sufrieron oxidación y no se pudo evidenciar si el incremento de volumen de las semillas fue una acción física de incubación o el desarrollo inicial de un protocormo. Es posible que los requerimientos para germinar pueden ser muy específicos para esta especie, p. Ej. La adición de una vitamina particular o un medio como lo observa para *Calypso bulbosa* por Arditti et al (1981). Otro mecanismo que podría explicar la difícil germinación en esta especie es la dormancia como lo descrito por Rasmussen (1992) para especies terrestres.

8. 5. Germinación y desarrollo simbiótico.

A partir de los resultados obtenidos de germinación y desarrollo de las orquídeas en este trabajo, se puede decir que la germinación de las semillas, demuestra potencialmente su viabilidad, no así garantiza su desarrollo. Se observaron tasas y patrones de desarrollo similares en las especies del género *Bletia* que se debieron probablemente a su fotoblastismo, demostrado en este trabajo para *B. Campanulata*.

Este comportamiento fotoblástico del género, podría conferirle ventajas sobre las especies restantes ya que al iniciar a fotosintetizar desde el inicio de la germinación, estas especies comienzan a tener suministros de azúcares y les permitiría establecerse hasta que fueran colonizadas por un hongo adecuado para su posterior desarrollo. Es decir, podrían depender menos en la germinación de los suministros proporcionados por los hongos micorrízicos, lo cual ha sido sugerido por Rasmussen (1995) para otras especies de orquídeas terrestres.

Sin embargo, como se aclara anteriormente, etapas posteriores al criterio de germinación (de la etapa 3 a la 6), indicaron que estas especies se ven favorecidas ante la colonización del hongo en su morfogénesis, incrementando el porcentaje de las plántulas que llegan a un estadio superior al alcanzado por el control. Los aislados A1, A4 y A5 promueven mayores porcentajes de plántulas que llegan al estadio 5. Mukerji *et al.* e Yoder *et al.*, (2000) explican que los fotoasimilados producidos por las plántulas son insuficientes para su desarrollo y el aporte externo de azúcares proporcionados por el hongo es una de las razones de esta dependencia posterior a la germinación. Aunque, esta explicación es simplista debido a que Arditti (1992) destaca que el aporte de nutrimentos y compuestos orgánicos por parte de los hongos en la simbiosis es tan importante y tan poco conocido, hasta ahora, el aporte de la planta hacia los hongos, que esta relación mutualista es factible de ser vista como parasitismo de la orquídea al hongo.

Es posible que el alto porcentaje de germinación de *B. campanulata* en el medio sin azúcares (MBA), pudiera deberse a que esta especie en particular contenga reservas lipídicas del embrión suficientes para iniciar su proceso de germinación (Rasmussen, 1995). Las especies *B. urbana* y *Bletia* sp. no lograron germinar en el medio sin azúcares, lo que podría indicar que tienen reservas limitadas (Arditti y Ghani, 2000), o que su estrategia de germinación difiere de la de *B. campanulata* o que son más dependientes del hongo micorrizico para el proceso de germinación.

Rasmussen (1995) describe un comportamiento sobre la germinación de las orquídeas terrestres. Existen las orquídeas cuya estrategia de germinación es rápida, volviéndose inmediatamente clorófilicas. Otras especies necesitan forzosamente germinar en oscuridad hasta la aparición del primordio foliar. La autora enfatiza ambos mecanismos para especies de diferentes climas y habitats. Sin embargo en el presente estudio, como se detallará a continuación, se identificaron ambas estrategias.

La especie *B. urbana* en este trabajo presentó porcentajes de germinación mayores a los obtenidos por Castillo (2002) en cultivo simbiótico y aún con el mismo aislado de

hongo simbiote. Sin embargo, en ambos casos, los porcentajes fueron menores en comparación con los obtenidos por Ortega-Larrocea *et al.* (2000) con semillas con 14 años de almacenamiento. Esto podría indicar que la hidratación de las semillas ejerza una influencia en la germinación, dado que los dos primeros trabajos fueron con semillas obtenidas a partir de cápsulas recolectadas recientemente. La posible deshidratación de las semillas almacenadas durante largo periodo, no alteró su viabilidad y aumentó su capacidad de germinación (Batty *et al.*, 2001a). También puede deberse a la madurez citológica de los embriones (Rasmussen, 1995).

Las especies restantes germinaron sólo en oscuridad hasta el estadio de primordio foliar (estadio tres) y mostraron distinto grado de dependencia o micotrofia en la germinación y subsecuente desarrollo.

La especie con mayor grado de dependencia micorrízica para su germinación fue *H. novemfida*. De igual manera, su morfogénesis fue completamente dependiente de la simbiosis. Este mutualismo puede inclusive afectar su distribución en campo, ya que esta especie crece en comunidades, donde las semillas podrían caer cerca de las plantas madres y de ahí ser colonizadas por los hongos micorrízicos (Bernar, 1909 en Smith y Read 1997; Rasmussen, 1993).

La especie *S. aurantiacus* no germinó en MBA, lo que indica igualmente una importante dependencia de los hongos micorrizicos. Su desarrollo posterior en medio con azúcares se logra favorablemente aunque es distinto al simbiótico. Es posible que el aporte de carbohidratos sea por tanto, suficiente para el crecimiento, pero la simbiosis puede aportar otros complementos e inclusive hormonas, que hacen la diferencia morfogenética (Arditti, 1992). Tres de los aislados promovieron el desarrollo de esta especie y el que la estimula más fue el aislado A2 que provino de una planta adulta de la misma especie. Este evento marca una muy elevada afinidad para este especie, como lo encontrado para otras especies de orquídeas *v. gr. Dactylorhiza purpurella* (Arditti, 1992).

Las semillas de *D. cinnabarinus* y *M. myurus* lograron germinar en todos los medios pero sin continuar con su desarrollo. Es posible que algunas semillas de ambas especies inicien el proceso de germinación sin la necesidad del suministro de azúcares externos dado lo bajo de su porcentaje de germinación (menor al 25%). Esto también podría indicar que la mayoría de las semillas de cápsulas recolectadas recientemente presenten un mecanismo de dormancia o inmadurez embrionaria (Rasmussen, 1992; 1995), o bien que los requerimientos para lograr mayores porcentajes de germinación no fueron los óptimos estudiados en este trabajo. Arditti et al. (1981) destacan la importancia de conocer los requerimientos de las semillas de orquídeas terrestres ya que algunas son difíciles de germinar *in vitro*. Los suplementos orgánicos pueden aportar algunos complejos vitamínicos u otros esenciales. En este caso, el agua de coco fue el suplemento utilizado, pero es posible que el plátano inmaduro u otros suministros hubieren resultado en una estimulación (A. Martínez *com. personal*).

8.6. Relación orquídea – hongo (especificidad).

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis planteada por Rasmussen (2002) sobre la baja especificidad simbiótica que existe entre la orquídea y el hongo en el caso particular de su germinación. Sin embargo, en cuanto al desarrollo, se observó que la hipótesis planteada por Bernad (1909) en Smith y Read (1997) demuestra que las plantas presentan especificidad por algún hongo particular.

Las especies del género *Bletia* respondieron mejor con los aislados provenientes del mismo género, lo podría sugerir que especies similares de hongos se asocian a plantas relacionadas taxonómica y ecológicamente (Otero *et al.*, 2002).

S. aurantiacus presentó un desarrollo muy heterogéneo en su germinación y desarrollo. Este no se vió modificado en los tratamientos simbióticos, como lo observado por Ortega-Larrocea *et al.* (2000) en la sincronización simbiótica de las germinación de *B. urbana*. Esto podía deberse a que tanto la germinación como el desarrollo en esta especie esté regulado genéticamente como lo mencionado por Rasmussen (1995).

