

## Germinación y regeneración *In Vitro* de *Epidendrum falcatum* LINDL

SANTIAGO-JERÓNIMO, Tomasita, CARBALLAR-HERNÁNDEZ, Santos y CHÁVEZ-ÁVILA, Víctor Manuel

T. Santiago´, S. Carballar´´ y V. Chávez´´

´ Instituto de Estudios Ambientales, Universidad de la Sierra Juárez. Avenida Universidad s/n, 68725. Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México.

´´ Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Jardín Botánico del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510. México, D.F.  
rosa\_jmo@hotmail.com

E. Figueroa, L. Godínez, F. Pérez (eds.) Ciencias de la Biología y Agronomía. Handbook T-I. -©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2015.

## Abstract

Diverse human activities, such as forest fires and illegal logging, coupled with collector's demand that promote illegal plunder of seeds and plants of *Epidendrum falcatum* have provoked a strong deterioration in the number of wild populations of this orchid species. *In vitro* propagation is a tool that allows us to study short and long term plant vulnerability to extinction. The aim of the present work was to establish an *in vitro* protocol for germination and regeneration of *E. falcatum*. Seeds were used as explants and cultivated in 50 % Murashige and Skoog (MS) medium added with different concentrations of organic compounds. The best response of germination (100%) was obtained with a treatment of 10% coconut water. Furthermore, treatment supplemented with 10% banana pulp had the highest regeneration capacity with a higher average number of PLB's. This study represents a successful biotechnological method for *in vitro* regeneration and allows a permanent acquisition of specimens for their study, conservation and use, thus reducing the exploitation of their natural populations.

## 16 Introducción

La familia Orchidaceae es la más rica en especies dentro de las monocotiledóneas, con un estimado de 25 000. Esta familia, es cosmopolita y alcanza su mayor diversidad en las regiones tropicales. Las orquídeas son culturalmente importantes en muchas regiones del mundo, la belleza de sus flores ha sido apreciada desde tiempos antiguos y actualmente tienen un lugar muy importante en el comercio de plantas ornamentales y de flor de corte (Hágsater, 1978; Soto y Salazar, 2004). Sin embargo, estas plantas, son de difícil reproducción natural; los periodos para su establecimiento, desarrollo y floración, son largos, por lo menos de cinco años (Francisco et al., 2011). Esto junto con la destrucción y transformación de sus hábitats, el tráfico ilegal de las especies, la depredación de ejemplares y el crecimiento urbano, han originado que un gran número de especies se encuentren amenazadas y otras en peligro de extinción (Soto y Salazar, 2004; Hágsater et al., 2005; Ávila y Salgado, 2006).

Debido a la presión antropogénica a la que están sometidas las orquídeas y a la dificultad que presentan sus semillas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación y propagación *in vitro* (Yam y Arditti, 2009; Arditti, 2010; Francisco et al., 2011). Con estas técnicas, se puede disminuir el tiempo de regeneración e incrementar las poblaciones produciendo de manera continua ejemplares de calidad, para reducir el saqueo de especies de sus hábitats naturales (Ávila y Salgado, 2006; Yam y Arditti, 2009). No obstante, es elemental realizar estudios relacionados con su capacidad de germinación y regeneración, pues se ha observado que cada especie tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar, por lo que hay que investigar cuales son las condiciones adecuadas para la propagación cada una de ellas (Flores et al., 2008; 2011; Francisco et al., 2011; Ruiz et al., 2008).

En la actualidad, se han desarrollado estudios encaminados a definir los medios de cultivo más idóneos para propagar orquídeas (Damon et al., 2004; Aktar et al., 2008; Ruiz et al., 2008). Además, se ha probado el empleo de compuestos orgánicos para hacer más eficiente la germinación en diferentes especies de orquídeas (Mineá et al., 2004; Arias et al., 2006; Moreno y Menchaca, 2007; Flores et al., 2008; 2011; Kaur y Bhutani, 2012). Aunque se ha generado mucha información sobre la propagación de orquídeas terrestres raras y en peligro de extinción, se sabe poco de la propagación de la gran mayoría de las orquídeas que son epífitas y litófitas, como *Epidendrum falcatum* (Damon et al., 2004). Por lo tanto, en esta investigación se establecieron las condiciones de cultivo *in vitro* para germinar y regenerar a *E. falcatum*, a partir de semillas.

