

***Chysis bractescens* Lindl. perspectivas para
su micropropagación: Revisión de literatura**

Renata Alejandra Intriago Dueñas

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

***Chysis bractescens* Lindl. perspectivas para su micropropagación: Revisión de literatura**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Renata Alejandra Intriago Dueñas

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

***Chysis bractescens* Lindl. perspectivas para su micropropagación: Revisión de literatura**

Presentado por:

Renata Alejandra Intriago Dueñas

Aprobado:



María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



Cynthia Martínez (Nov 11, 2020 20:06 CST)

Cynthia Martínez, Mtr.
Asesora



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano Académico

***Chysis bractescens* Lindl. perspectivas para su micropropagación: Revisión de literatura**

Renata Alejandra Intriago Dueñas

Resumen. El objetivo de este estudio fue realizar una revisión de literatura sobre *C. bractescens* y las técnicas de propagación *in vitro* aplicadas a otras especies de orquídeas para su posible aplicación a *C. bractescens*. La familia Orchidaceae está conformada por más de 20 mil especies, las cuales tienen una alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Son plantas de alto interés comercial debido a su diversidad de formas y colores, por lo que son especies que se han enfrentado la explotación comercial y al peligro de extinción, disminuyendo su capacidad reproductiva. Por esta razón, la micropropagación es una alternativa para lograr conservarlas. La orquídea *Chysis bractescens* Lindl. descubierta por John Lindley en 1837, conocida como Flor de Cera, es originaria del Sur de México, expandiéndose hasta Nicaragua. Actualmente es poco cultivada y se encuentra bajo amenaza. Es principalmente afectada por la reducción de su hábitat para la explotación agropecuaria. Hasta ahora, el único método de propagación *in vitro* probado ha sido el establecimiento de embriones cigóticos en cápsulas. Sin embargo, en esta revisión de literatura se muestran distintos métodos aplicados a otras especies comerciales, que en su momento podrían aplicarse a *C. bractescens* para su conservación. Al no existir suficiente información sobre la micropropagación de *C. bractescens* es difícil definir su comportamiento bajo una perspectiva de cultivo *in vitro*. Por ello, se abre una oportunidad para establecer investigación para su micropropagación.

Palabras Clave: Orquídeas, peligro de extinción, protocormos.

Abstract. The main goal of this study is to do a literary review and research about *C. bractescens* and micro-propagation techniques applied to other orchid species to possibly apply to *C. bractescens*. The Orchidaceae family is formed by more than 20 thousand species, which have a high adaptation capacity to diverse environmental conditions. These are high commercial interest plants due to their shapes and colors diversity, thus are species who had confronted commercial exploitation and endanger, lowering their reproductive capacity. Therefore, micropropagation is an alternative to achieve their conservation. *Chysis bractescens* Lindl. Orchid, discovered by John Lindley in 1837, known as Wax Flower, is from South Mexico, expanding to Nicaragua. Nowadays is not grown and it's categorized as endangered. It's mainly affected by habitat reduction due to agricultural exploitation. To this day, the only *in vitro* propagation method used in *C. bractescens* was zygotic embryos *in vitro* establishment. However, this review shows different methods applied on other commercial species, that could be appealed to *C. bractescens* for its conservation. Since there's no sufficient information about *C. bractescens* micropropagation, it's hard to define it's behavior under a tissue culture perspective. Thus, there's an open opportunity to stablish experiments for tissue culture in this species.

Keywords: Endangered species, orchids, protocorms.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Índice General.....	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4
4. CONCLUSIÓN	15
5. RECOMENDACIONES.....	16
6. LITERATURA CITADA	17

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de Cultivo Knudson C para establecimiento <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de orquídeas	9
2. Efecto de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación de en un medio básico MS suplementado con reguladores de crecimiento..	12
3. Efecto de medios de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación y desarrollo de cuerpos protocórmicos en orquídeas.	14

Figuras	Página
1. Distribución geográfica de <i>C. bractescens</i>	1
2. Ilustración de <i>Chysis bractescens</i> Lindl.....	5
3. Ilustración de <i>Chysis bractescens</i> Lindl. y las dimensiones (cm) de sus partes.....	6

1. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae se conforma de más de 20 mil especies monocotiledóneas, las cuales tienen la capacidad de adaptarse a diferentes temperaturas, humedad, condición climática, sustrato, es decir, pueden crecer fácilmente en otros medios que no necesariamente son suelos. Usualmente, las plantas pertenecientes a esta familia pueden vivir mucho tiempo, debido a su capacidad de almacenaje de agua y nutrientes en estructuras que se forman en la base del tallo, llamadas pseudobulbos. La familia Orchidaceae es la familia más diversa, y a su vez, una de las más vulnerables del reino *Plantae* (Ávila y Salgado 2006), por lo que es necesario adquirir profundo conocimiento sobre su manejo y conservación.

Las orquídeas son plantas de alto interés comercial debido a su diversidad de formas y colores. Por esta razón, son especies que se han llevado a la explotación comercial, y se enfrenta a una disminución exponencial en número de individuos y capacidad reproductiva, debido a la extracción intensiva y fuera de control, que en ocasiones también es ilegal, junto a la destrucción y degradación de sus hábitats (Hágsater y Pollard 2005). Toda esta alteración que se ha registrado en estas especies ha sido de influencia para que evolucionen a la simbiosis con micorrizas para su correcto desarrollo; a pesar de esto, su crecimiento es desacelerado, lo cual dificulta su reproducción vegetativa (Murdad *et al.* 2010).

La orquídea *Chysis bractescens* Lindl., conocida como Flor de Cera u Hoya Carnosa, es originaria del Sur de México, expandiéndose por Centroamérica desde Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras hasta llegar a Nicaragua (Figura 1). Fue descubierta por John Lindley en 1837 (Goaverts *et al.* 2008). Durante el siglo XIX fue bastante cotizada en Europa, por lo que fue altamente recolectada para lograr satisfacer la demanda; actualmente se la cultiva y colecta muy poco, y se encuentra bajo amenaza según Norma Oficial 059 en México (Soto *et al.* 2007). Sin embargo, no se encuentra en los listados de especies en peligro de extinción de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) para Honduras.



