



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Geología

Alternativas simbióticas y asimbióticas de  
conservación (micropropagación y  
reintroducción) de *Dichromanthus aurantiacus*  
(Orchidaceae), como especie modelo en la  
Reserva Ecológica El Pedregal de San Ángel

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

**IRIS SUÁREZ QUIJADA**

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

MÉXICO, D.F.

MAYO 2010



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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de febrero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **SUÁREZ QUIJADA IRIS** con número de cuenta **098173642** con la tesis titulada **"ALTERNATIVAS SIMBIÓTICAS Y ASIMBIÓTICAS DE CONSERVACIÓN (MICROPROPAGACIÓN Y REINTRODUCCIÓN) DE *Dichromanthus aurantiacus* (ORCHIDACEAE) COMO ESPECIE MODELO EN LA RESERVA ECOLÓGICA EL PEDREGAL DE SAN ÁNGEL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA**:

Presidente: DR. MARTÍN MATA ROSAS  
Vocal: DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA  
Secretario: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA  
Suplente: DR. ALEJANDRO MARTÍNEZ PALACIOS  
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de abril de 2010.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por brindarme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente con una educación de calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mi más profundo agradecimiento por la beca otorgada N° 207144, que hizo posible la realización de mis estudios de Maestría.

Esta tesis contó con el financiamiento de los proyectos PAPIIT IN230507 e IN119609 Calidad de micrositio edáfico con relación a la distribución de simbiontes micorrízicos en un matorral xerófito (REPSA).

A la Maestría en Restauración Ecológica (Biología Ambiental) de la UNAM y a la Fundación Packard, por el financiamiento otorgado para la adquisición de equipo de campo para esta tesis.

Al Instituto de Geología de la UNAM, por la beca interna proporcionada para finalizar el manuscrito de tesis.

A la Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea, por su invaluable dirección para la realización de esta investigación y por su amistad. Quien además de ser una maestra en toda la extensión de la palabra, me brindó la oportunidad de conocer el maravilloso mundo de la micorriza orquideoide. Todo el tiempo, apoyo y enseñanzas proporcionadas, han sido las mejores que pude haber recibido durante esta etapa de mi formación académica. ¡Mil gracias!

A todos y cada uno de los miembros del Jurado: Dr. Martín Mata Rosas, Dra. Alma Delfina Orozco Segovia, Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea, Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila y Dr. Alejandro Martínez Palacios, por su tiempo y paciencia dedicado a proporcionarme sus valiosísimas observaciones y sugerencias para enriquecer esta tesis.

A la M. en C. Mónica Rangel Villafranco por su amistad y por todo el valioso apoyo técnico constante durante la realización de este trabajo. ¡Muchas gracias!

Al Biól. Mario Sinaí Tinoco Juárez y al Fís. Nicolás Delgado Medina por su amistad y por su invaluable apoyo y compañía durante el trabajo de campo. ¡Gracias en verdad por todo!

A la M. en C. Kumiko Shimada y a los laboratoristas Lucero y Roberto, por su asesoría técnica y por brindarme todas las facilidades dentro del Laboratorio de Edafología Ambiental (LEA) del Instituto de Geología (UNAM), para llevar a cabo los análisis de suelo.

Al M. en C. Víctor Peña Ramírez por su valiosa asesoría y apoyo proporcionados con algunos de los análisis estadísticos de esta tesis, así como por las sugerencias para mejorar este trabajo.

Al M. en C. Israel Cárdenas por ayuda estadística y disposición para resolver mis dudas.

A mis compañeros del laboratorio de Microcosmos Bioedáfico por su amistad, apoyo y por todos los gratos momentos compartidos: Mario Tinoco, Frederique Reverchón, Lorena Segura, Jesús Colín, David Moreno, Sandra Manjarrez, y Liliana.

Un agradecimiento especial a la Dra. Rosario Castañón por la confianza, el tiempo y por todas las facilidades otorgadas para llevar a buen término este proyecto.

A mis nuevos amigos Jorge Castillo, Ana Lilia Sánchez, Yissell Inurreta, Luz Gabriela Sánchez y Eduardo Camacho por todo ser tan lindas personas conmigo y por todos los ánimos y buenos deseos.

A mis queridos e incondicionales amigos Daniela Rebolledo, Ingrid Membrillo, Irene Sandoval y Edgard Mason.

## *Dedicatoria*

*Esta tesis la dedico a:*

*Mi esposo Samuel Barragán Larios*

*Mis padres Hilda y Martín*

*Mis hermanas,  
Emma y Esmeralda*

*Por ser los pilares de mi vida y  
brindarme siempre su amor y  
apoyo incondicional*

*A mis queridos suegros  
Magdalena y Miguel Ángel  
por todo su cariño y apoyo*

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	I
<b>RESUMEN</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>CAPÍTULO 1. Introducción general</b> .....	1
1. Familia Orchidaceae.....	1
1.1. Distribución.....	2
1.2. Características de las orquídeas.....	3
1.3. Morfología floral.....	4
1.4. Frutos y semillas.....	6
2. Tendencias generales de conservación.....	6
2.2. Conservación <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> .....	7
3. La restauración ecológica como una estrategia de conservación.....	9
3.2. La restauración ecológica en México.....	11
4. La Reserva Ecológica El Pedregal de San Ángel.....	12
4.2. Generalidades.....	12
4.3. Importancia.....	15
4.4. Decreto y situación legal actual.....	17
4.5. Ubicación.....	19
4.6. Vegetación.....	20
4.7. Orquideoflora.....	21
4.8. <i>Dichromanthus aurantiacus</i> (La Llave y Lexarza) Salazar y Soto Arenas.....	22
4.8.1. Descripción botánica.....	22
4.9. Problemática para su conservación.....	24
5. REFERENCIAS.....	25
<b>CAPÍTULO 2. Proceso germinativo <i>in vitro</i> de <i>D. aurantiacus</i> por la vía simbiótica y asimbiótica</b> .....	32
1. INTRODUCCIÓN.....	32
a. Germinación de las semillas de las orquídeas.....	34
b. Hongos micorrízicos orquideoides.....	35
c. Germinación simbiótica y asimbiótica.....	36
d. Germinación <i>in vitro</i> de especies de orquídeas de la REPSA.....	38
e. Oxidación en el cultivo <i>in vitro</i> .....	38
f. Agentes antioxidantes.....	39
2. OBJETIVO GENERAL.....	41
a. Objetivos particulares.....	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
a. Material biológico y procedimiento de esterilización.....	42
b. Germinación simbiótica y asimbiótica <i>in vitro</i> de <i>D. aurantiacus</i> .....	42
c. Otras pruebas de germinación asimbiótica.....	45
d. Análisis estadístico.....	47
4. RESULTADOS.....	48
a. Germinación asimbiótica.....	48
b. Estadios de desarrollo durante la germinación asimbiótica.....	52
c. Germinación simbiótica.....	55
d. Morfología de las plantas cultivadas <i>in vitro</i> .....	59

e. Otras pruebas de germinación asimbiótica.....	61
f. Embriogénesis somática.....	63
5. DISCUSIÓN.....	64
6. CONCLUSIONES.....	69
7. REFERENCIAS.....	71
<b>CAPÍTULO 3. Reintroducción de <i>D. aurantiacus</i> a su hábitat natural, como una estrategia para su conservación <i>in situ</i>.....</b>	<b>77</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	77
a. Reintroducción biológica.....	80
b. Reintroducción de orquídeas.....	82
c. Orquídeas terrestres y epífitas.....	83
d. Reintroducción de orquídeas en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.....	86
2. OBJETIVO GENERAL.....	87
a. Objetivos particulares.....	87
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	88
a. Establecimiento <i>ex vitro</i> de las plantas micropropagadas.....	88
b. Caracterización de sitios y reintroducción.....	90
c. Análisis estadístico.....	94
d. Análisis de variables edáficas y climáticas.....	95
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
a. Establecimiento de las plantas micropropagadas de <i>D. aurantiacus</i> en condiciones <i>ex vitro</i> .....	97
b. Reintroducción de <i>D. aurantiacus</i> a su hábitat.....	99
c. Supervivencia de <i>D. aurantiacus</i> .....	102
d. Desarrollo de las plantas reintroducidas de <i>D. aurantiacus</i> en su hábitat natural.....	107
e. Variables edáficas.....	112
f. Variables microclimáticas.....	114
5. CONSIDERACIONES FINALES.....	123
6. CONCLUSIONES.....	124
7. REFERENCIAS.....	125
8. ANEXOS.....	130
Anexo 1.1.....	130
Anexo 1.2.....	131
Anexo 1.3.....	131
Anexo 1.4.....	132
Anexo 1.5.....	132
Anexo 2.1.....	133
Anexo 2.2.....	136
Anexo 2.3.....	139
Anexo 2.4.....	142
Anexo 2.5.....	145
Anexo 3.1.....	148
Anexo 3.2.....	148
Anexo 3.3.....	149
Anexo 3.4.....	149

## RESUMEN.

Se estableció un protocolo para la germinación asimbiótica de *Dichromanthus aurantiacus* en tres medios de cultivo (Murashige y Skoog, MS; Knudson C y Ernst), con agentes antioxidantes (polivinilpirrolidona; carbón activado y ácido cítrico y ascórbico). Los tratamientos antioxidantes no remediaron sustancialmente este problema; en el medio MS 50% control, se obtuvo el mayor porcentaje de germinación (74%) y desarrollo (estadio 6). Se evaluó la germinación simbiótica con diez aislados de hongos micorrízicos. Uno que ya había sido probado proveniente de una planta adulta de la misma especie y hábitat, promovió el mayor porcentaje de germinación (97%). No se observaron diferencias significativas debidas al origen de los aislados (planta adulta o protocormo). La germinación, el crecimiento y desarrollo fueron mayores en todos los cultivos simbióticos con la formación de plántulas a los 30 días en contraste con los 200 para la vía asimbiótica. En condiciones de invernadero, se registró también una mayor supervivencia (96 y 74%, respectivamente).

Se caracterizó el microambiente de los sitios de reintroducción dentro de la REPSA: los más conservados tuvieron menor radiación fotosintéticamente activa, temperatura, mayor humedad atmosférica y de suelo; la cubierta edáfica fue más rica en nutrimentos con un mayor contenido de cationes de  $\text{Na}^{2+}$  y de C y N totales y menor contenido de P disponible en comparación con los sitios perturbados.

La supervivencia y el desarrollo después de un año fueron mayores para las plantas simbióticas en todos los sitios de reintroducción, hasta un 83% en comparación con 33%. Las condiciones edáficas y microclimáticas influyeron de manera directa en la supervivencia siendo mayor en los microambientes conservados. Se estableció por vez primera un estudio comparativo de reintroducción simbiótica y asimbiótica de una orquídea terrestre donde se sugiere la estrategia simbiótica para la conservación del recurso edáfico y microbiológico para este hábitat.

## **ABSTRACT.**

A protocol was established for asymbiotic seed germination of *Dichromanthus aurantiacus*, using three nutrient media (Murashige and Skoog (MS), Knudson C and Ernst) in addition with antioxidants (polivinilpirrolidone, activated charcoal and citric and ascorbic acids). The antioxidant treatments did not substantially solved this problem. The control treatment 50% MS medium, could effectively induce the highest germination percentage (74%) and development (Stage 6). The effects of ten mycorrhizal fungi on symbiotic germination were evaluated. One of these mycorrhizal fungi, which has been previously tested and has been isolated from a naturally occurring plant of the same species and habitat, promoted the highest germination percentage (97%). No significant differences due to the origin of the isolates (adult plant or protocorm) were observed. Germination, growth and development rates were faster in all symbiotic cultures, since seedling formation initiated at 30 days against 200 days on asymbiotic propagation. A higher survival rate was also obtained under greenhouse conditions (96 and 74%, respectively).

A microenvironmental characterization of reintroduction sites was conducted within the REPSA. The most preserved sites had lower photosynthetic active radiation, temperature, higher atmospheric humidity and soil moisture; its soil cover had a larger amount of nutrients, with larger  $\text{Na}^{2+}$  cations and total C and N contents and lower available P content compared to disturbed sites.

After a year, survival and development were better for symbiotic plants in all reintroduction sites, with survival rates reaching 83% compared to 33% in asymbiotic conditions. Edaphic and microclimatic conditions directly influenced plant survival, which resulted higher in preserved microenvironments. This study was the first to compare symbiotic and asymbiotic reintroduction of a terrestrial orchid. Symbiotic strategy is recommended for the conservation of soil and microbiological resources for this habitat.

## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Ácido cítrico
<b>AS</b>	Ácido ascórbico
<b>CA</b>	Carbón activado
<b>ddr</b>	Días después de la reintroducción
<b>dds</b>	Días después de la siembra
<b>ER</b>	Medio Ernst (1982)
<b>HMO</b>	Hongos micorrízicos orquideoides
<b>KC</b>	Medio Knudson C (1946)
<b>MS</b>	Medio Murashige y Skoog (1962)
<b>MSm</b>	Medio Murashige y Skoog modificado
<b>MBA</b>	Medio Básico de Avena
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>RFA</b>	Radiación fotosintéticamente activa
<b>REPSA</b>	Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel

## **CAPÍTULO 1. Introducción general.**

### **1. FAMILIA ORCHIDACEAE.**

Las orquídeas representan taxonómicamente la familia más evolucionada entre las monocotiledóneas, encontrándose entre las más diversas del reino vegetal. Se estima que existen alrededor de 800 géneros y 25 000 especies en todo el mundo (Dressler, 1993; 2005). En las regiones tropicales y templadas la mayoría de las especies son epífitas (75%), aunque existe un número substancial de orquídeas terrestres (25%) (Arditti, 1992; Wells y Willems; 1991).

En México la diversidad y endemismo de especies vegetales es muy amplia, se sabe que del total de plantas endémicas registradas para el país más del 50% están representadas en sólo cinco familias Cactaceae, Asteraceae, Poaceae, Fabaceae y Orchidaceae (Toledo, 1988). De éstas la familia Orchidaceae ocupa el tercer lugar en cuanto a diversidad taxonómica, solamente superada por la familia Asteraceae y Fabaceae (Hágsater *et al.*, 2005). Así mismo, constituyen la quinta familia de fanerógamas con mayor número de especies en la Cuenca de México (Rzedowski y Calderón, 1989; citado por Salazar, 2009).

A lo largo del territorio nacional se distribuyen cerca de 1200 especies (Soto y Salazar, 2004), representando casi el 6% del total mundial (Espejo *et al.*, 2002). El dato más reciente sugiere que la familia comprende alrededor de 1254 especies y 21 taxa subespecíficos (Soto *et al.*, 2007). De esta gran diversidad se describen 444 especies o subespecies endémicas, que corresponden aproximadamente al 40% (Soto, 1996).

A pesar de que México es uno de los países tropicales cuya orquideoflora se conoce mejor (Soto *et al.*, 2007), desafortunadamente también es uno de los países donde un gran número de especies son altamente vulnerables a la extinción, debido a la destrucción y transformación de sus hábitats, así como a la extracción masiva de plantas de las poblaciones silvestres para su comercio ilegal (UICN/SSC Orchid

Specialist Group, 1996). La disminución de las poblaciones de muchas especies de orquídeas es significativa; si esta tendencia continúa, se seguirá perdiendo una parte importante de su variación genética y con ella, la capacidad de supervivencia de las especies (Hágsater *et al.*, 2005).

## **1.1 Distribución**

La distribución de las orquídeas a nivel mundial es muy amplia, encontrándose en todos los continentes, excepto la Antártida; aunque en las zonas tropicales es donde se encuentra su mayor diversidad (Sarmiento y Romero, 2000). Se ha estimado que el 56% del total mundial de orquídeas se encuentran en los trópicos (UICN/ SSC Orchid Specialist Group, 1996). Esto ha sido posible por las distintas adaptaciones que presentan estas plantas, permitiéndoles colonizar medios terrestres, rocosos, semiacuáticos y aéreos (sobre las ramas de los árboles) (Suárez y Mora, 2007).

En México la gran biodiversidad que posee se debe a distintos factores, entre ellos a su compleja orografía y ubicación geográfica, ya que está situado en la intersección de los reinos biogeográficos Neártico y Neotropical, permitiendo la llegada de especies tanto de Norteamérica, como de Sudamérica (Hágsater *et al.*, 2005).

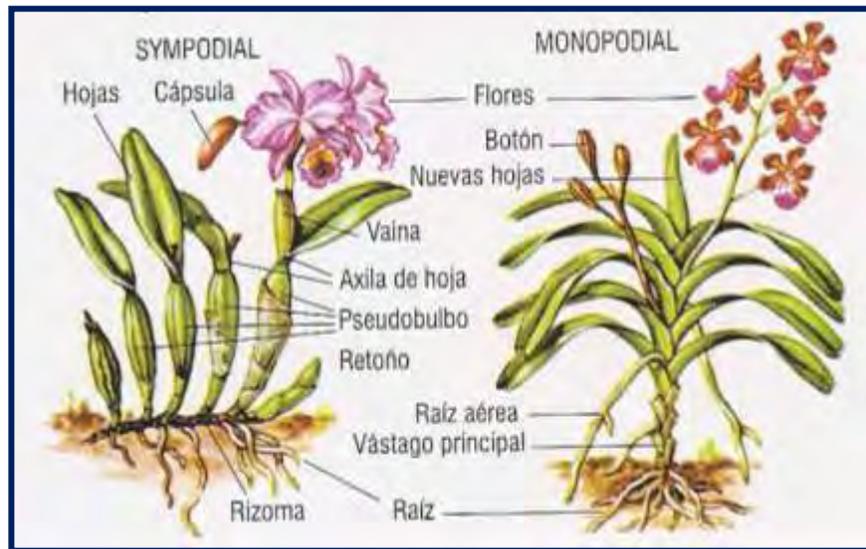
Aunque las orquídeas se distribuyen en gran parte de los ecosistemas de la República Mexicana, su mayor diversidad y abundancia se encuentra en los bosques de neblina y selvas tropicales húmedas del sur del país (Soto y Salazar, 2004; Hágsater *et al.*, 2005). La geología de la Cuenca de México con zonas montañosas y sequía estacional marcada, han favorecido el establecimiento de ciertas especies principalmente terrestres, a diferencia de las zonas más cálidas y húmedas, donde hay mayor diversidad de orquídeas epífitas (Salazar, 2009).

## 1.2. Características de las orquídeas

Las orquídeas son plantas herbáceas con una estructura básica similar a la que caracteriza a la mayoría de las monocotiledóneas. Presentan venación foliar paralela, haces vasculares dispersos, ovario ínfero y partes florales en múltiplos de tres (Dressler, 1981). Respecto a su arquitectura vegetal, estas plantas presentan una variación notable, pueden ser terrestres, epífitas o litófilas; con o sin cormos subterráneos; con rizomas cortos o alargados, con o sin pseudobulbos, con una gran diversidad de tallos desde erectos, escandentes, rastreros o péndulos, con hojas espiraladas o dísticas, conduplicadas, etc. En su tamaño también es visible la variación que presentan, pueden medir desde milímetros (*Platystelle jurgemanioides*) hasta varios metros de largo (*Gramatophyllum speciosum*) (Pupulin, 2005).

Se distinguen dos tipos de crecimiento con base en la posición del tallo principal: monopodial y simpodial. Cuando el tallo crece perpendicular al suelo y a partir de él se desarrollan las hojas, flores y frutos se denomina crecimiento monopodial. Los tallos florales y las raíces aéreas brotan entre las hojas y en algunas especies se ramifica desde las yemas, en la axila de las hojas. En el segundo caso, crece un tallo paralelo al suelo o la rama sobre la que crece la planta y a partir de él se desarrollan las hojas y los pseudobulbos (**Fig. 1**) (Sarmiento y Romero, 2000).

Tanto las orquídeas monopodiales como las simpodiales están constituidas por unidades funcionales denominadas metámeras. En las especies monopodiales las metámeras están formadas por un entrenudo, una hoja, una inflorescencia y por algunas raíces aéreas. En el caso de las especies simpodiales la metámera se constituye por un segmento de rizoma y por encima de éste un pseudobulbo que presenta una o más hojas y termina en una inflorescencia apical. En México la mayor parte de las orquídeas epífitas y todas las especies terrestres, presentan crecimiento simpodial (Hágsater *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Patrones de crecimiento simpodial y monopodial, en la familia Orchidaceae. Fuente: Amorosi, 2006.

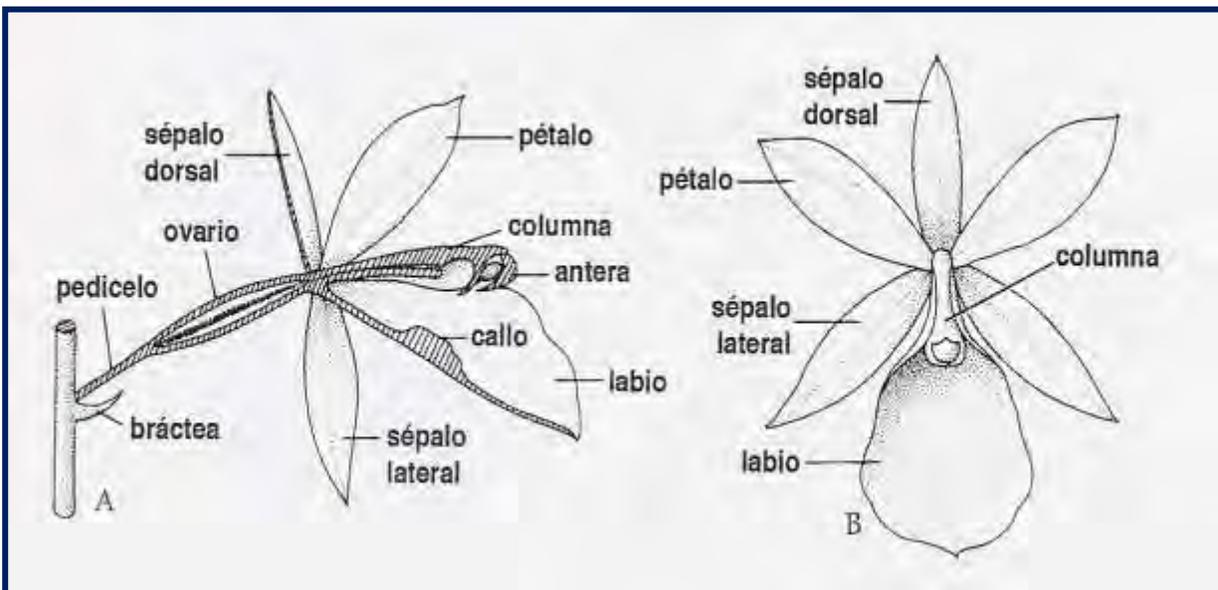
### 1.3. Morfología floral

Se consideran como una de las familias más especializadas dentro de las monocotiledóneas dada su particular morfología floral y sus tipos de polinización. Las flores pueden desarrollarse de manera individual o bien en conjunto formando inflorescencias, lo que les confiere la ventaja de que un mismo polinizador pueda repartir el polen de flores lejanas en varias flores de una misma planta (Sarmiento y Romero, 2000).

Las flores tienen una estructura elemental con ciertas características distintivas que consisten en: a) simetría bilateral; b) presentan una fusión parcial entre los órganos sexuales masculinos (filamentos de los estambres) y femeninos (el estilo) formando una estructura única denominada columna o ginostemio; c) existe una supresión de los estambres en un lado de la flor, presentándose por lo general sólo un estambre fértil; d) el pétalo opuesto a los estambres se denomina labio o labelo, es diferente de los otros dos en tamaño, forma o coloración, o bien por la presencia de engrosamientos que producen aceites, pseudopolen, compuestos aromáticos o néctar; e) en las flores

maduras sucede un cambio conocido como resupinación, que es una torsión del labelo quedando situado en la parte inferior de la flor; f) el polen presenta agregación formando unidades de cuatro granos (tétradas) que constituyen cuerpos sólidos llamados polinios. Existen ciertas excepciones a esto, donde los granos de polen son individuales (mónadas), como es el caso de las subfamilias Apostasioideae, Cyripedioideae y Vanilloideae; g) la columna presenta una estructura denominada rostelo, que interviene en la dispersión de los polinios y que a su vez los separa de la parte fértil del estigma (**Figs. 2A y 2B**). La mayoría de las orquídeas tienen flores hermafroditas, presentando los dos órganos sexuales en la misma flor. Aunque en ciertos casos los sexos están separados en tiempo (flores protándricas) o en el espacio, como en los géneros *Catasetum*, *Mormodes* y *Cycnoches* (Hágsater *et al.*, 2005)

La presencia de flores tan llamativas y diversas en las orquídeas tiene como finalidad lograr la polinización que la mayoría de las veces es cruzada, con lo que se genera variación genética; aunque en algunas especies se ha visto puede ocurrir autopolinización (Sarmiento y Romero, 2000; Hágsater *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Estructura floral en orquídeas. A) Sección longitudinal de la flor. B) Vista frontal de la flor. Tomado de Pupulin, 2005 (modificado de Dressler, 1981).

## **1.4. Frutos y semillas**

Una vez que se efectúa la polinización y fecundación de los óvulos, el ovario inicia su crecimiento en grosor y longitud hasta formar un fruto, denominado cápsula. Éste es el órgano que se encuentra en la porción posterior inmediata a la flor. Al interior del fruto se encuentran las semillas, que son diminutas por lo que se les conoce como semillas de polvo, las cuales son liberadas una vez que éstos maduran a través de las aberturas longitudinales que se generan (Sarmiento, 2000).

Las semillas presentan embriones diminutos y una cubierta delgada denominada testa que se encuentra llena de aire, por lo que pueden flotar y ser transportadas a grandes distancias por el viento (Hágsater *et al.*, 2005). A diferencia de las semillas de otras plantas, las de las orquídeas no poseen materiales de reserva que permitan la germinación y desarrollo inicial de la nueva planta. Debido a esto, de los miles a millones de semillas que son liberadas, solamente muy pocas llegan a germinar en su hábitat natural, ya que requieren de la presencia de hongos micorrízicos que les proporcionen las sustancias necesarias para su germinación (Suárez y Mora, 2007). Se estima que sólo una de 1000 o de cada 10 000 semillas germinan en su ambiente natural y pueden dar lugar a una planta adulta, en un proceso de crecimiento y desarrollo que puede tardar de uno a diez años (Pupulin, 2005). Esto se explica a mayor detalle en el capítulo 2.

## **2. TENDENCIAS GENERALES DE CONSERVACIÓN.**

Debido a la crisis ambiental que vivimos hoy en día, así como a la extinción masiva de especies, surge la conservación biológica como una ciencia multidisciplinaria que tiene como objetivos principales llevar a cabo: 1) la investigación de los efectos humanos sobre los demás seres vivos, las comunidades biológicas y los ecosistemas y 2) desarrollar aproximaciones prácticas que permitan: a) prevenir la degradación del hábitat y la extinción de especies; b) restaurar ecosistemas y reintroducir poblaciones y

c) restablecer relaciones sustentables entre las comunidades humanas y los ecosistemas (Rozzi *et al.*, 2001).

Por tanto, las estrategias para la conservación de las especies deben basarse en al menos dos perspectivas: 1) en el conocimiento demográfico del crecimiento y disminución de las poblaciones y 2) en el mantenimiento de su potencial evolutivo (Ackerman, 1998). Esto se logra llevando a cabo una estrategia de conservación integral que aborde la conservación *in situ* y *ex situ* de las especies.

## **2.1 Conservación *in situ* y *ex situ***

Atwood (1997), define la conservación *in situ* como la conservación de las especies en sus hábitats naturales. Es considerada como la estrategia de conservación más importante debido a que permite mantener la variación genética de las especies, sus interacciones con otros organismos y su capacidad para continuar evolucionando.

Por otra parte, la conservación de especies *ex situ* es la que se desarrolla fuera de su hábitat natural. Se le considera como un complemento a los esfuerzos de conservación *in situ*, debido a que de esta manera es posible preservar parte de la diversidad genética y especies particulares que están en riesgo. Tiene como objetivo aumentar el número poblacional de alguna especie amenazada para reintroducir nuevamente un elemento ya desaparecido del ecosistema (Ramsay y Dixon, 2003). Esto se abordará con mayor detalle en el capítulo 3.

Las especies y genes pueden conservarse *ex situ* por distintos mecanismos, como son los bancos de germoplasma y las colecciones de cultivo de tejidos, o bien las colecciones de organismos vivos como zoológicos y jardines botánicos (CONABIO, 1998). Esta estrategia de conservación presenta dos variantes principales: 1) la propagación y mantenimiento de las especies que ya no pueden subsistir en la naturaleza y 2) la propagación masiva y subsecuente comercialización de la mayor

cantidad de especies, con la finalidad de reducir y desalentar la recolecta de plantas en sus hábitats naturales.

En lo que respecta a las orquídeas en la actualidad, a nivel mundial un progreso considerable se ha realizado para establecer estrategias para su conservación *in situ* y *ex situ*, debido a la acelerada destrucción del hábitat y a la sobrercolecta de muchas especies. Se ha puesto particular énfasis en lo que se refiere al establecimiento de bancos de semillas, técnicas de micropropagación y bancos de hongos (Cribb *et al.*, 2003; Wing y Thame, 2005). En este último caso, en países como Canadá en la Universidad de Alberta, es posible adquirir aislados fúngicos con fines de investigación científica a bajo costo (Zettler, 1997).

Los jardines botánicos han sido otra de las estrategias de conservación de orquídeas *in situ* y *ex situ*. El trabajo *in situ* incluye el conocimiento de la diversidad local de orquídeas y sus endemismos, la investigación ecológica y la conservación del hábitat, así como la identificación de áreas prioritarias para su protección. La conservación *ex situ* involucra la propagación vegetativa y reproductiva, así como el establecimiento de programas educativos que ilustren la importancia de la biodiversidad y los factores de riesgo a los cuales se encuentra expuesta.

En México, en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM en el Distrito Federal, se realiza la conservación de orquídeas tanto *in situ* como *ex situ*. Dentro de las estrategias de conservación *ex situ*, se cuenta con una colección de orquídeas, con ejemplares de especies de distintas áreas naturales protegidas de México, como la Reserva Ecológica “El Pedregal de San Ángel” (*Bletia urbana*), la Reserva de la Biósfera “Sierra de Santa Marta”, en Veracruz (*Jacquiniella equitantifolia*) y el Parque Nacional “Lagunas de Montebello”, en Chiapas (*Pleurothallis cardiothallis*) (Téllez, 2003). Así mismo, se cuenta con un laboratorio especializado en el Cultivo de Tejidos Vegetales, donde se realiza la reproducción asexual y micropropagación de diversas orquídeas, principalmente aquellas que aparecen enlistadas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001).

En el Instituto de Geología de UNAM, en el laboratorio de Microcosmos Bioedáfico, también se realizan acciones para la conservación *in situ* y *ex situ* de esta familia de plantas. Se cuenta con un banco de germoplasma de semillas de orquídeas y de hongos micorrízicos orquídeoideos (HMO), entre ellos de algunas de las especies que habitan en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, ecosistema donde a su vez se ha realizado la reintroducción de algunas orquídeas terrestres (capítulo 3).

### **3. LA RESTAURACIÓN ECOLÓGICA COMO UNA ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN.**

La Sociedad Internacional para la Restauración Ecológica (2004), define a la restauración como el proceso de asistencia para la recuperación de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido. Desde una perspectiva simplista, la restauración ecológica se entiende como lograr el retorno de un ecosistema particular a su estado previo del cual fue sacado, como consecuencia de alguna actividad humana. Se contempla un proceso de simulación de estadios de sucesión de distintas comunidades biológicas conocidas en un sitio, hasta lograr que tomen una trayectoria autónoma y viable de establecimiento permanente en el lugar (Sánchez, 2005).

Sin embargo, el objetivo de la restauración ecológica no siempre es regresar un sistema degradado a sus condiciones originales, sino que también puede ser mitigar y compensar las disfunciones ambientales o mejorar sus condiciones de afectación e incrementar su capacidad productiva (Sarr *et al.*, 2004; Carabias *et al.*, 2007). A su vez, la restauración ecológica nos permite generar información de utilidad para el establecimiento de reservas naturales, como una manera de incrementar las áreas destinadas a la conservación de la biodiversidad (Dobson *et al.*, 1997). Por estos motivos, actualmente ésta debe ser considerada un componente integral del manejo de los ecosistemas en todo el mundo (Hobbs y Harris, 2001).

A pesar de que no existe una metodología específica para llevar a cabo proyectos de restauración ecológica, porque cada ecosistema presenta sus características intrínsecas, Hobbs y Norton (1996), proponen una serie de lineamientos clave que consisten en: a) identificar los procesos principales de degradación; b) desarrollar métodos que permitan revertir o disminuir el deterioro; c) determinar objetivos realistas para el restablecimiento de especies y de la funcionalidad del ecosistema; d) desarrollar técnicas prácticas para implementar los objetivos propuestos, en una escala proporcional al problema a resolver; e) documentar y comunicar estas técnicas para lograr una mayor inclusión y para el manejo de estrategias y f) supervisar las variables claves del sistema .

Es notable el crecimiento que se ha dado en el campo de la restauración ecológica a través del tiempo, volviéndose una fuerte disciplina de investigación (Young, 2000; 2005). Esto se ve reflejado en el aumento de artículos publicados en revistas científicas donde se habla de ella (Aronson *et al.*, 1993; Holl *et al.*, 2000; Antonio, 2002; Baer *et al.*, 2004; Bakker and Wilson, 2004; Gross y Hoffmann, 2005). En este sentido, la biología de la conservación, se ha centrado principalmente en estudios con animales, siendo más teórica y enfocándose a la genética de poblaciones. En comparación con la restauración ecológica que ha sido más experimental, con especies vegetales y ha estado dirigida a estudios a nivel de poblaciones, comunidades y ecosistemas (Young, 2000).

No obstante no es aceptable que la restauración ecológica o la “reparación” de hábitats degradados justifique que el ser humano siga dañando los ecosistemas de manera constante, pensando que con ella es posible revertir todos los daños causados y regresar a una condición prístina de los mismos, lo cual se sabe es completamente ficticio. La restauración ecológica debe ser vista como un esfuerzo complementario de la conservación biológica, que a su vez esté ligada a políticas de desarrollo económico sostenible (Aronson *et al.*, 2006).

### 3.1. La restauración ecológica en México

En México la restauración ecológica sigue siendo un campo del conocimiento prácticamente nuevo. Falta la consolidación de un marco normativo adecuado, que incremente los esfuerzos para la formación de técnicos y científicos capacitados con una visión holística e interdisciplinaria, que influyan en la formulación de nuevas políticas públicas para la restauración ambiental y en los rezagos existentes en el marco regulatorio (Carabias *et al.*, 2007). En la actualidad se siguen realizando esfuerzos por capacitar a un mayor número de profesionistas en esta disciplina, ejemplo de ello es la maestría con orientación en Restauración Ecológica que forma parte del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM desde el año 2001.

Algunos ejemplos de proyectos de restauración ecológica en México que han mostrado resultados favorables, son los que se han llevado a cabo en el Parque Ecológico de la Ciudad de México, también conocido como Ajusco Medio y en el Parque Ecológico-Arqueológico Cuicuilco. En el primero, se elaboraron estrategias de regeneración de las zonas afectadas y se desarrolló un programa de educación ambiental. Para el segundo, se estableció un plan de trabajo que incluía reforestación, reintroducción de especies ausentes y control mecánico de malezas (Cano- Santana *et al.*, 2006). En el caso del Pedregal de San Ángel, por tratarse de un ecosistema muy fragmentado, los mismos autores sugieren que para ejecutar acciones de conservación, restauración y manejo, se debe evaluar el estado de conservación de las áreas verdes y/o protegidas que estén asentadas cerca y sobre el Pedregal.

De manera particular para las orquídeas, se plantea el desarrollo de metodologías con el empleo de hongos micorrízicos orquideoides que puedan ser aplicadas a la restauración. Estas metodologías incluyen la propagación simbiótica y reintroducción de plantas como una estrategia de conservación natural, ya que por medio de éstas también se contribuye a la conservación del suelo y conservación de los microorganismos al reintroducir las plantas junto con sus hongos asociados (Zettler, 1997; Ortega y Rangel 2007; Ortega-Larrocea, 2008).

## 4. LA RESERVA ECOLÓGICA DEL PEDREGAL DE SAN ÁNGEL.

### 4.1. Generalidades

El Pedregal de San Ángel se encuentra ubicado en el Distrito Federal y su territorio abarcaba las delegaciones Villa Obregón, Coyoacán, Tlalpan y Contreras (Rzedowski, 1954). Este ecosistema se formó como consecuencia de la erupción del volcán Xitle (3100 m de altura) y conos adyacentes, hace aproximadamente 2000 años. El derrame lávico tuvo más de 10 m de espesor desde el pie del cerro del Ajusco hasta zonas ubicadas en el fondo de la cuenca hidrográfica del Valle de México, cubriendo una superficie original de alrededor de 80 km<sup>2</sup> (**Fig. 3**) (Carrillo, 1995). Las primeras corrientes de lava fueron relativamente pequeñas, derramándose hacia el sureste, sur y suroeste del Xitle, pero posteriormente se incrementó el volumen de lava derramado y su dirección hacia el Noreste, con lo cual el paisaje fisiográfico cambió de manera notable. Estas lavas fueron clasificadas como basalto de olivino con piroxeno y microcristales (Schmitter, 1953; Badilla, 1977).

Después de ocurrido el derrame lávico, continuó un ciclo de sucesión ecológica. Una vez que hizo erupción el volcán Xitle, la lava destruyó a todos los seres vivos presentes en la zona de influencia. Cuando ésta se enfrió, su superficie sirvió como un medio estéril para la llegada y colonización de las diferentes especies de microorganismos, hongos, plantas y animales, ocurriendo así un fenómeno de sucesión primaria. Conforme transcurrió el tiempo fueron evolucionando las comunidades bióticas y a la par ocurrió una evolución en la acumulación del suelo y en la erosión de la roca volcánica, fenómeno en el cual también intervino la misma vegetación de la zona (Rzedowski, 1954).