## 16.1 Materiales y métodos

**Material biológico.** Las semillas de *E. falcatum* que se utilizaron para la germinación provenían de una cápsula indehisciente que se obtuvo de la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) “Campamento de las Flores”, ubicada en la comunidad de Santa María Jaltianguis, Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Después de haber cortado la cápsula de la planta madre, se colocó en una bolsa de papel estraza y se conservó 17 días hasta su utilización.

**Diseño experimental.** Para conocer el efecto de los compuestos orgánicos sobre la germinación de las semillas de *E. falcatum*, se estableció un diseño factorial (2 x 3) completamente al azar con dos factores, el primer factor tuvo dos niveles con diferentes compuestos orgánicos, mientras que el segundo tuvo tres niveles con diferentes concentraciones de compuestos orgánicos más un testigo que contenía solo medio MS basal para un total de siete tratamientos. Se hicieron cinco repeticiones de cada tratamiento para un total de 35 unidades experimentales (frascos).

**Medio de cultivo.** El medio de cultivo utilizado fue MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado a 50 % de los macronutrientes, 100 % de los micronutrientes más la adición compuestos orgánicos (agua de coco y pulpa de plátano) a distintas concentraciones. Para tener concentraciones de 10, 20 y 30 % de cada uno de los complejos orgánicos, se agregó 100, 200 y 300 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco al medio MS basal. En el caso del plátano, se adicionó 100, 200 y 300 g L<sup>-1</sup> de pulpa de plátano al medio. A todos los medios de cultivo se les ajustó el pH a 5.7, posteriormente, se les agregó 4 g L<sup>-1</sup> de gelrite y se esterilizaron en un autoclave durante 17 minutos (Moreno y Menchaca, 2007).

**Desinfección del material biológico.** La cápsula se sumergió en una solución jabonosa por un minuto bajo agitación constante, se enjuagó con agua destilada, y posteriormente en condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar, se realizaron enjuagues en alcohol a 70 % y se flameó; este último proceso se repitió tres veces (Ruiz et al., 2008).

**Efecto de los compuestos orgánicos sobre la germinación de *E. falcatum*.** Una vez desinfectada la cápsula, en una caja de Petri previamente esterilizada, se le realizó un corte longitudinal dividiéndola en dos partes iguales, para liberar las semillas de su interior; posteriormente, con la ayuda de una espátula esterilizada; se pasaron las semillas a una caja de Petri y con la misma espátula se tomó una pequeña cantidad de éstas y se dispersaron uniformemente en los medios de cultivo de los siete tratamientos establecidos. Todos los tratamientos se mantuvieron en un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas oscuridad (McKendrick, 2000).

Después de 40 días de iniciado el cultivo de las semillas de *E. falcatum*, se determinó el porcentaje de germinación de manera cualitativa, considerando los cambios visibles y al microscopio estereoscópico, en escalas de tiempo indefinidas, tomando como semillas germinadas aquellas cuyo embrión emergió de la cubierta seminal. El porcentaje de germinación se determinó de acuerdo con el área ocupada por las semillas germinadas en cada unidad experimental y promediada por el total de las repeticiones de cada tratamiento (McKendrick, 2000; Ruiz et al., 2008).

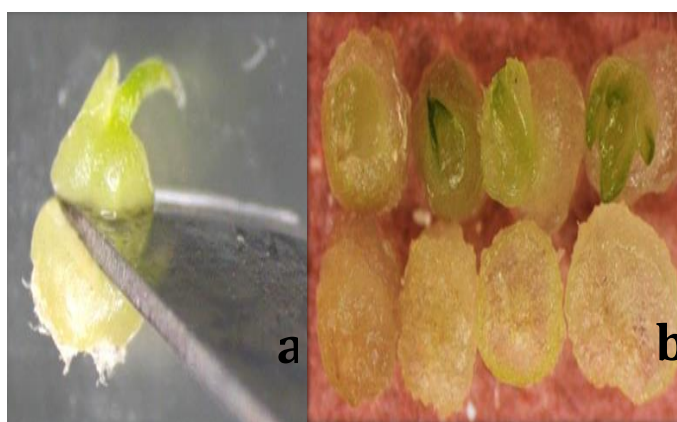
**Efecto de los compuestos orgánicos sobre la respuesta morfogénica de *E. falcatum*.** Se estableció un diseño factorial (2x3x3) completamente al azar, con tres factores, el primero tuvo dos niveles con diferentes compuestos orgánicos, mientras que el segundo tuvo tres niveles con diferentes concentraciones y el tercero con tres niveles con diferentes explantes para un total de 21 tratamientos, incluyendo tres controles.

