



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**GERMINACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE
Oncidium unguiculatum (ORCHIDACEAE),
CON FINES DE CONSERVACIÓN ex situ.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO
PRESENTA:
JUAN CARLOS CARMONA BAÑOS**

**DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. ERNESTO AGUIRRE LÉON**



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis padres por todo el apoyo y el amor incondicional que me han brindado en todos estos años, por sus palabras de aliento, por ayudarme a levantar la cabeza en cada una de mis derrotas y animarme a seguir luchando por mis anhelos.

A mi hija María Fernanda por haber cambiado mi universo con el batir de sus pequeñas alas y darme aún más motivos para seguir adelante.

Agradecimientos

A mi padre por darme tan sabios consejos a lo largo de mi existencia. Por adentrarme y mostrarme lo maravillosas que son la ciencia y la naturaleza; por enseñarme que jamás debo quedarme con una duda, por alimentar mi curiosidad de conocer el funcionamiento de la vida; y, por hacerme ver que puedo realizar cada uno de mis sueños si esa es mi decisión. Pero sobre todo, porque junto a él di mis primeros pasos para convertirme en el biólogo de plantas que ahora soy.

A mi madre por enseñarme el valor de la perseverancia y el significado de la palabra lucha; y que, cuando se tiene voluntad y decisión no hay tormenta capaz de derribarnos por fuerte e interminable que esta parezca. Por ayudarme a seguir mis sueños y por ponerme los pies en la Tierra cuando lo he necesitado.

A mi querida hermana por todos esos momentos inolvidables que hemos pasado juntos, por compartir desvelos, por su apoyo, sus consejos, muchas gracias. "Rocket brothers crack and burst if they can't meet upon the verge".

A mi tío Pedro Pablo por su gran apoyo en mis proyectos e interés por mi desarrollo profesional. Por saber que cuento con él.

Al Dr. Ernesto Aguirre León por ser una maravillosa persona, por haberme dado tantas lecciones, no nada más en el ámbito académico; por su apoyo incondicional, por la amistad, el cariño, sus valiosas opiniones y sus pertinentes sugerencias que me proporcionó durante la dirección de este trabajo. Muchas gracias maestro, por todo. Le estaré eternamente agradecido.

Al M. en C. Rafael Quintanar Zúñiga del laboratorio de fisiología vegetal de la UBIPRO por el apoyo prestado con el microscopio electrónico de barrido.

A la M. en C. Daleth del laboratorio de microscopía, por su amistad y por sus sabios consejos.

Al Biol. Ramse mi compañero del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por el apoyo, los consejos, por compartir las mismas inquietudes y el gusto por la botánica.

A todos y cada uno de los profesores que tuve el privilegio de conocer porque aunque muchos de ellos no me impartieron clase alguna, me dejaron muchos conocimientos.

A todos mis amigos de la carrera, discúlpenme el no nombrar a cada uno, pero la lista sería muy larga. Muchas gracias a todos.



Oncidium unguiculatum
Lindl.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Familia Orchidaceae.....	10
2.2 Género <i>Oncidium</i>	12
2.3 Descripción de la especie.....	13
2.4 Distribución y hábitat.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. OBJETIVOS.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 Material biológico.....	21
5.2 Prueba de viabilidad.....	21
5.3 Desinfección y siembra del material biológico.....	21
5.4 Medios y condiciones de cultivo.....	22
5.5 Germinación.....	23
5.6 Cultivo de tejidos.....	23
5.7 Medición de la capacidad fotosintética de las plantas.....	24

5.8 Aclimatización.....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
6.1 Germinación.....	27
6.2 Cultivo de tejidos.....	30
6.2.1 Inducción.....	30
6.3 Medición de la capacidad fotosintética de las plantas.....	37
6.4 Aclimatización.....	39
7. CONCLUSIONES.....	40
8. APÉNDICES.....	41
Apéndice A. Medio de cultivo Knudson C modificado (KC).....	41
Apéndice B. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).....	42
9. LITERATURA CITADA.....	43

RESUMEN

La germinación de las orquídeas puede conducir a su desarrollo normal formando plantas completas y en ocasiones pequeños cuerpos basales parecidos a protocormos o PLB (protocorm like-bodies por sus siglas en inglés). Estas estructuras de reproducción vegetativa, pueden formarse debido a factores ambientales, como carencias de nutrimentos que promueven la síntesis de reguladores capaces de favorecer el desarrollo de estos cuerpos. En el presente trabajo se establece un método eficaz de germinación y proliferación *in vitro* de la orquídea *Oncidium unguiculatum* para favorecer su conservación *ex situ*. En medio MS [1/2], la germinación fue de 93% en 75 días. 30% de las plántulas producidas formaron PLB y continuaron su crecimiento y desarrollo. La proliferación de PLB se consiguió en medio MS [1/2] líquido sin necesidad de agregar reguladores exógenos. Los PLB transferidos a medio MS [1/2] sólido iniciaron la formación de plántulas lo cual permite la germinación de plántulas normales útiles para el incremento de plantas deseadas. Pasadas 40 semanas de cultivo, las plántulas se subcultivaron a medio MS completo adicionado con tres diferentes concentraciones de sacarosa (60 g/L⁻¹, 30 g/L⁻¹ y sin sacarosa) para evaluar la capacidad fotosintética y la respuesta de las plántulas al proceso de aclimatización; las plántulas en medio MS con de 60 g/L⁻¹ de sacarosa mostraron un incremento de talla hasta del 200% en 60 días de tratamiento.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas entre las plantas con flores, comprendiendo de 20000 a 35000 especies, incluidas en 5 subfamilias y más de 725 géneros (Dressler, 1993; Mabberley, 1997, citado por Dixon *et al.*, 2003), de las cuales aproximadamente el 25% son terrestres, 70% son epífitas y el otro 5% restante puede crecer en una gran variedad de soportes y en diversos substratos, incluidas las rocas (Arditti, 1992). 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, aunque la mayoría de las especies se encuentra en el trópico (Dressler, 1981).

En México se distribuyen aproximadamente, cerca de 1200 a 1400 especies diferentes a lo largo del territorio nacional (Soto, 1994; Espejo & López-Ferrari, 1998; Hágsater y Soto, 1998; Soto y Salazar, 2004; Hágsater *et al.*, 2005, aunque son más abundantes y diversas en los bosques húmedos concentrados en la parte sur del país (Soto y Salazar, 2004). Las hay desde zonas montañosas, especialmente a una altitud aproximada de 2000 msnm, hasta los pastizales, chaparrales, bosque secos de piñoneros-encinos-enebros de las serranías del norte de México. Los estados de Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero poseen una mayor abundancia de especies, mientras que otros con una flora relativamente menor son Jalisco, México, Michoacán y las regiones más sureñas de Puebla y San Luis Potosí (Soto, 1989; citado por Cahuantzi, 1998; Hágsater *et al.*, 2005).

La familia Orchidaceae es una de las más vulnerables, esto se debe en gran parte al crecimiento urbano de forma desordenada, contribuyendo así a la destrucción y afectando de manera directa o indirecta a la transformación de su hábitat. Lo anterior se suma a la extracción indiscriminada y al tráfico ilegal de sus especies a la

que ha estado sujeta desde hace muchos años. Ambos fenómenos se deben al gran interés comercial que han despertado numerosas especies, favoreciendo a un extenso mercado sobre todo ilegal, en el que las plantas se cotizan en precios elevados (Sarmiento y Romero, 2000; Ávila y Salgado, 2006; Suárez, 2007).

En la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010), se encuentran catalogadas 189 especies de orquídeas dentro de alguno de los status de conservación. De estas 15 se consideran en peligro de extinción, 60 amenazadas, 108 bajo protección especial y una especie posiblemente extinta en la naturaleza (SEMARNAT, 2010). Es por esto que se considera, que es de vital importancia tomar acciones que conlleven a un manejo sustentable de las orquídeas mexicanas y una de ellas es la de establecer sistemas de micropropagación económica. Con ello se consigue la reproducción de orquídeas en forma masiva a partir de semillas o tejidos vegetativos para su desarrollo en gran escala. Con los sistemas de micropropagación 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; citado por Ávila y Salgado 2006; Dixon *et al.*, 2003).

Uno de los géneros de interés comercial es *Oncidium* Sw. integrado por más de 750 especies. Es nativo de América central y tiene una distribución que se extiende desde el sur de la Florida, a través de México y el Caribe hasta los Andes y Argentina; teniendo sus centros de diversificación en Sudamérica, entre Ecuador y Colombia; otro en Costa Rica y uno más en México (Chen y Chang, 2000b; Jiménez, 2008), en donde se conocen 36 especies (Jiménez, 2008) de las cuales 5 se encuentran bajo protección especial y 7 en la categoría de amenazadas (SEMARNAT, 2010).

Debido a la belleza de sus flores, a la creciente demanda por el valor ornamental que poseen y a la potencialidad para crear híbridos cada vez más vistosos, muchas especies del género *Oncidium*, están siendo extraídas de forma indiscriminada de su ambiente natural. Sumado a esto, otras actividades humanas ya consideradas

alteran su hábitat y reducen sus poblaciones a un punto crítico en algunas de las especies (Tinoco y Mata, 2007; Jiménez, 2008; SEMARNAT, 2010).

Oncidium unguiculatum Lindl. es una especie endémica de México (Jiménez, 2008). Sus flores se caracterizan por tener sépalos y pétalos amarillo verdosos con manchas pardo-rojizas, un labelo trilobado, largamente unguiculado, amarillo brillante y sin manchas. Habita en bosques de encino, pino-encino y mesófilos de montaña, en una altitud que va de los 2000 a los 2800 m.s.n.m. Se le puede ver en flor de noviembre a marzo (Espejo *et al.*, 2002). Junto con *Oncidium tigrinum* La Llave & Lex., especie muy cercana, con flores de mayor talla, este género muestra dos dignos representantes nativos de México.