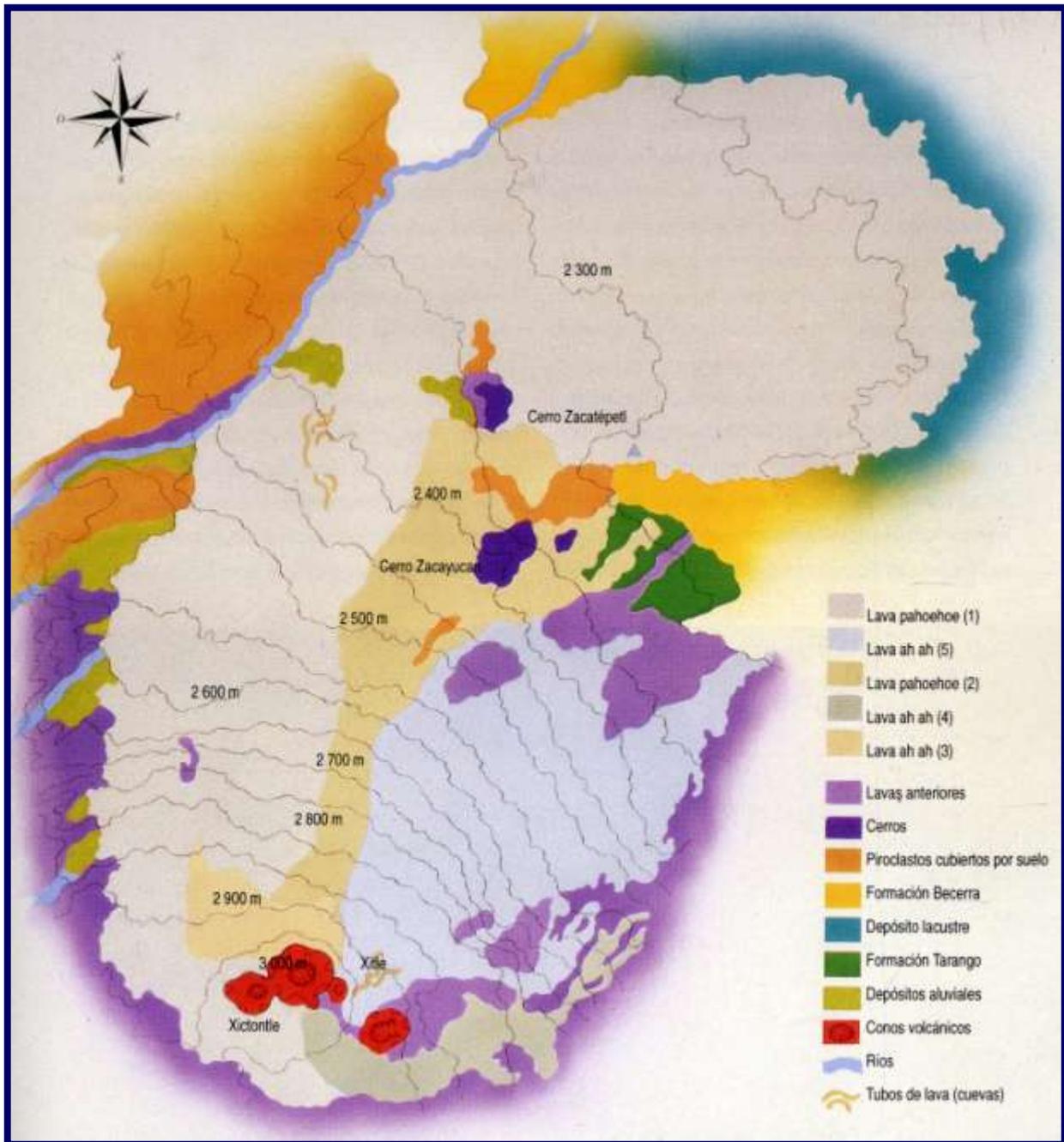
Al estudiar los mecanismos de sucesión primaria en estos sitios, es posible entender los patrones de cambio temporal en las características de la comunidad, así como de las condiciones ambientales. Un evento importante durante el proceso de sucesión debió ser la colonización de los ambientes rocosos por algas, seguido de la

colonización de las plantas que tienen una asociación simbiótica con microorganismos fijadores de nitrógeno, con lo que quizás las condiciones del suelo mejoraron al aumentar el contenido de este elemento, favoreciendo el crecimiento de las plantas. Al mismo tiempo, algunos animales sirvieron como dispersores de semillas (Cano-Santana y Meave, 1996).

Este ecosistema es también conocido como malpaís, por su origen a partir de roca volcánica o fragmentos de ésta que tuvieron un corto lapso de intemperización, formándose un suelo muy incipiente sobre la superficie de las grietas, fisuras y depresiones (Rojo y Rodríguez, 2002). El origen edáfico es principalmente eólico y orgánico, aunque otras fuentes de menor trascendencia fueron los productos de descomposición de la lava, así como acarreos de origen aluvial o humano (Rzedowski, 1954). Esta ausencia inicial de suelo durante su formación, se piensa fue la causa principal de que ocurriera una lenta sucesión primaria, aunque la velocidad de ésta dependerá de lo favorables que sean las condiciones del clima para el establecimiento y desarrollo de la vegetación (Cano-Santana y Meave, 1996).

Una vez que la corriente de lava avanzó, se enfrió y se solidificó, se formó una topografía muy irregular y heterogénea que dio lugar a la formación de diversos macro y microambientes contrastantes entre sí (Cano-Santana y Meave, 1996). Éstos permitieron el establecimiento de un sin número de especies de flora y fauna, gran parte de las cuales son endémicas de la zona. Se han registrado 337 especies de plantas vasculares pertenecientes a 74 familias y 193 géneros, de las cuales al menos 226 son endémicas (Castillo-Argüero *et al.*, 2004).

La capacidad de la roca basáltica para absorber grandes cantidades de calor, favoreció el desarrollo de especies características de zonas cálidas (Rzedowski, 1954). Aunado a esto, la cuenca de México forma parte del Eje Volcánico Transversal, que es el límite aproximado de confluencia entre las regiones biogeográficas neártica y neotropical (Carrillo, 1995), característica que también favoreció el florecimiento de una gran diversidad biológica.



**Figura 3.** Esquema tomado de Carrillo (1995), que muestra la extensión original que alcanzó el escurrimiento de lava por la erupción del volcán Xitle y conos adyacentes.

Álvarez *et al.* (1982) describieron en el pedregal la presencia de seis tipos de microambientes que corresponden a grietas, hoyos, hondonadas, promontorios, planicies y paredes. Sin embargo, años después Santibáñez-Andrade (2005), distinguió otros tipos diferentes al considerar ciertos factores físicos (profundidad del suelo, incidencia de luz y pendiente) que corresponden a sitios planos, oquedades, grietas, hondonadas, promontorios, paredes y cuevas.

Los límites altitudinales de la Reserva varían de 2250 msnm en la parte más baja hasta los 3100 msnm como cota superior, lo que genera una presión atmosférica baja. Se divide el año en una temporada de lluvias que abarca los meses de junio a octubre y en una época de secas que abarca de noviembre a mayo. De acuerdo con la clasificación climática de Köppen (modificada por García, 1988), el clima que caracteriza este sitio se designa con las letras Cb ( $w_1$ ) (w), que corresponde a templado subhúmedo con régimen de lluvias en verano, en donde la temperatura media anual es de 15.5 °C, con variaciones extremas desde los -6 °C hasta los 34.6 °C y la precipitación promedio anual varía entre los 700 y 950 mm (Rzedowski, 1954; Valiente-Banuet y García, 1990; Castillo- Argüero *et al.*, 2004).

## 4.2. Importancia

La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), es un ecosistema con importancia biológica, cultural y estética. Constituye el último hábitat con vegetación natural en la zona conurbada del Valle de México y es el único ecosistema de *Senecio praecox* (palo loco) en el mundo, que al albergar una alta diversidad florística, ha permitido ampliar el panorama cultural de la gente (Lot y Camarena, 2009). Además es una de las pocas zonas que existen en el mundo en las cuales se puede observar el desarrollo y evolución de una comunidad vegetal y animal sobre una superficie de lava, ya que este tipo de sustrato sólo permite el establecimiento de un conjunto particular de especies que difiere notablemente de las comunidades colindantes (Cano-Santana y Meave, 1996).

Este ecosistema sirve como refugio para la biodiversidad y su conservación, con fines de educación ambiental y de investigación científica, que ofrece un paisaje estético y un área de recreación (Cano-Santana *et al.*, 2006).

Así mismo, El Pedregal de San Ángel es un área que tiene una gran influencia en las condiciones ambientales del sur de la Ciudad de México, en la captación de agua y recarga del manto acuífero. Dentro de sus funciones ecológicas consideradas recientemente como un servicio ambiental está el filtrar el agua de la lluvia a través de los múltiples poros de las rocas volcánicas hasta el subsuelo (Nava *et al.*, 2009). Esto favorece el mantenimiento de la humedad y la calidad del aire, contribuyendo con el amortiguamiento de la temperatura en una zona de la Ciudad de México (Gaceta UNAM, 1983).

Considerando que el Pedregal de San Ángel es un sitio con una estructura geológica especial, con una alta diversidad de especies y endemismos, en donde se puede observar y estudiar el desarrollo y evolución de una comunidad vegetal y animal sobre un flujo de lava, Álvarez *et al.* en 1982, consideraron necesaria la creación de una Reserva Ecológica dentro de esta zona. El objetivo de esto fue que estuviera al resguardo de las autoridades de la Universidad Nacional Autónoma de México para mantenerla protegida de los efectos antropogénicos.

En 1982, cuando los autores antes señalados propusieron la creación de una reserva en gran parte de los terrenos del Pedregal de San Ángel, ya se habían edificado un sin número de casas, quedando libres de urbanismo solamente la superficie de los terrenos que correspondían a Ciudad Universitaria. Esta comunidad vegetal ocupaba de manera inicial el 50% de la superficie total de lava, que correspondía a una extensión de 40.45 km<sup>2</sup>. Sin embargo, por el urbanismo su superficie se redujo en poco más del 90%, quedando así con solamente 2.9 km<sup>2</sup> de superficie antes de que fuera decretada.

Los principales motivos para la creación de la Reserva propuesta, deberían de considerar las siguientes funciones: 1) la conservación de las comunidades vegetales y animales restantes; 2) servir como un laboratorio viviente para la investigación científica; 3) ser un área para la docencia, 4) servir con un centro de divulgación para la población de la Ciudad de México y 5) proporcionar una serie de servicios ecosistémicos y un espacio de recreación.

#### **4.3. Decreto y situación legal actual**

El 3 de Octubre de 1983 apareció publicada una nota en Gaceta UNAM (Vol. I, N° 59), titulada “Beneficia a la zona sur del Distrito Federal la reserva ecológica de Ciudad Universitaria”. Siendo rector de la universidad el Dr. Octavio Rivero Serrano, firmó un acuerdo universitario el 30 de septiembre de ese año en donde se decretó como Zona Ecológica Inafectable a lo que se reconoció a partir de ese momento como Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), siendo así esta la primera reserva de la Cuenca del Valle de México.

El objetivo principal de la creación de la REPSA fue el desarrollo, preservación y reintroducción de la flora y fauna, únicamente con fines académicos, de difusión e investigación, así como contribuir con la conservación y mejora del ambiente del sur de la Ciudad de México. No obstante, para esta fecha ya se describía una disminución en la extensión original que ocupaba el Pedregal de San Ángel, de 40.5 km<sup>2</sup> a solamente 3 km<sup>2</sup> y por consiguiente con una reducción del 90% de las especies de flora y fauna (Rivero, 1983).

A partir de la creación de la REPSA, con el transcurso de los años se publicaron en Gaceta UNAM nuevos acuerdos en donde se redefinieron e incrementaron los límites que ésta ocuparía dentro del campus de Ciudad Universitaria (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1.** Cronología de eventos de las distintas superficies decretadas en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

<b>Fecha de publicación de acuerdo</b>	<b>Superficie en hectáreas</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Referencia</b>
<b>3/Octubre/1983</b>	124.5	Conformada por 2 áreas: -1 Poniente: 83 ha -1 Oriente: 40 ha	Rivero, 1983.
<b>20/Agosto/1990</b>	146.8	Delimitación de: -Zona Núcleo: 115 ha, -Zona Amortiguamiento: 31 ha	Sarukhán, 1990
<b>14/Marzo/1996</b>	172.1	Conformada por 3 zonas (cada una a su vez con una zona núcleo y de amortiguamiento): -1 Poniente: 108 ha -2 al Oriente: 39 ha	Sarukhán, 1996
<b>13/Enero/1997</b>	176.9	Se establecen 8 Áreas Verdes de Manejo Especial (AVME) con un total de 35 ha	Sarukhán, 1997
<b>2/Junio/2005</b>	237.3	Integrada por 3 zonas núcleo y 13 de amortiguamiento Zonas núcleo: 171 ha Zonas Amortiguamiento: 66 ha	De la Fuente, 2005

Actualmente existe un Reglamento Interno que fue elaborado en el año 2006 por el Comité Técnico de la REPSA, el cual contiene los lineamientos para regular el desarrollo de actividades dentro de la misma. Éste contempla disposiciones generales, actividades académicas permitidas, sanciones a quienes realicen actividades no permitidas y aspectos sobre la supervisión y vigilancia de la reserva (De la Fuente *et al.*, 2006).

Un acontecimiento de relevancia que cabe destacar es el ocurrido el 24 de noviembre de 2008, fecha en la cual inició la Semana Nacional por la Conservación organizada por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). Durante este evento el secretario de Medio Ambiente y Recursos Naturales Juan Rafael Elvira Quesada, declaró que la REPSA sería decretada como un Área Natural Protegida (ANP), dentro de la categoría de Monumento Nacional, dada su gran importancia biológica y cultural. Así, la REPSA formaría parte del millón cien mil hectáreas que México tiene catalogadas como zonas de conservación (Ayala y Juárez, 2008). Ernesto Enkerlin, Presidente de la CONANP, también señaló que la REPSA recibiría la declaratoria como ANP en el año 2009, fecha a partir de la cual quedaría destinada de manera definitiva con fines de conservación. Esto facilitará en el futuro la designación de recursos para la conservación y protección de la misma (Hernández y Ramos, 2008). No obstante, a la fecha aún no se ha dado la resolución final a esta declaratoria.

Sin embargo; a pesar de todos los logros positivos que se han tenido, la realidad sigue siendo triste, dado que se siguen presentando un sinnúmero de anomalías dentro de la Reserva, principalmente en lo que se refiere a su vigilancia. Actualmente se han implementado mecanismos de protección mediante el bardaje perimetral de algunas de las zonas que la constituyen. Sin embargo; en los espacios abiertos al acceso público que son los que albergan las zonas más grandes, como el espacio escultórico y el Jardín Botánico, sería indispensable controlar el ingreso para evitar basureros, el saqueo ilegal de plantas y animales, la invasión de especies no nativas, los incendios provocados y la interferencia con quienes llevamos a cabo proyectos de investigación.

#### **4.4. Ubicación**

La REPSA se localiza al suroeste del Distrito Federal en la Delegación Coyoacán, coordenadas 19 17'N, 99 11'O, dentro de los terrenos de Ciudad Universitaria (**Fig. 4**) ([www.repsa.unam.mx](http://www.repsa.unam.mx)).



#### 4.6. Orquideoflora

Las características biológicas de las orquídeas, como su estrecha asociación con hongos micorrízicos, permitieron que se adaptaran en las lavas del Pedregal de San Ángel, sirviendo éste como uno de los refugios más importantes para estas plantas dentro del Valle de México (Álvarez *et al.*, 1982; Soto, 1983).

Desde el trabajo de Rzedowski (1954) hasta la fecha, se han realizado diversos listados florísticos en donde se refiere un número distinto de géneros y especies de orquídeas registradas para el Pedregal de San Ángel. El dato más reciente menciona la presencia de 16 géneros y 29 especies, prácticamente todas terrestres, excepto *Epidendrum anisatum* de hábito epífita (Salazar, 2009). De acuerdo con la NOM-059-ECOL-2001, solamente dos de ellas están catalogadas bajo alguna categoría de protección, tal es el caso de *Bletia urbana* registrada como amenazada (A) y *Galeottiella sarcoglossa*, como sujeta a protección especial (Pr) (SEMARNAT, 2002).

Se sabe que la familia Orchidaceae está constituida por cinco subfamilias (Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae), de las cuales solamente cuatro están presentes en México (Soto y Salazar, 2004). La orquideoflora del Pedregal de San Ángel, está representada por dos de estas subfamilias que son Orchidoideae y Epidendroideae. Los géneros *Bletia*, *Malaxis* y *Habenaria* son los que presentan mayor número de especies y la subtribu Spiranthinae, que incluye siete géneros y diez especies (a la cual pertenece la especie de estudio de esta investigación), es el grupo taxonómico mejor representado para este ecosistema (Salazar, 2009).

Todas las orquídeas terrestres del Pedregal presentan la forma de vida denominada criptofita, lo que significa que pierden las hojas durante la temporada de sequía, pero permanecen bajo el suelo sus órganos de perennación (cormos o raíces tuberosas); excepto *Cyrtopodium macrobulbon*, la cual presenta tallos aéreos o pseudobulbos (Salazar, 2009).

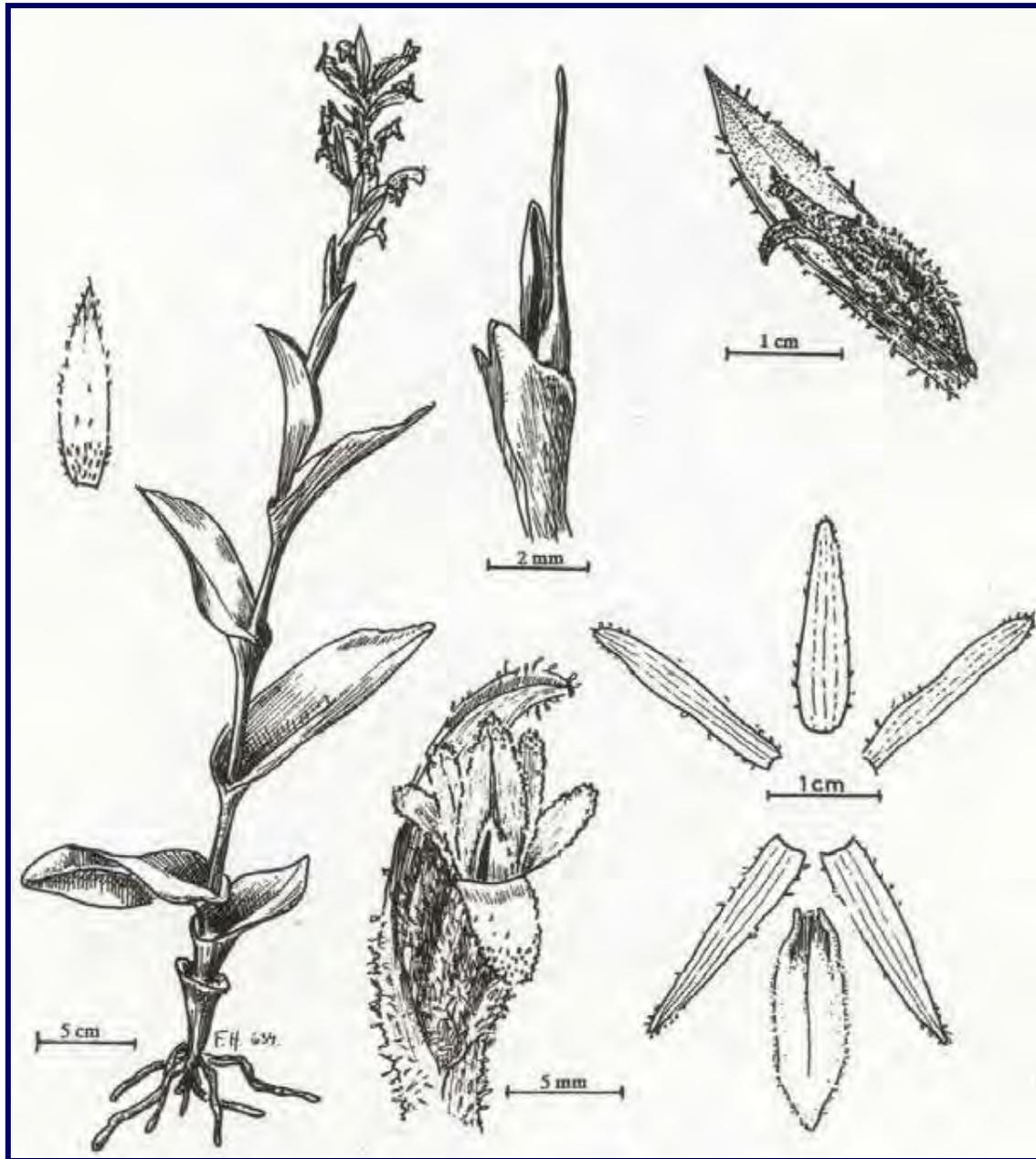
#### **4.7. *Dichromanthus aurantiacus* (La Llave y Lexarza) Salazar y Soto Arenas**

Una de las orquídeas mejor representadas en El Pedregal es *Dichromanthus aurantiacus* (La Llave & Lexarza) Salazar & Soto Arenas. Esta orquídea se puede considerar como una especie modelo por estar bien adaptada a las condiciones ambientales y porque es fácil tener un banco de semillas (Ortega y Rangel, 2007). Cada planta adulta de esta especie en su ambiente natural, llega a formar desde 2 hasta 17 cápsulas, las cuales se desarrollan en un periodo de tiempo relativamente corto de seis a ocho semanas (Rangel-Villafranco, com. pers.). Esta orquídea forma parte de las denominadas *cutsis*, debido a las flores tan llamativas que presenta, por lo que ha sido utilizada como flor de corte (Téllez, 2002). Es polinizada por los colibríes *Amazilia beryllina* e *Hylocharis leucotis* (Hágsater *et al.*, 2005).

##### **4.7.1. Descripción botánica**

Es una planta herbácea perenne, densamente pilosa en la parte superior, ennegreciéndose al secar, hasta de 1 m de alto; raíces abundantes, fasciculadas, algo carnosas, de unos 5 cm de largo y  $\pm$  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 cm de ancho, subobtusada a aguda, margen ondulado; inflorescencia en forma de espiga densa hasta de 25 cm de largo, con 2 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, conduplicado, 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. Se distribuye desde Chihuahua hasta Centroamérica (**Fig. 5**) (Peña, 1990).



**Figura 5.** Lámina de una planta adulta de *Dichromanthus aurantiacus* (La Llave & Lexarza) Salazar y Soto-Arenas (Fuente: Peña, 1990).

#### 4.8. Problemática para su conservación

Desafortunadamente, la REPSA y sus orquídeas están sujetas a una enorme presión por distintos factores. Destacan la contaminación atmosférica, la lluvia ácida, la depredación de las plantas, la introducción de especies exóticas que desplazan a las especies nativas, los incendios frecuentes, el aumento de la temperatura de la Ciudad de México y la urbanización, generada por la demanda de vivienda en la capital, lo que ha dado lugar a la constante fragmentación de este ecosistema (González-Hidalgo *et al.*, 2001; Mera *et al.*, 2002, Castillo-Argüero, 2004; Cano-Santana *et al.*, 2006).

De acuerdo con la información florística disponible, el número original de especies en la comunidad era de aproximadamente 350 (Reiche, 1914; citado por Valiente-Banuet y García, 1990), de las cuales para 1987 existían ya solamente 226 especies originales. El cambio en el tiempo del número de especies originales, indica que la extinción de éstas, se incrementó de manera significativa, como consecuencia de procesos de perturbación intensos asociados con el saqueo y la urbanización de la zona (Valiente-Banuet y García, 1990).

Según Valencia (1977) mencionó no haber visto en las partes más bajas del Pedregal ninguna planta de *D. aurantiacus* en esta fecha, aunque años más tarde se describió nuevamente su presencia (Panti, 1984). Lamentablemente poblaciones de orquídeas de las especies *Bletia punctata*, *Cyrtopodium macrobulbon*, *Epidendrum anisatum*, *Habenaria strictissima* y *Liparis greenwoodiana* se han extinguido, evidencia que muestra la alta probabilidad que existe de que otras especies más tiendan a desaparecer en los próximos años (Hágsater *et al.*, 2005).

Aunado a la gran importancia de conservar este tipo de áreas, el establecimiento de protocolos de propagación y reintroducción para estas especies debe ser prioritario, dada la función biológica, ecológica y evolutiva que tienen en los ecosistemas. De ahí la importancia de la presente investigación, donde se proporcionan estrategias para la conservación tanto *in situ* como *ex situ* de *Dichromanthus aurantiacus*, con la finalidad de que puedan ser aplicadas para el estudio de otras especies de orquídeas terrestres que se encuentren amenazadas o en peligro de extinción, contribuyendo al rescate, conservación y restauración de la vegetación de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

## 5. REFERENCIAS.

Ackerman, J. D. 1998. Evolutionary potencial in orchids: patterns and strategies for conservation. *Selbyana* 19(1): 8-14.

Álvarez, J., Carabias, J., Meave, J., Moreno, P., Nava, D., Rodríguez, F., Tovar, C. y Valiente, A. 1989. Proyecto para la creación de una Reserva en el Pedregal de San Ángel. Cuadernos de Ecología N° 1. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 54 p.

Amorosi, M. R. 2006. Orquídeas. Reglas prácticas de cultivo, desarrollo y mantenimiento. Sociedad Editora Alquimia. San José, Costa Rica. 116 p.

Antonio, C. D. y Meyerson, L. A. 2002. Exotic Plant Species as Problems and Solutions in Ecological Restoration: A Synthesis. *Restoration Ecology* 10(4): 703-713.

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

Aronson, J., Floret, C., LeFloc'h, E., Ovalle, C. y Pontanier, R. 1993. Restoration and Rehabilitation of Degraded Ecosystems in Arid and Semi-Arid Lands. A View from the South. *Restoration Ecology* 1(1): 8-17.

Aronson, J., Clewell, A. F., Blignaut, J. N. y Milton S. J. 2006. Ecological Restoration: A new frontier for nature conservation and economics. *Journal for Nature Conservation* 14(3-4): 135-139.

Atwood, J. T. 1997. Some thoughts on Orchid Conservation 97. *Selbyana* 18(2): 151.

Ayala, G. y Juárez, A. 2008. Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Monumento Nacional. *Gaceta UNAM*. México, D.F.

Badilla, C. R. 1977. Estudio petrológico de la lava de la parte noreste del Pedregal de San Ángel. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. Tomo XXXVIII. Núm. 1. 40 p.

Baer, S. G., Blair, J. M., Collins, S. L. y Knapp, A. K. 2004. Plant community responses to resource availability and heterogeneity during restoration. *Oecologia* 139: 617–629.

Bakker, J. D. y Wilson, S. D. 2004. Using ecological restoration to constrain biological invasion. *Journal of Applied Ecology* 41: 1058–1064.

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

Cano, S. Z., Pisanty, S. I., Mendoza, H. E., León, R. R., Soberón, J., Tovar, E., Martínez, R. E., Ruiz, L. C. y Martínez, B. A. 2006. Ecología, conservación, restauración y manejo de las áreas naturales y protegidas del Pedregal del Xitle. Pp: 203-226. En: Oyama, K. y A. Castillo (coords.). *Manejo, conservación y restauración de los recursos naturales en México. Perspectivas desde la investigación Científica*. UNAM. México y Siglo XXI, México.

Carabias, J., Arriaga, V. y Cervantes, V. G. 2007. Las políticas públicas de la restauración ambiental en México: Limitantes, avances, rezagos y retos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 80: 85-100.

Carrillo, T. C. 1995. *El Pedregal de San Ángel*. Universidad Nacional Autónoma de México. 177 p.

Castillo, A. S., Montes, C. G., Romero, R. M. A., Martínez, O. Y., Guadarrama, C. P., Sánchez, G. I y Núñez, C. O. 2004. Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (D.F., México). *Bol. Soc. Bot. Méx.* 74: 51-75.

Castillo, A. S., Martínez, O. Y., Romero, R. M. A., Guadarrama, C. P., Núñez, C. O., Sánchez, G. I. y Meave, J. A. 2007. *La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Aspectos florísticos y ecológicos*. UNAM. México. 295 p.

Castillo, A. S., Martínez, O. Y., Meave, J., Hernández, A. M., Núñez, C. O., Santibañez, A. G. y Guadarrama, C. P. 2009. Flora: susceptibilidad de la comunidad a la invasión de malezas nativas y exóticas. Pp: 107-117. *In: Lot, A.*

(ed.) Biodiversidad del ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Libro conmemorativo del 25 aniversario de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 341 p.

Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W. y Barrett, R. L. 2003. Orchid Conservation. pp. 259-288. In: Dixon, K. W., Kell, S. P., Barrett, R. L. y Cribb, P. J. (eds.). Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.

De la Fuente, J. R. 2005. Aumenta en 24.5 hectáreas la Reserva Ecológica de Ciudad Universitaria. México, D. F. Gaceta UNAM.

De la Fuente, J. R., Drucker, C. R., Pérez, O. T. y Lot, H. A. 2006. Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Reglamento interno. Lineamientos para el desarrollo de actividades dentro de la Reserva Ecológica. UNAM. México. 29 p.

Diego, P. N. 1970. Contribución a la flora silvestre de los alrededores del Jardín Botánico de la UNAM. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. 186 p.

Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid Family. Dioscorides Press. Portland, Oregon. 313 p.

Dressler, R. L. 2005. How many orchid species?. Selbyana 26: 155-158.

Espejo, S. A., García, C. J., López, F. A. R., Jiménez, M. R. y Sánchez, S. L. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Orq. (Méx.) Vol. 16. Número único. 332 p.

Flores, V. L. 2006. Contribución al estudio de la familia Orchidaceae en la Reserva del Pedregal de San Ángel y en algunas zonas perturbadas por la urbanización de la Ciudad Universitaria UNAM, México, D. F. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 110 p.

González, H. B., Orozco, S. A. y Diego, P. N. 2001. La vegetación de la Reserva Ecológica Lomas del Seminario, Ajusco, México. Bol. Soc. Bot. México 69: 77-99.

Gross, M. y Hoffmann, H. R. 2005. Ecological restoration as a real-world experiment: designing robust implementation strategies in an urban environment. Public Understanding of Science 14: 269-284.

Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez-Machorro, R., López-Rosas, M. A. y Dressler, R. L. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín. México. 304 p.

Hernández, M. y Ramos, A. 2008. Blinda UNAM Área Protegida. Periódico Reforma. México.

Herrera L. A. y Almeida L. L. 1994. Relaciones fitogeográficas de la flora vascular de la reserva del Pedregal de San Ángel, México, D.F. Pp 83-90. *In*: A. Rojo (Comp.), Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Ángel: Ecología, Historia Natural y Manejo. UNAM, México. D. F.

Hobbs, R. y Norton, D. 1996. Towards a Conceptual Framework for Restoration Ecology. *Restoration Ecology* 4(2): 93-110.

Hobbs, R. J. y Harris, J. A. 2001. Restoration Ecology: Repairing the Earth's Ecosystems in the New Millennium. *Restoration Ecology*. 9 (2):239-246.

Holl, K. D., Loik, M. E., Lin, E. H. V. y Samuels, I. A. 2000. Tropical montane forest restoration in Costa Rica: overcoming barriers to dispersal and establishment. *Restoration Ecology* 8: 339-349.

Mera, O. L. M., Zárate, A. A. y Sandoval, A. Y. 2002. El Herbarium del Pedregal de San Ángel. *Ciencias* 67 (Julio-Septiembre): 42-43.

Ortega, L. M. P. y Rangel, V. M. 2007. Fungus assisted reintroduction and long-term survival of two mexican terrestrial orchids in the natural habitat. *Lankesteriana* 7(1-2): 317-321.

Ortega, L. M. P. 2008. Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. Pp:85-96. En: Álvarez y Monroy (Comp.) Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. UNAM. México.

Panti, M. M. A. 1984. Contribución al conocimiento del Pedregal de San Ángel sobre el problema de su flora y conservación. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 72 p.

Peña, M. 1990. *Orchidaceae*. Pp 86-95 *In*: J. Rzedowski, W. Rzedowski. Flora fanerogámica del Valle de México, Vol. III Monocotiledóneas. Instituto de Ecología. UNAM. México D. F.

Pupulin, F. 2005. Conservación de orquídeas: una guía para autoridades administrativas. Universidad de Costa Rica. Jardín Botánico Lankester. 37 p.

Ramsay, M. M. y Dixon K. W. 2003. Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. Pp 259-288. *In*: Dixon, K. W., Kell, S. P., Barrett, R. L., Cribb, P. J. *Orchid conservation*. Natural History publications. Malaysia.

Reiche, C. 1914. La vegetación de los alrededores de la Ciudad de México. Tipografía Moderna. México, D. F. 145 pp.

Rivero, S. O. 1983. Acuerdo que beneficia a la zona sur del Distrito Federal. La Reserva Ecológica de Ciudad Universitaria. México, D. F. Gaceta UNAM.

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

Rojo, A. y Rodríguez, J. 2002. La flora del Pedregal de San Ángel. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT. México, D. F. 84 p.

Rozzi, R., Primarck, R., Feinsinger, P., Dirzo, R. y Massardo, F. 2001. ¿Qué es la biología de la conservación?. Pp. 35-58. *In*: Rozzi, R., R. Primarck, P. Feinsinger, R. Dirzo y F. Massardo (eds.). *Fundamentos de la conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica, México.

Rzedowski, J. 1954. Vegetación del Pedregal de San Ángel (Distrito Federal, México). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional*. 8: 59-129.

Rzedowski, J. y Calderón, G. 1989. Sinopsis numérica de la flora fanerogámica del Valle de México. *Acta Botánica Mexicana* 8: 15:30.

Salazar, G. A. 2009. Orquídeas. Pp: 153-169. *In*: A Lot (ed.) *Biodiversidad del ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel*. Libro conmemorativo del 25 aniversario de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Sánchez, O. 2005. Restauración ecológica: algunos conceptos, postulados y debates al inicio del siglo XXI. Pp: 15-29. *En*: *Temas sobre Restauración Ecológica*. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México.

Santibáñez, A. G. 2005. Caracterización de la Heterogeneidad Ambiental en la Reserva del Pedregal de San Ángel. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 67 p.

Sarmiento, F. M. 1995. Consideraciones sobre aspectos reproductivos y ecología de especies de géneros de la familia Orchidaceae en el Pedregal de San Ángel. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. 76 p.

Sarr, D., Puettmann K., Pabst, R., Cornett M. y Arguello L. 2004. Restoration ecology: new perspectives and opportunities for forestry. *Journal of Forestry* 102: 20-24.

Sarukhán, K. J. 1990. Acuerdo por el que se redefine la zona de la Reserva Ecológica de Ciudad Universitaria. México, D. F. Gaceta UNAM.

Sarukhán, K. J. 1996. Recupera la UNAM la Reserva Ecológica de la Cantera Oriente. México, D.F. Gaceta UNAM.

Sarukhán, K. J. 1997. Acuerdo por el que se reestructura e incrementa la zona de la Reserva Ecológica y se declaran las Áreas Verdes de Manejo Especial de la Ciudad Universitaria. México, D. F. Gaceta UNAM.

Schmitter, E. 1953. Investigación petrológica en las lavas del Pedregal de San Ángel. Memoria del Congreso Científico Mexicano de Geología. UNAM. México, D.F. 3: 218-237.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial (Segunda sección). 6 de marzo. México, D.F. 85 p.

Sociedad Internacional para la Restauración Ecológica. 2004. The SER international Primer on Ecological Restoration.

Soto, M. A. 1983. Vegetales de México. El Pedregal de San Ángel: un refugio natural de orquídeas. *Ocelote (Méx.)* 1: 9-11.

Soto, A. M. A. 1996. México. Pp. 53-58. *In*: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids-Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.

Soto, A. M. A. y Salazar, G. A. 2004. Orquídeas. Pp. 271-295. *In*: García-Mendoza A. J., Ordóñez, M. J. y Briones-Salas, M. (eds.) Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. México.

Soto, A. M. A., Solano, G. R. y Hágsater, E. 2007. Risk of extinction and patterns of diversity loss in mexican orchids. *Lankesteriana* 7(1-2): 114-121.

Suárez, B. E y Mora, L. J. 2007. Como cultivar orquídeas en su casa. Mundo Gráfico de San José. Costa Rica. 225 p.

Téllez, V. A. 2002. The Pedregal of San Angel and its Orchids. *Orchid Review* 110 (1242): 25-29.

Téllez, V. A. 2003. Orchid Collection at the National Autonomus University of Mexico. Special Report. American Orchid Society. pp. 812-813.

Toledo, V. M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. XIV, Núm. 81: 17-30.

IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. *Orchids-Status Survey and Action Plan*. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK. 153 p.

Valencia, A. 1977. Notas acerca de las orquídeas del Pedregal de San Ángel, México, D.F. *Orquídea (Méx.)* 6(7): 211-215.

Valiente B. A. y De Luna G. E. 1990. Una lista florística actualizada para la reserva del Pedregal de San Ángel, México. D. F. *Acta Botánica Mexicana* 9: 13-30.

Wells, T. C. y Willems, J.H. 1991. *Population Ecology of Terrestrial Orchids*. SPB Academic Publishing. Netherlands. 189 p.

Young, T. P. 2000. Restoration ecology and conservation biology. *Biological Conservation* 92: 73-83.

Young, T. P., Petersen D. A. y Clary, J. J. 2005. The ecology of restoration: historical links, emerging issues and unexplored realms. *Ecology Letters* 8: 662-673.

## **CAPÍTULO 2. Proceso germinativo *in vitro* de *D. aurantiacus* por la vía simbiótica y asimbiótica.**

### **1. INTRODUCCIÓN.**

En la naturaleza, se ha documentado que las orquídeas presentan bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y escaso reclutamiento de nuevos individuos (Arditti, 1992). A pesar de los miles a millones de semillas que producen por cápsula (Mitchell; 1989; Chávez, 1980; Hágsater *et al.*, 2005), se dificulta su germinación y desarrollo porque sus semillas son muy pequeñas, miden de 0.25 a 1.20 mm de largo y de 0.09 a 0.27 mm de ancho (Arditti, 1992). En su interior contienen un embrión diminuto prácticamente indiferenciado que carece de endospermo, por lo que las reservas energéticas se encuentran en cantidad limitada (Arditti, 1967; 1992). Las principales reservas energéticas que contienen las células de los embriones son lípidos y proteínas, aunque también se han observado gránulos de almidón y otros carbohidratos (Harrison, 1977; Leroux *et al.*, 1995; Suárez, 2006).

No obstante las escasas reservas energéticas que contienen las semillas, gracias al establecimiento de una relación simbiótica con hongos micorrízicos que les proporcionan nutrimentos, pueden germinar formando plántulas que logran establecerse en condiciones naturales (Rasmussen, 1995). Por esta razón, al menos durante su germinación, las orquídeas son micoheterótrofas obligadas (Hágsater *et al.*, 2005). La asociación con la familia Orchidaceae se conoce como micorriza orquideoide (Peterson *et al.*, 2004) y es específica solo para estas plantas. Histológicamente se le caracteriza dentro de las endomicorrizas porque las hifas fúngicas (pelotones), se desarrollan invaginando las células radicales de la planta hospedera (Rasmusen, 2009).

Aunque todas las orquídeas dependen de la micotrofia durante alguna fase de su ciclo de vida, en las orquídeas terrestres esta relación es más estrecha que en las epífitas, ya que éstas por su tipo de hábitat en general tienen mayor acceso a la luz

para realizar fotosíntesis y volverse autótrofas con mayor rapidez (Rasmussen, 1995). En cambio en las orquídeas terrestres la micotrofia es un requerimiento absoluto durante la germinación de sus semillas y el desarrollo de plántulas, lo cual generalmente ocurre bajo el suelo en condiciones de obscuridad (Zettler, 1997).

