PROPAGACION IN VITRO DE LA ORQUIDEA RHYNCHOLAELIA DIGBYANA (Lindl.) Schltr.

POR:

José Ledis Linares

BIBLIOTECA WILSON POPE
ESCUELA AGRICOLA PANAMERI
APARTADO 93
TEGUCIGALPA HONDURAS

TESIS

PRESENTADA A LA

ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCION

DEL TITULO DE

INGENIERO AGRONOMO

El Zamorano, Honduras

ABRIL, 1993

PROPAGACION IN VITRO DE LA ORQUIDEA RHYNCHOLAELIA DIGBYANA (Lindl.) Schltr.

Por

JOSE LEDIS LINARES

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana permiso para producir y distribuir copias de este trabajo para los usos que considere necesarios. Para otras personas y otros fines, se reservan los derechos de autor.

JOSE LEDIS LINARES

Abril de 1993

DEDICATORIA

Al insigne botánico Profesor Antonio Molina R.

RECONOCIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Juan José Alán, por su valiosa ayuda, cooperación y consejos brindados durante la realización del presente trabajo. Al Ing. Agr. Nelson Agudelo, Ms.C., por su inapreciable ayuda, en especial, por su minuciosa y esmerada revisión del manuscrito final.

A la Asociación Salvadoreña de Orquideología, especialmente a mis amigos: Prof. Carlos Antonio Martínez, Nelson Cansino, Vladimir Mina y Oscar Navarro; a la señora Ingeniera Agrónoma Ana Abdelnour del CATIE, Costa Rica, por haber proporcionado material bibliográfico y de consulta.

A Bessy Martínez por su valiosa cooperación en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

Al arquitecto Teodoro Albornoz por el trabajo de fotografía realizado.

Al profesor Antonio Molina R., al Biólogo Ramón Zúniga y al señor Enrique Kamm por la orientación y ayuda en los viajes de colecta al campo.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

TITULO i

APROBACION ii

DERECHOS DE AUTOR iii

DEDICATORIA iv

RECONOCIMIENTOS v

INDICE vi

INDICE DE CUADROS viii

INDICE DE FIGURAS x

ABREVIATURAS UTILIZADAS xii

COMPENDIO. xiii

I. INTRODUCCION 1
A. Importancia ecológica 1
B. Utilidad 2
C. Reproducción 3
D. Objetivos 5
1. Objetivos específicos 5

II. REVISION DE LITERATURA 6
A. Clasificación botánica 6
1. Distribución 6
2. Características generales de la especie . 7
3. Hábito de crecimiento 9
4. Floración 9
B. Propagación 11
1. Propagación sexual 12
2. Propagación asexual 14
C. Medios de cultivo 16
D. Sustancias de crecimiento 17
E. Ambiente físico 18
F. Oxidación 19
G. Material vegetal 20
1. Apices y bases de hojas 21
2. Apices de raíces 23
3. Yemas apicales y laterales 24
4. Embriones 27
5. Otros explantes 29

III. MATERIALES Y METODOS 30
A. Ubicación 30
B. Material vegetal 30

C. Desinfección 31
D. Medios de cultivo 32
E. Hormonas 33
F. Preparación de medios de cultivo 34
G. Esterilización 35
H. Cristalería e instrumentos 35
I. Obtención de explantes 36
J. Condiciones ambientales 37
K. Metodología 38

IV. RESULTADOS 39
A. Apices de raíces 39
B. Bases y apices de hojas 39
C. Yemas apicales 40
1. Efecto del ANA y del BAP, en los medios de MS y KC, sobre el cultivo de yemas apicales 40
2. Efecto del 2,4-D y del BAP, en los medios de MS y KC, sobre el cultivo de yemas apicales 57
3. Efecto del AIB y del BAP, en los medios de MS y KC, sobre el cultivo de yemas apicales 64
D. Experimentos con embriones 72

V. DISCUSION 73
A. Experimentos con ápices de raíces 73
B. Experimentos con ápices y bases de hojas . . . 75
C. Experimentos con yemas apicales 76
1. Callogénesis 76
2. Organogénesis 78
3. Medios de cultivo 79
D. Experimentos con embriones 81

VI. CONCLUSIONES 82

VII. RECOMENDACIONES 83

VIII. LITERATURA CITADA 84

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de los medios básicos de Murashige y Skoog (1962) modificado y de Knudson C (1951) modificado, utilizado para la propagación *in vitro* de *R. digbyana*. Escuela Agrícola Panamericana 1991-1992. 33

Cuadro 2. Dosis y combinaciones de hormonas usadas en los diferentes experimentos para la propagación *in vitro* de *R. digbyana*. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992. . . 34

Cuadro 3. Efecto del ANA y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, once semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. 47

Cuadro 4. Efecto del ANA y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, veinte semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. . 50

Cuadro 5. Efecto del ANA y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la organogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, veinte semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. 52

Cuadro 6. Efecto del 2,4-D y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, doce semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. . 58

Cuadro 7. Efecto del 2,4-D y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, 27 semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. . 61

Cuadro 8. Efecto del 2,4-D y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la organogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, 27 semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. . 62

Cuadro 9. Efecto del AIB y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, ocho semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. . 65

Cuadro 10. Efecto del AIB y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, dieciséis semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. 66

Cuadro 11. Efecto del AIB y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la organogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, dieciséis semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993. 67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de *Rhyncholaelia digbyana* (Lindl.) Schltr. var. *fimbripetala*, mostrando la flor característica de esta variedad 8

Figura 2. Callo con cuerpos protocórmicos de *R. digbyana* originado de una yema apical cultivada en el medio de MS modificado, después de 11 semanas de cultivo 43

Figura 3. Callo proveniente de un subcultivo de yema apical de *R. digbyana* originado de una yema a pical cultivada en el medio de MS modificado, 20 semanas después de la siembra 44

Figura 4. Callo de *R. digbyana* con protocormos en diferentes grados de diferenciación, 20 semanas después de la siembra 45

Figura 5. Subcultivo de un callo originado de una yema apical de *R. digbyana* cultivado en el medio de MS modificado, 20 semanas después de la siembra 46

Figura 6. Callo de *R. digbyana* originado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 11 semanas después de la siembra 48

Figura 7. Brote de *R. digbyana* proveniente de una yema apical cultivada en el medio de KC, 11 semanas después de la siembra 49

Figura 8. Callo de *R. digbyana* formado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 20 semanas después de la siembra 51

Figura 9. Brote de *R. digbyana* proveniente de una yema apical cultivada en el medio de KC, 20 semanas después de la siembra 53

Figura 10. Callo de *R. digbyana* con cuerpos protocórmi cos formado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 20 semanas después de la siembra 55

Figura 11. Brote con callo y protocormos de *R. digbyana* formado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 11 semanas después de la siembra 56

Figura 12. Callo de *R. digbyana* formado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 11 semanas después de la siembra 60

Figura 13. Plántulas de *R. digbyana* originadas de un callo sin subcultivar por más de cuatro semanas 69

Figura 14. Plántulas de *R. digbyana* originadas de un callo sin subcultivar por más de cuatro semanas 70

Figura 15. Plántulas de *R. digbyana* originadas de un callo sin subcultivar por más de cuatro semanas 71

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AIA	Acido indolacético
AIB	Acido indolbutírico
ANA	Acido naftalenacético
BAP	Bencilaminopurina
FeNa-EDTA	Acido etilendiamino-tetracético de Hierro y Sodio
K	Quinetina (= N-6-furfurilaminopurina)
KC	Knudson C
MS	Murashige y Skoog
pAPC	Acido para-diclorofenoxiacético
2-ip	N^6-isopenteniladenina
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético

COMPENDIO

La orquídea *Rhyncholaelia digbyana*, flor nacional de Honduras, enfrenta serios problemas de conservación debido a la destrucción de sus hábitats, a su lenta reproducción y a la fuerte presión que ejercen los colectores comerciales por la creciente demanda que tiene como ornamental. Debido a esta situación, se realizó este estudio orientado a desarrollar un método adecuado de propagación que garantice la disponibilidad de una gran cantidad de plantas de *R. digbyana* para su comercialización, así como para tener una importante reserva de material genético para su utilización en la hibridización o para su eventual repoblación en los bosques. Esta investigación se realizó por medio de una serie de experimentos en los cuales se usaron dos medios de cultivo, el de Murashige y Skoog (MS) y el de Knudson C (KC); cada uno con las diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas. Se probaron tres auxinas (ANA, 2,4-D y AIB) y una citoquinina (BAP). Los experimentos se organizaron siguiendo un diseño factorial, en el que uno de los factores fue una auxina y el otro la citoquinina. Se usaron tres dosis de auxinas y tres de la citoquinina, por lo que se tuvieron nueve combinaciones o tratamientos, que permitieron estudiar el efecto de las auxinas solas, las citoquininas solas y las combinaciones posibles de ambas. La investigación se orientó hacia las combinaciones de hormonas donde se observaron resultados

favorables en estudios anteriores con especies filogenéticamente cercanas.

El proceso de embriogénesis u organogénesis, en muchos casos, estuvo precedido de un proceso de callogénesis, aunque también hubo organogénesis directa. El estudio nos permitió conocer cuáles son los mejores medios de cultivo, las mejores combinaciones de hormonas y el mejor tipo de explante. El mejor medio de cultivo fue el de KC. De las auxinas probadas la mejor fue el AIB en la dosis de 1,0 mg/l. Se considera necesario el balance de auxinas y citoquininas para la callogénesis. Los mejores explantes para la regeneración de plantas fueron las yemas apicales. No se obtuvo regeneración con ápices de raíces ni con ápices y bases de hojas. La investigación nos permitió obtener una gran cantidad de plántulas que era uno de los objetivos de este estudio. La tasa de multiplicación permitió obtener hasta 2600 plántulas a partir de un solo explante en año y medio de cultivo.

I. INTRODUCCION

En muchas partes del mundo, los bosques desaparecen y los terrenos se dedican a la agricultura. En ese proceso, se talan los árboles y su flora epifítica se pierde con ellos. Bajo estas circunstancias, la eliminación de las orquídeas es, también, inminente.

Honduras no es ajena a esta tendencia mundial. Por tanto, la orquídea *Rhyncholaelia digbyana*, flor nacional de Honduras, enfrenta serios problemas de conservación debido a la destrucción de sus hábitats, a su lenta reproducción y a la fuerte presión que ejercen los colectores comerciales originada por la creciente demanda que tiene como ornamental.

A. Importancia ecológica

La importancia de la orquídeas radica principalmente en su alto valor estético, generado por la belleza de sus flores, además de que ocupan un lugar importante en la cadena evolutiva de las plantas superiores, ya que están entre las más avanzadas y especializadas. Muchas características demuestran claramente su gran éxito en adaptarse para la supervivencia. Por ejemplo, como resultado de su configuración floral, éstas plantas se han adaptado a un gran número de polinizadores

incluyendo escarabajos, moscas, polillas, abejas, pájaros y murciélagos. La respuesta a estos diferentes polinizadores ha conducido a una extensa adaptación de varios métodos de polinización, permitiendo la existencia de una relación simpátrica entre plantas y animales. Esta relación se llama, también, coevolución. En las flores de las orquídeas la forma y la función han evolucionado hacia una fuerte especialización en su relación con los agentes polinizadores. Una muestra de lo anterior es que aunque en estas flores el polen (llamado polinio) y el estigma están muy cerca en una misma estructura (llamada columna) han modificado su morfología, evolucionando de tal manera que la autopolinización, en forma natural, es casi imposible exceptuando a las especies que han evolucionado hacia la autopolinización (Roebuck y Steinhart, 1978). Además, representan parte esencial de la biodiversidad de cualquier país tropical, que pueden ser usadas para fines de ecoturismo por la vistosidad de sus flores. Además tiene para Honduras un gran valor simbólico pues es su flor nacional.

B. Utilidad

Las orquídeas, en su gran mayoría, han sido usadas como flor de corte. La excepción es el género *Vanilla*, de cuyas plantas se extrae todavía, en algunos sitios, el extracto llamado vainilla, que es ampliamente utilizado en la industria de la fabricación de alimentos.

R. digbyana, por sus características, ha alcanzando altos precios en los mercados internacionales. Las plantas mismas tienen una gran demanda por parte de los aficionados a su cultivo. Además, esta especie ha sido ampliamente usada en la producción de híbridos comerciales, de alto valor en el mercado, debido a que tiene flores grandes, al tamaño y forma del labelo y a la alta heredabilidad que tienen éstas características. Otra ventaja comercial radica en la gran importancia que se le ha dado, por parte de algunos gobiernos y organizaciones privadas, al turismo ecológico, un fenómeno que en años recientes, representa significativos beneficios para los llamados países en vías de desarrollo. Las giras organizadas por los amigos de las orquídeas y otros amantes de la naturaleza, procedentes de los Estados Unidos y Europa a muchas partes de los países tropicales y subtropicales, son beneficiosas para todos los involucrados, cuando son realizadas con una supervisión adecuada (Dressler, 1990).

En el área centroamericana, países como Costa Rica y Guatemala tienen ya al turismo como una fuente generadora de divisas. En Costa Rica, por ejemplo, el turismo es ahora uno de los principales rubros de la economía, y uno de sus componentes más importantes, es el turismo de tipo ecológico.