En cuanto al efecto diferencial de los aislados sobre las semillas de las diferentes especies, Hadley (1970) y Smreciu y Currah (1989) indicaron que ciertas cepas de *Rhizoctonia* son “más activas” y tienen la habilidad de estimular la germinación y el desarrollo de una gran variedad de orquídeas hospederas, que otras. Por otro lado se considera en la literatura que esta capacidad se puede ver limitada por el tiempo de almacenaje o el número de subcultivos (Rasmussen, 1995). Sin embargo, cabe resaltar que el aislado A1 fue obtenido en 1998 y que su efectividad no se vió afectada.

IX. CONCLUSIONES

Se describió por primera vez para la Reserva Ecológica “El Pedregal”, la caracterización morfológica de la simbiosis micorrízica de cinco especies de orquídeas descritas anteriormente. Se observó que las especies del género *Bletia*, presentaron una colonización micorrízica a lo largo y ancho de todo el córtex, mientras que, en *Stenorrhynchos aurantiacus*, se ubicó localizadamente en una zona lateral de las raíces y *Dichromantus cinnabarinus* y *Habenaria novemfida* lo hicieron circularmente en las primeras capas de córtex.

Se aislaron 15 hongos afines al género forma *Rhizoctonia* a partir de explantes de córtex de cuatro de las siete especies estudiadas (*Bletia campanulata*, *B. urbana*, *B. sp.* y *Stenorrhynchos aurantiacus*). Se demostró que el aislamiento de los hongos asociados a las especies del género *Bletia* fueron más fáciles de recrecer en los medios a partir de los explantes. La especie *Dichromantus cinnabarinus* a pesar de presentar pelotones intactos, éstos no recrecieron favorablemente por lo que es posible que se requieran otras condiciones de cultivo u otras etapas fenológicas de la plantra para su aislado.

Se demostró que las especies del mismo género que *Bletia urbana*, *B. campanulata* y *Bletia sp.*, son también especies fotoblásticas. Las especies restantes, *Stenorrhynchos aurantiacus*, *Dichromanthus cinnabarinus* y *Habenaria novemfida* requirieron de condiciones de oscuridad para germinar. No se logró estimular la germinación de *Malaxis myurus* asimbióticamente.

Se demostró la capacidad de promover la germinación y desarrollo de cuatro de estos aislados obtenidos de cada una de estas especies en semillas de las diferentes especies mencionadas. Se encontró que las especies del género *Bletia*, son relativamente fáciles de germinar asimbióticamente, así como simbióticamente, lo que puede estar relacionado a las reservas de su embrión o a estrategias adaptativas.

Algunas de las especies restantes *Dichromantus cinnabarinus* y *Habenaria novemfida* dependieron más que las anteriores de la asociación simbiótica para germinar y en el caso de *Stenorrhynchos aurantiacus*, dependió completamente del hongo para este proceso. La especie *M. myurus*, no se vió favorecida en la germinación por los distintos aislados probados por lo que es posible que se deba inmadurez embrionaria o a que esté en un estado de dormancia.

La germinación de las especies con los aislados demostró ser una prueba adecuada para investigar su capacidad simbiótica. Sin embargo, no demostró ser un mecanismo adecuado para evaluar la capacidad de los aislados en promover el desarrollo posterior de las semillas. Un seguimiento cualitativo de las mismas hasta los 60 días de cultivo *in vitro*, demostró que aún cuando algunos aislados estimularan la germinación, no así el consecutivo desarrollo como en el caso del aislado A3 con *Bletia campanulata*. *Stenorrhynchos aurantiacus* presentó un elevado desarrollo en sólo pocas semillas por lo que la efectividad del aislado no debe ser calificada sólo por el número de semillas que germinaron.

De manera global, se obtuvieron mejores resultados en el desarrollo con los tratamientos simbióticos. Los aislados que promovieron el desarrollo de cinco de siete especies fueron $A5 \geq A1 \approx A4 \geq A3$. El aislado A2 sólo promueve el desarrollo con éxito de las semillas de la misma especie de la que fue obtenido.

Se inició el cepario de hongos micorrízicos orquideoides de esta la Reserva con 106 cultivos provenientes de distintos subcultivos de las 15 cepas aisladas y una anteriormente probada. Este es el primer intento de preservar a los hongos asociados a las orquídeas para este hábitat. Aunado a esto, se inició una base de datos extensa sobre los aislados, su capacidad simbiótica, registro fotográfico, preparaciones de respaldo y datos de germoplasma. Paralelamente, se inició un banco de germoplasma de semillas de orquídeas terrestres del esta reserva con un total de 55 cápsulas de 5 especies.

X LITERATURA CITADA

- Agrios, A. 1997. *Plant pathology*. Academic press. EU.400 Pp.
- Allen, M. F. 1991. *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press. USA.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims y M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. John WileySons, Inc. London, GB. 780 p.
- Álvarez, S. F. J., J. Carabias, J. Meave, P. Moreno-Casasola, DF. Nava, F. Z. Rodríguez, C. G. Tovar y A. Valiente-Banuet. 1982. *Proyecto para la creación de una reserva en el Pedregal de San Ángel*. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 54 p.
- Arditti, J., J. D. Michau y A. P. Oliva. 1981. Seed germination of north American orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera*. *Botanical Gazette* **142** (4): 442-453.
- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons. USA. 691 p.
- Arditti, J. y A. Krikorian. 1996. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society* **122**: 183-241.
- Arditti, J. y A. K. A. Ghani. 2000. Numerical and Physical properties of orchid seeds and their biological implications. Tansley Review No. 110. *New Phytol.* **145**: 367-421.
- Batty A. L., K. W. Dixon, M. Brundrett y K. Sivasithamparam. 2001a. Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered Western Australian terrestrial orchids. *Aust. J. Bot.* **49**: 619-628.
- Batty A. L., K. W. Dixon, M. Brundrett y K. Sivasithamparam. 2001b. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. *New phyto.* **152**: 511-520.
- Burgerff H. 1959. *Mycorrhiza of orchids*. In *The orchids: a scientific survey*, ed. C.L. Withner, Ronald Press, New York.
- Camacho-Salazar, J. G., F. Hernández- Hernández y S. F. Pacheco-Chávez. 1993a. Precipitación pluvial 1963 -1992. *Boletín Meteorológico*, Facultad de Filosofía y Letras, UNAM. México, DF.

Camacho-Salazar, J. G., F. Hernández- Hernández, S. F. y Pacheco-Chávez. 1993b. Temperatura mínima pluvial 1963 -1992. *Boletín Meteorológico*, Facultad de Filosofía y Letras UNAM. México, DF.

Camacho-Salazar, J. G., F. Hernández-Hernández y S. F. Pacheco-Chávez. 1993c. Temperatura máxima 1963-1992. *Boletín Meteorológico*. Facultad de Filosofía y Letras, UNAM. México, DF.

Cano-Santana, Z. y J. C. Meave. 1996. Sucesión primaria en derrames volcánicos: el caso del Xitle. *Ciencias* **41**: 58-68.

Carrillo-Trueba, C. 1995. *El pedregal de San Ángel*. UNAM, México. DF. 50p

Castillo, M. M. 2002. Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* como una estrategia para su reintroducción. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 52 p.

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

Currah, R. S., C. D. Zelmer, S. Hambleton y K. A. Richardson. 1997. Fungi from orchid micorrizas. Pp 117-170. Eds J. Arditti, A. Pridgeon *In: Orchid biology: reviews and perspectives*, VII. Ed. Kluwer Academic Publisher.

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

Dressler, R. L. 1971. Notas sobre *Bletia*. *Orquídea* (Méx.) **1**(7): 9-21

Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 314p.

Espejo, A. S., J.C. García, A. R. F. López, R. M. Jiménez y L. S. Sánchez. 2002. *Orquídeas del estado de morelos*. AMO. México. 100p.

FAO .1996.www.fao.org/FOCUS/S/96/06/04-s 03 de diciembre del 2003.

FAO, 1988. Soil map of the World. Revised Legend. World Soil resources Report 60, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

García, E. 1964. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (daptarlos para a condiciones de la república Mexicana)*. UNAM México. 71p.

Guzman-Plazola, R. y R. Ferrera-Cerrato. 1990. *La edomicorriza vesicular-arbucular en las leguminosas* Colegio de posgraduados, Montecillos, México. 119p.

