

13

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS - IZTACALA

PROPAGACION *in vitro* DE *Oncidium cavendishianum* Batem (ORCHIDACEAE) A PARTIR DE EXPLANTES DE LA INFLORESCENCIA.

T E S I S

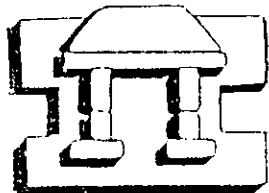
PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

Q U E P R E S E N T A :

CARLOS VICTOR CAHUANTZI ALVAREZ

ASESOR: M. en C. ERNESTO AGUIRRE LFON



IZTACALA LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO 1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

26472A

L



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.

## **Dedicatorias**

*A mis padres.*

Por haberme dado la posibilidad de terminar una carrera con todos los sacrificios que esto implicó, gracias.

*A mi compañera, amiga y esposa.*

Gracias amor mío por todo el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

*A mis hijos Eduardo y Luis*

Por el gran aliciente que le han dado a mi vida.

## **Agradecimientos**

*M. en Ciencias Ernesto Aguirre León*

Por el apoyo recibido durante la realización del presente trabajo, por las continuas y exhaustivas correcciones y comentarios para mejorar la presentación del presente trabajo, muchas gracias.

*Agustín*

Por sus acertados comentarios y aclaraciones.

A los bilogos Gerardo Ortiz M, Alberto Arriaga F. y Manuel Mandujano por la revisión del presente trabajo.

## INDICE

## PAG.

RESUMEN.....	5
INTRODUCCION.....	6
ANTECEDENTES.....	8
PROPAGACION <i>IN VITRO</i> DE ORQUIDEAS.....	9
OBJETIVOS.....	15
METODOLOGIA.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSION.....	33
CONCLUSIONES.....	36
APENDICE I.....	37
APENDICE II.....	39
REFERENCIAS.....	40

---

## RESUMEN

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas de plantas con flor. Su distribución es cosmopolita.

Uno de los géneros más grandes y extensamente cultivados es *Oncidium*, este género se distribuye desde la Florida hasta Perú y Brasil.

Se ha utilizado ampliamente para la hibridación pues muchas de las especies tienen características deseables, buscadas por los propagadores tales como; gran número de flores, duración prolongada y colorido variable.

En México una de las especies más conocidas es *Oncidium cavendishianum* Batem; este género ha sido propagado vegetativamente y por semilla, lo que hace el proceso lento y con poca cantidad de plantas, por se ha buscado nuevas formas de propagación.

En general el género *Oncidium*, los métodos de propagación *in vitro* han sido pocos, algunos son los realizados por Fast (1973), propago *O. papilio* utilizando las yemas apicales de la inflorescencia, Lim-Ho y Lee (1987) utilizaron inflorescencias de *O. ampliatum*, *O. cebolleta*; *O. sphacelatum* y otros híbridos del género.

En el presente trabajo se propone un medio para la propagación *in vitro* de *Oncidium cavendishianum* utilizando nudos apicales de la inflorescencia, de los cuales se obtuvieron cuerpos parecidos a protocormos. (PLB)

Se propone también un método de desinfección, ya que los, propuestos en la literatura dañaban a los explantes causando una rápida oxidación, ya que las características de la inflorescencia es lisa y carnosa, lo que ocasiona que no soporte periodos largos de desinfección.

## INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas entre las plantas con flores, comprende de 25000 a 30000 especies incluidas en más de 725 géneros (Dressler, 1981).

Su distribución es cosmopolita desde el Norte de Suecia y Alaska, hasta la tierra del fuego y las islas Macquarie a excepción de las zonas polares y áreas situadas a más de 4000 m de altitud, pero la mayoría de las especies se encuentra en el trópico (Dressler, 1981). En México las orquídeas se localizan en zonas montañosas especialmente a una altitud aproximada de 2000 m. Los estados de Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero poseen la mayor abundancia de especies, mientras que, otros con una flora relativamente rica en ellas son: Jalisco, México, Michoacán y las regiones más sureñas de Puebla y San Luis Potosí (Soto, 1989). Los estados de Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, con tierras de baja altitud poseen relativamente pocas especies (comunicación personal E. Aguirre). Las estimaciones de su número han variado con el tiempo, Dressler (1981), considera que existen aproximadamente 660 especies registradas en México, mientras que Soto (1988), indica que se conocen alrededor de 1000 especies para el país y que muy pronto se puede alcanzar la cifra de 1200 debido a los constantes hallazgos.

Cuando Linneo escribió su obra *Species Plantarum*, los botánicos europeos conocían pocas orquídeas epifitas, por lo que las clasificaban en el género *Epidendrum*. Sin embargo a principios del siglo XIX aumento el conocimiento de las orquídeas del neotropico y se reconocieron nuevos géneros. Uno de estos géneros es *Oncidium*, descrito por Olof Swartz en 1800. Este género es uno de los más grandes y extensamente cultivados, sin embargo su clasificación taxonómica presenta actualmente muchos problemas, existen grandes controversias sobre la delimitación de cada una de las secciones que forman a dicho género. (Dressler y Williams, 1973)

El género *Oncidium* presenta una distribución desde la Florida hasta Perú y Brasil. Lo encontramos desde tierras bajas tropicales hasta bosques de encino a los 2000. *Oncidium* ha sido utilizado ampliamente para hibridación pues muchas de las especies, tienen características deseables buscadas por los propagadores tales como: gran número de flores, duración prolongada y colorido variable.

En México el género se encuentra representado aproximadamente por 53 especies de las cuales, una de las más conocidas es *Oncidium cavendishianum*, llamada comúnmente "oreja de burro" por presentar hojas largas y carnosas, es fácilmente cultivable y no falta en viveros e invernaderos. Por ser una especie de fácil cultivo, y por presentar una floración llamativa, constituye un elemento para ser utilizado, por lo que puede considerarse una especie digna de estudio, que todavía se encuentra en bosques de encino cerca de la ciudad de México.

Existe información escasa en cuanto a la propagación *in vitro* del género *Oncidium*, condición que se extiende también a otros géneros y especies de México.

Recientemente Rubluo et. al. (1993) mencionan la importancia de buscar técnicas de propagación *in vitro* para la conservación de especies en peligro de extinción por la sobrecolectión y la pérdida de su hábitat, y hacen referencia de *Oncidium straminium*, perteneciente a la misma sección Plurituberculata, el cual se propagó a través de semilla.

Como puede advertirse es importante ofrecer alternativas para la propagación *in vitro* de especies como *Oncidium cavendishianum*, no sólo por su interés hortícola, sino porque abriría la posibilidad de propagar otras especies del género que se estudien, algunas de ellas raras y atractivas como: *Oncidium incurvum* y *O. oestlundianum*.



## ANTECEDENTES

En 1800 el botánico sueco Olof Swartz (1760-1818) nombró el género *Oncidium* basándose en el diminutivo de la palabra griega *onkos*-tumor, en alusión a los callos verrugosos sobre los labelos de todas las especies. (Hamer, 1974).

El género *Oncidium* con gran número de especies, aproximadamente 650 a 700 (Garay y Stacy, 1974), distribuidas desde la Florida hasta Perú y Brasil. Es uno de los géneros más variables en cuanto a la morfología de las especies y muy afín a los géneros *Odontoglossum*, *Brassia* y *Miltonia*. Tiene una distribución altitudinal muy amplia, encontrándose desde las tierras bajas tropicales hasta elevaciones que llegan a los 2700 m de altitud (Dressler y Williams, 1975).

En México hay alrededor de 55 especies (Soto, 1988) de *Oncidium* distribuida principalmente en los estados de México, Michoacán, Oaxaca, Tabasco y Chiapas. Otros estados con un número reducido de especies son Yucatán, Tamaulipas y San Luis Potosí (Wiard, 1987).

