

Conservación y propagación de orquídeas

María del Pilar Ortega-Larrocea¹, Alejandro Martínez Palacios² y Víctor M. Chávez Avila³

¹Departamento de Edafología, Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH).

³Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

mpol@geologia.unam.mx

Introducción

Como se ha documentado extensamente, el Pedregal ha sido escenario para el desarrollo y establecimiento de una flora y fauna característica y única, fuente de innumerables recolectas para educación e investigación. Las orquídeas, como uno de los grupos de plantas de más reciente evolución, mayor distribución y abundancia en el mundo, están bien representadas en México (Soto-Arenas *et al.*, 2007) y en este ecosistema, considerado como un refugio de la orquídeoflora del Valle de México (Soto, 1983; Téllez, 2002). Las orquídeas de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) han sido fuente de inspiración para la elaboración de varios trabajos de investigación y de tesis a nivel licenciatura y posgrado, los cuales han documentado diferentes aspectos sobre su biología. Entre estas contribuciones, destacan los listados taxonómicos en los que, si bien el número de especies incluido en éstos no ha sido consensuado (Téllez *et al.*, 2007), de alguna manera dan un aproximado de la gran representación de las orquídeas terrestres en este hábitat (Rzedowski, 1954; Diego, 1970; Castillo-Argüero *et al.*, 2004; Salazar en este libro, por citar algunos). Algunas de estas especies es casi seguro que han desaparecido (Hágsater *et al.*, 2005); otras desde su descubrimiento fueron catalogadas como amenazadas e incluso endémicas por su distribución limitada a este fragmentado hábitat. Tal es el caso de *Bletia urbana* Dressler (Dressler, 1968; Navarro, 1977; Rzedowski, 1979; Vovides, 1981; IUCN, 1985; Alvarez-Sánchez *et al.*, 1986; Soto-Arenas, 1996; SEMARNAT, 2002) que posteriormente se ha indicado que tiene una

distribución más amplia (Sosa, 1992; Reyes, 1993; Flores-Villanueva, 2006) (Fig. 1A). Sobre otras especies, quizá más vulnerables o ya desaparecidas en la REPSA, poco o nada se ha legislado y es pertinente destacar la falta de estudios sistemáticos sobre demografía y ecología de este grupo (Sarmiento, 1995).



Fig. 1. A) *Bletia urbana* (Dressler). B) Cultivo in vitro de *B. urbana* por 8 años.

Las razones principales se deben a que por la dificultad de su topografía se reduce la posibilidad de recorrer y observar dos veces un mismo camino cuando se realiza trabajo de campo, aún cuando su tamaño es pequeño comparado con otros parques naturales protegidos. Algunos recovecos han quedado todavía inexplorados, dando lugar al descubrimiento de nuevos registros en fechas recientes (Flores-Villanueva, 2006), como el caso de *Malaxis xerophila* G.A. Salazar & L.I. Cabrera, (Notimex, 2004), que fue encontrada por Mónica Rangel y Pilar Ortega en agosto del 2003. Por otro lado, está el hecho de que las orquídeas son un grupo taxonómi-

camente complejo y con cambios constantes (Salazar *et al.*, 2003, Schuiteman y de Vogel, 2003), por lo que la identificación de las plantas por personas no especializadas puede llevar a una determinación incorrecta, nomenclatura en desuso o sinonimias, generando listados actuales poco precisos para esta familia (Rojo y Rodríguez, 2003; Castillo-Argüero *et al.*, 2007). La identificación de las especies en campo se dificulta por la frecuencia de aparición de las estructuras epigeas, que en algunas especies no siempre es anual, por lo que es probable que muchas no sean observadas con regularidad y dependan en extremo de las condiciones climáticas del año de estudio (Téllez, 2002; Hágsater *et al.*, 2005; Flores-Villanueva, 2006). Todo esto conlleva a dificultades en la adquisición y registro certero de germoplasma para su conservación.

Estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*

En el campo de la conservación de un hábitat o de un grupo de organismos, como primera instancia, es necesario tener un registro de la diversidad amenazada que se pretende conservar. En segundo lugar, la preservación del hábitat natural, a través de las reservas ecológicas, es la vía más adecuada para conservar a una o varias especies en peligro de extinción, ya que a través de esta medida se permite una interacción estrecha entre las plantas y su entorno para que continúen evolucionando en el ecosistema (Barrett y Kohn, 1991; Tremblay y Hutchings, 2003). La conservación de cualquier especie permitirá también la preservación de las interrelaciones con otros organismos. Las orquídeas, han sido de los grupos más estudiados y documentados en relación a la versatilidad y complejidad de interacciones que establecen con una multitud de otros seres vivos, como polinizadores altamente especializados y hongos micorrízicos. Sin embargo, esto no significa, desde luego, que conservar un grupo de especies como las orquídeas sea suficiente para poder mantener un hábitat (Newman *et al.*, 2007; Farrington *et al.*, 2007). En contraparte, la gran diversidad de asociaciones que establecen estas plantas las hace difíciles de estudiar por los muchos factores que pueden estar regulando su distribución y demografía en un ecosistema (Whigham y Willems, 2003; Fay *et al.*, 2007; Gowland *et al.*, 2007). Para establecer protocolos exitosos de conservación se requiere de estudios más amplios en donde se incluyan aspectos taxonómicos,

poblacionales, de interacciones, ambientales, etc. (Light *et al.*, 2003). Al respecto, se ha generado muy poca información en México y menos aún en la REPSA, siendo un hecho el que la velocidad de desaparición de orquídeas o deterioro de los hábitats supera en gran medida, al tiempo en el que se logrará generar información suficiente sobre su biología.

Queda claro que la vía más adecuada para la preservación de la flora es la conservación *in situ* en su ambiente natural (Elias, 1986; Barrett y Kohn, 1991). Sin embargo, en los casos en los que ya no es posible realizar el rescate del área natural, cuando la velocidad de deterioro del hábitat por diversos factores antropogénicos es alta o cuando las poblaciones de una especie amenazada se han reducido drásticamente y se encuentran al borde de la extinción, los métodos de conservación *ex situ* pueden ser una alternativa viable o el último recurso para evitar la extinción definitiva (Seaton y Pritchard, 2003; Zelenko, 2007). Estos pueden ser muy diversos en cuanto a la forma y a la efectividad, siendo necesario utilizar todos los sistemas que permitan conservar la mayor diversidad genética posible (Frankel y Soulé, 1981). La conservación del matorral xerófilo preservado en la REPSA ha pasado por una fragilidad de supervivencia en varios periodos y se agudiza su existencia a cada paso, ya que ha estado sujeta a innumerables procesos degradativos. Año con año se va deteriorando este hábitat, a tal grado que la vegetación nativa únicamente estará documentada en herbarios y libros si no se valora la importancia de la Reserva en su conjunto. De este modo, es urgente establecer protocolos de conservación inmediata, paralelos al mantenimiento del hábitat, a través de varias vías de preservación de germoplasma (Ramsay y Dixon, 2003). Los bancos de germoplasma constan de muy diversas modalidades y en general se simplifican en:

- (a) la preservación de semillas a baja humedad y temperatura;
- (b) la conservación de plantas en vivero e invernadero y
- (c) la preservación de células, tejidos, órganos y/o plantas bajo cultivos *in vitro* y en nitrógeno líquido.