Los controles consistieron de medio MS basal y los diferentes explantes. Para cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones, con lo que se tuvieron 105 unidades experimentales.

En los 21 tratamientos, se ensayaron protocormos cigóticos completos y secciones ecuatoriales de éstos, para lo cual, fue necesario seleccionar protocormos que presentaban primordios foliares y rizoides (Figura 16a). En una campana de flujo laminar bajo condiciones de asepsia, se seleccionaron 350 protocormos; 175 fueron diseccionados ecuatorialmente (Figura 16.b) obteniéndose 525 explantes, de los cuales 175 fueron completos, 175 porciones apicales y 175 basales. Se colocaron cinco explantes en cada uno de los 21 tratamientos que contenían medio MS modificado y solidificado con 4 g/l de gelrite a un pH de 5.7. Todos los tratamientos fueron mantenidos en un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas oscuridad. De los 525 explantes que se utilizaron en este experimento se determinó la formación de cuerpos parecidos a protocormos o PLB's (Protocorm like bodies) por explante. Considerando como PLB s todas las estructuras formadas.

**Análisis estadístico.** Para saber si existían diferencias significativas entre los tratamientos de los experimentos establecidos, se realizó un análisis de varianza factorial y para contrastar los valores promedio se empleó la prueba de Tukey. Estos análisis se llevaron a cabo con el programa STATISTICA versión 8.0 (STATSOFT, INC. 1996). Previo al análisis estadístico, los datos porcentuales se transformaron aplicándoles la función arcoseno.

**Figura 16** a) Protocormo con primordios foliares y rizoides y b) secciones apicales y basales de los protocormos

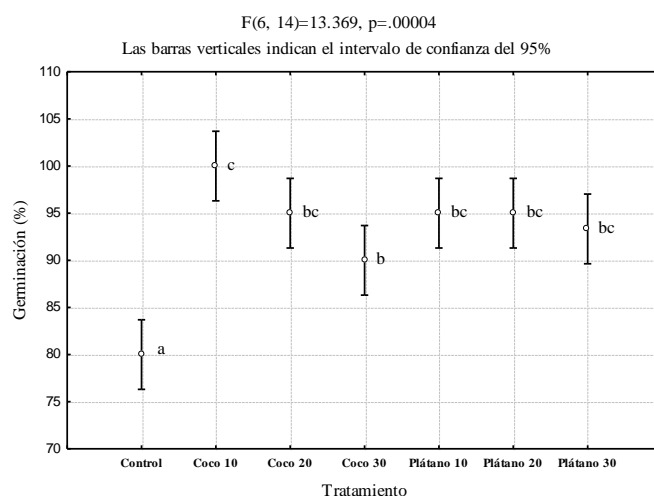


## 16.2 Resultados

**Efecto de los compuestos orgánicos en la germinación de *E. falcatum*.** Después de realizada la siembra de las semillas se observaron cambios en la coloración, pasando por diferentes tonalidades, comenzando por el blanco-amarillento, amarillo, verde-amarillento y verde. También se apreció una hidratación y aumento de tamaño de las semillas, así como la ruptura de la testa seminal que dio lugar a la formación de estructuras esféricas de color verde, denominadas protocormos, evidenciándose la germinación.