C. Reproducción

En la naturaleza, las orquídeas se propagan en forma

BIBLIOTECA WILSON POPENOE
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 93
TEGUCIGALPA HONDURAS

sexual, es decir, por medio de semillas. Sin embargo, con este método de propagación la tasa de reproducción es muy baja, ya que de aproximadamente un millón de semillas que puede tener una cápsula (fruto) sólo muy pocas logran germinar. Generalmente, menos de dos docenas llegan a la etapa adulta, ya que las semillas necesitan de una serie de condiciones favorables como la presencia de un hongo que destruya la testa (cáscara seminal), alta humedad al momento de la germinación y, en algunos casos, la existencia de un árbol que sea un hospedero adecuado. En el caso de *R. digbyana*, se ha observado que, por lo menos en Honduras, sólo crece en algunas especies de robles (*Quercus spp.*). Todo lo anterior hace totalmente inviable este método de propagación para fines comerciales. Dentro de la propagación asexual, la manera tradicional para propagar clones de estas plantas, usada todavía por los aficionados y pequeños cultivadores, es a través del llamado método de propagación por bulbo trasero. La técnica consiste en separar el pseudobulbo más viejo para forzar el desarrollo de yemas en estado de reposo o la separación de los crecimientos laterales, cuando éstos se forman. Sin embargo, este método es muy lento y, en el mejor de los casos, sólo nos permite duplicar el número de plantas por año. Por otra parte, únicamente puede ser aplicado a las orquídeas de crecimiento simpodial, ya que las de crecimiento monopodial no presentan pseudobulbos laterales (Bhojwanii y Razdan, 1983).

Debido a estas limitaciones, se hace necesario el desarrollo de un método que pueda ser utilizado para la propagación industrial de orquídeas. El cultivo de tejidos, la embriogénesis somática y la micropropagación, son los métodos más adecuados, para propagar clones y la técnica de rescate de embriones, para la obtención de híbridos.

BIBLIOTECA WILSON POPENOE
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 93
TEGUCIGALPA HONDURAS

D. Objetivos

En el presente estudio se espera desarrollar un método adecuado de propagación que garantice la disponibilidad de gran cantidad de plantas de *R. digbyana* para su comercialización, así como para tener una importante reserva de material genético para su utilización en hibridización o en su eventual repoblación en los bosques.

1. Objetivos específicos

a. Determinar el mejor medio de cultivo para la producción de protocormos de *R. digbyana*.
b. Encontrar la mejor combinación de reguladores de crecimiento para la producción y desarrollo de plántulas de *R. digbyana*.
c. Identificar el mejor medio de cultivo para el crecimiento de plántulas de *R. digbyana*.
d. Reproducir plantas para la comercializacón y repoblación de éstas en los bosques.

II. REVISION DE LITERATURA

A. Clasificación botánica

Rhyncholaelia digbyana (Lindl.) Schltr., como todas las orquídeas, pertenece a la división *Espermaphita*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Monocotiledoneae*, orden *Orchidales*, familia *Orchidaceae* (Dressler, 1990).

Para clasificar las orquídeas, al igual que la mayoría de los antófitos, es decir, las plantas con flores, se hace uso de las partes florales. Esta familia tiene algunas de éstas partes bastante diferenciadas, como ocurre con la estructura sexual llamada ginandrio o columna, los pétalos, sépalos y la semillas que son numerosas, sin endosperma, y muy pequeñas; por esta razón al orden Orchidales también se le llama Micros-permales (Dressler, 1990).

1. Distribución

El pequeño género *Rhyncholaelia*, cuenta con sólo dos especies, *R. glauca* y *R. digbyana*. Es originario de las zonas bajas y secas del sur de México y del norte de Centroamérica, principalmente de Belice y Honduras (Senghas y Bockemuhl, 1983). Ambas especies están representadas en Honduras y de ellas, *Rhyncholaelia digbyana*, es la más conocida y de mayor

importancia económica por ser muy usada en la hibridización o para su comercialización como especie. Por otra parte, las plantas que se encuentran en Honduras pertenecen, según Senghas y Bockemuhl (1983), a la variedad *fimbripetala* que al parecer es endémica de este país. Por lo que el nombre científico de esta planta es *Rhyncholaelia digbyana* (Lindl.) Schltr. var. *fimbripetala* Ames., en este trabajo nos referiremos a esta especie como *R. digbyana*.

2. Características generales de la especie

R. digbyana, es una planta epífita, con pseudobulbos alargados, delgados, con una sola hoja de hasta 20 cm de largo, carnosa, gruesa, de color verde o algo purpúrea cuando está expuesta al sol. Cada planta produce una sola flor, de hasta 20 cm de diámetro, muy vistosa, de color blanco o blanco verdoso; el pétalo superior o labelo es blanco crema, con los bordes superiores profundamente fimbriados (Ames y Correll, 1952). La variedad *fimbripetala*, además de contar con las características anteriores, tiene los otros pétalos un poco más anchos, ligeramente fimbriados y, en general, flores más grandes que la forma típica (Fig. 1).

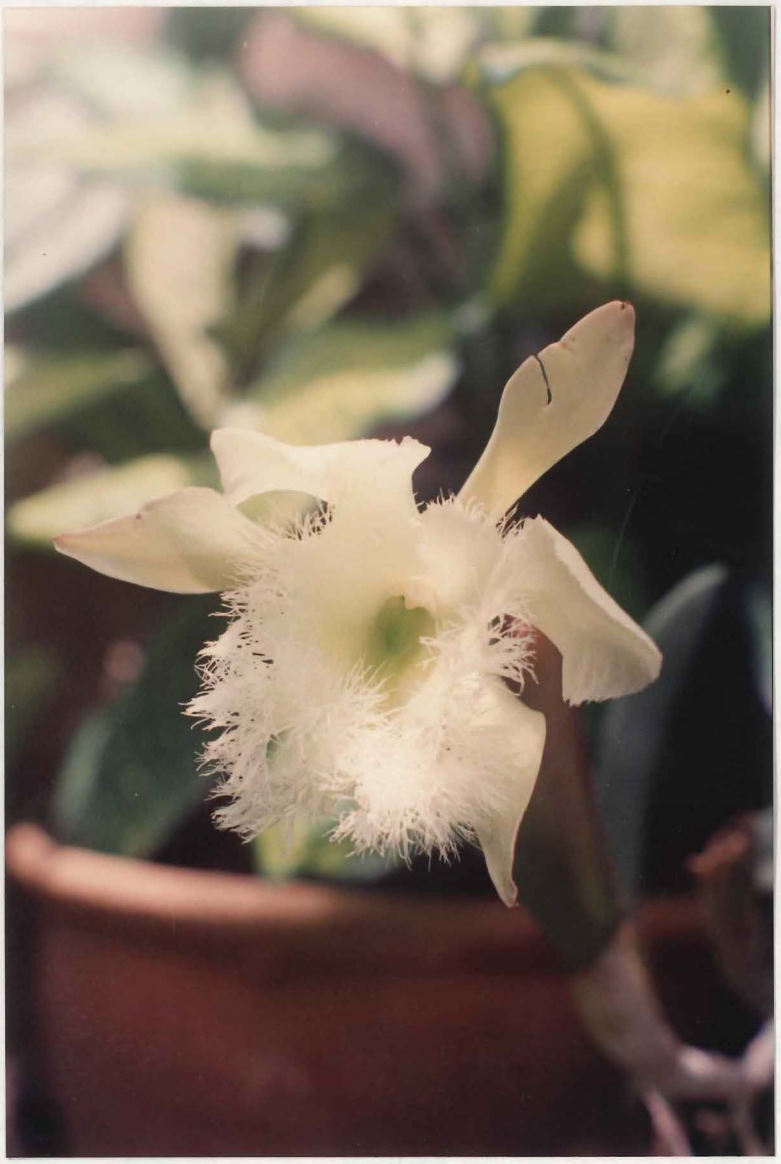

Fig. 1. Planta de *Rhyncholaelia digbyana* (Lindl.) Schltr. var. *fimbripetala* Ames., mostrando la flor característica de esta variedad.

3. Hábito de crecimiento

Las orquídeas son hierbas perennes y por el lugar en que crecen pueden ser terrestres, epifíticas, litofíticas, semiacuáticas o, muy raramente, subterráneas. La mayoría de las especies encontradas en las regiones templadas son terrestres, mientras que las de los trópicos y subtrópicos son, en general, epifíticas o litofíticas.

El crecimiento vegetativo de las orquídeas puede ser simpodial o monopodial. Todas las especies terrestres y muchas epifíticas son simpodiales, es decir, poseen un sistema de crecimiento en el cual el tallo vegetativo original deja de crecer al final de la floración, y se reanuda al siguiente año o época de floración en un eje diferente, lo que da como resultado una serie de tallos sucesivos anuales. En este tipo de crecimiento la inflorescencia puede ser lateral o terminal, como es el caso de *R. digbyana*. La forma de crecimiento monopodial es aquella en la que el crecimiento se presenta año tras año sobre el mismo eje; de esta manera, los nuevos brotes se producen sobre el ápice del brote anterior y las inflorescencias siempre estan localizadas en las axilas de las hojas (Ames y Correll, 1952).

4. Floración

En las orquídeas, la floración es generalmente anual, aunque hay algunas especies tropicales y subtropicales que florecen dos o más veces por año y otras que lo hacen durante

casi todo el año .

En su hábitat natural, en Honduras, *R. digbyana* florece una vez al año, dos semanas a un mes después del inicio de la época de lluvias. La flor permanece abierta de dos a tres semanas, tras lo cual, si no ha sido polinizada, muere y después de unos cuantos días cae.

Se ha comprobado la emisión de un olor fuerte en horas de la noche. Esta característica, unida al gran tamaño de la flor y a su coloración favorecen su polinización nocturna. El olor es un medio de atracción muy eficaz, actúa a grandes distancias y en las flores de este género, de noche. En muchas especies los polinizadores son inducidod por las fragancias florales y la composición química de éstas determina cuáles especies de polinizadores seran atraídos. Esta estrategia de atracción posteriormente limita a las potenciales especies polinizadoras. Pero aún así, la producción de esencias ayuda a prevenir la hibridización entre poblaciones compatibles de especies diferentes, pero cercanamente relacionadas (Roebuck y Steinhart, 1978). Hasta ahora, las sustancias encontradas en *R. digbyana,* son citronelol y linalol. Se informa que las flores de *Brassavola*, género en el cual se incluía anteriormente a *R. digbyana* son polinizadas por polillas, principalmente de la familia Noctuidae, por lo que son llamadas Phalenófilas (Roebuck y Steinhart, 1978). Por lo tanto *R. digbyana* se puede incluir en este grupo.

B. Propagación

La reproducción comercial de orquídeas por medios convencionales es difícil, ya que sus semillas no pueden germinar cuando se usan métodos tradicionales de siembra. Esto se debe a que las semillas son muy pequeñas, sólo miden entre 0,3 y 5 mm de largo y contienen poco o ningún endosperma o reserva alimenticia (Dressler, 1990). Su pequeño tamaño es casi determinante para que las semillas se pierdan si se siembran *in vivo* y sus limitadas reservas alimenticias hacen improbable su supervivencia. La germinación *in vitro* tiene muchas más posibilidades de éxito. En el caso de algunos géneros se puede obtener hasta un 100% de germinación, usando el medio adecuado (Pierik, 1990).

La germinación y el desarrollo tienen lugar mucho más rápido *in vitro*, ya que se realiza en un ambiente acondicionado y sin competencias con hongos o bacterias (Pierik, 1990)

Dadas las dificultades existentes en el cultivo de orquídeas, los descubrimientos hechos por Knudson en 1922 produjeron una verdadera revolución en el cultivo comercial de orquídeas. Knudson trabajó con semillas de varios híbridos de *Cattleya* y encontró que las semillas germinaban fácilmente en frascos de cristal conteniendo medios nutritivos compuestos de agar, macronutrimentos y micronutrimentos. Esta germinación tenía lugar en ausencia del hongo micorriza, por lo que se llamó germinación asimbiótica o germinación no-simbiótica. A

partir de este descubrimiento se pudo cultivar miles de plantas de una sóla cápsula o fruto, en lugar de las 10 ó 15 que se podían obtener de la siembra *in vivo* de semillas (Knudson, 1922).

Los descubrimientos de Knudson abrieron una amplia gama de posibilidades a los orquidófilos y cultivadores. Esto hizo que las plantas fueran más accesibles a un mayor número de personas y que se pudiera explorar el prometedor campo de la hibridización (Northern, 1961).

La micropropagación *in vitro* busca obtener, a partir de material vegetativo, gran cantidad de plantas en el menor tiempo posible y al menor costo. Esto se hace por medio del cultivo de partes vegetativas de la planta como, por ejemplo, ápices de raíces u hojas, bases de hojas, yemas laterales o terminales y nudos del escapo floral (Rao, 1977).

1. Propagación Sexual

La investigación en cultivo de tejidos, en orquídeas, data desde el principio de este siglo, casi desde el origen mismo de esta técnica. Al respecto, son muy importantes los aportes de Bernard quien, en 1909, logró aislar exitósamente el hongo que ayudaba a la germinación de semillas e hizo estudios comparativos de germinación con semillas infectadas y sin infección (Rao, 1977).

La propagación sexual *in vivo* es la que se realiza por medio de semillas; este procedimiento no se utiliza en la

actualidad para la producción masiva de plantas debido a que es muy complicado y porque además, proporciona un número reducido de individuos con variabilidad muy alta (Morel, 1972). Sin embargo, la germinación asimbiótica de embriones de orquídea ha hecho posible la producción masiva de gran cantidad de híbridos y especies valiosas.

Las desventajas de los métodos tradicionales o antiguos de propagación, como la siembra *in vivo* de semillas o la propagación por división de plantas hicieron posiblela búsqueda de otras alternativas de cultivo. Fue así como se pudo demostrar que los embriones de orquídeas podían cultivarse *in vitro* sin que mediara la acción de un hongo simbiótico (Knudson, 1922). Este descubrimiento jugó un papel muy importante en el desarrollo de la orquideología, e hizo factible el surgimiento de toda una industria alrededor de la propagación de orquídeas (Sauleda, 1976).