Figura 1. Distribución geográfica de *C. bractescens*.

Fuente: Grupo Orquideófilo del Norte Santafesino 2014.

En Latinoamérica se registran especies en peligro de extinción por su extracción indiscriminada y tráfico ilegal para su venta, y destrucción de los ecosistemas donde estas se desarrollan (Salgado 2006). Ahí es donde ingresa el interés de conservación de especies con el uso de técnicas de cultivo de tejidos como la micropropagación, ya sea tomando partes vegetativas o puntos de crecimiento, para inducir el desarrollo de explantes *in vitro*, o cápsulas embrionarias, sin utilizar el método de propagación convencional como lo es sembrar semillas (Flores *et al.* 2017). También, en los últimos años se han realizado diversos estudios relacionados con preservar estas especies, con la ayuda de la conservación *in vitro*.

Las técnicas de cultivo de tejidos ayudan a micropropagadores a obtener plantas a partir de un ejemplar, siendo este la planta madre, logrando multiplicarla masivamente acortando su ciclo reproductivo y manteniendo viabilidad genética. Las orquídeas presentan factores intrínsecos que limitan su propagación sexual y la variación genética que en ellas se puede presentar (Pérez y Castañeda 2016).

El objetivo de este estudio fue realizar una revisión de literatura sobre *C. bractescens* y las técnicas de propagación *in vitro* de orquídeas para su potencial aplicación en *C. bractescens*, para en el futuro garantizar la multiplicación y conservación de esta especie en peligro de extinción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue realizada entre los meses de julio a septiembre del año 2020. La información fue obtenida de artículos de revistas científicas, reportes universitarios, comisiones nacionales, y libros sobre generalidades de las orquídeas y la micropropagación.

Las bases de datos utilizadas para la revisión literaria fueron SpringerLink, Biología Plantarum, CONABIO, SciElo, ResearchGate, reportes y tesis universitarias. Estas fueron escogidas debido a la disponibilidad de acceso.

Las palabras clave utilizadas para la búsqueda fueron: cápsulas, *Chysis bractescens*, embriones cigóticos, micropropagación, orquídeas, propagación, reguladores de crecimiento. Los conectores usados en los buscadores fueron: de, y, en. El criterio de exclusión de la búsqueda fue el año de publicación, tomando en cuenta las publicaciones del 1987 a la fecha.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La *Chysis bractescens*, conocida como flor de cera, al ser una planta epífita, puede crecer sobre otro individuo, tanto biótico como abiótico, sin necesidad de parasitarlo, únicamente usándolo como soporte. Pueden encontrarse en zonas con elevaciones entre 800 y 1200 msnm. Crecen en troncos o ramas de árboles e incluso, ocasionalmente, sobre rocas. Pueden frecuentar zonas inundables y bosques lluviosos (Soto 2008).

La *C. bractescens* es una planta que requiere sitios sombríos o con luz moderada no directa. En la etapa de crecimiento es necesario suministrarle agua diariamente. Mantener una humedad alta puede prevenir la presencia de ácaros rojos. Crecen bajo temperaturas intermedias de 10 a 15 °C. La aplicación de fertilizantes se realiza únicamente en etapa de crecimiento. Al cultivarlas, debe hacerse con sustratos con buen drenaje; la opción más común es fibra de coco (Pridgeon 1992).

C. bractescens es una especie de crecimiento rápido, iterópara, cuya flor dura una semana aproximadamente, de alta fragancia, lo que atrae agentes polinizadores que incrementan su eficiencia de reproducción. Se declara que es una especie alógama, lo que permite que exista polinización cruzada. Tiene ciertos factores de amenaza en su hábitat, el cual se ve reducido para formar zonas agropecuarias e incluso urbanas (Soto *et al.* 2007).

La clasificación taxonómica de *Chysis bractescens* Lindl. es la siguiente:

División: Magniophyta
Clase: Liliopsida
Sub-Clase: Monocots
Orden: Asparagales
Familia: Orchidaceae
Sub-Familia: Epidendroideae
Tribe: Arethuseae
Sub-Tribe: *Bletiinae*
Género: *Chysis*
Especie: *bractescens* sp.

Fuente: Pridgeon 1992

La orquídea *C. bractescens* se ve principalmente afectada por la reducción de su hábitat para la explotación agropecuaria. En menor proporción es afectada por colecta de especímenes. Sin embargo, es una especie ampliamente colectada, siendo la extracción uno de los mayores problemas para su conservación (Soto *et al.* 2007).

Descripción de *Chysis bractescens* Lindl. Flor de Cera

Chysis bractescens puede llegar a medir hasta 50 cm de altura. Sus raíces son gruesas de un diámetro hasta de 4 mm. Su rizoma es alargado, formando un simpodio colgante. Los pseudobulbos limítrofes están separados por seis entrenudos de 1.5 a 6 cm de largo y un grosor entre 5 a 7 mm. Los pseudobulbos estipitados son gruesos y fusiformes; están

formados por 12 entrenudos y pueden llegar hasta los 30 cm de largo con un grosor entre 2.5 y 4 cm (Figura 2). Cuando la planta es joven, éstos pseudobulbos estipitados están cubiertos por vainas escarías de un tono blanquecino, que posteriormente se articulan a vainas foliares. Las hojas son dísticas y generalmente se encuentran caedizas en la mitad superior de los pseudobulbos (Soto *et al.* 2007).



Figura 2. Ilustración de *Chysis bractescens* Lindl. y sus partes. a) rizoma b) pseudobulbo c) hoja d) pétalo e) estigma f) raquis g) sépalo dorsal h) antera i) sépalos laterales j) labelo. Fuente: Kaplicka 1970.

Sus racimos florales se originan de los nudos inferiores, son laterales y pueden medir de 10 a 20 cm de largo. El pedúnculo de dos entrenudos tiene un grosor de casi 6 mm y mide de 9 a 12 cm. El raquis puede medir hasta 8 cm de largo, formando un zig-zag de cuatro a ocho flores, las cuales están casi todas abiertas y son algo aglomeradas. Sus brácteas florales son grandes, de forma triangular-ovalada, de tonalidad verde con 1.5 a 3 cm de ancho y hasta 1.5 cm de largo (Menchaca 2011).