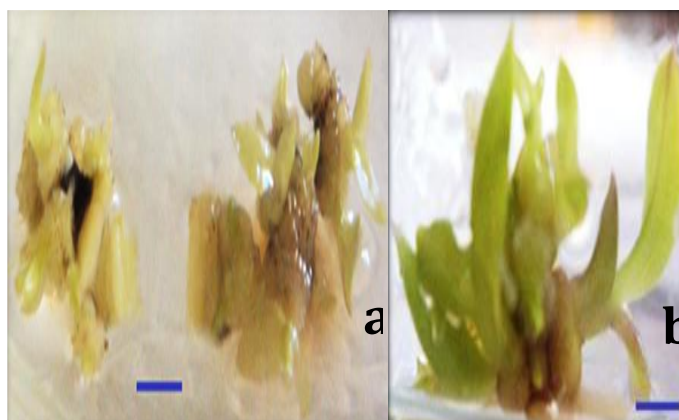
La germinación de *E. falcatum* se logró después de 35 días de iniciados los cultivos y se observó que el tipo de complejo orgánico y las diferentes concentraciones usadas tuvieron un efecto altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ) sobre el porcentaje de germinación, el cual varió desde 80 hasta 100 %. El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento que contenía medio MS basal con agua de coco al 10% y el menor en el tratamiento control que solo contenía MS basal.

**Figura 16.1** Efecto de los complejos orgánicos sobre la germinación *in vitro* de *E. falcatum*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ( $p \leq 0.01$ ) por la prueba de Tukey



**Efecto de los compuestos orgánicos sobre la respuesta morfogénica de *E. falcatum*.** En algunos casos los protocormos completos y las fracciones no respondieron favorablemente a la posición a la que se colocaron en el medio de cultivo, ya que en algunos explantes se evidenció deshidratación y oxidación. Hasta 40 a 45 días después de haber colocado los explantes se empezaron a manifestar cambios en el crecimiento como respuesta a los diferentes tratamientos. El primer cambio perceptible fue un aumento de tamaño, la región en donde se comenzó a apreciar un crecimiento celular fue la parte basal del explante mismo que estaba hidratado con una apariencia succulenta. Posteriormente se observó una apariencia nodular en la base del explante, a los 50 a 60 días, los nódulos formados mostraron un cambio en su tamaño y morfología, éstos comenzaron a adquirir una forma redonda semejante a la de un protocormo, denominándose a las estructuras formadas cuerpos parecidos a protocormos o PLB's (protocorm like bodies), que surgieron de manera directa del explante (Figura 16.2a). A los 80 a 90 días ya era evidente el crecimiento de los PLB's formados, éstos se alargaron y desarrollaron más hojas, con longitudes muy variables (Figura 16.2b).

**Figura 16.2** a) Respuesta morfogénica de *E. falcatum* obtenida a partir del cultivo *in vitro* de secciones basales de protocormos y b) PLB's formados a partir de un explante basal. Barra = 1 cm



El número promedio de PLB's generados por explante varió entre 0.44 y 8.8. Al analizar el efecto de los complejos orgánicos y las diferentes concentraciones sobre la respuesta morfogénica de las secciones apicales, basales y protocormos completos, se observaron diferencias altamente significativas en los tratamientos ( $p \leq 0.01$ ). El tratamiento que contenía pulpa de plátano al 10% en la sección basal presentó el mayor número promedio de PLB's, seguido del tratamiento con MS adicionado con agua de coco al 10% en la sección basal, con un promedio de 8.8 y 8.0 PLB's por explante respectivamente. El tratamiento que presentó el menor número promedio de PLB's por explante fue el que presentaba MS adicionado con plátano al 30% en la sección basal. Durante el transcurso de ocho meses, tiempo que duró el experimento para la evaluación de la respuesta morfogénica, se obtuvieron 1 247 plantas completas a partir de los 525 explantes utilizados inicialmente.

### 16.3 Discusión

**Efecto de los compuestos orgánicos en la germinación de *E. falcatum*.** El porcentaje de germinación promedio varió de 80% hasta el 100% y con diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 17.1). Estos resultados son similares a los encontrados por Moreno y Menchaca (2007), quienes reportan un porcentaje de germinación de 90 % para *Sthanopea tigrina*. Además, son más altos que los encontrados por Flores et al. (2008 y 2011) quienes reportan un porcentaje de germinación de 48 y 57 % para las especies *Oncidium stramineum* y *Brassia verrucosa*, respectivamente. La alta germinación obtenida en el presente estudio pudo deberse a que los complejos orgánicos presentan contenidos de nutrientes (Arditti y Ernest, 1993), como nitrógeno y potasio, que ayudan a la germinación de las semillas (Kauth et al., 2008). Además, este resultado indica que la mayoría de las semillas se formaron completamente y presentaban embriones viables.