Una herramienta biotecnológica de gran utilidad para la conservación y propagación rápida y masiva de plantas como las orquídeas, es el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) (Chávez y Rubluo, 1995; Arditti y Ernst, 2008). Con esta herramienta también ha sido posible la reintroducción de algunas especies a su hábitat natural (Rubluo *et al.*, 1993). Las estrategias de cultivo *in vitro* permiten la obtención de plantas, ya sea a través de la germinación de sus semillas o bien por medio de la multiplicación de algún fragmento de tejido vegetal.

Se recomienda que el material inicial para la propagación de una especie con fines de conservación sean semillas o estructuras que provengan directamente de la germinación de las mismas (Rubluo *et al.*, 1989; Fay, 1994). En el caso de las orquídeas el uso de semillas se facilita, ya que se pueden mantener viables por largos periodos de tiempo si se almacenan bajo condiciones controladas de temperatura (4 a 8° C) (Arditti, 1992) y humedad relativa (5%) (Seaton y Hales, 1989; Pritchard y Seaton, 1993). Aunque también se recomienda particularmente para las orquídeas terrestres que sus semillas se almacenen en condiciones de total obscuridad, porque los embriones son altamente sensibles a la luz (Zettler, 1997).

El presente capítulo tuvo como objetivo el establecimiento de un protocolo para la germinación asimbiótica de *D. aurantiacus* con el uso de distintos medios de cultivo y sustancias antioxidantes, debido a los problemas previos de oxidación descritos para esta especie (Rangel, 2006). Además, se estudió la germinación simbiótica con varios aislados, con la finalidad de poder comparar cualitativamente las diferencias que se obtienen al utilizar una u otra vía de propagación y poder obtener plantas que fueron reintroducidas en su hábitat natural, lo cual se abordará en el capítulo tres de este trabajo.

### **a. Germinación de las orquídeas**

De acuerdo con Arditti (1992), el proceso de germinación de las semillas inicia cuando el embrión absorbe agua a través de la cubierta seminal, produciendo un aumento de volumen que romperá la testa, comenzando así la división celular. La estructura resultante se denomina protocormo, que se diferencia en la zona apical en un meristemo de brote y hacia la zona basal produce la formación de rizoides. El protocormo continúa con su crecimiento y desarrollo hasta dar lugar a la formación de una plántula.

En la naturaleza la simbiosis micorrízica se inicia con la penetración de las hifas del hongo a través del suspensor del embrión (Clements, 1988). Las hifas de los hongos micorrízicos crecen formando pelotones u ovillos en las dos terceras partes inferiores del embrión en crecimiento. Las hifas exteriores a las estructuras de la raíz permiten la toma de la materia orgánica que está en el suelo, proporcionando nutrimentos tales como productos de carbono y minerales, para que los embriones puedan germinar y desarrollarse hasta constituir plantas autótrofas (Zettler *et al.*, 2003). La colonización del hongo dentro de los protocormos está regulada por sustancias producidas por las orquídeas, denominadas fitoalexinas. Aunque la evidencia no es conclusiva, se piensa que el hongo obtiene de la planta, vitaminas y hormonas vegetales (Arditti, 1992).

Los trabajos más recientes sugieren que esta asociación simbiótica no es mutualista, debido a que no existe un intercambio recíproco de beneficios entre el hongo y la planta. Las semillas de las orquídeas dependen de una asociación obligada con los hongos simbiotes durante su etapa aclorofila, pues además de ser incapaces de fotosintetizar en esta etapa, tienen un anabolismo incompetente para la producción de sustancias vitales como los aminoácidos (Rasmussen, 1995). Por esto se considera que las orquídeas son parásitas obligadas de los hongos durante su etapa de plántulas. Sin embargo, a pesar de que un gran número de especies permanecen bajo esta condición durante todo su ciclo de vida, otras al realizar

fotosíntesis se vuelven facultativamente dependientes de la colonización fúngica (Rasmussen 2002; Rasmussen y Rasmussen; 2009)

## **b. Hongos micorrízicos orquideoides**

Los endofitos que forman micorrizas con las orquídeas terrestres comúnmente son hongos del tipo *Rhizoctonias* y pertenecen a tres géneros anamórficos (asexuales) de Basidiomicetes: a) *Ceratorhiza*, b) *Epulorhiza* y c) *Moniliopsis* y a distintas variedades de teleomorfos (fase sexual) denominados *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella* y *Sebacina* (Moore, 1987; Warcup y Talbot, 1996). Las *Epulorhizas* parecen ser los más abundantes en las orquídeas terrestres (Zettler, 1997) y todos los hongos rizoctónicos se caracterizan por sus estructuras reproductoras asexuales que consisten de hifas septadas binucleadas o multinucleadas, con bifurcaciones a 90 ° en hifas jóvenes cerca del *septum*, con paredes gruesas en forma de cadenas o rosarios llamadas células moniliodes (Moore, 1987; Zettler, 1997).

De acuerdo con Rangel (2006), especies como *Bletia urbana*, *B. campanulata*, *Dichromanthus aurantiacus* y *D. cinnabarinus*, presentan una especificidad a nivel genérico en la asociación con sus endofitos micorrízicos. En las especies del género *Bletia* se encontró que están asociadas con hongos de la familia Tulasnellaceae, mientras que *D. aurantiacus* y *D. cinnabarinus* están asociadas con hongos de la familia Ceratobasidiaceae. A nivel de género, la especie *D. aurantiacus* está asociada con *Ceratorhizas*.

Rangel (2004) llevó a cabo el aislamiento de hongos micorrízicos de seis especies de orquídeas terrestres de la REPSA (*Bletia campanulata*, *B. urbana*, *Bletia* sp., *Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *Habenaria novemfida*), probando su efectividad al lograr la germinación simbiótica de semillas de siete especies de orquídeas de este hábitat. Con este trabajo se estableció por primera vez un banco de germoplasma de Hongos Micorrízicos Orquideoides (HMO), que se encuentra

resguardado en el Laboratorio de Microcosmos Bioedáfico del Instituto de Geología de la UNAM.

### c. Germinación simbiótica y asimbiótica

En condiciones *in vitro*, es posible realizar la germinación simbiótica y asimbiótica de semillas de orquídeas (Peterson *et al.*, 2004). En el primer caso se puede mantener la micotrofia en condiciones artificiales (Zettler, 1997), al cultivar las semillas junto con un inóculo de un hongo micorrízico orquídeoide en un medio de cultivo simple (Ortega-Larrocea, 2008). En la germinación asimbiótica, el medio de cultivo contiene los nutrimentos necesarios para que las semillas puedan germinar sin la presencia de un endofito. Esto fue demostrado por Knudson en 1922, quien fue el primero en dar a conocer un medio exitoso (constituido por una mezcla balanceada de minerales y una fuente de sacarosa) para la germinación asimbiótica de las semillas de orquídeas (Arditti, 1992).

El establecimiento de cultivos asistidos o no por los hongos micorrízicos tiene ciertas ventajas y desventajas. Con los cultivos asimbióticos se pueden germinar semillas y obtener un gran número de plantas en un medio con sacarosa, libre de patógenos, lo que facilita su manejo. Sin embargo esto es costoso y se requiere de sucesivos trasplantes aumentando la posibilidad de que los cultivos se contaminen (Castillo, 2002).

Por otro lado, el cultivo simbiótico promueve una mayor germinación, desarrollo y crecimiento en comparación con los cultivos asimbióticos (**Cuadro 2**), así como una mayor supervivencia de las plantas en la reintroducción (Castillo, 2002; Batty *et al.*, 2001; Batty *et al.*, 2006; Ortega-Larrocea y Rangel, 2007). A su vez, la propagación simbiótica es una forma de conservar a los hongos del suelo asociados con las orquídeas, por lo que también contribuye con la conservación del recurso edáfico (Ortega-Larrocea, 2008).

**Cuadro 2.** Ejemplos de germinación simbiótica y asimbiótica *in vitro* para algunas especies de orquídeas.

Espece	Tipo de germinación	Medio de cultivo	Tiempo de germinación	Porcentaje de germinación	Referencia
<i>Eulophia alta</i> (Linnaeus) Fawcet & Rendle	Asimbiótica	P723 (PhytoTechnology orchid seed sowing medium)	10 semanas dds*	56.1%	Johnson <i>et al.</i> , 2007
<i>Eulophia alta</i> (Linnaeus) Fawcet & Rendle	Simbiótica	Medio Básico de Avena	6 semanas dds*	70.1%	Johnson <i>et al.</i> , 2007
<i>Anoectochilus formosanus</i> Hayata	Asimbiótica	Murashige y Skoog	50 dds*	75.2 %	Chou y Chang, 2004
<i>Anoectochilus formosanus</i> Hayata	Simbiótica	Medio Básico de avena	50 dds*	79.5%	Chou y Chang, 2004
<i>Haemaria discolor</i> var. <i>dawsoniana</i>	Asimbiótica	Murashige y Skoog	50 dds*	72.1%	Chou y Chang, 2004
<i>Haemaria discolor</i> var. <i>dawsoniana</i>	Simbiótica	Medio Básico de Avena	50 dds*	80.9%	Chou y Chang, 2004
<i>Spiranthes magnicamporum</i>	Asimbiótica	Knudson C	30 dds*	45%	Anderson, 1991
<i>Spiranthes magnicamporum</i>	Simbiótica	Water agar	30dds*	90%	Anderson, 1991

\*dds= días después de la siembra.

#### **d. Germinación *in vitro* de especies de orquídeas de la REPSA**

*Bletia urbana* Dressler, orquídea amenazada, fue la primer especie de la REPSA en ser micropropagada asimbióticamente por medio de la técnica de cultivo asimbiótico (Chávez, 1980). Hasta 1998, se logró por primera vez su cultivo simbiótico (Ortega-Larrocea *et al.*, 2000).

Otras especies de orquídeas que han sido propagadas con éxito para este hábitat mediante su germinación simbiótica son: *Bletia campanulata*, *D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *Habenaria novemfida* (Rangel, 2004). Sin embargo, en los intentos por propagar de manera asimbiótica *D. aurantiacus*, no se obtuvieron resultados satisfactorios (Rangel, 2006). Esto se debió a que una vez que germinaban las semillas, no continuaban con su desarrollo más allá del estadio de protocormo debido a que se oxidaban hasta sufrir necrosis.

#### **e. Oxidación en el cultivo *in vitro***

La oxidación es un problema que se presenta eventualmente durante el CTV y se debe a la producción de sustancias fenólicas, que son metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta (Jiménez, 1998). Preece y Compton (1991) y Hu y Wang (1983), citados por Jiménez (1998), señalaron que cuando los compuestos fenólicos están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas de las células, éstos comienzan a mezclarse con el contenido de los plastidios y de otros organelos en donde están almacenadas las polifenoloxidasas. Esto genera una coloración oscura como consecuencia del proceso oxidativo. A su vez, los compuestos oxidados inhiben la actividad enzimática, dando como resultado el oscurecimiento total de los explantes y por consiguiente su necrosis. En el CTV esto se da comúnmente debido al efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, por la composición del medio de cultivo, por los cortes que se realizan en los explantes o incluso por el volumen y calidad del frasco de cultivo (Azofeifa, 2009). Sin embargo, este proceso también puede ocurrir durante

la germinación de las semillas, como se ha observado previamente para la germinación asimbiótica en *D. aurantiacus* (Rangel, 2006).

De manera general la prevención de la oxidación de los tejidos vegetales se puede hacer: a) removiendo los compuestos fenólicos producidos en el medio mediante un adsorbente, b) modificando el potencial rédox, lo cual cambia el pH, c) inactivando las enzimas fenolasas, d) colocando los explantes a baja luminosidad o en oscuridad, e) utilizando antioxidantes durante la preparación del explante o en el medio de cultivo (George y Sherrington; 1984; Azofeifa, 2009). Otros autores sugieren la utilización de medio de cultivo líquido en agitación constante, para diluir las sustancias fenólicas liberadas por los tejidos vegetales o bien realizar transferencias sucesivas de medios de cultivo, aunque esta última opción resulta muy laboriosa, con un alto costo en reactivos y mayor riesgo de contaminación (Jiménez y Guevara, 1996).

#### **f. Agentes antioxidantes.**

Algunos de los compuestos más utilizados como antioxidantes en el cultivo *in vitro* son:

- **Carbón activado (CA)**. Tiene la capacidad de remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado como el 5-hidroximetil-2-furaldehído (resultado de la deshidratación de la sacarosa), o bien liberadas por el explante (quinonas). El CA puede prevenir el crecimiento de callo, promover la morfogénesis (principalmente embriogénesis somática) y también funciona como promotor para la formación de raíces (George y Sherrington, 1984; Azofeifa, 2009). Dependiendo de la especie, su efecto puede ser promotor o inhibidor del crecimiento *in vitro* (Roca y Mroginski, 1991; Pan y Van Staden, 1998).

Dentro de los efectos benéficos del uso de CA en los cultivos *in vitro* de semillas y plántulas de orquídeas es que mejora la aireación en el medio y adsorbe el

etileno (inhibidor del crecimiento y la diferenciación de los tejidos vegetales). También tiene la función de adsorber hormonas vegetales y vitaminas, lo cual puede explicar su posible efecto como inhibidor del crecimiento (Fridborg y Eriksson, 1975; Constantin *et al.*, 1977; Fridborg *et al.*, 1978; Weatherhead *et al.*, 1978, citados por Arditti y Ernst, 1993).

- **Ácidos orgánicos.** Los ácidos orgánicos como el ácido cítrico (AC) (precursor de aminoácidos) y el ácido ascórbico (AS), además de ser agentes reductores o antioxidantes, tienen la capacidad de disminuir el pH en los cultivos *in vitro* (Roca y Mroginski, 1991). De tal manera la oxidación fenólica se reduce, ya que la enzima encargada de este proceso tiene su máxima actividad en un pH de 6.5, por lo que a medida que el pH disminuye se reduce su actividad (Ichihashi y Kako, 1977; citados por George y Sherrington, 1984).

-**Polivinilpirrolidona (PVP).** Compuestos como las proteínas, las amidas y las poliamidas, han sido adicionadas a los cultivos por reaccionar con los fenoles y restablecer la actividad enzimática. La poliamida más importante para este proceso es el PVP, que por medio de puentes de hidrógeno tiene la capacidad de adsorber metabolitos tóxicos como las polifenoloxidasas y otros fenoles (George y Sherrington, 1984; Arditti y Ernst, 1993, Azofeifa, 2009). A pesar de que este compuesto no siempre detiene la oxidación de los tejidos, ha sido utilizado con éxito en diferentes familias de plantas (George & Sherrington, 1984; Srivastava & Srivastava, 2004; Saucedo 2006). Sin embargo, no se encontraron descripciones de su uso como antioxidante en la germinación y cultivo *in vitro* de orquídeas.

## 2. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el proceso germinativo de la orquídea terrestre *D. aurantiacus*, tanto asimbióticamente aplicando compuestos antioxidantes, como simbióticamente mediante la utilización de distintos aislados micorrízicos.

### a. Objetivos particulares

- \* Utilizar algunas sustancias que previenen la oxidación de los tejidos vegetales (carbón activado, polivinilpirrolidona y ácidos cítrico y ascórbico) en tres medios de cultivo convencionales (Murashige y Skoog, Knudson C y Ernst), para establecer la germinación asimbiótica de *D. aurantiacus* y su posterior desarrollo *in vitro*.
- \* Utilizar varios aislados de hongos micorrízicos orquídeoides provenientes de plantas adultas y protocormos de *D. aurantiacus*, en la inducción de su germinación y desarrollo simbiótico *in vitro*.
- \* Comparar cualitativamente la germinación y el desarrollo simbiótico y asimbiótico de *D. aurantiacus* hasta su estado de plántula.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **a. Material biológico y procedimiento de esterilización**

Se utilizó germoplasma de dos cápsulas de *D. aurantiacus* recolectadas en la REPSA en el año 2002. Éstas fueron almacenadas durante cinco años a una temperatura promedio de 3 °C y 6% de H.R., en el banco de germoplasma del laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Instituto de Geología de la UNAM, con claves MCCBGQ44 y MCCBGQ46. Se homogeneizaron las semillas y se pesaron lotes de éstas con un peso previamente estandarizado de 0.001 g (Rangel-Villafranco, 2004), para obtener un rango de semillas entre 50 y 300 para cada ensayo. Éstas fueron colocadas en sobres de papel filtro Whatman N° 1, que se sellaron doblándolos y engrapando sus extremos.

La esterilización superficial de las semillas contenidas en los sobres se hizo en una solución con hipoclorito de sodio comercial (NaOCl con 6% de cloro activo) al 15% durante 15 min, seguido de tres enjuagues con agua destilada esterilizada dentro de la campana de flujo laminar. Para la siembra asimbiótica, los sobres se seccionaron y con una espátula se sembraron las semillas sobre el medio. En el caso de la siembra simbiótica las semillas se dejaron sobre restos del papel filtro que fueron colocados de manera circundante al inóculo fúngico.

#### **b. Germinación simbiótica y asimbiótica *in vitro* de *D. aurantiacus***

Para inducir la germinación asimbiótica y evitar el proceso de oxidación, las semillas de *D. aurantiacus* se sembraron en cajas de Petri (8 cm de diámetro) con 25 mL de medio cada una. Se utilizaron tres medios de cultivo distintos: 1) Murashige y Skoog (MS) (1962) al 50% de su concentración con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (Anexo 1.1. Medio MS), 2) Medio Knudson C (KC) (1946), con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (Anexo 1.2. Medio KC) y 3) Medio Ernst (ER) (1982), con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (Anexo 1.4. Medio ER). Para cada medio de cultivo se utilizó un tratamiento control y tres

tratamientos antioxidantes distintos que consistieron en la adición de: a) 2 g L<sup>-1</sup> de carbón activado (CA), b) 1 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP), c) una mezcla de ácido cítrico y ácido ascórbico (AC-AS) 100:150 mg L<sup>-1</sup>. En total se tuvieron 12 tratamientos. Cada tratamiento constó de tres repeticiones. El diseño factorial consistió en 3 medios × 3 tipos de antioxidante + 1 control × 3 réplicas.

Se cuantificó el porcentaje de germinación total obtenido para cada tratamiento a los 28 y 56 dds, considerando para cada fecha 2 variantes: 1) el porcentaje total de semillas que germinaron sin oxidarse y el porcentaje de semillas que germinaron, pero se oxidaron y 2) el porcentaje de germinación obtenido para cada estadio de desarrollo con y sin oxidación.

Para la germinación simbiótica, la siembra de las semillas se llevó a cabo en medio básico de avena (MBA) (Mitchell, 1989) (Anexo 1.4. Medio Básico de Avena), con diez aislados distintos de HMO. Los aislados están resguardados en el banco de germoplasma antes mencionado con las claves MCCBHQ11, 17, 24, 25, 28, 34, 36, 37, 40 y 41. Se incluyó un tratamiento testigo sin inóculo fúngico. El diseño factorial fue 1 medio de cultivo x 10 inóculos + 1 control x 2 réplicas.

Previo a la inducción de la germinación simbiótica, se realizó la resiembra de los aislados en medio papa-dextrosa-agar (PDA) (Anexo 1.5. Medio papa-dextrosa-agar) y se incubaron en obscuridad durante 30 días.

Una vez que se reactivó el crecimiento de la colonia, se tomó un cilindro de agar de la parte distal de ésta, de aproximadamente 0.5 cm de diámetro. Éste se colocó en la parte central de la caja de Petri con el medio MBA y se situaron las semillas dejando un cuadro de papel filtro debajo de éstas en cuatro puntos opuestos y equidistantes a partir del inóculo central, de manera que el crecimiento radial del hongo llegara hasta la zona donde fueron sembradas las semillas. Se realizaron dos repeticiones para cada ensayo.

A todos los medios utilizados se les ajustó el pH a 5.5, previa adición de agar bacteriológico (8.5 g L<sup>-1</sup> para los medios asimbióticos y 6 g L<sup>-1</sup> para el medio simbiótico) y se esterilizaron en una autoclave a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> durante 15 min.

Todos los tratamientos se incubaron a 25 ± 1 °C. En el caso de los cultivos asimbióticos, éstos se incubaron primero en oscuridad y a los 28 dds en luz bajo un fotoperiodo 16h con una iluminación de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Para los cultivos simbióticos, dada su rápida germinación, se colocaron en condiciones de luz a los 7 dds bajo las mismas condiciones de fotoperiodo e iluminación.

El número de semillas germinadas fue cuantificado bajo un microscopio estereoscópico (30 ×) a los 28 y 56 dds, para los tratamientos asimbióticos y solamente a los 28 dds para los simbióticos, debido a que el desarrollo fue mayor y las plántulas fueron subcultivadas a los 30 dds. La germinación se registró a partir de la imbibición de la semilla y ruptura de testa cuando los embriones presentaron polarización.

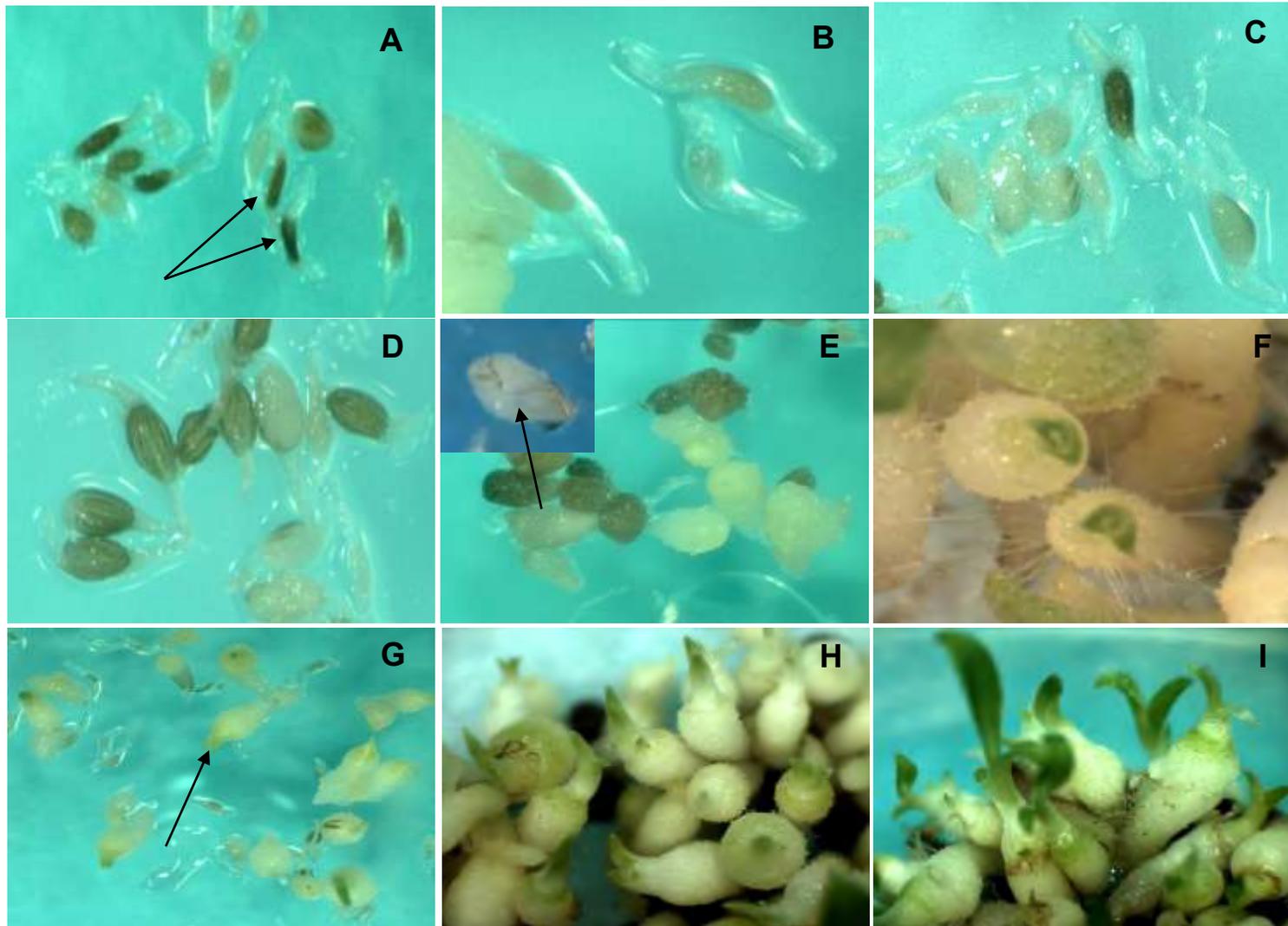
Los estadios considerados para describir la germinación y desarrollo asimbiótico y simbiótico de *D. aurantiacus*, fueron los propuestos por Zettler y McInnis (1993), y modificados según Rangel y Ortega-Larrocea (com. pers.) clasificados en una escala del 0-6. Éstos se describen en la **Figura 6**.

### c. Otras pruebas de germinación asimbiótica

Se llevaron a cabo otros ensayos para lograr la germinación asimbiótica y reducir la oxidación de las semillas de *D. aurantiacus*. Para pesar y desinfectar las semillas se siguió el mismo procedimiento antes señalado. Uno de los ensayos consistió en emplear el lote de semillas con clave MCCBGQ47 y nuevamente el medio de cultivo MS, pero modificado (MSm) por la reducción al 25% de los macronutrientes y al 50% del resto de los componentes y enriquecido por la adición de 500 mg L<sup>-1</sup> de extracto de banana (Sigma-Aldrich), 500 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa.

Para el otro ensayo se utilizó el mismo medio de cultivo (MSm), con dos lotes diferentes de semillas (MCCCBGQ27 y 47) en la misma caja de Petri en puntos opuestos, pero esta vez se dejó un cuadro de papel filtro, con la finalidad de que al sembrar las semillas no quedaran en contacto directo con el medio. Se obtuvieron así dos tratamientos con 10 repeticiones.

Se cuantificó el número de semillas germinadas a los 28 y 56 dds, considerándose los mismos estadios de desarrollo descritos anteriormente.



**Figura 6. Germinación asimbiótica de las semillas y etapas de desarrollo de *D. aurantiacus in vitro*.** A) Estadio 0. Semilla (8 ×), B) Estadio 0a. Semilla embebida sin ruptura de testa (16 ×), C) Estadio 1. Semilla embebida con ruptura de testa sin polarización “evidente” (16 ×), D) Estadio 1a. Semilla embebida con ruptura de testa y polarización (16 ×), E) Estadio 2. Protocormo sin rizoides (16 ×), F) Estadio 3. Protocormo con primordio foliar y rizoides (20 ×), G) Estadio 4. Protocormo con inicio de lámina foliar (8 ×), H) Estadio 5. Protocormo con lámina foliar en desarrollo (alargamiento de la hoja) (12.5 ×), I) Estadio 6. Protocormo con dos hojas y raíces (12.5 ×).

#### **d. Análisis estadístico**

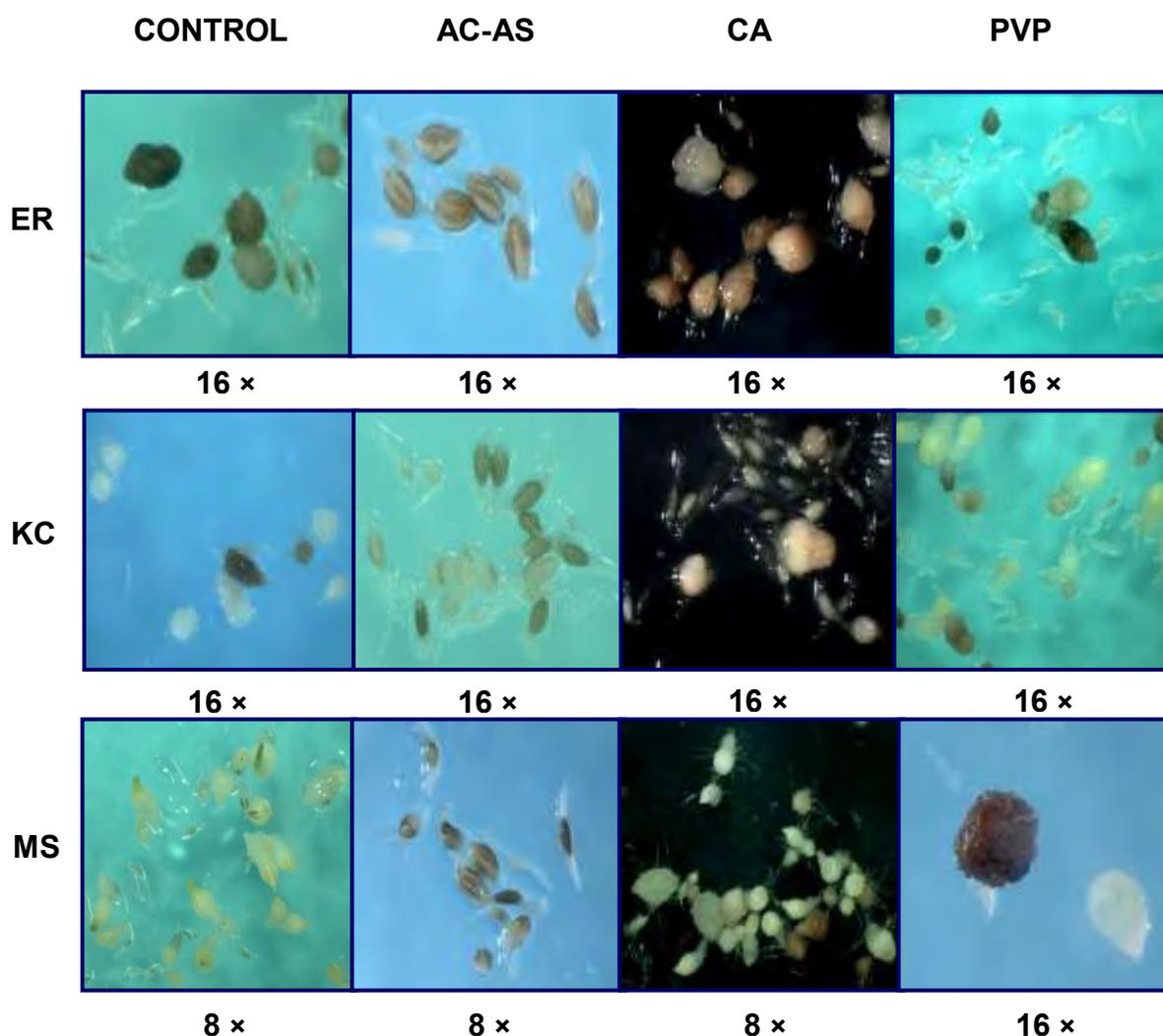
Para evaluar el efecto de los medios de cultivo, así como de los antioxidantes empleados en la germinación asimbiótica, los datos obtenidos de cada estadio de desarrollo a los 28 y 56 días de cultivo, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, corroborando la normalidad de éstos por medio de una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó un análisis de Tukey-Kramer para determinar las diferencias de medias estadísticamente significativas entre tratamientos. Todos los datos fueron transformados al arcoseno previo al corrimiento de las pruebas. Los análisis estadísticos se efectuaron mediante el programa *STATISTICA 7*, versión 6.

En el caso de las pruebas anexas de germinación asimbiótica, así como para la germinación simbiótica, no se tuvieron suficientes repeticiones para llevar a cabo un análisis estadístico.

#### 4. RESULTADOS.

##### a. Germinación asimbiótica

A los 28 días de cultivo *in vitro*, se registró la germinación asimbiótica de las semillas de *D. aurantiacus*, en los distintos medios de cultivo y tratamientos antioxidantes ensayados. Se observó la presencia de semillas en diferentes estadios de desarrollo, desde algunas en imbibición sin ruptura de testa hasta otras que formaron protocormos con primordios foliares y rizoides. Desde estas primeras etapas se presentó oxidación en algunos protocormos (Fig. 7).



**Figura 7.** Germinación asimbiótica de *D. aurantiacus*, a los 28 días después de la siembra, en los diferentes medios de cultivo y tratamientos antioxidantes.

Al analizar los datos provenientes de la germinación de las semillas de *D. aurantiacus* a los 28 dds, fue posible establecer una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, tanto para el medio de cultivo, los antioxidantes, así como para la interacción entre ambos factores (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del medio de cultivo y de los antioxidantes en la germinación asimbiótica de *D. aurantiacus*, a los 28 días de su cultivo *in vitro*.

<b>Variables independientes</b>	<b>F</b>	<b>Effect df</b>	<b>Error df</b>	<b>p</b>
<b>Medio</b>	6.5455	4	46	0.000295
<b>Antioxidante</b>	7.3077	6	46	0.000016
<b>Medio*Antioxidante</b>	3.5145	12	46	0.000991

De todos los tratamientos antioxidantes empleados a los 28 dds, en los medios MS al 50% control, MS al 50% con PVP y MS al 50% con AC-AS fue donde se obtuvo una respuesta germinativa significativamente mayor (52, 36 y 32% respectivamente), en comparación con los medios de cultivo KC y ER, tanto para los controles como con el uso de los distintos agentes antioxidantes (**Fig. 8**).

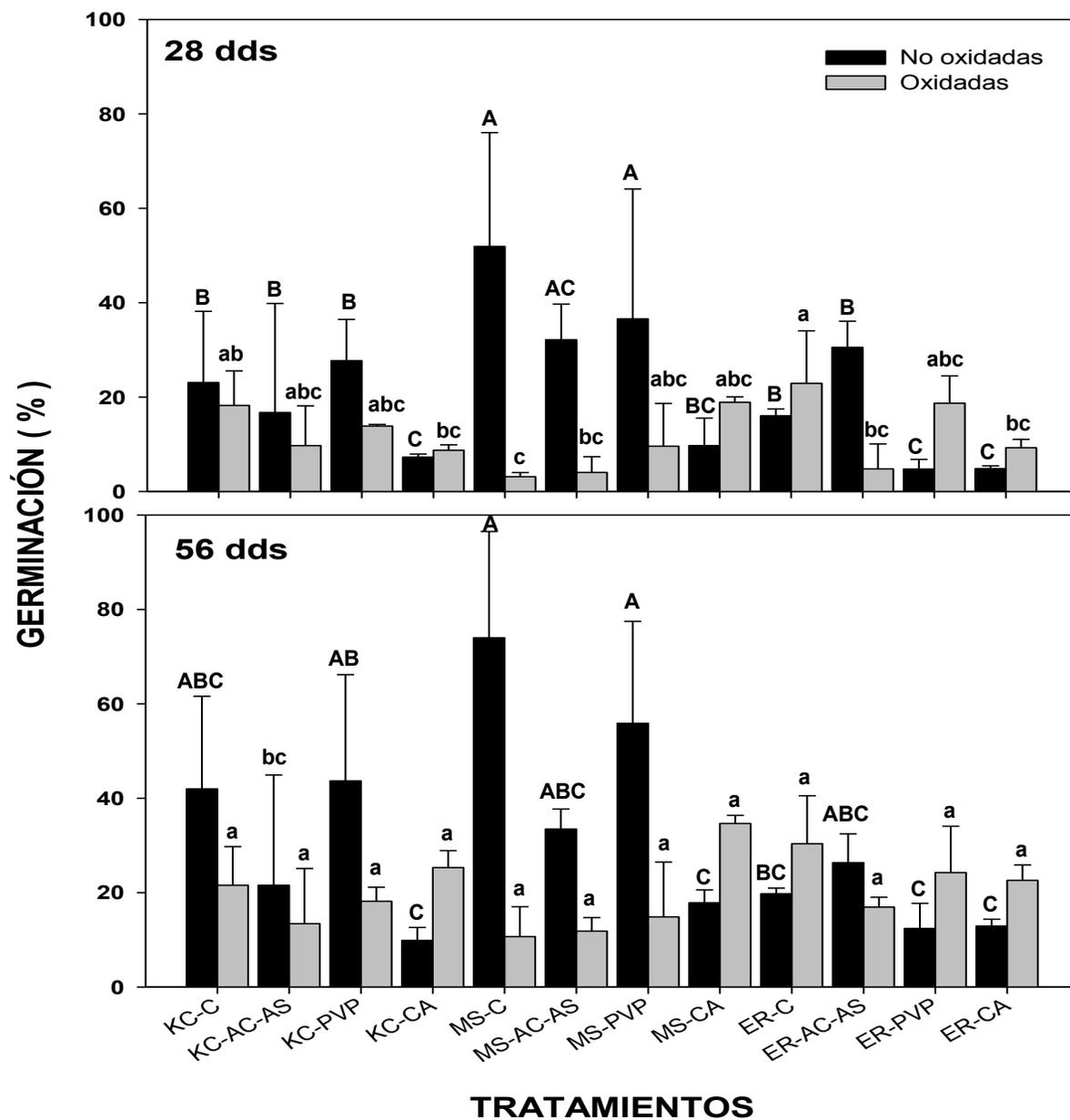
Al utilizar el PVP, el porcentaje de germinación de semillas no oxidadas fue mayor que el de las oxidadas para todos los medios obteniéndose mayores porcentajes que con el AC-AS (excepto en el medio ER). Para el CA se observó un efecto negativo, al incrementar la oxidación de las semillas en todos los casos (**Fig. 8**).

El análisis de varianza para la germinación a los 56 dds, también mostró que existen diferencias significativas dependiendo del medio de cultivo, de los antioxidantes y del efecto conjunto entre ambos (**Cuadro 4**). Para esta fecha, se encontró que en todos los tratamientos hubo un incremento en el porcentaje total de germinación, siendo nuevamente los tratamientos MS al 50% control y MS al 50% con PVP en los cuales se registró la mayor respuesta germinativa (74 y 56%, respectivamente), seguidos por los tratamientos KC con PVP (44%) y KC control (42%) (**Fig. 8**).

**Cuadro 4.** Análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del medio de cultivo y de los antioxidantes en la germinación asimbiótica de *D. aurantiacus*, a los 56 días de su cultivo *in vitro*.

<b>Variables independientes</b>	<b>F</b>	<b>Effect df</b>	<b>Error df</b>	<b>p</b>
<b>Medio</b>	8.9404	4	46	0.000020
<b>Antioxidante</b>	5.6534	6	46	0.000184
<b>Medio*Antioxidante</b>	4.0235	12	46	0.000289

El empleo de los antioxidantes mostró la misma respuesta que a los 28 dds, siendo evidente que su efecto sólo tiene valor dependiendo del medio de cultivo en el cual fueron adicionados. Por consiguiente, de los tres agentes antioxidantes utilizados, el PVP fue el que favoreció una mayor germinación de las semillas solamente al ser adicionado a los medios MS al 50% y KC. Efecto contrario se observó al utilizar CA en todos los casos. Con el empleo de AC-AS se redujo la oxidación en todos los casos, pero el porcentaje total de germinación obtenido en los tres medios de cultivo fue menor en comparación con los tratamientos control y con PVP (**Fig. 8**).