El ovario de la flor es robusto y tiene aproximadamente 2.5 cm de largo con un grosor que puede llegar a los 8 mm. La flor en sí tiene hasta 7 cm de diámetro, con fuerte fragancia y textura tipo cera; su coloración es blanco marfil, y sus ápices tienen una tonalidad amarillo pálido. El sépalo dorsal se presenta de forma ascendente, algo redondeado con extensión de hasta 2.3 cm, mientras que los sépalos laterales son de poca extensión y ambos contienen nervaduras. Los pétalos se encuentran bien extendidos, son redondeados con un contorno flabelado, formando lóbulos. Tallo de cuerpo robusto, arqueado, con márgenes ventrales prominentes, la superficie ventral es cóncava. Su antera apical es operculada (Rendón 2018).

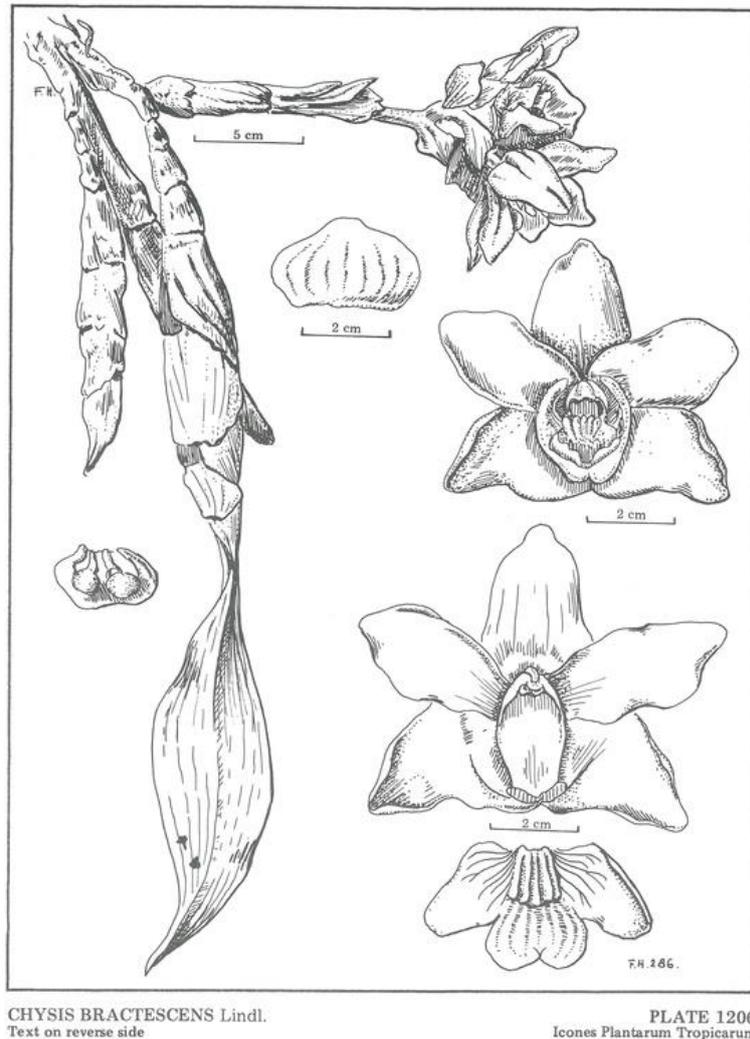


Figura 3. Ilustración de *Chysis bractescens* Lindl. y las dimensiones (cm) de sus partes.
Fuente: Hamer 1985.

Debido al gran tamaño de sus hojas, requieren un metabolismo C3. Puede soportar bajas temperaturas entre 5 y 8 °C, sin embargo, crecen con mayor eficiencia en zonas templadas y/o cálidas con temperaturas entre 15 hasta 26 °C y de alta humedad. *C. bractescens* es la única especie del género *Chysis* con flores casi completamente blancas (Rendón 2018).

Propagación convencional

Sexual. Para lograr la reproducción sexual de *C. bractescens* debe llevarse a cabo por semillas, las cuales se dispersan generalmente entre marzo y mayo, siendo que en muy pocas ocasiones forman ramificaciones. Existen afirmaciones sobre autopolinización en el caso de que la flor se encuentre un poco más cerrada de lo normal. La ayuda de agentes polinizadores no se descarta, debido a la fuerte fragancia que emite esta planta, las abejas son atraídas fácilmente (CONABIO 2007). Una característica fundamental que distingue a las orquídeas es que sus semillas son demasiado pequeñas, y no poseen reservas nutritivas para el desarrollo del embrión, por lo que su germinación en condiciones naturales es sumamente difícil, ya que requieren de relación simbiótica con micorrizas, lo cual es una limitante para su reproducción (Pacheco 2001).

Vegetativa. Puede realizarse una reproducción asexual utilizando esquejes en grupos de dos o tres pseudobulbos. Requiere de un sustrato que retenga humedad, ya que las divisiones son complicadas de establecer. Si bien *C. bractescens* no es una especie difícil de cultivar, si no se mantienen las condiciones adecuadas en la reproducción asexual, probablemente no se logre enraizar (Soto 2007).

Micropropagación

Conocida también como propagación clonal, se trata de un conjunto de diferentes técnicas de cultivo a partir de fragmentos vegetales o explantes establecidos *in vitro* para lograr multiplicación de manera rápida, eficiente y masiva (Castillo 2004).

En el caso de las orquídeas, el cultivo de tejidos fue revolucionado gracias a las investigaciones de Knudson en 1922, al crear un medio simple para la germinación de semillas de orquídeas. A partir de estas investigaciones, se ha podido aplicar la micropropagación mediante segmentos de hojas, segmentos nodales de plántulas, nudos florales, ápices, rizomas y secciones apicales (Sedano *et al.* 2015). La propagación *in vitro* se perfila como una opción para solucionar problemas, ayudando en la conservación de especies nativas e impedir la pérdida masiva del material biológico (Rojas 2014).

En 1993 las investigaciones de Arditti y Ernst muestran un gran avance, ya que describen distintos métodos de propagación *in vitro* de más de 83 especies de orquídeas utilizando medios de cultivo como Murashige y Skoog, Shenk, Hildebrandt, Hyponex, Vancin y Went (Sedano *et al.* 2015).