*Oncidium cavendishianum* Batem pertenece a la sección Plurituberculata caracterizadas por presentar sépalos mas o menos carnosos. Pétalos y labio membranoso, excepto el callo. Pseudobulbos pequeño con prominencias, hojas terminales, cresta del labio tuberculada. Es una especie de amplia distribución se le encuentra en bosques de encino y en bosques mesofilos de montaña de 1300 a 2150 m de altitud. Es una planta epifítica de clima templado, con pseudobulbos pequeños inconspicuos, comprimidos, unifoliados y verdes; hojas carnosas en su base fuertemente carinadas, agudas; inflorescencia sucucienta panicuiada lateralmente de 70 cm. de largo, con aproximadamente 30 a 40 flores, son de 4 cm. de diámetro, vistosas, amarillo verdosas, con manchas rojas sobre sépalos y pétalos, así como alrededor del labelo; ovario pedicelado de 5 cm. de largo; sépalos de 15 X 17 mm., ápice redondo, bordes ondeados amarillo verdosos con manchas rojas, pétalos de igual color de 16 X 9 mm; labelo trilobado, amarillo, lóbulos laterales unguiculado, circulares ondeados, lóbulo intermedio ancho, disco con callo carnoso, elevado, amarillo y blanco con manchas rojas; la columna es carnosa con dos brazos falcados, obtusos a cada lado apical.

Florece en noviembre y diciembre.

Se distribuye en México, Guatemala, El Salvador y Honduras.

En México se localiza en los estados de Veracruz, Jalisco, México, Morelos, Michoacán y Oaxaca. Es una especie de fácil cultivo y con flores vistosas que ha sido colectada en grandes números.

#### PROPAGACION *IN VITRO* DE ORQUIDEAS

En 1902 Haberlandt realizo (citado en Murashige,1974) el primer intento de cultivar células vegetales *in vitro*, su intención era mostrar que el cultivo de tejidos vegetales es una valiosa herramienta para explorar la morfogénesis y demostrar la totipotencialidad de las células vegetales. Probablemente no sospechó que la técnica de cultivo de células vegetales fuera a convertirse en una actividad orientada a la economía de mercado .(Murashige, 1974).

A partir de entonces se ha reorganizado la propagación a través del cultivo de células vegetales y se ha utilizado la exploración de los requerimientos de cada explante.

Marston (citado en Murashige, 1974) publicó una revisión relacionada con la propagación *in vitro* de orquídeas, mencionando que su interés comercial y sus rasgos característicos las han separado de otras plantas.

Las orquídeas para su propagación *in vitro* requieren de los siguientes componentes y condiciones:

##### I.- SALES INORGÁNICAS.

a) **Macronutrientes:** Requeridos en cantidades milimolares. Se ha observado que el N, uno de los elementos que más satisface el cultivo *in vitro* de orquídeas al igual que el fósforo. Los demás macronutrientes se requieren en diferente proporción . El hierro, es un elemento usado en la germinación, se han usado algunas veces tartrato férrico y citrato férrico, pero estos tienen problemas de solubilidad en el medio, por lo que han usado sales ferrosas. La tendencia es la de adicionar hierro quelado o la combinación de una sal inorgánica con EDTA.

b) **Micronutrientes :** Son requeridos en cantidades micromolares. Arditti (1967a) mencionó que los explantes de orquídeas no necesitaban de microelementos, considerando que las impurezas presentes en el agar y otras sales son suficientes para cubrir las necesidades de los explantes, más tarde esta afirmación se torna improbable y la explicación es que los avances en la purificación del agar hace que deban adicionarse los micronutrientes.

## 2.- VITAMINAS.

La tiamina es una vitamina de las más usadas aunque también se han empleado otros tales como: mio-inositol, piridoxina, ácido nicotínico, pantotenato de calcio, biotina, ácido fólico y también la niacina

## 3.- NUCLEOTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS.

Los más utilizados son : sulfato de adenina, 2,3-monofosfato de guanosina, 5-monofosfato de citidina, 5-monofosfato de uridina y ácido ribonucleico.

## 4.- FUENTE DE ENERGIA Y CARBONO.

La fuente principal de energía es la sacarosa. Aunque para *Vanda* al parecer es tóxica, pues causa un efecto osmótico adverso en este género. Otros azúcares usados son : glucosa, fructuosa, maltosa y manosa.

## 5.- COMPLEJOS NATURALES NO DEFINIDOS.

Algunos medios de cultivo incluyen extractos para suplementarlos, algunos de ellos son homogeneizados de plátano, agua de coco, peptona, neopeptona y ácido casamino.

## 6.- AGENTES SOLIDIFICANTES.

El más usado es el agar. Las cantidades de agar dependen de los diferentes contenidos minerales y sustancias orgánicas. Kerbauy (1993) menciona que las altas concentraciones de agar y sacarosa inhiben la formación de PLB en *Oncidium varicosum*.

## 7.- REGULADORES DEL CRECIMIENTO.

Los reguladores del crecimiento juegan un papel muy importante en el desarrollo de los vegetales. Los que más se utilizan en orquídeas son las auxina , citocininas y en ocasiones la antiauxina ácido trans-cinnámico.

a).- AUXINAS. La principal característica es la de elongar a la célula y promover la formación de raíces y desarrollo de brotes, varias de las más usadas son : ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftalen acético (ANA).

b).- ANTIAUXINAS. Su principal función es la de inhibir a las auxinas endógenas. El producto más usado es el ácido trans-cinnámico. Al parecer inhibe la formación de raíces y favorece el desarrollo de brotes.

c).- CITOCININAS. Provocan la división celular, promueven la formación de brotes y la diferenciación de tejidos cultivados, las más empleadas son: benciladenina (BA) y 6-furfurilaminopurina conocida con el nombre de cinctina.

#### 8.- PH Y ESTERILIZACION DEL MEDIO.

El margen usado habitualmente en el cultivo de tejidos de orquídeas es de 5.0 a 5.5 .

Este se ajusta con un ácido (HCl, ácido clorhídrico o ácido cítrico y/o una base (NaOH, KOH) a una concentración de 1 N o 1 M. Para la esterilización del medio comúnmente se utiliza una autoclave a 1.05 kg/cm<sup>2</sup> y 120°C durante 15 minutos.

Aunque en algunas ocasiones se utilizan micromembranas.

#### 9.- EXPLANTES.

Las características de vigor, salud y tipo de material vegetal a usar son determinantes para el éxito del establecimiento de los cultivos .

#### 10.- DESINFESTACION.

Existe una gran variedad de agentes químicos de uso común para la desinfestación del material . Algunos de ellos son : Hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio entre otros.

#### 11.- ILUMINACION.

Arditti y Ernst (1993) mencionan varios aspectos de la luz que son de gran importancia en la micropropagación de orquídeas, la presencia o ausencia (luz y oscuridad), duración (fotoperiodo) calidad (espectro) y fuente (natural, fluorescente incandescente.).

##### a).- LUZ Y OSCURIDAD.

En la mayor parte de los casos en el cultivo *in vitro* las orquídeas deben tener iluminación por lo menos varias horas cada 24 hrs. Cada explante debe estar sometido a un fotoperiodo; que puede determinarse experimentalmente en particular para orquídeas que no hayan sido cultivadas.

##### b).- INTENSIDAD.

Se refiere a la energía del espectro visible producido por una fuente de iluminación y/o su incidencia en un cultivo. Algunas de las unidades para medir la intensidad de la luz son: pies bujías (footcandle), lux y PAR ó radiación fotosintéticamente activa, que es una medida más acertada, y sus unidades son:  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}$

### c).- CALIDAD.

Esta se refiere al espectro de la fuente de luz que cada planta requiere, para su adecuado desarrollo y crecimiento. Por lo general las lámparas incandescentes producen más luz roja y menos longitud de onda azul que las lámparas fluorescentes. Las lámparas especiales para el crecimiento de plantas suministran luz mejor balanceada. Por ejemplo en estudios con *Tradescantia fluminensis*, la mejor calidad de luz es obtuvo con lámparas Sylvania Cool, blancas. (Biran y Křofenek, 1976 citado por Arditti y Ernst, 1993).

### d).- FUENTE DELUZ.

La información revisada sugiere que la fuente de luz apropiada para el cultivo de tejidos de orquídeas consiste en dos tubos blancos fluorescentes con dos bulbos incandescentes de 25 a 50 watts, colocados aproximadamente de 45-50 cm de los explantes, dos tubos blancos fluorescentes tienen aproximadamente entre 130 y 110 footcandle ( alrededor de 3.8 W/m<sup>2</sup>, 17.14  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s).

Usando cuatro tubos blancos, estos proveen 320 a 250 footcandle (alrededor de 2500-3200 lux, 9.52 W/m<sup>2</sup> o 20.14  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s PAR) o 1100 a 1300 lux.

### 12.- TEMPERATURA.

Casi en todos los reportes del cultivo de orquídeas la temperatura se mantiene entre 24 a 26 grados centígrados.

