

# Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación.

Irene Ávila Díaz<sup>1</sup> y R. Salgado-Garciglia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. R, CP 58030, Morelia, Michoacán. MÉXICO. Correo-e: [iavila@oikos.unam.mx](mailto:iavila@oikos.unam.mx)

<sup>2</sup>Lab. de Biotecnología Vegetal, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. B3, CP 58030, Morelia, Michoacán. MÉXICO. Correo-e: [rsalgado@zeus.umich.mx](mailto:rsalgado@zeus.umich.mx)

---

## RESUMEN

La familia Orchidaceae es una de las más diversas, pero también una de las más vulnerables, principalmente por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha estado sujeta. En México 181 especies de orquídeas son consideradas en alguna categoría de riesgo (NOM-059-ECOL-2001). Con el presente estudio se pretende colaborar en la conservación de algunas especies de orquídeas mexicanas a través de generar conocimientos sobre su propagación y conservación *in vitro*. Segmentos de hojas, estructuras tipo protocormos y pseudobulbos de plántulas cultivadas *in vitro* provenientes de semillas, fueron usados como explantes para su multiplicación. El medio Murashige y Skoog (MS) adicionado con concentraciones propias de auxina (ANA), citocinina (BA) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) fue utilizado para la inducción de callo, proliferación de estructuras tipo protocormos, desarrollo y mantenimiento a mediano plazo de plántulas. Se considera que se ha logrado establecer los métodos óptimos de propagación y mantenimiento *in vitro* de 9 especies de orquídeas Mexicanas (*Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Euchile citrina*, *Epidendrum radicans*, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Oncidium tigrinum* y *Oncidium cavendishianum*).

**PALABRAS CLAVE:** Micropropagación, cultivos *in vitro*, plantas en riesgo de extinción.

## ABSTRACT

### *In vitro* conservation and propagation of Mexican orchids

The Orchidaceae family is one of the most diverse but also one of the most vulnerable, due to its habitat destruction and high extraction that has been done from the wild populations. In Mexico about 181 orchid species are considered endangered. The present study attempts to conserve and propagate Mexican orchids species through *in vitro* cultures. Leaf, bodies like protocorms and pseudobulb segments of plantlets cultured *in vitro* from seeds, were used as explants for *in vitro* multiplication. Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with appropriate concentrations of auxin (NAA), cytokinin (BA) and gibberelic acid (GA<sub>3</sub>) was utilized for callus induction bodies like protocorms proliferation, plantlets development and maintenance. Methods for *in vitro* propagation and maintenance of 9 Mexican orchids (*Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Euchile citrina*, *Epidendrum radicans*, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Oncidium tigrinum* y *Oncidium cavendishianum*) have been established.

**KEY WORDS:** Micropropagation, *in vitro* cultures, endangered plants.

---

## INTRODUCCIÓN

Se considera que la viabilidad de las poblaciones a largo plazo está determinada por factores ecológicos (e.g. el tamaño y número de poblaciones, el sistema reproductivo, mecanismos de dispersión), genéticos (e.g. selección, mutaciones, deriva génica, endogamia), y del medio ambiente; dentro de estos últimos factores, se tienen aquellos independientes del ser humano (e.g. eventos catastróficos), o bien dependientes del ser humano (e.g. pérdida del hábitat, la introducción de especies, la extracción de los recursos y la degradación y contaminación ambiental) (Brown, 1992; Ledig, 1992; Frankham, 1995). En el pasado reciente, las actividades antropocéntricas han acentuado

fuertemente la pérdida de la biodiversidad (Vida, 1994).

La familia Orchidaceae, es una de las más diversas, pero también una de las más vulnerables, por la destrucción de su hábitat y la gran extracción a la que ha estado sujeta, por el gran interés comercial que ha despertado desde hace muchos años, lo que ha favorecido un extenso mercado, en el que tanto las plantas como las flores de corte se cotizan en precios elevados.