**Figura 8.** Porcentajes de germinación asimbiótica de semillas de *D. aurantiacus* ( $\pm$  ES), en los diferentes tratamientos antioxidantes a los 28 y 56 días de cultivo *in vitro*. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Medios KC= Knudson C; MS= Murashige & Skoog 50% y ER= Ernst. C= control, AC-AS= ácidos cítrico y ascórbico, PVP= polivinilpirrolidona y CA= carbón activado.

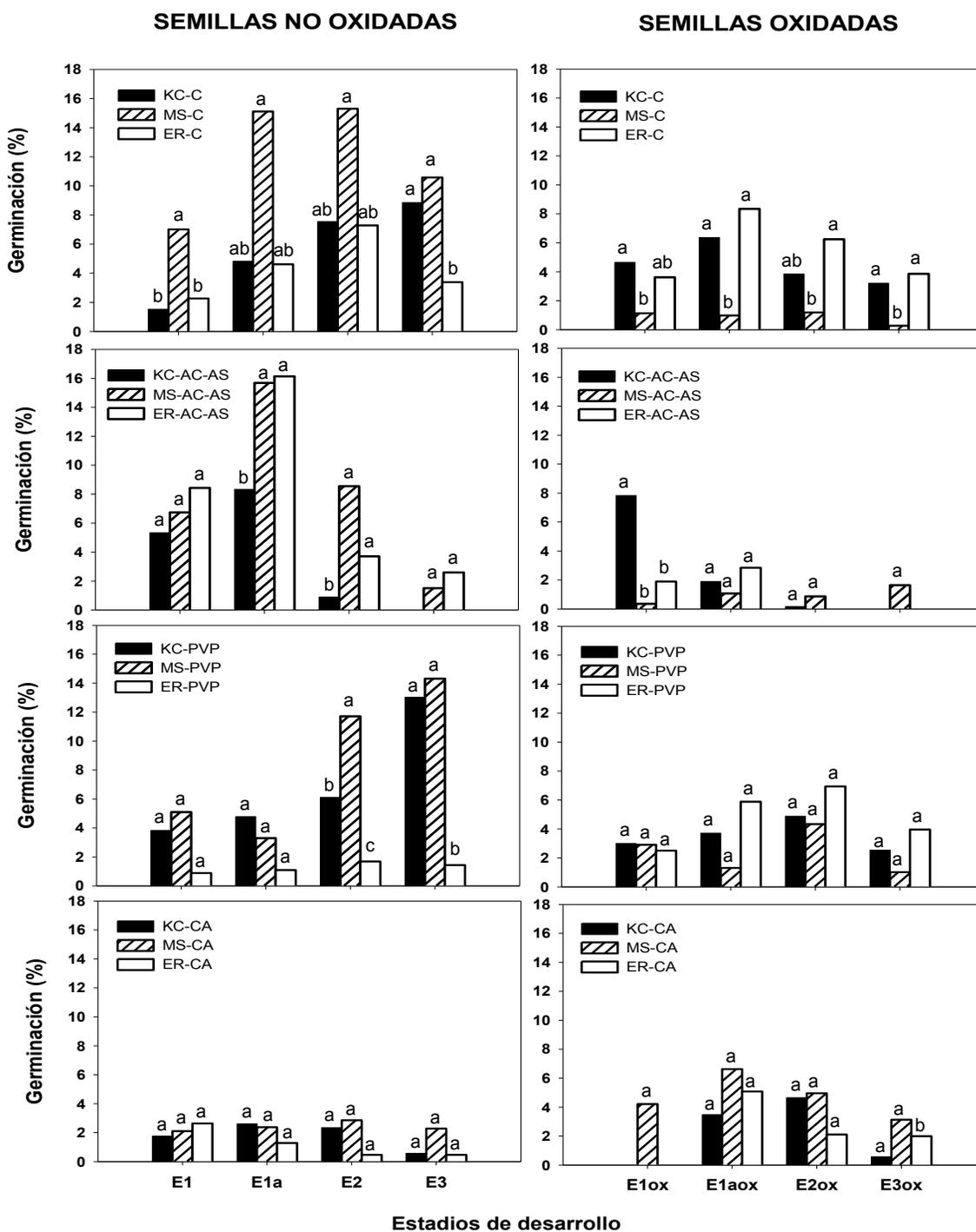
## b. Estadios de desarrollo durante la germinación asimbiótica

Analizando los porcentajes de germinación de semillas de *D. aurantiacus* obtenidos por estadios de desarrollo, se encontraron diferencias marcadas entre los distintos tratamientos empleados, tanto a los 28 como a los 56 días de cultivo *in vitro*.

En la **Figura 9**, se observa que el máximo estadio de desarrollo alcanzado a los 28 dds, tanto para las semillas que germinaron sin oxidarse como para las que se oxidaron fue el de protocormos con primordios foliares y rizoides en gran parte de los tratamientos ensayados (estadio 3). Para las semillas que germinaron sin oxidarse, en los medios de cultivo MS (50%) y KC adicionados con PVP fue donde se registraron los mayores porcentajes de protocormos en estadio 3, seguidos de los tratamientos control en los mismos medios. De manera contraria, con el empleo de AC-AS y CA en todos los medios de cultivo, el porcentaje de germinación de semillas no se vio favorecido para que éstas se desarrollaran hasta el estadio 3. En el caso de las semillas que germinaron pero se oxidaron se obtuvieron porcentajes menores al 5% para aquéllas que lograron desarrollarse hasta el estadio 3.

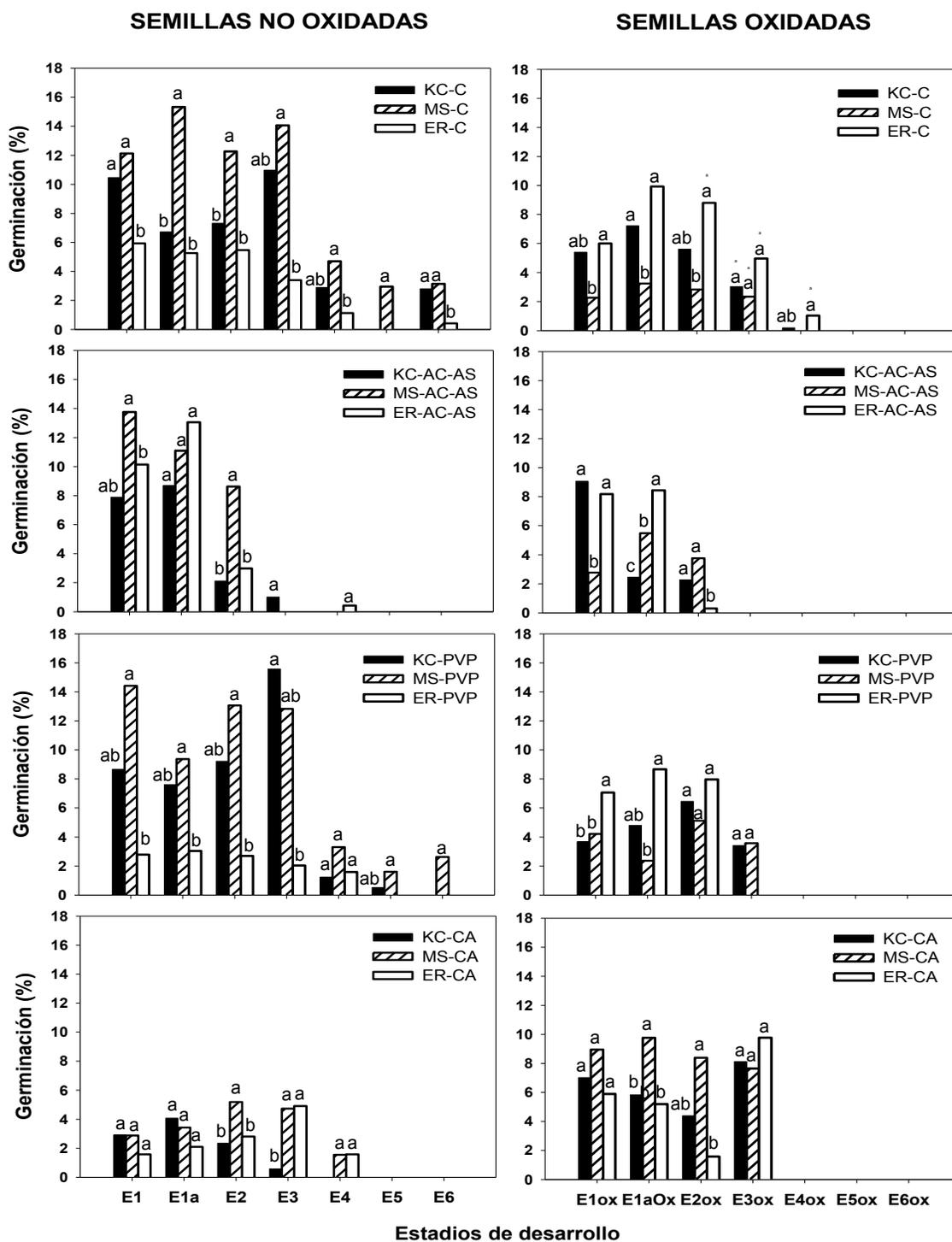
A los 56 días de cultivo *in vitro*, de manera general se observó que todas las semillas de los tratamientos control y las del medio MS al 50% con PVP que germinaron sin oxidarse, presentaron un mayor desarrollo hasta constituir protocormos con dos hojas (estadio 6). En comparación con las que germinaron y mostraron oxidación, el máximo desarrollo alcanzado fue la formación de un protocormo con el inicio de la lámina foliar (estadio 4), en los medios KC y ER control. En el caso de las semillas que germinaron y se oxidaron, el medio ER fue en el que las semillas mostraron un mayor porcentaje de oxidación para la mayor parte de los tratamientos. Mientras que, respecto a los antioxidantes el CA, fue el que tuvo el menor efecto para reducir la oxidación (**Fig. 10**).

28dds



**Figura 9.** Efecto comparativo del medio de cultivo y de los antioxidantes en el porcentaje de germinación asimbiótica de semillas por estadio de desarrollo de *D. aurantiacus*, después de 28 días de cultivo *in vitro*. Letras distintas en las barras para cada estadio indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

56dds



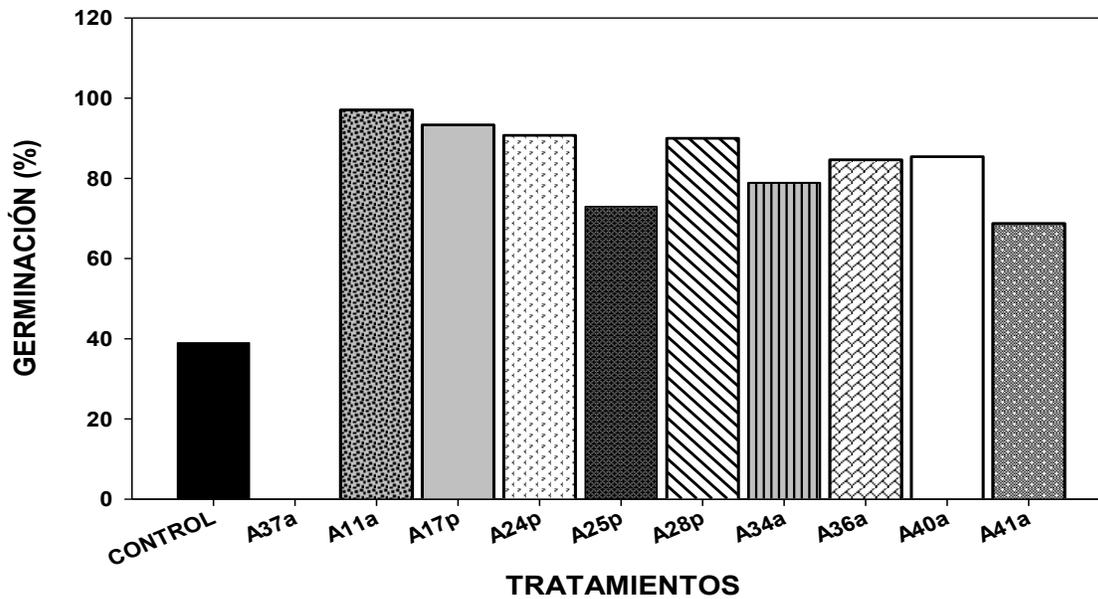
**Figura 10.** Efecto comparativo del medio de cultivo y de los antioxidantes en el porcentaje de germinación asimbiótica de semillas por estadio de desarrollo de *D. aurantiacus*, después de 56 días de cultivo *in vitro*. Letras distintas en las barras para cada estadio indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### c. Germinación simbiótica

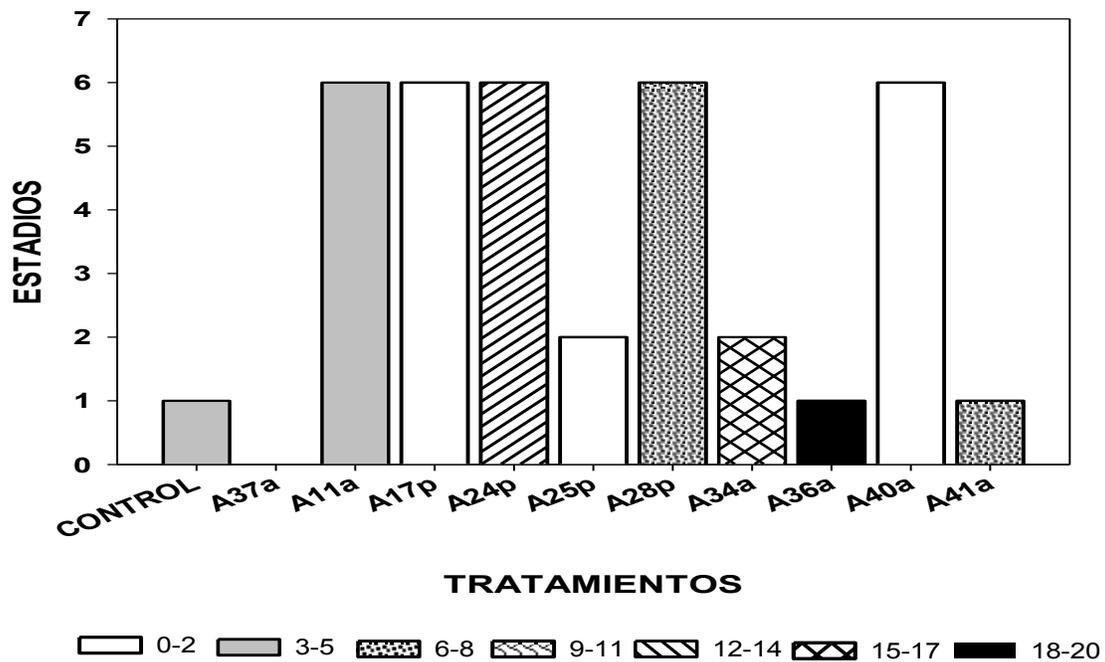
En la **Figura 11** se observan los resultados obtenidos para la germinación de las semillas con los aislados de hongos micorrízicos a los 28 dds. Menos del 40% de las semillas sembradas en ausencia de un hongo micorrízico (control) germinaron y ninguna de estas semillas se desarrolló más allá del estadio 1 (**Fig. 12**).

Al comparar el tratamiento control sin la presencia de hongos ni de azúcares con el resto de los tratamientos, es evidente que todos los aislados estimularon la germinación de las semillas y el posterior desarrollo de las plántulas formadas. La excepción fue el aislado 37 con el cual no se logró inducir la germinación por el crecimiento tan rápido del hongo que invadió a las semillas no permitiéndoles sobrevivir (**Figs. 13 y 14**). Todos los aislados utilizados estuvieron almacenados en el banco durante tres años. Con estos ensayos se probó que se mantiene la efectividad de los aislados para germinar las semillas.

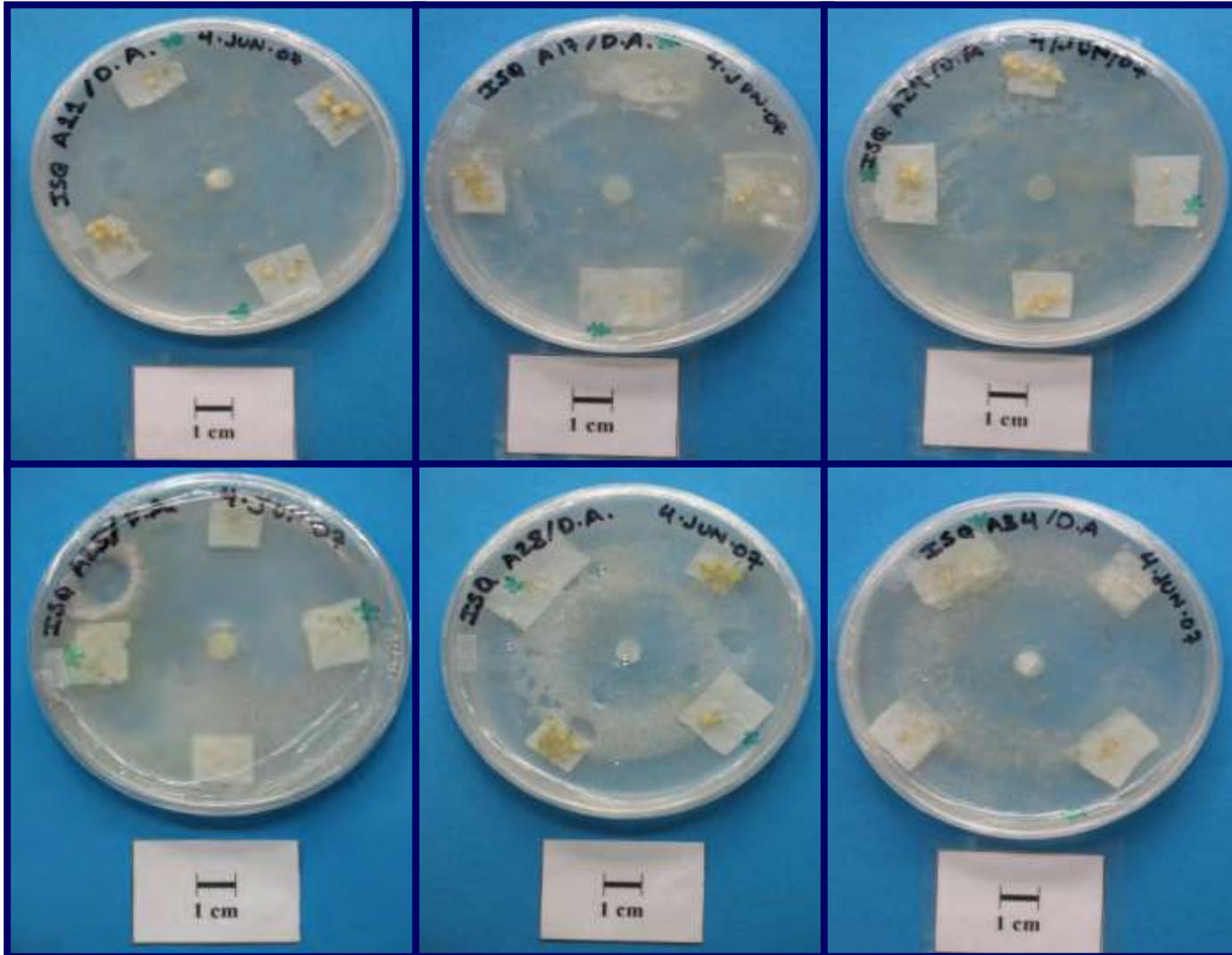
De los aislados que promovieron la germinación no todos lo hicieron de la misma manera, dado que con algunos de ellos se obtuvieron mayores porcentajes germinativos, así como un mayor desarrollo de los protocormos. Lo anterior no dependió de su origen, es decir si los aislados provenían de planta adulta o de un protocormo. El aislado 11 fue el más efectivo, éste provenía de una planta adulta de *D. aurantiacus* y favoreció una germinación muy cercana al 100%, seguido de los aislados 17 (93%) y 28 (90%). De manera opuesta, el aislado que tuvo el menor efecto en la germinación fue el número 41 (69%), cuyo origen fue también a partir de una planta adulta (**Fig. 11**). El cultivo simbiótico con los aislados 11, 17, 24, 28 y 40 promovió el crecimiento y desarrollo de los embriones, hasta constituir protocormos con dos hojas (estadio 6) (**Fig. 12**). Sin embargo, los aislados 25, 34 y 36 que ejercieron un menor crecimiento y desarrollo en las plantas promovieron porcentajes de germinación elevados (**Fig. 11**). El tratamiento control y el aislado 41, además de ser con los que se registraron los menores porcentajes de germinación total también promovieron un menor desarrollo de las semillas (**Figs. 11 y 12**).



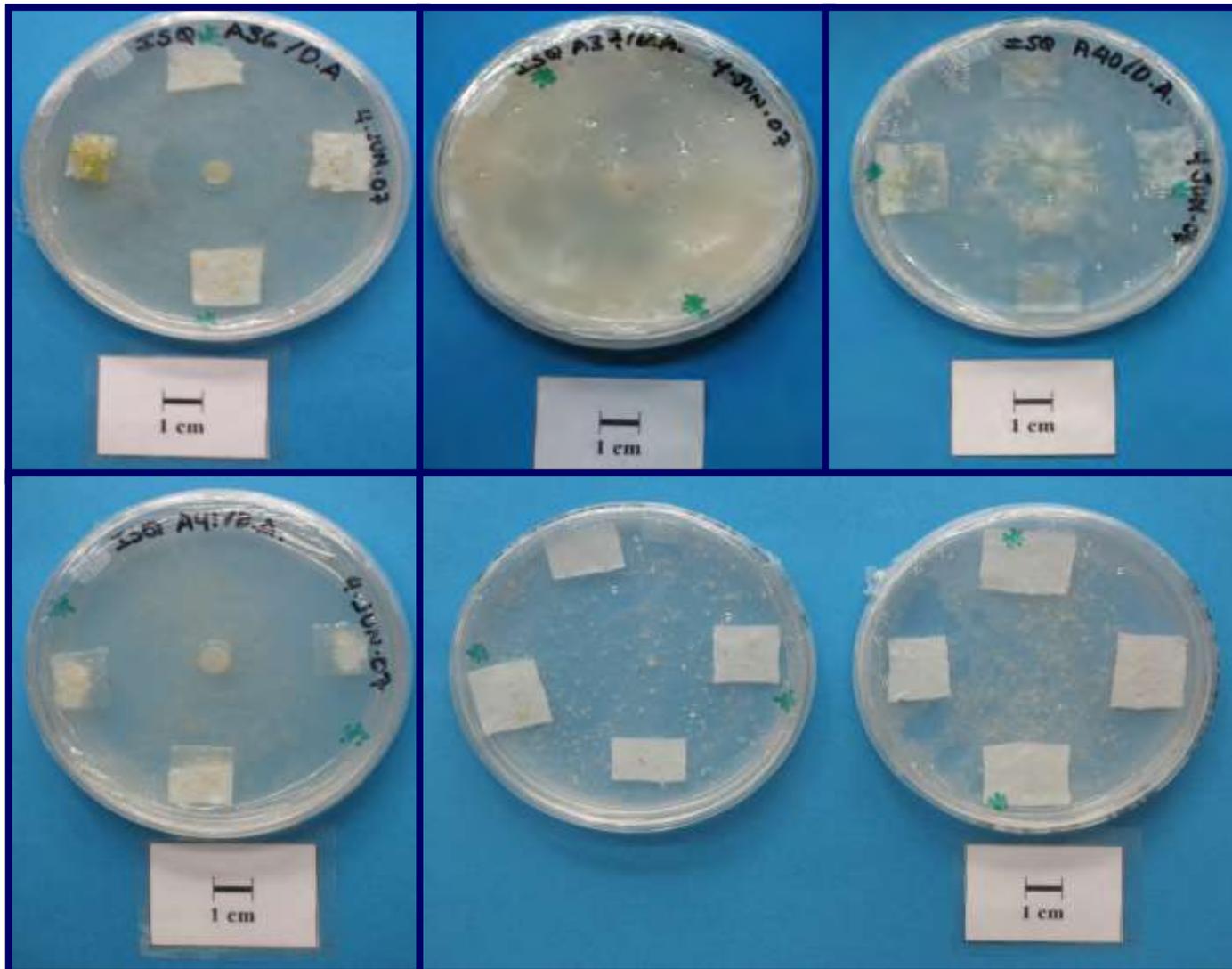
**Figura 11.** Porcentaje total de germinación simbiótica de las semillas de *D. aurantiacus*, en Medio Básico de Avena (MBA), con los diferentes aislados de hongos micorrízicos, a los 28 días de cultivo *in vitro*. La letra A con los números son las claves con las que se encuentran resguardados en el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Microcosmos Bioedáfico del Instituto Geología, UNAM. Las letras minúsculas se refieren a la procedencia de los aislados, donde a= planta adulta y p=protocormo.



**Figura 12.** Máximos estadios de desarrollo alcanzados por las semillas de *D. aurantiacus*, con los diferentes aislados de hongos micorrízicos. Las tramas de las barras indican el rango de porcentaje de germinación que se alcanzó en cada estadio a los 28 días de su cultivo *in vitro*.



**Figura 13.** Siembra simbiótica semillas de *D. aurantiacus* a los 28 días de cultivo *in vitro*, con los aislados de Hongos Micorrízicos Orquideoides (MCCBHQ11, 17, 24, 25, 28 y 34), del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Microcosmos Bioedáfico.



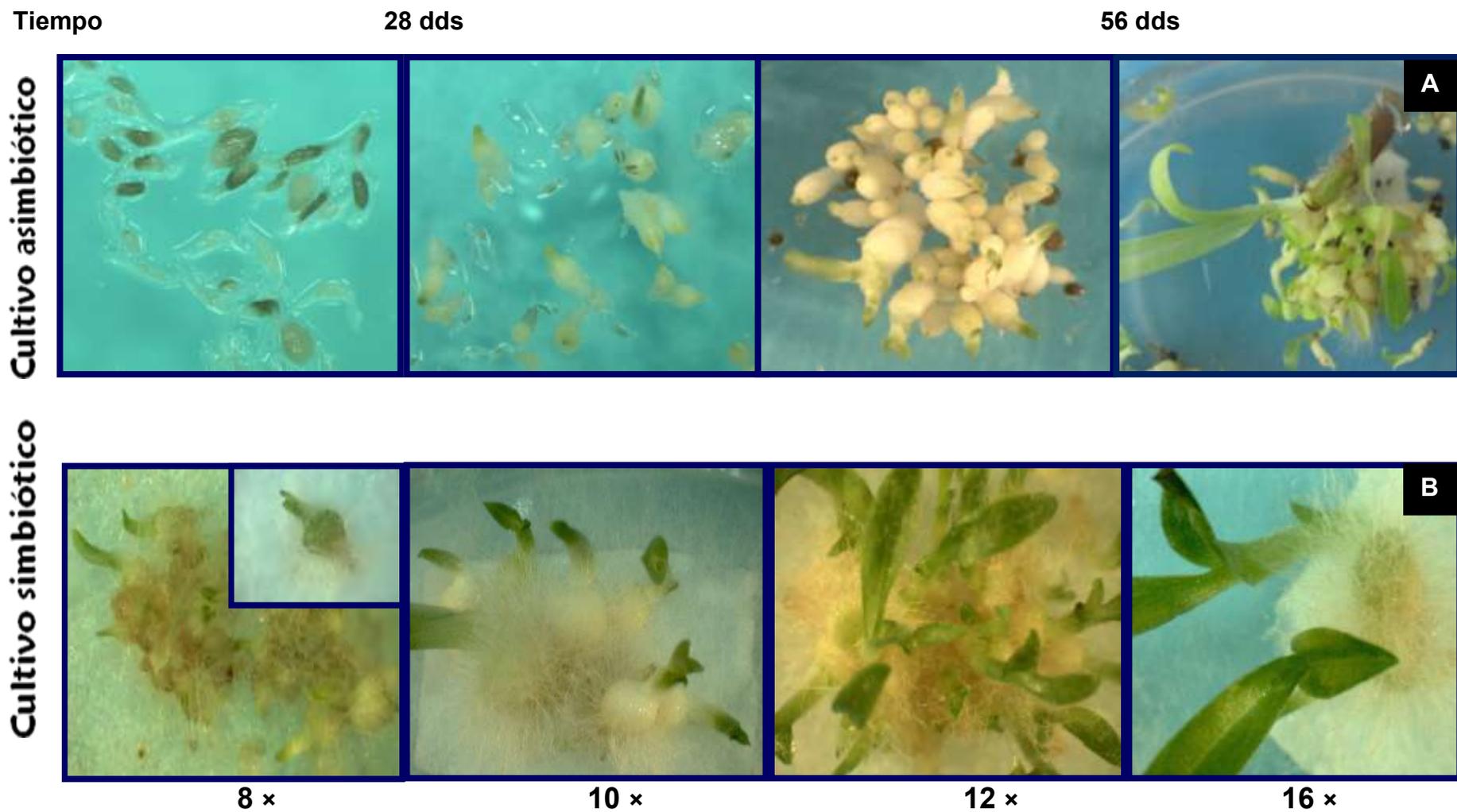
**Figura 14.** Siembra simbiótica de semillas de *D. aurantiacus* a los 28 días de cultivo *in vitro*, con los aislados de Hongos Micorrízicos Orquideoides (MCCBHQ36, 37, 40, 41 y tratamiento control), del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Microcosmos Bioedáfico.

#### **d. Morfología de las plantas cultivadas *in vitro***

Cualitativamente la germinación, el crecimiento y desarrollo de las plantas asimbióticas fue diferente al de las simbióticas. De manera general se observan diferencias marcadas en el tiempo. En los tratamientos simbióticos se alcanzaron los mayores estadios de desarrollo, formándose protocormos con dos hojas a los 28 dds, mientras que éstos se obtuvieron hasta los 56 dds para los tratamientos asimbióticos **(Fig. 15)**.

El protocormo, que es la primera estructura que se forma como resultado de la germinación de las semillas, en los tratamientos asimbióticos es de forma ovalada, mientras que en los simbióticos presenta forma de corazón. Además hacia la parte basal se observó una coloración café únicamente en los protocormos simbióticos, lo que es muestra del inicio de los ápices radiculares. Los rizoides fueron menos abundantes en las plantas asimbióticas en comparación con las plantas micorrizadas. Esta respuesta morfogénica distinta en las plantas simbióticas, se debe a que los rizoides sirven de estructura de salida para que el hongo pueda explorar el medio **(Fig.15)**.

Las hojas también presentan una morfología distinta, al ser más grandes y vigorosas en los tratamientos con los hongos micorrízicos. En las plantas simbióticas no se observó la presencia de raíces durante su cultivo *in vitro*, sino hasta que fueron establecidas en suelo en condiciones de invernadero. En las plántulas asimbióticas se observó su aparición a los 56 dds **(Fig. 15)**.



**Figura 15.** Monografía comparativa de la germinación asimbiótica (A) y simbiótica (B) y formación de plántulas de *D. aurantiacus*, a los 28 y 56 días de cultivo *in vitro*, respectivamente.

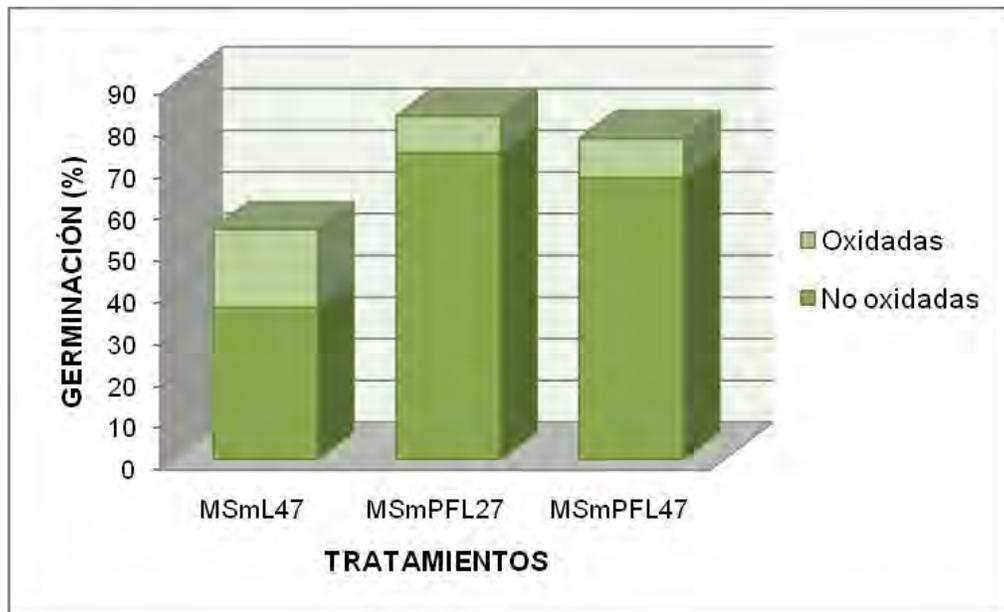
#### e. Otras pruebas de germinación asimbiótica

En la **Figura 16** se observa que el medio de cultivo MS modificado (MSm), también promovió a los 28 dds la germinación asimbiótica de las semillas de *D. aurantiacus*, en un porcentaje similar al obtenido antes con el medio de cultivo MS al 50% control (52%) (**Figura 8**).

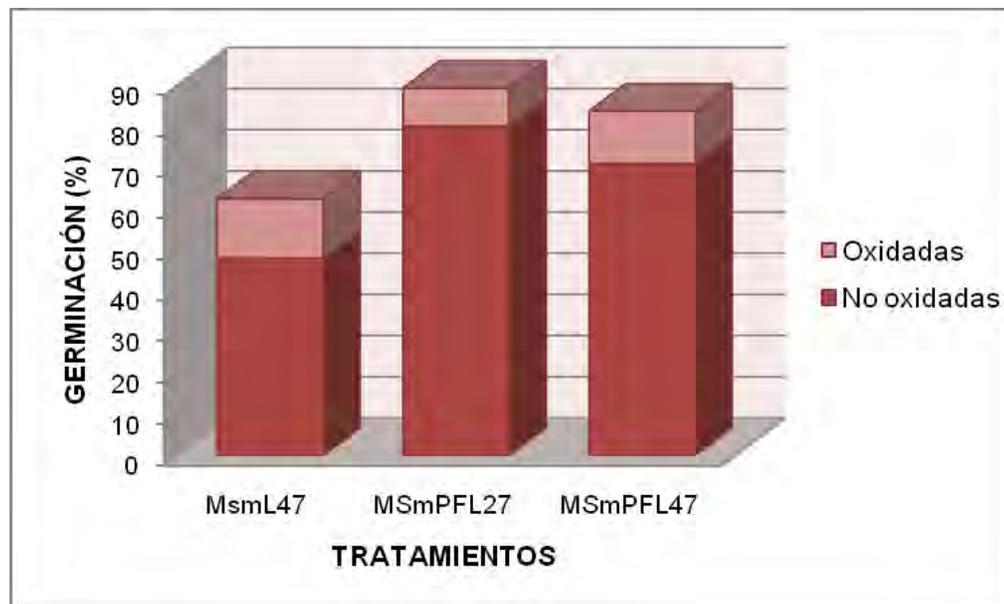
Sin embargo, del porcentaje total de germinación obtenido con el medio MSm (55%), el 19% de las semillas se oxidaron durante su desarrollo, porcentaje elevado de oxidación en comparación con el medio MS al 50% control, en donde únicamente se registró el 3% de oxidación de las semillas (**Fig. 16**).

De manera contrastante con los resultados antes señalados, fueron los obtenidos con el empleo del medio MSm, pero esta vez dejando un fragmento de papel filtro sobre el medio, sobre el cual se sembraron las semillas (MSmPFL27 y MsmPFL47). En este caso, tanto a los 28 como a los 56 dds se registraron los mayores porcentajes de germinación para ambos lotes de semillas utilizados (27 y 47% respectivamente), en comparación con todos los tratamientos antes probados en el presente trabajo. Así mismo, se observa que los porcentajes de oxidación registrados fueron menores al 10% para ambas fechas (**Figs. 16 y 17**).

Estos resultados forman parte de un pequeño ensayo que se realizó como complemento a las pruebas de germinación asimbiótica, con la finalidad de evaluar si al evitar el contacto directo de las semillas de *D. aurantiacus* con el medio de cultivo (colocándolas sobre papel filtro), se reducía la oxidación durante la germinación. Este ensayo también sirvió para probar la viabilidad de otros lotes de semillas que se tenían resguardados en el Banco de Germoplasma.



**Figura 16.** Germinación asimbiótica de semillas de *D. aurantiacus* a los 28 días de cultivo *in vitro*, utilizando papel filtro (PF). MSm= Medio MS modificado, L47= Lote de semillas N° 47, L27= Lote de semillas N° 27.

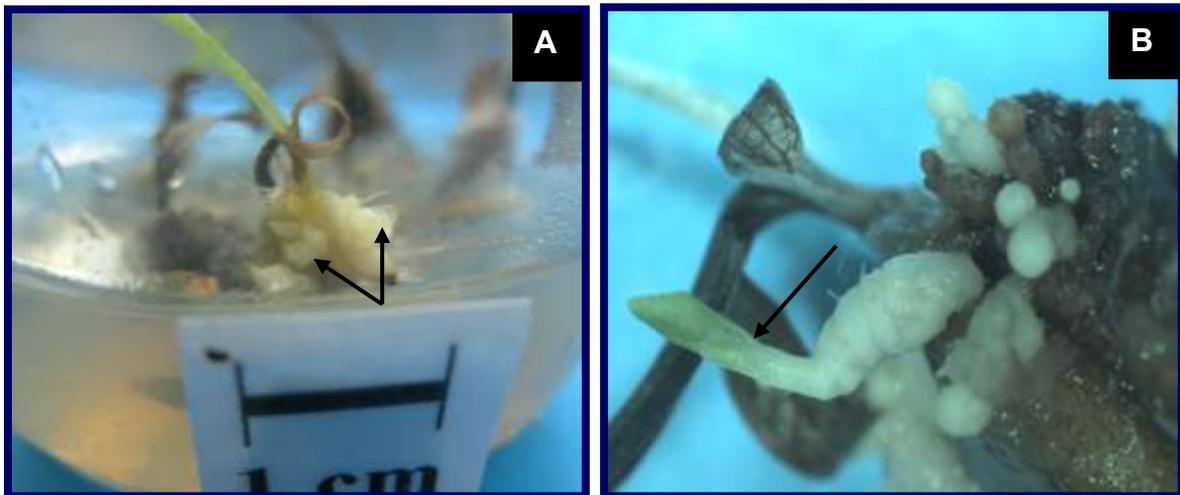


**Figura 17.** Germinación asimbiótica de semillas de *D. aurantiacus* a los 56 días de cultivo *in vitro*, utilizando papel filtro (PF). MSm= Medio MS modificado, L47= Lote de semillas N° 47, L27= Lote de semillas N° 27.