La preservación de especies con semillas ortodoxas como lo son la mayoría de las orquídeas, es viable y puede garantizar su almacenamiento por periodos mayores de 20 años (Arditti, 1993; Seaton y Pritchard, 2003, Pritchard, 2004). Aunque las semillas de estas plantas son consideradas entre las más simples por

estar constituidas por un embrión sin endospermos y cubierto por una o dos capas de células, pueden sobrevivir si se les sujeta inclusive a temperaturas ultrabajas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Pritchard *et al.*, 1999). Se cuenta con una escasa documentación acerca de los periodos de viabilidad de la mayor parte de las orquídeas terrestres de la REPSA; sin embargo para algunas especies de gran valor biológico por su alto grado de amenaza como *Bletia urbana*, los registros de su viabilidad en periodos prolongados de conservación son prometedores. Después de dos décadas de almacenamiento a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ y bajo condiciones de humedad relativa cercanas al 10 %, las semillas logran germinar entre 60 y 100 % a los 5-6 días en un medio de cultivo específico (Castillo, 2002; Martínez-Palacios *et al.*, 2007). Otros estudios han permitido constatar la viabilidad de semillas recién recolectadas o después de un corto periodo de almacenamiento (menor a 5 años) en especies de la REPSA como *Bletia campanulata* Llave & Lex, *Bletia sp.*, *Dichromanthus aurantiacus* (Lex.) Salazar & Soto Arenas, *Dichromanthus cinnabarinus* La llave & Lexarza, *Habenaria novemfida* Lindl. (H. diffusa Rich. & Gal.), *Malaxis myurus* Kuntze (*Microstylis myurus* Reichb. F.) (Rangel, 2004; Rangel y Ortega-Larrocea, 2007) y recientemente *Govenia superba* Lind. (Ortega-Larrocea, com. pers.).

Sin embargo para muchas especies de orquídeas, el almacenamiento por periodos mayores a dos años o más prolongados, no es una alternativa de resguardo al existir semillas que pierden su viabilidad días después de la dehiscencia (Seaton y Pritchard, 2003). Ante esta situación, existen otras alternativas como la conservación de plantas a través de colecciones vivas bajo condiciones semi-controladas en invernaderos, viveros y orquidarios; alternativa que también puede considerarse para las especies no recalcitrantes. Tales sistemas artificiales de conservación de colecciones vivas siempre deben darse al resguardo de Instituciones comprometidas y especializadas como Jardines Botánicos y centros de investigación y ser manejadas bajo programas especiales, aplicando medidas eficientes de horticultura para mantener colecciones (Elias, 1986; Nash *et al.*, 2003, Garduño *et al.*, 2007). Los jardines botánicos durante muchos años han sido los mayores centros para el mantenimiento y estudio científico de la riqueza florística (IUCN, 1987). Estos han constituido islas artificiales que resguardan una parte de la diversidad florística para la conservación de la variabilidad genética y se han convertido en las vitri-

nas del mundo con más de 1400 en distintas regiones (Villa-Lobos, 1988). Los Jardines Botánicos establecidos *in situ*, como el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, son la alternativa idónea para las especies de la REPSA, debido a que por su ubicación permiten la interacción de las plantas nativas con los organismos de su entorno natural (micorrizas, polinizadores, etc.) y bajo las mismas condiciones climáticas. En el Jardín Botánico del IB-UNAM se tiene un resguardo importante de varias especies de orquídeas de la REPSA (Téllez-Velasco, 2007).

Además, a partir de las plantas generadas por la germinación de semillas *ex situ*, se pueden establecer sistemas de propagación asexual que pueden generar posteriormente bancos de propágulos (Fig. 1B). Con dichos bancos se pueden establecer otras colecciones de plantas en Instituciones de Investigación externas o pueden ser utilizadas en diversos experimentos bajo condiciones controladas. Por ejemplo, una colección de plantas de *Bletia urbana* derivadas de la germinación *in vitro* y mantenida por 5 años en terrarios de cristal, han sido utilizadas para evaluar su respuesta al adicionar sustratos a rocas basálticas tratando de igualar las condiciones de escases de suelo (Guillén *et al.*, 2007; Fig. 1C-D). Estas plantas han reproducido los ciclos que se llevan a cabo en la naturaleza, donde a principios de la primavera de los cormos nuevos surgen brotes que crecen a partir de la colonia (Fig. 1E).



Fig. 1. C-D) Conservación *ex situ* de plantas germinadas en el laboratorio y mantenidas por cinco años en condiciones de invernadero.

E) Múltiples brotes en segmento basal de protocormo.

El resguardo genético de orquídeas amenazadas mediante bancos de semillas o colecciones vivas a veces no es posible de lograr cuando no se cuenta con suficiente material de campo (cápsulas) o en las colecciones. Por tanto, se hace necesario recurrir a otras técnicas de reproducción vegetativa como el cultivo de tejidos, que es una herramienta biotecnológica de propagación común en especies hortícolas (Ford-Lloyd y Jackson, 1986) y que puede aplicarse a especies silvestres (Ramsay y Dixon, 2003). El cultivo *in vitro* tiene un gran potencial regenerativo y por tanto de propagación y es altamente prometedor para el rescate de especies (Rubluo, 1994; Ortega-Larrocea *et al.*, 1997). Sus limitaciones radican en que el establecimiento de las plantas bajo condiciones ideales requiere de instalaciones especializadas y su mantenimiento *in vitro* necesita de tres o más subcultivos por año, con el consecuente requerimiento de espacio en cámaras de incubación con condiciones de iluminación y temperatura controladas. Estas limitaciones se pueden contrarrestar con el uso de reguladores (v.g. ácido abscísico o compuestos con efecto osmótico) o condiciones de estrés (v.g. descenso de temperatura), que solos o combinados minimizan o retrasan el crecimiento vegetal y permiten prolongar los subcultivos por más de 10 periodos.

La preservación en nitrógeno líquido o *criopreservación* podría llegar a ser uno de los sistemas más eficientes para conservar germoplasma. La temperatura que se alcanza (-196° C) detiene toda acción metabólica permitiendo la preservación fisiológica para almacenar sólo células de potencial embriogénico o tejidos como meristemas, de los cuales se pueden regenerar genotipos idénticos al donador (Kartha, 1981, 1982). Sin embargo esta técnica dista aún de ser aplicada para la conservación por un periodo prolongado de tiempo ya que la viabilidad de las células y tejidos disminuyen considerablemente (Yamada *et al.*, 1991).

Cultivo *in vitro*: germinación simbiótica, asimbiótica y cultivo de tejidos.