En México se conocen más de 1200 especies de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005), de las cuales 181 se registran en alguna categoría de riesgo en la norma oficial vigente (NOM-059-ECOL-2001), 72 son endémicas, 58 en la categoría de amenazadas, 107 que requieren protección especial, 15 en peligro de extinción y una especie

extinta en la naturaleza (*Laelia gouldiana*) (Diario Oficial de la Federación, 2002).

Se considera que es de vital importancia tomar acciones que conlleven a un manejo sustentable de las orquídeas mexicanas, entre las que se tiene el establecer sistemas de micropropagación, para conseguir la reproducción de orquídeas en forma masiva a partir de semillas o tejidos vegetativos y desarrollarlas en grandes invernaderos. Con esto, se puede mantener una producción continua de ejemplares de calidad, para reducir en cierta medida el saqueo de especies de sus poblaciones naturales (Lee y Lee, 1991).

Se reporta que las orquídeas fueron las primeras plantas propagadas *in vitro* a partir de la siembra de semillas, de manera simbiótica (Noël Bernard en Francia c. 1900) y asimbióticamente (Lewis Knudson en los Estados Unidos de América en 1921) (Arditti y Krikorian, 1996), o clonalmente al introducirse la técnica del cultivo de meristemas para la propagación vegetativa (Morel, 1960, 1964) (Capellades *et al.*, 1991). Dada la importancia hortícola y comercial de las orquídeas, se han desarrollado diversos métodos de propagación, tanto sexual, a través de semillas (Northen, 1970; Leroy y Pike, 1976; Arditti y Ernst, 1981; Sheehan, 1983.), como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos (explantes) (Arditti, 1977; Sheehan, 1983; Sagawa y Kunisaki, 1984; Chin- Chi Lin, 1986).

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de

la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, se han establecido cultivos *in vitro* de diversas orquídeas mexicanas, predominantemente del Estado de Michoacán, con el objetivo de implementar su propagación masiva y conservación *in vitro*. En el presente trabajo se presentan los resultados del establecimiento, propagación y conservación de 9 especies de orquídeas mexicanas (*Cattleya aurantiaca* 'Bateman ex Lindley' P.N. Don, *Encyclia adenocaula* 'La Llave y Lexarza' Schlechter, *Epidendrum radicans* Pavón ex Lindley, *Euchile citrina* 'La Llave y Lexarza' Whitner, *Laelia albida* Bateman ex Lindley, *Laelia autumnalis* 'La Llave y Lexarza' Lindley, *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter, *Oncidium cavendishianum* Bateman, y *Oncidium tigrinum* La Llave y Lexarza ). Estos logros son producto de proyectos de investigación apoyados por diferentes instituciones como La Casa de las Artesanías de Michoacán, dependiente del Gob. del Edo. de Michoacán (1999-2003); el Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, en la colaboración con el Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM, (1999-2002); y la Coordinación de la Investigación Científica, UMSNH. Las investigaciones han sido realizadas por estudiantes tesisistas de Licenciatura de la Fac. de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Material biológico**

La mayor parte de las plantas fuente de semillas son de colecciones particulares (*Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Epidendrum radicans*, *Euchile citrina*, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis*, *Oncidium cavendishianum*, y *Oncidium tigrinum*). En el caso de *Laelia speciosa*, las cápsulas utilizadas (5) fueron colectadas en “El Olvido” Michoacán, Mpio. de Tzintzuntzan. Dicha población también ha sido incluida en estudios sobre la genética de poblaciones, el sistema y éxito reproductivo de dicha planta.

### **Establecimiento de cultivos *in vitro***

El establecimiento de los cultivos *in vitro* se realizó por la siembra de semillas, las cuales se obtuvieron de cápsulas con madurez fisiológica (previo a la apertura de éstas). Para realizar la siembra en medios de cultivos, se desarrolló la asepsia superficial de las cápsulas bajo un procedimiento ya establecido (Ávila y Salgado-Garciglia, 2000), que consistió en colocarlas en una solución de detergente neutro (Hyclin® 15%, 15 min), enjuague con agua corriente, ponerlas en etanol 70% por 2 min, posteriormente en agua oxigenada 3% por 1 min y por último en hipoclorito de sodio comercial 1.2% por 20 min. En área estéril se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y fueron seccionadas con un corte transversal y otro longitudinal, separando las semillas con una espátula y cultivándolas sobre el medio nutritivo,

de manera uniforme.