Hadley, G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* **69**:1015-1023.

Hadley, G. 1982 Orchid mycorrhiza. Pp 83-188. *In: Arditti, J. Orchid biology: reviews and perspectives, II.* Cornell University Press, Ithaca, New York.

Herrera, A. L., y L. L. Almeida. 1994. Relaciones fitogeográficas de la flora vascular de la reserva del Pedregal de San Ángel, México DF. Páginas 83-89. *In: A. Rojo (Comp.), Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo.* UNAM, México. DF.

Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. *El reino de los hongos Micología básica y aplicada.* UNAM y Fondo de Cultura Económica. México. DF. 607 p.

Huynh, T., C. McLean, F. Coates, A. Lawrie. 2003. Peleton morphology of orchid mycorrhizas in the Australian terrestrial orchid *Arachnorchis Formosa* (G. W. Carr) D. L. Jones y M. A. Clem. *In: 4th. International Conference on Mycorrhizae (ICOM).* Pp. 300. Montréal, Canada.

IUCN (International Union in Conservation Nature)/SSS Orchid specialist group. 1996. *Status survey and conservation action plan orchids.* M. A. Pribgeon (comp.), iniciales Haggater and Dumont. 120p.

Janse 1897 *In: Smith, S. E. y D. J. Read. 1997 Mycorrhizal Symbiosis* Academic Press, San Diego California. 605 p.

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

Larsson, R. A. 1988. *Introducción a la floricultura..* Ed. AgT E.U. Carolina del norte. 119-127 p.

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

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

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

Matuda, E. Z. 1970. *Las orquídeas del estado de México.* Dirección de agricultura y ganadería del estado. México. 35 p.

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

NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.

Mukerji, K. G., B. D. Chamola y S. Jagjit. 2000. *Mycorrhizal Biology*. Academic/Plenum. London.

Munsell. Soil color carts. 1994. Macbeth Division.

Oliva, P. A. y J. Arditti. 1984. Seed germination of North American orchids. II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes*. *Botanical Gazette* **145** (4): 495-501.

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

Ortega-Larrocea, M. P., S. Luna-Rosales, V. M. Chávez. Symbiotic development of *Bletia urbana* (Orchidaceae) *in vitro*. En prep.

Ortega-Larrocea, M. P., D. González, V. M. Chávez, A. Martínez. Reintroduction of symbiotic *Bletia urbana* (Orchidaceae) into their natural environment. En prep

Otero, J. T., J. D. Ackerman, y P. Bayman. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia* - like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* **89**(11): 1852-1858.

Peña, M. 1990. *Orchidaceae*. Pp 86-95 *In: J. Rzedowski, W. Rzedowski. Flora fanerogamica del valle de México, Vol. III Monocotiledoneas*. Instituto de ecología. UNAM. México DF.

Peterson, L. R., P. Bonfante, A. Faccio y Y. Uetake. 1996. The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells. *Can. J. Bot.* **74**: 1861-1870.

Pritchard, H. W. 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana* **14**: 89-104.

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

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

- Rasmussen, H. N. 1993. Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *Am.J.Bot.* **80** (12): 1374-1378.
- Rasmussen, H. N. 1992. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiol. Plant.* **86**: 161-167.
- Rasmussen, H. N. 1995. *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press. Cambridge, G B. Pp. 444.
- Rasmussen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant & soil* **244**: 149-163.
- Read, D. J., D.H. Lewis., A. H. Fitter, y I.J. Alexander. 1992. Mycorrhizas in ecosystems. CAB international. USA. 250Pp.
- Reyes, T. C. 1973. El fenómeno de la micorriza. *Orquídea (México)* **3**(9):281-291.
- Rico, L. 2002. Reales jardines botánicos de Kew. *Ciencias* **68**: 42-45.
- Rojo, A. (comp.) 1994. Reserva ecológica "El Pedregal" de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo. UNAM. México. 410 p.
- Rubluo, A., V. Chávez y A. Martínez. 1989. *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana* **4** (2): 68-73.
- Rubluo, A., V. Chávez, A. P. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation* **63**: 163-169.
- Rzedowski, J. 1954. *Vegetación del pedregal de San Angel, D. F.* An. Esc. Nac. Cienc. Biol. México. 124 p.
- Rzedowski, J. 1994. Vegetación del Pedregal de San Ángel (Distrito Federal, México). Pp 9-65 In: A. Rojo (Comp.) *Reserva ecológica "El Pedregal" de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo*.
- Smith, S. E. y D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis* Academic Press, San Diego California. 605 p.
- Smreciu, E. A. y R. S. Currah. 1989. Symbiotic germination of seeds de terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana* **4** (1): 6-15.
- Sosa, V. 1992. Neotipificación de tres especies del genero *Bletia* (Orchidaceae). *Acta botánica Mexicana* **18**:71-79

Soto, M. A. 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea* (Méx.) **11**: 233-277.

Soto, M. A. y E. Hágsater. 1990. Algunas ideas acerca de la conservación de las orquídeas mexicanas y un listado preliminar de las taxa amenazados. Pp.: 155-172 In: J. L. Carrillo, R. Fermín y A. Rivera (comp.), *Áreas naturales protegidas en México y especies en extinción*. Proyecto Conservación y mejoramiento del ambiente (CyMA), primera edición, UNAM, México, DF.

Téllez, V. A. 2002. The Pedregal of San Ángel and its orchids. *The Orchid Journal of the Royal Horticultural society* **110** (1242): 25-2.

Ulloa M., R. T. Hanlin. 2001. *Illustrated Dictionary of Mycology*. APS Press, Minesota, USA. 448 p.

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

Warcup, J. H. y P. H. B. Talbot. 1967. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. *New Phytol* **66**: 631-641.

Wells, T. C. E. y J. H. Willems. 1991. Population ecology of terrestrial orchids. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands. 189 p.

Yoder, J. A., L. W. Zettler y S. L. Stewart. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science* **156**: 145-150.

Zelmer, C. D. y R. S. Currah. 1995. *Ceratorhiza pernacatena* and *Ephuloriza calendulina* spp. nov.: mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. *Can. J. Bot.* **73**: 862-866.

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

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

Zettler, L. W y C. J. Hofer. 1997. Sensitivity of *Spiranthes odorata* seeds to light during *in vitro* simbiotic seed germination. *Lindleyana* **12** (1): 26-29.

Zettler, L. W; Delaney, J. A. Sunley. 1998. Seed propagation of the epiphytic green-fly orchid *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. *Selbyana* **19**(2): 249-253.

ANEXO 1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES.