Las orquídeas desatan en muy diversos aspectos siendo la germinación uno de ellos. Los embriones, albergados en semillas diminutas carecen de endospermo que les permita garantizar una germinación autónoma sostenida por este recurso (Fig. 1F, H). El desarrollo de las orquídeas durante la germinación no ocurre como en el resto de las demás angiospermas (radícula-tallo-hoja) y pasan por una serie de estadios llamados protocormos (Fig. 2A-C). Inician con formas esféricas a periformes a partir de las cuales se desarrollan primero los ápices foliares y posteriormente las raíces, hasta alcanzar el estadio de plántula (Zettler y McInnis, 1993). Los frutos de las orquídeas llamados cápsulas fueron considerados infértiles hasta finales del siglo antepasado (Fig. 1G, I). Se pensaba que los millones de semillas que producían eran vanas, dado su tamaño diminuto y a la dificultad de observar plántulas en campo. A principios del siglo XX, el francés Claude Bernard (1904) descubrió que alrededor de las plantas adultas crecían brotes diminutos (los protocormos), cuyos tejidos al observarse al microscopio estaban completamente infestados de hongos al igual que



Fig. 2. A) Semillas en germinación asimbiótica de *Dichromantus aurantiacus*. B) Semillas en germinación y protocormos asimbióticos de *Bletia urbana* distintas fases. C) Protocormo simbiótico con primordio de hoja y rizoides.



Fig. 1. F-G) Semillas y cápsula de *B. urbana*. H-I) Semillas y cápsula de *Dichromantus aurantiacus*.

sus raíces (Fig. 2D). Esta observación permitió comprender que estos organismos requieren de la mediación de una simbiosis para poder desarrollarse. Bajo este principio, la germinación simbiótica se empezó a utilizar por los cultivadores de orquídeas, ya sea mediante el uso de sustratos donde crecían las plantas adultas (p. ej. musgo) o caldos nutritivos con extractos de raíces. Meses después de su manipulación, en dichos sustratos era posible observar el surgimiento de las plantas, las cuales están listas para su trasplante y cultivo individual. La germinación simbiótica de orquídeas de la REPSA ha demostrado ser altamente efectiva en la propagación de especies como *Bletia urbana*, *B. campanulata*, *Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *Habenaria novemfida* (Rangel, 2004; Fig. 2E). La adición del endófito adecuado a las semillas durante su germinación reduce significativamente el tiempo en que se desarrollan las plántulas en un medio que consiste únicamente de agar y unos gramos de avena comercial (Fig. 2F-G)(Ortega-Larrocea y González, 2008). La simbiosis genera plantas más vigorosas que sobreviven mejor la aclimatación *ex vitro* (Castillo, 2002; Ortega-Larrocea *et al.*, 2005). La germinación simbiótica, sin embargo, requiere de conocimiento especializado sobre el manejo de los endófitos adecuados para que sea altamente efectiva (Rasmussen, 1995; Ortega-Larrocea, 2008). En términos prácticos, los resultados han sido prometedores en aquellas especies difíciles de germinar sin su hongo micorrízico. Sin embargo en lo relativo a la producción de orquídeas a escala comercial, una de las limitantes más fuertes de esta técnica es el hecho de que la producción de un solo inoculante para la propagación de diversas especies, no es igualmente efectivo para todas éstas.

La producción masiva de orquídeas se logró de manera no simbiótica en el primer cuarto del siglo pasado con los trabajos desarrollados por el fisiólogo americano Lewis Knudson (1922), quien demostró que el contenido de los caldos de Bernard podía ser sustituido por un aporte externo de carbohidratos para llevar a cabo la germinación. La inducción de la germinación asimbiótica o no mediada por hongos, tuvo mayores alcances y repercusiones en la propagación de estas plantas y disparó desde su inicio, el desarrollo de la industria de la orquídea y de la producción de un sin fin de híbridos en muy diversos medios (Knudson, 1946; Arditti, 1992). Raven (1976) y Wochok (1981) destacan como las primeras referencias en donde se documenta el uso

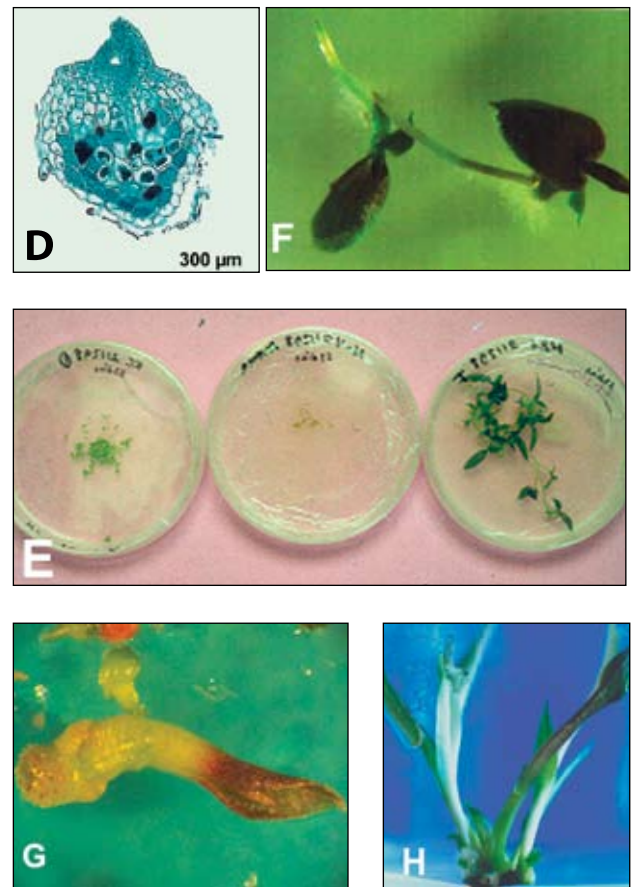


Fig. 2. D) Histología del desarrollo simbiótico, protocormo invadido por el hongo en su parte basal. E) Comparación del desarrollo asimbiótico en un medio con carbohidrato, sin carbohidratos y sin carbohidratos pero con el hongo micorrízico a partir de germoplasma almacenado por 14 años. F) Plántulas simbióticas a los 28 días. G) Protocormo asimbiótico con inicio de lámina foliar a los 60 días. H) Múltiples brotes en segmento basal de protocormo.

de la micropropagación como una herramienta para recuperar especies en vías de extinción. A partir de entonces, se desprende el cultivo de orquídeas mediado por técnicas más rigurosas y distintas a la multiplicación vegetativa en viveros, las cuales han permitido propagar especies recalcitrantes mediante explantes meristemáticos de flores, tallos, etc. de plantas adultas a través de diversas vías de regeneración morfogénica.