El rescate *in vitro* de embriones es la técnica más usada para la obtención de híbridos interespecíficos o intergenéricos, porque permite una germinación de casi el 100% de los embriones; por otra parte, ha sido empleada para la propagación de especies en peligro de extinción. No obstante, cuando se está tratando de propagar clones, éste es un método que no puede ser usado debido a la gran variabilidad genética que presenta la descendencia.

2. Propagación asexual

Prácticamente el único método para la propagación asexual *in vivo* es el deniminado como propagación por bulbo trasero. El método involucra la separación del último bulbo trasero y obliga a la planta a desarrollar las yemas que se encuentran en estado de reposo. Este proceso es extremadamente lento y sólo permite duplicar el número de plantas en un año (Bhojwani y Razdan, 1983).

En éstos momentos casi toda la investigación que se ha hecho en cultivo de tejidos, en orquídeas, ha estado vinculada con la producción masiva de híbridos y muy poca con la propagación de especies (Alán y Linares, 1992). Se considera que la micropropagación permite obtener duplicados de la planta madre original, usando explantes de yemas axilares o apicales (Morel, 1960), ápices y bases de hojas (Churchill *et al.*, 1971) y ápices de raíces (Churchill *et al.*, 1973).

En 1960 se produjo un hecho trascendental en la propagación vegetativa de orquídeas. En ese año, el cientifico francés George Morel intentó obtener plantas de *Cymbidium,* libres de virus a través del cultivo de meristemas. Aisló yemas de pseudobulbos traseros y cultivó *in vitro* el meristema con dos primordios foliares de aproximadamente 1 mm de largo. A partir de estos ápices obtuvo unos cuerpos esféricos que en su parte superior tenían una pequeña depresión de la cual, más tarde, emergía una hoja y en la parte inferior desarrollaban pequeños pelos absorbentes o rizoides. Eran

parecidos a los que se forman después de la germinación de la semilla. Estos cuerpos se conocen en la literatura reciente como "cuerpos protocórmicos" (Pierik, 1990). De manera ocasional estos cuerpos protocórmicos se dividen en forma espontánea, pero generalmente ello se consigue cortándolos en porciones. En el caso de *Cymbidium* se pueden producir seis u ocho nuevos protocormos en más o menos seis semanas. En principio, este proceso se puede repetir en forma indefinida. Si no se hacen nuevos cortes, el ápice de cada protocormo puede en principio desarrollar una plántula con hojas y raíces. De esta manera, Morel produjo millares de plantas en un año, a partir de un único ápice. El "clonado" de orquídeas por cultivo de meristemas fue la primera aplicación comercial de la propagación vegetativa *in vitro*. Este método, desarrollado originalmente para *Cymbidium* se modificó y se utilizó después para *Cattleya* y para otros géneros de orquídeas (Pierik, 1990).

La embriogénesis somática utiliza los siguientes tipos de explantes: a) material juvenil: embrión cigótico y partes de la plántula (nudo, entrenudo, hoja caulinar, raíz, rizoma), b) material de cultivo de tejidos: embrión somático y partes de plántulas regeneradas de embriones somáticos y c) Material adulto: meristema apical, bases y ápices de hojas (Rao y Rao, 1990).

C. Medios de cultivo

En el cultivo de tejidos de orquídeas se han usado muchos medios, desde unos muy simples basados en jugos de frutas y emulsiones de pescado, hasta otros más complejos y sofisticados (Arango, 1979).

Anteriormente, la mayoría de tejidos u órganos eran propagados, en medio sólido y el medio líquido era casi exclusivo para el cultivo de raíces. En la actualidad, después de muchos trabajos, el medio líquido y en agitación constante se ha vuelto más común para la callogénesis y la organogénesis. Para los cultivos en movimiento se hace uso de agitadores rotativos o laterales. En los primeros estudios se usaban los medios sólidos para la diferenciación, organogénesis o el cultivo de embriones. Las investigaciones relizadas en la década de los setenta, indican que el medio líquido es más eficaz para la inducción o proliferación, particularmente en protocormos o callos. Muchos investigadores usaron ambos tipos de medios para estudiar callogénesis u organogénesis. En 1977, Rao informó que el número de medios usados en esas investigaciones llegaba a 25. Actualmente, los medios más usados son el de Murashige y Skoog (1962), Knudson C (1946) y el de Vaccin y Went (1949). En el cultivo de ápices de hojas se han utilizado los medios de Knudson C, Murashige y Skoog y el de Heller (1953), principalmente en especies de la subtribu *Laeliinae* (Churchill *et al.*, 1972).

En algunas ocasiones, una receta particular es propuesta para un género o especie determinada y luego es modificada o mejorada mediante la adición de varios promotores del crecimiento, tales como agua de coco, jugo de tomate, extracto de banano, jugos de diferentes frutas, emulsión de pescado, extracto de carne y hasta de cerveza (Rao, 1977). En muchos casos, tales modificaciones dan resultados beneficiosos indudables, pero la fisiología y la nutrición de las plántulas, los órganos y callos son aún poco conocidas.

D. Sustancias de crecimiento

Scully (1967) observó que se puede inducir la formación de callo, en el cultivo *in vitro,* de meristemas de especies de la alianza *Cattleya*, usando la auxina ácido naftalenoacético (ANA), a la concentración de 1 mg/l. Por otra parte, Reinert y Mohr (1967) informan haber logrado callogénesis en *Cattleya*, usando las auxinas ácido indol butírico (AIB) y ANA, a una concentración de 1.75 mg/l. No informan haber usado citoquininas. Stewart y Button (1978) afirman haber usado las auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido para-diclorofenoxiacético (pAPC) y la citoquinina quinetina (K), cuando cultivaron ápices de raíces de algunos cultivares de *Epidendrum obrienianum*. Por otro lado, Flamée (1978) obtuvo buenos resultados en el cultivo de plántulas de *Paphiopedilum* sp., con el uso de ANA a una concentración de 1 mg/l. Kukulczanka

et al. (1989) obtuvieron la regeneración y organogénesis más altas cuando cultivaron *in vitro* brotes de *Vuylstekeara* 'Cambria' en el medio de MS con 0,2 mg/l de BAP y de ANA y 1g/L de peptona.

E. Ambiente físico

Las condiciones físicas más importantes para el buen desarrollo de un cultivo *in vitro* son: luz, temperatura, fotoperíodo y humedad relativa (Mroginsky y Roca, 1991).

Reinhert y Mohr (1967), obtuvieron buenos resultados cuando cultivaron m,eristemas de *Cattleya*, usando lámparas fluorescentes de luz fría, con una intensidad aproximada de 2000 lux, durante un período de 16 horas, y a una temperatura entre los 24° y los 28°C. Stewart y Button (1978), tuvieron conclusiones satisfactorias, en la formación de callo, cuando cultivaron ápices de raíces de *Epidendrum*, bajo las siguientes condiciones: intensidad luminosa de 1000 lux, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 23 a 25°C y una humedad relativa de 75 $\pm$ 5%. Flamée (1978), obtuvo resultados positivos en el cultivo de embriones y plántulas de *Phalaenopsis,* a una intensidad de 3500 lux, con un fotoperíodo de nueve horas y temperatura de 22°C.

Churchill *et al.* (1972), informan haber obtenido callogénesis y posteriormente formación de plántulas, en el cultivo de ápices de hojas de *Laeliocattleya*, manteniendo una intensi-

dad de 2500 lux proporcionada, por una mezcla de bulbos incandescentes y lámparas Gro Lux^{R}, con un fotoperíodo de 18 horas y una temperatura de 24 $\pm$ 2°C. Morel (1960), produjo plantas de *Cymbidium* a partir de yemas de bulbos traseros, cultivadas a una temperatura de 22°C, y un fotoperíodo de 12 horas.

Por otra parte, Tanaka *et al.* (1976) obtuvieron plántulas de *Phalaenopsis* cultivando ápices de raíces a 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas con lámparas fluorescentes de luz blanca. Arditti *et al.* (1977), lograron obtener plantas cultivando yemas ubicadas en el escapo floral de plantas de *Phalaenopsis,* cultivándolas con una intensidad luminosa de 2500 lux, producidas por una mezcla de lámparas fluorescentes y bulbos incandescentes durante un fotoperíodo de 16 horas.

F. Oxidación

Oxidación es la producción y secreción de compuestos fenólicos por los explantes. Estos compuestos inhiben el crecimiento normal y, eventualmente, matan al explante. Por ello, siempre que se trabaja en cultivo de tejidos se trata de reducir o eliminar la producción de estos compuestos (Ishii *et al.* 1979). Con esa finalidad se hace uso de sustancias químicas, así como también de factores físicos. Entre los agentes antioxidantes de origen físico, están el cultivo en la oscuridad durante la etapa inicial y el uso de medios líqui-

dos. Entre los agentes antioxidantes de origen químico se tienen: la cisteína, el ácido ascórbico y el ácido cítrico, además del carbón activado (Moltalván, 1992).

Alán y Linares (1992), utilizaron con éxito el cultivo en la oscuridad, en la propagación de *Cattleya aurantiaca*, durante la etapa inicial del cultivo.

Huang (1988), mantuvo los explantes en una solución antioxidante, con 100 mg/l de ácido ascórbico y 150 mg/l de ácido cítrico.

G. Material vegetal

Se considera que las orquídeas son fáciles de propagar por medio de cultivo de tejidos *in vitro*. La familia *Orchidaceae* incluye casi 25000 especies, agrupadas en más de 900 géneros. Tales especies son extremadamente heterocigóticas, razón por la cual la respuesta al cultivo *in vitro* es extremadamente variable y depende principalmente del género, especie y aún del genotipo. La respuesta a este tipo de cultivo está pobremente documentada en la literatura (Lindsey, 1991).

Al culivar orquídeas *in vitro* se pretende destruir la menor cantidad de tejidos o plantas. Por esta razón, se trata de usar tejidos que no conduzcan a la destrucción de la planta como ocurre cuando se utilizan meristemas de yemas apicales.

Dentro de la gran variedad de tejido como fuente de explantes, se informa sobre el uso de ápices y bases de hojas

(Vij y Pathak, 1990; Yam y Weatherhead, 1991; Fu, 1979; Churchill *et al.*,1979; Reinert y Mohr, 1967; Churchill *et al.*, 1978), el empleo de los brotes laterales y apicales (Li-Chung, 1988; Morel, 1960; Stewart y Button, 1975; Lindemann *et al.*, 1970; Teo, 1978; Scully, 1967; Kukulczanka *et al.*, 1979; Gu y Yan, 1989; Madhuri y Vasundhara, 1990), y otras partes de la planta como rizomas (Yam y Weatherhead, 1990; Kim *et al.* 1988), ápices de raíces (Kraus y Monteiro, 1989; Stewart y Button, 1978; Churchill *et al.*, 1972; Tanaka *et al.*, 1976), y yemas en reposo de pseudobulbos traseros (Vajrabhaya, 1978).

La propagación sexual *in vitro* o rescate de embriones a diferencia de la asexual o vegetativa, no implica la destrucción de tejidos importantes para la planta, porque se utilizan las semillas inmaduras (embriones). Generalmente una sola cápsula proporciona suficiente cantidad de embriones, entre 1300 y cuatro millones (Pierik, 1990), por lo que no es necesario tener gran cantidad de cápsulas cuyo mantenimiento podría conducir al debilitamiento de la planta madre.

1. Apices y bases de hojas

Se han registrado varios métodos de regeneración, en ciertas orquídeas; pero si se considera el tamaño de la familia, sólo unas pocas especies o híbridos han sido estudiados con miras a analizar su potencial regenerativo a partir de hojas. Champagnat *et al.*, citados por Rao (1977), usaron hojas de plántulas de *Cattleya* para inducir crecimiento

posterior. Por otra parte, el empleo del tejido meristemático, en la base de las hojas, condujo a la formación de callo el que se diferenció en muchos cuerpos protocórmicos. En este caso se usó ácido indol acético (AIA), quinetina (K), caseína hidrolizada, extracto de hígado y vitaminas, como variables inductoras del crecimiento. Se demostró que se podía desarrollar el potencial de la base de las hojas para producir grandes cantidades de plantas.

Los ápices de hojas jóvenes de *Dendrobium, Epidendrum* y *Laeliocattleya* fueron usados por Churchill *et al.* (1971), para inducir regeneración. Después de seis a siete semanas en cultivo, desarrollaban pequeños callos y cuerpos protocórmicos.

Churchill *et al.* (1972), obtuvieron plantas a partir de ápices de hojas de plántulas de *Epidendrum obrienianum* u hojas jóvenes de crecimientos nuevos de plantas maduras de *Laeliocattleya* cv. Portia "Mayflower". Las plántulas fueron cultivadas en el medio de Heller modificado con 30 g/l de azúcar de cocina y suplementado con 1mg/l de 2,4 - D y 0.5 mg/l de bencilaminopurina (BAP) y en el medio de MS modificado sin adenina, niacina o piridoxina. Una vez obtenidos los callos o cuerpos protocórmicos, se cultivaron en medio de Knudson C.

Vij y Pathak (1990), obtuvieron regeneración cuando cultivaron bases y ápices de hojas de nueve especies de orquídeas, usando los medios de Mitra, MS y Knudson C modifi-

cado, con varias combinaciones de reguladores de crecimiento como AIA, 2,4-D, AIB, ANA, BAP, quinetina y suplementos orgánicos de crecimiento.