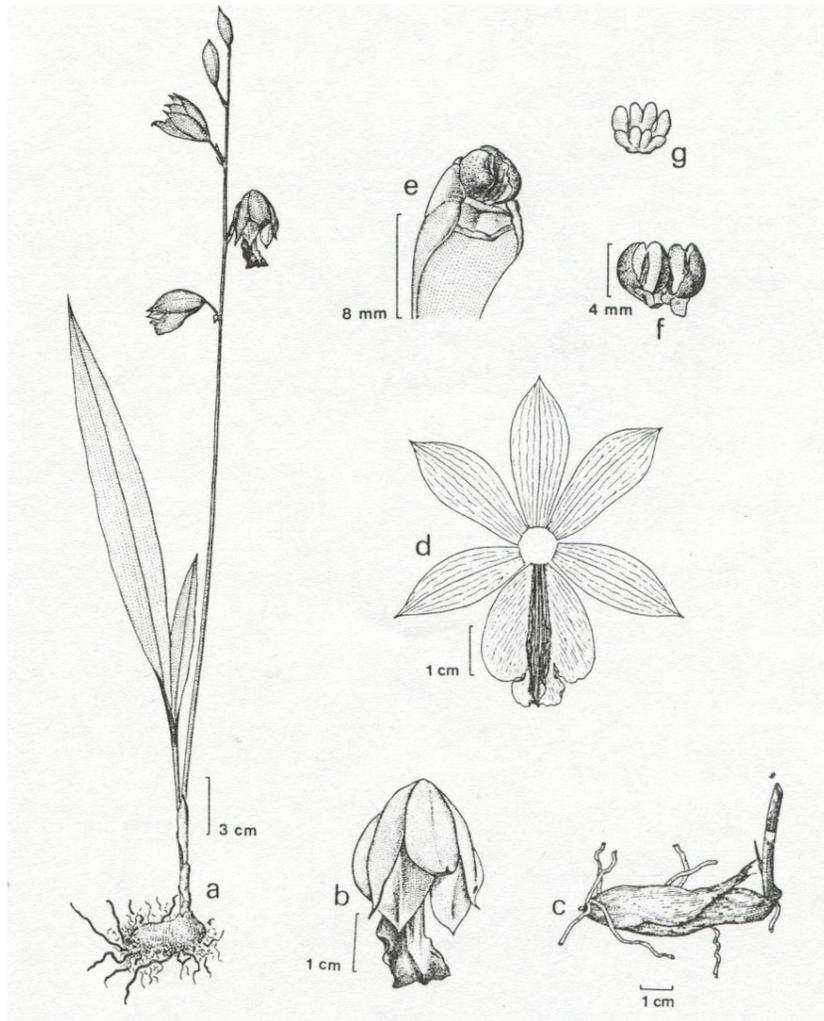


Figura 11. *Bletia campanulata* (Sosa, 1992).

***Bletia campanulata* Llave & Lex (Peña, 1990).**

Planta herbácea, terrestre, de 50 a 70 cm de alto; cormos subterráneos horizontales, fusiformes, de unos 2 cm de largo por 1 cm de ancho, con raíces fibrosas; hojas 2 a 3, presentes en la época de floración, lanceoladas, de 20 a 40 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, acuminadas, con apariencia plegada; inflorescencias en forma de racimo, con (1) 3 a 4 flores horizontales sobre el pedúnculo, vistosas, de color rosa-púrpura con blanco, acampanadas, cerradas por los sépalos; bráctea floral lanceolado-ovada, acuminada, de 1.2 a 1.8 cm de largo; ovario pedicelo de 2 a 3 cm de largo; sépalo dorsal elíptico, gradualmente acuminado, de 2.8 a 3.5 cm de largo por 0.7 a 1 cm de ancho, los laterales semejantes al dorsal; pétalos elíptico-ovados, de 2.7 a 3.7 cm de largo por 1 a 1.2 cm de ancho; labelo obovado, redondeado en la base, trilobado (a subentero), de (2.7) 3 a 3.5 cm de largo por alrededor de 2.5 cm de ancho, lóbulo medio de color púrpura con venas oscuras, oblongo, subtruncado, retuso, por lo común con un apículo central, lóbulos laterales amplios, erectos, envolviendo a la columna, disco con 5 lamelas longitudinales; columna ligeramente arqueada, de 2.2 a 2.4 cm de largo, erecta sobre pedicelo algo ascendente. Occidente centro de México a Argentina (cuadro 4).

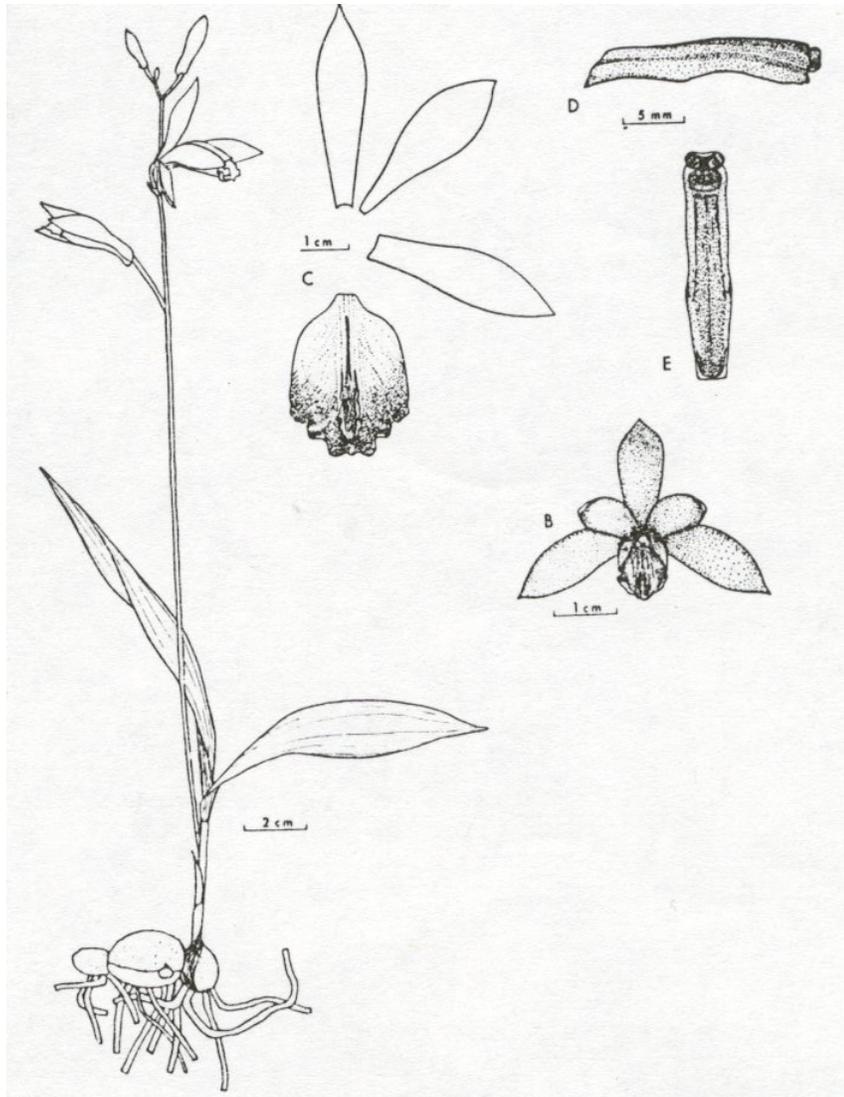


Figura 12. *Bletia urbana* (Dressler, 1971)

***Bletia urbana* Dressler (Peña, 1990).**

Planta, terrestre, hasta de 40 (60) cm de altura; cormos subterráneos, sudglobosos, de unos 3 cm de largo por unos 2 cm de ancho, con raíces fibrosas; hojas 1 a 3, linear-lanceoladas, de 30 a 55 cm de largo por (1) 1.5 a 3 cm de ancho, acuminadas, con apariencia de plegadas; inflorescencia en forma de racimo con (3) 5 a 6 flores más bien grandes, vistosas, color de rosa a morado con blanco y/o amarillo; bráctea floral subulada, de 5 a 11 mm de largo por unos 3 mm de ancho; ovario pedicelo de 1 a 2 cm de largo; sépalo dorsal oblongo, de 2.5 a 3 cm de largo por 6 a 7 mm de ancho, agudo, los laterales semejantes al dorsal aunque un poco más cortos y anchos; pétalos elípticos, de 2.4 a 2.7 cm de largo y 7 a 10 mm de ancho, subagudos; labelo sudentero, oblongo-sudcuadrado, de 2.4 a 2.6 cm de largo por alrededor de 2 cm de ancho, rizado hacia el ápice, ligeramente retuso, disco con 5 lamelas; columna de más o menos 1.8 cm. de largo, algo alada cerca de la base, arqueada hacia el ápice. Pedregal de San Ángel y del estado de Oaxaca (Cuadro 4).



Figura 13. *Dichromanthus cinnabarinus* (Matuda, 1970).