El cultivo de tejidos vegetales es una potente herramienta en la micropropagación de especies o genotipos y se puede llevar a gran escala para abastecer la demanda comercial (Wochok, 1981). Un ejemplo de esto es la clonación de plantas donde no se requiere específica-

mente la preservación de una gran diversidad genética y se pueden apuntar protocolos de masificación de genotipos selectos con alto valor ornamental. La inducción de PLBs (*protocorm like bodies*) puede cuatuplicar la regeneración vegetativa en un tiempo de cultivo corto, obteniendo más de 1 millón de plantas en un lapso menor a un año (Arditti, 1977).

En México, uno de los primeros trabajos en aplicar las técnicas de germinación *in vitro* y cultivo de tejidos en la conservación de orquídeas en peligro de extinción y de una especie de la REPSA, se gestó desde inicios de 1980 con *Bletia urbana* (Chávez, 1980). Chávez realizó un estudio detallado en el que documentó sistemáticamente por vez primera a las semillas, su abundancia, forma, tamaño, germinación y generación de protocormos en un medio de cultivo. Posteriormente, Martínez-Palacios (1985 y 1991) estableció un medio de cultivo óptimo para lograr la germinación de forma sincronizada, bajo condiciones de luz y fotoperiodo específicos. La brotación múltiple de esta especie se consiguió de manera directa, sin pasar por la formación de callo que generalmente les anteceden, lo cual garantiza su estabilidad genética (George, 1993). El cultivo de secciones de protocormos de esta especie a partir de explantes apical y basal en contacto con un medio modificado con hormonas indujo la formación de brotes (Rubluo *et al.*, 1993; Fig. 2H).

Aunque a los reguladores del crecimiento no se les cataloga como inductores de mutaciones, los cultivos cuya inducción morfogénica es constante por su uso en altas concentraciones, pueden derivar en malformaciones genéticas debido al elevado proceso de mitosis continua al que se sujeta a un tejido (George, 1993). Por lo cual, el uso de la clonación a baja escala y el no aplicar subcultivos a medios inductores para generar multiplicación masiva de plantas, puede permitir mantener una mayor estabilidad de los genotipos (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

Aclimatización, floración y reintroducción de plantas micropropagadas

La regeneración de orquídeas por cualquiera de las vías anteriormente descritas es un logro importante en la conservación de germoplasma, llámese semillas o material vegetativo (v.g. brotes y/o meristemas). Sin embargo, las plantas no pueden permanecer *in vitro* indefinidamente, por lo que cualesquiera que sean los fines

de su manejo, el paso a condiciones *ex vitro*, llamado aclimatización o endurecimiento, puede ser la parte crítica en la recuperación de plantas (Ramsay y Dixon, 2003). Las plantas bajo cultivo *in vitro* desarrollan una nutrición heterótrofa, predominando la adquisición de carbohidratos de manera directa en el medio de cultivo y limitando al mínimo el proceso fotosintético, el cual además no es inducido debido a la baja intensidad luminosa que predomina en las condiciones de incubación. Las plantas dentro de los frascos se mantienen en condiciones de alta humedad relativa (>90 %) y asepsia absoluta, lo que produce estomas poco funcionales (Ziv *et al.*, 1987) y láminas foliares sin un recubrimiento ceroso que permita regular la elevada evapotranspiración cuando son sujetas al ambiente natural (Sutter, 1988). Al ser transplantadas en sustratos en condiciones de invernadero o campo, su nutrición pasa a ser estrictamente autótrofa y están expuestas a mayor intensidad lumínica, a cambios en la humedad y al ataque de patógenos (George, 1993). Cuando en estas condiciones se alcanzan tasas de supervivencia mayores a las de los cultivos, puede considerarse que se ha logrado establecer las condiciones fisiológicas de aclimatización y desarrollo, por lo que los individuos producidos en invernadero están listos para su reintroducción en campo; como fue determinado para *Bletia urbana* y otras orquídeas mexicanas (Martínez-Palacios, 1991; Rubluo *et al.* 1989; 1993; Castillo, 2002).

La inducción *in vitro* de flores es otra de las líneas de investigación poco exploradas y de muy alto potencial comercial en orquídeas. Esta línea ha resultado ser muy atractiva y en el caso de *Bletia urbana* se pudo establecer su protocolo recientemente (Guillén, 2003). En esta especie se logró la floración a partir de tejidos inmaduros, protocormos de 3-4 semanas de edad, sujetos a diferentes concentraciones de hormonas y fotoperiodos. La interacción de ambos factores permitió la floración en más de un 60 % de los protocormos (Guillén *et al.*, 2007; Fig. 2 I). Los resultados son de suma importancia por el aporte en la fisiología de este proceso ya que existen pocos trabajos sobre los disparadores de la floración *in vitro* (Sim *et al.*, 2007).

Como se estableció previamente, la reintroducción de germoplasma propagado por cualquiera de las técnicas descritas anteriormente, es otra de las vías de conservación que utilizan alternativas *ex situ*. En regiones donde existen asentamientos humanos es necesario

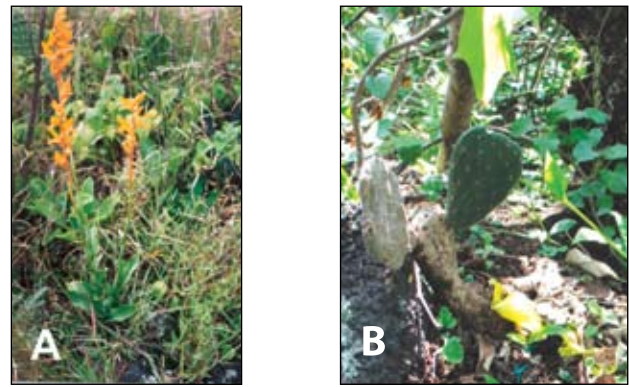
implementar programas de uso sustentable que permitan la coexistencia entre un hábitat protegido y la urbanización para disminuir o erradicar las presiones que ponen en riesgo a las poblaciones silvestres (Caldecott *et al.*, 1996). El rescate y reintroducción propuesto por Frankel y Soulé (1981) es una herramienta poderosa en los esquemas de restauración de hábitats deteriorados y ha mostrado ser altamente prometedora para recuperar especies nativas (Smith *et al.*, 2007). En el caso de las orquídeas de la REPSA, el establecimiento de los protocolos de propagación adecuados permitió llevar a cabo los primeros experimentos de reintroducción a su hábitat de *Bletia urbana*, como la primer orquídea propagada y reintroducida asimbióticamente vía cultivo de tejidos (Rubluo *et al.* 1989, 1993; Fig. 2J). Posteriormente, se ha continuado con el establecimiento de otros protocolos de reintroducción con plantas simbióticas (Castillo, 2001), que han sido extensivos a otras especies (Rangel, 2006) y han permitido generar modelos de conservación que puedan ser aplicados en un futuro inmediato (Suárez, en proceso).