Las poblaciones de *O. unguiculatum*; se han ido reduciendo de manera alarmante por lo cual se considera una especie amenazada (SEMARNAT, 2002). Por otro lado, la falta de información e investigaciones sobre muchas de las especies mexicanas del género *Oncidium*, ha contribuido a que se carezca de conocimientos sobre los métodos de propagación *in vitro* para su comercialización y así contrarrestar, en lo posible, su extracción de la naturaleza. Es por eso que se deben realizar estudios sobre su propagación masiva, con la finalidad de ponerlas al alcance de la gente y reducir su extracción y venta clandestinas.

En el presente trabajo se describe un método desarrollado para la micropropagación de *Oncidium unguiculatum*, como alternativa para la propagación masiva de la especie, con el propósito de satisfacer la demanda comercial y, de esta forma contribuir a ayudar a la conservación de las poblaciones silvestres dentro de la naturaleza.

2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Orchidaceae

La familia **Orchidaceae** se divide en 5 subfamilias (Dressler, 1993; Mabberley, 1997 citado por Dixon *et al.*, 2003) Tabla 1.

Las orquídeas son un grupo antiguo, que con su presente distribución sugiere un origen que probablemente precede a la separación de Gondwana hace 125 millones de años, cuando la familia todavía se encontraba en activa evolución (Raven and Axelrod, 1974; citado por Dixon *et al.*, 2003; Chase, 2001).

Apostasioideae	16
Vanilloideae	249
Cypripedioideae	155
Orchidoideae	4 704
Epidendroideae	19785
Total	24910

Tabla 1. Número de especies reconocidas por subfamilia en Orchidaceae. Los datos son compilados de Dixon *et al.*, 2003.

El gran tamaño de la familia y sus múltiples adaptaciones, que conlleva también una gran diversidad anatómica (Arditti, 1992; Hágsater *et al.*, 2005), han llevado a las orquídeas a presentar una amplia distribución y la capacidad de establecerse en casi todos los ambientes de la Tierra.

Uno de sus rasgos más atractivos lo constituyen las adaptaciones altamente especializadas de atracción, engaño y manipulación de los insectos, como principales agentes polinizadores para conseguir la fecundación, que les permite producir semillas y perpetuar su especie. Esto ha fascinado a observadores de todo tipo desde tiempos de Darwin. Los aficionados a las orquídeas las cultivan alrededor del mundo en invernaderos, jardines, ventanas y sótanos (Dressler, 1981; Anderson *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2005), siendo así, consideradas una de las plantas ornamentales más apreciadas y con mayor valor comercial (Sorace *et al.*, 2007).

La propagación natural de las orquídeas sigue un proceso que se dificulta porque sus semillas son diminutas y carecen de endospermo. Por esta razón, requieren de una relación obligada con hongos micorrízicos que permite la germinación de las semillas (Arditti, 1984; Potisek, 1996).

Actualmente el avance de la tecnología y de la aplicación de métodos de cultivo *in vitro*, es posible debido a la existencia de una mejor comprensión de los requerimientos nutricionales de las células y tejidos en cultivo. La formulación del medio de cultivo es esencial para la planta, pues concentra los nutrientes necesarios para su desarrollo, pudiendo ser preparado con diferentes combinaciones de los mismos, dependiendo de los requerimientos de cada especie (Faria *et al.*, 2002). Esto ha permitido que se puedan realizar estudios sobre los métodos de propagación más eficientes, mediante la germinación asimbiótica, de diversos géneros de orquídeas como *Bletia* (Smith, 1973; Rubluo *et al.*, 1989), *Brassavola* (Damon *et al.*, 2004), *Cattleya* (Knudson, 1922; Damon *et al.*, 2004; Ávila y Salgado, 2006), *Vanilla*

(Knudson, 1950), *Dactylorhiza* (Smith, 1973), *Encyclia* (Damon *et al.*, 2004; Ávila y Salgado, 2006; Ruiz *et al.*, 2008), *Epidendrum* (Potisek *et al.*, 1996; Ávila y Salgado, 2006), *Euchile* (Ávila y Salgado, 2006; Suárez *et al.*, 2007) y *Laelia* (Potisek, *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2005; Ávila y Salgado, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Por otra parte, además de los métodos de germinación, también se han desarrollado métodos de cultivo de tejidos; gracias a los cuales han podido propagar géneros como *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* y *Vanilla* (Stewart, 1989) a través del empleo de diferentes estructuras tales como brotes axilares (George y Ravishankar, 1997) y apicales (Malabadi *et al.*, 2005), así como explantes de inflorescencia (Košir y Luthar, 2004), nodales y de brote (Kalimuthu *et al.*, 2006) y segmentos de pseudobulbos (Basker y Narmatha, 2006). Con el paso del tiempo y el desarrollo de nuevas tecnologías, los trabajos relacionados con este tema, han ido aumentando considerablemente en los últimos años (Faria *et al.*, 2002; Arditti, 1993).

2.2 Género *Oncidium*

Existen diversos trabajos dirigidos a la micropropagación del género *Oncidium* partiendo desde la germinación asimbiótica (Ávila y Salgado, 2006; Kalimuthu *et al.*, 2007; Sorace *et al.*, 2008; Scheid *et al.*, 2009) hasta la propagación utilizando alguno de sus tejidos, como explantes de hoja (Cheng *et al.*, 1999; Chen y Chang, 2001, 2004 y 2006), inflorescencia (Cahuantzi, 1998; Cheng y Chang, 2000), raíces (Kerbauy, 1993) y callo (Cheng y Chang, 2000; Sheng *et al.*, 2006). Así como la regeneración de plantas a través de embriogénesis somática usando escapos florales, hoja, raíz y meristemas (Chen y Chang, 1999, 2000a, 2000b, 2001, 2002, 2003a, 2003b, 2004; Mata-Rosas *et*

al.2011). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos abordan el interés comercial de propagación de híbridos creados para flor de corte y planta en maceta

En lo referente a *Oncidium unguiculatum*, no se encontró información en la literatura sobre su micropropagación, por lo que en el presente trabajo, estuvo dirigido al desarrollo de un protocolo eficiente para la y micropropagación de *O. unguiculatum*.

2.3 Descripción de la especie

***Oncidium unguiculatum* Lindl.**

La descripción de *O. unguiculatum*, de acuerdo con Jiménez (2008), es la siguiente: **Hierba** de 25-50 cm de alto sin incluir la inflorescencia. **Raíces** delgadas, 1.0-1.5 mm de grosor. **Rizoma** corto. **Seudobulbos** agregados, ovoides, comprimidos, bi a trifoliados, sulcados longitudinalmente, mostrando 3 costillas, color verde claro, brillantes, 6.5-10.5 x 3-4 cm, cubiertos en la base por 4-6 vainas subcoriáceas, 2.5-12 cm de largo, foliosas, con lámina foliar articulada, semejante a las hojas, de 7.5-17.0 x 2.0-2.5 cm. **Hojas** 2-3 en el ápice del pseudobulbo, erecto-arqueadas, lanceoladas o angostamente elípticas, agudas, subcoriáceas, color verde claro, 31-43 x 1.3-3.2 cm. **Inflorescencia** originada en la base del pseudobulbo maduro, una por pseudobulbo, paniculada, erecto-arqueada, 113-210 cm de largo (a veces más de 2.10 m en ejemplares cultivados), laxiflora, 20-80 flores generalmente simultáneas o sucesivas (en ejemplares cultivados puede ser mayor el número de flores), 3-7 ramas de 20-55 cm de largo (en ejemplares cultivados pueden ser muy largas); pedúnculo de 40-78 cm de largo, el eje de la inflorescencia de sinuoso a recto, ramas e inflorescencia en el ápice ligeramente en zig-zag, provista de brácteas triangulares, escarioso-papiráceas, amplexicaules en la base, agudas, las del pedúnculo 10-20 x 14-20 mm, las de la base

de las ramas, 11-20 x 8-12 mm. **Brácteas florales** triangulares, escarioso-papiráceas, amplexicaules en la base, agudas, 4-12 x 4-6 mm. **Ovario** pedicelado, sulcado, 25-45 mm de largo, 1.0-1.5 mm de grosor. **Flores** vistosas, 45-50 mm de diámetro, con aroma diurno, ligero, no muy agradable, dispuestas en las ramas en forma dística; sépalos y pétalos amarillo- verdosos con manchas pardo-claras a pardo-amarillentas, irregulares, con las venas marcadas; labelo amarillo. **Sépalos** extendidos, elípticos, agudos, con márgenes ondulados, carinados dorsalmente, 7- nervados; **sépalos dorsal** ligeramente conduplicado en el ápice, 15-23 x 5-10 mm; **sépalos laterales** oblicuos, connados brevemente en la base, falcados, 15-26 x 5-9 mm. **Pétalos** extendidos, ligeramente sigmoides, con márgenes ondulados, ligeramente carinados en el dorso, 5- a 7-nervados, 15-20 x 5-9 mm. **Labelo** trilobado, la base formando un ángulo de 45° con respecto a la columna, perpendicular al plano de los sépalos y pétalos, luego se dobla abruptamente hacia abajo al nivel del callo (formando un ángulo de 135° con respecto a la base) y en la parte donde comienza el lóbulo medio se vuelve a doblar hacia adelante, 20-35 mm de largo, 10-13 mm entre los **lóbulos laterales**; estos subcuadrados, con márgenes redondeados, convexos, 4-6 x 3.5-6.0 mm; **istmo** alargado, angosto, 10-14 x 3-5 mm; **lóbulo medio** ocupando menos de la mitad del largo del labelo, transversalmente oblongo, reniforme, bilobado, ápice hendido, con los márgenes laterales redondeados, bordes ligeramente sinuosos, 10-19 x 14-28 mm. **Callo** amarillo, extendiéndose 1/3 de la longitud total del labelo, formado por dos quillas laterales que terminan cerca de la mitad de la longitud del callo, con un diente agudo después de la quilla y separado de esta y una quilla central en forma de tubérculo trilobulado que se levanta sobre el labelo, 8-14 mm de largo, 3 mm de ancho. **Columna** corta, gruesa, 7-10 mm de largo, amarilla, alada, con tabula infraestigmática amarilla, prominente, formada por dos engrosamientos lateralmente aplanados, paralelos, entre ellos se forma un sulco profundo, si se observan lateralmente son subcuadrados; **alas** semiorbiculares, delgadas, paralelas a la cavidad estigmática, amarillas, 1.1-1.2 x 3.0-3.3 mm. **Antera** semiovoide, ápice obtuso, unilocular, con un tabique ligero, amarilla, 3.2 mm de largo, 2.2 mm de ancho.