### **Medios y condiciones de cultivo**

El medio de cultivo basal fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g litro<sup>-1</sup> de sacarosa, 7 g litro<sup>-1</sup> de agar, con un pH 5.75. Para optimizar la germinación, regeneración, desarrollo de plántulas y lograr la conservación de plántulas, se adicionaron reguladores de crecimiento (ácido naftalenacético, ANA; benciladenina, BA; ácido giberélico, GA<sub>3</sub>; y ácido abscísico, ABA) en diferentes dosis según la planta y el tipo de respuesta *in vitro*. Los cultivos fueron mantenidos en cuarto de incubación con condiciones controladas de luz (16 h fotoperíodo, 2000 lux) y temperatura (25°C). Para la conservación, estas condiciones variaron.

### **Micropropagación**

Para determinar los sistemas *in vitro* de propagación masiva de cada orquídea, se utilizaron segmentos de hojas, protocormos y pseudobulbos (explantos, 0.5 cm<sup>2</sup>) de las plántulas producidas por semilla, mantenidas por 6 meses en cultivos *in vitro*. Los explantes fueron cultivados en MS con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (ANA/BA, ANA/GA<sub>3</sub>, ANA/BA/GA<sub>3</sub>) en dosis de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg litro<sup>-1</sup>, con la finalidad de seleccionar medios para la inducción de callos, medios para la regeneración de estructuras tipo protocormos y plántulas, medios de desarrollo y de mantenimiento.

### ***Trasplante y aclimatación***

El cultivo *ex vitro* se ha llevado a cabo de la siguiente manera: se seleccionan plántulas mayores de 3 cm de longitud, los frascos son perforados y se mantienen en condiciones no controladas de luz y temperatura por 24 h y se siembran sobre un sustrato constituido por tezontle y corteza de encino triturada (1:1), en cajas de plástico transparente, siguiendo el proceso de aclimatación con disminución paulatina de la humedad relativa, que consiste en abrir la cubierta poco a poco (cada cinco días) durante 30 días posteriores al trasplante. Durante este período se realizan riegos con pulverizaciones de agua diariamente. Posteriormente cada plántula es separada y cultivada de manera individual, manteniéndola con 70% de humedad relativa (Sarabia, 2001).

### ***Mantenimiento de cultivos in vitro***

El mantenimiento de los cultivos *in vitro* de las 9 orquídeas en estudio se realiza de dos maneras: a corto plazo, con subcultivos continuos de plántulas cada 4 meses, en medios de desarrollo seleccionados en investigaciones previas (Sarabia, 2001; Becerril, 2003, Huapeo, 2004, Luviano, 2006); y a mediano plazo, con subcultivos de plántulas cada 12 meses, en medios de conservación de mínimo crecimiento, también previamente establecidos, que se mantienen a 10°C y a una intensidad de 500 lux (Ochoa-Ambriz, 2005).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***Establecimiento in vitro***

Se consiguió el cultivo *in vitro* por semillas de todas las orquídeas en estudio. En general se ha obtenido un 100% de germinación utilizando el medio completo MS, con o sin reguladores de crecimiento, al cultivarlas en condiciones de luz. Se ha observado que al adicionar BA en una dosis relativamente baja ( $0.05 \text{ mg litro}^{-1}$ ), el proceso de germinación en general se acelera y es homogénea, no importando si se incuban en la oscuridad o en la luz. Para *L. speciosa*, el medio óptimo de germinación es MS sin reguladores de crecimiento (Ávila y Salgado-Garciglia, 2000). El tiempo para lograr el 100% de la germinación varía para cada orquídea, en promedio se obtiene entre los 30 y 45 días, después de la siembra (Cuadro 1, Figura 1A). Esta respuesta ha sido reportada para diferentes orquídeas cultivadas *in vitro* asimbióticamente, específicamente *Bulbophyllum bufo* y *Odontoglossum pulchellum* (Morel, 1974). Lee y Lee (1991) reportan que la germinación en semillas de orquídeas cultivadas *in vitro* a partir de cápsula varía dependiendo de la madurez de ésta y del tipo de orquídea, sin embargo se indica que germinan entre 30 y 60 días de cultivo.