El medio Knudson C ha sido probablemente el más usado en propagación *in vitro* de orquídeas y desde su descubrimiento (1946) hasta nuestros días ha sufrido modificaciones, lo cual ha permitido abrir nuevas alternativas en la propagación de orquídeas no sólo por semilla, también usando explantes vegetativos.

Morel en 1955 (citado por Stewart, 1989 ) obtuvo plantas libres de virus utilizando meristemos apicales de *Cymbidium*, ya anteriormente se habían propagado otros géneros con éxito con esta técnica algunos ejemplos son: *Dahlia* (Morel y Martín , 1955) y *Chrysanthemum* (Holmes, 1956) entre varios más.

El desarrollo de la técnica de cultivo *in vitro* de meristemos vegetativos tiene grandes ventajas como lo menciona Morel (citado por Stewart, 1989):

1.- Los meristemos de orquídeas cultivados son una masa de tejido morfológicamente idéntico a la del protocormo.

2.- Los protocormos algunas veces desarrollan una raíz y hasta brotes o bien muchas veces desarrollan espontáneamente un número de protuberancias o cuerpos semejantes a protocormos (PLB) : protocorm like body abreviatura ampliamente utilizada en la literatura.

3.- El número de protocormos obtenidos de un sólo meristemo puede aumentar artificialmente, resembrando los explantes en un medio con nutrientes en donde cada corte prolifere y pueda dividirse en más protocormos aumentando así la regeneración de la planta.

Vacherot (1966 citado por Stewart, 1989) menciona que el cultivo de meristemas de orquídeas representa un punto comercial muy importante lo que ha hecho que aumente la divulgación de trabajos experimentales de más de 350 diferentes clones entre poco más de 10 géneros que se han llevado a la multiplicación.

Por lo anterior resulta evidente que se busquen nuevos caminos en la propagación *in vitro* utilizando explantes y órganos. Algunos de los trabajos para propagar orquídeas a través de los brotes terminales y axilares conteniendo meristemas son los de : Sagawa et. al., 1966; Ball et. al., 1977 ; Mosich et. al., 1973 ; Churchill et. al., 1971; Wilfret, 1966 ; Reinert y Yeoman, 1982 ; Kim y Sagawa, 1970 ; Scully, 1966; Arditti, 1977.

Con estas técnicas frecuentemente una parte de la planta debe de ser sacrificada junto con sus meristemas, por lo que se deben buscar diferentes tipos de explantes ( Stewart, 1989)

Se han hecho reportes de formación de callos y regeneración de plantas teniendo como explantes plantulitas (Pierek y Steegman, 1972 citado por Stewart, 1989), se han utilizado las hojas (Champagnat et. al. 1970, citado por Stewart, 1989 ; Luna, 1982), inflorescencias jóvenes (Kotomori y Murashige, 1956 ; Intuwong y Sagawa, 1973; Lin 1986) , primordios de la inflorescencia (Fast, 1973 , Stokes, 1974 citado por Stewart, 1989), raíces aéreas (Stewart, 1989), yemas apicales, nudos y entrenudos de la inflorescencia (Mosich et. al., 1973 ; Arditti, 1975 ; Lin , 1986 , Yam y Weatherhead, 1990) y yemas axilares y laterales de pseudobulbos (Arditti, 1977 ; Jones y Tisseratt, 1990).

Estas técnicas se han realizado en géneros como: *Calanthe*, *Carleya*, *Lycaste*, *Laeliocattleya*, *Neottia*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, y *Doritaenopsis* por citar algunos. Cabe destacar que *Phalaenopsis* es acaso el género que más se ha trabajado en la micropropagación a partir de la inflorescencia, es un género de gran importancia hortícola y sus inflorescencias suculentas se parecen a la de

*Oncidium cuventishianum*. En el género *Phalaenopsis* el cultivo *in vitro* de las inflorescencias producen cuerpos parecidos a protocormos (FLB).

En particular el género *Oncidium* ha sido propagado principalmente a partir de semilla (Arditti, 1977), se menciona la posibilidad de propagarlo con el procedimiento usado para *Cymbidium* (Morel, 1960, 1963, 1964a, 1965b, 1970 citado en Arditti, 1977) en tanto Arditti dice que el método usado para *Cattleya* puede ser utilizado para propagar *Oncidium*.

Recientemente Jones y Tisserat 1990, describen métodos de propagación *in vitro* de orquídeas refiriéndose a dos grandes grupos, el primero las simpodiales que incluye a géneros como *Cymbidium*, *Cattleya*, *Dendrobium* y *Oncidium*, caracterizados por tener rizomas con multibrácteas que presenta varios brotes axilares que son usados como explantes.

El segundo grupo, el cual incluye las orquídeas monopodiales comprende a los géneros tales como: *Phalaenopsis* y *Vanda*, que se caracterizan por tener una sola bractea axial de crecimiento, fácilmente apreciable y que es usada como explante.

Estos métodos utilizan las yemas como explante y sugieren así mismo la posibilidad de propagar *Oncidium* a partir de yemas axilares de los pseudobulbos, ocasionando muchas de las veces que la planta tarde mucho en regenerarse, por lo que se han buscado nuevas alternativas para la propagación *in vitro* de orquídeas.

Uno de los pocos trabajos publicados sobre *Oncidium* es el de Fast (1973), utilizando yemas ápicales de la inflorescencia de *Oncidium papilio*, sin embargo la posición taxonómica de especie parece ser dudosa. Otro trabajo es el realizado por Lim Ho y Lee (1987), utilizando inflorescencias de varias especies de *Oncidium* tales como *O. ampliatum*, *O. cebolleta* y *O. sphacelatum* y de otros híbridos del género. Cabe hacer notar que estos *Oncidium* son de la sección *Oncidium*, solo *O. cebolleta* pertenece a la sección *Plurituberculata*.

Por lo expuesto anteriormente es de suma importancia buscar y depurar metodologías, como la del uso de explantes de la inflorescencia para la propagación *in vitro* de orquídeas en particular de *Oncidium*, tomando en cuenta estas consideraciones se propusieron los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL.**

- 1.- Establecer una metodología para la propagación *in vitro* de *Oncidium cavendishianum* Batem utilizando explantes de la inflorescencia.**

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- a).- Inducir y evaluar la producción de estructuras parecidas a protocormos (PLB) a partir de explantes de la inflorescencias variando las concentraciones de los reguladores.**
- b).-Conseguir la propagación *in vitro* de *Oncidium cavendishianum* a partir de nudos y/o entrenudos de la inflorescencia**



## METODOLOGIA.

### MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal se colectó en la cercanía de Ocuilan, Edo. de México donde la especie crece epífita sobre encinos. Como la floración se inicia en esta localidad en noviembre y diciembre, se pudieron reunir un total de 20 inflorescencias inmaduras en la primera mitad del mes noviembre las que fueron colocadas en tubos con agua para su traslado al laboratorio. Ya que el tamaño de la inflorescencia en el campo es variable dependiendo de la edad y vigor de cada planta, se procuró que las que se eligieran tuvieran un tamaño entre 30 y 60 cm., distinguiendo nudos y entrenudos a fin de seguir un procedimiento de micropropagación empleado en otras especies similar al del género *Phalaenopsis* (Lin, 1989).

### LIMPIEZA GENERAL.

a) Las inflorescencias enteras fueron lavadas con jabón suave, limpiadas superficialmente con alcohol al 70 % y cortadas en secciones que comprendieron 2 nudos, reconociéndose las siguientes partes de la inflorescencia : ápice (A = ápice), la parte media (P.M. = parte media) y la parte base (B = base) (Fig. 1). Estas secciones se lavaron con agua destilada estéril y un detergente comercial ( L.O.C. AMWAY) fueron sumergidas en alcohol al 70 % durante 1 minuto y enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril.

b) En la desinfección del material se probaron dos métodos :

MÉTODO 1. Se utilizó hipoclorito de sodio en las siguientes concentraciones y secuencia:

Hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos

Hipoclorito de sodio al 5 % por 5 a 8 minutos

Hipoclorito de sodio al 1 % por 1 minuto

El método fue adaptado del usado en *Cymbidium* (Sagawa, Shoji y Shoji 1966) para exponer gradualmente al tejido a concentraciones menores y menos dañinas del desinfectante.