Agregar extractos orgánicos al medio de cultivo para la germinación de las semillas de *E. falcatum* resultó positivo, pues se obtuvo un porcentaje de germinación significativamente mayor en el tratamiento que contenía agua de coco a 10 %. Resultados similares fueron hallados por Salazar (2012), quien obtuvo el mejor porcentaje de germinación de *Cattleya mendelii* en el medio de cultivo MS con 200 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco. También concuerda con lo reportado por Ruiz et al. (2008) para la germinación *in vitro* de *Encyclia adenocaula*, utilizando diferentes medios de cultivo y compuestos orgánicos.

El alto porcentaje de germinación obtenido en el tratamiento con agua de coco a 10 %, puede explicarse porque a esta concentración se tiene un contenido de azúcares, aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento vegetal adecuados para la germinación (Arditti y Ernest, 1993; Arias et al., 2006). Aunado a esto, se ha observado que en algunas orquídeas, particularmente las epífitas y litófitas, el proceso de germinación puede ser afectado de manera negativa a altas concentraciones de compuestos orgánicos, ya que generalmente viven en hábitats con deficiencia de nutrientes (Damon et al., 2004; Flores et al., 2008).

En este trabajo se muestra que los compuestos orgánicos, particularmente a bajas concentraciones, estimulan la germinación de las semillas de *E. falcatum*. Además, indica que las semillas son un explante conveniente a emplear para iniciar el cultivo *in vitro*, pues a partir de su germinación se logra la obtención de plántulas libres de agentes patógenos y se conserva e incrementa de forma natural la variabilidad genética de las plantas (Ruiz et al., 2008). Una de las ventajas de agregar complejos orgánicos al medio de cultivo es su bajo costo, comparado con el de los reguladores de crecimiento, como las auxinas y las citocininas que se utilizan de manera frecuente en la germinación de las orquídeas (Moreno y Menchaca, 2007).

Sin embargo, se desconoce su composición química exacta y, por la fuente de los compuestos orgánicos, las subsecuentes aplicaciones propiciarían una variabilidad de los resultados. No obstante, los beneficios han demostrado que su aplicación es recomendable, pues algún factor desconocido resulta benéfico para las orquídeas (Minea et al., 2004; Arias et al., 2006; Flores et al., 2008; 2011; Kaur y Bhutani, 2012).

**Efecto de los compuestos orgánicos sobre la respuesta morfogénica de *E. falcatum*.** En las orquídeas, después del proceso de germinación se forma una masa de células con una alta totipotencialidad llamada protocormo, el cual puede diferenciarse en una plántula o formar cuerpos parecidos a protocormos (PLB's). El protocormo se diferencia en una región apical, que consiste en pequeñas células que forman el ápice de brote y la parte basal formada por células grandes parenquimatosas que funcionan como un depósito orgánico (Fehér et al., 2003). En la propagación vegetativa intensiva de orquídeas, los PLB's formados a partir de protocormos completos o secciones apicales y basales son los explantes de mayor demanda debido a su rápido desarrollo *in vitro*; además, se tiene la certeza de la semejanza fenotípica con los progenitores (Sagawa, 1991). Esta ventaja está basada en el hecho de que los protocormos adventicios y en este caso los PLB's corresponden realmente a embriones somáticos generados por los embriones cigóticos procedentes de las semillas. La condición meristemática de las células de estos embriones cigóticos donde existe un estricto control en la división celular asegura no solo la semejanza fenotípica sino también la genotípica, aunado a la citada capacidad de propagación rápida, intensa e ilimitada.