### ***Desarrollo de plántulas in vitro***

El desarrollo de plántulas *in vitro* para su conservación en este tipo de cultivos, para obtener plántulas fuente de explantes para la micropropagación y plántulas que estén aptas para ser

cultivadas *ex vitro*; se ha implementado en el medio de cultivo MS con reguladores de crecimiento, habiendo seleccionado las dosis y tipos de reguladores para cada orquídea (medio de desarrollo o de mantenimiento), obteniendo a los 4 meses plántulas de hasta 5 cm de altura con formación de pseudobulbo y raíces con velamen (Cuadro 1, Figura 1B). Es claro que la adición de la auxina ANA en combinación con GA<sub>3</sub> promueve el mejor desarrollo de plántulas de estas orquídeas (Ávila y Salgado-Garciglia, 2000).

### **Morfogénesis *in vitro***

Con fines de establecer métodos de propagación masiva, segmentos de hoja, protocormos y pseudobulbos de cada una de estas orquídeas han sido cultivados en MS con reguladores de crecimiento, encontrando también las dosis, tipos y combinaciones óptimas de éstos, dando como resultado diferentes respuestas: formación de callo, multiplicación de protocormos y regeneración de plántulas. La inducción de callo se obtiene por la adición de ANA (0.25-1.0 mg litro<sup>-1</sup>) en combinación con diferentes dosis de BA dependiendo de la especie (0.5-2.5 mg litro<sup>-1</sup>), condición que permite la proliferación de este tejido no diferenciado, no importando la fuente de explante, ya que tanto en segmentos de hoja como de protocormos y pseudobulbos, se produce callogénesis (Cuadro 1). Las características de estos callos son similares para todas las orquídeas en estudio, granuloso, de color verde claro y una alta capacidad regenerativa (Figura 1C). La

multiplicación de las estructuras tipo protocormos de manera directa se consigue en MS también con la combinación ANA/BA, aunque en algunas orquídeas fue necesario la adición de GA<sub>3</sub>. En general, la multiplicación de este tipo de estructuras se produce en tejidos de protocormos o de pseudobulbos después de 30 días de cultivo (Figura 1D), en hoja solamente se ha observado para *O. cavendishiana*, *O. tigrinum*, *C. aurantiaca* y *E. radicans*. La regeneración de estructuras protocórmicas a partir de fragmentos de callos de todas las orquídeas bajo investigación, también ha sido exitoso, los callos pueden ser subcultivados en MS con reguladores de crecimiento para obtener una gran cantidad de estas estructuras (> 50 protocormos/explante) tan solo en 21 días (Cuadro 1, Figura 1E).

Las dosis y combinaciones de estos reguladores de crecimiento para la proliferación y desarrollo de las estructuras protocórmicas en estas orquídeas, son similares a los observados en la micropropagación de orquídeas como en *Epidendrum longipetalum*, que en presencia de 2.5 mg/l tanto de BA como de ANA se producen protocormos y brotes a los 40 días de cultivo de los explantes (Torres-Zúñiga y Aguirre-León, 2001). Otras orquídeas requieren dosis mayores de reguladores, como en *Laelia anceps* Lindl., donde la combinación 1:1 de auxina/citocinina (ANA/BA) de 8 mg/l, dio como resultado el mayor número de estructuras protocórmicas hasta los 180 días del cultivo, aunque para la

formación de brotes no se requirió la presencia de los reguladores de crecimiento (Ramírez, 1999).