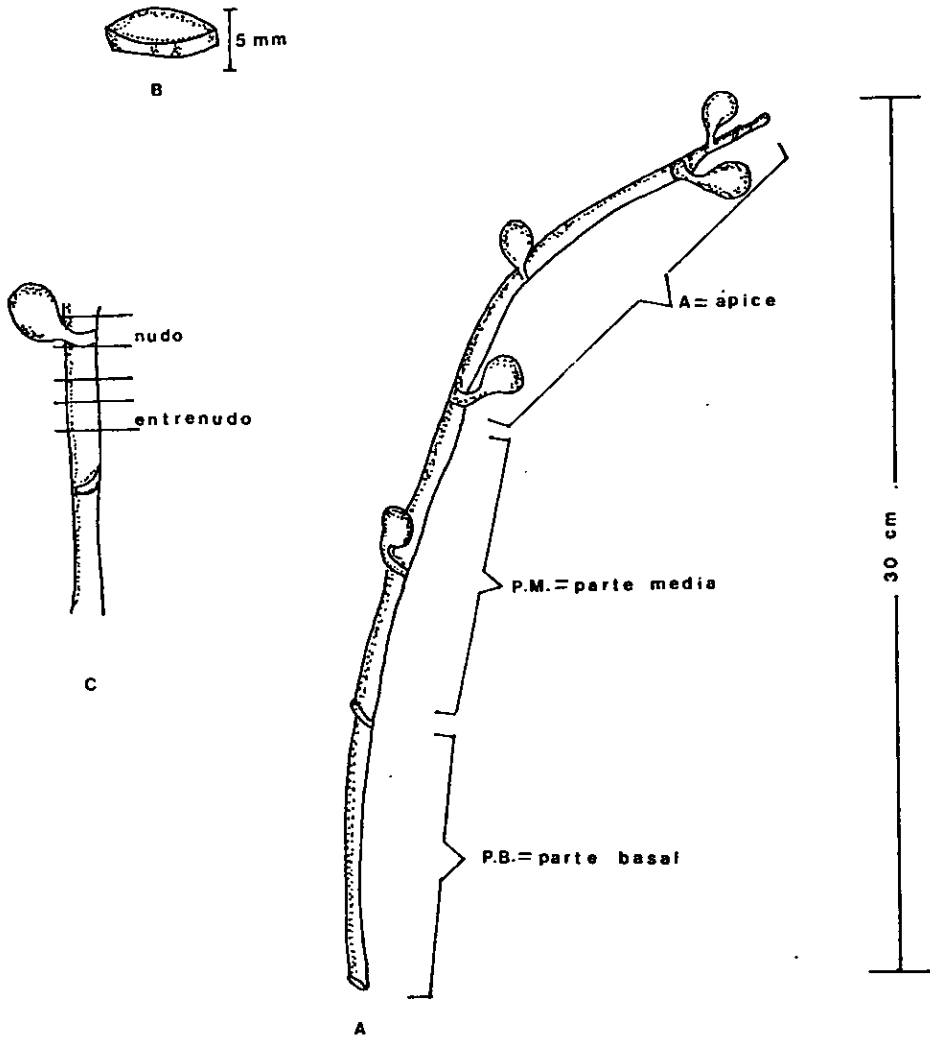


Fig.1 A).- Dimensiones de la inflorescencia de *Oncidium cavendishianum* Batem. B).-Sección del entrenudo. C).- Sección de la inflorescencia incluyendo nudos y entrenudos.

**MÉTODO 2.- Sólo se utilizó hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos**

En ambos métodos después de la secuencia de desinfección se enjuagó cada explante con agua destilada estéril tres veces . Para preparar el desinfectante se utilizó cloro comercial (cloralex), tomando 10 ml. de este se aforo a 100 ml. con agua destilada estéril para obtener el 10 % de hipoclorito de sodio ( 0.5 % de cloro activo) y así para las otras concentraciones.

Toda la desinfección se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar en condiciones estériles. Se separaron las brácteas que cubren cada uno de los nudos , se hicieron secciones de nudos y entrenudos de aproximadamente 5 mm. de longitud con ayuda de un bisturí y pinzas estériles pasándolas a la flama entre cada siembra y se colocaron en el medio de cultivo ligeramente sumergidos para ofrecer mayor estabilidad.

**MEDIO DE CULTIVO**

El medio de cultivo que se utilizó fue el propuesto por Fast (1973), modificado (ver apéndice), con los reguladores de crecimiento son los propuestos por Jones y Tisserrat (1990) de los qué se variaron sus concentraciones. (tabla 1.)

ANAmg/l	BAPmg/l	TRATAMIENTO
0.02	0.7	Mi 1
0.1	3.0	Mi 2
1.0	4.4	Mi 3
2.0	5.0	Mi 4

**TABLA 1.- Concentraciones utilizadas de los reguladores del crecimiento BAP benzilaminopurina, ANA ácido naftalenacético. MI 1 tratamiento de iniciación 1, MI 2 tratamiento de iniciación 2, MI 3 tratamiento de iniciación 3, MI 4 tratamiento de iniciación 4. (Adaptado en parte de Jones y Tisserrat,1990).**

Se agregaron además por cada litro: 30 g. de sacarosa, 8 g. de agar . 1 mg ácido nicotínico , 5 mg. tiamina y 0.5 mg piridoxina . El pH del medio se ajusto a 5 - 5.5 con ácido cítrico 0.1 M y/o KOH 0.1 M.

## TRATAMIENTO.

Se aplicaron 4 tipos de tratamientos (Mi 1, Mi 2, Mi 3, Mi 4) conforme a tabla 1, a las secciones de cada parte de la inflorescencia, colocando un explante por frasco.

El número de repeticiones varió en función de la disponibilidad de inflorescencias y de cada una de las partes estudiadas, ápical, media y basal.

PARTE	APICAL		PARTE MEDIA		PARTE BASAL	
	nudo	entrenado	nudo	entrenado	nudo	entrenado
MEDIO						
Mi 1	12	8	9	12	-	14
Mi 2	12	9	5	6	-	-
Mi 3	5	7	7	14	2	20
Mi 4	6	5	5	12	-	-

TABLA 2.- Muestra el número de repeticiones por cada parte de la inflorescencia, para cada medio de cultivo, para el método de desinfección 1.

PARTE	APICAL		PARTE MEDIA		PARTE BASAL	
	nudo	entrenado	nudo	entrenado	nudo	entrenado
MEDIO						
Mi 1	36	24	6	51	4	14
Mi 2	32	15	13	50	6	13
Mi 3	25	16	10	52	4	22
Mi 4	23	12	10	63	6	27

TABLA 3.- Muestra el número de repeticiones por cada parte de la inflorescencia, para cada medio de cultivo para el método de desinfección 2

## RECIPIENTES

Se utilizaron frascos gerber de 50 ml. de capacidad y el volumen de medio empleado fue de 20 ml/frasco. Estos se taparon con aluminio reforzado y se esterilizaron en autoclave a 1.5 kg./cm<sup>2</sup> y 120 °C durante 15 minutos

## CONDICIONES DE CULTIVO

Los frascos se colocaron a 30 cm. de lámparas Philipps F40D de 40 watt con una radiación continua de 24 horas (PAR) promedio de 13.9  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Con una temperatura de 27  $\pm$  2 grados centígrados con luz continua. Los explantes se subcultivaron aproximadamente cada 30-40 días.

## MEDIO DE ENRAIZAMIENTO.

El medio utilizado para la formación de raíces fue el Mi 4, únicamente se vario el contenido de los reguladores del crecimiento, adicionando solo 2 mg/l de ANA y eliminando el uso de BAP.