Yam y Weatherhead (1991) produjeron plantas cuando cultivaron ápices de hojas, de plántulas cultivadas *in vitro*, de cuatro especies nativas de Hong Kong, usando los medios de Heller (1953), MS e Ichihashi y Yamashita (1977), dichos medios se modificaron con la adición de agua de coco al 20%, grafito, ANA y BAP. Los mejores resultados, en *Pholidota chinensis,* se produjeron con el medio de Heller, con dosis bajas de BAP (1 mg/l) y ANA (0,2 mg/l).

2. Apices de raíces

A pesar de que de según el principio de totipotencialidad de la célula enunciado por Haberlandt (1902), se podrían obtener plántulas a partir de una célula proveniente de cualquier parte de la planta, muy pocas veces se ha obtenido organogénesis o callogénesis cuando se usan ápices de raíces de orquídeas. Sin embargo, Tanaka *et al.* (1976) lograron obtener plantas cuando cultivaron ápices de raíces de plantas jóvenes de híbridos de *Phalaenopsis amabilis*, en el medio de cultivo de Kyoto modificado, sin auxinas, ni citoquininas. A los tres meses del cultivo, se observó incremento en la actividad celular y la formación de callo y, gradualmente, la constitución de cuerpos protocórmicos, similares a los protocormos obtenidos de semillas de *Phalaenopsis*.

Churchill *et al.* (1972), informaron no haber obtenido callogénesis ni organogénesis, cuando cultivaron ápices de raíces de *Epidendrum obrienianum*, en diferentes medios y subcultivadas cada seis meses. Después de dos años en cultivo, la mayoría de las raíces todavía crecían; no obstante, se observaba, un adelgazamiento en las raíces y una tendencia a perder la capacidad fotosintética. Sin embargo, Stewart y Button (1978) indican que obtuvieron callo y finalmente plántulas, usando ápices de raíces de *Epidendrum obrienianum*; atribuyen el éxito al uso de hormonas, principalmente 2,4 - D a una concentración de 1 mg/l y ácido paratriclorofenoxiacético, a una concentración de 2 mg/l.

Kraus y Monteiro (1989), obtuvieron cuerpos protocórmicos, que posteriormente originaron plántulas, cuando cultivaron ápices de raíces de plántulas de *Catasetum pileatum*. Las plántulas se cultivaron *in vitro*, en medio de MS modificado, con la adición de 1 g/L de peptona; no informan haber usado auxinas ni citoquininas.

3. Yemas apicales y laterales

En 1960 Morel describió un método *in vitro* para multiplicar orquídeas, a una tasa muy alta. Observó que cuando cultivaba ápices de *Cymbidium*, en vez de desarrollar un brote folioso se observaba la formación de un cuerpo esferoidal, con rizoides en la base. Estas estructuras eran morfológicamente muy similares a los protocormos formados durante el proceso

de germinación de la semillaa de orquídeas. Algunos de estos protocormos proliferaron y formaron racimos de hasta 12 protocormos. Morel cortó estos cuerpos en tres o seis partes y las cultivó en medio de cultivo de Knudson C. Cada pieza formó protocormos adicionales y de una sola pieza fue posible obtener hasta doce protocormos en un mes. Este proceso podía repetirse indefinidamente. Por este método se pueden obtener varios millones de plantas en un año, partiendo de un solo meristema apical de menos de 1 mm de largo (Bhojwani y Razdan, 1983). Esta técnica fue rápidamente adoptada por los cultivadores comerciales de orquídeas, quienes vieron en ella una forma excepcional de obtener una gran cantidad de plantas, con características uniformes y de gran valor comercial.

Reinert y Mohr (1967), produjeron hasta 3000 plántulas a partir de un sólo meristema lateral de plantas de *Cattleya* o *Cymbidium;* los propágulos se cultivaron en un medio líquido, desarrollado por ellos, con la adición de 100 ml/l de agua de coco y las auxinas AIB y ANA, ambas a la concentración de 1.75 mg/l. Encontraron que al usar 1mg/l de quinetina y 100 mg/l de inositol, los explantes se volvieran de color café y crecieron lentamente.

Scully (1967), obtuvo buenos resultados cuando cultivó especies de la alianza *Cattleya*, en el medio de Vaccin y Went (1946) con la adición de 25% de agua de coco, o en el medio de Morel (1965) con 1 mg/l de ANA y 10% de agua de coco. Como explantes, utilizó meristemas apicales y yemas laterales,

ubicadas en el último crecimiento vegetativo. Obtuvo cuerpos protocórmicos que finalmente desarrollaron plántulas. El proceso, hasta el desarrollo de protocormos, duró desde 45 hasta 85 días, dependiendo de la especie.

Huang (1988), produjo más de 200 plantas, a partir de un solo explante, cuando cultivó yemas apicales de híbridos de *Paphiopedilum*. Inicialmente cultivó los explantes en medio de MS (1962), con 3% de sacarosa, 100 mg/l de i-inositol, 0,1 mg/l de ANA y 3 mg/l de N^6-isopenteniladenina (2iP).

Teo (1988), cultivó brotes apicales de *Haemaria discolor*, una especie usada por su follaje ornamental, en condiciones *in vitro* en medio Knudson C; los brotes no produjeron protocormos, ni callos sino numerosas estructuras caulinares o tallos, sin que se observara ninguna influencia de las concentraciones de auxinas o citoquininas.

Kukulczanka *et al*. (1989) obtuvieron *in vitro* brotes de *Vuylstekeara* 'Cambria', en medio de MS con dosis de entre 0.2 y 1.0 mg/l de ANA y BAP. Los brotes laterales se desarrollaron después de cinco semanas; cuerpos protocórmicos, brotes adventicios y raíces lo hicieron después de 10 semanas. La inclusión de 1 g/L de peptona estimuló la actividad meristemática, la proliferación de protocormos, la formación y el desrrollo de brotes adventicios. El ANA promovió la rizogénesis y el BAP sólo la inhibió, pero este efecto fue superado con la adición de ANA o peptona o de ambas. La regeneración y organogénesis más altas se obtuvieron con medio de MS con 0.2

mg/l de BAP y de ANA y 1 g/L de peptona.

Yoneda *et al.* (1979), registraron el mayor peso promedio de plántulas cuando cultivaron meristemas de *Cattleya fabingiana,* en el medio basal Hyponex con 20 mg/l de benziladenina y 100 mg/l de ácido giberélico. El mayor tamaño (altura) se obtuvo al cultivar los meristemas en el medio basal Hyponex, con 10 mg/l de benziladenina y 100 mg/l de ácido giberélico.

Gu y Yan (1979), lograron los mejores resultados en la formación de cuerpos protocórmicos, al cultivar ápices de *Cymbidium grandiflorum*, en medio líquido de Vacin y Went con 1.0 mg/l de BAP. Pero el mejor desarrollo y diferenciación de los cuerpos protocórmicos se obtuvo al cultivarlos en medio sólido de Knudson con 0.4 mg/l de BAP.

Madhuri y Vasundhara (1990), cultivaron meristemas apicales en medio líquido o sólido de Vacin y Went, suplementados con 10, 15 y 20% de agua de coco, con varias combinaciones de AIA, AIB y ANA (0, 0.5, 1.0 mg/l de cada una) y sacarosa al 1 ó 3%. La mejor formación de brotes se obtuvo en medio líquido, con 3% de sacarosa y 1 mg/l de AIB, ANA o BAP. Las auxinas no fueron necesarias para el enraizamiento, el que fue mejor cuando únicamente se usó un 1% de sacarosa.

4. Embriones

La ténica de rescate de embriones ha sido ampliamente usada en el cultivo de orquídeas para propagar híbridos y su uso esta bien documentado en la literatura. Sin embargo, hay

pocos informes acerca del uso de esta técnica para la propagación de especies en peligro de extinción. En este sentido son notables los trabajos de Rubluo *et al.* (1989), Dodson (1981), Rubluo *et al.* (1993), Pain (1990) y Christenson (1989).

Rubluo *et al.* (1989) consiguieron la reintroducción de *Bletia urbana*, en México, en su hábitat natural, cultivando plántulas provenientes de la germinación de embriones *in vitro*, en los medios de KC y MS con suplementos orgánicos. La mejor germinación ocurrió en el medio de KC con 3% de sacarosa y 10% de agua de coco. Los cultivos se colocaron en un ambiente con 25 $\pm$ 2°C y un fotoperiodo de 16 horas. Uno de los casos más famosos de reintroducción a su ambiente natural de especies en peligro de extinción es el de *Epidendrum ilense*, especie ecuatoriana extremadamente rara y con un hábitat casi totalmente destruido. Después de varios intentos de autopolinización se pudo obtener una cápsula con semillas viables, que fueron cultivadas *in vitro*, produciendo plántulas que mostraron algo de diversidad genética que fue reintroducida en el ambiente silvestre en Ecuador (Christenson, 1989).

Rubluo *et al.* (1993) informan de la recuperación exitosa de cinco especies de orquídeas en peligro de extinción y su posterior reintroducción. Cultivaron embriones *in vitro* en el medio de KC con las vitaminas del medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968). Usaron semillas obtenidas de cápsulas provenientes del campo y obtuvieron una tasa de germinación de más del 90%. Tuvieron éxito con *Laelia anceps, Bletia urbana, Lycaste*

III. MATERIALES Y METODOS

A. Ubicación

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, del Departamento de Agronomía, de la Escuela Agrícola Panamericana.

B. Material vegetal

Se utilizaron tanto plantas compradas a colectores particulares, del área de Talanga, como aquellas obtenidas por el autor en colectas efectuadas en los bosques del Norte del Valle de Talanga, Departamento de Francisco Morazán.

Se aislaron los siguiente tipos de explantes:

1. Yemas apicales:

Las yemas apicales se obtuvieron del último pseudobulbo de plantas maduras, es decir, en edad de floración.

2. Apices de raíces:

Se extrajeron de las raíces jóvenes que presentaban actividad meristemática, la que se reconoce por una coloración verde brillante en el ápice.

3. Apices y bases de hojas:

Se usaron ápices y bases de hojas jóvenes de plantas

maduras, en estado previo a la expansión de la lámina.

4. Embriones inmaduros :

Para la producción de semillas se hizo una polinización manual usando una aguja para remover los polinios del progenitor masculino y colocarlos en el estigma de la flor de la planta madre. Después de 10 meses se cosechó una cápsula, al 80% de su madurez, con semillas viables listas para la siembra.

C. Desinfección

Para obtener las yemas apicales y las bases y ápices de hojas, se separó el último pseudobulbo de la planta, se lavó con jabón y abundante agua para quitarles el polvo y la suciedad. Se cortaron las yemas apicales y las hojas jóvenes, se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 30 segundos. Después se pusieron en una solución de hipoclorito de calcio al 1%, con unas gotas de Tween 80 durante 15 minutos en un agitador magnético. Por último, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, con unas gotas de Tween 80, durante 15 minutos en agitación constante. Después de la desinfección, en la cámara de flujo laminar, el material se enjuagó cuatro veces con agua bidestilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito de calcio o hipoclorito de sodio.

Para los ápices de raíces, se cortaron aproximadamente 2

cm de la parte terminal de la raíz. Se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante cinco segundos; posteriormente se pusieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 15 minutos. En la cámara de flujo laminar, se enjuagaron cuatro veces con agua bidestilada estéril

La cápsula se lavó con jabón comercial y abundante agua para eliminar el polvo y otros residuos. Se esterilizó con etanol al 95% durante un minuto, luego en hipoclorito de calcio al 1% e inmediatamente después en hipoclorito de sodio al 2%, durante 20 minutos en cada una de estas soluciones. A ambas se les agregó dispersante Tween 80. Después, en la cámara de flujo laminar, se enjuagó tres veces con agua bidestilada estéril.

D. Medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron el de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con hormonas y otras sustancias orgánicas y el Knudson C (1951) modificado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición de los medios básicos de Murashige y Skoog (1962) modificado y de Knudson C (1951) modificado, utilizado para la propagación *in vitro* de *R. digbyana*. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.

Macroelementos	MS (mg/l)	Knudson C (mg/l)
NH_4NO_3	1650	
KNO_3	1900	
$Ca(NO_3)_2 4H_2O$		1000
$(NH_4)_2SO_4$		500
$CaCl_2 2H_2O$	440	
$MgSO4\ 7H_2O$	370	250
KH_2PO_4	170	250
FeNa-EDTA	37,5	37,5
Microelementos		
KI	0,83	0,63
H_3BO_3	6,2	6,2
$MnSO_4 4H_2O$	22,3	22,3
$ZnSO_4 7H_2O$	8,6	8,6
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0,25	0,25
$CuSO_4 5H_2O$	0,025	0,025
$CoCl_2 6H_2O$	0,025	0,025
Inositol	100	
Acido nicotínico	0,01	
Piridoxina	0,01	
Pantotenato	0,01	
Tiamina	0,1	
Biotina	0,0001	
Caseína hidrolizada	1	
Sulfato de adenina	5	
Cisteína	10	
Agua de coco		10%
Sacarosa	30000	20000
Agar	7500	7500
pH	5,8	5,5

BIBLIOTECA WILSON POPENOE
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 93
TEGUCIGALPA HONDURAS

E. Hormonas

Se usaron tres auxinas y una citoquinina. Las auxinas fueron los ácidos naftalenoacético (ANA), indolbutírico (AIB)

y el 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4 - D). La citoquinina fue la bencilaminopurina (BAP).

Los medios de cultivo para cada experimento se prepararon usando las diferentes combinaciones de auxinas y citoquinina, que se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Dosis y combinaciones de hormonas usadas en los diferentes experimentos para la propagación *in vitro* de *R. digbyana*. Escuela Agrícola Panameri cana, 1991-1992.