La formación de plántulas a partir de las estructuras tipo protocormos se alcanza al cultivarlos en MS generalmente con ANA/BA/GA<sub>3</sub>, dependiendo de la especie de orquídea (Cuadro 1). Estas plántulas muestran rápido crecimiento (3-4 meses) en sus medios de desarrollo respectivos, presentando características óptimas para su trasplante y aclimatación (Figura 1F).

La adición de reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y giberelinas a medios de cultivo para optimizar el crecimiento y desarrollo de plántulas, frecuentemente resulta en la estimulación del desarrollo de las plántulas, aunque no siempre se favorece, ya que puede haber respuesta de callogénesis, retardo en el crecimiento y excesiva elongación de los tallos (Weaver, 1990). En todas las orquídeas bajo estudio la adición de reguladores en esta fase de cultivo si benefició su crecimiento y desarrollo.

### ***Trasplante y aclimatación***

Se ha determinado el procedimiento para conseguir el trasplante y aclimatación de plántulas micropropagadas de *L. autumnalis*, *L. albida*, *E. citrina* y *O. cavendishianum*, como se detalla en metodología (Sarabia, 2001), logrando porcentajes de sobrevivencia por arriba del 70%. En el caso de *L. speciosa*, la sobrevivencia es hasta de un 98%, debido a que las plántulas *in vitro* se mantienen por 20 días en condiciones de invernadero previo a su trasplante,

cultivadas en MS con 100% de nutrimentos y 40 g litro<sup>-1</sup> de sacarosa, método establecido por Ortega en el 2003.

Después de 30 días, las plántulas producen nuevas raíces con velamen y desarrollan el pseudobulbo (Figura 1G), es conveniente mantenerlas en porcentajes mayores del 70% de humedad relativa en los siguientes 90 días, para posteriormente cultivarlas en forma individualizada.

Plantas micropropagadas de *L. speciosa*, han sido mantenidas bajo cultivo por dos años en invernadero y presentan características de crecimiento y desarrollo óptimos, con hojas de hasta 10 cm de largo y pseudobulbos de 2-3 cm de diámetro (Figura 1H).

### ***Conservación in vitro***

Las 9 orquídeas establecidas y propagadas *in vitro*, se mantienen bajo subcultivos continuos (cada 4 meses) en medio MS de desarrollo propio para cada especie (Cuadro 1), donde prevalecen con un crecimiento y desarrollo natural de estas plantas *in vitro*. Crecen hasta 5 cm de altura, generan pseudobulbos y producen nuevas plántulas. Por ello, fue conveniente desarrollar un método de conservación a mediano plazo de todas estas plantas, con el fin de minimizar su crecimiento sin que disminuyera la viabilidad. Para determinar los medios de cultivo y condiciones óptimas para esta conservación, se cultivaron plántulas en medio MS modificado, variando la concentración de sus componentes (100%, 75%, 50%, 25% y 12.5%), de sacarosa (60, 40, 30, 20 y

10 g litro<sup>-1</sup>), adicionando sustancias retardadoras del crecimiento como manitol, sorbitol y ácido abscísico y probando tres diferentes temperaturas (25, 10 y 5°C), cultivándolas en condiciones de luz difusa (500 lux). Con los resultados obtenidos (datos no mostrados), actualmente se conservan a una temperatura de 10°C en tres diferentes medios para mínimo crecimiento, dependiendo de la especie de orquídea: *L. albida*, *L. autumnalis* y *L. speciosa* en MS 12.5% con 60 g litro<sup>-1</sup> de sacarosa y 0.5 mg litro<sup>-1</sup> ABA; *E. radicans*, *O. cavendishianum* y *O. tigrinum* en MS 12.5% con 40 g litro<sup>-1</sup> de sacarosa, sin ABA; *C. aurantiaca*, *E. adenocaula* y *E. citrina* en MS 75% con 60 g litro<sup>-1</sup> de sacarosa sin ABA (Ochoa-Ambriz, 2005). Estas plántulas se subcultivan a medio fresco cada 12 meses con el fin de probar su viabilidad y capacidad de propagación, aunque pueden sobrevivir los 24 meses de cultivo, período en el cual se ha evitado la contaminación y mortalidad al máximo (Figura 11).