En esta investigación la respuesta morfogénica obtenida a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos, resultó ser diferencial dependiendo de la región del protocormo de que se trate. El número promedio de PLB's generados por explante osciló entre 0.44 y 8.8. Al analizar el efecto de los complejos orgánicos y las diferentes concentraciones sobre la respuesta morfogénica de las secciones apicales, basales y protocormos completos, se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre los tratamientos. La mayor cantidad de PLB's se obtuvo en las secciones basales de los protocormos a una concentración de 10% para ambos complejos orgánicos (agua de coco y pulpa de plátano). Resultados similares reportó Suárez (2006) en la regeneración de *Euchile mariae*; ya que, obtuvo la mayor formación de PLB's a partir de las secciones basales de los protocormos, con un promedio de  $11.4 \pm 9.64$  PLB's por explante. Así mismo, Francisco (2011) en *Trichocentrum carthagenense* encontró que el número de PLB's generados es mayor en la sección basal de los protocormos. Estos resultados se pueden explicar considerando la diferenciación celular y dominancia apical. Hacia el ápice existe una mayor diferenciación celular de los tejidos que conforman al protocormo, puesto que en esta zona se forma el primer meristemo apical del brote (Taiz y Zeiger, 2006). Sin embargo, como se trata de una región de crecimiento activo es probable que no permita la formación de otros centros meristemáticos o de otras yemas laterales. Por otro lado, hacia la base del protocormo el tejido se encuentra menos diferenciado y por lo tanto presenta una mayor capacidad morfogénica (García et al., 2006).

Actualmente se sabe que el potencial de regeneración de explantes de protocormos (en términos de porcentaje de regeneración, número promedio de PLB y brotes producidos por explante) es fuertemente influenciado por la calidad y cantidad de suplementos orgánicos añadidos al medio (Sinha y Roy, 2004; Aktar et al., 2008; Kaur y Bhutani, 2012). En este trabajo se obtuvo una mayor generación de PLB's en el tratamiento que contenía compuestos orgánicos a concentraciones bajas (10%) comparado con el tratamiento testigz. Esto concuerda con lo reportado por Kaur y Bhutani (2012) quienes encontraron que altas concentraciones de pulpa de plátano y agua de coco resultan perjudiciales para el desarrollo y sobrevivencia de los PLB's de *Cymbidium pendulum*.

Bajas concentraciones de compuesto orgánicos promueven la frecuencia de regeneración, el crecimiento de las partes renovadas, lo que permite que los PLB's generados puedan diferenciarse en brotes y raíces (Kaur y Bhutani, 2012), lo cual puede explicar el haber encontrado un mayor número de PLB's a bajas concentraciones de compuesto orgánicos. Además, se ha observado que el contenido de sacarosa en concentraciones bajas de homogenizado de plátano mejora la regeneración y formación de PLB's en especies del genero *Dendrobium* (Aktar et al., 2008) y aumenta la longitud de los brotes en la orquídea *Vanda teres* (Sinha y Roy, 2004). Por otro lado, el efecto positivo del agua de coco en la generación de PLB's puede estar relacionada con su capacidad de inducir divisiones celulares en las células que no lo harían, por lo tanto, promueve la diferenciación temprana del protocormo. Aunado a esto, se ha observado la presencia de reguladores de crecimiento en el agua de coco (por ejemplo citocinina) que promueven la división y diferenciación celular (Sinha y Roy, 2004; Aktar et al., 2008; Kaur y Bhutani, 2012).

#### 16.4 Conclusiones

El mayor porcentaje de germinación se obtuvo mediante la utilización del medio de cultivo MS modificado más la adición de agua de coco a 10 %.

La mayor formación de PLB's se logró en el tratamiento que contenía MS más pulpa de plátano al 10% en la sección basal.

De los 525 explantes utilizados para evaluar la respuesta morfogénica se regeneraron 1247 plantas completas en los 21 tratamientos evaluados.

El empleo de técnicas de cultivo *in vitro* resultó eficiente para la germinación y regeneración de *E. falcatum*, lo cual proporciona una alternativa para reducir la presión que se ejerce sobre las poblaciones silvestres, contribuyendo de esta manera a su conservación y aprovechamiento sustentable.

#### 16.5 Referencias

Aktar S., Nasiruddin M. and Hossain K. (2008), Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* Orchid. Journal Agricultural Rural Dev. Núm. 1 Vol. 6. pp 69-74.

Arditti J. (2010), Plenary Presentation: History of orchid propagation. Mol. Biol. Biotechnology vol.18. pp. 171-174.

Arditti J, and Ernest R, Micropropagation of orchids, New York, Wiley-Interscience Publication, 1993. 682 pp.