Entre los beneficios que presenta el cultivo de tejidos se encuentran: la propagación masiva de clones, y obtener plantas libres de patógenos mediante el uso de técnicas que nos permitan sanear el material, es decir, hay un mayor control sobre la sanidad del material propagado. Otros beneficios que presenta el cultivo de tejidos pueden ser que existe una reducción de tiempo para la multiplicación, la posibilidad de multiplicar en grandes cantidades en un espacio reducido con bajo costo (Rojas 2014).

Rescate de embriones cigóticos

Knudson en 1922, demostró que era posible la germinación de embriones cigóticos provenientes de cápsulas, sobre un medio simple que contuviera minerales y azúcares, sin

la presencia de hongos. Supuso una conmoción en el mundo de las orquídeas, al demostrar que las semillas de *Cattleya*, *Epidendrum* y otras orquídeas eran capaces de germinar asimbióticamente *in vitro*. A pesar del descubrimiento de Knudson, se comprobó que no siempre es posible hacer un medio en el que una determinada especie de orquídea pueda germinar y desarrollar. Se han descrito muchos medios nutritivos, para muchos géneros y especies diferentes (Arditti *et al.* 2008).

El embrión en la semilla de las orquídeas está cubierto por la testa y es extremadamente pequeño, y durante la germinación se ensancha formando una protuberancia produciendo pelos protocormóticos. Esta es la etapa en la cual el embrión se torna lustroso y casi transparente portando una yema en su extremo, cubierta en dos tercios de pelos protocormóticos, los cuáles en ausencia de sistema radicular, ayudan a la absorción de nutrientes del medio de cultivo sin la necesidad de la simbiosis con hongos ya que tiene las condiciones nutricionales óptimas para germinar (Fang *et al.* 2016).

Proceso de desinfección de las cápsulas previo al rescate de embriones cigóticos. La desinfección superficial se inicia con cuatro lavados por 10 minutos con agua corriente y jabón. Posteriormente, sumergir la cápsula en una solución de hipoclorito de sodio al 20% en un período de 15 minutos con Tween 80. Una vez transcurrido este tiempo, se realizan cuatro enjuagues, de cinco minutos cada uno, con agua desionizada y estéril. Finalmente, se colocan las cápsulas en agua desionizada y estéril hasta el momento de la siembra de los embriones contenidos en ellas (Pacheco 2001).

El protocolo utilizado para desinfección de cápsulas que contienen embriones cigóticos de orquídeas, utilizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Zamorano, consiste en realizar un lavado de las cápsulas con agua y jabón líquido. Una vez realizado el lavado, se sumergen en etanol al 70% en un período de 30 segundos. Luego deben sumergirse en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 30% $\frac{\text{volumen}}{\text{volumen}}$ durante 10 minutos.

Establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos. En una campana de flujo laminar, se cortan las cápsulas a la mitad con un bisturí estéril. Con la ayuda de una pinza de disección estéril se toma una de la cápsula partida, y dando suaves golpes a la cápsula se esparce las semillas sobre el medio de cultivo estéril, contenido en frascos de vidrio. Para cubrir los frascos, una vez realizada la siembra, se utiliza aluminio y plástico adhesivo para evitar una posible contaminación. Finalmente, se incuban a 22-25 °C, con un fotoperíodo de 16/8 día noche con luz fluorescente. Al transcurrir alrededor de tres meses, se observará una tonalidad verde oscura en los frascos, lo que significa que las semillas están germinando (Pacheco 2001).

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Zamorano, una vez terminado el protocolo de desinfección, en la cámara de flujo laminar se decanta la solución desinfectante y se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril. Se abre la cápsula para realizar la extracción de los embriones cigóticos. Los embriones cigóticos se inoculan en el medio de cultivo estéril Knudson C (Cuadro 1). El período de germinación varía entre 2 - 6 meses, dependiendo la especie, a una temperatura de 22 a 24 ° C con 16 horas de luz.

Cuadro 1. Medio de Cultivo Knudson C para establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de orquídeas.

Componente	mg/L
Macroelementos de Knudson	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1000.000
(NH ₄) ₂ SO ₄	500.000
MgSO ₄ .7H ₂ O	250.000
KH ₂ PO ₄	250.000
Microelementos Murashige y Skoog	
KI	0.830
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600
Na ₂ .MoO ₄ .2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.800
FeNaEDTA	50.000
Agua de Coco (mL)	100.000
Sacarosa	20,000.000
pH 5.5	
Phytigel	1,800.000

Fuente: Kyte y Kleyn 1996

Micropropagación a partir de explantes vegetativos

La micropropagación usando explantes vegetativos tiene como objetivo regenerar un nuevo individuo con el mismo material genético que la planta madre, es decir, clones (Vera 2013). A diferencia de la propagación por semilla, donde la descendencia no es genéticamente idéntica a su progenitora, y la propagación vegetativa, con la cual se obtienen clones, pero en cantidades mínimas, sin embargo, el tiempo hasta obtener una planta adulta es tardío, la micropropagación permite mantener uniformidad genética y fenotípica deseada en ornamentales en un menor período y con un mayor número de plántulas obtenidas.

Reguladores de crecimiento en la micropropagación de orquídeas

También conocidos como fitohormonas, son muy utilizados en micropropagación y propagación en general, ya que juegan un papel muy importante en aspectos generales de crecimiento y desarrollo de plantas (Yeung 2017). Su uso ha ido en aumento en los últimos años, dado que se han convertido en las principales herramientas capaces de controlar el crecimiento y actividad bioquímica de plantas. El efecto al utilizar reguladores de crecimiento varía según la especie. Estos compuestos son sintetizados por la planta, en muy bajas concentraciones, con un efecto principalmente a nivel celular, cambiando patrones de crecimiento en las plantas (Alcántara *et al.* 2019).

El género *Phalaenopsis*, es más apreciado por la diversidad de colores y larga duración de sus flores. El crecimiento de este tipo de orquídeas suele ser monopodial lento, lo cual dificulta su reproducción. Por esta razón, distintas maneras de multiplicación clonal han sido desarrolladas, tales como nodales, varas florales, protocormos rizoidales, yemas axilares, entre otros (Jiménez y Guevara 1996).