## CONCLUSIONES

Se han establecido cultivos *in vitro* exitosos a partir de semillas de las 9 orquídeas mencionadas en este trabajo. Los sistemas de micropropagación han sido implementados para cada una de ellas, logrando la formación de callos, la regeneración de estructuras tipo protocormos y el desarrollo de plántulas, utilizando el medio nutritivo MS con reguladores de crecimiento (ANA/BA/GA<sub>3</sub>). Cada una de ellas se mantiene bajo el sistema de

conservación *in vitro*, con subcultivos continuos cada 12 ó 24 meses.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las siguientes Instituciones, por el apoyo económico brindado:

Casa de las artesanías; Fondo Mexicano para la Conservación de la naturaleza, a través del Proyecto “Manejo sustentable de *Laelia speciosa*” (FMCN A 1-99/130); Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH (RSG-2.10).

Al personal del Orquidario de Morelia, por el apoyo en la determinación taxonómica de algunas especies; al Dr Ken Oyama por el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto “Manejo sustentable de *Laelia speciosa*”, a los estudiantes por su colaboración al hacer su tesis de licenciatura en esta área.

## REFERENCIAS

- Arditti, J. 1977. **Clonal propagation of orchids by means of tissue culture- a manual**. En: J. Arditti (ed) *Orchid Biology, Reviews and Perspectives*, I. Cornell Univ. Press, Ithaca. 203-293 pp.
- Arditti, J. y Ernst R. 1981. **Physiology of Germinating Orchids Seeds**. En: J. Arditti (ed) *Orchid Biology, Reviews and Perspectives*, II. Cornell Univ. Press, Ithaca.
- Arditti, J. y Krikorian A.D. 1996. **Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators**. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122: 183-241pp.