Arias H, Santibáñez R, Rincón R, Ayota T, y Gutiérrez F. (2006), Efecto de agua de coco y homogeneizado de jitomate y plátano sobre el crecimiento de la orquídea *Guarianthe skinnerii*, cultivada *in vitro*. Rev. Ciencia y Tecnología en la Frontera No. 1, Vol. 4, pp. 23-28.

Ávila D. y Salgado R, (2006), Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas para colaborar en su conservación. Rev. Biológicas 8: 138-149.



Damon A, Guerrero A, Rivera L y Nikolaeva V, (2004). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. Revista Chapingo serie Horticultura Vol. 10, pp. 195-203.

Fehér A, Pasternak P and Dudits D, (2003), Transition of somatic plant cells to an embryogenic state, Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol. 74, pp. 201-228.

Flores G, Vásquez G, Colinas M y Mata M, (2011). Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. Revista Chapingo Serie Horticultura Vol. 17, pp. 5-8.

Flores G, Legaria P, Vásquez G y Colinas M, (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo Serie Horticultura, Vol. 14, pp. 347-353.

Francisco J, Jiménez R, Jesús A, Arenas M, Ventura E y Evangelista E, (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. F. generadas *in vitro*. Rev. Polibotánica, Vol. 32, pp. 107-117.

García F, Roselló J, y Santamarina M, Introducción al Funcionamiento de las Plantas. España, Ed. Universidad Politécnica Valencia. 2006. 182 pp.

Hágsater E, (1978), Orquídea. Revista de la Asociación Mexicana de Orquideología, A. C. Vol. 7, pp. 1-56.

Hágsater E, Garcia J, Jiménez R y Sánchez L, Estudio taxonómico-florístico de la familia Orchidaceae en el Bajío: tribus Epidendreae y Maxillariae. Instituto Chinoin, México, 1999. 149 pp.

Hágsater E, Soto M, Salazar A, Jiménez R, López A, y Dressler R. Las orquídeas de México. Instituto Chinoin, México, 2005. 303 pp.

Kaur S. and Bhutani k, (2012), Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. Hort. Sci. Vol. 39, pp. 47-52.

Kauth P, Kane M, Wagner A and Reinhardt C, (2008). Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae): evidence for ecotypic differentiation. Annals of Botany Vol. 102, pp. 783-793.

McKendrick S, Manual para la germinación de orquídeas *in vitro*. Ecuador, Ceiba Foundation for Tropical Conservation. 2000. 17 pp.

Minea M, Piluek C, Menakanit A, and Tantiwivat S, (2004), A study on seed germination and seedling development of *Spathoglottis* Bl. Orchids. Kasetsart J. Nat. Sci. vol. 38, pp. 141-156.

Moreno D, y Menchaca G, (2007), Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). Revista Foresta veracruzana Vol. 9, pp. 27-32.

Murashige T, and Skoog F, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, Vol. 15, pp. 473-497.

Ruiz C, Laguna A, Iglesias L, Damon A, Marín N, Azpíroz R y Moreno M, (2008), Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula*. Revista Internacional de Botánica experimental Vol. 77, pp. 203-215.

Sagawa Y, (1991), "Clonal Propagation of Orchids". Plant Tissue Culture Manual, No.1, Vol. 1, pp. 1-7.

Salazar S, (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). Revista Acta agronómica, vol. 61, pp. 69-78.

Sinha P. and Roy S, (2004). Regeneration of an indigenous Orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. Through *in vitro* culture. Plant Tissue Cult. No. 1, Vol. 14, pp. 55-61.

Solano R, Cruz G, Martínez A y Lagunes L, (2010), Plantas utilizadas en la celebración de semana santa en Zaachila, Oaxaca, México. Revista Polibotánica No. 1, Vol. 29, pp. 263-279.

Soto M, y Salazar A, Orquídeas. En: Biodiversidad de Oaxaca. García A, Ordoñez M y Briones M. (eds.). Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la conservación de la Naturaleza-World wildlife Fund, México. 2004. 271-295 pp.

Suárez I, Regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (Orchidaceae), especie endémica de México. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, 2006. 143 pp.

Taiz L y Zeiger E, Fisiología vegetal. Castelló de la planta: Publicaciones de la Universidad Jaume I. 2006. 187 pp.

Yam T and Arditti J, (2009) History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Plant Biotechnology No. 3 Vol. 1, pp. 1-56.