Al ser una especie de alto interés comercial, como lo es *Phalaenopsis spp.*, uno de los métodos más estudiados y realizados ha sido el uso de varas florales para la extracción de meristemas. La inducción de brotes *in vitro* con este método se hace mediante una ruta de organogénesis. Sin embargo, la inducción de los brotes depende mucho del regulador de crecimiento que se utilice (Frausto *et al.* 2019).

En la micropropagación de *Phalaenopsis amabilis* variedad White Grull, Vences y González (1995) utilizaron yemas florales en un medio básico Murashige y Skoog al 100% con N6-benciladenina BA con obtención de plántulas a los 55 días, observando un alto porcentaje de oxidación con dosis altas de BA (5.5-6 mg/L). Estos mismos autores utilizando las hojas de vitropiantas observaron la formación de protocormos al combinar BA con Sulfato de Adenina y ácido naftalenacético (ANA).

El medio MS suplementado con agua de coco estimuló formación de alrededor de 7.3 hojas en vitropántulas de *Laeliocattleya* y en otras especies como *Dendrobium nobile* Lindl., *Cymbidium aloifolium* y *Phalaenopsis spp* también se han presentado estos resultados, sin embargo, el uso de agua de coco puede ser contraproducente en ciertas ocasiones, dado que al contener citoquininas puede inhibir la formación de raíces. A diferencia del medio KC con suplemento de agua de coco y pulpa de banana, las combinaciones de ácido naftanelacético (ANA) – N6-benciladenina (BAP) y ácido 3-indolbutírico (IBA) – kinetina (KIN) ha dado mejores resultados, generando 6.2 y 6 brotes respectivamente (Menezes *et al.* 2016).

Para el caso de *Dendrobium nobile* utilizando yemas axilares, se agregó a un medio MS 2 mg/L de N6-benciladenina BA se obtuvo un resultado de 4.33 brotes, agregando 1.5 mg/L de kinetina (KIN) se obtuvo una cantidad de 2.45 brotes y con 100 mL de agua de coco se obtuvieron 3.42 brotes (Ashgar *et al.* 2011).

En un estudio realizado Cadavid y Salazar (2008) para evaluar el desarrollo *in vitro* de semillas de *Cattleya quadricolor* para formación de protocormos, en un medio MS modificado con 0.033 g/L de mioinositol y suministro de agua de coco y otro medio MS con los mismos componentes, pero adicionando 0.5 mg/L ácido naftanelacético y jugo de piña, obtuvo un promedio de longitud de raíz de 1.18 cm a los 90 días en el medio

modificado con ANA y jugo de piña, mientras que el medio sin reguladores de crecimiento y agua de coco se obtuvo un promedio de longitud radical de 5.14 cm a los 90 días.

Cyrtochilum loxense es otra especie en la que se ha trabajado con ayuda de fitorreguladores; realizando pruebas con distintos fotoperíodos, se logró obtener 0.57 brotes por explante, utilizando una dosis de 0.5 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de ANA, en un fotoperíodo de 24/0 (González y Cueva 2014).

Para el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq se utilizó un medio MS complementado con tres factores, carbón activado al 0.5 y 1%, 0.5 mg/L ácido indolacético (AIA) y BAP, obteniendo resultados favorables con carbón activado y AIA (Pedroza 2009).

La propagación *in vitro* de *Prosthechea citrina*, realizada en México 2016, fue llevada a cabo con el uso de protocormos a partir de semillas establecidas *in vitro*. En un medio MS modificado con 30 g/L de sacarosa y 2 g/L de Phytigel, fue suministrado con combinaciones de BAP-ANA en 3.0 mg/L y 0.3 mg/L respectivamente, con un fotoperíodo de 16/8, obteniendo un número de brotes por explante de 6.75 (Cazarez *et al.* 2015). En el Cuadro 2 se presenta resumida esta información. Para el caso de *C. bractescens*, estos métodos no se han sido implementados, lo que abre una oportunidad a micropropagadores a realizar experimentos para lograr la conservación de esta especie.

Cuadro 2. Efecto de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación de en un medio básico MS suplementado con reguladores de crecimiento.

Explante	Regulador de crecimiento	mg/L	N° de brotes por explante	Referencia
<i>Phalaenopsis amabilis</i>				
Yemas Florales	N6-benciladenina (BAP)	4.0	1.37	Vences y González 1995
Yema axilar	BAP	1.5	1.75	
Protocormos	BAP	4.5	14.87	
<i>Laeliocattleya</i> (híbrido)				
Vitroplántulas	ácido naftanelacético (ANA) + BAP	1.0 + 1.0	6.2	Menezes <i>et al.</i> 2016
	ácido 3-indolbutírico + kinetina (KIN)	0.5 + 0.1	6	
<i>Dendrobium nobile</i>				
Yemas axilares	BAP	2.0	4.33	Ashgar <i>et al.</i> 2011
	KIN	1.5	2.45	
	Agua de Coco (mL)	100	3.42	
<i>Cattleya quadricolor</i>				
Protocormos	Agua de Coco	-	5.14 cm de raíz	Cadavid y Salazar 2008
	Jugo de piña + ANA	0.5 (ANA)	1.18 cm de raíz	
<i>Cyrtorchilum loxense</i>				
Vitroplántulas	BAP + ANA	0.5 + 1.0	0.57	González y Cueva 2014
<i>Epidendrum elongatum</i> Jacq				
Cápsulas	Carbón activado (%)	0.5 y 1	3.7 y 3.2	Pedroza 2009
	Ácido indolacético	0.5	3.6	
<i>Prosthechea citrina</i>				
Protocormos	BAP + ANA	3.0 + 0.3	6.75	Cazarez <i>et al.</i> 2015

Inducción a la formación de cuerpos protocórmicos para la propagación masiva de orquídeas

Uno de los métodos más utilizados por micropropagadores de orquídeas, es la inducción al desarrollo de protocormos a partir de explantes vegetativos. Los cuerpos parecidos a protocormos (“PLB” por sus siglas en inglés) son un excelente explante para propagación clonal, desarrollo de semillas artificiales y regeneración de embriones somáticos y cigóticos que se propagan rápidamente (Gnasekaran *et al.* 2016).