Polinario: tipo XI de la clasificación de Chase (1987), 2.2-2.3 mm, formado por dos **polinios**, angostamente elipsoides, sulcados ventralmente, 1.1-1.2 mm de largo, 0.4-0.5 mm de ancho; **estípite** laminar, con los bordes basales ligeramente revolutos, formando un pico agudo en el ápice por la parte dorsal, 1.5 mm de largo; **viscidio** pequeño en comparación al tamaño total del polinario, ovoide, pardo-rojizo. **Clinandrio** ovado, con dos depresiones donde descansan los polinios. **Rostelo** triangular, muy corto. **Cavidad estigmática** subcuadrada, cóncava, brillante, blanco-verdosa. **Cápsula** angostamente ovoide, 7.0-8.5 mm de largo, 1.7-2.0 cm de ancho con pedicelo de 3 cm de largo (Fig. 1).

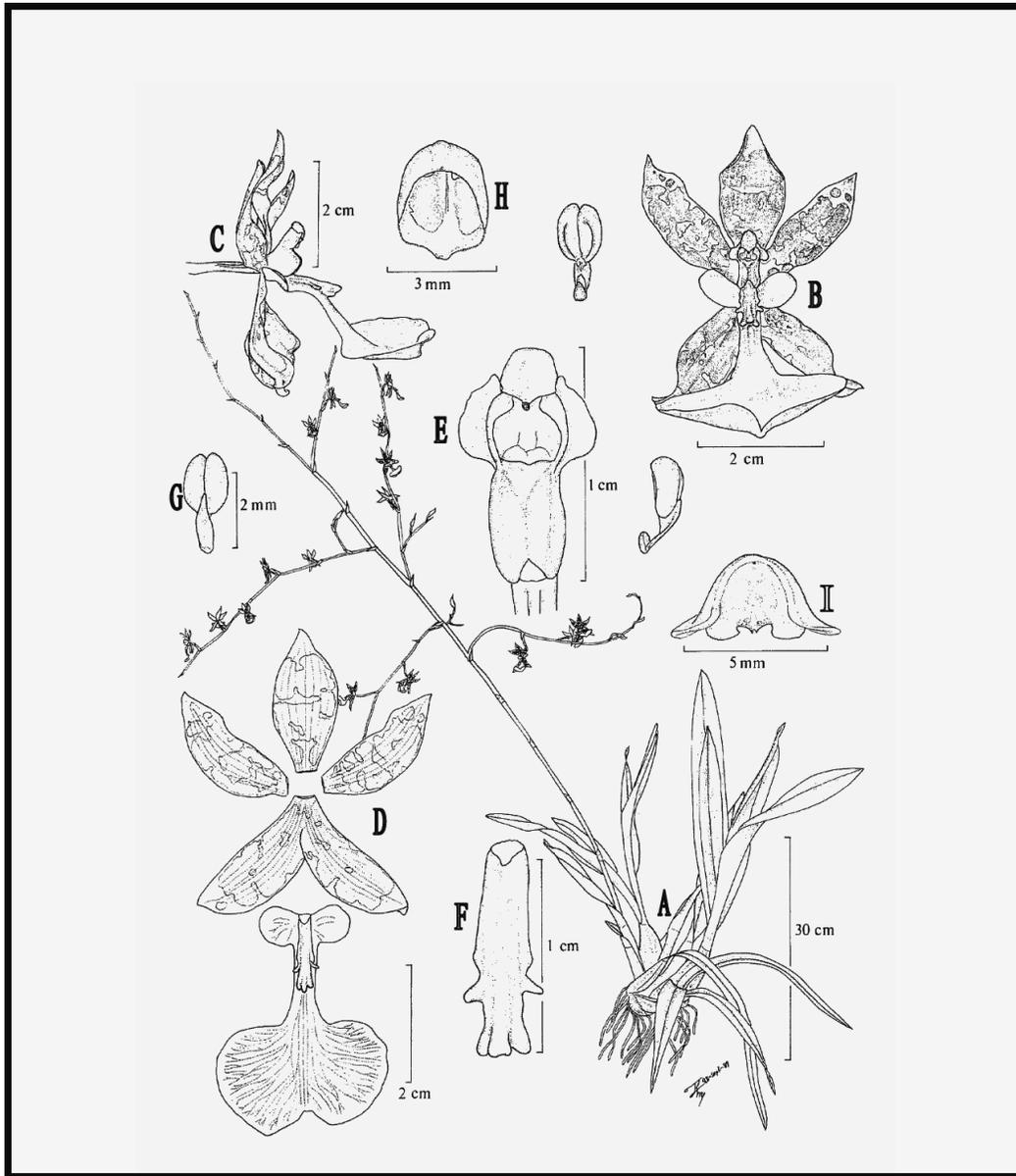


Fig. 1 *Oncidium unguiculatum* Lindl. Dibujo tomado de Jiménez, 2008. A. Planta. B. Flor vista de frente. C. Flor vista de perfil. D. Flor disecada. E. Columna. F. Callo. G. Polinario. H. Antera. I. Columna mostrando el clinandrio.

2.4 Distribución y hábitat

Oncidium unguiculatum está distribuida en el Eje Volcánico Transversal y la Sierra Madre del Sur; se puede encontrar en zonas muy localizadas, en los estados de Morelos, Guerrero, Oaxaca y Estado de México, habiendo un número reducido de poblaciones a lo largo del rango de su distribución. (Mc Vaugh, 1985; Hágsater *et al.*, 2005; Jiménez, 2008) (**Mapa 1**).

Es una planta epífita que crece en los bosques húmedos o subhúmedos de *Quercus* y bosque húmedo de *Pinus-Quercus* con elementos mesófilos, entre los 1800 y 2600 m de altitud. Se puede ver en floración de octubre a marzo (Espejo *et al.*, 2002; Jiménez, 2008).



Figura 2. Mapa de distribución en México de *Oncidium unguiculatum* Lindl. (tomado de Jiménez, 2008).

En el presente trabajo se describe el método desarrollado para la micropropagación de *Oncidium unguiculatum*, como alternativa para la propagación masiva de la especie, con el propósito de satisfacer la demanda comercial y, de esta forma, reducir la depredación de las poblaciones silvestres, contribuyendo de alguna manera a su conservación dentro de la naturaleza.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen cuatro maneras de obtención de orquídeas epífitas: 1. El saqueo ilegal de plantas de la naturaleza y su venta a bajo precio, 2. La propagación vegetativa, lenta y poco redituable, 3. La propagación *in vitro* a través de semillas y 4. El cultivo de tejidos (Damoen *et al.*, 2004).

Debido a que *Oncidium unguiculatum* es endémica de México, con poblaciones reducidas en su área de su distribución (Jiménez, 2008) y al , crecimiento desmedido de asentamientos humanos en los últimos años y la tala clandestina e inmoderada, así como a la extracción excesiva de su hábitat (debido a la belleza de sus flores), sus poblaciones se verán severamente afectadas en muy poco tiempo. Es por ello, que se necesitan más y mejores planes de manejo y de conservación, así como estudios enfocados a la propagación masiva, sea éstos con fines de conservación *ex situ* o de comercialización, para reducir la extracción indiscriminada de esta especie y otras especies.

La importancia de estudiar la germinación y micropropagación de *Oncidium unguiculatum* radica en que, aparte de ser una especie endémica de crecimiento vigoroso, posee inflorescencias ramificadas y flores de particular atractivo. Tiene, como otras especies cercanamente relacionadas, 56 cromosomas y los resultados de ADN recientes lo ubican dentro del Grupo *Hastatum* denominado así por Chase y Zelenko (2002). Comparte ese conjunto cromosómico con especies de singular belleza, como *Oncidium tigrinum*, *O. maculatum*, *O. leucochilum*, *O. stelligerum*, *O. hastilabium* y otros no menos atractivos, con los que pueden producirse híbridos de gran calidad. Así mismo, está relacionado con los *Oncidium* de otros grupos afines como *Anthocrene* y *Sphacelatum* (Chase y Zelenko, 2002), lo que le confiere mayor potencial hortícola y comercial.

4. Objetivos

General

- Establecer un método eficaz de germinación y proliferación *in vitro* de la orquídea *Oncidium unguiculatum* Lindl. para favorecer su conservación *ex situ*.

Particulares

- Determinar el medio de cultivo más conveniente para la germinación *in vitro* de *O. unguiculatum*.
- Encontrar al menos un tipo de tejido que permita la proliferación de plántulas.
- Determinar las condiciones necesarias para el cultivo *in vitro*, tanto de la germinación como del cultivo de tejidos.
- Iniciar el proceso de aclimatización de las plántulas de *O. unguiculatum* a las condiciones *ex vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

El material biológico que se utilizó para la realización de este trabajo, fueron semillas provenientes de una cápsula madura (dehiscente), generada en una planta cultivada de la especie en estudio.