***Dichromanthus cinnabarinus* La llave & Lexarza (Peña, 1990).**

Hierba perenne, pubescente hacia la parte superior, hasta 1m de alto; raíces fasciculadas, carnosas, de 2 a 11 (15) cm de largo por 1 cm de diámetro; hojas inferiores conduplicadas, las mayores (3 a 6) se sitúan más o menos a la mitad del largo, oblanceoladas a linear-lanceoladas, de 10 a 20 cm de largo por 1.5 a 3 (4) cm de ancho, agudas a cortamente acuminadas; escapo floral cubierto por vainas de 3 a 7 cm de largo, agudas a prominentemente acuminadas; inflorescencia en forma de espiga muy densa, de 4 a 8 (16) cm de largo y 3 a 4 (6) cm de diámetro, angostándose hacia la punta; bráctea floral ovada a lanceolada, de 1 a 3 cm de largo por 5 a 10 mm de ancho, aguda a acuminada, de color anaranjado, al igual que las flores que son tubulares; sépalos y pétalos densamente papilosos, los sépalos pubescentes por lo menos cerca de la base, sépalo dorsal lanceolado- acuminado, de 1.5 a 2.5 cm de largo por 2 a 3 mm de ancho, sépalos laterales oblicuamente lanceolados, de 1.2 a 2.5 cm de largo por 2 a 3 mm de ancho, agudos; pétalos linear-lanceolados, falcados, de 1.2 a 2.2 cm de largo por alrededor de 2.5 mm de ancho; labelo sésil, obovado-lanceolado o elíptico-lanceolado, largamente acuminado hacia el ápice, de 1.2 a 1.5 cm de largo por 3 a 6 mm de ancho; columna gruesa, de alrededor de 1 cm. de largo incluyendo el esbelto rostelo. Del oeste de Texas a través de México hasta Guatemala (Cuadro 4).

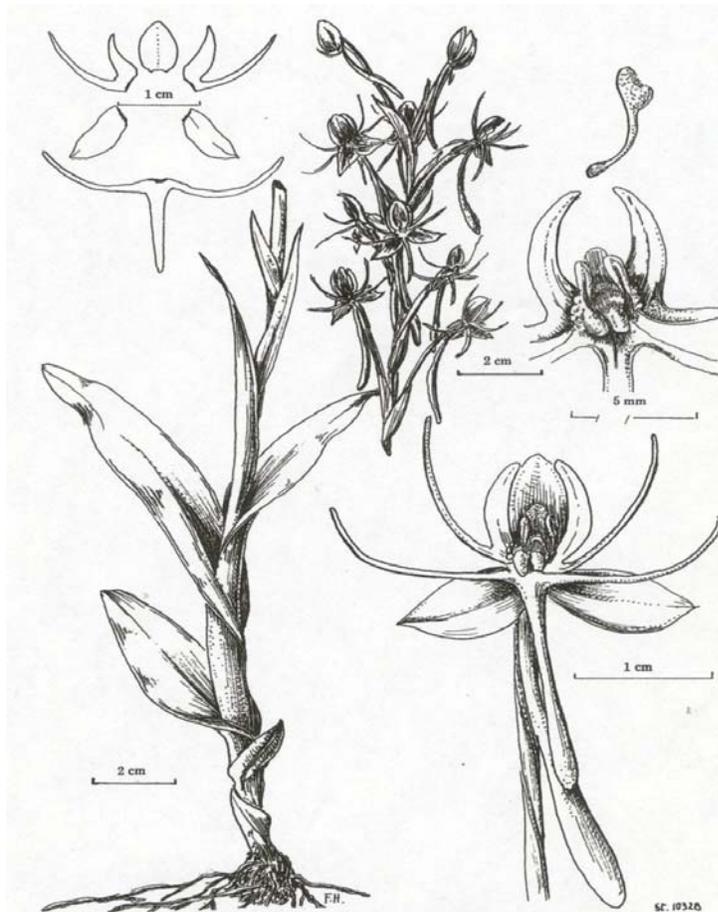


Figura 14. *Habenaria novemfida* .

***Habenaria novemfida* Lindl. (*H. diffusa* Rich. & Gal.) (Peña, 1990).**

Planta herbácea perenne, terrestre, de 25 a 40 (75) cm de alto, partes subterráneas con un pequeño tubérculo, raíces fibrosas; tallo con frecuencia desprovisto de hojas en la porción inferior, representadas por vainas envolventes; hoja estrechamente ovadas o elípticas o linear-lanceoladas, de (3) 6 a 12 (14) cm de largo por (1.5) 2 a 4 cm de ancho, agudas o acuminadas; inflorescencia de (6) 10 a 15 (20) cm de largo, laxa o densa; bráctea floral lanceolada - acuminada, de 1 a 3 cm de largo; ovario pedicelado de 1.5 a 2.5 cm de largo; sépalos verdes o amarillo - verdosos, dorsalmente carinados, el dorsal ovado - elíptico, a suborbicular, de 4.5 a 7mm de largo por 4 a 5 mm de ancho, sudagudo, sépalos laterales oblicuamente ovado - elípticos a oblongos, de 7 a 10 mm de largo por 3 a 3.5 mm de ancho, sudagudos a apiculados; pétalos y labelo de color crema; pétalos bipartidos, el lóbulo posterior (superior) linear u oblongo, falcado, de 4 a 6 mm de largo por 1 a 2 mm de ancho en la base, lóbulo anterior (inferior) divergente, curvado, linear o filiforme, de 7 a 10 mm de largo; labelo tripartido casi desde su base, lóbulo medio linear, de 6 a 11 mm de largo por alrededor de 1 mm de ancho, lóbulos laterales divergentes, curvados, de 11 a 15 mm de largo, filiformes o estrechamente lineares, por lo general un poco más largos y anchos que el lóbulo medio, espolón recurvado, linear, de 2 a 3 cm de largo, dilatado hacia el ápice, obtuso; columna de 2.5 a 3 mm de largo. Baja California a Veracruz y Costa rica (Cuadro 4).

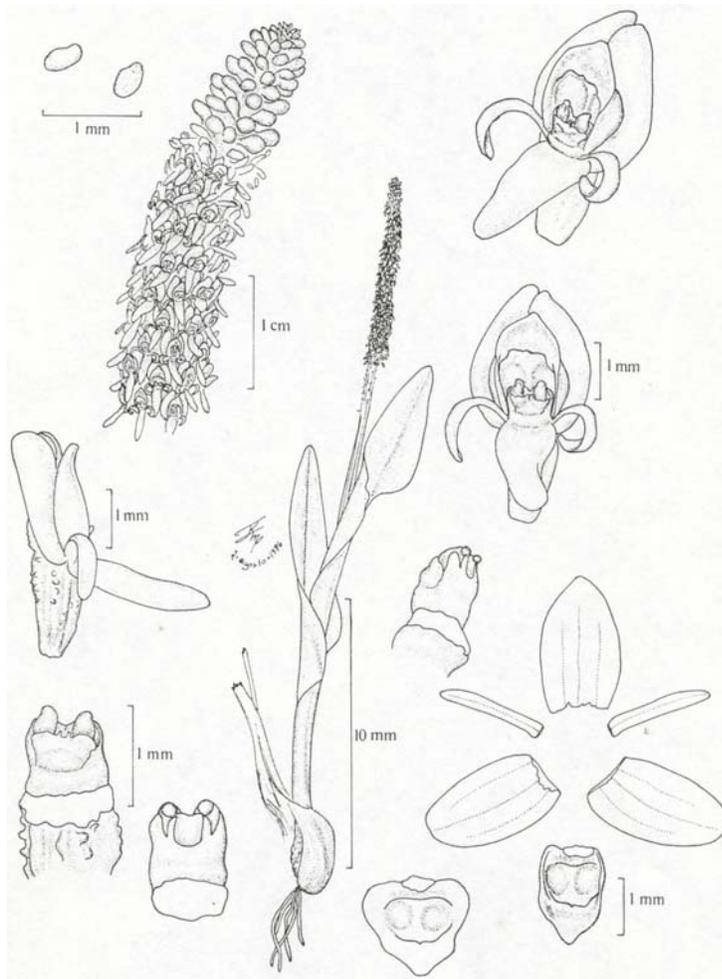


Fig.ura15. *Malaxis myurus* (Espejo et al., 2002).