Registros en campo detallados y fenología de algunas orquídeas de la Reserva

La fragmentación del Pedregal y el impacto antropogénico ha traído como consecuencia que algunas especies vegetales se vean favorecidas en su dispersión y algunas otras sean sumamente frágiles. Tal es el caso de las orquídeas *D. aurantiacus* y *B. urbana*, respectivamente, seleccionadas como dos especies clave en estudios de conservación por sus contrastantes hábitos (Ortega-

Larrocea y Rangel, 2007, Suárez y Ortega-Larrocea, 2008; Fig. 3A-C). *Bletia urbana* fue parte de un programa de reintroducción a su hábitat natural (Rubluo *et al.*, 1989), en el cual se dio seguimiento a la supervivencia y desarrollo de las plantas por cuatro años con excelentes resultados (Rubluo *et al.*, 1993; Fig. 2J). Este trabajo sirvió para aplicar el mismo sistema para otras especies de orquídeas de otras áreas geográficas del país (Martínez-Palacios, 1991) y permitió a estos autores ser pioneros en reintroducir plantas amenazadas de extinción y producidas por cultivo *in vitro*.



Sin embargo, la reintroducción de plantas a su medio natural no es la tarea final, ya que son necesarios los estudios a largo plazo que permitan asegurar que las poblaciones se han podido restablecer o recuperar a través de ésta vía. Mucho se ha escrito sobre el laboratorio natural que constituye la REPSA (Castillo-Argüero *et al.*, 2007). A este respecto, la documentación constante de las

plantas llevadas a campo permitirá saber si el número de individuos reintroducidos ha sido el adecuado, si las plantas han sobrevivido hasta su madurez reproductiva, si han generado propágulos que les permitan perpetuarse; sólo de este modo podrá aplicarse la palabra rescate de una especie de manera correcta. Desde luego, esto es complejo pero no imposible y es la única manera de poder generar información precisa que pueda ser aplicada a la conservación potencial de otras especies amenazadas en México. En la REPSA, este procedimiento se ha comenzado a implementar con el registro de la supervivencia de *B. urbana* a largo plazo, cuyas plantas fueron reintroducidas de manera simbiótica en el año 2001 (Castillo, 2002). Al cabo de cinco años de mantener una supervivencia documentada anualmente en 17 micrositios distintos, se registró el primer evento de floración bajo condiciones naturales (Ortega-Larrocea *et al.*, no publicado; Fig. 3D). Las semillas de las cápsulas obtenidas fueron nuevamente sometidas a cultivo *in vitro*, demostrándose su viabilidad y potencial regenerativo (Ortega-Larrocea y Rangel, 2007; Fig. 3E). A partir de este evento, las plantas han florecido año con año; sin embargo los factores ambientales, ecológicos y humanos, han mostrado ser determinantes en la viabilidad de las cápsulas ya que algunas de ellas han sufrido pudrición, ataque por patógenos y robo (Fig. 3F-M).

El caso contrario lo constituye *Dichromanthus aurantiacus*, que dada la gran cantidad de germoplasma que se puede obtener de la especie, se puede disponer de material suficiente para elaborar protocolos de propagación, endurecimiento y reintroducción (Fig. 3A). Sin embargo, su cultivo *in vitro* mediante la germinación es dificultoso debido a problemas de oxidación de los tejidos cuando esta especie es propagada asimbióticamente (Fig. 2A) y que se logra disminuir en gran medida con el cultivo simbiótico (Rangel, 2006). La reintroducción de plantas asimbióticas en parcelas experimentales ha documentado una baja supervivencia en un tiempo corto (Suárez, en proceso) y las plántulas simbióticas se ven afectadas por el endófito y las condiciones de micrositio (Ortega-Larrocea y Rangel, 2007; Fig. 3B) por lo que otras estrategias están siendo exploradas demostrándose una elevada supervivencia en una segunda reintroducción simbiótica (Suárez, en proceso). Esto demuestra que el protocolo de propagación hasta la reintroducción de una especie presenta muy distintos resultados, por lo que se hace necesario

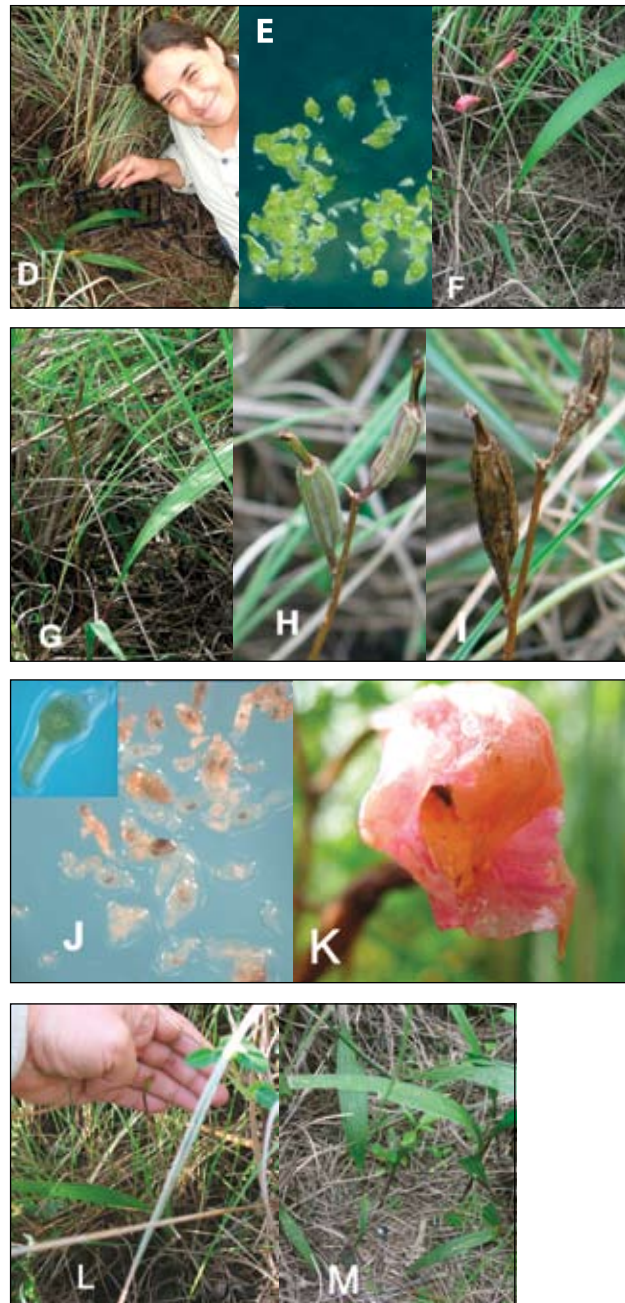


Fig. 3. D) Celebración por la aparición en campo de la primera cápsula (octubre, 2005) en individuos reintroducidos en el año 2001. E) Germinación asimbiótica de semillas de la primera cápsula obtenida (febrero, 2006). F) Floración por segundo año consecutivo de las plantas reintroducidas (julio, 2006). G) Desarrollo de cápsula de la planta anterior planta un mes después. H) Acercamiento de la cápsula inmadura (septiembre, 2006). I) Pudrición de esa misma cápsula por la abundante precipitación en el año (noviembre, 2006). J) Afectación de la viabilidad de las semillas (central), algunos protocormos lograron germinar (sup.) (enero, 2007). K) Vitrificación de flores naturales por exceso de lluvia en el año 2007 (julio, 2007). L) Floración por tercer año consecutivo (junio, 2007). M) Robo de escapos de plantas reintroducidas (agosto, 2007).

calibrarlo según el caso. Asimismo, se reconoce que toda la información generada sirve de base para planear estrategias de restauración más allá de los estudios piloto en parcelas experimentales.