# RESULTADOS

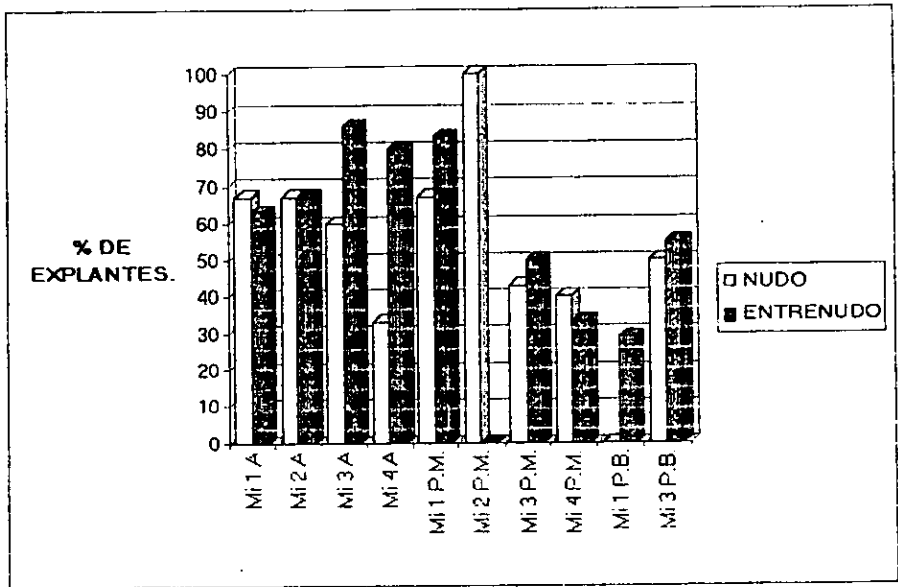


Fig. 2.- Porcentaje de explantes oxidados al mes de cultivo con el método de desinfección I. A = ápice, P.M. = parte media y P.B. = parte basal.

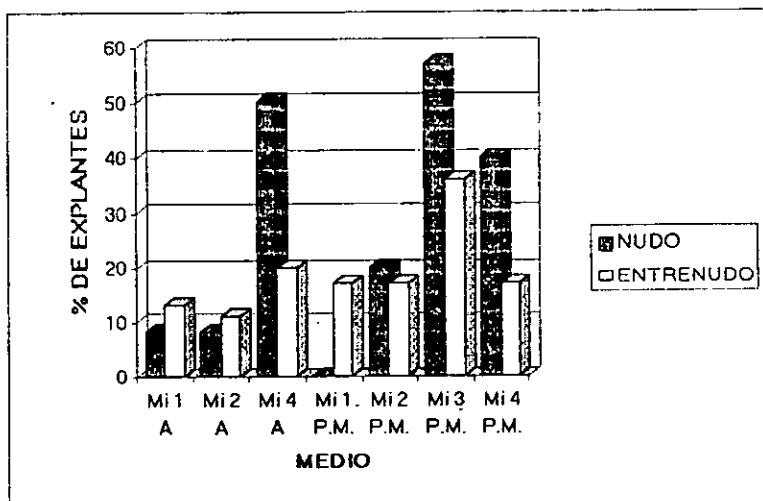


Fig. 3.- Porcentaje de explantes verdes al mes de cultivo con el método de desinfestación 1. A = ápice, P.M. = parte media, P.B. = parte basal.



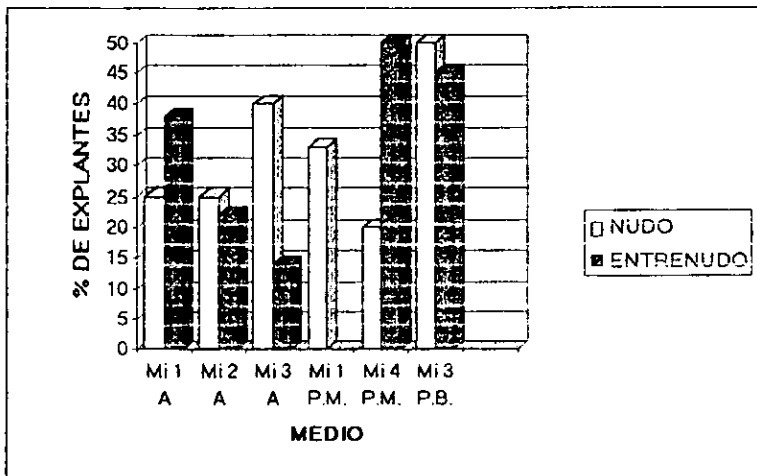


Fig. 4.- Porcentaje de explantes contaminados por bacterias y/o hongos con el método de desinfección 1 ai mes de cultivo. A = ápice, P.M = parte media, P.B. parte basal.

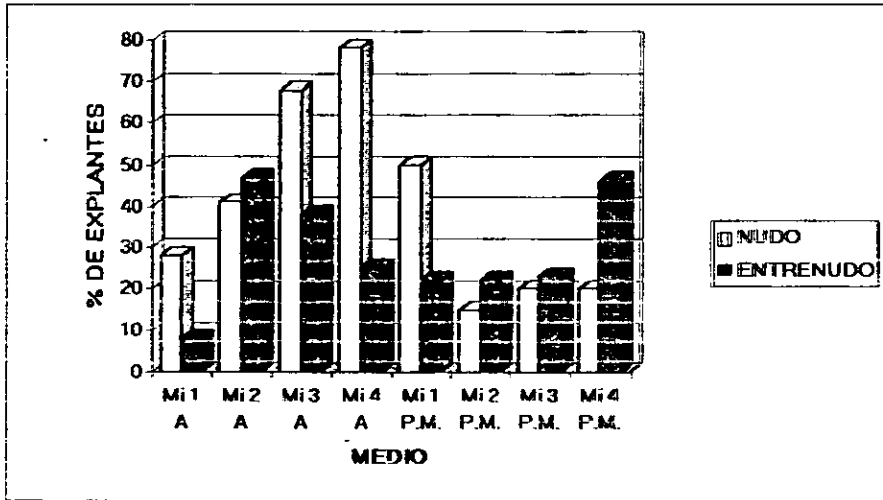


Fig. 5.- Porcentaje de explantes verdes con el método de desinfección 2 al mes de cultivo. A = ápice, P.M. = parte media, P.B. = parte basal.

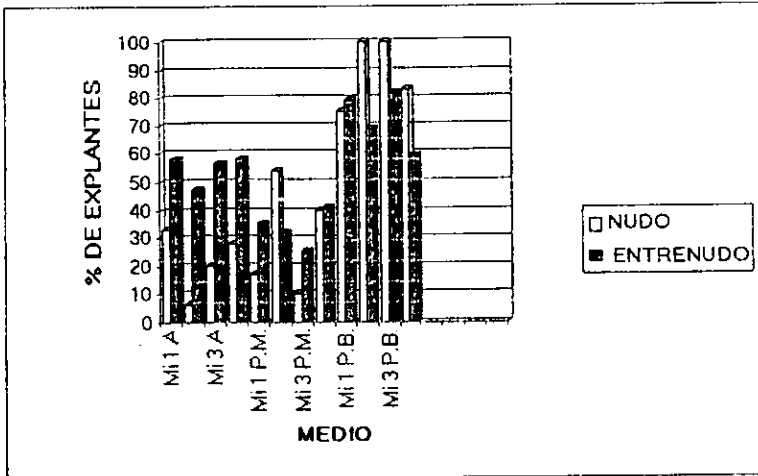


Fig. 6.- Porcentaje de explantes oxidados con el método de desinfección 2 al mes de cultivo. A = ápice, P.M. = parte media y P.B. = parte basal.

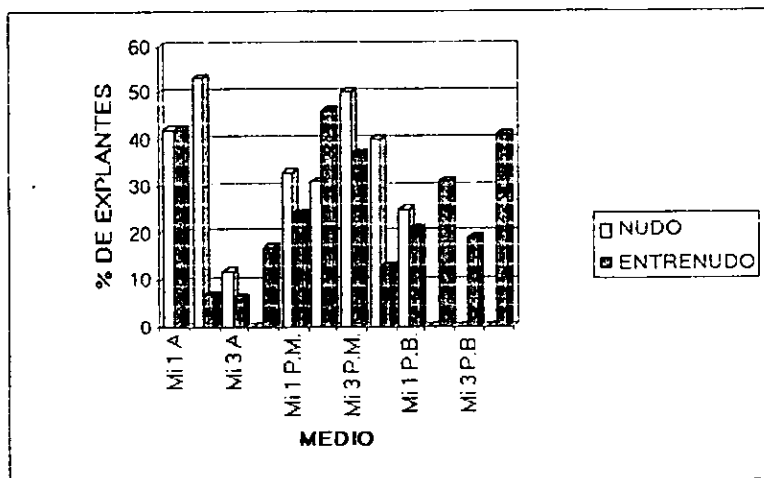


Fig. 7.- Porcentaje de explantes contaminados con el método de desinfección 2 al mes de cultivo por bacterias y / o hongos . A = ápice, P.M. = parte media y P.B. = parte basal.