## f. Embriogénesis somática

Aunque no fue uno de los objetivos planteados para esta investigación, a la par de realizar la germinación asimbiótica de semillas de *D. aurantiacus*, se observó una respuesta morfogénica interesante. Ésta fue la formación de cuerpos parecidos a protocormos conocidos como PLB's (por sus siglas en inglés *protocorm like bodies*), que surgieron de manera directa a partir de la zona basal de la raíz de las plántulas en desarrollo (**Figs. 18A y B**).

La respuesta observada posiblemente se trate de embriogénesis somática directa, dado que los PLB's obtenidos continuaron desarrollándose hasta formarse una lámina foliar (**Fig. 18B**) y una vez que se individualizaron se logró la formación nuevamente de una planta completa.



**Figura 18.** Formación directa de PLB's (flechas) en plántulas asimbióticas de *D. aurantiacus* a los 9 meses de cultivo *in vitro*. A) surgimiento de PLB's a partir de las raíces y B) aparición de lámina foliar en desarrollo (10×).

## 5. DISCUSIÓN.

Uno de los aspectos que limita la germinación de las semillas de las orquídeas es el tiempo y las condiciones de almacenamiento que se les proporcionan (Seaton y Ramsay, 2005). En el presente trabajo se demuestra que las semillas utilizadas de *D. aurantiacus* conservaron su viabilidad después de 5 años de almacenamiento, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa.

Se observó una gran variabilidad en la germinación debido probablemente al empleo de diferentes cápsulas de *D. aurantiacus*. Mantener esta variabilidad genética es importante cuando el objetivo final de la propagación es el establecimiento de las plantas en su hábitat natural, lo cual favorecerá la supervivencia a largo plazo (Rubluo *et al.*, 1993).

El cultivo asimbiótico de orquídeas terrestres a partir de semillas, en algunos casos resulta fácilmente inducible (Chávez, 1980; Grell *et al.*, 1988; Gangaprasad *et al.*, 1999); mientras que en otros se dificulta, debido a su fuerte dependencia fisiológica con los hongos micorrízicos (Zettler, 1997; Stewart *et al.*, 2003). Tal el caso de *D. aurantiacus*, dados los problemas de oxidación que se presentaron durante su germinación asimbiótica.

Por lo tanto, el presente trabajo es el primero que describe un protocolo para la germinación asimbiótica de *D. aurantiacus* con el uso de distintos medios y agentes antioxidantes, lográndose que las semillas germinadas continuaran con el desarrollo de los embriones hasta constituir plántulas que fueron aclimatizadas en invernadero y posteriormente reintroducidas en campo (capítulo 3).

Con el empleo de otros medios de cultivo y diversos antioxidantes, se pudo superar el porcentaje de germinación obtenido anteriormente para esta especie por Rangel (2006), quien logró la germinación asimbiótica y desarrollo de las

semillas de *D. aurantiacus*, hasta el estadio de protocormo con primordios foliares, etapa a partir de la cual se oxidaban y necrosaban. La necrosis durante el cultivo *in vitro* de orquídeas ha sido observada también para otras especies emparentadas. En una especie emparentada (*Spiranthes magnicamporum*), Anderson (1991) señaló que al germinar asimbióticamente semillas no se desarrollaban más allá del estadio de protocormo, tornándose café los embriones después de su germinación.

A pesar de que en este trabajo la germinación simbiótica previno la oxidación, ésta también se ha descrito en otras especies como en *Goodyera repens* donde posterior a una germinación exitosa con el aislado *Ceratobasidium cereale*, los protocormos comenzaron a tornarse café y necrosarse cuando se desarrollaron hasta el estadio 5 (Smerciu y Currah, 1989).

La germinación fue promovida por el medio MS al 50%, obteniéndose con éste los mejores porcentajes de germinación, así como la menor oxidación en el tratamiento control, en comparación con los otros dos medios utilizados. Lo anterior, se puede deber a que este medio posee la concentración más alta de sales minerales (Arditti y Ernst, 1984), además de contener altos niveles de potasio y de nitrógeno en forma de nitrato de amonio, siendo éste último elemento un factor que induce la división celular (George & Sherrington, 1984; Razdan, 2002). Aunque el medio KC es el más utilizado para la germinación de las semillas de orquídeas, el medio MS en algunas especies ha promovido el 100% de germinación (Potisek *et al.*, 1995).

El carbón activado (CA) es comúnmente utilizado en la propagación asimbiótica de orquídeas, independientemente de que se presenten problemas de oxidación en los cultivos *in vitro*, para adsorber cualquier sustancia tóxica que se genere (Arditti, 1993; Thomas, 2008). Al utilizar CA, se ha logrado inducir de manera efectiva el desarrollo de protocormos, así como la formación de plántulas a partir de protocormos oxidados (Fu, 1978; citado por George y Sherrington,

1984; Hossain *et al.*, 2010). Sin embargo, en el presente estudio mostró efectos inhibitorios en la germinación en los tres medios de cultivo ensayados, no lográndose la formación de plántulas. Es posible que esto se debiera a que algunas marcas comerciales de carbón activado contienen trazas de algunos metales pesados que pudieran ejercer algún efecto inhibitorio en la germinación (Thomas, 2008).

La adición de ácido cítrico ( $100 \text{ m L}^{-1}$ ) y ascórbico ( $150 \text{ m L}^{-1}$ ), así como de PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) redujeron significativamente la oxidación en las primeras etapas de desarrollo. Con el PVP se disminuyó la oxidación y también se favoreció el desarrollo al ser adicionado al medio MS al 50% control. Sin embargo al emplear ácido cítrico y ascórbico, solamente se favoreció la germinación en los tres medios de cultivo utilizados, pero no el desarrollo. Por consiguiente, se propone el empleo de diferentes medios de cultivo, donde de manera inicial se recomendaría utilizar AC-AS para inducir la germinación y posteriormente subcultivar los protocormos obtenidos a medio MS 50% control, para favorecer su desarrollo y lograr la obtención de plántulas.

Por otra parte, la mezcla de varios antioxidantes también pudiera tener efectos positivos como los encontrados para otras orquídeas, donde la adición de carbón activado en combinación con ácido cítrico y ascórbico favorecieron el crecimiento en altura de plantas cultivadas *in vitro*, así como el crecimiento en longitud de sus raíces (Díaz *et al.*, 2006). También es posible que la utilización de estas sustancias en otras concentraciones pudiera tener mejores efectos. Por ejemplo, la reducción del pH de los ácidos orgánicos para impedir la acción enzimática que produce la oxidación, así como la adsorción de fenoles por el PVP en el mismo medio pudiera tener un efecto sinérgico.

Posiblemente otras maneras de abordar el problema de la oxidación durante la germinación para *D. aurantiacus*, sea utilizando medios de cultivo líquidos, en los cuales se ha documentado que las sustancias tóxicas que se

liberan pueden difundirse rápidamente al mantener los cultivos en agitación constante (Ichihashi y Kako, 1977; citados por George y Sherrington, 1984; Azofeifa, 2009). Así mismo, se sugiere reducir los tiempos de desinfección de las semillas, ya que también se ha visto que el agente desinfectante puede tener un efecto abrasivo, o bien realizar una combinación de dichas estrategias para favorecer una mejor respuesta (Azofeifa, 2009).

En lo que respecta a la formación de cuerpos parecidos a protocormos (PLB's) a partir de la raíz de las plántulas asimbióticas de *D. aurantiacus*, es una respuesta que es poco común en el cultivo *in vitro* de orquídeas, cuando no se han adicionado reguladores de crecimiento al medio. Esta respuesta observada probablemente se debió a tres factores: 1) que la cantidad endógena de hormonas presentes en esta especie sea elevada, 2) que las células del meristemo terminal de la raíz permanecieron un mayor tiempo activas y con algún estímulo externo se desencadenó su desdiferenciación y la formación de regenerantes y 3) debido al efecto de alguno de los componentes del medio de cultivo (Pierik, 1990).

En este estudio, resultó evidente que los cultivos simbióticos promovieron una mayor germinación de las semillas que los asimbióticos, así como su posterior desarrollo hasta constituir plantas que no presentaron el problema de la oxidación. Se ha señalado que la germinación de las semillas en las orquídeas terrestres y su posterior desarrollo, ha mostrado ser más eficiente de manera simbiótica que asimbiótica (Anderson, 1991; Zettler; 1997; Markovina y McGee, 2000; Ramsay y Dixon; 2003). En particular en el género *Spiranthes* (al que anteriormente pertenecía esta especie), se ha visto que las especies son relativamente fáciles de cultivar *in vitro* mediante la germinación simbiótica de sus semillas (Anderson, 1991; Zelmer y Currah, 1997; Zettler y Mc Innis, 1993; Zettler *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 2003).

Por otro lado, también se ha documentado la variabilidad que presentan los hongos micorrízicos para promover la germinación *in vitro* de las semillas de las orquídeas terrestres, su crecimiento y desarrollo hasta constituir una planta (Smerciu y Currah, 1989). A pesar de que en algunos casos, los hongos pueden promover la germinación en los estadios iniciales de desarrollo, no son capaces de establecer una verdadera simbiosis con los protocormos resultantes, lo que posiblemente indique que existan varios hongos asociados con diferentes estadios del desarrollo de las orquídeas o bien que exista una pérdida del potencial de la estabilidad genética durante su almacenamiento (Marx y Daniel, 1976; citados por Smerciu y Currah, 1989).

Lo anterior se vio reflejado en los resultados obtenidos para la germinación simbiótica de *D. aurantiacus*, al encontrarse diferentes respuestas en la germinación y desarrollo dependiendo del aislado micorrízico empleado. Un ejemplo claro de esto fueron las respuestas obtenidas con los aislados 11 y 17, con los cuales se obtuvieron los mayores porcentajes de germinación. Estos aislados fueron probados antes por Rangel (2006), dando también los mejores resultados de germinación y desarrollo. Sin embargo, los porcentajes de germinación que obtuvo fueron menores en comparación con los registrados para el presente trabajo. Lo mismo sucedió con el aislado 28, también antes probado por el mismo autor, el cual no promovió la germinación y en esta investigación de manera opuesta se obtuvo un porcentaje elevado. Otro de los aislados utilizados (A37), pudo por el contrario haber perdido su potencial micorrízico al tener un excesivo crecimiento en el medio convencional de cultivo. Lo anterior demuestra que a pesar de utilizar el mismo germoplasma, tanto de hongos como de semillas, en ocasiones no se obtienen los mismos resultados debido probablemente a efectos de almacenamiento.

## 6. CONCLUSIONES.

- Se comprobó la viabilidad de las semillas de *D. aurantiacus*, después de cinco años de almacenamiento, así como el grado de efectividad de los aislados de HMO resguardados en el Banco de Germoplasma.
- Se logró por primera vez la germinación asimbiótica de las semillas de *D. aurantiacus*, más allá del estadio de protocormos.
- El mejor medio de cultivo para la germinación asimbiótica fue el MS al 50% sin antioxidantes, dado que fue el que promovió tanto la germinación como evitó la oxidación de los embriones de las semillas.
- El empleo de distintos tratamientos antioxidantes no mejoró sustancialmente el problema de oxidación durante la germinación asimbiótica. Aún cuando la mezcla de ácido cítrico y ácido ascórbico en las primeras etapas de desarrollo la disminuyó, las plantas no se desarrollaron posteriormente.
- Se observó que la morfología del desarrollo fue distinta para las plantas simbióticas y asimbióticas durante su cultivo *in vitro*, siendo más rápida la germinación y formación de plantas completas en los cultivos simbióticos. Se obtuvieron protocormos con dos hojas a los 28 días después de la siembra de las semillas, en comparación con el doble de tiempo (56 dds) para los tratamientos asimbióticos.
- En los cultivos simbióticos, no se encontraron diferencias en la respuesta germinativa de las semillas cuando los aislados micorrízicos provenían de plantas adultas o de protocormos.

- Durante la propagación asimbiótica se registró la formación de PLB's, lo cual resultó novedoso debido a que no es común que este tipo de estructuras se desarrollen a partir de tejidos radicales. Se observó que los PLB's también sufrieron oxidación, por lo que será necesario desarrollar otros protocolos que puedan disminuir este problema durante la propagación asimbiótica. Esta puede ser una nueva vía de regeneración de plantas que no estuvo prevista, pero que también se puede recurrir en caso de no contar con germoplasma suficiente.
- Métodos simples como la siembra de las semillas en un papel filtro sin la utilización de antioxidantes, demostró ser eficiente en disminuir considerablemente la oxidación durante la germinación, por lo que es posible que algún elemento del medio sea la principal causa de este problema.
- Aún cuando no se logró de manera completa evitar la oxidación de las semillas en ninguno de los tratamientos probados, se lograron obtener plántulas asimbióticas de *D. aurantiacus* y se corroboró lo anteriormente obtenido para la simbiótica. Ambos protocolos pueden ser utilizados para la propagación, conservación y uso sustentable de otras orquídeas.

## 7. REFERENCIAS.

- Anderson, A. B. 1991. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae). *Lindleyana* 6 (4):183-186.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review* 33: 1-82.
- Arditti, J. y Ernst, R. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. pp.177-222 *In*: Arditti, J. (ed.). *Orchid biology: Reviews and perspectives, III*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA. 691 p.
- Arditti, J. y Ernst, R. 1993. *Micropropagation of Orchids*. Wiley Interscience. New York. 682 p.
- Arditti, J. y Ernst, R. 2008. *Micropropagation of Orchids*. Second edition. Wiley Interscience. New York. 1560 p.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Batty, A. L., Dixon, K. W., Brundrett, M. y Sivasithamparam, K. 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in mediterranean woodland. *New Phytologist* 152: 511–520.
- Batty L. A., Brundrett M. C., Dixon W. K. y Sivasithamparam K. 2006. *In situ* symbiotic seed germination and propagation of terrestrial orchid seedling for establishment at field sites. *Australian Journal of Botany* 54: 375-381.
- Castillo, M. M. 2002. Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae) como una estrategia para su reintroducción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 52 p.
- 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. 81 p.
- Chávez, A. V. M. y Rubluo, I. A. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. Pp. 123-131. *In*: Linares, E., Dávila, P., Chiang, F., Bye, R. y Elias, T. S. (Eds.) *Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques*. Instituto de Biología. UNAM.
- Clements, M. A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3(2): 73-86.

Díaz, L. P., Namur, J. J. y Bollati, S. A. 2006. Efecto del ácido cítrico y del carbón activado en la regeneración de plantas de orquídeas (*Laelia lundii*) por cultivo *in vitro* de semillas. Congreso Argentino de Floricultura. 3. Jornadas Nacionales. Argentina.

Espejo, S. A., García, C. J., López, F. A. R., Jiménez, M. R. y Sánchez, S. L. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Orq. (Méx.) Vol. 16. Número único. 332 p.

Fay, M. F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. Biodiversity and Conservation 3: 176-183.

George, E. F. y Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstone, England. 709 p.

Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez-Machorro, R., López-Rosas, M. A. y Dressler, R. L. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín. México. 304 p.

Harrison, C. R. 1977. Ultraestructural and histochemical changes during germination of *Cattleya aurantiaca* (ORCHIDACEAE). Bot. Gaz. 138(1): 41-45.

Hossain, M. M., Sharma, M., Teixeira, J. S. y Pathak, P. 2010. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. Scientia Horticulturae 123 (1): 479-487.

Hu, C. V. y Wang, J. P. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. Pp: 177-227. In: Handbook of Plant Cell Culture. Evans, D. A., Ammirato, P. V. y Yameda, Y. (eds). MacMillan Publishing, Nueva York. Vol. I.

Ichihashi, S. y Kako, S. 1977. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 46 (1): 325-330.

Jiménez, V. M. y Guevara, E. 1996. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (ORCHIDACEAE) mediante el cultivo de secciones de ejes florales después de la senescencia de las flores. Agronomía Costarricense. 20(1): 75-79.

Jiménez, E. G. 1998. Cultivo de Ápices y Meristemas. Pp. 45-56. In: Ponce, J. N. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.

Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette 73: 1-25.

Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin 15(1): 214-217.

Leroux, G., Barabé, D., y Vieth, J. 1995. Morphogenese comparee de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultivés *in vitro* avec ou sans sucre. Canadian Journal of Botany 73(1): 1391-1406.

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

Marx, D. H. y Daniel, J. W. 1976. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. Canadian Journal of Microbiology 22(1): 338-341.

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

Moore, R. T. 1987. The genera of Rhizoctonia-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Monilliopsis* and *Rhizoctonia*. Mycotaxon 29: 91-99.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15(1):473-497.

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

Ortega-Larrocea, M. P. y Rangel, V. M. 2007. Fungus assisted reintroduction and long-term survival of two mexican terrestrial orchids in the natural habitat. En: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Orchid Conservation Congress. San José, Costa Rica. Pp: 317-321.

Ortega-Larrocea, M. P. 2008. Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. Pp: 85-96. In: Álvarez-Sánchez J. y Monroy-Ata A. (comp.). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Editorial Prensa Ciencias. UNAM.

Pan, M. J. y J. Van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. Plant Growth Regulation 26:155-163.

Peña, M. 1990. Orchidaceae. Pp 86-95. In: Rzedowski, J., Rzedowski, W. eds. Flora fanerogámica del valle de México, Vol. III Monocotiledóneas. Instituto de Ecología, UNAM. México, D. F.

Peterson, R. L., Massicotte, H. B. y Melville, L. H. 2004. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology, NRC-CNRC. Ottawa. 173 p.

Potisek, M. C., Sarmiento, M. J. y Puc, L. N. 1995. Germinación de semillas y su establecimiento *in vitro* de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stamfordianum* Batem. Memorias del Simposio. Managua (Nicaragua). Pp. 187-192.

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

Rangel, V. M. 2004. Aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres de la Reserva "El Pedregal" de San Ángel, México, D.F. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 111 p.

Rangel, V. M. 2006. Germinación simbiótica y reintroducción de orquídeas terrestres en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, México, D.F. Tesis de Maestría. Instituto de Geología. UNAM. México. 115 p.

Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press. Cambridge, G. B. 444 p.

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

Rasmussen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149-163.

Rasmussen, H. N. y Rasmussen, F. N. 2009. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos* 118: 334-345.

Razdan, M. K. 2002. Introduction to Plant Tissue Culture. Second edition. Science Publishers, Inc. USA. 375 p.

Roca, W. M. y Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 953 p.

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

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

Saucedo, G. S. 2006. Regeneración *in vitro* de *Cephalocereus apicicephalum* y *Echinocereus pentalophus*, cactáceas nativas de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 151 p.

Seaton, P.T. y Hailes, N.S.J., 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. Pp. 17–29. *In*: H.W. Pritchard (Ed.), Modern methods in orchid conservation. Cambridge University Press, Cambridge.

Seaton, P. y Ramsay, M. 2005. Growing orchids from seed. Royal Botanic Gardens, Kew. England. 83 p.

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

Soto, A. M. A. 1996. México. Pp. 53-58. *In*: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids-Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.

Soto, A. M. A. y Salazar, G. A. 2004. Orquídeas. Pp. 271-295. *In*: García-Mendoza A. J., Ordóñez, M. J. y Briones-Salas, M. (eds.) Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. México.

Soto, A. M. A., Hágsater, E., Machorro, R, Salazar, G., Solano, R. y Flores, R. 2007. Las orquídeas de México. Catálogo digital. Instituto Chinoín, A.C. México. DVD.

Srivastava, S. K. y Srivastava, N. 2004. *In vitro* multiplication of *Paedaria foetida* L.-A rare medicinal plant. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology* 13: 89-91.

Stewart, S. L., Zettler, L. W. y Minso, J. 2003. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, and endangered orchid native to Florida. *Selbyana* 24(1): 64-70.

Suárez, Q. I. 2006. Regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (ORCHIDACEAE), especie endémica de México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 143 p.

Thomas, D. T. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26 (1): 618-631.

IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. *Orchids-Status Survey and Action Plan*. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK. 153 p.

Valiente-Banuet A. y E. De Luna-García. 1994. Una lista florística actualizada para la reserva del Pedregal de San Ángel, México. D. F. *In*: A. Rojo (Comp). Reserva

Ecológica "El Pedregal" de San Ángel: Ecología, Historia Natural y manejo. UNAM. México. 410 p.

Warcup, J. y Talbot, P. 1996. Perfect states of some Rhizoctonia. Transactions of the British Mycological Society 49: 427-435.

Wells, T. C. and Willems, J.H. 1991. Population Ecology of Terrestrial Orchids. SPB Academic Publishing. Netherlands. 189 p.

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

Zettler L W, McInnis T M. 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 Mc Innis, T. M. 1995. Developmental morphology of *Spiranthes odorata* seedlings in symbiotic culture. Lindleyana 10: 211-216.

Zettler, L. W. 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: Techniques and perspectives. Selbyana 18(2): 188-194.

### **CAPÍTULO 3. Reintroducción de *D. aurantiacus* a su hábitat natural, como una estrategia para su conservación *in situ*.**

#### **1. INTRODUCCIÓN.**

Las ciudades con un continuo desarrollo urbano y crecimiento poblacional, como la Ciudad de México, están sujetas a la destrucción constante de sus áreas verdes y por consiguiente a la pérdida de su vegetación nativa y urbana. Tal y como sucede en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel donde las orquídeas que habitan en él son unas de las especies más vulnerables ante esta degradación y fragmentación del hábitat. Muchas de las especies han quedado en parches aislados dentro de la misma, pero a pesar de ello siguen persistiendo (Hágsater *et al.*, 2005; Salazar, 2009). Esto hace evidente su alta especialización y el importante papel que estas plantas tienen en la naturaleza, en donde algunos autores como Newman *et al.* (2007), sugieren que la presencia de orquídeas silvestres son un indicador de la condición de la vegetación y de la salud del ecosistema.

Por consiguiente, es indispensable el establecimiento de estrategias integrales de conservación para esta familia de plantas, las cuales incluyan la reintroducción de especies a sus hábitats naturales, contribuyendo con ello a su conservación *in situ*. Para que estas estrategias sean exitosas se requiere establecer un equilibrio entre la necesidad urgente de actuar para evitar una mayor pérdida de los hábitats naturales y la búsqueda de información esencial que permita tener los conocimientos básicos de las especies y del ecosistema a ser conservado (Swarts *et al.*, 2007).

Se debe considerar cuidadosamente el establecimiento de objetivos específicos, el propósito ecológico general, las limitaciones técnicas y biológicas a las cuales es posible enfrentarse, razones por las que lo ideal es contar con un equipo de trabajo multidisciplinario (Seddon *et al.*, 2007).

La estrategia de conservación integral puede ser vista como un modelo piramidal, donde la cúspide de esta pirámide es lograr el rescate de especies, para lo cual se requiere tener conocimiento de los escalones que están por debajo de ella. Es decir, conocer las interacciones entre diversos factores, como la demografía y genética de poblaciones, la conservación del suelo, el manejo biológico, la propagación, reintroducción y restauración del hábitat. Los enfoques de la conservación integral varían de acuerdo a las diferentes especies con las características de sus hábitats y su distribución. Sin embargo; el propósito básico permanece siendo el mismo, lograr el rescate de especies (Dixon y Batty, 2003; Hopper, 1997; citados por Swarts *et al.*, 2007).

Dentro de estas estrategias integrales de conservación, la reintroducción de especies a la vida silvestre se considera como el último paso de la conservación *in situ*. A través de ella se contribuye de manera directa al proceso de restauración ecológica de un ecosistema. Siempre y cuando aún existan tanto el hábitat, como las presiones que dieron origen a la disminución de las poblaciones silvestres de las especies que han desaparecido (Lascuráin *et al.*, 2009).

En el caso particular de las orquídeas, existen muy pocos estudios sobre la reintroducción de éstas tanto a nivel mundial como en México. Además, son contados los proyectos en los que se da seguimiento a largo plazo de las poblaciones de orquídeas reintroducidas (Cuadros 6 y 7).

Aunado a esto si consideramos que algunas especies están prácticamente extintas en la naturaleza y que por consiguiente la obtención de material biológico se dificulta, el empleo de especies modelo es ideal para poder desarrollar protocolos de conservación para esta familia de plantas. Las especies modelo son aquellas orquídeas que se encuentran bien adaptadas a los cambios ambientales y de las cuales es fácil adquirir semillas (Ortega y Rangel, 2007). Esto a su vez nos permite generar información útil de las especies y alternativas para su manejo. Algunas de estas alternativas son la micropropagación de plantas y su venta en jardines botánicos o a

aficionados, sin seguir causando daño a las poblaciones silvestres de orquídeas. Al mismo tiempo esta actividad permite proveer de fuentes para el financiamiento y el monitoreo de proyectos a largo plazo.

Tal es el caso de *Dichromanthus aurantiacus*, orquídea con una amplia distribución dentro de la REPSA. Esta especie presenta una estrategia reproductiva tipo *r* (producción de numerosos descendientes, pero baja supervivencia), por lo que su ciclo de vida en la naturaleza es corto en comparación con otras especies de orquídeas. Esto se ve compensado con la producción de un número relativamente grande de cápsulas (hasta 17) con semillas que permanecen viables por largos periodos de tiempo (Rangel, com. pers.).

En la actualidad, son contados los estudios que han investigado los requerimientos ecológicos del hábitat para lograr un establecimiento exitoso *in situ* de las plantas micropropagadas. Para poder entender cuáles son los factores clave del hábitat que afectan la supervivencia de las plántulas reintroducidas, se sugiere estudiar el impacto de los factores del hábitat a pequeñas escalas (Scade *et al.*, 2006).

En la presente investigación, se buscó correlacionar los factores edáficos y climáticos con la supervivencia de las plantas reintroducidas a nivel de microambiente, dado que no existen para la REPSA descripciones amplias de la cubierta edáfica, ni de la heterogeneidad ambiental a escala de micrositio. Además es el primer estudio tanto en México como a nivel mundial, que realiza una comparación de reintroducción simbiótica y asimbiótica. Por tanto, se propone que la información generada sirva como modelo para el establecimiento de protocolos de propagación y reintroducción para la conservación de plantas y hongos micorrizógenos y para la restauración de este ecosistema.

## **a. Reintroducción biológica**

La reintroducción es un método cuyo objetivo principal debe de ser establecer una población viable en campo de las especies que están global o localmente extintas, o bien aumentar las poblaciones existentes que no pueden ser manejadas sustentablemente a largo plazo. Ésta conjunta las estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*, al utilizar materiales obtenidos a partir de la germinación de semillas (con genotipos conocidos) almacenadas en un banco de germoplasma y del empleo de métodos de propagación de plántulas que serán restablecidas en su hábitat natural (Ecker, 1989; Rangel, 2006).

Considerando lo anterior, la evaluación de un sitio para reintroducción necesita asegurar que los requerimientos críticos de las especies se satisfagan y puedan a su vez ser mantenidos. Este objetivo también puede incluir: aumentar las probabilidades de supervivencia de una especie a largo plazo; mantener y/o restaurar la biodiversidad natural; proveer beneficios a largo plazo a la economía local y/o nacional; promover la toma de conciencia de la conservación o alguna combinación de ellos (Cribb *et al.*, 2003).

En respuesta al aumento en la incidencia mundial de proyectos de reintroducción, los especialistas de la IUCN han planteado una serie de procedimientos que cubren los requerimientos biológicos de las especies para tener mayores posibilidades de éxito en los proyectos de reintroducción. Éstos se enlistan a continuación ([www.iucn.org](http://www.iucn.org)).

### **1) Estudio de factibilidad e investigación de antecedentes**

Debe llevarse a cabo una evaluación de la condición taxonómica de los individuos a ser reintroducidos. Lo ideal es hacer estudios detallados de la condición y la biología de las poblaciones silvestres (si ellas existen), para determinar las necesidades críticas de la especie. Se deben de incluir requerimientos bióticos y abióticos del hábitat, mecanismos de dispersión, biología reproductiva, genética de

poblaciones, demografía, relaciones simbióticas (por ej. con micorrizas y polinizadores), insectos plaga y enfermedades. En general, un conocimiento sólido de la historia natural de la especie en cuestión es crucial para el esquema completo de reintroducción.

## **2) Reintroducciones previas. Establecimiento de protocolos**

Se debe llevar a cabo una investigación exhaustiva de los estudios piloto sobre reintroducciones previas de la especie en cuestión o de especies similares, que permitan establecer un protocolo nuevo y mejorado de reintroducción.

También llevar a cabo la identificación de las causas previas que llevaron a la disminución o extinción de la especie: enfermedades; sobreexplotación por colectas; contaminación; herbivoría, especies introducidas; pérdida de hábitat; efectos adversos de investigaciones o programas de manejo previos, entre otros.

## **3) Elección y Evaluación del sitio de reintroducción**

Se refiere a la disponibilidad de un hábitat adecuado: las reintroducciones deberían tener lugar solamente donde se encuentren satisfechos los requerimientos del hábitat de la especie y que puedan ser mantenidos como tales en forma sostenida en un futuro previsible. El sitio o los sitios elegidos para la reintroducción, deberían de estar dentro del área de distribución histórica de la especie. A su vez, el área de reintroducción debería tener asegurada su protección a largo plazo.

## **4) Evaluación post-reintroducción**

Un seguimiento constante de todos los individuos reintroducidos en su hábitat natural, debe ser parte integral de todo programa de reintroducción. Esto permitirá evaluar a largo plazo el éxito de la reintroducción. Este aspecto tan vital puede llevarse a cabo por métodos sencillos como el marcaje y seguimiento de plantas.

## **b. Reintroducción de orquídeas**

Dentro de las técnicas de reproducción vegetativa de plantas, el cultivo simbiótico *in vitro* y la reintroducción de orquídeas terrestres en su medio natural obtenidas por esta vía de propagación, son alternativas eficientes para el establecimiento de protocolos de conservación integral para esta familia de plantas (Zettler, 1997; Ramsay y Dixon, 2003; Batty *et al.*, 2006b; Ortega y Rangel, 2007). Desafortunadamente son pocos los trabajos que definen las condiciones básicas necesarias para llevar a cabo la reintroducción de orquídeas, principalmente terrestres (Ramsay and Stewart; 1998; Batty *et al.*, 2006), así como los factores bióticos y abióticos que determinarán su establecimiento en condiciones naturales (Scade *et al.*, 2006).

Ramsay y Dixon (2003) sugieren como aspectos clave importantes a considerar para lograr una reintroducción exitosa: 1) la selección adecuada del sitio, por lo que se requiere conocer el hábitat de distribución de la especie, las especies que cohabitan y la fenología del sitio; 2) conocer las características del suelo del sitio de reintroducción, tales como pH, contenido orgánico, clase de suelo, entre otros; 3) tratar de controlar herbivoría, malezas y plagas que sean una amenaza directa o que puedan causar enfermedades a las plantas reintroducidas y 4) la presencia de propágulos micorrízicos en el sitio. Es importante tener conocimiento de las interacciones planta-hongo y de su especificidad, para considerar los requerimientos del hábitat de ambos organismos asociados.

Así mismo, mantener un buen registro y un seguimiento regular (al menos anual) de las plantas reintroducidas son aspectos cruciales para el éxito de cualquier programa de rescate y conservación de orquídeas (Batty *et al.*, 2006). No obstante, éstas son a menudo pasadas por alto, siendo escasos los trabajos en la literatura que cumplen con ello.

### c. Orquídeas terrestres y epífitas

Existen pocas investigaciones tanto a nivel mundial como en México donde se realizan estudios enfocados a la reintroducción de orquídeas epífitas (**Cuadro 5**) y terrestres (**Cuadro 6**). En dichos trabajos es variable el éxito obtenido en la supervivencia. Se observa que la reintroducción de las especies se realiza sólo por una vía ya sea simbiótica o asimbiótica, pero no ambas. También es evidente que en la mayoría de ellos no se da un seguimiento a largo plazo de las poblaciones de orquídeas reintroducidas. No se sabe si las plantas que han logrado florecer y formar frutos, presentan semillas viables que puedan germinar tanto *in situ* (reclutamiento de nuevos individuos) como *ex situ* hasta formar una planta, completándose así el ciclo de vida.

**Cuadro 5.** Estudios de reintroducción con orquídeas epífitas.

Especie	Hábitat	Estrategias de conservación	Supervivencia de la reintroducción	Referencia
<i>Epidendrum nocturnum</i> (Jacquin)	EUA, Antillas del Oeste, México, Centro y Norte de Sudamérica	Propagación simbiótica y reintroducción en tres sitios	6 meses: 50% en los 3 sitios 8 meses: 42% en 1 sitio, en los 2 restantes sólo 2 plantas persistieron. 1er. año: 20% en un sitio y 0% en el resto de los sitios.	Zettler <i>et al.</i> , 2007
<i>Vanda spathulata</i> (L.) Spreng	India	Propagación asimbiótica <i>ex situ</i> y reintroducción de plantas adultas en 2 localidades diferentes	Se proporcionan datos después de 2 años de reintroducción. Localidad 1: 43.4% Localidad 2: 79%	Decruse <i>et al.</i> , 2003
<i>Vanda coerulea</i> Griff ex. Lindl.	India	Micropropagación asimbiótica y reintroducción de plántulas en 2 localidades	Se proporcionan datos después de 1 año de reintroducción. Localidad 1: 70% Localidad 2: 80%	Seeni y Latha, 2000

<b><i>Grammatophyllum speciosum</i> (Blume)</b>	Singapur	Banco de semillas (crioconservación) Propagación asimbiótica <i>in vitro</i> , aclimatización y reintroducción en 5 diferentes zonas urbanas y en una reserva natural	Se proporcionan datos después de 5 años de reintroducción, con un intervalo de supervivencia de 10-95%. Una planta floreció y formó frutos. Se logró la germinación de las semillas y la formación de plántulas que fueron nuevamente reintroducidas.	Wing y Thame, 2005
<b><i>Bulbophyllum vaginatum</i> (Lindl.) Rchb.f.</b> <b><i>Bulbophyllum membranaceum</i> Teijsm &amp; Binn</b>			Se proporcionan datos después de 5 años de reintroducción. Se describe una supervivencia de más del 90% de las plantas.	
<b><i>Lycaste skinneri</i> (Batem. ex Lindl.) Lindl. var. <i>skinneri</i></b>	México	Micropropagación asimbiótica y reintroducción	Se proporcionan datos sólo para dos fechas. 6 meses: 69% 4to. año: 12%	Martínez, 1991
<b><i>Lycaste aromatica</i> (Graham ex Hooker) Lindl.</b>			6 meses: 60% 4to. año: 7%	
<b><i>Oncidium stramineum</i> (Lindl.) Batem.</b>			1er. año: 40% 2do. año: 10%	
<b><i>Prostechea vitellina</i></b>	México	Propagación asimbiótica <i>in vitro</i> y reintroducción	6 meses: 0%	De la Cruz, 2006

**Cuadro 6.** Estudios de reintroducción con orquídeas terrestres.

<b>Especie</b>	<b>Hábitat</b>	<b>Estrategias de conservación</b>	<b>Supervivencia de la reintroducción</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Diuris fragantissima</i> (D.L.Jones &amp; M.A.Clem.)</b>	Australia	Germinación asimbiótica, aclimatización y reintroducción de plantas en 2 estaciones del año	4to. año: 32.5% y 29.1% (primavera y otoño, respectivamente). Se observó floración 4 años después	Smith <i>et al.</i> , 2009
<b><i>Caladenia arenicola</i> (Hopper &amp; A.P.Brown)</b>	Australia	Creación de un banco de germoplasma (semillas y de HMO)	1er. año 55% 2do. año 0%	Batty <i>et al.</i> , 2006
<b><i>Pterostylis sanguinea</i> D.L.Jones &amp;</b>		Propagación simbiótica <i>ex situ</i> y	1er. año 90% 2do. año 40%	

<b>M.A.Clem.</b>		reintroducción de plántulas	3er. año 0%	
<b><i>Thelymitra manginiorum</i> (Jeanes, ms)</b>			1er. año 80% 2do. año 75% 3er. año 70%	
<b><i>Anacamptis laxiflora</i> (Lam.) R. M. Bateman, Pridgeon, M. W. Chase</b>	Reino Unido	Propagación simbiótica <i>ex situ</i> y reintroducción de plántulas	No se proporcionan datos numéricos de la supervivencia. Se observó floración y formación de frutos en las plantas reintroducidas.	Muir, 1987; Ramsay, 1994; citados por Ramsay y Dixon; 2003
<b><i>Dactylorhiza majalis</i> var. <i>praetermissa</i></b>	Reino Unido	Micropropagación simbiótica <i>ex situ</i> y reintroducción de plántulas	Estudio piloto. No se proporcionan datos de su supervivencia.	McKendrick, 1995; citado por Ramsay y Dixon; 2003
<b><i>Liparis loeselii</i> (L.) Rich.</b>	Reino Unido	Germinación <i>in situ</i> , micropropagación simbiótica <i>ex situ</i> y reintroducción de plántulas	1er. año: 12% 2do. año: floreció y formó tres cápsulas una de las plantas reintroducidas.	Ramsay y Dixon; 2003
<b><i>Spiranthes brevilabris</i> (Lindl.)</b>	EUA Florida	Propagación simbiótica y reintroducción en 6 sitios	1er. año: En 3 sitios 0% y en el resto más del 70% de las plantas florecieron. 2do. y 3er. año: 53% de las plantas florecieron.	Stewart <i>et al.</i> , 2003; Stewart, 2008.
<b><i>Ipsea malabarica</i> (Rchb.f.) Hook.f.</b>	India	Propagación asimbiótica <i>ex situ</i> y reintroducción de plántulas en 2 sitios diferentes	1er. año: Localidad 1: 78.5% Localidad 2: 75.8% 2do. año: hubo una disminución en la supervivencia.	Gangaprasad <i>et al.</i> , 1999
<b><i>Cypripedium calceolus</i> (L.)</b>	Reino Unido	Micropropagación simbiótica <i>ex situ</i> y reintroducción de plántulas en dos años 1989 y 1990	1989: 1er. año 100% 1990: 1er. año 50% Se observó floración en una planta once años después de la reintroducción.	Ramsay y Stewart; 1998
<b><i>Paphiopedilum rothschildianum</i></b>	Malasia	Propagación asimbiótica <i>ex situ</i> y reintroducción de plántulas	No se proporcionan datos numéricos de supervivencia. Un año después de la reintroducción las plántulas formaron nuevas estructuras como hojas y raíces sanas.	Grell <i>et al.</i> 1988

#### **d. Reintroducción de orquídeas en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel**

*Bletia urbana* Dressler, fue la primer orquídea de la REPSA en ser propagada por medio del cultivo asimbiótico (Chávez, 1980). A partir de la germinación *in vitro* de sus semillas, se logró la formación de plántulas que fueron aclimatizadas en invernadero y posteriormente reintroducidas a su hábitat natural (Rubluo *et al.*, 1989).