Perspectivas a futuro

La aplicación de técnicas de conservación de germoplasma, propagación y reintroducción como su fin último, han sido exitosamente aplicadas para algunas especies de orquídeas de la REPSA. Sin embargo, falta mucho trabajo por hacer, como el levantamiento demográfico de las especies más vulnerables (Tinoco, en proceso) que permitirá estimar las plantas que es necesario recuperar en términos de metodologías de propagación, factores de supervivencia en campo, de diversidad genética, etc. En el caso particular de las orquídeas terrestres, caracterizadas por ser altamente especializadas en asociaciones con otros organismos, se hace evidente que las estrategias de conservación asimbióticas y simbióticas confieren distintas ventajas. La propagación asimbiótica permite obtener clones de alto valor comercial que pueden ser comercializados con el fin de disminuir las presiones de recolecta, representan una alternativa de ingreso para el financiamiento de investigación y también permiten preservar genotipos valiosos *ex situ*. Especies de flores altamente atractivas como los cutzis (*D. aurantiacus* y *D. cinnabarinus*) son una alternativa. Por otro lado, la propagación simbiótica, altamente efectiva en especies del género *Bletia*, ha mostrado ser invaluable para el rescate de genotipos silvestres en programas de conservación, aunada además, a la propagación vegetativa para distintos fines.

Aún cuando se apliquen las herramientas antes discutidas y las plantas se lleven exitosamente al campo, las orquídeas tienen una gran vulnerabilidad a ser completamente rescatadas en el sentido estricto del término. Para muchas de ellas, la fecundación de sus flores depende de organismos altamente específicos, por lo que si éstos no se encuentran más en el hábitat, los esfuerzos de recuperación por métodos de propagación y documentación en campo son completamente infértiles. LA REPSA es un hábitat en donde todavía se pueden conservar muchos elementos originales, llámense plantas, animales u hongos los cuales han permitido ensayar protocolos de conservación de germoplasma que pueden ser aplicados en otros hábitats.

Es notable que las poblaciones resistan altos índices de perturbación, tal y como se puede constatar en la Reserva, donde algunas especies que son más vulnerables como *Bletia urbana*, se encuentran aún creciendo y reproduciéndose.

Las recomendaciones finales no apuntan a estrategias administrativas de protección, se dirigen a remarcar el tipo de investigación básica que es pertinente para conservar lo poco que queda de nuestro entorno. Queda plasmado en este capítulo que, la mayor parte de los estudios sobre orquídeas son listados taxonómicos no actualizados en su mayoría y la falta de un proyecto serio de conservación de germoplasma, la nula información sobre flujo genético o factores que afectan su distribución o al menos la información actualizada sobre las poblaciones que quedan. Asimismo, se reconoce que algunas especies protegidas como el chautle, *Bletia urbana*, son sujetas a la recolecta clandestina dentro de la Reserva.

Es importante considerar en los estudios futuros el gran avance en las técnicas moleculares y estudios de diversidad genética, los cuales pueden ser muy valorados en los siguientes años para la restauración de este hábitat prioritario. Su vinculación con sistemas de horticultura podrían tener un impacto positivo en la naturaleza y en la calidad de vida de sus habitantes. Se ha demostrado que entre más se limite el uso del recurso, existe un incremento del saqueo de especies. Por tanto, la multiplicación de especies en peligro de extinción podría abastecer al mercado demandante vía clones y apoyar de manera indirecta la conservación de las poblaciones silvestres. Para los casos de reintroducción, el uso de la clonación sólo se justifica si se ha erosionado a tal grado la diversidad de una especie que ya no se cuente con material para su propagación por los métodos tradicionales (Zelenko, 2007) y sólo puede ser aceptada después de un estudio ecológico y genético minucioso, localizando los genotipos únicos que están en inminente extinción para evitar su pérdida (Mistretta, 1994; Valverde y Chávez, en este libro).

Agradecimientos

En este proyecto a largo plazo han participado de manera puntual investigadores y técnicos de la UNAM como S. Luna (FES-Zaragoza, UNAM) en la primera propagación simbiótica, E. Sandoval en los estudios histológicos y A. Téllez (Jardín Botánico, IB-UNAM) y G. Salazar (Instituto de Biología, UNAM) en la determinación de las especies. Ha contado además con algunos fondos de proyectos CIC-UMSNH 5.6, Proyecto CONACYT35481-B, PFAMU (PI100306) y PAPIIT IN230507.