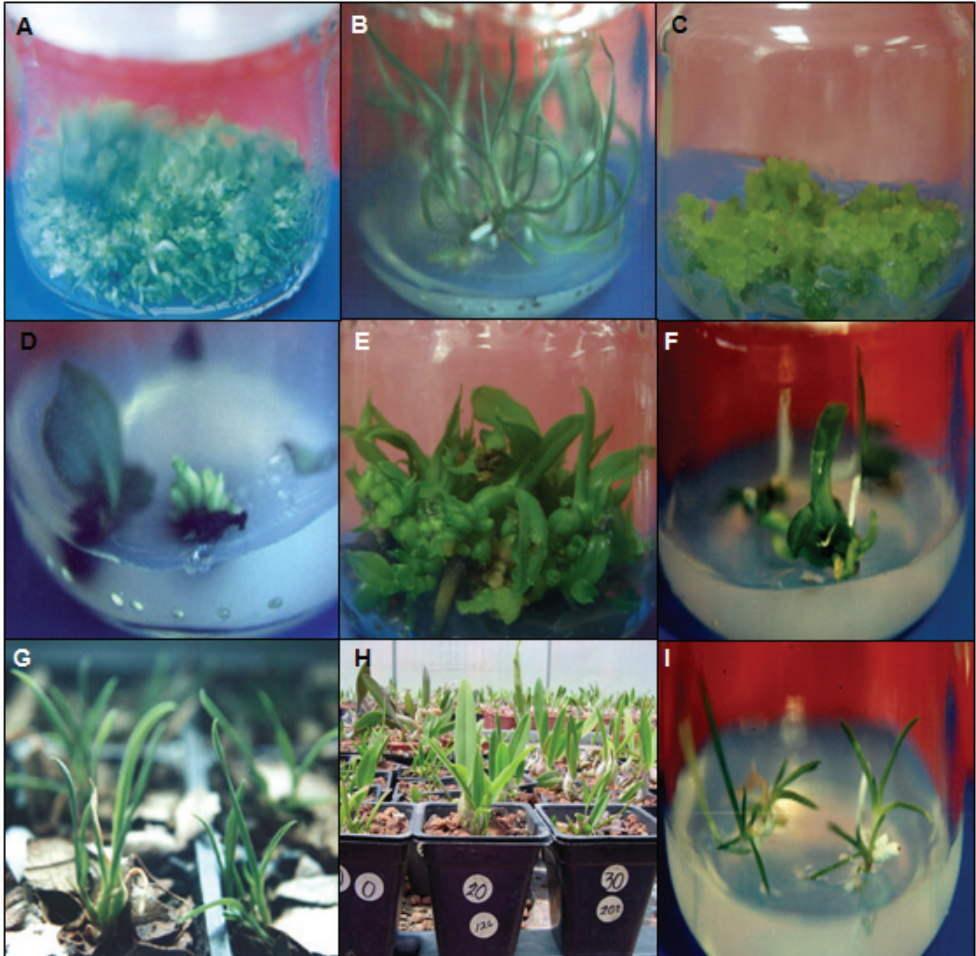


- Ávila, I. y Salgado-Garciglia R. 2000. **Un sistema de propagación masiva de *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter (Orchidaceae), como alternativa para la conservación.** ¡Divulga!, Revista de la CIC/UMSNH, México. No. 1:27-30.
- Becerril, T. R. 2003. **Micropropagación de *Euchile citrina* (Orchidaceae).** Tesis de Licenciatura, Fac. de Biología, U.M.S.N.H. 57 p.
- Brown, A. H. D. 1992. **Human impact on plant gene pools and sampling for their conservation.** Oikos 63: 109-118.
- Capellades, M., Beruto M., Vanderschaeghe A. y Debergh P. C. 1991 **Ornamentals.** En: Debergh, P.C. y Zimmerman (Eds). Micropropagation technology and application. Kluwer Academic Publishers. 215-229.
- Chin-Chi L. 1986. **In vitro Culture of Flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*.** Lyndleyana 1: 158-163.
- Diario Oficial De La Federación. 2002. **Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL-2001. Segunda Sección, Anexo narrativo II.** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. pp. 95-190.
- Frankham, R. 1995. **Conservation Genetics.** Annual Rev. Genetics 29: 302-327.
- Hágsater, E., M. Á. Soto Arenas, G. A. Salazar Chávez, R. Jimenez Machorro, M. A. López Rosas y R. L. Dressler. 2005. **Las orquídeas de México.** Instituto Chinoín, México.
- Huapeo, P.Y. 2004. **Establecimiento in vitro y regeneración de plantas de *Laelia autumnalis* (Llave y Lex.) Lindl. (Orchidaceae).** Tesis de Lic., Fac. de Biología, UMSNH. 55 p.
- Ledig, F. T. 1992. **Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems.** Oikos 63: 87-108.
- Lee, J. Y Lee H. 1991. **Micropropagación de orquídeas a partir de semillas.** Boletín informativo de FIRA XXIV 2:15-30.
- Leroy, T. Y Pike L.M. 1976. **Flasking orchid seeds-A method for the novice grower.** Amer. Orchid Soc. Bull. 45: 800-803.
- Luviano, R. C. 2006 **Optimización de la multiplicación in vitro de protocormos de *Oncidium cavendishianum* Batem. (Orchidaceae) en medio de cultivo líquido.** Tesis de Licenciatura, Facultad De Biología .U.M.S.N.H MÉXICO. 64 p.
- Morel, G. M. 1960. **Producing virus-free *Cymbidiums*.** Amer. Orchid. Soc. Bul. 29:495-497.
- Morel, G. M. 1964. **Tissue culture – a new means of clonal propagation of orchids.** Am. Orchid Soc. Bull. 33:473–478.
- Morel, G. M. 1974. **Clonal Multiplication of orchids.** En: Withner, C. L.(ed). **The Orchids** Scientific Studies. John Wiley & Sons, New York. 604p.
- Murashige, T. y Skoog F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Northen, R. T.1970 **Home Orchid Growing.** Third Edition. 95-113