***Malaxis myurus* (Lindl.) Kuntze (*Microstylis myurus* Reichb. f.) (Peña, 1990).**

Hierba terrestre, perenne, de 15 a 50 cm de alto; partes subterráneas bulbosas, de unos 2 a 3 cm de largo por 1.5 a 2 cm de ancho; tallo generalmente con 2 vainas tubulosas de 3 a 9 cm de largo; hojas en número de 2, expandidas aproximadamente a la mitad del largo del tallo, lámina estrechamente elíptica a ovada, de 6 a 10 (15) cm de largo por 2 a 3.5 (5) cm de ancho, obtusa a sudaguda; inflorescencia en espiga larga y densa, de 5 a 20 cm de largo por 5 a 8 (10) mm de ancho con numerosas flores pequeñas; bráctea floral ampliamente triangular, de +/- 1 mm de largo; ovario pedicelado papiloso o equinado, de 2 a 3 mm de largo, flores verdosas o verde - amarillentas; sépalo dorsal triangular, de 2 a 3 mm de largo por alrededor de 1.5 mm de ancho en la base, sépalos laterales erectos por detrás del labelo, oblongo-falcado, de unos 2.5 mm de largo; pétalos filiformes, de 1.5 a 2 mm de largo, curvados; labelo ovado a suborbicular, de alrededor de 2mm de largo, ápice redondeado con una corta proyección deltoide, disco con 2 excavaciones laterales separadas por un engrosamiento medio; columna de 0.5 mm de ancho; cápsula elipsoide, papilosa o equinada, de 4 a 6 mm de largo por 3 a 4 mm de grueso. Chihuahua al DF y Oaxaca (Cuadro 4).

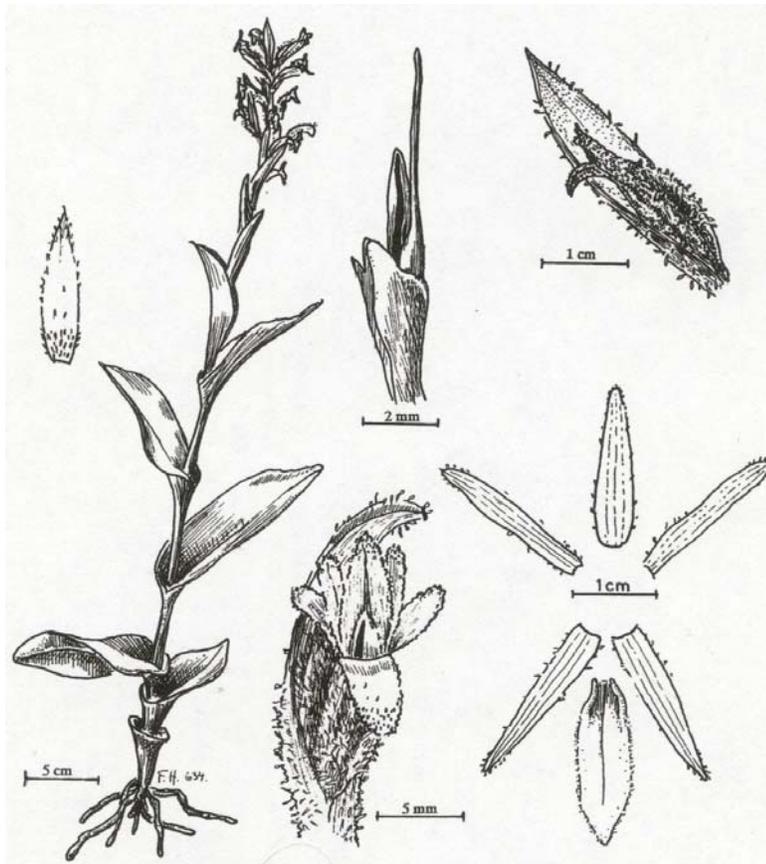


Figura 16. *Stenorrhynchos aurantiacus*.

***Stenorrhynchos auratiacus* La llave & Lexarza (Peña, 1990).**

Planta herbácea perenne, densamente pilosa en la parte superior, ennegreciéndose al secar, hasta de 1 mm de alto; raíces abundantes, fasciculadas, algo carnosas, de unos 5 cm. de largo y +/- 1 cm de ancho; tallos erguidos con hojas alternas a todo su largo, convirtiéndose en vaina hacia el escapo floral, lámina orbicular-ovada a oblongo-lanceolada, de 7 a 25 cm de largo por 4 a 8.5 de ancho, subobtusa a aguda, margen ondulado; inflorescencia en forma de espiga densa hasta de 25 cm de largo, con pocas a 20 flores; bráctea floral vistosa, de color naranja a amarillo, a veces verdoso, de 3 a 6 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, a veces hasta del doble del largo de la flor y cubriéndola en una buena parte; ovario casi sésil, pubescente, de color naranja o rojo-anaranjado, tubulosa, de 2.5 a 3 cm de largo; sépalos de 2 a 2.5 cm de largo por 5 a 7 mm de ancho, el dorsal oblongo a lanceolado, con duplicado, en la base, con sus márgenes adherentes a los pétalos de la mitad hacia al ápice, sépalos laterales libres, oblongo-lanceolados; pétalos oblicuamente linear-oblongos, de 2 a 2.5 cm de largo por 3 a 4 mm de ancho, obtusos a subagudos, recurvados; labelo ovado-lanceolado, obtuso y recurvado en el ápice, lámina de 1.5 a 2 cm de largo y 6 a 9 mm de ancho cerca de la base, que es adherente a la columna y que se estrecha en una parte basal libre de 7 a 8 mm de largo, disco con 2 callosidades cerca de la base; columna claviforme, de alrededor de 1 cm de largo; cápsula ampliamente elipsoide a subglobosa, de 1.5 cm de largo por 1 a 1.2 cm de ancho. Chihuahua a Nuevo León y hacia el sur hasta Centroamérica (Cuadro 4).

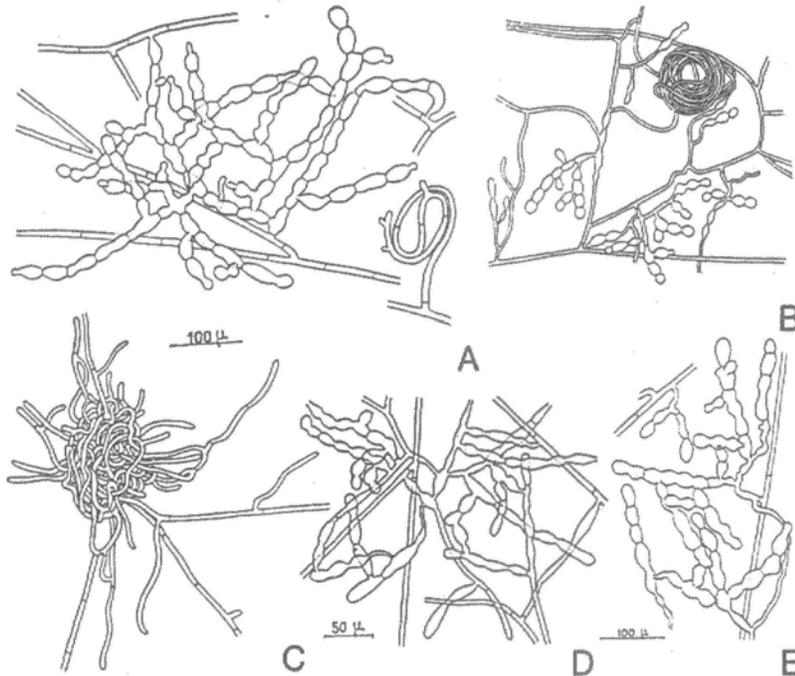


Figura 17. Células monilioides características de *Rhizoctonia* spp. (Arditti, 1992)