Literatura citada

- ALVAREZ-SÁNCHEZ, J., J. CARABIAS-LILO, J. MEAVE DEL CASTILLO, P. MORENO-CASASOLA, D. NAVA-FERNÁNDEZ, C. TOVAR-GONZÁLEZ Y A. VALIENTE-VANUET. 1986. Proyecto para la creación de una reserva en el Pedregal de San Ángel. Cuadernos de Ecología no. 1. Facultad de Ciencias, UNAM, México. D. F.
- ARDITTI, J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture - A manual. Pp. 203-93, en: Arditti, J. (ed.). *Orchid Biology Reviews and Perspectives I*. Cornell University Press, Ithaca y Londres.
- ARDITTI, J. 1992. *Fundamentals of orchids biology*. Wiley and Sons. Nueva York.
- ARDITTI, J. 1993. Storage and longevity of orchid seeds. *Malayan Orchid Review (Singapore)*. **27**: 59-63.
- BARRETT, S. C. Y J. R. KOHN. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Pp. 3-30, en: Falk, D. A. y K. E. Holsinger (eds.). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, Nueva York.
- BERNARD, N. 1904. Recherches experimentales sur les Orchidées. *Revue Général de Botanique*. **16**: 458-476.
- CALDECOTT, J. O., M. D. JENKINS, T. H. JOHNSON Y B. GROOMBRIDGE. 1996. Priorities for conserving global species richness and endemism. *Biodiversity and Conservation*. **5**: 699-727.
- CASTILLO, M. 2002. Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* (ORCHIDACEAE) como una estrategia para su reintroducción. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- CASTILLO-ARGÜERO, S., G. MONTES-CARTAS, M. A. ROMERO-ROMERO, Y. MARTÍNEZ-OREA, P. GUADARRAMA-CHÁVEZ, I. SÁNCHEZ-GALLÉN Y O. NÚÑEZ-CASTILLO. 2004. Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (D.F., México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **74**: 51-75.
- CASTILLO - ARGÜERO, S., Y. MARTÍNEZ - OREA, M. A. ROMERO, P. GUADARRAMA, O. NÚÑEZ, I. SÁNCHEZ Y J. MEAVE. 2007. La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Aspectos florísticos y ecológicos. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- CHÁVEZ, A. V. M. 1980. Cultivo asimbiótico de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) especie endémica del Pedregal de San Ángel. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- DIEGO, N. 1970. Contribución a la flora silvestre de los alrededores del Jardín Botánico de la UNAM. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- DRESSLER, R. L. 1968. Notes on *Bletia*. (Orchidaceae). *Brittonia*. **20**: 182-190.
- ELIAS, T. S. 1986. Can threatened and endangered species be maintained in botanic gardens?. Pp. 5-8, en: Elias, T. S. (ed.), *Conservation and management of rare and endangered plants*. Proceeding conference of the California Native Plant Society, California.
- FARRINGTON, L. W., J. M. FACELLI, S. C. DONNELLAN Y A. D. AUSTIN. 2007. Are some life-history strategies more vulnerable to the genetic consequences of habitat fragmentation? A case study using South Australian's *Caladenia caladenia* R. Br. (Orchidaceae) species. *Lankesteriana*. **7**: 270-271.
- FAY, M., F., R. J. SMITH, K. ZUIDERDUIN, E. HOPPER, R. SAMUEL, R. M. BATEMAN Y M. W. CHASE. 2007. How does hybridization influence the decision making process in conservation? The genus *Orchis* (Orchidaceae) as a case of history. *Lankesteriana*. **7**: 135-137.
- FLORES-VILLANUEVA, L. 2006. Contribución al estudio de la familia Orchidaceae en la Reserva del Pedregal de San Ángel y en algunas zonas perturbadas por la urbanización de la Ciudad Universitaria, UNAM, México D. F. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- FORD-LLOYD, B Y M. JACKSON. 1986. Plant genetic resources: an introduction to their conservation and use. Edward Arnold, Baltimore.
- FRANKEL, O. H. Y M. E. SOULÉ. 1981. Conservation and evolution. Cambridge University Press, Londres.
- GARDUÑO, C., S. Y. GARCÍA, M. RAMOS Y M. A. TÉLLEZ. 2007. Area recovery and characteristic orchids conservation *in situ* at the San Angel stony terrain. México D. F. *Lankesteriana* **7**: 281-286.
- GEORGE, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. 1. The Technology. Exegetics Ltd, Inglaterra.
- GOWLAND, K. M., U. MATHESIUS, M. A. CLEMENTS Y A. B. NICOTRA. 2007. Understanding the distribution of three species of epiphytic orchids in temperate Australian rainforest by investigation of their host and fungal associates. *Lankesteriana*. **7**: 44-46.
- GUILLÉN, R. S. 2003. Morfogénesis *in vitro* en protocormos de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) sujetos a diferentes concentraciones de Bencil adenina y fotoperiodo. Tesis Profesional. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.
- GUILLÉN-RODRÍGUEZ S., A. MARTÍNEZ-PALACIOS Y V. CHÁVEZ. 2007. Alta respuesta a la floración *in vitro* en protocormos de *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae). Resúmenes del XVII Congreso Mexicano de Botánica. Zacatecas.
- HÁGSATER, E., M. A. SOTO-ARENAS, G. A. SALAZAR CHÁVEZ, J. JIMÉNEZ MACHORRO, M. A. LÓPEZ ROSAS Y R. L. DRESSLER. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.
- IUCN (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). 1985. Rare and threatened plant list. Threatened plant Committee Botanic Gardens Conservation Coordinating Body, Londres.
- IUCN. 1987. Secretaría para la conservación en jardines botánicos, presentación. Centro de Monitoreo para la conservación, Londres.
- KARTHA, K. K. 1981. Meristem culture and cryopreservation methods and applications. Pp. 181-211, en: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture, methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York.
- KARTHA, K. K. 1982. Cryopreservation of germplasm using meristem and tissue culture. Pp. 139-161, en: Tomes, D. T., B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha y R.L. Peterson (eds.). Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture & Industry. Universidad de Guelph, Ontario.
- KNUDSON, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seed. *Botanical Gazette*. **73**: 1-25.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of Orchid Seeds. *American Orchid Society Bulletin*. **15**:214-217.
- LIGHT, M. H. S., H. KOPOWITZ Y T. A. MARCHANT. 2003. The impact of climatic, edaphic and physiographic factors on the population behavior of selected temperate and tropical orchids. Pp. 159-182, en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. I. Barrett, P. J. Cribb (eds.). Orchid conservation. Natural History Publications, Borneo.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, A. 1985. Inducción *in vitro* de brotación múltiple en *Bletia urbana* Dress (Orchidaceae) a partir de protocormos seccionados. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis Mestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, A., M. P. ORTEGA-LARROCEA, V. M. CHÁVEZ Y R. BYE. 2003. Somatic embriogénesis and organogénesis of *Agave victoria-reginae*, considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **74**: 135-142.
- MARTÍNEZ-PALACIOS A., J. MEDRANO MALDONADO Y R. CÁRDENAS-NAVARRO. 2007. Preservación de Semillas de Orquídeas. 53 Reunión Anual Sociedad Interamericana para la Horticultura Tropical. Michoacán.
- MISTRETTA, O. 1994. Genetics of species re-introductions: applications of genetic analysis. *Biodiversity and Conservation*. **3**: 184-190.
- NASH, N., R. L. BARRET, H. F. OAKELEY, I. CHALMERS Y H. RICHARDS. 2003. Role of Orchid societies and growers in conservation. Pp. 313-328, en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. I. Barrett y P. J. Cribb (eds.). Orchid conservation. Natural History Publications, Borneo.
- NAVARRO, A. V. 1977. *Bletia urbana* Dressler. *Orquidea (Méx.)* **6**: 346-353.
- NEWMAN, B. J., P. LADD, A. BATTY Y K. DIXON. 2007. Ecology of orchids in urban bushlands reserves- can orchids be used as indicators of vegetation condition? *Lankesteriana*. **7**: 313-315.
- NOTIMEX. 2004. Hallan en el DF dos tipos de orquídeas que crecen en zonas áridas. La crónica de hoy, El universal, 17 de enero. México.