- Ochoa-Ambriz, E. L. 2005. **Conservación *in vitro* a mediano plazo de tres orquídeas michoacanas: *Laelia speciosa*, *Oncidium cavendishianum* y *Encyclia adenocaula*.** Tesis de Licenciatura, Facultad De Biología .U.M.S.N.H MÉXICO. 101 p.
- Ortega M. M. L. 2003. **Aclimatación de plántulas cultivadas *in vitro* de *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter.** Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología. U.M.S.N.H. México. 64 p.
- Ramírez, S. J. 1999 **Cultivo *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* Lindl, subespecie *dawsonii* f. *chilapensis*.** Memorias VIII Congreso de Horticultura. México pp. 63
- Sagawa, Y. y Kunisaki J. T. 1984. **Clonal Propagation: Orchids.** Cell Culture and Somatic Cell. 3: 61-67.
- Sarabia, O. M. E. 2001. **Reproducción asexual *in vitro* de *Laelia speciosa* "H.B.K." Schl.** Tesis de Licenciatura, Facultad De Biología .U.M.S.N.H MEXICO. 50 p.
- Sheehan, T. J. 1983. **Recent advances in botany, propagation, and physiology of orchids.** Hort. Rev. 5: pp. 279-315.
- Torres-Zúñiga, M. M. Y Aguirre-León E.M. 2001. **Micropropagación aplicada a la conservación ex situ de *Epidendrum longipetalum* (Orchidaceae).** XV Congreso Mexicano de Botánica. Resumen de cartel.
- Vida, G. 1994. **Global issues of genetic diversity.** En : V. Loeschcke, J. Tomiuk y S.K. Jain (eds.), Conservation Genetics, 9-19. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Weaver, J.R. 1990. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura.** W.H. Freeman Cia., U.S.A., 594 p.

**CUADRO 1.** Medios de cultivo para desarrollo y mantenimiento de plántulas, callogénesis, multiplicación de protocormos y regeneración de plántulas de las orquídeas en estudio.

ORQUÍDEA	MEDIOS DE CULTIVO (MS, ANA/BA/GA <sub>3</sub> , mg litro <sup>-1</sup> )			
	Desarrollo	Inductor de Callo	Multiplicación de Protocormos	Regeneración de Plántulas
<i>C. aurantiaca</i>	0.1/0/0.5	1.0/2.0/0	1.0/0.5/0	0.1/0.05/0.1
<i>E. radicans</i>	0.01/0.05/0.1	0.5/1.0/0	1.0/1.0/1.0	0.1/0.1/0.1
<i>E. adenocaula</i>	0.01/0.05/0.1	0.5/2.0/0	0/1.0/0.1	0.1/0.1/0.1
<i>E. citrina</i>	0/0.1/0.1	1.0/1.0/0	0.25/2.5/0	0.25/0/0.1
<i>L. albida</i>	0.1/0.05/0.1	0.5/2.5/0	0.1/0.5/0.1	0.1/0.1/0.1
<i>L. autumnalis</i>	0.5/0/0.1	1.0/1.0/1.0	0.1/0.1/0.1	0/0.1/0.1
<i>L. speciosa</i>	0.1/0/0.5	0.5/2.5/0	0.1/0.5/0	0.1/0.05/0.1
<i>O. cavendishianum</i>	0.1/0.1/0.1	0.5/1.0/0	1.0/1.0/1.0	0.1/0.1/0.1
<i>O. tigrinum</i>	0.1/0.1/0	0.25/0.5/0	1.0/1.0/1.0	0.1/0.05/0.1



**Figura 1.** Fotografías que muestran los diferentes eventos de la propagación y conservación *in vitro* de orquídeas: A. Plántulas de semilla; B. Plántula de 6 meses de edad; C. Tejido calloso; D. Formación de estructuras tipo protocormos en tejido de pseudobulbo; E. Regeneración de plántulas a partir de estructuras protocórmicas; F. Plántula individualizada previo al trasplante; G. Plántulas micropropagadas cultivadas en invernadero por 6 meses; H. Plántulas micropropagadas mantenidas por 2 años en condiciones de invernadero; I. Plántulas cultivadas *in vitro* bajo el sistema de conservación en mínimas condiciones de crecimiento, por 12 meses.