La razón por la que el uso de estos explantes es tan aplicada para la micropropagación de orquídeas es porque se considera que los protocormos son una estructura singular, diseñada para establecer simbiosis con micorrizas y para formación de meristemas apicales, generalmente utilizando un medio líquido para su desarrollo. El embrión se primero desarrolla dentro de un protocormo generando una plántula (Yeung 2017).

A partir de hojas tomadas de vitroplántulas de *Phalaenopsis amabilis* colocadas en un medio MS modificado con 12.5 mg/L de BAP y 9 mg/L de Sulfato de adenina se logró obtener 15 protocormos por explante (Vences y González 1995). Utilizando ápices de vástago de *Cymbidium sp.* en 50 mL un medio MS líquido, se obtuvo formación de cuerpos protocórmicos, similares a los que se forman una vez germinada la semilla, se pueden obtener entre seis y ocho a partir de un explante (Pierik 1987).

Usando tejido meristemático de *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* en un medio MS líquido modificado con 20 mL con 2 mg/L de carbón activado se obtuvieron cuerpos protocórmicos bien desarrollados a las 4.67 semanas (Alvarado 2000). Al usar semillas de *Oncidium sp.* en un medio MS modificado con 30 g/L de sacarosa, utilizando 10 mL del medio en platos Petri de 50 × 15 mm, con un fotoperíodo de 16 horas luz, observando la presencia de cuerpos protocórmicos a los 48 días (Billard *et al.* 2014).

Al someter en un medio MS modificado con 5 mg/L de Thidiazuron (TDZ) a semillas de *Vanilla planifolia* generando cuerpos protocórmicos alrededor de los 20 días. Una vez generado el protocormo, se transfiere a un medio MS con 5 mg/L de ANA para desarrollo de brotes (Palama *et al.* 2010). En el Cuadro 3 se presenta esta información resumida.

Cuadro 3. Efecto de medios de cultivo y reguladores de crecimiento en el desarrollo de cuerpos protocórmicos en orquídeas.

Explante	Medio de cultivo + complementos	mg/L	Protocormos por explante	Referencia
<i>Phalaenopsis amabilis</i>				
Hojas de vitroplántulas	MS modificado con BAP + Sulfato de adenina	12.5 + 9.0	15	Vences y González 1995
<i>Cymbidium sp</i>				
Ápices de vástago	MS líquido	50.0 mL	6 - 8	Pierik 1987
<i>Cattleya skinneri</i> x <i>Cattleya maxima</i>				
Tejido meristemático	Knudson C líq. + carbón activado	20.0 mL + 2.0	Se observaron a las 4.5 semanas	Alvarado 2000
<i>Oncidium sp.</i>				
Semillas	MS modificado	10.0 mL/Petri dish	Se observaron a los 48 días	Billard <i>et al.</i> 2014
<i>Vanilla planifolia</i>				
Semillas	MS modificado con Thidiazuron	5.0 (TDZ)	Se observaron alrededor de los 20 días.	Palama <i>et al.</i> 2010

4. CONCLUSIÓN

No existe información sobre micropropagación de *C. bractescens*. Sin embargo, existen estudios en otras especies con el uso de un medio MS suplementado con reguladores de crecimiento. El método de micropropagación comercial en orquídeas más utilizado es la inducción a la formación de cuerpos protocórmicos, y el explante más usado son los meristemas. Existe una oportunidad para realizar estudios aplicando otras técnicas a la propagación clonal de *C. bractescens* diferentes al rescate de embriones cigóticos para su conservación.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar investigación sobre micropropagación con distintas técnicas y explantes de *C. bractesens*.
- Debido a que en otras especies la adición de N6-benciladenina (BAP) al medio MS ha sido efectiva en el desarrollo de protocormos y brotes, es recomendable la aplicación de esta hormona para obtener resultados favorables en la propagación *in vitro* de *C. bractescens*.

6. LITERATURA CITADA

- Alcántara J, Acero J, Alcántara J, Sánchez R. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*. 17(32):109 - 129. [consultado el 19 de sep. 2020] <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Alvarado C. 2000. "Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices" [Tesis pregrado]. Cartago, Costa Rica. Universidad de Costa Rica [consultado el 1 de Oct. 2020] <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/1318/BJFIB20016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- American Orchid Society. 2009. *Chysis*: All about orchids. Coral Gables, Florida. [Sin editorial] [consultado el 3 de jul. 2020] <https://www.aos.org/orchids/orchids-a-to-z/letter-c/chysis.aspx>
- Antama F. 2017. Citoquininas: La hormona vegetal citoquinina regula el crecimiento y desarrollo de las plantas. Madrid, España. [Sin editorial] [consultado el 19 de sep. 2020] <http://fundacion-antama.org/la-hormona-vegetal-citoquinina-regula-el-crecimiento-y-desarrollo-de-las-plantas/#:~:text=La%20hormona%20vegetal%20citoquinina%20regula%20el%20crecimiento%20y%20desarrollo%20de%20las%20plantas,-Publicado%20por%20F&text=Las%20citoquininas%20o%20citocininas%20son%2Cdivisi%C3%B3n%20y%20la%20diferenciaci%C3%B3n%20celular.>
- Arditti J. 2008. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal*. 3(3):56 [consultado el 17 de jul. 2020] https://www.researchgate.net/publication/229790264_An_history_of_orchid_hybridization_seed_germination_and_tissue_culture
- Ashgar S, Ahmad T, Ahmad I, Yaseen M. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology*. 10(16):3097-3103. [consultado el 21 de sep. 2020] https://www.researchgate.net/publication/267549186_In_vitro_propagation_of_orchid_Dendrobium_nobile_var_Emma_white
- Ávila I, Salgado R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Morelia, Michoacán. México. *Biológicas*. 1(8):138-149. [consultado el 21 de oct. 2019] https://www.researchgate.net/publication/233799527_Propagacion_y_mantenimiento_in_vitro_de_orquideas_mexicanas_para_colaborar_en_su_conservacion
- Bechtel H, Cribb P, Launert E. 1992. *The Manual of Cultivated Orchid Species*. Third Edition. Blandford Press, London. 444 p. ISBN: 0262021625 [consultado el 4 de jul. 2020] <http://iscdunnula.myddns.me/344.html>
- Billard C, Dalzotto C, Lallana V. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas

- de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. Polibotánica. 8(38):145-157. [consultado el 3 de Oct. 2020] <http://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n38/n38a8.pdf>
- Cadavid I, Salazar S. 2008. Micropropagación de *Cattleya quadricolor*. Tesis pregrado. Medellín, Colombia. Universidad EAFIT. [consultado el 22 de sep. 2020] <https://core.ac.uk/download/pdf/47237276.pdf>
- Carbajal V, Tejeda O, Trejo L. 2019. La aplicación exógena de reguladores de crecimiento mejora el tiempo a antesis y vida de la flor de la orquídea. *Laelia anceps* subesp. *anceps*. Contribución en Conferencia en el Colegio de Postgraduados sobre el Desarrollo Científico en México. Capítulo 1. p.110-113. [consultado el 18 de sep. 2020] https://www.researchgate.net/publication/332846853_LA_APLICACION_EXOGENA_DE_REGULADORES_DE_CRECIMIENTO_MEJORA_EL_TIEMPO_A_ANTESIS_Y_VIDA_DE_LA_FLOR_DE_LA_ORQUIDEA_Laelia_anceps_subesp_anceps
- Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA. Las Brujas. [consultado el 8 de Oct. 2020] http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf
- Cazarez T, Graciano J, Solís S, Díaz B, Nájera J, Montoya J. 2015. Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. Investigación y Ciencia. 24(67). Universidad Autónoma de Aguascalientes. [consultado el 23 de sep. 2020] <https://www.redalyc.org/jatsRepo/674/67446178003/html/index.html>
- Chen Y, Liu X, Liu Y. 2005. *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2005(81):247-251. [consultado el 25 de ago. 2020] <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-004-4956-y>
- Chung H, Chen J, Chang W. 2007. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. Biología Plantarum. 51(2):346-350. [consultado el 25 de ago. 2020] <https://link.springer.com/article/10.1007/s10535-007-0069-x>
- [CONABIO], Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. 2007. Flor de Cera (*Chysis bractescens*). [consultado el 3 de jul. 2020] <https://docplayer.es/12982328-Flor-de-cera-chysis-bractescens.html>
- Dressler R. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. First Edition. Cambridge. University Press, Cambridge. [consultado el 4 de jul. 2020] https://www.researchgate.net/publication/256692433_Phylogeny_and_Classification_of_Orchid_Family
- Fang S, Chen J, Ju M. 2016. Protocorms and Protocorm-Like Bodies Are Molecularly

Distinct from Zygotic Embryonic Tissues in *Phalaenopsis Aphrodite*. *Plant Physiol* 171(10):2682-2700. [consultado el 25 de sep. 2020] <http://www.plantphysiol.org/content/171/4/2682>

Flores L, Robledo A, Jimarez M. 2017. Medio de cultivo y sustituidos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8(6):297. [Consultado el 2 de nov. 2019] http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342017000601315&lng=es&nrm=iso

Frausto K, Ojeda M, Alvarado O, García E, Rodríguez H, Rodríguez G. 2019. Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis spp.* (Blume) *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10(6):608 [consultado el 19 de sep. 2020] <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/608/2649>

Gnasekaran P, Mahmood M, Subrammaniam S. 2016. Ultrastructure study of Vanda Kasem's Delight orchid's protocorm-like body. *Horticultura Brasileira*. 34(3):333-339. [consultado el 24 de sep. 2020] https://www.researchgate.net/publication/305877163_Ultrastructure_study_of_Vanda_Kasem's_Delight_orchid's_protocorm-like_body

Goaverts R, Bernet P, Kratochvil K, Gerlach G, Carr G, Alric P, Pridgeon A, Pfah J, Campacci M, Holland D, Tigges H, Shaw J, Cribb P, George A, Kreuz K, Wood J. 2008. *World Checklist of Orchidaceae*. Royal Botanic Gardens, Kew, London, England. [consultado el 3 de jul. 2020] <https://wmsp.science.kew.org/advanced.do>

[GONS] Grupo Orquídeófilo del Norte Santafesino. 2014. *Chysis bractescens*. Argentina. [consultado el 3 de sep. 2020] <http://grupogons.blogspot.com/2014/12/chysis-bractescens.html>

González Y, Cueva A. 2014. Effects of photoperiod, plant growth regulators and culture media on *in vitro* growth of seedlings of *Cyrtochilum loxense* (Lindl.) Kraenzl. an endemic and endangered orchid from Ecuador. *Revista Peruana de Biología* 21(2):189-192. [consultado el 22 de sep. 2020] <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v21n2/a12v21n2.pdf>

Hágsater E, Pollard G. 2005. Orquídea (México City) n.s., *Journal of the Asociación Mexicana de Orquideología*, México City, Mexico. *Revista de la Asociación Mexicana de Orquideología*. Vol.8. [Consultado el 27 de nov. 2019] [https://herbarioamo.org/index_archivos/Orquidea\(Mex.\)8\(1\).pdf](https://herbarioamo.org/index_archivos/Orquidea(Mex.)8(1).pdf)

Hamer F. 1985. *Icones Plantarum Tropicarum*, Vol. 13, Orchids of Nicaragua, Part 6. [consultado el 28 de sep. 2020] https://orchid.unibas.ch/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=3&SearchResultID=310441/Chysis/bractescens/Lindley_John&setLang=en-GB

Jiménez V, Guevara E. 1996. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae)

mediante el cultivo de secciones de ejes florales después de la senescencia de las flores. *Agronomía Costarricense* 20(1):75-79. [consultado el 17 de sep. 2020] https://www.mag.go.cr/rev_agr/v20n01_075.pdf

Kaplicka J. 1970. *Chysis bractescens* Lindl. Vintage impression. Germany. [consultado el 18 de ago. 2020] <https://www.etsy.com/es/listing/226466067/chysis-bractescens-orquidea-1970-vintage>

Kyte L, Kleyn J. 1996. *Plants from Test Tubes*. Third Edition. Timber Press. Portland, Oregon. p.240. [consultado el 31 de ago. 2020] https://archive.org/stream/PlantsFromTestTubesHollyScoggins_201712/Plants%20from%20Test%20Tubes%20-%20Holly%20Scoggins_djvu.txt