Citoquininas (mg/l)	Auxinas (mg/l) 0	1	2
0	0:0	0:1	0:2
0,5	0,5:0	0,5:1	0,5:2
1	1:0	1:1	1:2

F. Preparación de medios de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo de MS se usaron soluciones madres de los macronutrimentos (concentrada 10 veces) , micronutrimentos (concentrada 1000 veces), y de FeNa-EDTA (concentrada 200 veces). Para el medio de Knudson C se pesaron los macroelementos cada vez que se preparó; sólo se utilizó la solucion madre de FeNa-EDTA en la misma concentración. Para los micronutrimentos se usó la solución madre del medio de MS. Los medios de cultivo se solidificaron con agar al 0.75%.

Para cada experimento se preparó un litro de medio semisólido, del que se tomaron nueve partes de 100 ml. A cada una de ellas se le añadió la dosis correspondiente de auxinas y citoquininas. El medio se transfirió, con la ayuda de una jeringa automática, a tubos de cultivo de 18 x 150 mm, los que se taparon con tapas de plástico. Los tubos se marcaron previamente con el número del tratamiento.

Se obtuvo 10 tubos de cada tratamiento, considerándose cada tubo como una repetición.

G. Esterilización

Los tubos con medio se esterilizaron en una autoclave automática, a 1.06 kg de presión por cm^2 (15 $lbs/pulg^2$), a 120°C (251°F) durante 20 minutos.

H. Cristalería e instrumentos

La cristalería se lavó con detergente Alconox^R, se enjuagó con abundante agua y al menos tres veces con agua bidestilada. Se secó en un horno a temperatura constante de 120°C durante cuatro horas. Las pipetas, frascos volumétricos y probetas, se secaron al aire.

Se usaron pinzas, bisturíes y agujas hipodérmicas, que se esterilizaron flameándolos en la llama de un mechero antes de cada operación. Durante el tiempo en que no se usaban,

permanecieron sumergidos en alcohol. Los instrumentos se enfriaron con agua bidestilada estéril antes de cada operación, para no dañar los tejidos.

I. Obtención de explantes

Una vez que el tejido estuvo esterilizado y enjuagado se disecó en la cámara de flujo laminar, usando pinzas, bisturíes y agujas hipodérmicas.

La disección se hizo sobre discos de papel filtro en platos de Petri esterilizados previamente en un autoclave. Durante el proceso de disección se agregó un poco de agua bidestilada estéril al plato para reducir la oxidación de los explantes. A las yemas apicales se les quitó seis o siete brácteas, hasta tener un explante de aproximadamente 3 mm de largo. Cada explante se colocó en un tubo de cultivo y la tapa se selló con Parafilm^{R}.

Como fuente de explantes de las bases y ápices de hojas se tomó las hojas jóvenes de plantas maduras, en el estado previo a la extensión de la lámina. Se cortó la parte basal de la hoja en forma paralela a la línea de unión con el pseudobulbo y, posteriormente, esta porción se dividió en cinco o seis partes de 2 mm de ancho. Los cortes se hicieron en forma paralela a las nervaduras. Los ápices de hojas se cortaron de una longitud cercana a los 5 mm y luego fueron seccionados longitudinalmente en cinco o seis partes, siendo cada una de

ellas un explante; una vez obtenidos los explantes, se colocaron en tubos de cultivo con medio y se sellaron con Parafilm^{R}.

Para los ensayos con ápices de raíces se seleccionaron plantas procedentes del campo, se tomaron las puntas de las raíces, en plena actividad meristemática. Tales puntas tenían una longitud de unos 2 cm. Los explantes (ápices), con los meristemas que se cortaron de las puntas de las raíces, tenían una longitud de aproximadamente 1 a 2 mm, se colocaron en tubos con medio de cultivo y se sellaron con Parafilm^{R}.

Para los experimentos con embriones se usaron semillas provenientes de la cápsula que se obtuvo mediante polinización manual. La cápsula fue cortada en cuatro secciones longitudinales con la ayuda de pinzas y bisturíes. Se extrajeron numerosas semillas de cada sección y se sembraron en frascos de Mason, con 100 ml de medio.

J. Condiciones ambientales

Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 25 $\pm$ 1°C. Durante los primeros dos meses se mantuvieron en la oscuridad para reducir la oxidación. Posteriormente, se expusieron a un fotoperiodo de 16 horas de luz, con una intensidad lumínica de 3000 lux.

K. Metodología

Esta investigación se realizó por medio de una serie de experimentos, en los cuales se usó dos medios de cultivo (Cuadro 1), cada uno con las diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas (Cuadro 2). Se probaron tres auxinas (ANA, 2,4-D y AIB) y una citoquinina (BAP). Los experimentos se organizaron siguiendo un diseño factorial, en el que uno de los factores fue una auxina y el otro la citoquinina. Se empleó tres dosis de auxinas y tres de la citoquinina; de esta manera, se obtuvo nueve combinaciones o tratamientos, los cuales permitieron estudiar el efecto de las auxinas solas, las citoquininas solas y las combinaciones posibles de ambas (Cuadro 2). La investigación se orientó hacia las combinaciones de hormonas, debido a que en estudios, anteriores, con especies filogenéticamente cercanas se lograron resultados favorables.

IV. RESULTADOS

A. Apices de raíces

El efecto del ANA y BAP en el cultivo a la luz de ápices de raíces de *Rhincholaelia digbyana,* en medio MS modificado se estudió por medio de un ensayo.

En este experimento no hubo problemas de oxidación ni de contaminación. Después de unas semanas de cultivo, todos los explantes habían tomado una coloración blanquecina; luego algunos de ellos, se volvieron de un color café claro. Los explantes se observaron cada dos semanas; no hubo ninguna reacción o crecimiento, ni cambios en la coloración.

B. Bases y apices de hojas

Se montó un ensayo para estudiar el efecto del ANA y del BAP en el cultivo de bases y ápices de hojas de *R. digbyana* en medio MS modificado, por dos meses en la oscuridad y, posteriormente, a la luz.

Después de dos semanas de cultivo, la mayoría (80%) de los explantes habían muerto. Debido a una oxidación fuerte, los explantes se tornaron de un color café oscuro, el que comenzó por los bordes o cortes, casi al momento de disecar-

los; a pesar de que se colocaron en platos de Petri, con una solución de agua bidestilada estéril y ácido cítrico. Más tarde, la coloración café se extendió hacia el centro del explante. Los explantes sobrevivientes se transfirieron a medio fresco, pero una semana después muerieron.

C. Yemas apicales

1. Efecto del ANA y BAP, en los medios de MS y KC, sobre el cultivo de yemas apicales.

Se estudió, por medio de varios experimentos, el efecto del ANA y BAP en los medios de MS y KC, sobre el cultivo de yemas apicales de *R. digbyana*.

Los principales problemas en el primer experimento, fueron la contaminación ocasionada en su totalidad por bacterias sistémicas y la alta tasa de mortalidad. La oxidación fue leve y la supervivencia fue de baja a media, sin que se observara ninguna influencia de los tramientos en la misma. Los explantes sobrevivientes fueron transferidos, cada cuatro semanas, a medio fresco con las mismas combinaciones de hormonas que aquellos en los cuales se cultivaron originalmente. Después de cuatro semanas de cultivo en la oscuridad, sólo un explante había formado callo en el medio de KC. Once semanas después de la siembra un explante del tratamiento que contenía 1 mg/l de las dos hormonas en el medio de MS (Cuadro 3), formó un callo de color verde claro, de apariencia

friable, de aproximadamente 3 mm de diámetro. Veinte semanas después de la siembra tenía un tamaño de unos 12 mm de diámetro, presentaba una coloracion verde brillante, de apariencia friable y con numerosas protuberancias redondeadas, de color un poco más claro en la superficie. Estas protuberancias tenían la apariencia de protocormos muy pequeños (Fig. 2).

El callo fué dividido en 12 partes y cada una de ellas se subcultivó cada dos semanas, en el mismo medio, con la misma combinación de hormonas. Ocho semanas después del primer subcultivo, seis porciones habían formado callos, tres de los cuales presentaban protocormos perfectamente distinguibles, callos y brotes sin raíces. Dos presentaban sólo protocormos y unicamente uno tenía callo sin diferenciar. Todos fueron divididos en tantas porciones como lo permitía su tamaño. Los explantes medían entre 2 y 3 mm y fueron subcultivados en un medio de cultivo igual al inicial. Catorce semanas después, la mayoría de los callos seguían vivos y otros habían aumentado varias veces su tamaño. Aunque algunos no presentaban crecimiento, medían aproximadamente 2 ó 3 mm de diámetro y tenían una coloración blanquecina o verde amarillenta, con secciones de color café (Fig. 3). Otros presentaban un color verde claro y habían crecido hasta alcanzar aproximadamente 4 mm de diámetro. Algunos de ellos presentaban cuerpos semejantes a protocormos, con distintos grados de diferenciación (Fig. 4). Otros eran de color café con una porción verde que todavía

permanecía unida al callo (Fig. 5). Los callos muertos tenían un color café oscuro o negro. No mostraban contaminación de hongos o bacterias.

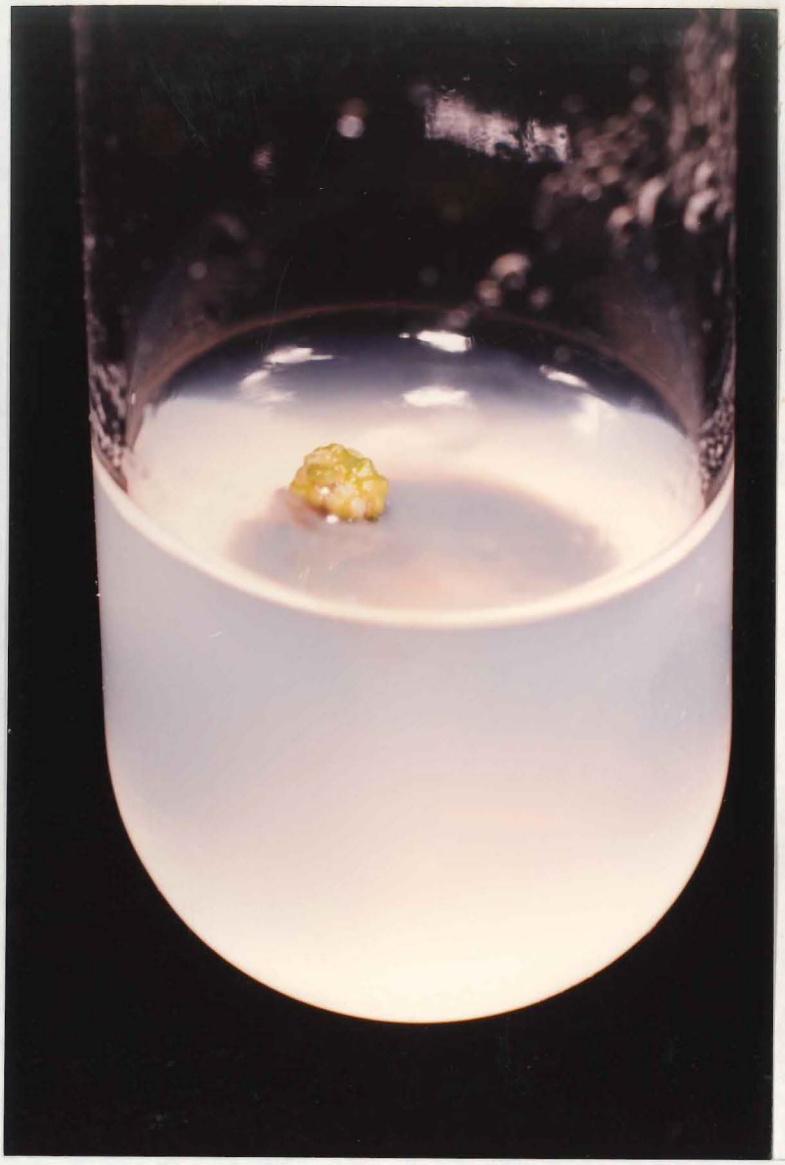

Fig. 2. Callo con cuerpos protocórmicos de *R. digbyana* originado de una yema apical cultivada en el medio de MS modificado, después de 11 semanas de cultivo.