Fig. 8.- Estado de desarrollo del nudo de la inflorescencia en el Mi 4 de *Oncidium cavendishianum*. a) Nudo a las cuatro semanas, b) hinchamiento del nudo a las 8 semanas de cultivo. c) Formación de PLB a las 16 semanas, d) Formación de las primeras hojas y más PLB a las 20 semanas, e) Más PLB y plantulas sin raíz a las 24 semanas f) Se forman PLB y plantulas a las 28 semanas de cultivo.



Fig 8 ( continuación) .- g) Formación de plantulas sin raíz a las 28 semanas de cultivo, h) Se resiembra las plantulas en Mi 4 con 2.0 mg de ANA a las 29 semanas de subcultivos, i) Se forman raíces a las 32 semanas de subcultivo.

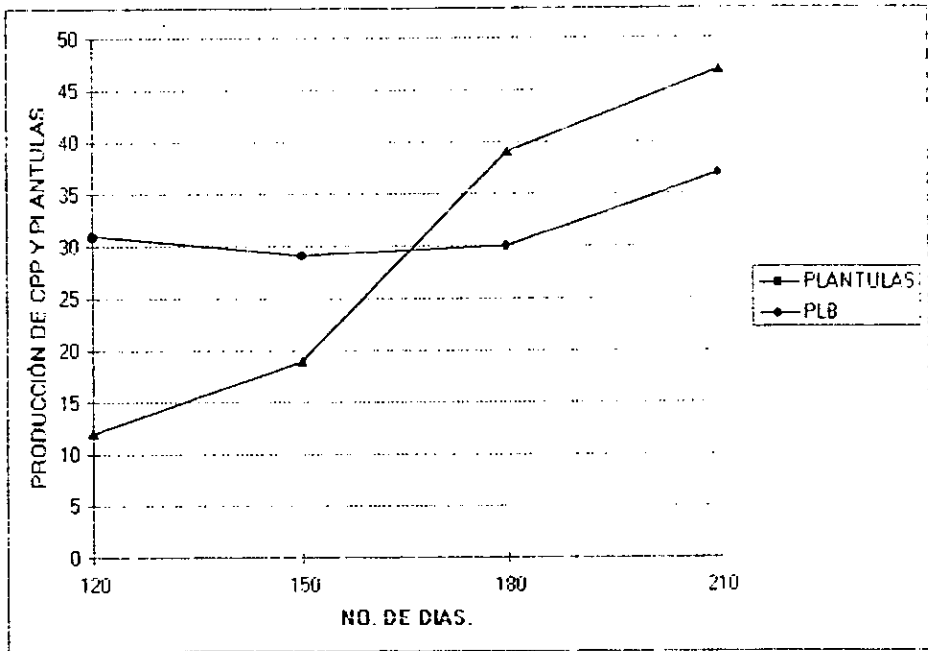


Fig. 9.- Número de plantulas y PLB del nudo apical en 15 frascos de cultivo después de 120 días de cultivo en el medio Mi 4.

## MÉTODOS DE DESINFESTACION

El método de desinfestación 1, fue poco exitoso, en la mayor parte de los explantes el tejido se oxidó rápidamente después de la cuarta semana de cultivo ó se contaminaron. Los explantes que se mantuvieron verdes hasta la cuarta semana fueron escasos. (Tablas. 4 ,5 ,6 , ver apéndice y Figuras 2,3 y 4)

Con el método 2, se obtuvieron mejores resultados, el número de explantes a la cuarta semana de cultivo fue relativamente alto a pesar de que la oxidación fue importante. (Fig. 7 ,8 , 9, ver apéndice y Figuras 5,6 y 7).

## MEDIO DE CULTIVO.

Los explantes en cada medio de cultivo se mantuvieron verdes hasta la cuarta semana de cultivo después de ese tiempo comenzaron a oxidarse en forma variable observándose que sólo en el Mi 4 se mantenían más tiempo verdes.

Los explantes obtenidos de las diferentes partes de la inflorescencia, ápice (A), parte media (P.M.) y parte basal (P.B.), fueron colocados los 4 tratamientos antes indicados (Tabla 1), observándose que en los medios de iniciación Mi 1 a Mi 3, los explantes se mantuvieron verdes durante un mes, oxidándose posteriormente.

En el medio medio Mi 4 los tres tipos de explantes usados se mantuvieron verdes durante más tiempo, aproximadamente de 5 a 6 semanas, después de las cuales las partes basales y medias se oxidaron, quedando sólo las ápicales. Se observó únicamente en los nudos un crecimiento, al principio poco definido, que consistió en protuberancias, que después de 7 semanas (Fig. 8 a y b), mostraron ser cuerpos parecidos a protocormos (PLB) de los cuales se desarrollaron hojas (Fig.d.e.f.d y g), para formar posteriormente plántulas que fueron transferidos al medio de enraizamiento (Fig. 8 h e i))



## PRODUCCION DE PLBs Y PLANTULAS.

Se realizó un conteo del número de PLB producidos y de plantas desarrolladas en el Mi 4 a partir de los 120 días de cultivo, encontrándose una relación paralela entre la producción de PLBs y plántulas. (Fig. 9).

## MEDIO DE ENRAIZAMIENTO.

El medio de enraizamiento se determino haciendo una modificación en el medio Mi 4, eliminando el contenido de citocinina. Las raíces se formaron a las cuatro semanas después de haber transferido a dicho medio y ninguna otra modificación probada dio mejores resultados. (Fig. 8 h e i)

## DISCUSION

### A) MÉTODOS DE DESINFESTACION.

Las dos modalidades del procedimiento de desinfestación de explantes florales seguido en este trabajo se basaron en métodos aplicados por otros autores para ese y otros tipos de explante (Sagawa et. al. 1966; Intuwong y Sagawa, 1973; Fast, 1973; Lin, 1986). La fragilidad de la inflorescencia utilizada, todavía en desarrollo únicamente con botones florales, facilitó su limpieza, pero al mismo tiempo hizo pensar en el periodo requerido para lograr la mayor efectividad del desinfectante y la susceptibilidad del tejido a la acción del agente desinfectante, lo que motivó a la elección de un tratamiento usando concentraciones gradualmente menores del desinfectante durante unos 16 minutos (Método 1. Fig. 2,3 y 4) y otro sometiendo el tejido al efecto de una sola concentración por 10 minutos.

Este último método permitió claramente la sobrevivencia de mayor numero de explantes (Fig. 5) por más de cuatro semanas necesarias para mostrar las primeras respuestas manifestadas por una hinchazón del tejido y no afectó el estado ni la respuesta de las porciones más jóvenes ubicadas en el ápice de la inflorescencia, las que coinciden con la literatura como las de uso más conveniente, como se ha determinado para otros géneros. (Lin, 1986; Fast, 1973; Intuwong y Sagawa, 1973; Ichihashi, 1992)

### B) PARTES DE INFLORESCENCIA.

Se utilizaron inflorescencias jóvenes aproximadamente de 2 meses de desarrollo y una longitud de 30 a 60 cm, mostrando el desarrollo de los primeros botones florales (Fig. 1). Dado que el material empleado fue colectado directamente del campo, se procuró que al grado de desarrollo de la inflorescencia fuera el mismo en general. Las porciones utilizadas fueron los nudos y entrenudos de las regiones ápical, media y basal de las inflorescencias. Únicamente los nudos de la región ápical respondieron produciendo cuerpos parecidos a protocormos (PLB) al cabo de 12 semanas (Fig. 8 c y e).

En pruebas preliminares también se utilizaron inflorescencias en un desarrollo terminal mostrando flores en antesis y algunos botones florales e incluso con flores a termino, marchitas o sin ellas, de las que se ocuparon nudos y entrenudos de las

regiones ya citadas anteriormente. Es interesante indicar que en este tipo de inflorescencias los nudos y entrenudos de la región apical permanecieron verdes 6 semanas, siendo los primeros los que llegaron a engrosarse en algunos casos, para mostrar finalmente, dificultades para su sobrevivencia.

Las inflorescencias en desarrollo, los nudos y entrenudos de las regiones medias y basales resultaron difíciles de mantener y se oxidaron (Fig. 6).

Lo anterior concuerda con hallazgos de autores que coinciden en señalar que las porciones jóvenes de la inflorescencia son más fáciles de descontaminar en tanto que las más viejas son más difíciles y representan riesgos mayores de contaminación (Zimmer, 1978, citado por Ichihashi, 1992). Es posible que la oxidación que significó otro inconveniente importante en este trabajo, después de la aplicación de los métodos de desinfestación 1 y del 2, pudiera eliminarse ó reducirse utilizando inflorescencias aún más jóvenes que las que se usaron. Fast(1973) e Ichihashi (1992), emplearon porciones de inflorescencia con yemas todavía latentes, las inflorescencias de *Phalaenopsis* utilizadas por Ichihashi fueron jóvenes no mayores de 15 cm. de longitud. Nuevas pruebas podrían evidenciar la ventaja de emplear plantas cultivadas de donde se obtuvieran explantes en etapas tempranas de desarrollo..