Lara A, Mosqueda O, González J. 2004. Determinación de los Efectos Del Pectimorf y C-751 Sobre la Multiplicación de Brotes de *Anthurium Undreanum* Propagados En Biorreactores de Inmersión Temporal. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. *Revista Ceiba* 45(2):121-127. [consultado el 14 de sep. 2020] <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/3207>

Menchaca RA. 2011. *Manual para la propagación de orquídeas*. Zapopan, Jalisco. México. Primera Edición. Mexico. p.30. [consultado el 27 de nov. 2019] https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PRO_PAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF

Menezes L, Machado M, Ballesta P, Mora F, Milaneze M, Mangolin C. 2016. Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Revista Idesia* 34(1):47-54. [consultado el 21 de sep. 2020] https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292016000100006

Missouri Botanical Garden. 2008. *Chysis bractescens* Lindl. Missouri, USA. [Sin Edición] [consultado el 7 de jul. 2020] <https://www.tropicos.org/name/23513012>

Murdad R, Latip M, Aziz Z, Ripin R. 2010. Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 18(1):197-200. [consultado el 17 de oct. 2019] https://www.researchgate.net/publication/286704585_Effects_of_carbon_source_and_potato_homogenate_on_in_vitro_growth_and_development_of_Sabah's_Endangered_orchid_Phalaenopsis_gigantea

Pacheco E. 2001. Análisis comparativo del crecimiento *in vitro* entre *Chysis aurea* y *Chysis bractescens* Lindl. (1837). Tesis pregrado. Xalapa, Veracruz, México. Universidad Veracruzana. [consultado el 20 de ago. 2020] <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/48423/PachecoAlarconEdgar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Palama T, Menard P, Fock I, Choi Y, Bourdon E, Goviden J, Bahut M, Payet B, Verpoorte R, Kodja H. 2010. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC*

Plant Biology. 10(82):2-18. [consultado el 3 de oct. 2020]
<https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2229-10-82>

Pedroza J. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología. 11(1):17-32. [consultado el 23 de sep. 2020]
https://www.researchgate.net/publication/26849629_Efecto_del_carbon_activado_o_acido_indolacetico_AIA_y_bencil_amino_purina_BAP_en_el_desarrollo_de_protocormos_de_Epidendrum_elongatum_Jacq_bajo_condiciones_in_vitro/download

Pérez B, Castañeda S. 2016. Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. Biotecnología Vegetal. 16(3):143-151. [consultado el 21 de oct. 2019] <https://biblat.unam.mx/es/revista/biotecnologia-vegetal/articulo/propagacion-in-vitro-de-orquideas-nativas-como-una-contribucion-para-la-conservacion-ex-situ>

Pierik R. 1987. In vitro culture of higher plants. Dordrecht, The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers. [consultado el 3 de oct.]
https://www.actahort.org/books/226/226_1.htm

Pridgeon, A. 1992. The Illustrated Encyclopedia of Orchids. Illustrated. Timber Press, Portland. p.304. [consultado el 3 de jul. 2020]
<https://www.aos.org/orchids/orchids-a-to-z/letter-c/chysis.aspx>

Rendón A. 2018. Caracterización morfológica y molecular de hongos micorrízicos orquideoides aislados de *Trichocentrum stramineum* (Orquidaceae) en cinco localidades de Veracruz, México. Tesis pregrado. Xalapa, Veracruz, México. Universidad Veracruzana. [consultado el 16 de jul. 2020]
<https://www.uv.mx/met/files/2018/06/Cuauhtemoc-Edgar-Rendon-Lara-marzo2018.pdf>

Rojas D. 2014. Propagación *in vitro* de la orquídea "*Phalaenopsis violacea*" a través de la vara floral. Tesis pregrado. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil. [consultado el 17 de sep. 2020]
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/7088/1/Tesis%20Propagaci%C3%B3n%20in%20vitro%20de%20la%20orquidea%20Phalaenopsis%20vilacea%20a%20trav%C3%A9s%20de%20la%20vara%20floral.pdf>

Salgado R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Revista Biológicas. 1(8):138-149. [consultado el 7 de ago. 2020]
https://www.researchgate.net/publication/233799527_Propagacion_y_mantenimiento_in_vitro_de_orquideas_mexicanas_para_colaborar_en_su_conservacion

Sedano G, Manzo A, Roldán R, Castellanos J. 2015. Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 1:451-456. [consultado el 11 de sep. 2020]
<https://www.redalyc.org/pdf/2631/263139243061.pdf>

- Soto M. 2008. *Chysis bractescens* Lindl. Icones Orchidacearum fascicle 10, Orchids of Mexico. Illustrated. Edited by Eric Hágsater & Miguel Soto. Lomas de Chapultepec, México. Instituto Chinoín, A.C. p.240. ISBN 978-968-7889-1 2-2. [consultado el 5 de jul. 2020] https://www.herbarioamo.org/index_archivos/Fascicle10.pdf
- Soto M, Solano R, Hágsater E. 2007. Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Revista Lankesteriana*. 7(1-2):114-121. [consultado el 4 de jul. 2020] <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/18449/0>
- Vences C, González H. 1995. Micropropagación de *Phalaenopsis amabilis* (Linnaeus) Blume variedad White Grull. *Revista Ciencia Ergo Sum*. 6(1):57-61. [consultado el 18 de sep. 2020] <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5128978>
- Vera H. 2013. Propagación de *Cattleya rex* en Cultivo *in vitro*. [Sin edición] Perú. P.44. [consultado el 13 de sep. 2020] https://issuu.com/marcoacuna/docs/manual_cattleya_rex_2014_hvt
- Quintero O, Jaramillo S. 2012. Rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels) Germination and rescue *in vitro* of immature embryos of black cedar (*Juglans neotropica* Diels). *Acta Agronómica*. 61(1):52-60. [consultado el 14 de sep. 2020] <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v61n1/v61n1a07.pdf>
- Yeung E. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*. 58(33):2-14. [consultado el 24 de sep. 2020] <https://as-botanicalstudies.springeropen.com/articles/10.1186/s40529-017-0188-4>