***Rhizoctonia* (Alexopoulos et. al., 1996; Currah, 1997)**

Rhizoctonia es un género forma de basidiomicetes del suelo causantes de enfermedades en diferentes plantas. El género está relacionado con teleomorfismos discomicetes y basidimicetes, siendo la forma patógena la basidimicetes, la cual tiene compartimentos hifales multinucleados. Un gran número de especies pertenecientes a este género se ha asociado a la formación de micorrizas con orquídeas las cuales tienen a estos hongos como simbioses. Forman una estructura característica de la simbiosis que son los pelotones. Este género presenta problemas taxonómicos y varios han sido los sistemas para clasificar a este grupo. El primero se basa en determinar si ocurre anastomosis hifal entre ellos; otro sistema incluye otros criterios como morfología y patogenicidad para así incluirlos en un subgrupo llamado grupo interespecífico (ISG), los cuales podrían dar idea de especies individuales identificando 25 ISG dentro de *Rhizoctonia solani*. Los micelios de colonias estériles son blancos a café claros, con vellosidades o lisos, desprovistas de conectores de septos y muestran constricciones en los brazos. Todos los que forman pelotones son basidiomicetes y tiene pocas conexiones entre los septos. La ultraestructura hifal es usada para distinguir a este grupo basada en el doliporo que tienen en cada septo, el cual parece una unión entre ellos. Entre los hongos formadores de pelotones endófitos, existen dos grupos: imperforados y perforados. Las células monilioides son comunes en estos hongos y sus características pueden usarse para limitar el taxa. Estas estructuras son células hinchadas, de cuerpo esférico y elipsoidal, formando cadenas de vinculación de una célula a la siguiente siendo estructuras de proliferación desde jóvenes. Su forma y tamaño son de considerable valor taxonómico.

ANEXO 2. BASE DE DATOS DEL CEPARIO

Anexo 2. Base de datos del cepario de hongos micorrízicos aislados en este trabajo y depositados en la Colección del Laboratorio de Microcosmos del Instituto de Geología, UNAM.

Clave en el cepario	Planta de origen	Coordenadas GPS (UTM)	Altura (msnm)	Descripción de la raíz	Método de aislamiento	Clave en el subcultivo
MCCQ0021,21' MCCQ0001,1'	<i>Bletia campanulata</i>	14479718E;2136049N	2 324 m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV001-6 MRV001-6/1 MRV001-6/1-1
MCCQ0022,22' MCCQ0002,2'	<i>Bletia campanulata</i>	14479718E;2136049N	2 324 m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV001-10 MRV001-10/1 MRV001-10/1-1
MCCQ0023,23' MCCQ0003,3'	<i>Bletia campanulata</i>	14479718E;2136049N	2 324m	Delgada fácil observación de los pelotones	por explante	MRV001-12 MRV001-12/1 MRV001-12/2
MCCQ0004,4' MCCQ0005,5'	<i>Bletia urbana</i>	14479647E;2136003N	2 323m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV006-3 MRV006-3/1 MRV006-3/1-1 MRV006-3/1-1'
MCCQ0006,6'	<i>Bletia urbana</i>	14479647E;2136003N	2 323 m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV006-7 MRV006-7/1
MCCQ0024,24' MCCQ0007,7'	<i>Bletia urbana</i>	14479647E;2136003N	2 323 m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV006-10 MRV006-10/1 MRV006-10/1-1
MCCQ0025,25' MCCQ0026,26' MCCQ0008,8'	<i>Bletia urbana</i>	14479647E;2136003N	2 323m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV006-11 MRV006-11/1 MRV006-11/2 MRV006-11/1'
MCCQ0009,9' MCCQ0027,27'	<i>Bletia urbana</i>	14479671E;2135981N	2 319m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV008-2 MRV008-2/1 MRV008-2/2 MRV008-2/1-1
MCCQ0010,10' MCCQ0011,11'	<i>Bletia urbana</i>	14479671E;2135981N	2 319 m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV008-8 MRV008-8/1
MCCQ0012,12'	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E;2136402N	2 324 m	Gruesa, los pelotones sólo se ven en una parte de la raíz	por explante	MRV016-2 MRV016-2/1
	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E;2136402N	2 324 m	Gruesa, los pelotones sólo se ven en una parte de la raíz	por explante	MRV016-3 MRV016-3/1 MRV016-3/1-1
MCQ0013,13' MCQ00128,28'	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E;2136402N	2 324 m	Gruesa, los pelotones sólo se ven en una parte de la raíz	por explante	MRV016-1 MRV016-1/1 MRV016-1 (A2O) A2M1

Textura y crecimiento	Color de la cepa en crecimiento	Color de la cepa madura	Preparaciones (PVLG)	Subcultivos	Fechas de subcultivo	Fecha de ingreso al cepario	Probados
Lustrosa	2.5Y 8/1 blanco	2.5Y 7/3 amarillo pálido	4	origen (MAF-PDA)	210802	muy seca	no
				1er. (PDA 2)	130103	190503 -2 tubos	no
				2do. (PDA 3)	30303	140503 - 2tubos	no
Lustrosa	2.5Y 8/1 blanco	2.5Y 7/3 amarillo pálido	2	origen	310802	muy seca	no
				1er. (PDA 2)	130103	190503	no
				2do. (PDA 3)	30303	140503	no
Lustrosa	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2.5Y 7/3 amarillo pálido	1	origen	210802	muy seca	no
				1er. (PDA 2)	130103	190503	no
				2do. (PDA 3)	30303	140503	no
Algodonosa en el centro	2.5Y 8/1 blanco	2.5Y 8/3 amarillo pálido	3	origen	210802	muy seca	no
				1er. (PDA 2)	130103	contaminada	no
				2do. (PDA 3)	30303	140503	no
Lustrosa	2.5Y 8/3 amarillo pálido	2.5Y 7/4 amarillo pálido	2	origen	310803	contaminada extraviada	no
				1er. (PDA 2)	130103	140503	no
				origen	210802	muy seca contaminada	no
Algodonosa en el centro	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2.5Y 7/3 amarillo pálido	no	1er. (PDA 2)	130103	190503	no
				2do. (PDA 3)	30303	140503	no
				origen	210802	muy seca contaminada	no
Lustrosa con costras	2.5Y 7/3 amarillo pálido	2.5Y 8/1 blanco	1	origen	210802	muy seca	no
				1er. (PDA 2)	130103	190503	no
				1er. (PDA 2)	130103	190503	no
Lustrosa	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2.5Y 7/3 amarillo pálido	2	2do. (PDA 3)	30303	140503	no
				origen	310802	contaminada perdida	no
				1er. (PDA 2)	210902	muy seca	no
Lustrosa	2.5Y 8/3 amarillo pálido	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2	1er. (PDA 2)	130103	140503	no
				1er. (PDA 2)	130103	140503	no
				2do. (PDA 3)	210902- 130103	190503	no
Lustrosa	2.5Y 8/4 amarillo pálido	2.5Y 8/1 blanco	4	origen	70902	140503	no
Algodonoso	2.5Y 8/4 amarillo pálido	2.5Y 8/1 blanco	4	1er. (PDA 2)	130103	contaminada	no
				origen	70902	muy seca	no
				1er. (PDA 2)	130103	140503	no
Concéntrico, algodonosa	2.5Y 8/1 blanco	2.5Y 8/2 amarillo pálido	5	2do. (PDA 3)	130303	contaminada	no
				origen	70902	muy seca	no
				1er. (PDA 2)	130103	contaminada	no
				1er. (PDA 2)	130303	140503	
				1er. (PDA 2)	240303	190503	