5.2 Prueba de viabilidad

Para comprobar la viabilidad de las semillas, se tomaron 100 semillas de la cápsula, utilizando para ello una solución de 2,3,5 Cloruro de trifeníl-tetrazolium (TTC) al 1% de acuerdo con van Waes y Debergh, (1986). Las semillas fueron colocadas en un tubo Eppendorf con 1ml de la solución de TTC y se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 30°C durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo, las semillas se examinaron con la ayuda de un microscopio óptico, el criterio que se siguió para la evaluación de la viabilidad fue el color del embrión de las semillas, los embriones que se presentaron completamente teñidos de color rojo se les consideraron viables. En este caso el porcentaje de viabilidad fue del 100%.

5.3 Desinfección y siembra del material biológico

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (Clorox) al 0.6% (V/V), adicionada con una gota de dispersante

(Tween, 20) agitando el tubo constantemente durante 15 minutos. Posteriormente, bajo condiciones asépticas; esto es, dentro de una campana de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas y enjuagadas, las semillas fueron puestas en una caja Petri estéril.

Con la ayuda de una pequeña espátula estéril, se contaron y colocaron 300 semillas en cada uno de los frascos Gerber conteniendo 20ml de medio de cultivo, se cubrieron con papel aluminio y se sellaron con plástico autoadherible. Se hicieron 5 repeticiones por cada cultivo empleado. Posteriormente las frascos fueron etiquetados con la fecha de siembra y colocados en un cuarto de incubación.

5.4 Medios y condiciones de cultivo

Germinación

Para la germinación de las semillas se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Knudson C (KC, Apéndice A).
- Murashige-Skoog, a la mitad de su concentración (MS [1/2], Apéndice B) y suplementado con sacarosa al 3%.

Realizando 10 repeticiones por cada medio.

El pH de los medios se ajustó a 5.6 con la ayuda de un potenciómetro y las soluciones de KOH y HCl a 0.1, 0.5 y 1M. Luego de ese ajuste, los medios se adicionaron con 6.5 g/L^{-1} de Agargel como agente gelificante. Posteriormente se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121°C y una presión de 1.5 kg/cm^2 durante 15 minutos.

El cuarto de incubación se mantuvo bajo condiciones controladas de temperatura (30°C) y luz ($12 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

5.5 Germinación

Se tomó como semilla germinada, aquella en la que el embrión se había hinchado y adquiriría una tonalidad verde en su color.

Para evaluar el porcentaje de germinación se realizó el conteo total de las semillas germinadas en cada uno de los frascos de los dos medios.

5.6 Cultivo de tejidos

Una vez ocurrida la germinación a la germinación, el correspondiente al 50% de los protocormos obtenidos, se separaron y se colocaron en medio líquido MS [1/2] sin reguladores exógenos, (Apéndice B) con 30 g/L⁻¹ de sacarosa, se mantuvieron en agitación y se subcultivaron cada 8 semanas. Después del tercer subcultivo se separaron y se sembraron en medio sólido MS [1/2], sin reguladores exógenos y suplementado con sacarosa al 3%, para iniciar la morfogénesis. Ya en medio sólido, se realizaron subcultivos cada 8 semanas de acuerdo con Damon *et al.* (2004). De la misma manera se procedió con el otro 50% de los protocormos derivados de la germinación de las semillas y se inocularon en medio sólido, sin reguladores de crecimiento exógenos para inducir la morfogénesis.

Cuando las plántulas alcanzaron una talla entre los 3 y 3.5 cm de longitud, se subcultivaron en medio MS completo (apéndice B) con 30 g /L⁻¹ de sacarosa y 0.5 g/L⁻¹ de carbón activado, en envases transparentes magenta GA7 (SIGMA) con tapas translúcidas para permitir una mayor penetración de luz (12μmol m⁻²s⁻¹), además de presentar un mayor volumen que permitiera a las plantas continuaran con su desarrollo.

Posteriormente, las plántulas se subcultivaron en medio sólido MS completo conteniendo diferentes concentraciones de sacarosa (60 g/L⁻¹, 30 g/L⁻¹ y 0 g/L⁻¹60, Rego-Oliveira *et al.*, 2003), en las mismas condiciones de luz y temperatura. Esto con la finalidad de evaluar la capacidad fotosintética y la respuesta de las plantas ante el proceso de aclimatización.

5.7 Medición de la capacidad fotosintética de las plantas

Para determinar el grado de actividad fotosintética de los cultivos, se midió dicha actividad en plántulas de cada uno de los tratamientos de las distintas concentraciones de sacarosa. Para esto se utilizó un analizador infrarrojo (IRGA) antes de la extracción de las plantas de los envases en los que se mantuvieron en cultivo. El análisis se realizó en las plantas a las tres semanas de haber iniciado los tratamientos a diferentes concentraciones de sacarosa y, tres semanas previas al inicio del proceso de aclimatización. Este análisis se realizó con la finalidad de disponer de datos de la adaptación de las plantas durante el proceso de aclimatización *ex vitro*.

5.8 Aclimatización

La aclimatización es un proceso dirigido a la adaptación *ex vitro* de las plántulas. Para realizarla, las plántulas se extrajeron de las cajas magenta con medio de cultivo, se les quitó el exceso de medio con agua destilada estéril, para ser transferidas posteriormente a envases de plástico transparente con un sustrato constituido en su totalidad por agrolita, siguiendo el proceso de adaptación con la disminución paulatina de humedad relativa, que consistió en ventilar poco a poco (cada cinco días) los cultivos durante 30 días posteriores a la extracción (Sarabia,

2001; citado por Ávila y Salgado, 2006). Transcurridas dos semanas posteriores al inicio de la etapa de aclimatización, se efectuaría una siguiente medición de la actividad fotosintética que las plantas estaban teniendo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La propagación *in vitro* ha sido utilizada como un medio rápido de propagación vegetativa en la industria de la horticultura de ornamentales, junto con otras técnicas biotecnológicas, permitiendo la obtención de un gran número de plantas en cualquier época del año (Sorace *et al.*, 2008). No obstante, también se considera una herramienta más para coadyuvar en la conservación de especies vegetales; la familia Orchidaceae es un ejemplo de ello (Rubluo *et al.*, 1993; Cahuantzi, 1998; Espinosa, 2002; Damon *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005; Ávila y Salgado, 2006). Siendo esos, los principales motivos que impulsaron a la realización de este trabajo, es preciso, no obstante, abordar la problemática de conservación en la cual se encuentra *Oncidium unguiculatum*, ya que desde la NOM-059-ECOL-2001 y en la NOM-059-SEMARNAT-2010 es considerada como una especie amenazada (SEMARNAT, 2002; SEMARNAT, 2010). Considerando su estatus de conservación, la misma NOM-059-ECOL-2001 y la NOM-059-SEMARNAT-2010 presenta inconsistencias catalogando a *O. unguiculatum* como una especie NO ENDÉMICA. Por lo que es imperante señalar que esta especie se distribuye únicamente dentro del territorio mexicano (Dodson, 1992; Jiménez, 2008), las poblaciones de esta especie son pequeñas y se encuentran en lugares muy localizados, existiendo un número reducido de las mismas a lo largo de su rango de distribución, en los estados de Morelos, Guerrero, Oaxaca y Estado de México (McVaugh, 1985; Hágsater *et al.*, 2005; Jiménez, 2008).

Probablemente, la situación anterior pudo haberse suscitado debido a una confusión al momento de la búsqueda de información sobre distribución de *Oncidium unguiculatum* Lindl. (The Journal of the Horticultural Society of London, 1846) con *Oncidium unguiculatum* Klotzsch (Otto y Dietrich, 1849), esta última considerada como sinónimo heterotípico no válido de *Gomesa concolor* Hook (Govaerts, 2003;

Königer, 2005), cuya distribución va desde Brasil hasta el norte de Argentina (Zuloaga *et al.*, 2008).

6.1 Germinación

El tiempo de germinación de las semillas de *O. unguiculatum* en el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS[1/2]) y sin reguladores de crecimiento fue de 32 días. Desde la siembra hasta el primer indicio de la misma, consistió en el hinchamiento del embrión y su cambio de color a verde (Fig. 4 A). Trece días después (esto es a los 45 días posteriores a la siembra) ya se podía observar un protocormo bien definido (Fig. 4 B). 60 días posteriores a la siembra sólo había germinado el 65% (Fig. 3). Fueron necesarios 75 días para la germinación del 93% de las semillas, contrastando con lo descrito por Ávila y Salgado (2006), que pudieron obtener el 100% de germinación entre 30 y 45 días de cultivo y también con lo publicado por Lee y Lee (1991, citado por Ávila y Salgado, 2006) referente a especies que pueden llegar a mostrar 100% de las semillas germinadas entre los 30 y 60 días posteriores a la siembra.

Según Ávila y Salgado (2006), es posible que el tiempo de este proceso pudiese ser acortado mediante el uso de reguladores de crecimiento, como lo proponen. Estos autores obtuvieron resultados favorables con 9 especies de orquídeas mexicanas, al adicionar el medio de cultivo con citocininas (BA), acelerando el proceso de germinación y haciéndolo homogéneo. Stuart y Kane (2006) concluyen algo similar, pero para *Habenaria macroceratitis*.

Por otra parte, en el medio Knudson C (KC) (Apéndice A), la germinación después de 60 días posteriores a la siembra fue sólo del 6% (gráfica 1), no habiendo desarrollo ni proliferación posteriores a esa fecha.