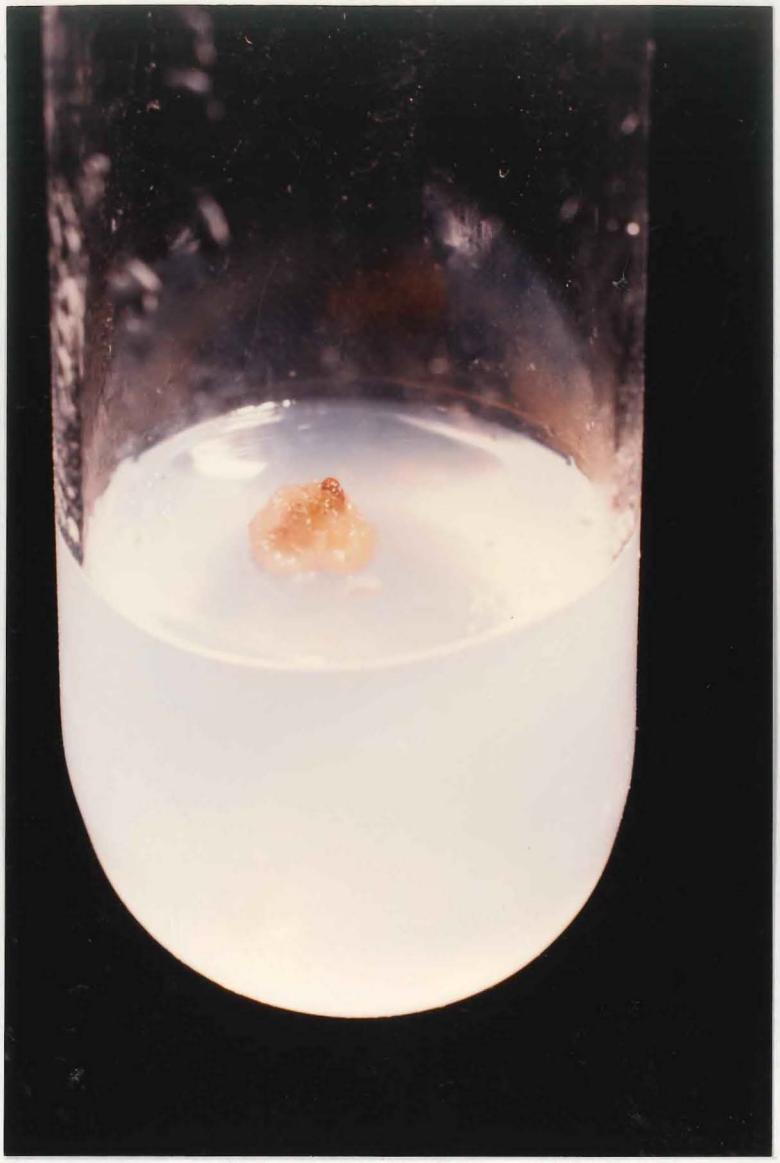

Fig. 3. Callo proveniente de un subcultivo de yema apical de *R. digbyana* originado de una yema apical cultivada en el medio de MS modificado, 20 semanas después de la siembra.

Fig. 4. Callo de *R. digbyana* con protocormos en diferentes grados de diferenciación, 20 semanas después de la siembra.

Fig. 5. Subcultivo de un callo originado de una yema apical de *R. digbyana* cultivado en el medio de MS modificado, 20 semanas después de la siembra.

Once semanas después de la siembra hubo callogénesis en algunos de los tratamientos, principalmente en el medio de KC (Cuadro 3). En ausencia de ANA y BAP (testigo), hubo un 50% de callos. Los porcentajes de callogénesis fueron variables. En ausencia de BAP hubo un 50% de callos, para las dosis de 0 y 1,0 mg/l de ANA. Sin embargo, no hubo formación cuando la dosis se aumentó a 2,0 mg/l. En las diferentes combinaciones de hormonas, el mejor tratamiento fue el de 1 mg/l de ambas sustancias, con un 50% de callogénesis. Los callos eran pequeños, de 2 a 5 mm de diámetro, de color amarillo pálido o café claro y, al principio, de apariencia mucilaginosa (Fig. 6). Luego, algunos de ellos se volvieron de color verde claro y de apariencia friable. Los brotes eran de color verde brillante y pequeños de entre 3 y 5 mm (Fig. 7). Los callos y brotes fueron transferidos a medio fresco.

Cuadro 3. Efecto del ANA y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, once semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993.

BAP (mg/l)	ANA (mg/l)					
	0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	0	50	0	50	0	0
0,5	0	0	0	0	0	25
1,0	0	0	25	50	0	0

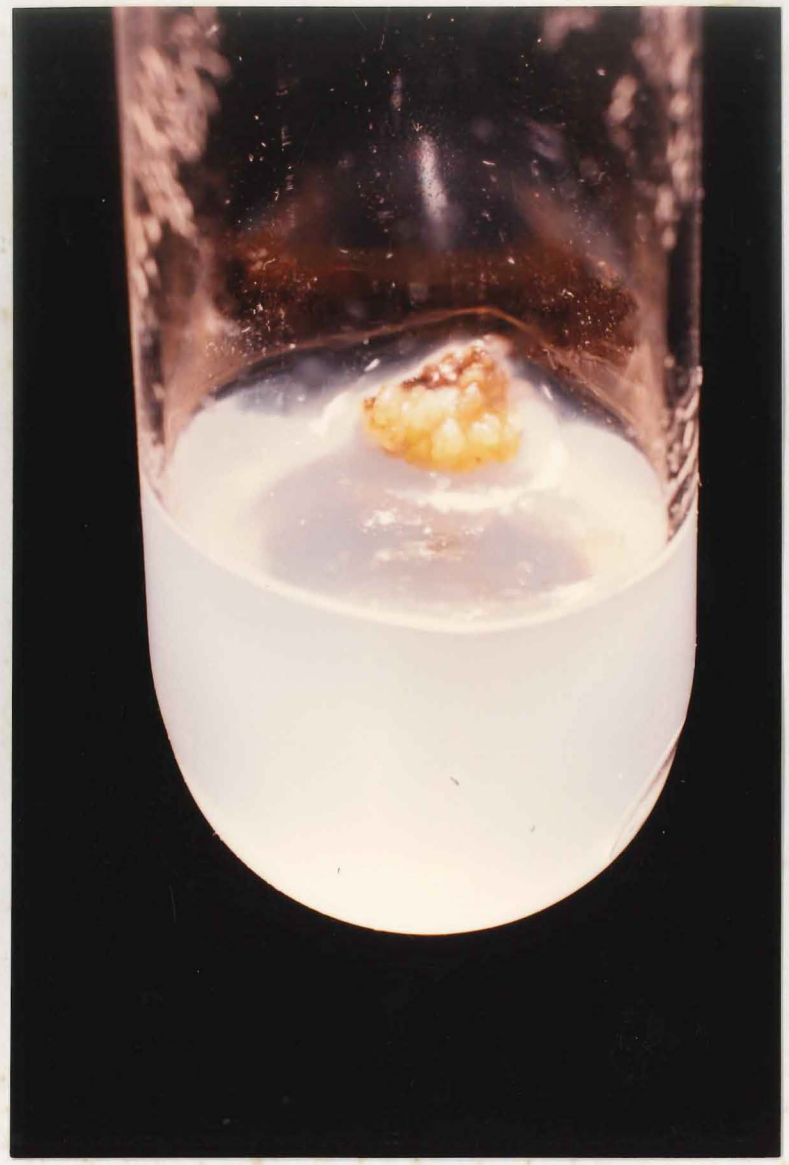

Fig. 6. Callo de *R. digbyana* originado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 11 semanas después de la siembra.

Fig. 7. Brote de *R. digbyana* proveniente de una yema apical cultivada en el medio de KC, 11 semanas después de la siembra.

En el Cuadro 4 se presentan los porcentajes de formación de callos a las 20 semanas de cultivo para el medio de KC. La mayoría de los callos eran pequeños (2 a 5 mm de diámetro), de color verde a verde amarillento (Fig. 8), aunque había algunos color café claro. Uno de los callos, del tratamiento sin BAP y con 1,0 mg/l de ANA, creció hasta alcanzar aproximadamente 13 mm de diámetro; era de color verde oscuro y con una superficie cubierta de pequeños cuerpos similares a los protocormos (cuerpo protocórmicos).

Cuadro 4. Efecto del ANA y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, viente semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993.

BAP (mg/l)	ANA (mg/l) 0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	0	50	0	50	0	0
0,5	0	0	0	0	0	50
1,0	0	0	100	100	0	50

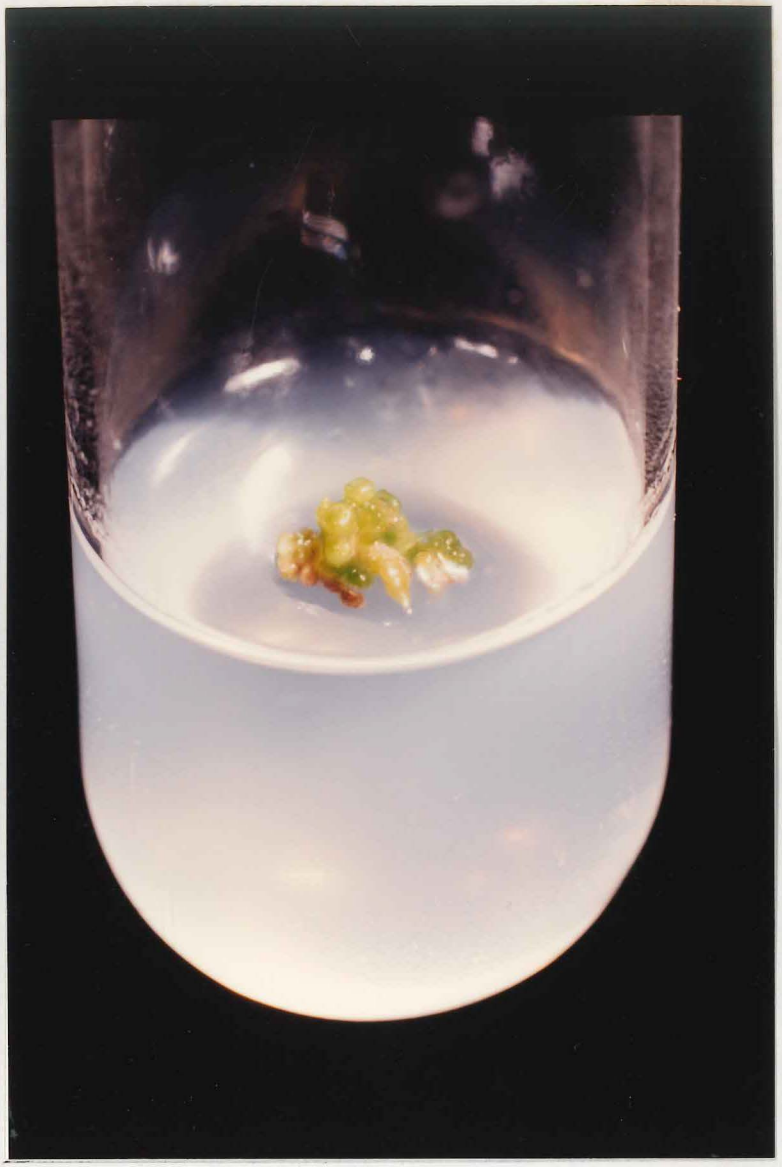

Fig. 8. Callo de *R. digbyana* formado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 20 semanas después de la siembra.

No hubo organogénesis en el medio de MS (Cuadro 5). En el medio de KC, en ausencia de BAP y ANA (testigo), hubo un 50% de formación de brotes. Además, sin BAP hubo organogénesis en la dosis de 1,0 mg/l de ANA. Sin ANA hubo formación de brotes con la dosis de 0,5 mg/l de BAP. En las combinaciones de ambas hormonas, sólo hubo formación de brotes para la dosis de 0,5 mg/l de BAP con 1,0 mg/l de ANA. Los brotes tenían apariencia vigorosa, color verde o verde oscuro, hojas lustrosas y medían entre 5 y 10 mm; algunos de ellos habían desarrollado brotes laterales, pero sólo uno presentaba raíces.

Cuadro 5. Efecto del ANA y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la organogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, veinte semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993.

BAP (mg/l)	ANA (mg/l)					
	0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	0	50	0	50	0	0
0,5	0	100	0	100	0	0
1,0	0	0	0	0	0	0

Fig. 9. Brote de *R. digbyana* proveniente de una yema apical cultivada en el medio de KC, 20 semanas después de la siembra.

Tanto los brotes como los callos fueron divididos tantas veces como lo permitía su tamaño.

Los brotes se pueden dividir en dos grandes grupos: los que presentan diferenciación en tallos, hojas y raíces y en los que sólo se observan yemas, es decir, no tenían las hojas extendidas ni raíces. Los brotes habían aumentado notablemente su tamaño, alcanzando algunos hasta 15 mm de largo; tenían dos o tres hojas verdes y lustrosas. Los que presentaban raíces y brotes laterales eran morfológicamente similares a los brotes centrales, pero menores (1 a 4 mm de largo).

Varios de los callos del medio KC formaron cuerpos esféricos muy pequeños, semejantes a protocormos (Cuadro 4), de color verde y medían de unos 5 a 6 mm de diámetro. En su mayoría, eran de forma esférica o redondeada, principalmente en la superficie que no estaba en contacto con el medio de cultivo (Fig. 10). Otros tenían forma irregular. La superficie, en todos los casos, tenía apariencia friable.

Los brotes, en el medio de KC, tenían tamaño variable (2 a 6 mm de largo), con dos o tres hojas de color verde, lustrosas y de apariencia suculenta. Algunos tenían raíces de apariencia normal originadas de los nudos o de la base. Otros presentaban callos con varios protocormos en la base, así como varios brotes laterales que eran de menor tamaño (1 a 3 mm) que el brote central, pero de la misma apariencia (Fig. 11).

Fig. 10. Callo de *R. digbyana* con cuerpos protocórmicos formado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 20 semanas después de la siembra.

Fig. 11. Brote con callo y protocormos de *R. digbyana* formado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 11 semanas después de la siembra.

Un callo que estaba contaminado con hongos se esterilizó y se transfirió a medio fresco, igual que el inicial. Debido a la contaminación no se dividió. Después de cinco semanas no se había recontaminado y creció hasta alcanzar unos 10 mm de diámetro, al tiempo que comenzaba a diferenciarse en numerosos brotes en la superficie.

2. Efecto del 2,4-D y del BAP, en los medios de MS y KC sobre el cultivo de yemas apicales

El efecto del 2,4-D y del BAP en los medios de MS y KC sobre la callogénesis, a partir de yemas apicales de *R. digbyana,* se midió mediante experimentos en los que las hormonas se combinaron en cada uno de los medios.