En 1998, se logró por primera vez el cultivo simbiótico de esta especie (Ortega-Larrocea *et al.*, 2000) y años más tarde su reintroducción por Castillo (2002), quien reintrodujo 170 plantas micorrizadas en época de lluvias a su hábitat natural. Se reintrodujeron dos grupos de plantas unas que habían sido aclimatizadas en invernadero durante más de 1 año y otras aclimatizadas durante 54 días. Después de cinco años de reintroducidas estas plantas se logró su floración y la subsecuente formación de frutos, que fueron recolectados para sembrar sus semillas *in vitro*, obteniéndose más del 90% de germinación de las mismas (Ortega-Larrocea y Rangel, 2007). Esto demostró la factibilidad del uso de la propagación simbiótica como una estrategia exitosa para la reintroducción de esta especie.

Rangel en los años 2004 y 2005, llevó a cabo la reintroducción de plántulas obtenidas a partir de cultivos simbióticos de *Dichromanthus aurantiacus*, en micrositios diferentes dentro de la REPSA, siendo esta la segunda orquídea en ser reintroducida para este ecosistema.

El protocolo de propagación simbiótica y asimbiótica desarrollado en la presente investigación permitió la obtención de plántulas por ambas vías, que fueron reintroducidas en la REPSA. Por lo tanto, la hipótesis planteada fue comprobar que en la naturaleza las poblaciones de orquídeas terrestres simbióticas tienen una mayor capacidad adaptativa que las asimbióticas.

## 2. OBJETIVO GENERAL.

Reintroducir en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), plántulas de *Dichromanthus aurantiacus* propagadas *in vitro* tanto simbiótica como asimbióticamente y evaluar las condiciones microambientales en donde se distribuye, en sitios conservados y perturbados dentro de la misma.

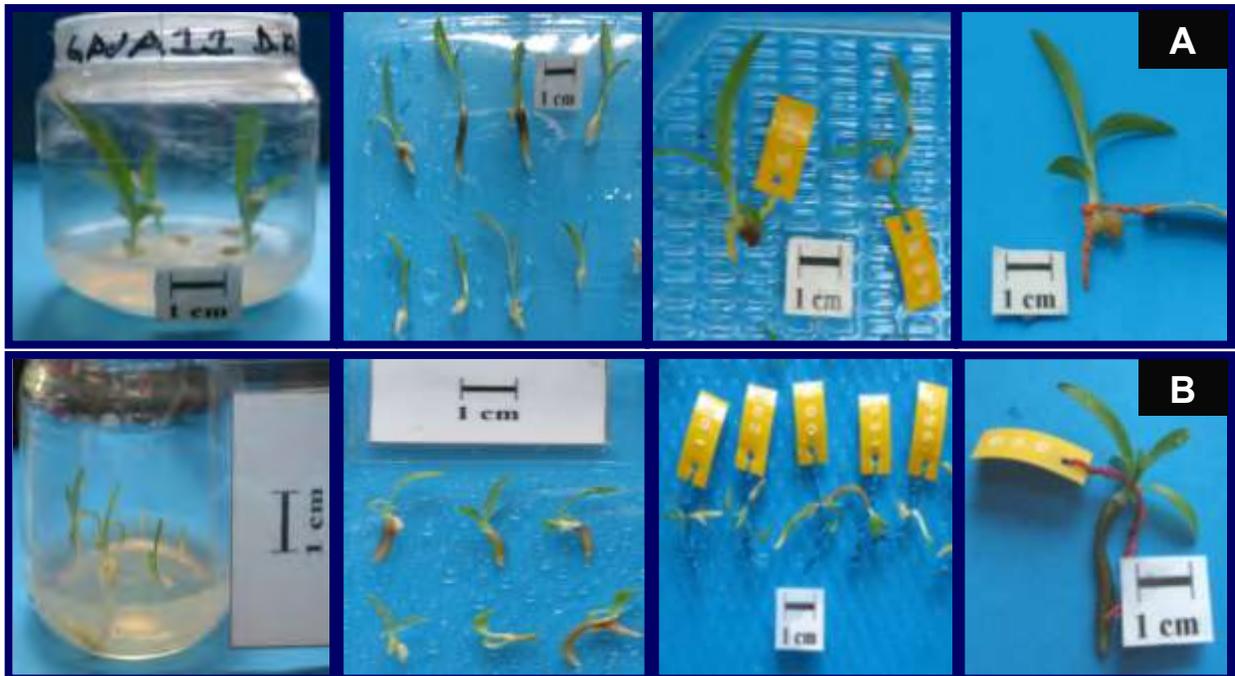
### a. Objetivos particulares

- \* Caracterizar en laboratorio y en campo algunas condiciones de los micrositos en donde se distribuye *D. aurantiacus* en la REPSA, con base en factores edáficos y microclimáticos para evaluar si fueron los sitios adecuados de reintroducción.
  
- \* Evaluar la supervivencia de las plantas reintroducidas con relación a su procedencia (simbiótica o asimbiótica) y a los factores microambientales (climáticos y edáficos) de cada sitio.

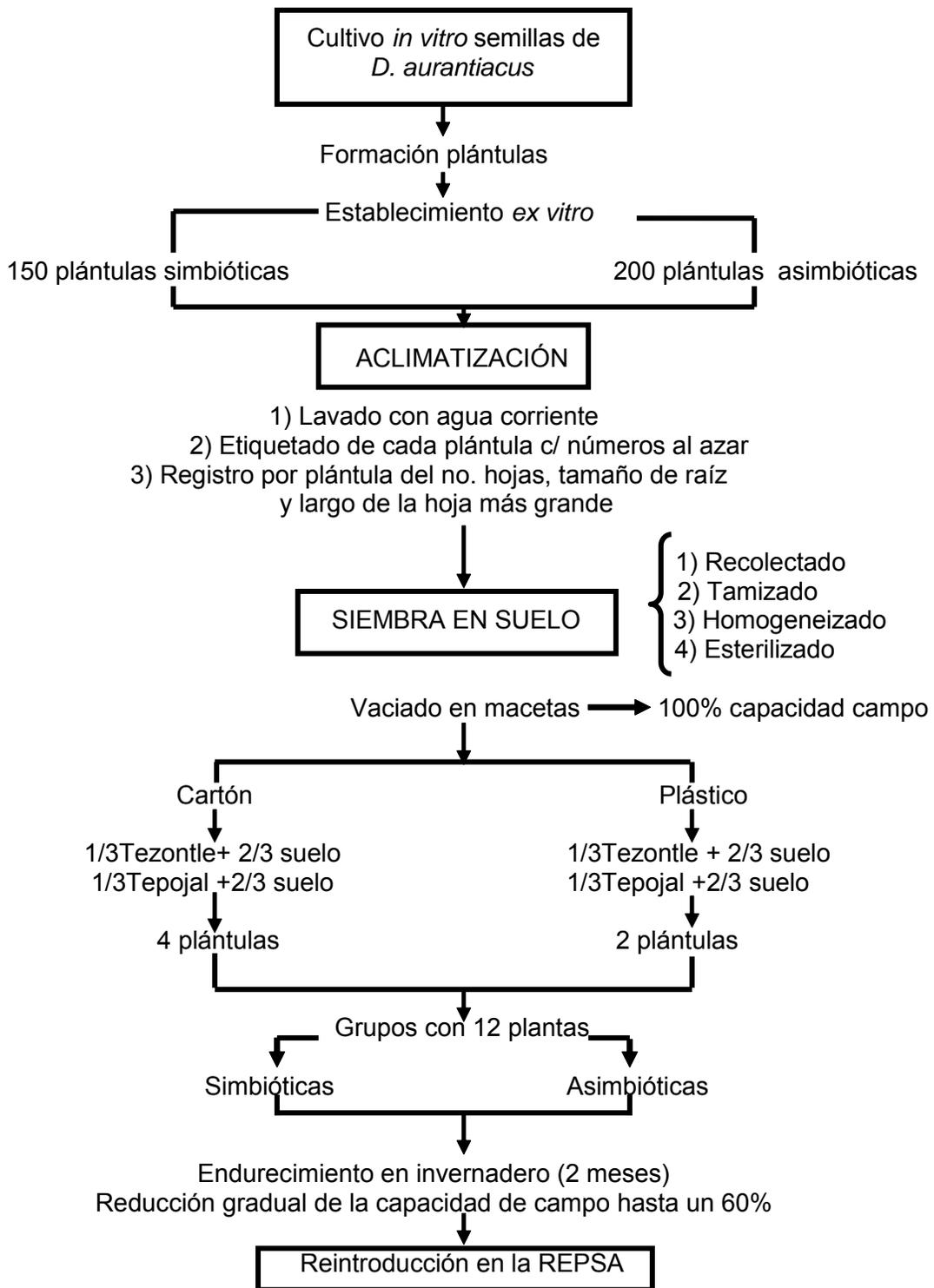
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### a. Establecimiento *ex vitro* de las plantas micropropagadas

Una vez documentada la germinación (Cap.2), las plántulas simbióticas fueron subcultivadas una sola vez en medio MBA al 50% y las asimbióticas dos veces (cada dos meses) en MS al 50%. Para su establecimiento *ex vitro*, las plántulas se lavaron con agua destilada y se colocaron en charolas de plástico cerradas (previamente humedecidas con agua) en la cámara de incubación en las mismas condiciones, durante tres días. Posteriormente, se etiquetó cada plántula con números al azar y se midió el número de hojas, la longitud de la más larga y la longitud de la raíz. El trasplante se hizo en suelo de la REPSA tamizado (2 mm), homogeneizado y esterilizado en autoclave durante 45 min, a 1.5 kg/cm<sup>2</sup> de presión y 121 °C. Las plantas se mantuvieron en sustrato al 100% de su capacidad de campo en condiciones de invernadero reduciéndola gradualmente hasta el 60%, durante un periodo de 2 meses previo a su reintroducción (Figs. 19 y 20).



**Figura 19.** Fase de endurecimiento de las plántulas de *D. aurantiacus*, obtenidas a partir de su cultivo A) simbiótico y B) asimbiótico. En secuencia de izquierda a derecha se observan en la primera columna las plantas obtenidas *in vitro*, en la segunda la eliminación de agar con agua, en la tercera el marcaje de cada planta y en la última su medición.



**Figura 20.** Metodología general para la obtención de plántulas mediante la germinación simbiótica y asimbiótica de semillas de *D. aurantiacus*.

## b. Caracterización de sitios y reintroducción

La reintroducción de las plántulas simbióticas y asimbióticas se llevó a cabo en la Zona Núcleo Poniente de la REPSA (**Fig. 21**). Se realizó durante la época de lluvias en el año 2007, a finales del mes de septiembre, los días 24 y 25. Se eligieron 5 sitios aislados entre sí con distinto grado de perturbación, seleccionados con base en la distribución de individuos adultos de *D. aurantiacus* (en floración), catalogándolos en sitios perturbados (1 y 2) y conservados (3 al 5) (**Fig. 22**). El grado de perturbación se determinó con base en la caracterización de la vegetación circundante y considerando datos microclimáticos y edáficos *in situ* (**Cuadro 7**).



**Figura 21.** Fotografía aérea de la Reserva Ecológica (Fuente: Gaceta UNAM, 2005), dentro de los terrenos de Ciudad Universitaria. Se muestran los cinco sitios seleccionados para la reintroducción de *D. aurantiacus* en el año 2007.

**Cuadro 7.** Caracterización de los sitios de reintroducción de *D. aurantiacus*.

Sitio	Categoría	Micro-ambiente	Vegetación	Características fenológicas	Características edáficas <i>in situ</i>
1	Perturbado (P)	Plano	Sin flora nativa. Sitio totalmente abierto.	Perturbado por incendio e invasión de pastos. Con abundantes heces de conejo y cascajo a los alrededores y expuesto a la incidencia solar directa.	Profundidad máxima del suelo: 20 cm pH con H <sub>2</sub> O destilada=7 pH con CaCl <sub>2</sub> = 6
2	Perturbado (P)	Plano	Cobertura vegetal escasa, únicamente <i>Muhlenbergia robusta</i> en los alrededores y gran cantidad de hojarasca de eucalipto.	Señales de fuego y presencia de abundante pasto. Presencia de heces de conejo. Incidencia solar directa.	Profundidad máxima del suelo: 9 cm pH con H <sub>2</sub> O destilada= 7 pH con CaCl <sub>2</sub> = 7
3	Conservado (C)	Promontorio	Principalmente herbáceas. Abundantes helechos ( <i>Asplenium praemorsum</i> ) y crasuláceas ( <i>Echeveria gibbiflora</i> ). Plantas de mayor talla como <i>Opuntias</i> , <i>Wigandia urens</i> , <i>Senecio praecox</i> , <i>Buddleia cordata</i> y <i>Bursera cuneata</i> .	Sitio elevado con roca expuesta y fragmentada con presencia de pequeños intersticios donde se acumula suelo y hojarasca. Radiación solar directa en la mayor parte del sitio.	Profundidad máxima del suelo: 4 cm pH con H <sub>2</sub> O destilada= 6 pH con CaCl <sub>2</sub> = 5
4	Conservado (C)	Plano	Especies arbustivas y herbáceas todas características de este matorral ( <i>Asplenium praemorsum</i> , <i>Mammillaria magnimamma</i> , <i>Muhlenbergia robusta</i> , <i>Muhlenbergia virletti</i> , <i>Opuntia robusta</i> , <i>Senecio praecox</i> , <i>Echeveria gibbiflora</i> ).	Sobre una plancha de roca basáltica con abundante cobertura vegetal y gran cantidad de hojarasca. Incidencia de luz solar no tan directa por la cobertura vegetal presente.	Profundidad máxima del suelo: 6 cm pH con H <sub>2</sub> O destilada= 7 pH con CaCl <sub>2</sub> = 6
5	Conservado (C)	Plano	Especies arbóreas circundantes ( <i>Schinus molle</i> ) y especies características de la Reserva ( <i>Opuntia robusta</i> , <i>Senecio praecox</i> , <i>Muhlenbergia robusta</i> , <i>Echeveria gibbiflora</i> ).	Abundante cobertura vegetal, que protegen de la incidencia solar directa. Gran cantidad de hojarasca de especies arbóreas circundantes	Profundidad máxima del suelo: 10 cm pH con H <sub>2</sub> O destilada= 7 pH con CaCl <sub>2</sub> = 7

Época de lluvias

Época de secas



**Figura 22.** Fenología de los sitios elegidos para la reintroducción de *D. aurantiacus*, dentro de la REPSA en el año 2007.

### Época de lluvias

### Época de secas



**Figura 22.** Fenología de los sitios elegidos para la reintroducción de *D. aurantiacus*, dentro de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, en el año 2007.

En cada sitio, se reintrodujeron un total de 48 plantas (24 simbióticas y 24 asimbióticas), que fueron previamente aleatorizadas en la etapa de endurecimiento, con la finalidad de formar grupos de 12 individuos provenientes cada uno de ellos de un tratamiento distinto. Su siembra se realizó alrededor de una planta adulta de la misma especie formando cuatro grupos de 12 plantas. En cada uno las plantas fueron alternadas de manera simbiótica-asimbiótica-simbiótica-asimbiótica colocadas en los cuatro puntos cardinales (**Fig. 23**).

La supervivencia de las plantas reintroducidas se registró un año después cada 15 días a lo largo de todo el periodo de lluvias (junio-octubre 2008), considerándose el número de hojas que emergieron, así como el largo y ancho de las mismas. Para realizar estas mediciones se utilizó un vernier digital y se llevó a cabo un registro fotográfico. En total se llevaron a cabo once observaciones.

### c. Análisis estadístico

Los datos de supervivencia obtenidos para las orquídeas reintroducidas, fueron transformados al arcoseno para poder analizarlos estadísticamente con el programa *Statistica* versión 7. Se aplicó un análisis de Tukey-Kramer para determinar las diferencias de medias estadísticamente significativas entre las plantas simbióticas y asimbióticas para cada uno de los sitios de reintroducción. Para evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas reintroducidas se aplicó un análisis de medidas repetidas utilizando el mismo programa antes mencionado.



**Figura 23.** Ubicación espacial de las plantas simbióticas y asimbióticas reintroducidas alrededor de una planta adulta de *D. aurantiacus*.

#### d. Análisis de variables edáficas y climáticas

De acuerdo con el manual de Siebe *et al.* (1996) se realizó la descripción del perfil de suelo en campo, para cada uno de los sitios seleccionados en la REPSA donde se llevó a cabo la reintroducción de las plántulas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus*. Se consideraron las siguientes características: profundidad y espesor, textura, pedregosidad, color, pH, salinidad y sodicidad, porosidad, contenido de materia orgánica, contenido de carbonatos, agregación, densidad aparente, humedad actual (Anexos 2.1 a 2.5).

Para cada sitio se tomó una muestra de 1 kg de suelo en los primeros 3 a 5 cm (sitios conservados y perturbados, respectivamente) de la zona más cercana a donde se reintrodujeron las plantas y se realizó una caracterización química en laboratorio de la cubierta edáfica. Se determinó pH con un potenciómetro (Herre, 2001), fósforo disponible por el método de Bray-Kurtz (Shimada, 2000), cationes intercambiables ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) por extracción con acetato de amonio y lectura flamométrica (Sánchez y Shimada, 2007) y porcentaje de C y N total cuantificado con TOC (Mora y Shimada, 2007).

Se llevó a cabo la medición de variables climáticas durante toda la época de secas del año 2007 y la época de lluvias del 2008 en cada uno de los micrositos de reintroducción con registradores de datos (HOBO Onset Computer Corporation, Massachusetts, USA). Se registraron periódicamente (cada media hora) datos de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (%), luz fotosintéticamente activa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), humedad de suelo ( $\text{m}^3/\text{m}^3$ ) y precipitación (mm) (**Fig. 24**).



**Figura 24.** Registradores de datos HOBO-Pendant, utilizados para la medición de las condiciones microambientales. a) Temperatura, b) humedad relativa ambiental, c) radiación fotosintéticamente activa (PAR), d) humedad de suelo, e) microestación y f) pluviómetro.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### a. Establecimiento de las plantas micropropagadas de *D. aurantiacus* en condiciones *ex vitro*

La obtención de plantas simbióticas *in vitro* se logró a los 30 días después de la siembra de las semillas (dds); mientras que la formación de plantas asimbióticas se registró hasta los 200 dds (después de cuatro subcultivos). Esta marcada diferencia en el tiempo de obtención de las plantas es una evidencia clara del efecto benéfico de los hongos micorrízicos en el cultivo *in vitro* de orquídeas terrestres (Zettler, 1997; Ortega-Larrocea, 2008).

Se observó a los 180 dds, la formación de 2 a 3 hojas en las plántulas obtenidas por ambas vías. Sin embargo; para esta fecha solamente en las plántulas asimbióticas se observó la formación de 1 a 2 raíces, mientras que las simbióticas carecían de éstas. Las raíces se generaron hasta después de 30 días de que las plántulas fueron establecidas en condiciones *ex vitro* en sustrato de la REPSA. Esto coincide con lo observado anteriormente para esta especie por Rangel (2006), quien también señaló no haber presenciado la formación de raíces *in vitro*, sino hasta que estableció las plantas en un sustrato. La diferencia en la formación de raíces en plantas simbióticas y asimbióticas se puede deber a que en las primeras, las plantas obtienen recursos del medio vía los hongos micorrízicos y no requieren de la formación de raíces. En las segundas, las plantas requieren de estructuras especializadas para la captación de nutrimentos por lo que generan lo antes posible raíces para completar su desarrollo. Aún así esto no modificó la clasificación de la morfogénesis propuesta por Zettler y Mc Innis (1993), donde el estadio 6 corresponde a plántula con raíces.

Debido a que se sembraron un mayor número de semillas para los tratamientos asimbióticos, se logró la obtención de 200 plántulas asimbióticas y 150 simbióticas (**Fig. 25**). Durante el periodo de endurecimiento en invernadero se registró una supervivencia del 74% para las primeras y del 96% para las simbióticas.

En el **Cuadro 8** se muestran los porcentajes de obtención de plántulas en la etapa de trasplante a suelo, respecto al número total de semillas sembradas inicialmente para los tratamientos simbióticos y asimbióticos. En éste se observa que con los tratamientos simbióticos se requiere tres veces menos germoplasma, para obtener un número similar de plantas para ser reintroducidas. Esto desde luego es un aproximado e involucra toda la variabilidad de los tratamientos incluidos, es decir, que posiblemente estas proporciones variarían si se consideraran únicamente tanto el tratamiento asimbiótico como el inóculo micorrízico más efectivos.



**Figura 25.** Desarrollo de plántulas de *D. aurantiacus* en invernadero. **A)** Plántulas simbióticas, **B)** Plántulas asimbióticas.

**Cuadro 8.** Número de individuos simbióticos y asimbióticos de *D. aurantiacus*, obtenidos en las etapas de trasplante a suelo y reintroducción.

Tratamiento	N° individuos trasplantados	% del total de semillas sembradas	N° individuos aclimatizados	% de supervivencia en invernadero
<b>ASIMBIÓTICO</b>	200	33.3	148	74
<b>SIMBIÓTICO</b>	150	81.5	145	96.6

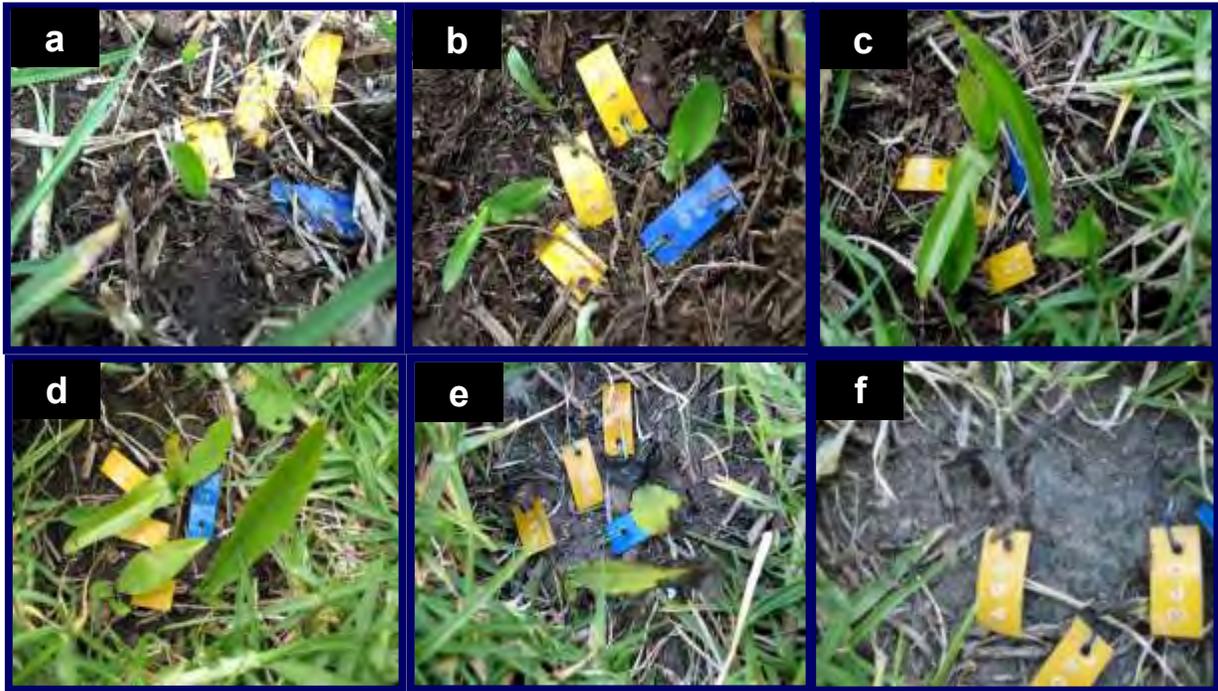
**b. Reintroducción de *D. aurantiacus* a su hábitat**

A los 30 días después de la reintroducción (ddr) de las plantas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus*, se observó la desaparición de las hojas en prácticamente todos los individuos para los sitios perturbados (1 y 2). Esto también fue previamente observado para esta especie por Rangel, 2006. Sin embargo; la persistencia de éstas se observó en un mayor número de plantas en los sitios conservados 3, 4 y 5 (12, 42 y 44%, respectivamente).

Al cabo de un año se registró la supervivencia de las plantas durante la época de lluvias. A principios del mes de junio se observó la emergencia de las primeras hojas en campo en todos los sitios. Fue posible apreciar el desarrollo completo de éstas hasta que senescieron nuevamente por completo durante el mes de noviembre (**Figs. 26 y 27**).

Estos resultados reafirman la fenología reproductiva descrita para esta especie, la cual pierde su parte aérea (inflorescencia y hojas) en época de secas quedando sus estructuras persistentes (raíces tuberosas), completamente protegidas bajo el nivel del suelo (Salazar, 2009). Es hasta el inicio de la época de lluvias que se observa la aparición de las hojas, en el mes de junio y en agosto el surgimiento de la inflorescencia (Flores, 2006).

## SITIO 1

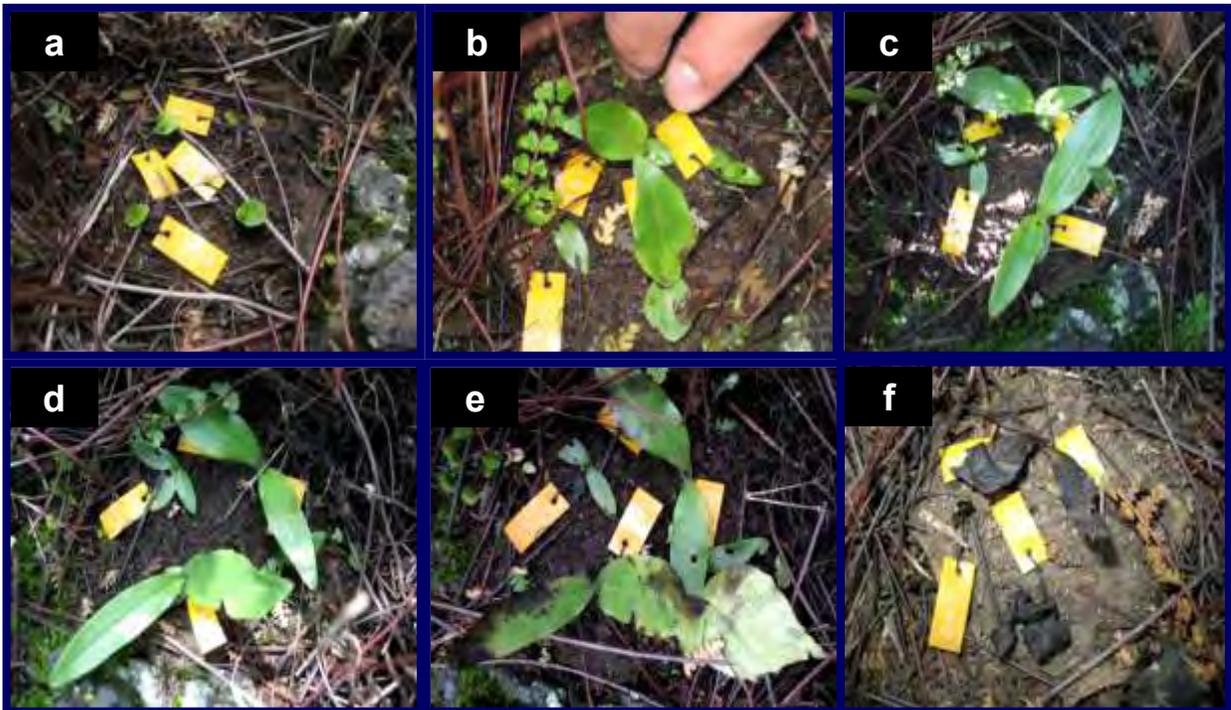


## SITIO 2

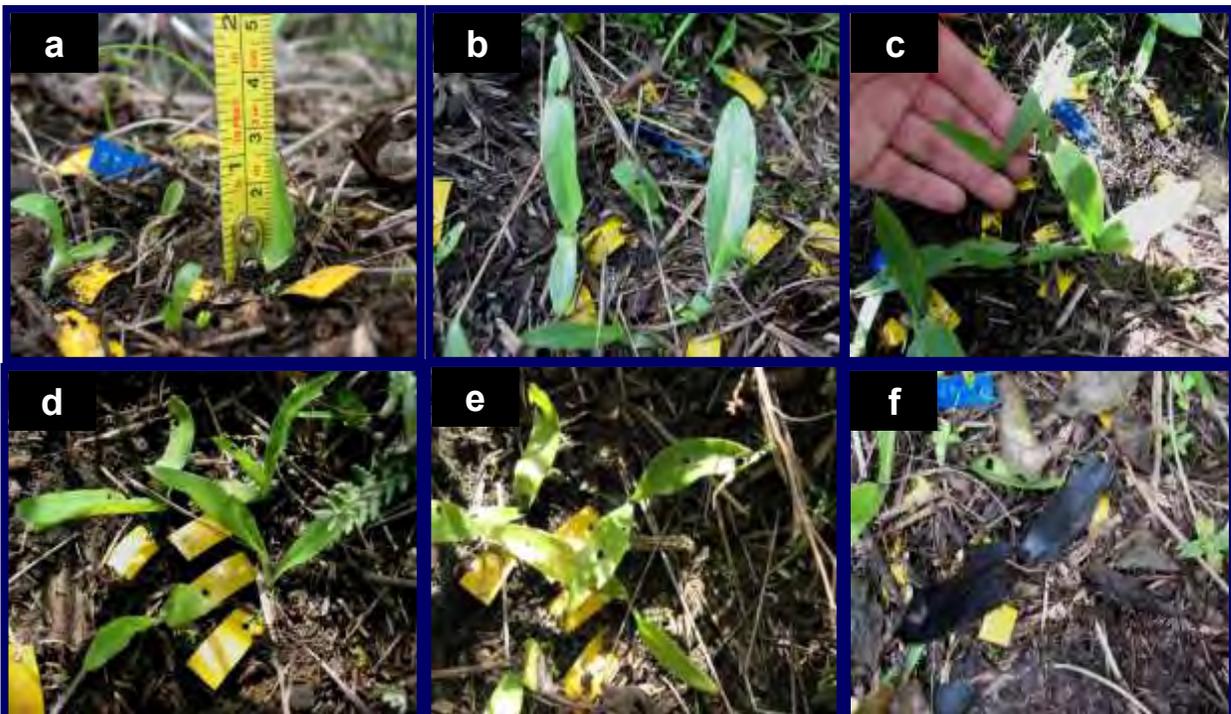


**Figura 26.** Supervivencia y desarrollo foliar en plantas de *D. aurantiacus* un año después de su reintroducción en campo en los sitios perturbados, durante los meses de a) junio, b) julio, c) agosto, d) septiembre, e) octubre, f) noviembre del 2008.

### SITIO 3



### SITIO 4



**Figura 27.** Supervivencia y desarrollo foliar en plantas de *D. aurantiacus* un año después de su reintroducción en campo en los sitios conservados, durante los meses de a) junio, b) julio, c) agosto, d) septiembre, e) octubre, f) noviembre del 2008.

## SITIO 5

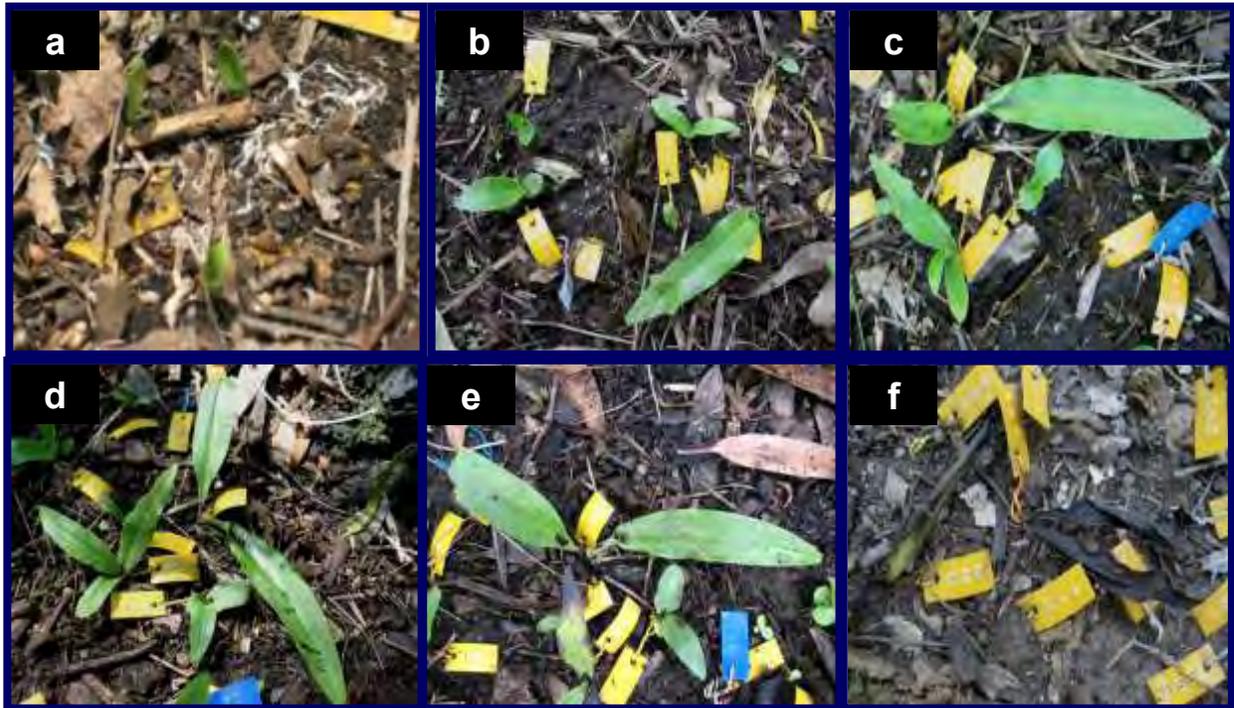


Figura 27. (continuación).

### c. Supervivencia de *D. aurantiacus*

En la **figura 28** se muestran los porcentajes de supervivencia total en cada sitio de reintroducción, registrados un año después de la reintroducción de las plantas simbióticas y asimbióticas. Se observó una diferencia estadística significativa en la supervivencia de las plantas micorrizadas y las no micorrizadas, donde fue mayor la supervivencia para las primeras. Esto reflejó la importancia de la asociación de los hongos micorrízicos orquideoides para su establecimiento y desarrollo en condiciones naturales. Tal y como lo señalaron Ramsay y Dixon (2003), quienes han hecho énfasis en la importancia de mantener las interacciones planta-micorriza como una estrategia en el manejo *in situ* del hábitat. Esto se refiere a que al reintroducir plantas micorrizadas también se reintroduce a los hongos asociados, los cuales tienen la capacidad de sobrevivir como saprobios en ausencia de un hospedero. De ahí la importancia de recurrir a aislados fúngicos obtenidos del mismo hábitat (Ortega-Larrocea y González, 2008).

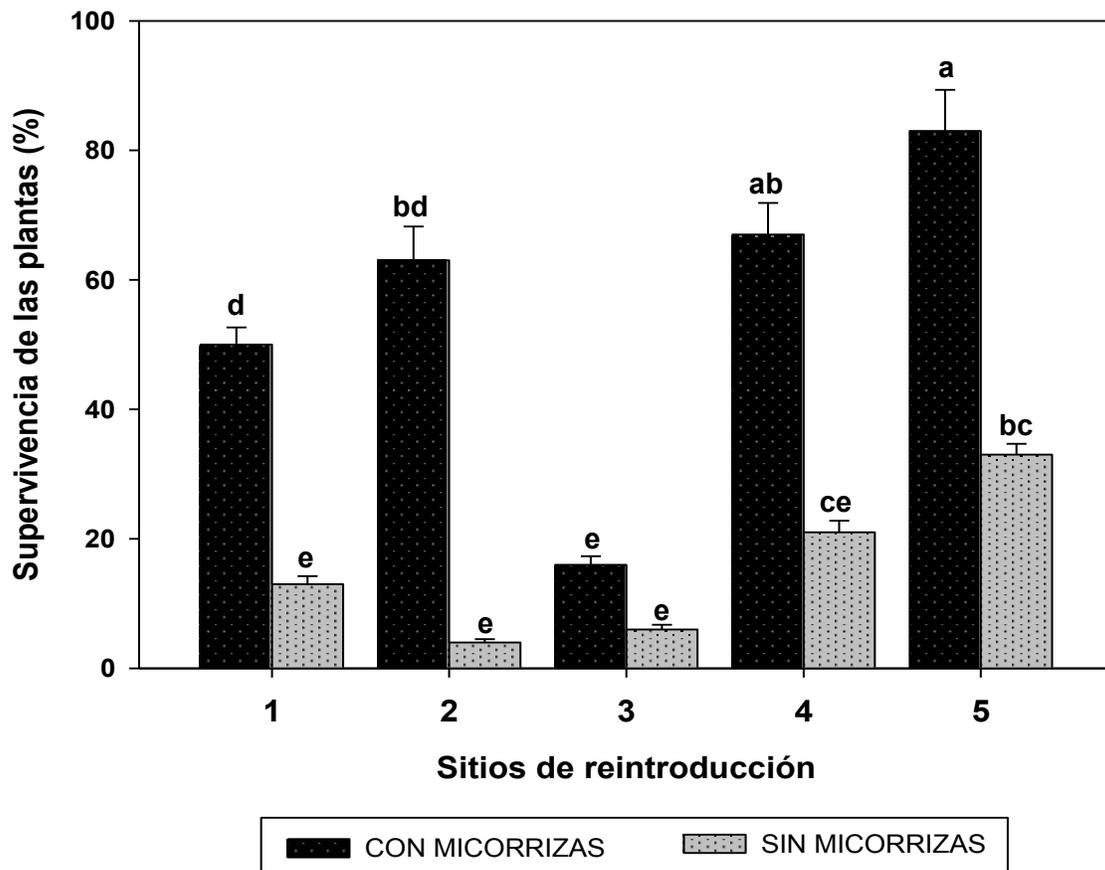
Sin embargo, con respecto a las orquídeas terrestres es prácticamente improbable que puedan sobrevivir a largo plazo en ausencia de sus hongos asociados (Rasmussen, 1995). Esto se ha reiterado en la literatura a lo largo del tiempo por diversos autores, quienes han enfatizado que las orquídeas terrestres tienen una completa o parcial dependencia con sus hongos micorrízicos en parte o durante todo su ciclo de vida (Rasmussen, 2002; Batty *et al.*, 2001; 2006). Lo anterior ocurre principalmente durante la germinación de las semillas, lo que permite que las plantas se desarrollen micotróficamente durante toda su vida. Este trabajo permitirá corroborar esta teoría en el futuro, al haber reintroducido paralelamente poblaciones simbióticas y asimbióticas que fueron propagadas con el mismo germoplasma, bajo las mismas condiciones y en el mismo tiempo y sitios de reintroducción.

Por tanto, la propagación simbiótica a diferencia de la asimbiótica (no mediada por los HMO) se sugiere como una vía más exitosa para la obtención de plantas con fines de reintroducción. Esto ocurre porque a pesar de que las plantas asimbióticas se pueden micorrizan *in situ* una vez que han sido reintroducidas, lo más probable es que su desarrollo no sea igual en comparación con las plantas que desde sus etapas iniciales (semillas) han sido micorrizadas.