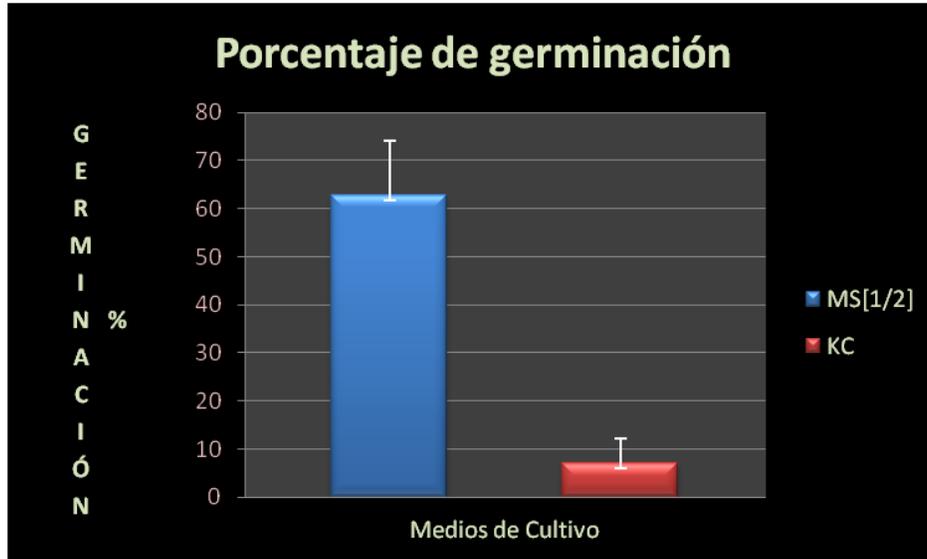


Figura 3. Porcentaje de germinación de *O. unguiculatum* en los medios MS [1/2] y KC.

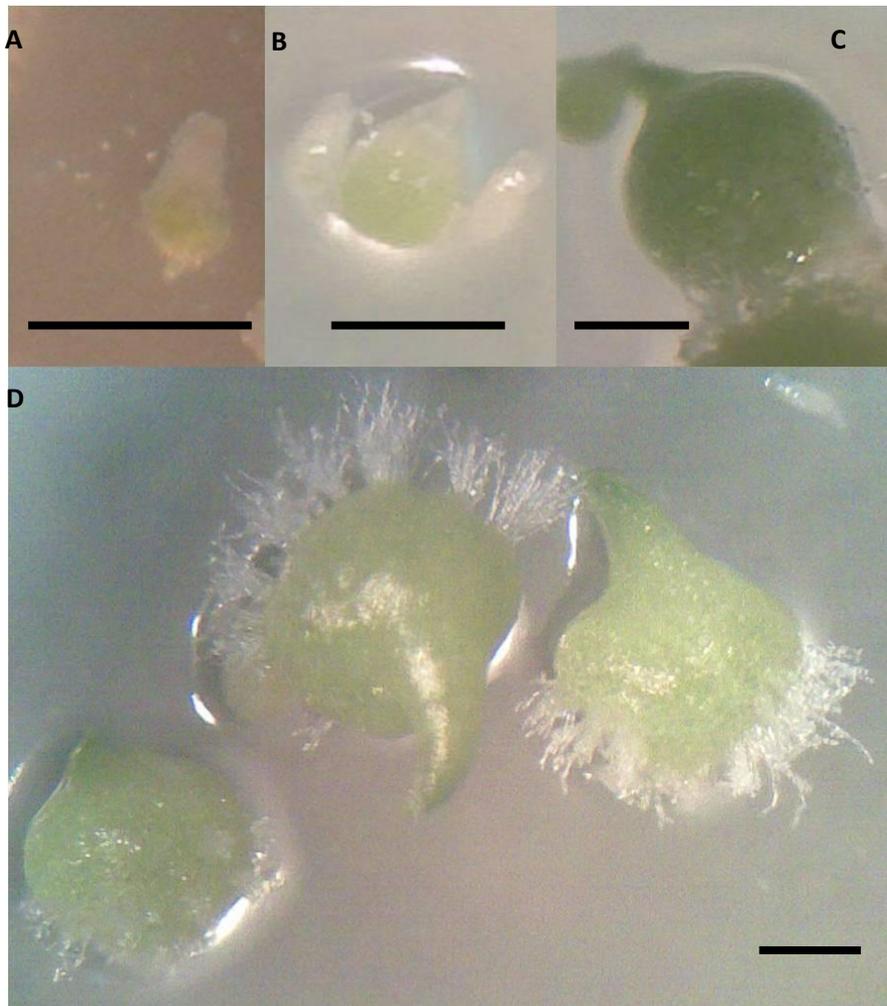


Figura 4. Etapas de germinación asimbiótica de semillas de *O. unguiculatum* en MS[1/2] . A) Germinación de semillas 32 días posteriores a la siembra. B) Protocormo bien definido después de 45 días de cultivo. C) Primordio de hoja en protocormo. D) Protocormo con rizoides 60 días después de la germinación (Barra = 3mm).

6.2 Cultivo de tejidos

6.2.1 Inducción

La masa (g) de 50% de los protocormos que fueron separados y cultivados en medio MS [1/2] líquido, sin reguladores de crecimiento (Fig. 6 A), se incrementó de 2.105 g a 37.67 g durante 37 semanas en que se mantuvieron en cultivo (Figs. 5, 6B). No obstante, este resultado, puede mejorarse muy probablemente con la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo líquido; ya que estos favorecen el crecimiento y desarrollo del material vegetal *in vitro* (George y Sherrington, 1984 citado por Suárez, 2006). Otro factor que podría coadyuvar con el crecimiento y desarrollo del material vegetal, es la modificación en las concentraciones de sacarosa, reduciéndolas tal como lo han hecho Cheng y Chang (2001), puede promover la capacidad para la producción de embriones somáticos, agregando Thidiazuron (TDZ), obteniendo resultados positivos. Sin embargo, cabe mencionar que esos experimentos fueron realizados en medios sólidos y no se cuenta con información que respalde el uso de estas modificaciones en medios líquidos.

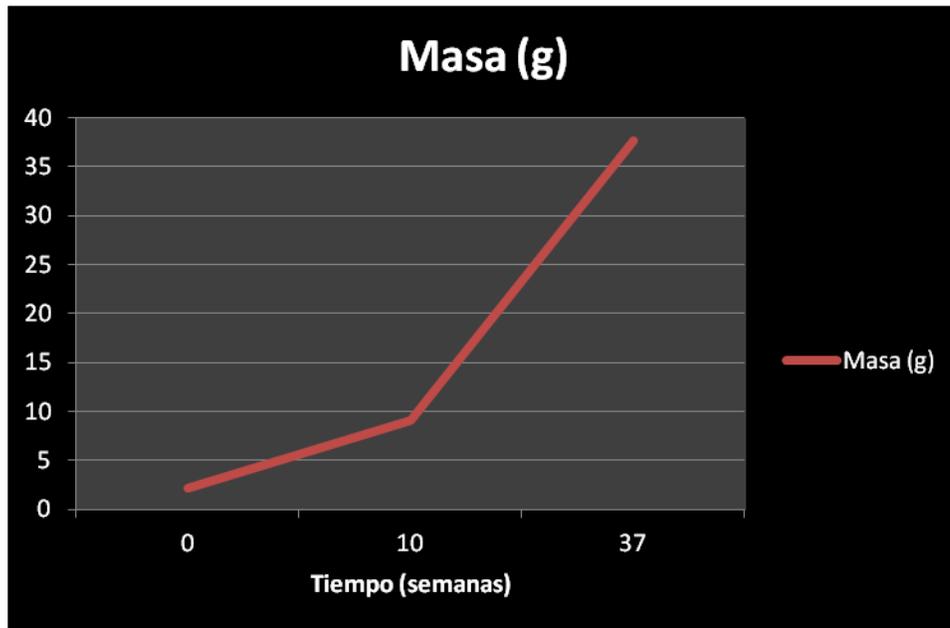


Figura 5. Masa (g) del material verde (PLB) que se cultivó en medio líquido MS [1/2] obtenidos de las plántulas obtenidas de semilla.



Figura 6. A) Cultivo de protocormos de *O. unguiculatum* en medio líquido MS [1/2] y, B) Detalle de PLB después de 37 semanas de cultivo en medio líquido.

Tras 28 semanas de cultivo, aproximadamente el 30% de las plántulas comenzaron a formar basalmente cuerpos parecidos a protocormos (PLB), sin la necesidad de agregar reguladores de crecimiento exógenos (Figs. 7A, 8A, 8B).

Se ha mencionado en la literatura, que la formación de PLB puede obtenerse a partir de diferentes tejidos como hojas, inflorescencias, protocormos raíces (Kerbaui, 1993; Chen y Chang, 1999; Chen y Chang, 2000b). Sin embargo, cabe señalar que la formación de los PLB sin la adición de reguladores de crecimiento exógenos posiblemente se debió en parte, a las características del medio, la concentración de sacarosa, las condiciones de cultivo y rasgos fisiológicos propios de la especie.

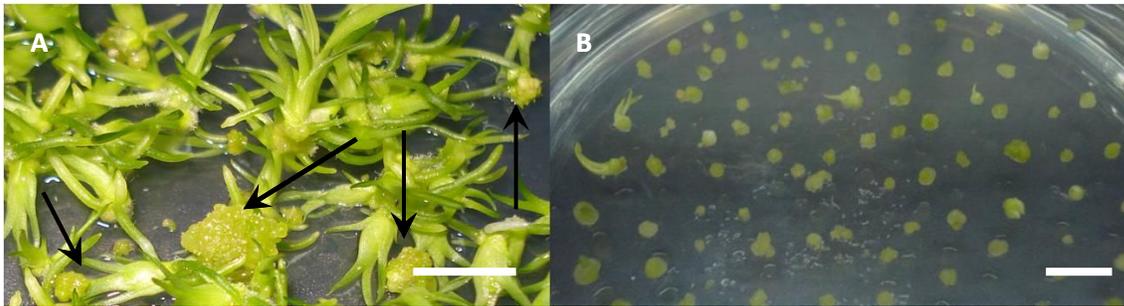


Figura 7. A) PLB de *Oncidium unguiculatum* en formación en plántulas después de 28 semanas de cultivo en medio MS [1/2] (flechas). B) PLB inoculados en medio MS [1/2] sin reguladores de crecimiento para iniciar morfogénesis (barra=1cm).