La supervivencia fue de baja a media en ambos medios. La contaminación ocasionada por bacterias sistémicas fue alta. No se observó ninguna influencia de las hormonas en los porcentajes de supervivencia. Hubo oxidación leve que se observó como un ligero oscurecimiento en la parte cortada, es decir, en la parte basal de la yema. Luego de 12 semanas de cultivo, se observó callogénesis en casi todos los tratamientos, en el medio de MS, con excepción del tratamiento con las dosis más altas de ambas hormonas (Cuadro 6). Sin el 2,4-D, los porcentajes de formación de callo fueron bajos y similares a los observados en ausencia de BAP. En los tratamientos con ambas hormonas el porcentaje de callogénesis alcanzó hasta un 50%. El tratamiento con 0,5 mg/l de BAP y 2,0 mg/l de 2,4-D, así

como el tratamiento con 1,0 mg/l de BAP y 1,0 m/L de 2,4-D, formaron 50% de callo. En el testigo absoluto y en los tratamientos sin BAP no hubo formación de callo. En ausencia de 2,4-D, un tratamiento formó callos. En las combinaciones de ambas hormonas hubo formación de callo en todos los tratamientos excepto en el que contenía las dosis más alta de ambas hormonas.

Cuadro 6. Efecto del 2,4-D y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, doce semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993.

BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)					
	0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	33	0	33	25	40	0
0,5	33	25	17	75	50	0
1,0	25	0	50	0	0	0

En esta etapa, en el medio de KC, algunos de los tratamientos presentaban callos (Cuadro 6). Estos eran pequeños, entre 2 a 3 mm de diámetro, verde amarillentos y de apariencia mucilaginosa. Algunos se volvieron de color café oscuro y murieron a las dos semanas de haberse formado (Fig. 12). En ausencia de BAP, se produjo callo sólo en la dosis media (1 mg/l de 2,4-D). En ausencia de 2,4-D, se formó callo con la

dosis intermedia de BAP (0,5 mg/l). En las combinaciones de ambas hormonas hubo callogénesis con las dosis intermedias de BAP y de 2,4-D.

Los callos que se formaron en esta etapa y los explantes que no formaron callo y permanecían vivos fueron transferidos a medio fresco.

Después de 27 semanas en cultivo, en el medio de MS, algunos callos tenían una coloración café o grisácea y habían muerto. Otros formaron brotes o continuaron creciendo. Los porcentajes de formación de callos se presentan en el Cuadro 7. En el medio de KC algunos callos tomaron una coloración café oscura o grisácea y murieron; los explantes que no habían formado callo lo produjeron (Cuadros 6 y 7).

Fig. 12. Callo de *R. digbyana* formado de una yema apical cultivada en el medio de KC, 11 semanas después de la siembra.

Cuadro 7. Efecto del 2,4-D y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, 27 semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993.

BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l) 0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	0	0	100	0	0	0
0,5	100	0	0	0	0	83
1,0	0	0	0	0	100	0

En algunos tratamientos, en los dos medios de cultivo, hubo organogénesis (Cuadro 8). En ausencia de BAP, en el medio de KC, no se desarrollaron brotes. En los tratamientos con BAP, la organogénesis se produjo con las dosis de 0,5 y 1,0 mg/l. En las combinaciones de hormonas algunos tratamientos formaron brotes, observándose que la cantidad aumentó a medida que se incrementaba una de las sustancias o ambas. Los brotes, con una o dos hojas de 5 a 10 mm de largo, de color verde oscuro, lustrosas, eran en general vigorosos. En esta etapa, aún no habían desarrollado raíces. Algunos formaron crecimientos laterales más pequeños que el tallo central, pero de la misma apariencia. Uno de los callos formó un crecimiento similar a un estolón, con un pequeño brote en el extremo distal.

En el medio de MS, en ausencia de BAP, no hubo formación

de brotes. Sin 2,4-D hubo formación de brotes con la dosis de 1,0 mg/l de BAP. En ausencia de BAP y 2,4-D (testigo absoluto) la aparición de brotes fue nula. En los tratamientos con 1.0 mg/l de 2,4-D y 0.5 y 1.0 mg/l de BAP hubo 100% de formación de brotes.

Los callos y los brotes se dividieron en varios explantes y se subcultivaron en medio fresco de la misma composición. La apariencia de estos brotes era similar a la de los brotes formados en el medio de KC.

Cuadro 8. Efecto del 2,4-D y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la organogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, 27 semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993.

BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l) 0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	0	0	0	0	0	0
0,5	0	100	100	0	0	0
1,0	100	100	100	50	0	100

Los callos y brotes fueron transferidos a medio fresco. Se observó una alta contaminación provocada por hongos. Entre los explantes que no se contaminaron, del medio de MS, hubo un callo que creció y alcanzó un tamaño de aproximadamente 11 mm de diámetro, de color verde amarillento, de forma redondeada

BIBLIOTECA WILSON POPENOE
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 93
TEGUCIGALPA HONDURAS

y superficie de aspecto rugoso. Se observó la formación de pequeños cuerpos protocórmicos en la superficie y algunos de ellos comenzando a desarrollar rizoides. Al partir el callo para subcultivarlo, se apreció que la formación de estos cuerpos se limitaba a la superficie. Este callo se dividió en 11 explantes de tamaño aproximadamente igual. Algunos se fragmentaron en dos o tres partes al momento de transferirse al medio fresco. Determinadas secciones se volvieron amarillentas y en los cortes se tornaron de color café claro, continuaron creciendo y formando cuerpos protocórmicos. Al momento del transplante medían aproximadamente de 1 a 2 mm de diámetro. Después de cuatro semanas de subcultivo (31 después de la siembra), medían entre 4 y 5 mm de diámetro. Los protocormos no se habían diferenciado.

Los callos, brotes y los explantes del medio de KC que aún estaban vivos fueron transferidos a medio fresco, de igual composición al original. Después de seis semanas de subcultivo algunos callos murieron y los explantes produjeron callo (Cuadro 7). La mayoría de los callos presentaba una coloración verde amarillenta, forma irregular, superficie de apariencia friable y con numerosos cuerpos protocórmicos en la superficie. Estos callos tenían un tamaño promedio estimado de 4 mm de diámetro. Otros callos tenían una sección verde que permanecia unida a otra de color café oscuro, aparentemente muerta. Un callo del tratamiento con 0,5 mg/l de BAP y 2,0 mg/l de 2,4-D tenía forma irregular, con una parte verde

oscuro unida a otra de color café claro, con superficie de aspecto mucilaginoso y con fuerte oxidación.

3. Efecto del AIB y del BAP, en los medios de MS y KC sobre el cultivo de yemas apicales

Se realizaron experimentos para detectar el efecto del AIB y BAP en los medios de MS y KC, sobre la callogénesis, a partir de yemas apicales de *R. digbyana*.

La contaminación, en estos experimentos, fue baja y la oxidación que se observó, en todos los explantes, fue leve. Esta consistió, principalmente, en un oscurecimiento de las partes cortadas en los explantes. La supervivencia fue de media a alta.

En todos los tratamientos se observó callogénesis después de ocho semanas en cultivo (Cuadro 9). Los callos eran al principio pequeños, de aproximadamente 2 mm de diámetro, de coloración variable, desde el verde amarillento hasta el verde oscuro y algunos de color grisáceo. La mayoría, de apariencia mucilaginosa. Todos los tratamientos, en ambos medios, formaron callo, llegando, en el mejor de los casos, a un 80%. El testigo absoluto formó 29% de callos en el medio de MS y 30% en el de KC. En ausencia de BAP se notó una tendencia hacia el aumento en el porcentaje de callos, con cada incremento en la dosis de AIB. Con 0,5 mg/l de BAP, en el medio de MS, el porcentaje de callogénesis fue bajo: entre 14 y 56%. En cambio, en el medio de KC fue más alto: entre 29 y 83%, se

observó, en este caso, que la callogénesis disminuía a medida que se aumentaba la dosis de AIB. Con 1,0 mg/l de BAP, en el medio de MS, hubo una respuesta variable, entre 29 y 80%, siendo el mejor el de 1 mg/l de ambas hormonas. Con el medio de KC el mejor tratamiento fue el 2,0 mg/l de AIB. En ausencia de AIB hubo callogénesis en todos los tratamientos, observándose los porcentajes más altos con 1,0 mg/l de BAP para el medio de MS, y con 0,5 mg/l de BAP, para el de KC. En las combinaciones de ambas hormonas hubo formación de callo en todos los tratamientos, siendo los mejores 1,0 mg/l de ambas hormonas, para el medio de MS, y el 0,5 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB, para el medio de KC.

Cuadro 9. Efecto del AIB y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, ocho semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993.

BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)					
	0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	29	30	75	33	80	50
0,5	14	83	56	60	25	29
1,0	60	43	80	20	29	50

Los callos y los explantes vivos del medio de MS se transfirieron a medio fresco y después de ocho semanas de

subcultivo algunos habían muerto y otros formaron brotes. En el medio de MS, sólo había callos en los tratamientos con 0,5 mg/l de AIB (Cuadro 10). En el medio de KC, en ausencia de ambas hormonas, hubo un 25% de callogénesis. Sin BAP se obtuvo callogénesis en todos los tratamientos. Sin AIB se observó formación de callo en el tratamiento con 0,5 mg/l de BAP. En las combinaciones de ambas hormonas sólo se observó formación de callo en el tratamiento con la dosis de 1,0 mg/l de ambas y con 0,5 de BAP y 2,0 de AIB. Los callos formados en el medio de KC eran de color verde oscuro, con la superficie de aspecto mucilaginoso, de 2 mm de diámetro.

Cuadro 10. Efecto del AIB y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la callogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, 16 semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1992-1993.

BAP (mg/l)	AIB (mg/l)					
	0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	0	25	0	66	0	66
0,5	0	50	25	0	0	75
1,0	0	0	0	100	0	0

Dieciséis semanas después del cultivo se observó organogénesis en ambos medios (Cuadro 11). En el medio de MS, en ausencia de BAP, no hubo formación de brotes. Sin AIB se

obtuvo formación de brotes con 0,5 y 1,0 mg/l de BAP. Hubo organogénesis en los tratamientos con 0,5 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB y 2,0 mg/l de AIB con 1,0 mg/l de BAP. En el medio de KC, hubo organogénesis en ausencia de BAP o de AIB, o de ambas. En las combinaciones de la dos hormonas hubo formación de brotes en los tratamientos con 2,0 mg/l de AIB y 0,5 mg/l de BAP y con 1,0 de BAP con 2,0 mg/l de AIB.

Cuadro 11. Efecto del AIB y BAP, con los medios de MS y Knudson C, sobre la organogénesis en explantes de yemas apicales de *R. digbyana*, 16 semanas después de la siembra. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1992-1993.

BAP (mg/l)	AIB (mg/l)					
	0,0		1,0		2,0	
	MS	KC	MS	KC	MS	KC
0,0	0	50	0	33	0	33
0,5	50	50	25	0	0	25
1,0	33	100	0	0	100	100

Los brotes, en ambos medios, eran de color verde, de 3 a 4 mm de largo y de apariencia similar a los observados en los otros experimentos. Algunos presentaban brotes laterales. En esta etapa aún no habían formado raíces (Fig. 13). Estos callos y brotes se transfirieron a medio fresco. Los brotes se subcultivaron en un medio igual al inicial, cada seis semanas.

Los callos que formaron protocormos en todos los experimentos con yemas apicales, desarrollaron plántulas completas de apariencia vigorosa, al dejarlos de subcultivar por más de cuatro semanas (Figs. 14 y 15).

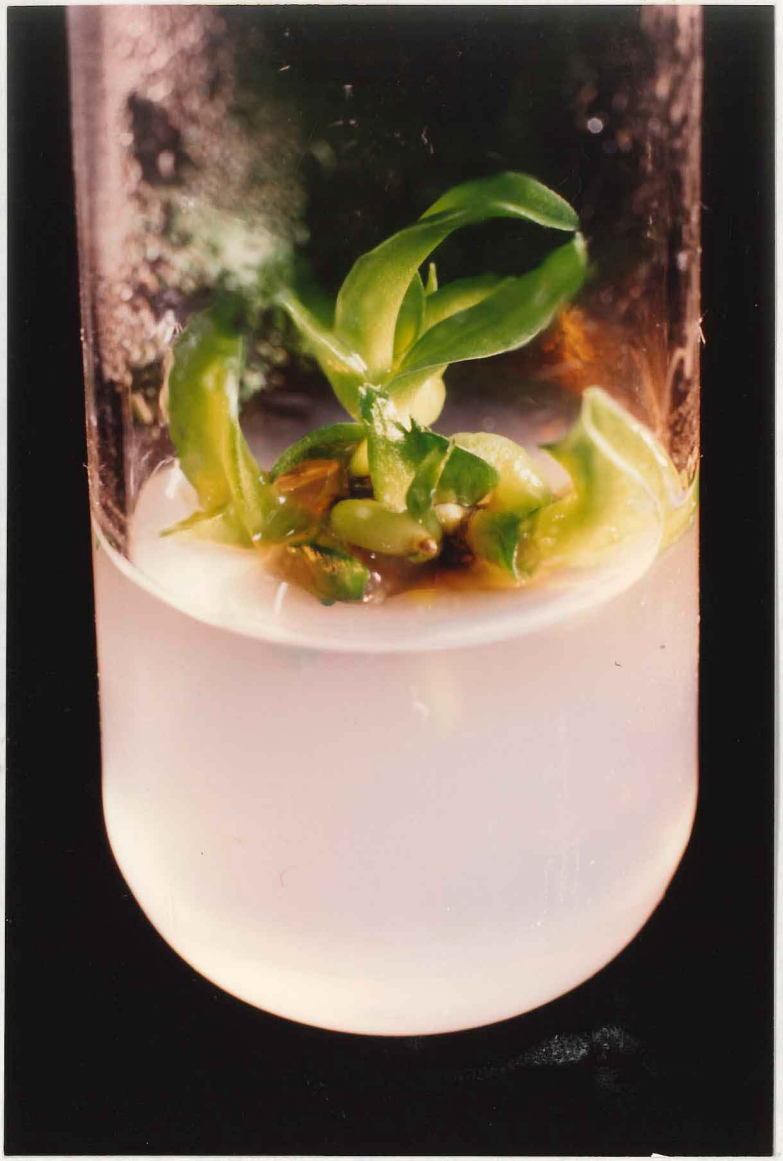

Fig. 13. Plántulas de *R. digbyana* originadas de un callo sin subcultivar por más de cuatro semanas.