### C) MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo fue adaptado de Fast (1973), quien a su vez modificó los medios Knudson C (1946 y Murashige-Skoog (1962) (Arditti y Ernst, 1993). Originalmente la formulación usada por Fast para propagar *Oncidium papilio* incluyó los reguladores ácido naftalenacético (0.5 mg/l) y cinetina (0.05 mg/l). Al no existir relación taxonómica cercana entre *O. papilio* y *O. cavendishianum* se requirió sin embargo adaptar el medio de Fast modificando el tipo de reguladores y sus concentraciones, con base de Jones y Tisserat, debido a la escasa información en la literatura sobre la propagación de otro *Oncidium* a partir de la inflorescencia, parte del esquema de los reguladores se modificaron de las propuestas de Jones y Tisserat (1990) para propagar *in vitro* diferentes géneros, entre ellos *Oncidium*. Más tarde y ya terminada la investigación se localizo el trabajo de Lim-Ho y Lee (1987). Los cuales propagaron *Oncidium ampliatum*, *O. cebolleta*, *O. sphacelatum* e híbridos, utilizando brotes de las inflorescencias. Ellos utilizaron el medio Vacin y Went (1949) con dos auxinas, 0.5 mg/l de 2,4-D y 2 mg/l de BA y con 0.5 mg/l de ANA, observando ellos la formación de plantulas, masas de callos y la de PLBs.

Estos trabajos parecen fundamentar la necesidad de utilizar reguladores del crecimiento en concentraciones variables para obtener las respuestas esperadas. Solo se encontró un solo reporte en la literatura de la producción de brotes múltiples en explantes de la inflorescencia de *Oncidium o'brienianum* trabajo que fue realizado por Stewart y Botton (1976) utilizando el medio Lindeman.

#### D) PRODUCCION DE CUERPOS PARECIDOS A PROTOCORMOS Y FORMACION DE PLANTULAS.

Después de 8 semanas de cultivo, las porciones de los nudos de las regiones ápicales del tratamiento 2 mostraron un engrosamiento (hinchamiento) al cabo de 12 semanas (Fig. 8 b y c). La superficie de estos crecimientos se noto a partir de este momento un tanto granulosa y para las 16 semanas , aparecieron pequeños cuerpecillos esféricos con desarrollo muy similar al de los protocormos derivados de semillas, estos son los denominados PLBs. En forma posterior a las 20 semanas los protocormos comenzaron a producir hojas, a las 24 semanas iniciaron la formación de plántulas y a las 28 semanas constituyeron plántulas definidas, pero sin tener raíz (Fig. 8 d, e, f, g, h e i).

Estos resultados son muy similares a los reportados en la literatura con otros géneros como *Phalaenopsis* (Lin ,1987), *Cymbidium* (Wang 1988,Sagawa 1966),

El método es muy confiable pues habré la posibilidad de propagar otros *Oncidium* de la Sección Plurituberculata y de otras secciones del género.

Se realizaron pruebas con un híbrido que se llama *Oncidium Gomez Ramsey* el cuál tuvo la misma respuesta con la producción de PLB . Observandose que hay una estabilidad del número cromosómico, aparentemente no afecta la variabilidad del tejido.

#### E) MEDIO DE ENRAIZAMIENTO.

La concentración de auxina requerida para la formación de raíz en las plántulas derivadas de PLBs se determino a través de pruebas con la variación contenida en los tratamientos Mi 1 a Mi 4 y se basó en el uso de ANA como regulador citado en la bibliografía ( Wang, 1988; Fast, 1973; Lim-Ho y Lee,1987).

## CONCLUSIONES

- La desinfestación realizada en *Oncidium cavendishianum* en concentraciones relativamente bajas de hipoclorito de sodio y por tiempo prolongado causa oxidación por lo que se recomienda buscar una concentración que no dañe a la inflorescencia, pues esta presenta la característica de ser lisa y carnosa .
- Las porciones ápicales de la inflorescencia joven son las idóneas para propagar *O. cavendishianum*.
- El medio Mi 4 con modificaciones permite la propagación *in vitro* a partir de los nudos ápicales de la inflorescencia y de su enraizamiento.
- El mismo medio Mi 4 solo con la adición de ácido naftalenácetico permite el enraizamiento de la plántula.
- El Mi 4 empleado abre la posibilidad para la micropropagación de otros géneros de orquídeas a partir de explantes de la inflorescencia y no se sacrifica yemas o brotes principales.

APENDICE 1

PARTE MEDIO	APICAL		PARTE MEDIA		PARTE BASAL	
	nudo	entrenudo	nudo	entrenudo	nudo	entrenudo
Mi 1	8	5	6	10	0	4
Mi 2	8	6	5	0	0	0
Mi 3	3	6	3	7	1	11
Mi 4	2	4	2	4	0	0

Tabla 3.- Número de explantes oxidados al mes de cultivo usando el método de desinfección 1

PARTE MEDIO	APICAL		PARTE MEDIA		PARTE BASAL	
	nudo	entrenudo	nudo	entrenudo	nudo	entrenudo
Mi 1	1	1	0	2	0	0
Mi 2	1	1	1	1	0	0
Mi 3	0	0	4	5	0	0
Mi 4	3	1	2	2	0	0

TABLA 4.- Número de explantes verdes al mes de cultivo usando el método de desinfección 1

PARTE MEDIO	APICAL		PARTE MEDIA		PARTE BASAL	
	nudo	entrenudo	nudo	entrenudo	nudo	entrenudo
Mi 1	3	3	3	0	0	0
Mi 2	3	2	0	0	0	0
Mi 3	2	1	0	0	1	9
Mi 4	1	0	1	6	0	0

TABLA 5.- Número de explantes contaminados por bacterias u hongos con el método de desinfección 1.

PARTE	APICAL		PARTE MEDIA		PARTE BASAL	
	nudo	entrenado	nudo	entrenado	nudo	entrenado
<b>MEDIO</b>						
Mi 1	10	2	3	11	0	0
Mi 2	13	7	2	11	0	0
Mi 3	17	6	2	12	0	0
Mi 4	18	3	2	29	0	0

TABLA 6.- Número de explantes verdes con el método de desinfección 2 al mes de cultivo.

	PARTE APICAL		PARTE MEDIA		PARTE BASAL	
	nudo	entrenado	nudo	entrenado	nudo	entrenado
<b>MEDIO</b>						
Mi 1	12	14	1	18	3	11
Mi 2	2	7	7	16	6	9
Mi 3	5	9	1	12	4	18
Mi 4	5	7	4	26	5	16

TABLA 7.- Número de oxidados con el método de desinfección 2 al mes de cultivo

	PARTE APICAL		PARTE MEDIA		PARTE BASAL	
	nudo	entrenado	nudo	entrenado	nudo	entrenado
<b>MEDIO</b>						
Mi 1	15	10	2	12	1	3
Mi 2	17	1	4	23	0	4
Mi 3	3	1	5	19	0	4
Mi 4	0	2	4	8	0	11

TABLA 8.- Número de explantes contaminados con el método de desinfección 2 al mes de cultivo, tanto bacterias como hongos

## APENDICE 2

Medio Murashige-Skoog modificado para el cultivo de *Oncidium* (Fast, 1973).