Los PLB derivados de plántulas, fueron separados y puestos en medio MS [1/2] sin reguladores de crecimiento para comenzar con la morfogénesis (Fig. 7 B), y obtener una plántula totalmente desarrollada 24 semanas después de iniciado el cultivo (Fig. 9).

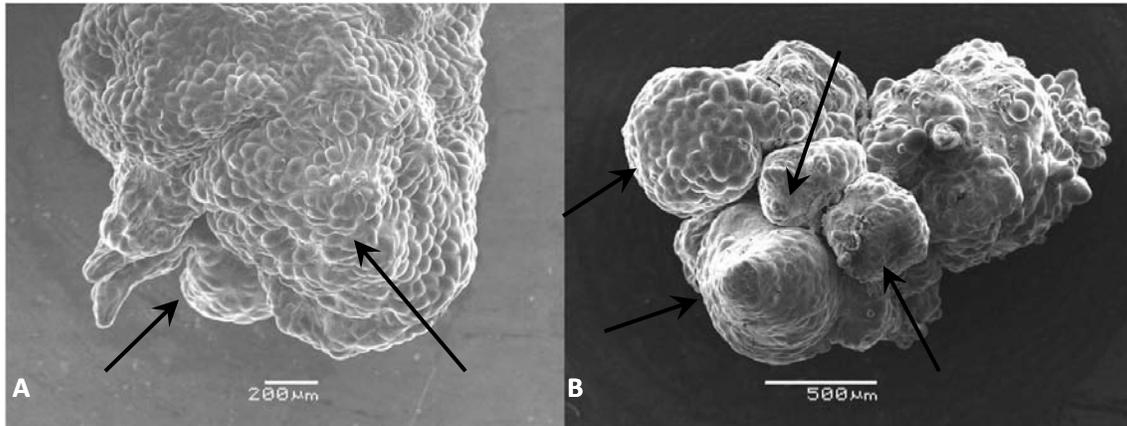


Figura 8. Microfotografías electrónicas de barrido de *O. unguiculatum* A) del inicio de la formación de PLB (flechas) a partir de plántulas derivadas de semilla y, B) de PLB en desarrollo, formados a partir de plántulas obtenidas a partir de semilla.

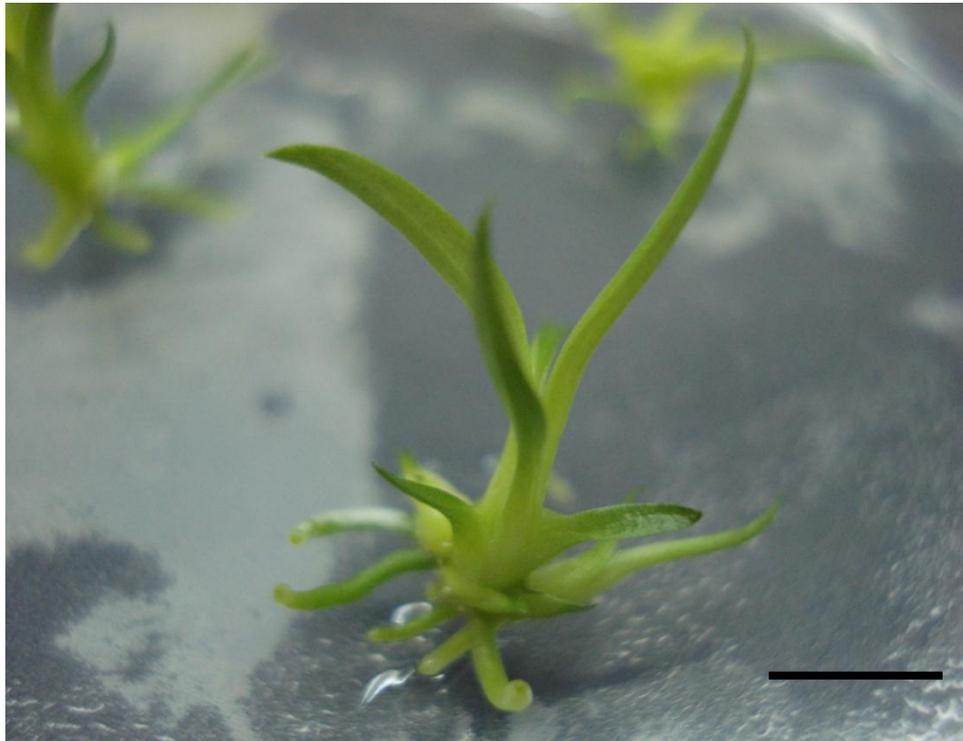


Figura 9. Plántula de *Oncidium unguiculatum* después de 24 semanas derivada de PLB y cultivada en medio MS [1/2] (barra=1cm).

Después de 36 semanas de cultivo, las plántulas presentaron ya, una talla de 3 – 3.5 cm. En este punto las plántulas fueron subcultivadas en medio MS completo adicionado con 30 g /L⁻¹ de sacarosa y 0.5 g/L⁻¹ de carbón activado. El subcultivo de las plántulas al medio MS completo, se debió a que las plántulas presentaban amarillamiento en las hojas más jóvenes y las raíces habían dejado de desarrollarse; esto debido, posiblemente a que los nutrimentos del medio fueron insuficientes para el correcto desarrollo de la plántula.

Cuatro semanas después de que las plántulas fueron transferidas del medio MS [1/2] a MS con concentración completa, se subcultivaron nuevamente en medio sólido MS completo pero ahora con diferentes concentraciones de sacarosa (60 g/L⁻¹, 30 g/L⁻¹ y sin sacarosa, Rego-Oliveira *et al.*, 2003).

60 días posteriores al subcultivo en medio MS completo con las diferentes concentraciones de sacarosa (60 g/L^{-1} , 30 g/L^{-1} y sin sacarosa), se pudieron observar claras diferencias entre los tres tratamientos. Por una parte, las plántulas cultivadas en el medio sin sacarosa presentaron un atraso notorio en su crecimiento, las hojas se volvieron cloróticas (Fig.10 A) y la mayor parte de las plántulas murieron después de los 90 días de tratamiento.

En el caso de las plántulas del grupo control (MS con 30 g/L^{-1}) el crecimiento fue normal aunque se notó una leve clorosis en algunas de las hojas adultas (Fig. 10 B), sin embargo la supervivencia después de noventa días de aplicado el tratamiento, fue del 100%.

Las plántulas en medio MS con 60 g/L^{-1} de sacarosa (Fig. 10 C) mostraron un incremento notable en su talla, llegando en promedio a 9 cm de longitud (Fig. 10 D), sus raíces se encontraban bien desarrolladas. No hubo rastros de clorosis en ninguna de sus hojas. Por otra parte, hubo formación de PLB en la parte basal de las plántulas, así como el inicio de brotes múltiples (Fig. 11).

Algunos trabajos han mostrado que la habilidad de las células para inducir la embriogénesis somática y el desarrollo de embriones somáticos fue influenciado por las fuentes de carbohidratos y las concentraciones utilizadas en el cultivo (Schiraldi *et al.*, 2002; Tokuhara y Mii, 2003; citado por Jheng *et al.*, 2006). Sin embargo, Cheng *et al.* (1999) consideran que la formación de embriones directamente de las células de las hojas provee una gran oportunidad para la clonación *in vitro*. En la embriogénesis somática, la fuente de carbohidratos también ha sido reportada como un parámetro importante en la conversión de embriones a plántulas (Jheng *et al.*, 2006).

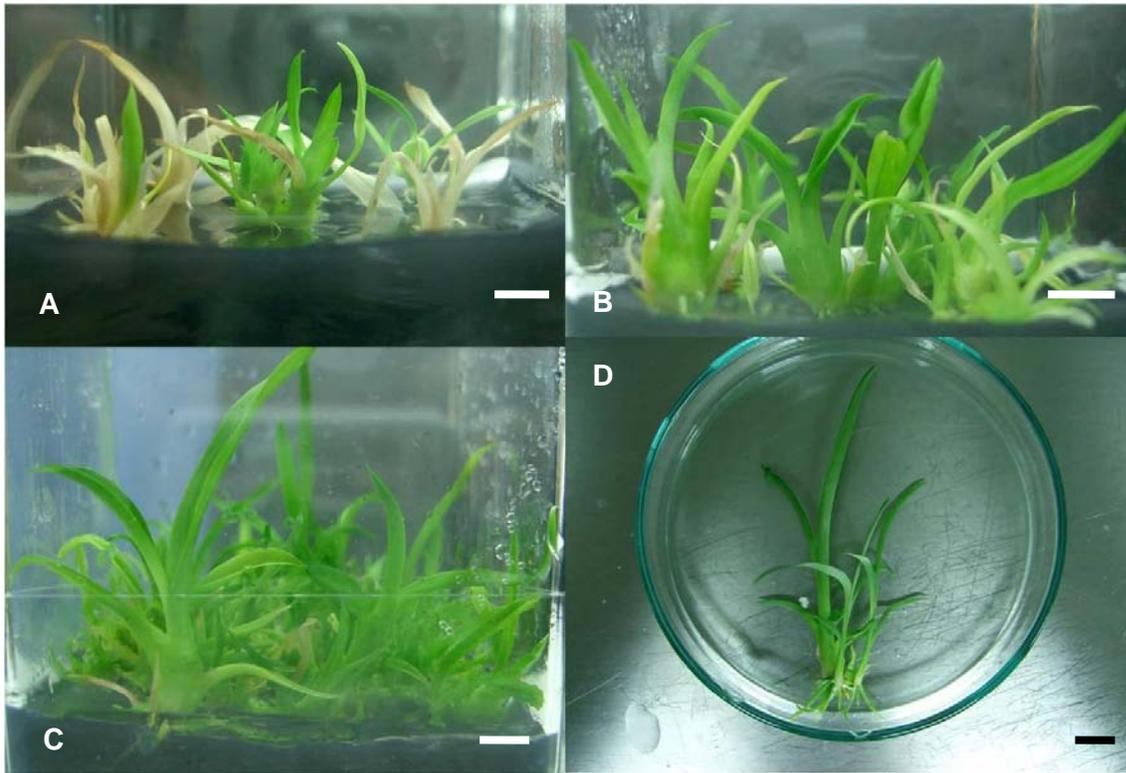


Figura 10. Plántulas de *Oncidium unguiculatum* después de 60 días de tratamiento en medio MS con diferentes concentraciones de sacarosa. A) Sin sacarosa. B) Grupo control con 30 g/L⁻¹ C) Con 60 g/L⁻¹ y D) Plántula con una talla de 9cm de longitud, extraída del medio MS con 60 g/L⁻¹ de sacarosa (barra=1cm).