El presente estudio permitió establecer por primera vez un parámetro real de comparación entre plantas micorrizadas y las que no lo están al momento de su reintroducción en su ambiente natural. Hasta donde se sabe esto no se había realizado previamente. Los trabajos encontrados en la literatura señalan haber llevado a cabo la germinación simbiótica y/o asimbiótica de semillas hasta lograr la obtención de plantas, pero solamente llegan hasta la fase de establecimiento en invernadero (Anderson 1991; Zettler y Mc Innis, 1993; Zettler *et al.*, 2000; Markovina y McGee, 2000; Dutra *et al.*, 2008) o bien aquéllos donde se ha realizado la reintroducción sólo por una de las dos vías (Rubluo *et al.*, 1989; Castillo, 2002; Rangel, 2006; Stewart, 2008; Smith, 2009). Además, este trabajo es uno de los pocos donde se ha realizado la reintroducción de una orquídea para el género

*Dichromanthus* (anteriormente descrito como *Spiranthes*), para el cual solo se cuenta con un reporte en la literatura sobre reintroducción (Stewart *et al.*, 2003).

Por otro lado, independientemente de la vía de propagación, se observó que la supervivencia también se vio influenciada por el estado de conservación de los sitios. En los sitios 4 y 5 de reintroducción (sitios conservados), fue donde se registraron los mayores porcentajes de supervivencia tanto para las plantas simbióticas como asimbióticas. Aunque en el sitio 3 considerado también dentro de los sitios más conservados, se registraron porcentajes de supervivencia menores a los encontrados para los sitios perturbados (sitios 1 y 2).



**Figura 28.** Supervivencia de plantas de *D. aurantiacus* micorrizadas y no micorrizadas, un año después de su reintroducción en su hábitat natural, en los sitios perturbados (1 y 2) y conservados (3, 4 y 5). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Las barras indican la desviación estándar.

De manera general, la supervivencia de orquídeas terrestres reintroducidas presenta resultados muy variables dependiendo de la especie. La supervivencia obtenida para las plantas simbióticas de *D. aurantiacus* fue favorable, al haberse obtenido hasta un 83% durante el primer año de reintroducción. Otros proyectos de reintroducción de plantas simbióticas de orquídeas terrestres se consideraron exitosos al haber obtenido de 75% a 80% de supervivencia de las plantas (Ramsay y Stewart; 1998; Batty *et al.*, 2006).

Sin embargo, a lo largo del tiempo, se ha documentado que la supervivencia de las plantas reintroducidas declina a lo largo del tiempo (Batty *et al.*, 2006; Rangel, 2006; Stewart, 2008; Smith *et al.*, 2009). De ahí la importancia de realizar una evaluación constante y a largo plazo de las poblaciones de orquídeas reintroducidas para poder tener una medida real de su supervivencia y establecimiento *in situ* (Ortega *et al.*, 2009).

Respecto a las orquídeas que han sido reintroducidas dentro de la REPSA de manera simbiótica, la supervivencia registrada ha sido menor en comparación a la obtenida en este trabajo, tal es el caso de *Bletia urbana*, donde se registró una supervivencia del 62% al cabo de un año (Castillo, 2001). Sin embargo, a lo largo de ocho años después de la reintroducción se observó una supervivencia sostenida anual de aproximadamente el 50% de las plantas (P. Ortega, com. pers., 2009).

En el caso particular de *D. aurantiacus*, los resultados presentados aquí contrastan con los obtenidos por Rangel (2006), quien señaló que los porcentajes de supervivencia para las plántulas reintroducidas simbióticamente fueron muy bajos después del primer año, observando sólo el 15% de supervivencia. Al segundo año, menos del 5% de esta población volvió a emerger; mientras que en una segunda reintroducción con 131 plántulas, al año siguiente describió que aproximadamente sólo el 25% de éstas sobrevivieron (Ortega-Larrocea y Rangel, 2007). Se ha registrado la supervivencia de estas poblaciones a lo largo del tiempo, siendo después de cinco años solamente del 3% para la primer reintroducción; mientras que

para la segunda se registró un 20% después de cuatro años (Rangel, com. pers., 2009).

En el presente trabajo, para las plantas de *D. aurantiacus* reintroducidas de manera asimbiótica, al cabo de un año se registraron porcentajes de supervivencia bajos en comparación con los obtenidos para las simbióticas, siendo el 33% el máximo registrado para uno de los sitios de reintroducción (sitio 5) y el 6% el porcentaje mínimo observado (sitio 3). Como se mencionó antes, para esta especie no se había intentado la reintroducción asimbiótica y se puede observar que estos resultados superan a los obtenidos para *Bletia urbana*, con la cual se registró una supervivencia del 15% después de un año (Rubluo *et al.*, 1989; Rubluo, 1993).

Por otro lado, al comparar estos resultados con la supervivencia en orquídeas epífitas, los porcentajes de supervivencia obtenidos para las plantas simbióticas de *D. aurantiacus* son mayores que los descritos en la literatura para la el único estudio que a la fecha existe sobre reintroducción simbiótica de una orquídea epífita (Zettler *et al.*, 2007). Sin embargo; a diferencia de las terrestres, las orquídeas epífitas son visualmente perennes y su supervivencia se considera como el número de brotes nuevos que se desarrollan en la planta y el establecimiento de las raíces en su hospedero (Wing y Thame, 2005). En el caso de las plantas asimbióticas de *D. aurantiacus*, los porcentajes de supervivencia obtenidos fueron menores en comparación con otros trabajos como el de Martínez (1991). Sin embargo, se han descrito en la literatura trabajos donde ha sido nula la supervivencia de las plantas reintroducidas por la vía asimbiótica (0%), debido al ataque de insectos (De la Cruz, 2006). Esto es un argumento más que destaca la estrecha micotrofia que presentan las orquídeas terrestres, así como la importancia de que las plantas puedan ir micorrizadas al momento de su reintroducción para evitar el posible ataque de algunos patógenos (Rasmussen, 1995; Zettler, 1997).

#### **d. Desarrollo de las plantas reintroducidas de *D. aurantiacus* en su hábitat natural**

La comparación entre el crecimiento y desarrollo de las plantas en campo se presenta en las **figuras 29 y 30**, donde se observó el desarrollo foliar a lo largo de toda la época de lluvias. Se muestra que el tamaño máximo alcanzado tanto para el largo como el ancho de las hojas, se registró a los 380 días después de la reintroducción de las plantas (ddr). Después de este tiempo comenzó a ocurrir el marchitamiento de las mismas.

El análisis estadístico realizado permitió comparar las plantas simbióticas y asimbióticas a lo largo del tiempo. Para la variable largo de las hojas se encontró variación entre los sitios 2 y 4. En el caso del ancho de las hojas, se encontraron diferencias significativas entre prácticamente todos los sitios de reintroducción (**Cuadro 9**) (Anexos 3.1 a 3.4)

**Cuadro 9.** Diferencias encontradas con el análisis de varianza de medidas repetidas al comparar en su conjunto las plantas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus*, entre los distintos sitios de reintroducción ( $p < 0.05$ ), a los 380 días después de la reintroducción.

<b>Variable</b>	<b>Sitios diferentes entre sí</b>
<b>Largo de las hojas</b>	Sitios 2 y 4.
<b>Ancho de las hojas</b>	Sitios 1, 2, 4 y 5.

En el sitio 5 además de ser en el cual se registraron los mayores porcentajes de supervivencia para las plantas propagadas por ambas vías (83 y 33%, simbióticas y asimbióticas respectivamente), también se observó que fue donde las plantas alcanzaron los máximos tamaños con respecto al largo de sus hojas para ambos casos. Por otro lado, a pesar de que el sitio 3 fue donde se registraron los menores

porcentajes de supervivencia para ambos tratamientos (16 y 6%, simbióticas y asimbióticas respectivamente), la altura de las plantas que lograron sobrevivir fue similar a la de algunos de los sitios con el mayor porcentaje de supervivencia (**Fig. 30**).

Por tanto, el desarrollo foliar independientemente del grado de perturbación o conservación del sitio, estuvo determinado por la presencia inicial de los hongos micorrízicos orquideoides, puesto que en los sitios perturbados (1 y 2), las plantas alcanzaron tamaños muy similares a las de los sitios conservados (3 al 5).

Considerando los resultados antes descritos resulta evidente que las plantas micorrizadas no solamente se vieron favorecidas en los porcentajes de supervivencia en campo en comparación con las no micorrizadas, sino también en el tamaño que alcanzaron en todos los sitios de reintroducción. Esto se ha visto que puede estar determinado por el tiempo previo de crecimiento y desarrollo que se les ha dado las plantas durante su fase de cultivo y endurecimiento en invernadero, siendo así importante su tamaño inicial al momento de su reintroducción (Stewart, 2008; Takahashi *et al.*, 2008). La observación anterior coincidió con los resultados obtenidos en este trabajo, dado que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tamaños promedio de las hojas y/o raíces o cormos de las plantas al momento de ser establecidas en condiciones de invernadero (**Cuadro 10**), siendo mayores en las plantas simbióticas en comparación con las asimbióticas, a pesar de que las primeras estuvieron menor tiempo en cultivo *in vitro* (2 y 6 meses, respectivamente).

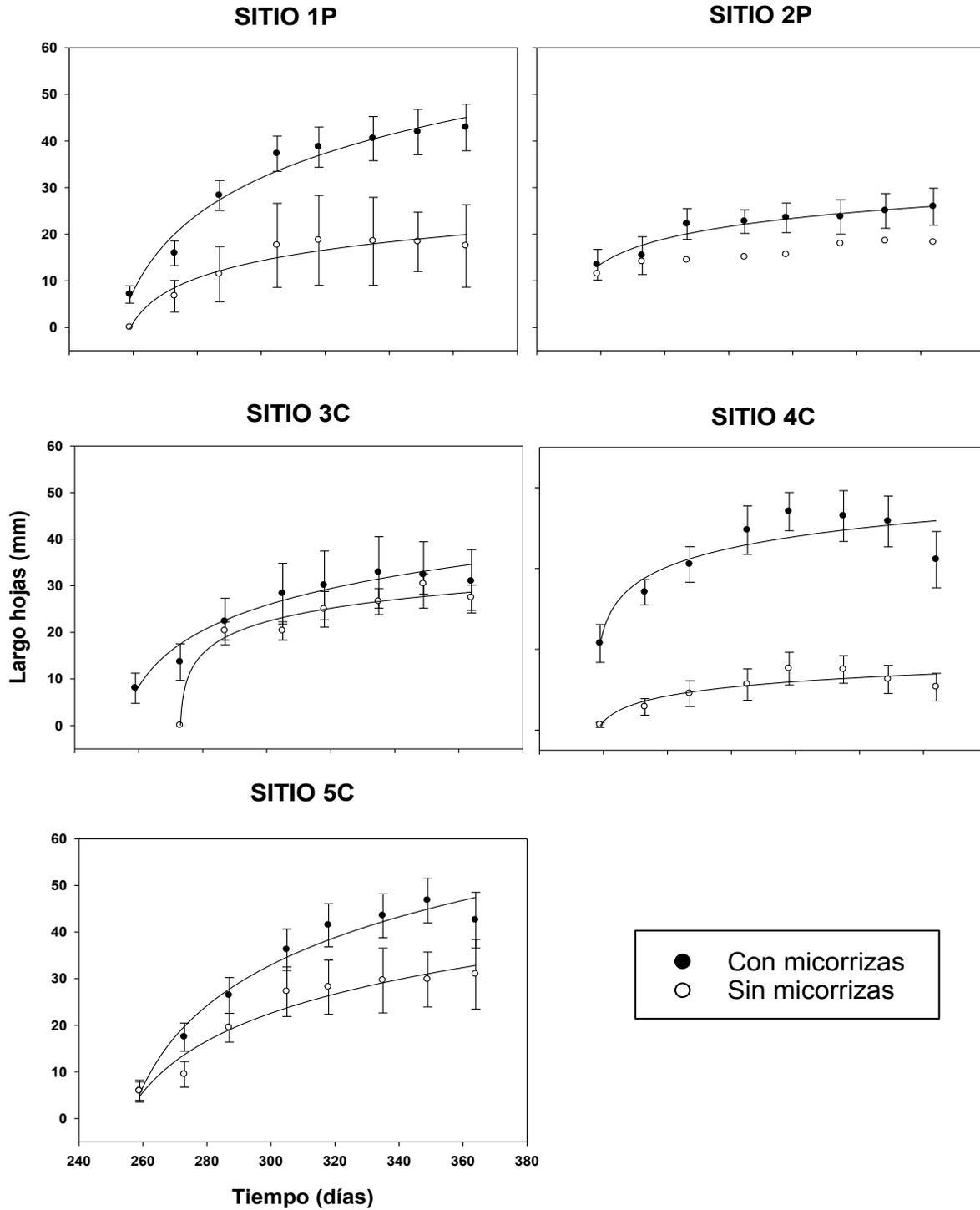
Al comparar entre sí los tamaños de las plantas dentro de los tratamientos (micorrizadas y no), se observó que éstas tenían tamaños muy similares (**Cuadro 10**). Esto demostró que el crecimiento y desarrollo de las plantas obtenido después de un año de su reintroducción en campo, no fue favorecido de manera inicial para algún sitio en particular.

**Cuadro 10.** Tamaños promedio de las plantas micorrizadas (M+) y las no micorrizadas (M-), obtenidas de la propagación *in vitro*.

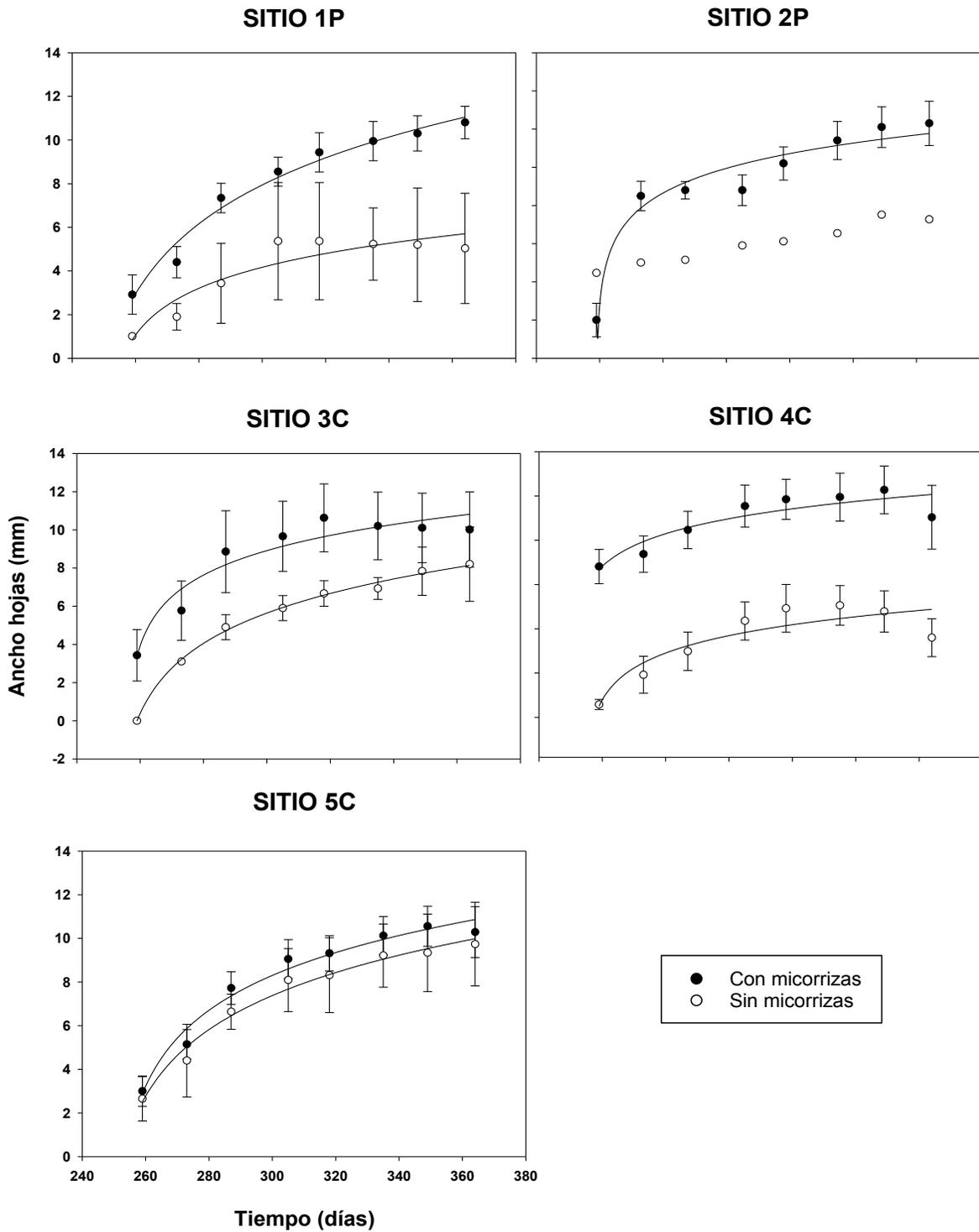
SITIO	M(+)	M(+)	M(+)	M(-)	M(-)	M(-)
	N° hojas	Largo hoja	Largo cormo	N° hojas	Largo hoja	Largo raíz
1	2.58±0.71a	2.76±1.45 a	0.30±0.11 a	2.62±0.57 a	1.15±0.53 a	0.91±0.72 ab
2	2.75±0.53 a	2.59±1.46 a	0.33±0.12 a	2.62±0.49 a	1.65±0.64 b	1.40±0.75 a
3	2.93±0.78 a	2.72±1.22 a	0.29±0.10 a	2.27±0.75 a	1.50±0.46 ab	0.88±0.50 b
4	2.87±0.67 a	2.42±1.16 a	0.33±0.12 a	2.33±0.56 a	1.44±0.52 ab	0.94±0.50 ab
5	2.62±0.64 a	2.89±1.70 a	0.33±0.13 a	2.54±0.83 a	1.33±0.60 ab	1.36±0.70 a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas dentro de cada grupo ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos de supervivencia para las plantas de *D. aurantiacus* cultivadas por las dos vías, permitieron demostrar que el posterior desarrollo de las propagadas por la vía asimbiótica fue menor; aún cuando después de un año de su establecimiento en suelo, estas plantas tuvieron la capacidad de ser micorrizadas *in situ*. Es posible que en las plantas propagadas por la vía simbiótica, el almacenamiento de nutrientes haya sido mayor a lo largo del primer año de reintroducción, permitiéndoles acumular una mayor cantidad de reservas que les ayudaron a rebrotar con mayor vigor en comparación con las asimbióticas. Esto se debe en parte a que los hongos micorrízicos impiden la entrada de organismos patógenos en las plantas, lo que favorece que tengan una mejora en su nutrición. No se hicieron pruebas para determinar si al año de supervivencia, las raíces de las plantas asimbióticas y simbióticas estaban micorrizadas o no y en qué porcentajes. Se prefirió dejar a las plantas sin perturbar, para no alterar bajo ninguna circunstancia su supervivencia, dado que el simple hecho de recolectar una raíz en una planta de este tamaño podría producir su muerte.



**Figura 29.** Largo de las hojas alcanzado en las plantas de *D. aurantiacus* a los 380 días después de su reintroducción en campo, en distintos sitios de reintroducción. P=perturbado, C= Conservado.



**Figura 30.** Ancho de las hojas alcanzado en las plantas de *D. aurantiacus* a los 380 días después de su reintroducción en campo, en distintos sitios de reintroducción. P=perturbado, C= Conservado.

#### e. Variables edáficas

En el cuadro 12 se presenta la caracterización físico-química de la cubierta edáfica para cada sitio de reintroducción. Los datos obtenidos muestran de manera general que existe una gran heterogeneidad entre sitios y que independientemente de la vía de propagación, la supervivencia de las plantas también se vio influenciada por las características de éstos.

La diferencia entre los sitios perturbados y los conservados se dio principalmente en el contenido de C y N; así como en algunos cationes como  $\text{Na}^{2+}$ , siendo mucho menor en los primeros. Los datos de P disponible también mostraron valores más altos para los dos primeros sitios (1 y 2). La relación C:N indica el grado de humificación de la materia orgánica en el suelo y por consiguiente de la calidad de ésta. Lo anterior refleja que, aún cuando hay una mayor profundidad del suelo en los sitios perturbados, por la introducción de escombro y el aumento de materia orgánica por el crecimiento de pastos invasivos, el efecto del manejo como el fuego disminuye el C y N por su volatilización y aumenta la disponibilidad de ortofosfatos.

En cuanto al contenido de macronutrientes, la cubierta edáfica de los sitios conservados, aunque mucho más delgada fue más rica (**Cuadro 11**). Esto fue un factor que quizá determinó la supervivencia de las plantas en campo, puesto que en los sitios perturbados (1 y 2), los porcentajes de supervivencia obtenidos fueron menores a los obtenidos para los conservados, a excepción del sitio 3.

En el **Cuadro 12** se muestra la interpretación de las características edafológicas para cada uno de los sitios de reintroducción, evaluadas según Siebe *et al.* (1996). Como se observa, tanto los sitios perturbados como conservados presentan una alta conductividad hidráulica y por consiguiente buenas condiciones de drenaje. Los resultados obtenidos respecto a los nutrientes presentes en el suelo, concuerdan con lo descrito por Flores (2006), quien encontró que el sustrato

donde crece esta especie de orquídea en la REPSA, presenta un alto porcentaje de espacios porosos, por lo que existe un buen drenaje del agua.

**Cuadro 11.** Variables edáficas cuantificadas en laboratorio para cada sitio de reintroducción en la Reserva Ecológica El Pedregal de San Ángel.

SITIO	pH	pH	C	N	C:N	P Bray	Cationes intercambiables				
	KCl	Agua	total	total		mg/kg	cmol/kg	Ca	Mg	K	Na
	1:2.5	1:2.5	(%)	(%)							
1P	5.95	6.29	3.44	0.26	13.23	33.79	13.57	2.94	1.33	0.04	
2P	7.02	6.99	5.06	0.40	12.65	21.62	26.45	4.74	3.10	0.06	
3C	5.41	6.07	23.91	1.79	13.35	14.65	38.17	7.15	2.08	0.07	
4C	6.94	7.01	16.96	1.33	12.75	5.67	43.54	6.04	1.13	0.08	
5C	5.51	5.74	13.49	1.08	12.49	2.68	29.07	4.40	0.71	0.12	

**Cuadro 12.** Evaluación edafocológica (según Siebe, 1996) de los sitios de reintroducción de *D. aurantiacus*, en la Reserva Ecológica El Pedregal de San Ángel.

SITIO	dCC	CC	Kf
1	muy baja	muy baja	muy alta
2	muy baja	muy baja	muy alta
3	muy baja	muy baja	muy alta
4	muy baja	muy baja	alta
5	muy baja	muy baja	alta

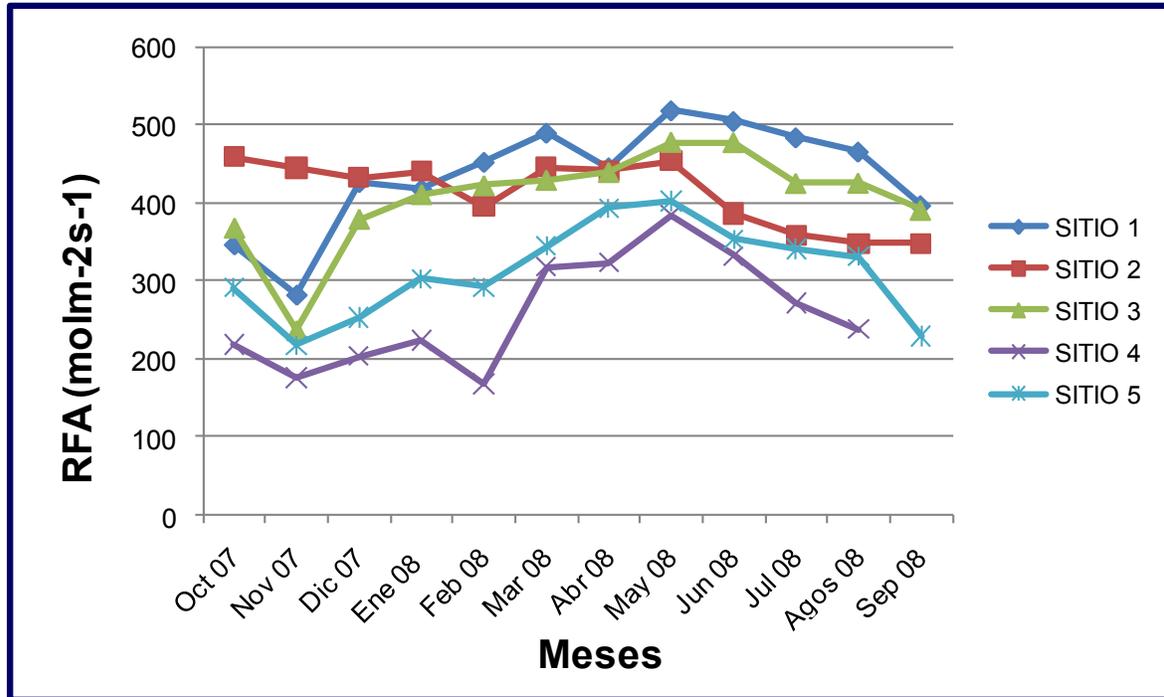
dCC=capacidad de agua disponible, CC= capacidad de campo, Kf= conductividad hidráulica.

El suelo de la reserva se clasificó como un Inceptisol (FAO, 1988). Una de las características principales de estos suelos es que dado su espesor y bajo contenido de limos y arcillas, tiene una alta capacidad de infiltración pero una baja capacidad de retención de agua, a pesar de su elevado contenido de materia orgánica. Así en todos los sitios, un factor que puede estar limitando el desarrollo de las plantas reintroducidas es la baja capacidad de agua disponible y de retención de la misma, sobre todo en los sitios donde la insolación es alta.

#### **f. Variables microclimáticas**

En las siguientes figuras se muestran las respuestas obtenidas de las variables climáticas analizadas para cada sitio de reintroducción. De manera general se encontró una notable heterogeneidad ambiental entre sitios en todos los parámetros evaluados.

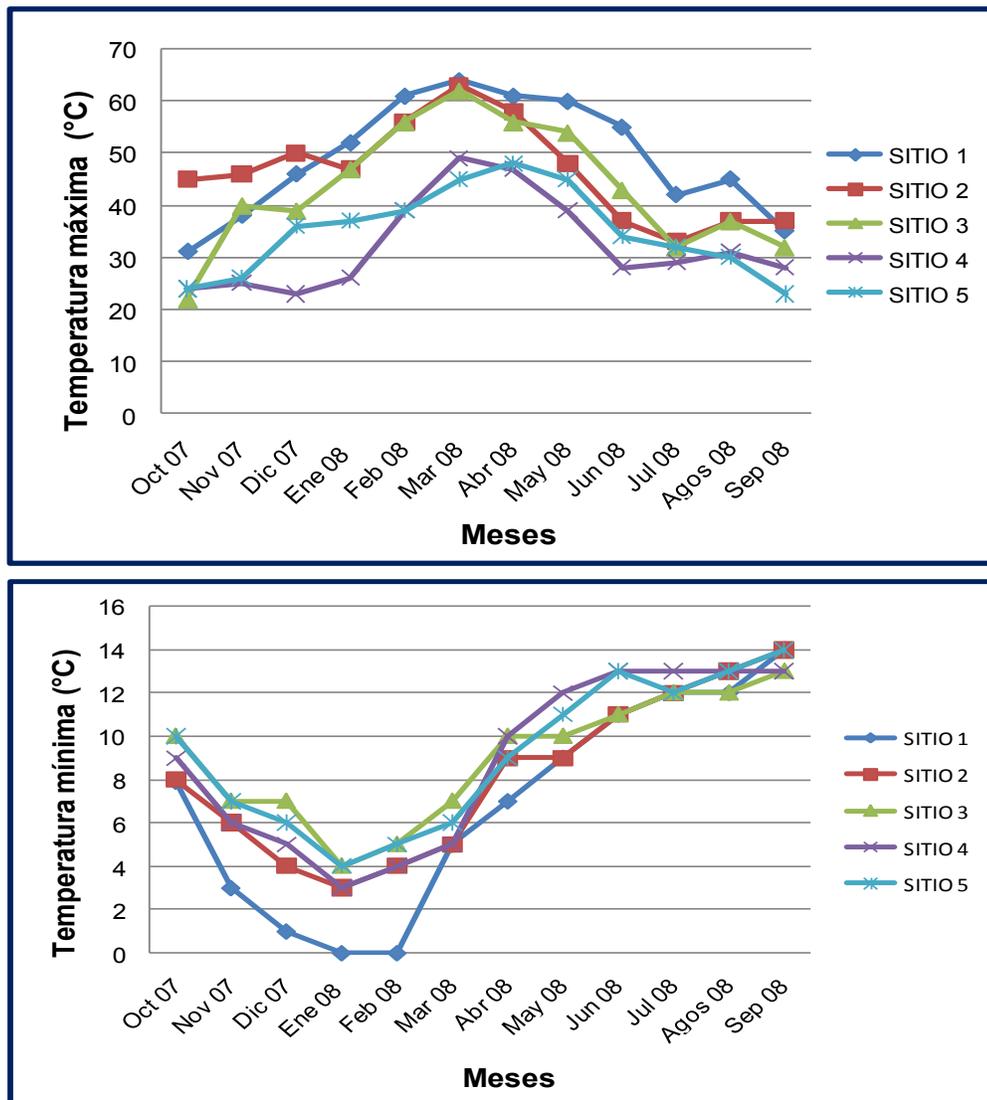
En la **figura 31** se observa que la radiación fotosintéticamente activa (RFA) varió a lo largo del año entre los distintos sitios de reintroducción. Los meses con mayor intensidad luminosa fueron octubre, enero y junio. No obstante, existieron diferencias marcadas entre los sitios respecto a la cantidad de radiación que recibió cada uno. Los sitios perturbados (1 y 2) presentaron los mayores valores de radiación, en comparación con los sitios conservados (4 y 5), donde la intensidad luminosa fue mucho menor. Esto se debió al tipo de cobertura vegetal (ver cuadro 7), donde para los sitios conservados, distintas especies de la vegetación del matorral tienen mayor cobertura y por lo tanto mantuvieron una menor luminosidad que los sitios completamente expuestos y cubiertos por pastos. Sin embargo; el sitio 3 catalogado dentro de los sitios conservados, por ser tipo promontorio mostró una gran abertura y exposición a la radiación solar, por lo que se encontraron valores similares de RFA a los de los sitios perturbados.



**Figura 31.** Fluctuación de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) a lo largo de un ciclo anual en la REPSA, cuantificada en los cinco micrositos de reintroducción de *D. aurantiacus*.

La intensidad luminosa tiene un efecto directo en la temperatura. En la **figura 32** se puede apreciar la fluctuación de temperatura promedio anual máxima y mínima que se registró en los sitios. Se observó que los meses más calurosos del año fueron marzo y abril, mientras que los meses más fríos fueron enero y febrero. Esto coincidió con el ombrograma del sitio donde se registró en enero la menor temperatura del año y en mayo la temperatura máxima (Orozco *et al.*, 2009). Las temperaturas promedio máximas y mínimas también fueron contrastantes entre los sitios perturbados y los conservados, a excepción del sitio 3 donde se observaron valores similares a los sitios perturbados. En este último y en los sitios perturbados se alcanzaron temperaturas máximas por arriba de los 60 °C. Las temperaturas mínimas registradas también fueron en los meses de enero y febrero, alcanzando hasta 0 °C en uno de los sitios perturbados. Sorpresivamente en los sitios 4 y 5 las temperaturas máximas, fueron casi 20 grados menores que en el resto de los demás sitios.

Estas diferencias tan marcadas en las condiciones de luz y temperatura entre sitios de un mismo hábitat, se explicaron por la presencia de diversos microambientes en el Pedregal de San Ángel (Cano-Santana y Meave, 1996; Orozco *et al.*, 2009). Sin embargo a pesar de que se sabe sobre la enorme heterogeneidad ambiental que presenta este matorral xerófilo, son prácticamente escasos los trabajos realizados en éste que documenten de manera precisa a lo largo del tiempo, las fluctuaciones que puede haber en las variables microclimáticas y edáficas a nivel de micrositio.

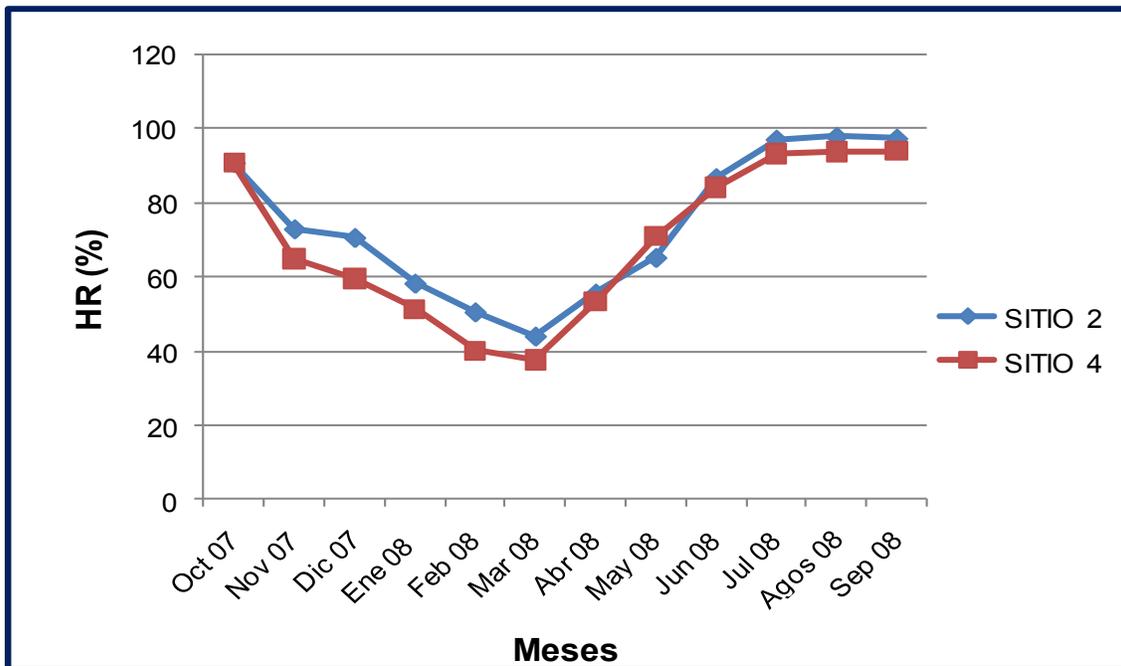


**Figura 32.** Valores promedio de temperatura anual máxima y mínima en los sitios de reintroducción de *D. aurantiacus* en la REPSA.

Por otro lado, aún cuando se sabe que los factores ambientales son determinantes en la diversidad, distribución y persistencia de las poblaciones de orquídeas en un ecosistema (Willems y Bik; 1991; Light *et al.*, 2003), a nivel mundial hasta donde se conoce son pocos los estudios que consideran datos de alguna variable climática como iluminación o temperatura en el momento de realizar la reintroducción de orquídeas (Gangaprasad *et al.*, 1999; Light *et al.*, 2003). Lo más común es que se dé un solo valor tomado en el momento del establecimiento *in situ* de las plantas, sin que esto refleje completamente si ese dato representa una condición común y constante del sitio que permita explicar posteriormente su supervivencia o adaptación.

En el caso de la humedad atmosférica ésta se cuantificó únicamente para dos sitios (2 y 4). Se observó en ambos prácticamente la misma tendencia en las fluctuaciones promedio, por lo que coincidió la humedad relativa máxima registrada al inicio de la época de lluvias. Ésta se comenzó a incrementar a partir del mes de abril y disminuyó en el mes de noviembre, mientras que la humedad relativa mínima promedio correspondió también con la época de secas (**Fig. 33**).

Aún cuando se para esta variable se contó con los datos sólo para dos sitios, se observó que el sitio perturbado (sitio 2) guardó una humedad relativa ligeramente mayor que el sitio más conservado (sitio 4) en el periodo de secas y quizá esto se pueda atribuir a que estuvo relativamente más expuesto y caliente, teniendo tasas de evapotranspiración mayores. Esto coincidió con los valores de humedad mínima en la época de secas, en donde el sitio perturbado también fue más húmedo ambientalmente porque estuvo más expuesto. La humedad relativa fue también un factor importante a considerar en el estudio de micrositio, porque se ha visto que las plantas reintroducidas en áreas con alta humedad relativa sobreviven mejor que aquéllas que están en zonas áridas (Wing y Thame, 2005). En el Pedregal, la humedad relativa mínima en época de secas correspondió al 38%, que corresponde fenológicamente al periodo de latencia de la mayoría de las orquídeas de este sitio.