Clave en el cepario	Planta de origen	Coordenadas GPS (UTM)	Altura (msnm)	Descripción de la raíz	Método de aislamiento	Clave en el subcultivo
MCCQ0029,29´						A2M1´
MCCQ0030,30´						A2M1"
MCCQ0045,45´						A2 Sa
MCCQ0014,14´						MRV005-5 (A3O)
MCCQ0031,31´						A3MO
MCCQ0032,32´						A3M1
MCCQ0033,33´						A3M1´
MCCQ0034,34´						A3M1"
MCCQ0015,15´	<i>Bletia sp.</i>	14479736E;2136043	2 297 m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV013 (A4O)
MCCQ0035,35´						A4M1
MCCQ0036,36´						A4M1´
MCCQ0037,37´						A4M1"
MCCQ0046,46´						A4 Sa
MCCQ0047,47´						A4 Bsp
MCCQ0048,48´						A4 Bu
MCCQ0049,49´						A4 Bc
MCCQ0016,16´	<i>Bletia urbana</i>	14479671E;2135981N	2 319 m	Delgada, fácil observación de los pelotones	por explante	MRV008-4=A5
MCCQ0038,38´						MRV008-4 (A5O)
MCCQ0039,39´						A5M1
MCCQ0040,40´						A5M2
MCCQ0041,41´						A5M2´
MCCQ0050,50´						A5M2"
MCCQ0051,51´						A5 HN
MCCQ0052,52´						A5 Sa
MCCQ0053,53´						A5 Bsp
MCCQ0054,54´						A5 Bu
MCCQ0017,17´	<i>Bletia urbana</i>	Ortega et al. 1999				A5 Bc
MCCQ0042,42´						Rsp M4+2 (A1O)
MCCQ0043,43´						A1M1
MCCQ0044,44´						A1M1´
MCCQ0055,55´						A1M1"
MCCQ0056,56´						A1HN
MCCQ0057,57´						A1 Bsp
MCCQ0058,58´						A1Bc
MCCQ0018,18´	<i>Bletia urbana</i>	Ortega et al. 1999			Pelotones	A1Bu
MCCQ0019,19´	<i>Bletia urbana</i>	Ortega et al. 1999			Pelotones	Rsp MBA M4+2-1
MCCQ0020,20´	<i>Bletia urbana</i>	Ortega et al. 1999			Pelotones	Rsp MBA M1+ 5-1
					Pelotones	Rsp MBA M1+ 5-2

Textura y crecimiento	Color de la cepa en crecimiento	Color de la cepa madura	Preparaciones (PVLG)	Subcultivos	Fechas de subcultivo	Fecha de ingreso al cepario	Probados
					310303	190503	
					110403	190503	
					40403MBA	50603	<i>S. aurantiacus</i>
					310103	140503	
					30303	190503	
					310303(MBA)	190503	
					110403	190503	
Algodonosa en el centro	2.5Y 8/1 blanco	2.5Y 8/3 amarillo pálido	2	origen	30303	140503	
					240303	190503	
					310303	190503	
					110403	190503	
					040403 BMA	50603	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>
					230403 MBA	50603	<i>Bletia sp.</i>
					230403 MBA	50603	<i>Bletia urbana</i>
					250403 MBA	50603	<i>Bletia campanulata</i>
Algodonosa en el centro	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2.5Y 8/2 amarillo pálido	4	origen	310802	muy seca	
					130103	140503	
					30303	190503	
					240303	190503	
					310303	190503	
					110403	190503	
					040403 MBA	50603	<i>Habenaria novemfida</i>
					040403 MBA	50603	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>
					230403 MBA	50603	<i>Bletia sp.</i>
					230403 MBA	50603	<i>Bletia urbana</i>
					250403 MBA	50603	<i>Bletia campanulata</i>
Lustrosa con costras	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2.5Y 7/4 amarillo pálido	no	origen 1°	240103	140503	
					240303	190503	
					310303(MBA)	190503	
					110403	190503	
					040403 MBA	50603	<i>Habenaria novemfida</i>
					230403 MBA	50603	<i>Bletia sp.</i>
					230403 MBA	50603	<i>Bletia urbana</i>
					230403 MBA	50603	<i>Bletia campanulata</i>
Lustrosa con costras	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2.5Y 7/4 amarillo pálido	no		Rsp MBA	140503	<i>Bletia urbana</i>
Lustrosa con costras	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2.5Y 7/4 amarillo pálido	no		M4+2-1		
					Rsp MBA M1+5-1	140503	<i>Bletia urbana</i>
Lustrosa con costras	2.5Y 8/2 amarillo pálido	2.5Y 7/4 amarillo pálido	no		Rsp MBA M1+5-2	140503	<i>Bletia urbana</i>

ANEXO 3. BASE DE DATOS DEL BANCO DE GERMOPLASMA

CLAVE	Especie	Coordenadas GPS (UTM)	Altura (msnm)	Asociación	Fecha de recolecta (cápsulas)	No. de cápsulas recolectadas
MRV001	<i>Bletia campanulata</i>	14479718E; 2136049N	2324	Pasto	25/11/2002	3
MRV001-2	<i>Bletia campanulata</i>	14479718E; 2136049N	2324	Pasto	25/11/2002	1
MRV002	<i>Spiranthes</i> sp.	14479654E; 2136049N	2322	Nopal, crasulaceas y malezas	-	no
MRV003	<i>Spiranthes</i> sp.	14479654E; 2136049N	2322	Nopal, crasulaceas y malezas	-	no
MRV004	<i>Spiranthes</i> sp.	14479612E; 2135960N	2324	Trébol	-	no
MRV005	<i>Bletia campanulata</i>	14479634E; 2135960N	2320	Crasulaceas	25/11/2002	3
MRV005-2	<i>Bletia campanulata</i>	14479634E; 2135960N	2320	Crasulaceas	15/11/2002	2
MRV006	<i>Bletia urbana</i>	14479647E; 2136003N	2323	Pastos secos	25/11/2002	6
MRV007	<i>Bletia campanulata</i>	14479655E; 2135987N	2320	Pastos secos y musgo	15/11/2002	4
MRV007-2	<i>Bletia campanulata</i>	14479655E; 2135987N	2320	Pastos secos y musgo	2 8/11/2002	2
MRV008	<i>Bletia urbana</i>	14479671E; 2135981N	2319	Mulenbergia	-	no
MRV009	<i>Spiranthes</i> sp.	14479784E; 2136095N	2321	Pastos	-	no
MRV010	<i>Habenaria</i> sp.	14479784E; 2136095N	2321	Planta anuales	-	no
MRV011	<i>Habenaria novemfida</i>	14479784E; 2136095N	2321	Plantas anuales, pasto	08/11/2002	18
MRV012-1	<i>Malaxis myurus</i>	14479784E; 2136095N	2321	Cerca de <i>Habenaria novemfida</i>	08/11/2002	4
MRV012-2	<i>Malaxis myurus</i>	14479784E; 2136095N	2321	Pastos	15/11/2002	3
MRV013	<i>Bletia</i> sp.	14479736E; 2136043N	2297	Pastos	25/11/2002	2
MRV014-1	<i>Bletia campanulata</i>	14479736E; 2136043N	2297	Pastos	25/11/2002	2
MRV014-2	<i>Bletia campanulata</i>	14479736E; 2136043N	2297	Pastos	25/11/2002	1
MRV014-3	<i>Bletia campanulata</i>	14479736E; 2136043N	2297	Pastos	25/11/2002	1
MRV015-1	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	15/11/2002	inflorescencia
MRV015-2	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	15/11/2002	inflorescencia
MRV015-3	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	15/11/2002	inflorescencia
MRV015-4	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	15/11/2002	inflorescencia
MRV015-5	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	16/11/2002	inflorescencia
MRV015-6	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	15/11/2002	inflorescencia
MRV015-7	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	15/11/2002	inflorescencia
MRV015-8	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	15/11/2002	inflorescencia
MRV015-9	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14480763E; 2136767N	2302	Pasto y gramíneas	15/11/2002	inflorescencia
MRVO16-1	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E; 2136402N	2324	Pastos y en roca	25/11/2002	6
MRVO16-2	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E; 2136402N	2324	Pastos y en roca	25/11/2002	9
MRVO16-3	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E; 2136402N	2324	pastos y en roca	25/11/2002	3
MRVO16-4	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E; 2136402N	2324	Pastos y en roca	25/11/2002	4
MRVO16-5	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E; 2136402N	2324	Pastos y en roca	-	no
MRVO16-6	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E; 2136402N	2324	Pastos y en roca	25/11/2002	15
MRVO16-7	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	14479825E; 2136402N	2324	Pastos y en roca	-	no
MRV017	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	14481002E; 2135256N	2230	Pasto y gramíneas	-	no