Figura 11. Plántula de *O. unguiculatum* de 15 meses de edad con brotes múltiples y formaciones basales de PLB (flecha), cultivada en MS completo, adicionado con 6% de sacarosa (barra=1cm).

6.3 Medición de la capacidad fotosintética de las plantas.

La medición de la actividad fotosintética, tuvo por objeto analizar los datos de las plántulas en los tratamientos con las diferentes concentraciones de sacarosa, dos semanas antes de su extracción del frasco y dos semanas después. Esto con la finalidad de conocer cuál podría ser el medio de cultivo que mayor encausara a adaptarse a las condiciones *ex vitro*. Desafortunadamente el IRGA sólo funcionó para una primera medición (Fig. 12) antes de presentar fallas y debido a esto ya no pudo realizarse una segunda medición.

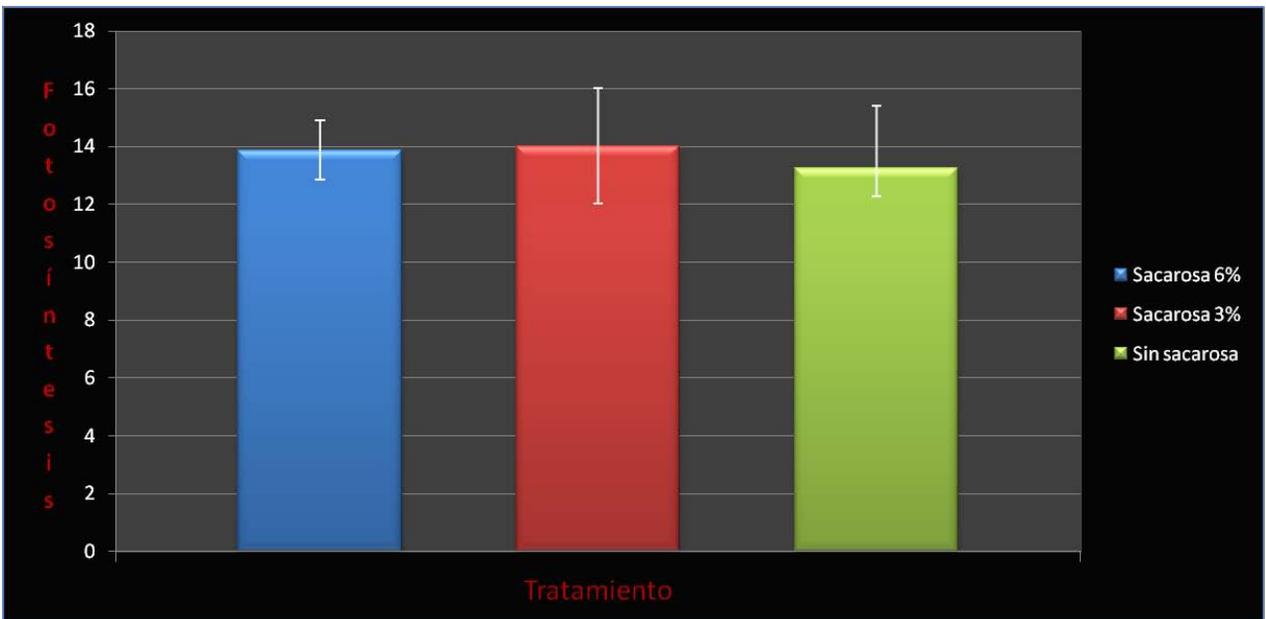


Figura 12. Muestra el nivel fotosintético de las plántulas en condiciones *in vitro* en las tres concentraciones de sacarosa.

Los datos que se obtuvieron, coinciden con las respuestas a mediciones de fotosíntesis realizadas en plantas C3 por Avadhani *et al.* (1980). Expresado de otra manera, los niveles de fotosíntesis de las plántulas en las diferentes concentraciones de sacarosa no presentan diferencia alguna, pero son normales para orquídeas C3, como *Arundina graminifolia*, *Bromheadia finlaysoniana*, *Spathoglottis plicata* y el propio *Oncidium unguiculatum*. Sería difícil llegar a una conclusión, puesto que hicieron falta más mediciones y debido a esto no puede saberse, si alguno de los medios con las diferentes concentraciones de sacarosa, pudiera favorecer o no la aclimatización (adaptación a condiciones *ex vitro*) presentando una baja tasa de mortalidad.

6.4 Aclimatización

La aclimatización es el proceso de transición de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro* (Debergh, 1991).

Esta fase sólo pudo llevarse a la primera etapa, debido a que la contaminación de las plántulas por hongos afectó la totalidad del cultivo.

7. CONCLUSIONES

- El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el medio MS a la mitad de su concentración con un porcentaje de germinación de casi 80% de las semillas sembradas.
- El cultivo de los protocormos en medio líquido MS a la mitad de su concentración y sin necesidad de agregar reguladores de crecimiento exógenos, permitió la proliferación e inducción de PLB, dando por resultados el incremento de la masa de 2.105g a 37.67g en 37 semanas de cultivo.
- El medio MS a la mitad de su concentración fue un excelente medio para la morfogénesis.
- El medio MS en concentración completa resultó ser adecuado para el desarrollo y crecimiento de las plántulas.
- En el desarrollo de plántulas, más grandes, pero también el desarrollo de brotes múltiples y formación de PLB, el medio MS en su concentración completa, adicionado con 6% de sacarosa resultó ser apropiado sin la necesidad de utilizar reguladores de crecimiento exógenos.

8. APÉNDICES

Apéndice A. Medio de cultivo Knudson C modificado (KC) (Sigma 4003)

Componente	Cantidad (mg/L ⁻¹)
Sulfato de Amonio	500
Ácido Bórico	0.056
Nitrato de Calcio	694.4
Sulfato Cúprico	0.0624
Sulfato Ferroso	25.0
Sulfato de Magnesio	122.125
Sulfato de Manganeso	5.078
Trióxido de Molibdeno	0.016
Fosfato de Potasio Monobásico	250.0
Sulfato de Zinc	0.331
Sacarosa	20 000

Apéndice B. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (Sigma 5519)

	Compuesto	MS completo g/L ⁻¹	MS [1/2] g/L ⁻¹
SALES INORGÁNICAS	Nitrato de Amonio	1650.0	825.0
	Ácido Bórico	6.2	3.1
	Cloruro de Calcio (Anhidro)	332.2	166.1
	Cloruro de Cobalto	0.025	0.0125
	Sulfato de Cobre	0.025	0.0125
	Ácido Etilendiaminotetraacético (sal disódica)	37.26	18.63
	Sulfato Ferroso	27.8	13.9
	Sulfato de Magnesio	180.7	90.35
	Sulfato de Manganeso	16.9	8.45
	Ácido Molíbdico (sal sódica)	0.25	0.0125
	Yoduro de Potasio	0.83	0.415
	Nitrato de Potasio	1900	950
	Fosfato Monobásico de Potasio	170	85
	Sulfato de Zinc	8.6	4.3
ORGÁNICOS	Glicina	2.0	1.0
	mio-Inositol	100.0	50.0
	Ácido Nicotínico	0.5	0.25
	Piridoxina	0.5	0.25
	Tiamina	0.1	0.05

9. LITERATURA CITADA

Anderson, B.; S. D. Johnson y C. Carbutt (2005). Exploitation of a specialized mutualism by a deceptive orchid. *Amer. Jour. of Bot.* 92: 1342-1349.

Arditti, J. (1984). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press. Ithaca, USA. 432 p.

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchids Biology*. United States of America. John Wiley and Sons.

Arditti, J. y R. Ernst 1993. *Micropropagation of orchids*. Willey New York.

Arditti, J. y G.A. Abdul K. 2000. Numerical and physical propeties of orchid seeds and their biological implications. *New Phyto.* 145:367-421.

Avadhani, P. N.; C. J. Gho; A. N. Rao y J. Arditti. 1980. Carbon Fixation in Orchids. *Orchid Biology: Biochemistry-Physiology.* 175-193

Ávila, D.I. y K. Oyama 2000. Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (*Orchidaceae*). *Biodiversitas* 8:9-12.

Ávila, D.I. y R. Salgado, G. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para su conservación. *Biológicas* 8:138-149.

Basker, S. y B. V. Normantha. 2006. Micropropagation of *Coelogyne stricta* (D. Don) Schltr. Via pseudobulbs segments. *Trop. and Subtr. Agro* (6): 31-35

Cahuantzi, A. C. V. 1998. Propagación *in vitro* de *Oncidium cavendishianum* Batem (*Orchidaceae*) a partir de explantes de la inflorescencia. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala, UNAM.

Chase, M.W. (2001). The origin and biogeography of Orchidaceae. In Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase M.W. and Rasmussen, F. eds. *Genera orchidacearum, Vol. II: Orchidoideae (part I)*. pp. 1-5. Oxford University Press, Oxford.

Chase, M. W. y H. Zelenko. 2002. *The pictorial encyclopedia of Oncidium*. ZAI. Publications, Quito, Ecuador.