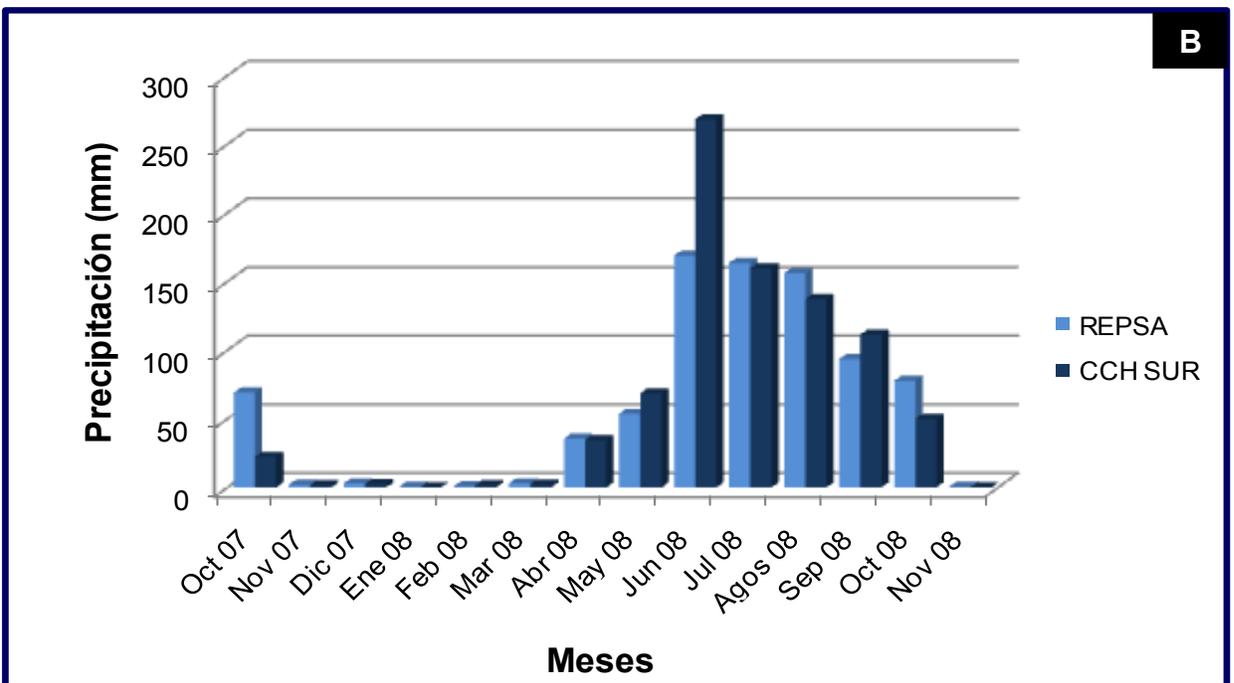
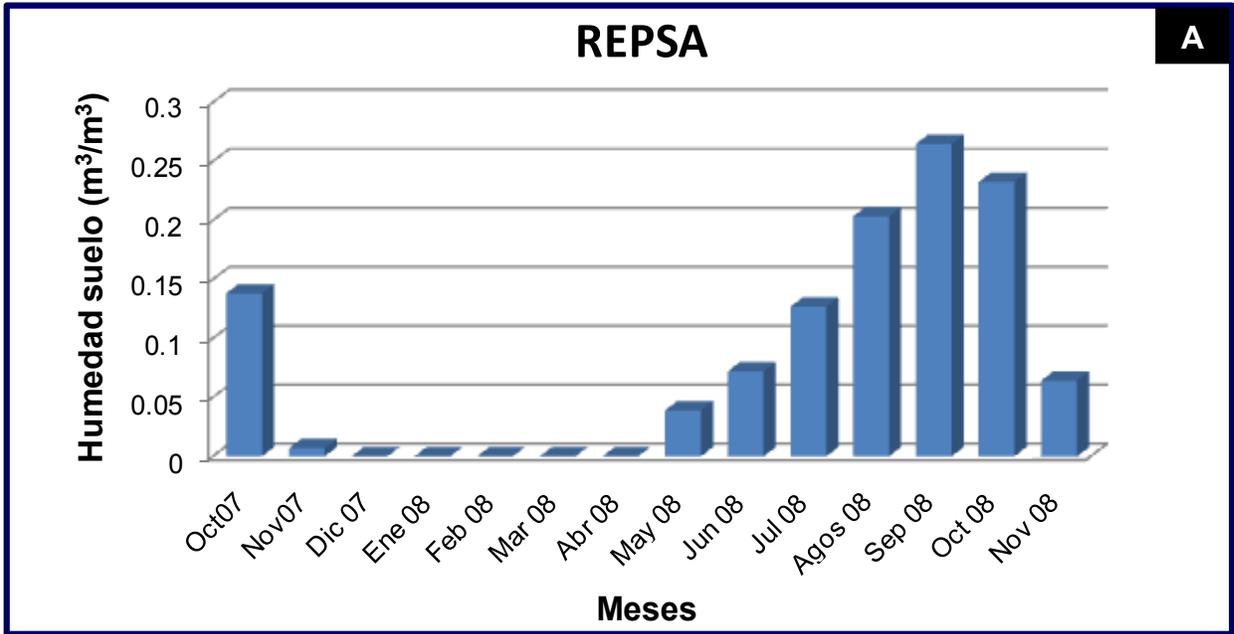


**Figura 33.** Fluctuación promedio anual de la humedad relativa (HR) en la REPSA, en un sitio perturbado y otro conservado.

De la misma manera, los valores promedio anuales de humedad de suelo obtenidos para uno de los sitios (4C), concordaron con la precipitación, los cuales fueron mayores en los meses de septiembre y octubre (**Fig. 34A y B**). Los resultados registrados para la humedad de suelo se refieren al contenido volumétrico de agua presente en el mismo por metro cúbico, donde los valores de 0 a 0.1 significaron que el suelo se encontraba muy seco y valores de 0.3 a 0.5 indicaron el intervalo de un suelo húmedo a saturado de agua. Con base en esta información se encontró que el suelo de los sitios de reintroducción nunca llegó a estar al máximo de su capacidad de campo, lo cual coincide con los resultados obtenidos del análisis edáfico ya antes mencionado, donde se indicó la elevada infiltración o poca retención de agua para este sitio, así como su baja capacidad de campo (**Cuadro 12**).

Finalmente, la precipitación promedio anual registrada para el mismo sitio (4C), fue similar a la que registró la estación meteorológica más cercana ubicada en el Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur de la UNAM (**Fig. 34B**). Dicha estación registró que en el mes de abril del año 2007 iniciaron las lluvias y finalizaron para el mes de octubre, siendo junio el mes más lluvioso. Algunos meses mostraron diferencias locales ligeras en el volumen de lluvia, lo que reveló que aún en distancias relativamente cortas para una escala geográfica, pueden existir variaciones hasta en 100 mm por mes como se observó para el mes de junio.

El valor de precipitación promedio anual obtenido localmente fue de 750 mm, 100 mm menor al registrado por la estación meteorológica del CCH-sur (y que se debió a la diferencia del mes anteriormente mencionado) durante la época de lluvias del año 2008, pero dentro de los intervalos que se han descrito de 700 a 950 mm en años precedentes (Rzedowski, 1954; Castillo-Argüero, 2004).



**Figura 34.** Fluctuación promedio mensual de A) humedad de suelo y B) de precipitación en la REPSA y en la Estación Meteorológica del CCH- sur.

La importancia de cuantificar las interacciones entre los factores climáticos y las condiciones del sustrato, son cruciales para la productividad vegetal, debido a que la producción y el consumo de materia orgánica son procesos estrechamente relacionados y que están controlados por la temperatura, la humedad disponibles y las condiciones del suelo (Raich y Tufekcioglu, 2000).

Lo anterior se reitera con los resultados obtenidos en esta investigación, donde se demostró que la diversidad vegetal aérea tiene consecuencias en los contenidos de C, N y nutrimentos en el suelo así como en la acidez del mismo, etc. A su vez, la transformación de la cubierta edáfica tiene implicaciones importantes en la cantidad de luz incidente en el sustrato y su consecuente evapotranspiración, contenido de agua y humedad relativa. En el sitio 3 donde se encontró una población considerable de plantas adultas de *Dichromanthus aurantiacus* y donde las condiciones de vegetación eran las más similares a las descripciones originales (con pocas especies de perturbación), se tuvo la menor supervivencia de todos. Esto a pesar de que fue el sitio más rico en nutrimentos, C y N y no fue, ni el más expuesto, ni el más caliente de todos. Sitios perturbados con mayor incidencia de luz y de temperaturas extremas tuvieron mayor supervivencia y uno de los factores atribuibles se debió a la presencia de pastos que cubrieron completamente a las plantas protegiéndolas posiblemente de la desecación (Fig. 22).

Por lo tanto, varios fueron los factores que intervinieron en la supervivencia de las plantas reintroducidas. Si bien éstos incluyeron el microclima del área (luz, temperatura, humedad relativa, etc.), las condiciones del suelo y la presencia inicial de los hongos micorrízicos, todos ellos tendrán que ponderarse posteriormente en años subsecuentes. Por consiguiente, es evidente que los factores de sitio pueden ser críticos en el establecimiento de las poblaciones reintroducidas, sobre todo en el primer año (Cuadro 6). Esto afecta las estrategias de conservación, así como el restablecimiento y rescate de las poblaciones de orquídeas en campo (Wolken *et al.*, 2001; Batty *et al.*, 2006). En lugares tan heterogéneos como la REPSA, las condiciones de micrositio son fundamentales y en ocasiones los lugares donde se

encuentra una relativa abundancia de plantas adultas que han emergido posiblemente de la germinación *in situ*, no corresponden siempre a los mejores sitios para reintroducir plántulas aclimatizadas artificialmente. Así, la información generada puede ser utilizada para hacer una evaluación rápida que permita identificar sitios donde la reintroducción pueda ser más exitosa.

Es claro que una mayor supervivencia en el primer año es clave para poder garantizar si ocurre una baja de ésta en años subsecuentes, lo cual permitirá mantener una población estable al menos en el tiempo en el que la especie pueda nuevamente florecer y generar descendencia. Lugares como el sitio 3, en donde muy pocas plantas propagadas por ambas estrategias sobrevivirán, permiten rápidamente ser descartados porque tienden a tener una supervivencia nula posteriormente. Esto también fue corroborado por Rangel (com. pers. 2009) quien observó que lugares abiertos y por consiguiente muy expuestos a la radiación solar (aún cuando estuvieran cubiertos con musgos), presentaron una supervivencia casi nula.

Nuevamente, la estrategia simbiótica de propagación, mostró ser la herramienta prioritaria que marcó la crítica supervivencia de las plantas, siendo de un 50 a un 70% más eficiente en el primer año de establecimiento y permitió que las plantas se adaptaran mejor a condiciones de perturbación en la REPSA.

## 5. CONSIDERACIONES FINALES.

La reintroducción de orquídeas es un campo muy poco explorado y que debe ser visto como una estrategia integral que permita su conservación *in situ*, cuando se ha realizado su preservación y propagación *ex situ*. Cabe destacar que este estudio, puede ser considerado como uno de los primeros trabajos donde se ha realizado una comparación de poblaciones de orquídeas de la misma especie propagadas y reintroducidas con y sin la presencia de sus hongos micorrízicos. Así mismo, se han considerado algunos factores más que en los estudios tradicionales no se toman en cuenta y aún así existen otros no menos importantes como la interacción con polinizadores, herbivoría, demografía y variabilidad genética no abordados en el presente y que también pueden encontrarse entre los factores clave que permitan rescatar a una especie de la extinción.

Se recomienda el seguimiento constante de las poblaciones de orquídeas reintroducidas, para tener una evaluación real de la supervivencia a largo plazo que permita asegurar el éxito de los procedimientos empleados, dado que en el ambiente natural existen diversos factores que estarán continuamente afectando la supervivencia de las plantas. Por tanto, aún cuando los datos generados en el presente son de un extremo valor biológico, son incipientes considerando que la reproducción y descendencia posiblemente puedan cambiar en los distintos sitios.

Este trabajo es una continuidad de los primeros resultados de reintroducción para esta especie (Rangel, 2006), en donde se ha dado seguimiento a la medición de diversos factores ambientales. Se probaron otras vías de propagación como la asimbiótica, hasta la reintroducción para con todo ello generar conocimiento sobre los mecanismos de supervivencia y adaptación de las orquídeas que servirán en futuras prácticas de restauración de este hábitat. Sin embargo, se deben continuar haciendo esfuerzos porque las futuras investigaciones estén también enfocadas en la creación de bancos de germoplasma de semillas y hongos micorrízicos, como un medio que permita asistir el proceso de reintroducción.

## 6. CONCLUSIONES.

- Se logró el establecimiento de plantas asimbióticas de *D. aurantiacus* a su hábitat natural y el registro de supervivencia de las mismas a lo largo de un año.
- Las semillas de *D. aurantiacus* cultivadas con los hongos micorrízicos germinaron y presentaron un desarrollo más vigoroso y en menor tiempo, en comparación con las propagadas por la vía asimbiótica.
- La supervivencia en campo al cabo de un ciclo anual durante la época de lluvias también fue mayor para las plantas micorrizadas en comparación con la que no estaban. Con esto se demostró que la práctica de propagación asistida con micorrizas, es una herramienta clave en la conservación de las orquídeas terrestres cuando se utilizan estrategias de reintroducción
- Las condiciones de sitio, edáficas y microclimáticas mostraron claramente que los sitios perturbados presentaron diferencias notables en la cantidad de nutrimentos, C, N, pH; debidas no sólo al cambio de la vegetación, sino también por las variaciones que produce el reemplazo de la vegetación natural por especies de perturbación. Estos sitios tienen una mayor radiación, menor humedad relativa y menor humedad de suelo, lo que también influyó en la supervivencia de las plantas reintroducidas.
- En la actualidad son escasos los trabajos realizados en la REPSA que se enfoquen al estudio de las variaciones climáticas y edáficas a nivel de microambiente. Por tanto, con el presente trabajo se logró comprender de manera más integral cuales son las limitaciones que están afectando la supervivencia de las plantas reintroducidas, cumpliéndose con ello los objetivos planteados.

## 7. REFERENCIAS.

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

Batty, L. A., Brundrett, M. C. Dixon, W. K. y Sivasithamparam K. 2006. *In situ* symbiotic seed germination and propagation of terrestrial orchid seedling for establishment at field sites. *Australian Journal of Botany* 54: 375-381.

Batty, A., L., Brundrett, M. C., Dixon K.,W. y Sivasithamparam, K. 2006b. New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil. *Australian Journal of Botany* 54: 367–374.

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

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

Castillo, A. S., Martínez, O. Y., Romero, R. M. A., Guadarrama, C. P., Núñez, C. O., Sánchez, G. I. y Meave, J. A. 2007. La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Aspectos florísticos y ecológicos. UNAM. México. 295 p.

Decruse, W., Gangaprasad, A., Seeni, S. y Sarojini, M., V. 2003. Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 199-202.

De la Cruz, R. R. M. 2006. Micropropagación y adaptación a condiciones ambientales de *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins (Orchidaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.

Ecker, L. 1989. Rare Plant Reintroductions. *Agave* 3(3): 6-8.

Flores, V. L. 2006. Contribución al estudio de la familia Orchidaceae en la Reserva del Pedregal de San Ángel y en algunas zonas perturbadas por la urbanización de la Ciudad Universitaria UNAM, México, D. F. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 110 p.

Gangaprasad, A., N., Decruse, W., S., Seeni, S. y Menon, S. 1999. Micropropagation and restoration of the endangered malabar daffodil orchid *Ipsea malabarica*. *Lindleyana* 14(1):38-46.

Grell, E., Haas-von Schmude, N. F., Lamb A. y Bacon, A. 1988. Re-introducing *Paphiopedilum rothschildianum* to Sabah, North Borneo. American Orchid Society Bulletin. 57(11), 1239-1249.

Herre, A. 2001. Determinación de pH y conductividad eléctrica en estratos acuosos de suelo. Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP). Laboratorio de Edafología Ambiental. Instituto de Geología, UNAM.

Lascuráin, M., List, R., Barraza, L., Díaz, E. P., Gual F. S., Maunder, M., Dorantes, J. y Luna V. E. 2009. Conservación de especies *ex situ*. Vol. II. Pp. 517-544. En: Capital Natural de México: Conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. CONABIO. México.

Markovina, A. L. y McGee, P. A. 2000. Comparison of symbiotic and asymbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandae; Orchidaceae). Lindleyana 15(2):69-72.

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

McKendrick, S. L. 1995. The effects of herbivory and vegetation on laboratory-raised *Dactylorhiza praetermissa* (Orchidaceae) planted into grassland in Southern England. Biological Conservation 73:215-220.

Mora, P. L. y Shimada, M. K. 2007. Determinación de Carbono y Nitrógeno total. Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP). Laboratorio de Edafología Ambiental. Instituto de Geología, UNAM.

Muir, H. M. 1987. Symbiotic propagation of *Orchis laxiflora*. The Orchid Review 95(1):27-29.

Newman, J. B., Ladd, P., Batty, A. y Dixon, K. 2007. Ecology of orchids in urban bushland reserves-Can orchids be used as indicators of vegetation condition?. En: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Orchid Conservation Congress. San José, Costa Rica. LANKESTERIANA 7(1-2):313-315.

Orozco, S. A., Gamboa de Buen, A. y Barradas, M. V. L. 2009. La diversidad funcional del ecosistema. Pp. 297-315. En: Biodiversidad del Ecosistema del Pedregal de San Ángel. Lot, A. y Zenón, C. S. (eds.). Universidad Nacional Autónoma de México.

Ortega, L. M. P., Zettler, L., González, D., Chávez V. M. y Martínez, A. 2000. Symbiotic micropropagation, reintroduction, and long-term monitoring of *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae), an endangered terrestrial orchid from Mexico. Enviado a Biological Conservation, mayo 2006.

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

Ortega, L. M. P. y Rangel, V. M. 2007. Fungus assisted reintroduction and long-term survival of two mexican terrestrial orchids in the natural habitat. En: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Orchid Conservation Congress. San José, Costa Rica. LANKESTERIANA 7(1-2): 317-321.

Ortega, L. P., Martínez, P. A. y Chávez, A. V. M. 2009. Conservación y propagación de orquídeas. En: Biodiversidad del Ecosistema del Pedregal de San Ángel. Lot, A. y Zenón, C. S. (eds.). pp. 483-495. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press. Cambridge, G. B. 444 p.

Rasmusen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. Plant and Soil 244: 149-163.

Raich, J. W. y Tufekcioglu, A. 2000. Vegetation and soil respiration: correlations and controls. Biogeochemistry 48: 71-90.

Ramsay, M. M. y Dixon, K. W. 2003. Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. 2003. Pp. 259-288. En: Orchid Conservation. Dixon, K.W., Kell, S. P., Barret, R. L, y Cribb, P. J. (eds.). Natural History Publications (Borneo): Kota Kinabalu, Sabah, Malasia.

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

Rangel, V. M. 2006. Germinación simbiótica y reintroducción de orquídeas terrestres en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, México, D.F. Tesis de Maestría. Instituto de Geología. UNAM. México. 115 p.

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

Rubluo, A., Chávez, V., Martínez, P. A. y Martínez, V. O. 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 Ángel (Distrito Federal, México). Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional 8: 59-129.

Sánchez, S. y Shimada, M. K. 2007. Determinación de cationes intercambiables por extracción con acetato de amonio. Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP). Laboratorio de Edafología Ambiental. Instituto de Geología, UNAM.

Scade, A., Brundrett, M. C., Batty, A. L., Dixon, K. W. y Sivasithamparam, K. 2006. Survival of transplanted terrestrial orchid seedlings in urban bushland habitats with high or low weed cover. *Australian Journal of Botany* 54: 383-389.

Seeni, S. y Latha, P., G. 2000. *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61:1-8

Seddon, J. P., Armstrong, P. D. y Maloney, R. F. 2007. Developing the Science of Reintroduction Biology. *Conservation Biology* 21(2): 303-312.

Shimada, M. K. 2000. Determinación de fósforo disponible (método de Bray-Kurtz), usando ácido ascórbico como reductor. Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP). Laboratorio de Edafología Ambiental. Instituto de Geología, UNAM.

Siebe, C., Jahn, R. y Stahr, K. 1996. Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en campo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Publicación especial 4. 57 p.

Smith, Z. F., James, E. A., McDonell, M. J. y McLean, C. B. 2009. Planting conditions improve translocation success of the endangered terrestrial orchid *Diuris fragrantissima* (Orchidaceae). *Australian Journal of Botany* 57: 200-209.

Swartz, N. D., Batty, L. A., Hopper, S. y Dixon, K. W. 2007. Does integrated conservation of terrestrial orchids work?. En: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Orchid Conservation Congress. San José, Costa Rica. LANKESTERIANA 7(1-2):219-222.

Stewart, L. S., Zettler, L. W. y Minso, J. 2003. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, and endangered orchid native to Florida. *Selbyana* 24(1): 64-70.

Stewart, L. S. 2008. Orchid reintroduction in the United States: A mini-review. *North American Native Orchid Journal* 14(1): 54-59.

Takahashi, K., Ishikawa, H., Ogino, T., Hatana, T. y Ogiwara, I. 2008. Time of seed germination, infection of orchid mycorrhizal fungi, and reintroduction of protocorms inoculated with orchid mycorrhizal fungi and covered with gel to a habitat in *Habernaria radiata* (Thunb.) K.Spreng. *Horticultural Research (Japan)* 7: 27-31.

Willems J, H. y Bik, L. 1991. Long-term dynamics in a population of *Orchis simia* in the Netherlands. En: Wells TCE, Willems, J. H. (Eds). Population ecology of terrestrial orchids. SPB Academic Publishing, The Hague, pp 33–45.

Wing, Y. T. y Thame, A. 2005. Conservation and reintroduction of the native orchids of Singapore. *Selbyana* 26 (1,2): 75-80.

Wolken, P. M., Hull, S. C. y Williams, S. E. 2001. Quantifying suitable habitat of the threatened western prairie fringed orchid. *J. Range Manage* 54: 611-616.

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

Zettler, L. W., Sunley, J. A. y Wilson, T. D. 2000. Symbiotic seed germination of an orchid in decline (*Platanthera integra*) from the green swamp, North Carolina. *Castanea* 65 (3): 207-212.

Zettler, L., W., Sharma, J. y Rasmussen, F., N. 2003. Mycorrhizal diversity. Pp. 205–226. En: *Orchid conservation*. Dixon, K.W., Kell, S. P., Barret, R. L, y Cribb, P. J. (eds.). Natural History Publications (Borneo: Kota Kinabalu, Sabah, Malasia).

Zettler, L. W., Poulter, S. B., McDonald, K. I. y Stewart, S. L. 2007. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortScience* 42:135-139.

## 8. ANEXOS.

### ANEXO 1.1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 1962.

N° stock	COMPONENTES	g/l	g/10 l
<b>1</b>	<b>MACRONUTRIENTES</b>		
	(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1.65	16.5
	KNO <sub>3</sub>	1.9	19
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.37	3.7
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	1.7
<b>2</b>	<b>CALCIO</b>		
	CaCl <sub>2</sub>	0.44	4.4
<b>3</b>	<b>MICRONUTRIENTES</b>		
	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0.01689	0.1689
	ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.0086	0.086
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062	0.062
	KI	0.00083	0.0083
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.00025	0.0025
	CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0.000025	0.00025
	CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0.000025	0.00025
<b>4</b>	<b>FIERRO</b>		
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.0278	0.278
	Na <sub>2</sub> EDTA	0.0373	0.373
<b>5</b>	<b>VITAMINAS</b>		
	Tiamina * HCl	0.0001	0.001
	Ácido Nicotínico	0.0005	0.005
	Piridoxina * HCl	0.0005	0.005
<b>6</b>	<b>INOSITOL</b>	0.10	1.0
<b>7</b>	<b>GLICINA</b>	0.002	0.02
<b>8</b>	<b>CARBOHIDRATOS</b>		
	Sacarosa	30.0	

**ANEXO 1.2. Medio de cultivo Knudson C (KC) 1946.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>FÓRMULA</b>	<b>g/L</b>
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.00
Fosfato monopotásico ácido	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.25
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.50
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0075
<b>CARBOHIDRATOS</b>		
Sacarosa		20.0

**ANEXO 1.3. Medio de cultivo Ernst (ER) 1982.**

<b>Sol. concentradas (Stocks)</b>	<b>Reactivo</b>	<b>g/L</b>	<b>g/10 L</b>
<b>I</b>	Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.15	<b>1.5</b>
	Nitrato de amonio $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	0.4	<b>4.0</b>
	Nitrato de potasio $\text{KNO}_3$	0.4	<b>4.0</b>
	Nitrato de Magnesio $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1	<b>1.0</b>
<b>II</b>	Fosfato de potasio $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.3	<b>3.0</b>
<b>III</b>	Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025	<b>0.25</b>
----- -----	Sacarosa $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	20	<b>200</b>
	<b>Agar bacteriológico</b>	<b>8.0</b>	<b>800</b>

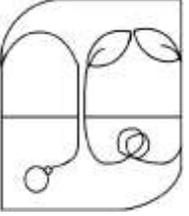
**ANEXO 1.4. Medio Básico de Avena (MBA) Mitchell, 1989.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>g/L</b>	<b>g/10L</b>
<b>Avena en polvo</b>	3.5	35
<b>Extracto de levadura</b>	0.1	1
<b>Agar bacteriológico</b>	6.0	60

**ANEXO 1.5. Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA).**

<b>REACTIVO</b>	<b>g/L</b>	<b>g/10L</b>
<b>Papa-Dextrosa-Agar</b>	39	390
<b>Agua destilada</b>	1 500 ,mL	

**ANEXO 2.1. Descripción del perfil correspondiente al sitio de reintroducción 1 (Sitio perturbado1) (1RP), de plántulas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus* en la REPSA.**

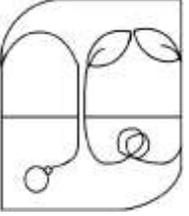
	<b>Microcosmos bioedáfico</b>		MCCI
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM		
	PRESOP		
	<b>Hoja de registro para la descripción de perfiles de suelo en campo (Siebe, 1996)</b>		Versión: 1

<b>Localidad:</b>	Reserva Ecológica "El Pedregal de San Ángel", Ciudad Universitaria. México, D. F.
<b>No. de perfil y autor:</b>	ISQ001, Iris Suárez Quijada.
<b>Coordenadas y mapa topográfico:</b>	14480109 E 2135806 N
<b>Altitud:</b>	2325 m
<b>Fecha:</b>	2 de Octubre del 2007
<b>Tipo climático:</b>	Templado subhúmedo con lluvias en verano (Cb (w1)w)
<b>T° media anual, máx., mín.</b>	Temp. media anual de 15.5°C, máxima de 34° C y mínima de -6° C.
<b>Precipitación media anual, no. meses sequía, duración y frecuencia de los periodos de humedad</b>	700-900 mm, 6 meses sequía (Nov.-Abril) y 6 meses de lluvia (Mayo-Octubre)
<b>Frecuencia, Duración, Duración anual acumulativa</b>	Frecuencia (f) =F3 (más de 50 ocasiones en 100 años), Duración D = D2 (4-48 horas), DAC3 = Presente 3 a 6 meses
<b>Estado del tiempo:</b>	ET3 = Precipitación en las últimas 24 h
<b>Uso del suelo y vegetación:</b>	Reserva ecológica (Senecietum-Matorral xerófito).
<b>Exposición:</b>	SE (Sureste)
<b>Pendiente:</b>	0 (casi plano)
<b>Forma del terreno:</b>	Topografía irregular (derrame lávico)
<b>Evidencias de erosión :</b>	Clase 1 (pérdida menor a 25%)
<b>Material parental:</b>	Roca basáltica
<b>Profundidad del manto freático:</b>	Nula





**ANEXO 2.2. Descripción del perfil correspondiente al sitio de reintroducción 2 (Sitio perturbado 2) de plántulas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus* en la REPSA.**

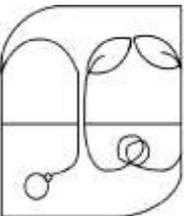
	<b>Microcosmos bioedáfico</b>		MCCI
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM		
	PRESOP		
	<b>Hoja de registro para la descripción de perfiles de suelo en campo (Siebe, 1996)</b>		Versión: 1

<b>Localidad:</b>	Reserva Ecológica "El Pedregal de San Ángel", Ciudad Universitaria. México, D. F.
<b>No. de perfil y autor:</b>	ISQ002, Iris Suárez Quijada
<b>Coordenadas y mapa topográfico:</b>	14480119 E 2136111 N
<b>Altitud:</b>	2315 m
<b>Fecha:</b>	1 de Octubre del 2007
<b>Tipo climático:</b>	Templado subhúmedo con lluvias en verano (Cb (w1)w)
<b>T° media anual, máx., mín.</b>	Temp. media anual de 15.5°C, máxima de 34° C y mínima de -6° C.
<b>Precipitación media anual, no. meses sequía, duración y frecuencia de los periodos de humedad</b>	700-900 mm, 6 meses sequía (Nov.-Abril) y 6 meses de lluvia (Mayo-Octubre)
<b>Frecuencia, Duración, Duración anual acumulativa</b>	Frecuencia (f) =F3 (más de 50 ocasiones en 100 años), Duración D = D2 (4-48 horas), DAC3 = Presente 3 a 6 meses
<b>Estado del tiempo:</b>	ET3 = Precipitación en las últimas 24 h.
<b>Uso del suelo y vegetación:</b>	Reserva ecológica (Senecietum-Matorral xerófito)
<b>Exposición:</b>	NO (Noroeste)
<b>Pendiente:</b>	0 (casi plano)
<b>Forma del terreno :</b>	Topografía irregular (derrame lávico)
<b>Evidencias de erosión:</b>	Clase 1 (pérdida menor a 25%)
<b>Material parental:</b>	Roca basáltica
<b>Profundidad del manto freático:</b>	Nula





**ANEXO 2.3. Descripción del perfil correspondiente al sitio 3 de reintroducción (No perturbado) (3RNP)  
de plántulas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus* en la REPSA.**

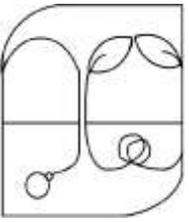
	<b>Microcosmos bioedáfico</b>		MCCI
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM		
	PRESOP		
	<b>Hoja de registro para la descripción de perfiles de suelo en campo (Siebe, 1996)</b>		Versión: 1

<b>Localidad:</b>	Reserva Ecológica "El Pedregal de San Ángel", Ciudad Universitaria. México, D. F.
<b>No. de perfil y autor:</b>	ISQ003, Iris Suárez Quijada
<b>Coordenadas y mapa topográfico:</b>	14479783 E 2135387 N
<b>Altitud:</b>	2329 m
<b>Fecha:</b>	1 de Octubre del 2007
<b>Tipo climático:</b>	Templado subhúmedo con lluvias en verano (Cb (w1)w)
<b>T° media anual, máx., mín.</b>	Temp. media anual de 15.5°C, máxima de 34° C y mínima de -6° C.
<b>Precipitación media anual, no. meses sequía, duración y frecuencia de los periodos de humedad</b>	700-900 mm, 6 meses sequía (Nov.-Abril) y 6 meses de lluvia (Mayo-Octubre)
<b>Frecuencia, Duración, Duración anual acumulativa</b>	Frecuencia (f) =F3 (más de 50 ocasiones en 100 años), Duración D = D2 (4-48 horas), DAC3 = Presente 3 a 6 meses
<b>Estado del tiempo:</b>	ET3 = Precipitación en las últimas 24 h
<b>Uso del suelo y vegetación:</b>	Reserva ecológica (Senecietum-Matorral xerófito)
<b>Exposición:</b>	NO (Noroeste)
<b>Pendiente:</b>	0 (casi plano)
<b>Forma del terreno:</b>	Topografía irregular (derrame lávico)
<b>Evidencias de erosión:</b>	Clase 1 (pérdida menor a 25%)
<b>Material parental:</b>	Roca basáltica
<b>Profundidad del manto freático:</b>	Nula





**ANEXO 2.4. Descripción del perfil correspondiente al sitio de reintroducción número 4 (No perturbado) (4RNP), de plántulas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus* en la REPSA.**

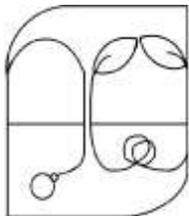
	<b>Microcosmos bioedáfico</b>		MCCI
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM		
	PRESOP		
	<b>Hoja de registro para la descripción de perfiles de suelo en campo (Siebe, 1996)</b>		Versión: 1

<b>Localidad:</b>	Reserva Ecológica "El Pedregal de San Ángel", Ciudad Universitaria. México, D. F.
<b>No. de perfil y autor:</b>	ISQ004, Iris Suárez Quijada
<b>Coordenadas y mapa topográfico:</b>	14479575 E 2135723 N
<b>Altitud:</b>	2329 m
<b>Fecha:</b>	1 de Octubre del 2007
<b>Tipo climático:</b>	Templado subhúmedo con lluvias en verano (Cb (w1)w)
<b>T° media anual, máx., mín.</b>	Temp. media anual de 15.5°C, máxima de 34° C y mínima de -6° C.
<b>Precipitación media anual, no. meses sequía, duración y frecuencia de los periodos de humedad</b>	700-900 mm, 6 meses sequía (Nov-Abril) y 6 meses de lluvia (Mayo-October)
<b>Frecuencia, Duración, Duración anual acumulativa</b>	Frecuencia (f) =F3 (más de 50 ocasiones en 100 años), Duración D = D2 (4-48 horas), DAC3 = Presente 3 a 6 meses
<b>Estado del tiempo:</b>	ET3 = Precipitación en las últimas 24 h.
<b>Uso del suelo y vegetación:</b>	Reserva ecológica (Senecietum-Matorral xerófito)
<b>Exposición:</b>	NO (Noroeste)
<b>Pendiente:</b>	0 (casi plano)
<b>Forma del terreno:</b>	Topografía irregular (derrame lávico)
<b>Evidencias de erosión:</b>	Clase 1 (pérdida menor a 25%)
<b>Material parental:</b>	Roca basáltica
<b>Profundidad del manto freático:</b>	Nula





**ANEXO 2.5. Descripción del perfil correspondiente al sitio de reintroducción 5 (No perturbado) (5RNP), de plántulas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus* en la REPSA.**

	<b>Microcosmos bioedáfico</b>		MCCI
	Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM		
	PRESOP		
	<b>Hoja de registro para la descripción de perfiles de suelo en campo (Siebe, 1996)</b>		Versión: 1

<b>Localidad:</b>	Reserva Ecológica "El Pedregal de San Ángel", Ciudad Universitaria. México, D. F.
<b>No. de perfil y autor:</b>	ISQ005, Iris Suárez Quijada
<b>Coordenadas y mapa topográfico:</b>	14479533 E 2136242 N
<b>Altitud:</b>	2331 m
<b>Fecha:</b>	2 de Octubre del 2007
<b>Tipo climático:</b>	Templado subhúmedo, con lluvias en verano (Cb (w1)w)
<b>T° media anual, máx., mín.</b>	Temp. media anual de 15.5°C, máxima de 34° C y mínima de -6° C.
<b>Precipitación media anual, no. meses sequía, duración y frecuencia de los periodos de humedad</b>	700-900 mm, 6 meses sequía (Nov.-Abril) y 6 meses de lluvia (Mayo-Octubre)
<b>Frecuencia, Duración, Duración anual acumulativa</b>	Frecuencia (f) =F3 (más de 50 ocasiones en 100 años), Duración D = D2 (4-48 horas), DAC3 = Presente 3 a 6 meses
<b>Estado del tiempo:</b>	ET3 = Precipitación en las últimas 24 h.
<b>Uso del suelo y vegetación:</b>	Reserva ecológica (Senecietum-Matorral xerófito)
<b>Exposición:</b>	NE (Noreste)
<b>Pendiente:</b>	0 (casi plano)
<b>Forma del terreno:</b>	Topografía irregular (derrame lávico)
<b>Evidencias de erosión:</b>	Clase 1 (pérdida menor a 25%)
<b>Material parental:</b>	Roca basáltica
<b>Profundidad del manto freático (página 12):</b>	Nula





**Anexo 3.1.** Análisis de varianza de medidas repetidas para evaluar las diferencias en el largo de las hojas presentes entre las plantas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus*, entre los sitios de reintroducción

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Sitio	7058	4	1764	0.89	0.473
Micorriza	1.10E+04	1	1.10E+04	5.54	.021*
Sitio*Micorriza	1.31E+04	4	3280	1.66	0.168
TIEMPO	3.82E+04	10	3819	26.45	0.000*
TIEMPO*Sitio	8598	40	215	1.49	.028*
TIEMPO*Micorriza	2193	10	219	1.52	0.128
TIEMPO*Sitio*Micorriza	4275	40	107	0.74	0.882

**3.2.** Análisis de Tukey-Kramer para evaluar las diferencias entre los sitios de reintroducción respecto al largo de hojas presentes entre las plantas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus*.

Tukey HSD test; variable DV_1 (MED REP SIMB vs ASIMB LARGO) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1979.7, df = 80.000												
Cell No.	Sitio	Micorriza	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
			30.945	12.770	13.541	18.973	21.092	18.142	36.475	12.036	31.437	22.669
1	1	con		0.53388	0.03857	0.99731	0.86991	0.89672	0.98542	0.21351	1.00000	0.93795
2	1	sin	0.53388		1.00000	0.99999	0.99614	0.99997	0.15141	1.00000	0.43426	0.98442
3	2	con	0.03857	1.00000		0.99999	0.96531	0.99993	0.00048	1.00000	0.00716	0.86552
4	2	sin	0.99731	0.99999	0.99999		1.00000	1.00000	0.95838	0.99998	0.99588	1.00000
5	3	con	0.86991	0.99614	0.96531	1.00000		0.99999	0.26889	0.97723	0.75999	1.00000
6	3	sin	0.89672	0.99997	0.99993	1.00000	0.99999		0.48419	0.99979	0.84399	0.99996
7	4	con	0.98542	0.15141	0.00048	0.95838	0.26889	0.48419		0.02127	0.98129	0.35372
8	4	sin	0.21351	1.00000	1.00000	0.99998	0.97723	0.99979	0.02127		0.12507	0.92678
9	5	con	1.00000	0.43426	0.00716	0.99588	0.75999	0.84399	0.98129	0.12507		0.86187
10	5	sin	0.93795	0.98442	0.86552	1.00000	1.00000	0.99996	0.35372	0.92678	0.86187	

**3.3.** Análisis de varianza de medidas repetidas para evaluar las diferencias en el ancho de las hojas presentes entre las plantas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus*, entre los sitios de reintroducción

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Sitio	537	4	134.2	1.45	0.224
Micorriza	262	1	261.9	2.84	0.096
Sitio*Micorriza	867	4	216.9	2.35	0.061
TIEMPO	2302	10	230.2	23.74	0.000*
TIEMPO*Sitio	580	40	14.5	1.5	.026*
TIEMPO*Micorriza	124	10	12.4	1.28	0.237
TIEMPO*Sitio*Micorriza	296	40	7.4	0.76	0.855

**3.4.** Análisis de Tukey-Kramer para evaluar las diferencias entre los sitios de reintroducción respecto al ancho de las hojas presentes entre las plantas simbióticas y asimbióticas de *D. aurantiacus* evaluadas en 10 tiempos.

Tukey HSD test; variable DV_1 (MED REP SIMB vs ASIMB ANCHO)												
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests												
Error: Between MS = 92.277, df = 80.000												
Cell No.	Sitio	Micorriza	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
			7.7636	3.5667	3.9091	7.0000	7.6013	5.3242	7.7710	3.5418	7.5614	7.6193
1	1	con		0.43595	0.03016	1.00000	1.00000	0.94976	1.00000	0.17659	1.00000	1.00000
2	1	sin	0.43595		1.00000	0.98976	0.58884	0.99913	0.39610	1.00000	0.44722	0.55582
3	2	con	0.03016	1.00000		0.98927	0.15955	0.99882	0.01329	1.00000	0.01407	0.11555
4	2	sin	1.00000	0.98976	0.98927		1.00000	0.99996	1.00000	0.98442	1.00000	1.00000
5	3	con	1.00000	0.58884	0.15955	1.00000		0.97896	1.00000	0.34363	1.00000	1.00000
6	3	sin	0.94976	0.99913	0.99882	0.99996	0.97896		0.94029	0.99764	0.96198	0.97482
7	4	con	1.00000	0.39610	0.01329	1.00000	1.00000	0.94029		0.13788	1.00000	1.00000
8	4	sin	0.17659	1.00000	1.00000	0.98442	0.34363	0.99764	0.13788		0.16287	0.30085
9	5	con	1.00000	0.44722	0.01407	1.00000	1.00000	0.96198	1.00000	0.16287		1.00000
10	5	sin	1.00000	0.55582	0.11555	1.00000	1.00000	0.97482	1.00000	0.30085	1.00000	