<u>Sales</u>	mg./litro.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1650.0
KNO <sub>3</sub>	1900.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440.0
Fe <sup>2+</sup> -EDTA	25.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7.0
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.01
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.03
AlCl <sub>3</sub>	0.03
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.03
KI	0.01
<u>Vitaminas</u>	
Acido nicotínico	1.0
Tiamina	0.5
Peridoxina	0.5
Sacarosa	20 g/lit
Agar	8 g/lit

Ajustando finalmente el pH de 5.0 - 5.5 (antes de agregar el agar)



## REFERENCIAS

- 1.-Arditti, J.1977. Clonal propagation of Orchids by means of tissue culture -A manual - In Orchid Biology, Reviews and Perspectives. Ed. J. Arditti, Conrwell University Press. N. Y.
- 2.- Arditti, J. y R. Ernst. 1993. Micropropagation of Orchids. Ed. John Wiley .pp. 69-75.
- 3.- Ball, A.E., J. Arditti y D.M. Reisinger. 1977. Cultivo de yemas del escapo floral ; Un método para la propagación vegetativa de *Phalaenopsis* . ORQUIDEA (Méx.) 5(8) :
- 4.- Churchill, M.E., J. Arditti y E.E. Ball.1975. Clonal propagation of Orchids from leaf tips. Amer. Orchd. Soc. Bull. Feb. Reproducido en ORQUIDEA. Méx. - (10):269-300.
- 5.- Dodds, J. H. y L.W. Roberts .1986. Isolation purification, and culture of protoplast. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. N.Y. pp:133-143.
- 6.- Dodds, J.H. y L.W. Roberts. 1986. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University and Press N.Y. pp. 74-75.
- 7- Dressler, R. L. y G.E. Pollard.1974. El género *Encyclia* en México. Ed. A.M.O. México. 151 pp.
- 8.- Dressler, R. L.1981. The Orchids. Natural History and classification. Harvard University Press Cambridge. Massachussets.
- 9.- Dressler, L.R. y H.N. Williams.1973. El complejo *Oncidium-confusum*. ORQUIDEA. Méx. 4(1): 333-334.
- 10.- Dressler, R.L. y H.N. Williams.1982. TAXON. Vol. 34 (4): 661.
- 11.- Dressler, R.L. y H.N. Williams 1983. TAXON. Vol. 31 (4):725-754.
- 12.- Dugger, B.R. 1977. *Odontoglossum*. Hybridizing for the future. Amer.Orchd. Soc. Bull. Vol. ( ) :
- 13.- Fast,G. 1973. Die Vermehrung von *Oncidium papilio* durch triebspitzen-Kultur und Besprechung einiger Nahmedian. Die Orchidee . 24 : 240-246.
- 14.- Gamborg O.C. et. al. 1976 . Plant Tissue Culture media . IN VITRO (7) . 473-478.
- 15.- Garay, A.L. y J.E. Stacy. 1974 . Synopsis of the genus *Oncidium* . BRADEA. Vol. 1 (40) . 193-424.

- 16.- Hamer , F. 1974. Las Orquídeas del Salvador. Vol. III. Derechos de Publicaciones del Ministerio de Publicaciones del Salvador.
- 17.- Harrison, Ch.R. y J. Arditti . 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* ( ORCHIDACEAE ). Bot. Gaz. 132 ( 2) : 180-189.
- 18.- Hurtado , V.M.D. y M.M.E. Merino . 1987 . Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. pp. 170-175.
- 19.- Ichihashi , S. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks . Lindelyana 7(4): 208-215.
- 20.- Intuwong, O. y Y. Sagawa. 1973 . Clonal Propagation Orchids by aseptic culture of Inflorescences. Amer. Orchd. Soc. Bull. 42 : 209-215.
- 21.- Intuwong, O. y Y. Sagawa. 1974. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture. Amer. Orchd. Soc. Bull. October. Vol. 43. No. 10: 893-895. ,
- 22.- Jones, D. y B. Tisserat. 1990. Clonal Propagation of Orchids the methods in molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture. Vol. 6. Ed. J.W. Pollard y J.M. Walker. pp. 181-191.
- 23.- Kerbaux, G.B. 1993. The Effects of sucrose and agar on the formation of protocorm-lik bodies in recalcitrant root tip meristems of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae). Lindleyana 8 (3) : 149-154.
- 24.- Kim , K., J.T. y Y. Sagawa 1970. Amer. Orchid Soc. Bull. 88: 1077-1080.
- 25.- Konar , R.N. y S. Kitchule. 1982. Flower culture. Experimental Embriology of vascular plants. Ed. B.M. Johri. Sringer- Verlag N.Y. pp: 53-78.
- 26.- Kotomori y T. Murashige. 1965. Some Aspects of Aseptic propagation of Orchid. Amer. Orchd. Soc. Bull. 34: 484-489.
- 27.- Lejarazo, C.A. 1991. Estudios sobre la inducción y desarrollo del cultivo de callos de *Vanilla planifolia* para la producción de vainilla. Tesis. E.N.E.P.I. U.N.A.M. México.
- 28.- Lim-Ho, C.L. y G.C. Lee.1987. Clonal Propagation of *Oncidium* through flower-stalk buds. In: Micropropagation of Orchid. In Arditti J. and Ernst R.1992. Ed. Wiley Jhon N.Y. pp: 682.
- 29.- Lin, Chin-chi.1986. *In vitro* culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Lindleyana (3):158-163.
- 30.- Lin, Chin-chi. 1987. Histological observations on *in vitro* formation of protocorm-like bodies from flower stalk internodes of *Phalaenopsis*. Lindleyana. 2(1): 58-65.

- 31.- Luna, R.B.S.1982. Propagación *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* var *alba* . Tesis. Fac. de Ciencias . U.N.A.M.
- 32.- Mosich, S.K., E.A. Ball y J. Arditti.1973. Propagación clonal de *Dendrobium* por medio del cultivo de nodos. ORQUIDEA. Nov.Méx. (8).244-255.
- 33.- Murashige, T. 1974. Plant Propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:136-166.
- 34.- Murashige , T. y F Skoog.1962. A revised Medium for rapid Growth and Bio-Assays with tabaco tissue cultures,. Physiologia Plantarum. Vol. 15 : 473-497.
- 35.- Peakall, R. y S.H. James.1989. Chromosome numbers of some Australian terrestrial Orchids. Lindleyana. 4(2): 85-88.
- 36.- Radford, Dickinson,Massey y Beli 1974. Vascular Plant Systematics.Ed. Harper and Row.pp. 246-258.
- 37.- Rubluo, A., V. Chávez, A.P. Martinez & O. Martinez. 1993. Strategies for the recover of endangered Orchids and cacti through *in vitro* culture. Biological Conservation. No. 63: 163-169.
- 38.- Sagawa Y., T. Shojit and T. Shojit.1966. Clonal Propagation of *Cymbidium*s through shoot meristem culture. Amer. Orchd. Soc. Bull. Vol. ( ): 118-122.
- 39.- Scully, R.M.1966. Stem Propagation of *Phalaenopsis*. Amer. Orchd. Soc. Bull. Vol. 35 :40-42
- 40.- Stepa-Sarkisian, G. Selection of media for tissue and cell culture. En: Methods in molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture. Vol. 6 Ed. J.W. Pollard y J.M. Walker. The Human Press
- 41.- Soto, M.A. 1988. Listado actualizado de las Orquídeas de México ORQUIDEA (Méx.) 11: 233-273.
- 42.- Stewart J. y J. Bolton .1976. Rapid vegetative O'brienuanum *in vitro* and in the green house. Amer.Soc. Bull. Vol. 45 No. 10 pp: 922-930.
- 43.- Stewart, J. 1989. Orchid propagation by tissue culture techniques past, present and future. Moderan Metidos in Orchid Conservación. He role of Physiology, Ecology and Management. Ed. H.W. Prit Cherd. University of Cambridge.
- 44.- Tanaka R y H. Kamemoto. 1984. Chromosomes in Orchids: Counting and Numbers. Orchid Biology Reviews and Perspectives. Ed. Arditti J. Cornwell University Press. New York.pp: 325-330.
- 45.- Thompson P.A. 1977. Orchids from seed. Royal Botanic Gardens Kew. Londres. pp.23

- 46.- Wang, X. 1988. Tissue Culture of *Cymbidiums* :plant and flower induction *in vitro*. Lindleyana 3(4): 184-189.
- 47.- Weaver, P.J. 1972 Plant Growth substances in agriculture. Rd. W.H. Freeman and Co. San Francisco.
- 48.- Wiard, L. 1987. An introduction to the Orchids of México. C.P.A. Londres.
- 49.- Williams, L.O. 1965. The Orchidaceae of México. Escuela Agricola Panamericana. Honduras, Honduras.
- 50.- Wilfret, G.J. 1966. Formation of protocorm-like bodies on Excised *Cymbidium* shoot tips. Amer. Orchd.Soc. Bull. Vol. 35. No. 10:823-827 .
- 51.- Yam T.W. & M.A. Weatherhead. 1990. Nodal culture of some native orchids of Hong Kong. Lindleyana. 5(4): 218-223.