Chen, J.T., C. Chang, W. Chang, C. 1999. Direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' and subsequent plant regeneration. - Plant Cell Rep. 19: 143-149.

Chen, J.T., W. Chang, C. 2000a. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). - Plant Sci. 160: 87-93.

Chen, J.T., W. Chang, C. 2000b. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium* 'Sweet Sugar'. - Plant Cell Tissue Organ Cult. 62: 95-100.

Chen, J.T., W. Chang, C. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. - Plant Growth Regul. 34: 229-232.

Chen, J.T., W. Chang, C. 2002. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* 'Gower Ramsey'. - Plant Cell Tissue Organ Cult. 69: 41-44.

Chen, J.T., W. Chang, C. 2003a. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid enhances direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. - Biol. Plant. 46: 455-458.

Chen, J.T., W. Chang, C. 2003b. Effects of GA3, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium in vitro*. - Plant Cell Tissue Organ Cult. 72: 105-108.

Chen, J.T., W. Chang, C. 2004. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. - Plant Cell Tissue Organ Cult. 79: 315-320

Damon, A.; G.E. Aguilar; L. Rivera y V. Nikolaeva. 2004. Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. Chapingo 10(2):195-203.

Debergh, P. C. 1991. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. Acta Horticulturae 289: 291-300.

Dixon, K. W.; S. P. Kell; Barrett, R. L. and Cribb, P. J. 2003. Orchid Conservation. pp. 1-24.

Dodson, C. H. 1992 Checklist of the Orchids of the Western Hemisphere. Draft manuscript deposited in Missouri Botanical Garden Library.

Dressler, R. L. 1981. The orchids: Natural history and classification. London, England. Harvard University Press.

Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland.

Espejo, S. A. y F. A. R. López Ferrari. 1998. Las Monocotiledoneas mexicanas una sinopsis florística 1. Lista de Referencia Parte VII. Orchidaceae I. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Mexico. 90 p.

Espejo, S. A.; C. J. Garáz; F. A. R. López; M. R. Jiménez y S. L. Sánchez. 2002. Orquídeas del estado de Morelos. *Orquídea (Méx)* 16:222-223.

Espinosa, G. A. M. 2002. Proliferación de *Rhynchostele bictoniense* (ORCHIDACEAE) a partir de explantes de material cultivado *in vitro*. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala, UNAM.

Govaerts, R. 2003. World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827. *Boa Tru Roy Bot Gar*, Kew.

George, P.S. y G. A. Ravishankar. 1997. In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants *Plant Cell Rep.* 16:490-494

Hadley, G. y G. Harvais. 1968. The Effect of Certain Growth Substances on Asimbyotic Germination and Development of *Orchis purpurella*. *New Phyt.* 67:441-445.

Hágsater, E. y M. A. Soto A. 1998. Orchid conservation in Mexico. *Selbyana* 19(1): 15-19.

Hágsater, E.; M. A. Soto A.; G.A. Salazar C.; R. Jiménez M.; M.A. López R. y R. L Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, 304 pp.

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

Harrison, G.R. y J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). Bot Gaz, 139:180-189.

Huber, F.K.; R. Kaiser; W. Sauter y F. P. Schiestl. 2005. Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). Oecología 142: 564-575.

Jiménez, M. R. 2008. Una revisión del género *Oncidium* Sw. (Orchidaceae) en México. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.

Jheng, F. Y.; Y. Y. Do; Y. W. Liauh; J. P. Chung y P. L. Huang. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus culture of *Oncidium Gower Ramsey* by adjusting carbohydrate sources. Plant Science 170:1133-1140.

Kalimuthu, K.; R. Senthilkumar; y N. Murugalatha 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. — a tropical orchid. Current science. 91(10): 1401-1403

Kalimuthu, K.; R. Senthilkumar y S. Vijayakumar. 2007. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). Afr. J. Biotechnol, 6:1171-1174.

Kerbauy, G.B. 1993. The effect of sucrose and agar on the formation of protocorm-like bodies in recalcitrant root tip meristems of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae). Lindleyana, 8(3):149-154.

Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic Germination of Orchids Seeds. Bot. Gaz. 73(1):1-25.

Knudson, L. 1950. Germination of Seeds of Vanilla. Amer. Jour. Bot. 37(3):241-247.

Königer, W. 2005. *Oncidium*. Eine Monographie / A Monograph. Ver. Hel. Kön, Mün. 2:1-256.

Košir, P.; Škof, S.; Z. Luthar. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. Acta agric slov, 83 (2):233-242

Lee, E. H.; C. A. Laguna; G. J. Murguía; M. P. Elorza; A. L. Iglesias; R. B. García; P. F. Barredo y B. N. Santana. 2007. Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* SSP. *Dawsonii*. UDO Agrícola. 7(1):58-67

Malabadi, R. B.; G. S. Mulgund y N. Kallappa. 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. *J. Plant Physiol.* 162:473-478.

Mata-Rosas, M.; R. J. Baltazar-García y V. M. Chávez-Ávila. 2011. *In vitro* regeneration through direct organogenesis from protocorms of *Oncidium tigrinum* Llave & Lex. (Orchidaceae), an endemic and threatened mexican species. *Hort. Sci.* 46(8):1132-1135.

Mc Vaugh, R. 1985. *Flora Novo-Galiciana. Orchidaceae*. The University of Michigan Press. Ann Arbor, Mich. 16:

Morel, G. M. 1974. Clonal multiplications of orchids. *The orchids*.

Newton, S. G.; S. A. Lopes L.; D. A. Garret; B. L. Antonio; A. A. Haruko y Ricardo, S. C. 2009. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. *BIOCIÊNCIAS*, Porto Alegre, 17(1): 82-85.

Otto, F. y A. Dietrich. 1849. *Allgemeine Gartenzeitung* 17:9.

Potisek, M. C.; M. Sarmiento y L.N. Puc. 1996. Germinación de semillas *in vitro* de *Laelia rubescens* Lindley y *Epidendrum stanfordianum* Batem. INIFAP. CIR-SURESTE Eds.. 1:187-192.

Quiñones, M. 2000. Micropropagación de orquídeas peruanas a escala piloto. Universidad Ricardo Palma. COCYTEC. Lima, Perú. 98 pp.

Rego-Oliveira, L. V.; F. R. Tadeu; F. I. Batista C. y C. Saconato. 2003. Inffluência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). *Semina. Cie. Agr., Lon.*, 24(2):265-272.

Rubluo, A.; V. Chávez; A. P. Martínez y V. O. Martínez. 1993. Strategies for the Riccovery of Endangered Orchids and Cacti Through *in vitro* Culture. *Biol. Cons.* 63:163-169.

Ruiz, B. C.; C. A. Laguna; A. L. Iglesias G.; A. Damon; H. T. N. Marín J.; R. H. Azpíroz S. y M. J. Moreno L. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *PHYTON* 77: 203-215

Santos, H.L., G.M. Martínez; J. Campos E. y E. Aguirre L. 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *Hortscience*, 40(2):439-442.

Sarmiento, M. P. y C. G. Romero. 2000. Orquídeas mexicanas. Grupo Editorial Miguel Angel Porrua. Mexico. 147 p.

Serna, A.L. 1999. Propagación *in vitro* de orquídea a partir de semilla sexual. Fitotecnia, 34:

SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental —Especies nativas de México de flora y fauna silvestre- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Diario oficial de la federación. 6 de marzo.

SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental —Especies nativas de México de flora y fauna silvestre- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Diario oficial de la federación, 30 de diciembre.

Smith, S. E. Asymbiotic Germination of Orchids Seeds on Carbohydrates of Fungal Origin. 1973. New Phytol. 72:497-499.

Sorace, M.; F.R. Tadeu; Y. L. Yukari; A., S. J. y T. L.S. Assari. 2007. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium bahueri* (Orchidaceae). Semina, 28(2):195-200.

Soto, A. M. A. 1994. Population studies in Mexican orchids. In: Pridgeon, A. M. (ed.) Proceedings, 14th World Orchid Ciongress. HMSO, Edinburgh. pp. 153-160

Soto, A. M. A. y G. Salazar A. 2004. Orquídeas. En: Garcia-Mendoza A. J., Ordonez, M. J. y Briones-Salas, M. (eds.) Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservacion de la Naturaleza-World Wildlife Fund. Mexico. pp. 271-295.

Stuart, S. L. y M. E. Kane. 2006. Asymbitic germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae) a rare Florida terrestrial orchid. Plan. Cel. Tiss. Org. Cult. 86:147-158

Su, Y.J.; J.T. Chen y W. Chang C. 2006. Efficient and repetitive production of leaf-derived somatic embryos of *Oncidium* - Biol. Plant. 50 (1): 107-110.

Suárez, Q. I.; A. M. Hernández; V. Chávez A.; Sandoval, Z.E. y Martinez, P. A. 2007. Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (AMES) Withner (Orchidaceae). Lanksteriana 7(1-2): 388-393.

The Journal of the Horticultural Society of London 1846-1855 1:303

Tinoco, J. M. S. y R. M. Mata. 2007. Adquisición de competência para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya* x *Esbetts* (Orchidaceae). LANKESTERIANA 7(1-2): 404-418.

Vieira, J. G. Z.; J.K. Yamakami; R.S. Aguiar; L.K. Unemoto y R.T. Faria. 2007. Influência da caseína hidrolisada no cultivo *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). Sem. Ciên. Agrá. 28(2):207-212.

Van Huylenbroek, J. M. y P. C. Deberg. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spatiphyllum* plantlets. *Physiol. Plant* 96:298-304.

Van Waes, J.M. y P.C. Debergh. 1986. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Plant Physiol.* 66:435-442.

Wu, I.F., Chen, J.T., W. Chang C. 2004. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. - *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77:107-109.

Zuloaga, F. O.; O. Morrone; M. J. Belgrano; C. Marticorena y E. Marchesi. 2008. Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 107(1-3): i-xcvi, 1-3348.