- ORTEGA-LARROCEA, M. P. 2008. Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. Pp. 85-96, en: Alvarez-Sánchez, J. y A. Monroy-Ata (comps.). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración, Facultad de Ciencias, UNAM.
- ORTEGA-LARROCEA, M. P., M. V. CHÁVEZ Y R. BYE. 1997. Micropropagación y establecimiento *ex vitro* de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. *Amaranto* **10**: 1- 9.
- ORTEGA-LARROCEA, M. P. Y D. GONZÁLEZ. 2008. Los hongos asociados a las orquídeas terrestres en la restauración. Pp. 219-227, en: Heredia A., G. (ed.). Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica. Instituto de Ecología, A. C., México.
- ORTEGA-LARROCEA M. P. Y M. RANGEL-VILAFRANCO. 2007. Fungus-assisted reintroduction and long-term survival of two Mexican terrestrial orchids in the natural habitat. *Lankesteriana*. **7**: 317-321.
- ORTEGA-LARROCEA, M. P., E. SANDOVAL, C. RAMOS Y V. M. CHÁVEZ-AVILA. 2005. Histological development of *Bletia urbana*: an endangered terrestrial orchid from México. *Selbyana*. **26**: 309.
- PRITCHARD, H. W. 2004. Classification of seed storage 'types' for *ex situ* conservation in relation to temperature and moisture. Pp. 139-161, en: Guerrant, E. O., K. Havens y M. Maunder (eds.). *Ex situ* plant conservation: supporting species survival in the wild. Island Press, Washington, D.C.
- PRITCHARD, H. W., A.L. POYNTER Y P. T. SEATON. 1999. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana*. **14**: 92-101.
- RAMSAY, M. M. Y K. W. DIXON. 2003. Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. Pp. 259-286, en: K. W. Dixon, S. P. Kell, R. I. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Borneo.
- RANGEL, V. M. 2004. Aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres de la Reserva Ecológica "El Pedregal" de San Angel, México, D. F. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- RANGEL, V. M. 2006. Reintroducción de algunas especies de orquídeas de la Reserva del Pedregal de San Angel, México, D. F. Tesis de Maestría, Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- RANGEL-VILAFRANCO M. Y M. P. ORTEGA-LARROCEA. 2007. Efforts to conserve endangered terrestrial orchids *in situ* and *ex situ* at two natural reserves within Central Mexico. *Lankesteriana*. **7**: 326-333.
- RASMUSSEN, H. N. 1995. Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Reino Unido.
- RAVEN, P. H. 1976. Ethics and attitudes in conservation of threatened plant. Pp. 155-180, en: NATO Conference Series no. 1. Ecology. Plenum Press, Nueva York.
- REYES S. Y P. J. 1993. Estudio florístico y fito geográfico en el municipio de San Juan Mixtepec, Distrito de Juxtlahuaca Oaxaca. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- ROJO, A. Y J. RODRÍGUEZ. 2003. La flora del pedregal de San Angel. SEMARNAT-INE, México.
- RUBLUO, A. 1994. Del tubo de ensayo a la Reserva Ecológica. Rescate de especies en extinción por cultivo *in vitro*. Pp. 399- 401, en: A. Rojo (Comp.). Reserva Ecológica "El Pedregal de San Angel". Ecología, Historia Natural y Manejo. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- RUBLUO, A., V. CHÁVEZ Y A. MARTÍNEZ. 1989. *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana*. **4**: 68-73.
- RUBLUO, A., V. CHÁVEZ, A. P. MARTÍNEZ Y O. MARTÍNEZ-VÁZQUEZ. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation*. **63**: 163-169.
- RZEDOWSKI, J. 1954. Vegetación del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal, México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. **8**: 59-129.
- RZEDOWSKI, J. 1979. Extinción de Especies Vegetales. Pp. 43-45, en: Rzedowski, J. y G.G. de Rzedowski (eds.). Flora Fanerogámica del Valle de México, vol. I. CECSA, México.
- SALAZAR, G. A., M. A. CHASE, M. A. SOTO Y M. INGROUILLE. 2003. Phylogenetics of Cranichidae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastic and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany*. **90**: 777-795.
- SARMIENTO, F. M. 1995. Consideraciones sobre aspectos reproductivos y ecología de especies de géneros de la familia Orchidaceae en el Pedregal de San Angel.

- Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- SCHUITEMAN, A. Y E. DE VOGEL. 2003. Taxonomy for conservation. Pp. 55-68, en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. I. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Borneo.
- SEATON, P. Y H. W. PRITCHARD. 2003. Orchid germplasm collection, storage and exchange. Pp. 227-258, en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. I. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Borneo.
- SEMARNAT. 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 y cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, 2ª. Sección. 6 marzo.
- SIM, G. E., C. S. LOH Y C. J. GOH. 2007. High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium Madame Thong-In* (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*. **26**: 383-393.
- SMITH, Z. F., E. A. JAMES Y C. B. MCLEAN. 2007. Experimental reintroduction of the threatened terrestrial orchid *Diurus fragantissima*. *Lankesteriana*. **7**: 377-381.
- SOSA, V. 1992. Systematic studies on *Bletia*. (Orchidaceae) University of California, Berkeley. 199 p.
- SOTO, M. A. 1983. Vegetales de México. El Pedregal de San Angel: un refugio natural de orquídeas. *Ocelote (Méx.)*. **1**: 9-11.
- SOTO-ARENAS, M. A. 1996. Regional Accounts: Mexico. Pp. 53-58, en: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids status survey and conservation action plan. IUCN, Gland y Cambridge.
- SOTO-ARENAS, M. A., R. S. SOLANO-GÓMEZ Y E. HÁG-SATER. 2007. Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana*. **7**: 114-121.
- SUÁREZ, I. Y M. P. ORTEGA-LARROCEA. 2008. Conservación *in situ* y *ex situ* de una orquídea modelo en una reserva ecológica del Valle de México con vegetación relictual. Convención Trópico, La Habana Cuba.
- SUTTER, E. 1988. Stomatal and cuticula water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *Journal of American Society of Horticulture Science*. **113**: 234-238.
- TÉLLEZ, V. A. 2002. The Pedregal de San Angel and its orchids. *Orchid review*. **110**: 25-29.
- TELLEZ-VELASCO, A. 2007. The important role that the Botanical Garden of the National Autonomous University plays in the conservation of Mexican Orchids. *Lankesteriana*. **7**: 156-160.
- TÉLLEZ, V. A., L. FLORES Y E. ESPARZA. 2007. Orquídeas terrestres del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- TREMBLAY, R. L. Y M. J. HUTCHINGS. 2003. Population dynamics in orchid conservation: a review of analytical methods, based on the rare species *Lepanthes eltoroensis*. Pp. 183-204, en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. I. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Borneo.
- VILLA-LOBOS, J. 1988. Threatened Plant List of Middle America. IUCN.
- VOVIDES, A. P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. *Biotica*. **6**: 219-28.
- WHIGHAM, D. F. Y J. H. WILLEMS. 2003. Demographic studies and life-story strategies of temperate terrestrial orchids as a basis for conservation. Pp. 137-158, en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. I. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Borneo.
- WOCHOK, Z. S. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biological Conservation*. **20**: 83-89.
- YAMADA, T., A. SAKAI, T. MATSUMARA Y S. HIGUCHI. 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Science*. **73**: 111-116.
- ZETTLER, L. W. Y T. M. MCINNIS. 1993. Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana*. **8**: 155-162.
- ZIV, M., A. SCHWARTZ Y D. FLEMINGER. 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*: implications for hardening. *Plant Science*. **52**: 124-127.
- ZELENKO, H. 2007. Not a single orchid. *Lankesteriana*. **7**: 164-168.