Fig. 14. Plántulas de *R. digbyana* originadas de un callo sin subcultivar por más de cuatro semanas.

Fig. 15. Plántulas de *R. digbyana* originadas de un callo sin subcultivar por más de cuatro semanas.

D. Experimentos con embriones

Hubo una alta tasa de contaminación ocasionada por bacterias sistémicas presentes en las cápsulas. Solamente sobrevivieron las semillas de uno de los 12 frascos que se cultivaron. Estos se subcultivaron en frascos de 125 ml con 15 ml de medio de KC. Cuatro semanas después de la siembra los embriones se tornaron de color verde y comenzó la formación de protocormos. Seis semanas después de la siembra se podían reconocer los protocormos a simple vista y cuatro semanas más tarde algunos presentaban una hoja de aproximadamente 5 mm de largo. Seis meses después de la siembra, había plántulas de casi 3 cm de alto, algunas de ellas con raíces. Un año después, las plántulas tenían alrededor de 5 cm de alto con 2 ó 3 hojas y raíces completamente desarrolladas. En esta fase estaban listas para someterlas a un proceso de adaptación en el invernadero.

V. DISCUSION

En los primeros experimentos hubo altas tasas de mortalidad y oxidación, a pesar de que los explantes fueron disecados en platos de Petri, con una solución de agua bidestilada estéril y con ácido cítrico al 1%, como agente antioxidante. Es probable que la oxidación se haya debido a la manipulación excesiva de los explantes, la que podría haber destruido tejidos meristemáticos.

A. Experimentos con ápices de raíces

El uso de ápices de raíces ha sido sugerido para evitar la destrucción completa de plantas, en especial de aquellas especies que se encuentran en peligro de extinción. Son pocas las especies en las cuales se ha obtenido regeneración de plantas. En el experimento con ápices de raíces, no se obtuvo callogénesis (Sección IV, pág. 38). Esto coincide con los resultados de Churchill *et al*. (1972), quienes encontraron que los ápices de raíces de *Epidendrum obrienianum* morían al ser cultivados en los medios de MS, Heller y Knudson C, aunque sí crecieron al cultivarlas en otros medios. Después de dos años no habían formado callos ni plantas. Estos resultados son distintos de los de Stewart y Button (1978), quienes lograron

callo y posteriormente plántulas, al cultivar ápices de raíces de la misma especie en medios con concentraciones de sales bajas y diferentes dosis de BAP (0,5; 1,0 y 2,0 mg/l). Ellos obtuvieron la mayor formación de callo con la dosis de 0,5 mg/l. En el experimento estaban incluidas dos de las dosis con las que obtuvieron callogénesis (0,5 y 1,0 mg/l), pero no observaron callos en ninguna. El medio de cultivo de KC, usado en el presente estudio, es químicamente distinto a los utilizados por Steawrt y Button. Estos investigadores emplearon el medio de Ojima y Fujiwara (1959), al doble de la concentración original y lograron resultados favorables. Ellos indicaron, por lo tanto, la ventaja de usar medios con una mayor concentración de sales. El medio de KC se considera rico en sales minerales, pero aún así no hubo formación de callo; por ello se descartó, entonces, la posibilidad de que los resultados de este trabajo hayan estado influidos por las concentraciones de sales en el medio.

Todos los autores que informan acerca del uso de ápices de raíces, trabajaron con explantes provenientes de plántulas cultivadas *in vitro*, lo cual no requería esterilización; en cambio, en los experimentos se llevaron a cabo se emplearon explantes de plantas maduras provenientes del campo, razón por la cual no está claro si los explantes murieron debido al tratamiento aplicado para esterilizarlos. No se observó formación de compuestos fenólicos (oxidación), ni contaminaciones causadas por hongos o bacterias que pudieran afectar la

supervivencia.

B. Experimentos con ápices y bases de hojas

En los experimentos con ápices y bases de hojas (Sección IV. B pág. 38), no se observó ningún tipo de crecimiento. Churchill *et al.* (1972), obtuvieron protocormos y, posteriormente, plántulas al cultivar *in vitro* ápices de hojas jóvenes de plantas maduras de *Laeliocattleya*; también lograron producir callo en ápices de hojas de plántulas de *Epidendrum obrienianum*. En el experimento desarrollado con este fín, los explantes se extrajeron de hojas jóvenes de plantas maduras, al igual que en el caso de la *Laeliocattleya* cultivada por Churchill *et al.* (1972). A pesar de ello, los explantes se oxidaron muy rápidamente y la oxidación persistió aunque aquellos se transfirieron a medio fresco. Más tarde, la oxidación se extendió al centro de los explantes y éstos murieron. Yam y Weatherhead (1991), hicieron posibla la aparición de cuerpos protocórmicos y brotes, cuando cultivaron ápices de hojas de plántulas de *Acampe rigida*. En presencia de ANA y BAP, la organogénesis fue siempre precedida de callogénesis; cuando usaron únicamente ANA sólo hubo callogénesis. La más tasa alta de organogénesis la obtuvieron en el medio de MS, con 1 mg/l de BAP y 0,2 mg/l de ANA. Se debe recalcar que si bien en los experimentos que se diseñaron con este fín, se empleó el mismo medio y las mismas hormonas, de hecho, no se

alcanzó organogénesis ni callogénesis. Esto podría atribuirse al estado de desarrollo de la planta y también a cualidades fenotípicas de la especie, ya que la respuesta al cultivo de tejidos puede depender de características fenológicas o genotípicas. Otra razón podría ser la fuerte oxidación observada. Se sabe que la oxidación es la liberación de compuestos fenólicos los cuales, al acumularse en el medio, son tóxicos para los explantes y eventualmente los matan.

C. Experimentos con yemas apicales

Al cultivar yemas apicales hubo callogénesis y, posteriormente, formación de protocormos y plántulas, así como organogénesis en ambos medios y en varios tratamientos.

1. Callogénesis

Aparentemente, la mejor dosis de BAP para la inducción de callogénesis fue la de 0,5 mg/l (Cuadros 4, 7 y 10). Es difícil comparar estos resultados con los de otros autores porque la mayoría de ellos no informan de los porcentajes de callogénesis, sino que proporcionan como resultado final, la formación de protocormos o de plántulas. En los experimentos ejecutados al respecto, la formación de brotes o protocomos ha sido muchas veces precedida de la callogénesis.

Cuando se utilizó ANA y BAP la mayor callogénesis se obtuvo con las dosis de 1,0 mg/l de ambas hormonas (Cuadro 4).

Esto sugiere que tanto las auxinas como las citoquininas son necesarias para la callogénesis. Los resultados alcanzados son distintos de los de Reinert y Mohr (1967), en el sentido de que ellos lograron los mejores resultados cuando aplicaron dosis de 1,75 mg/l de dos auxinas (ANA y AIA) sin citoquinina.

Al cultivar yemas apicales con 2,4-D y BAP hubo callogénesis en varios tratamientos (Cuadro 6), sin que se pueda observar una influencia de éstos en la formación de callo. Aunque el mayor porcentaje de callogénesis se obtuvo con 1 mg/l de 2,4-D, con las diferentes dosis de BAP.

Al usar AIB y BAP se produjo, después de ocho semanas, callogénesis en todos tratamientos. Muchos de estos callos murieron o formaron brotes. En esta etapa no se observaba ninguna tendencia en los porcentajes de callogénesis. Después de 16 semanas se detectó callogénesis en la mayor parte de los tratamientos del medio de KC y solamente en uno de los tratamientos del medio de MS (Cuadro 10). La formación de callo, en los diferentes tratamientos, no permite deducir ninguna tendencia en la callogénesis. Es notable el hecho de que, después de 16 semanas de cultivo, muchos callos que se habían formado en el medio de MS murieron. Ello podría deberse a la falta de reguladores de crecimiento en el medio. Estos reguladores podrían hallarse presentes en el medio de KC, como consecuencia de la adición de agua de coco.

A pesar de que en la literatura se cita más comúnmente el uso de la auxina ANA (Reinert y Mohr, 1967; Flameé, 1978;

Kukulczanka, 1988), en el experimento en mención se obtuvo los mejores resultados con AIB (Cuadros 4, 7 y 10). El AIB fue más eficaz en la inducción de callos en las concentraciones de 1,0 ó 2,0 mg/l.

Los resultados obtenidos con las diferentes combinaciones de auxinas y BAP parecen indicar que el uso de esta última no es esencial para obtener callogénesis, cuando se cultivan yemas apicales de *R. digbyana*.

2. Organogénesis.

Se consideró como organogénesis directa la formación de brotes a partir de yemas apicales sin pasar por el proceso de callogénesis. Después de algunas semanas en cultivo todos los brotes formaron raíces. La organogésis directa tiene como desventaja que sólo se obtiene un brote único o planta de una yema apical. En cambio, cuando hay un proceso de callogénesis es posible subcultivarlo indefinidamente y, al final, tras un proceso de organogénesis o embriogénesis, obtener una gran cantidad de plantas. Hubo organogénesis directa en los dos medios y en varios de los tratamientos, con las diferentes auxinas. Ahora bien, la mayor formación de brotes se alcanzó con el empleo del medio de KC y la auxina AIB, con diferentes dosis de BAP. Los resultados obtenidos no permiten inferir cuales son las mejores dosis de ambas hormonas.

3. Medios de cultivo

Al principio, hubo callogénesis en los dos medios usados (Cuadros 3,6 y 9), pero después de algún tiempo en cultivo, algunos de los callos formados habían muerto, especialmente en el medio de MS (Cuadros 4, 7 y 10). Por lo tanto, se observaron variaciones en los porcentajes de una etapa a otra. Esto se debe a que hubo algunos callos que produjeron brotes, a la formación de callos en explantes que no lo habían hecho o a la muerte de otros. En general, la callogénesis fue mayor en el medio de KC (Cuadros 4, 7 y 10). Esto podría explicarse, en parte, a la adición de agua de coco (Cuadro 1), que es un componente indeterminado, con cantidades variables de hormonas, vitaminas y otras sustancias de crecimiento que, en combinación con las hormonas exógenas, podrían tener un efecto sinergístico en la callogénesis.

Aparentemente, la proliferación de callo es más rápida en medios líquidos y en agitación constante, que en medios sólidos y estacionarios (Gu y Yam, 1989; Reinert y Mohr, 1967; Rao, 1977). Se cree que la agitación rompe la polaridad y provoca múltiples centros de crecimiento, proporciona más aireación al explante y aumenta su área de exposición al medio. En este estudio se obtuvieron buenos resultados con medios sólidos. La tasa de crecimiento fue parecida a las obtenidas por Reinert y Mohr (1968), cuando cultivaron explantes en medios líquidos y en agitación constante. En los casos en que hubo callogénesis sería posible obtener hasta 2500

plantas en año y medio de cultivo, partiendo de un solo explante.

El método tiene muchas ventajas al propagar clones específicos cuando, por razones técnicas y económicas, se desea mantener la uniformidad genética. Es menos ventajoso cuando se trata de obtener gran cantidad de plantas que tengan diversidad genética para conservar la especie y reintroducirlas en su ambiente natural, aunque en el campo, terminarían por recombinarse y restablecer una parte de la variabilidad génetica de la especie.

En el medio de MS los porcentajes de callogénesis y embriogénesis (Cuadros 5, 8 y 11) fueron menores que los obtenidos en el medio de KC, a pesar de que el medio de MS es más complejo (Cuadro 1).

Cuando Morel cultivó meristemas apicales de *Cymbidium*, obtuvo un solo protocormo de cada meristema; éste fue dividido en cuatro o seis pedazos, los que volvieron a formar protocormos y se separaron nuevamente. Este proceso podía ser repetido indefinidamente y obtener millones de plantas en un año. Los resultados con *R. digbyana* fueron diferentes cuando se cultivaron yemas apicales ya que se produjo callo y no protocormos. Estos callos se dividieron y subcultivaron muchas veces. Al dejarlos sin subcultivar por más de cuatro semanas, se diferenciaron y formaron muchos cuerpos protocórmicos que desarrollaron plántulas normales. En otros casos, los callos desarrollaron brotes que posteriormente formaron

raíces. Sin embargo, en otros hubo organogénesis directa (formación de brotes), sin pasar por el proceso de callogénesis. A pesar de las diferencias, en el proceso de obtención de plántulas, de éstos experimentos con los de Morel (1960), es evidente que es un método igualmente eficaz, ya que proporciona un gran número de plántulas en poco tiempo.

D. Experimentos con embriones

Cuando se cultivaron embriones de *R. digbyana*, se observó una alta tasa de contaminación (92%) ocasionada por bacterias sistémicas. Esta contaminación fue difícil de controlar aunque se trabajó con plantas provenientes del campo o de jardines. Afortunadamnete, del 8% restante (un frasco que no presentó contaminación), se obtuvo una excelente germinación, lo que proporcionó una gran cantidad de plantas. Este método es apropiado cuando se quiere propagar plantas altamente heterocigóticas, para conservar variabilidad genética, que fue uno de los objetivos del estudio. Este método, en principio, es más largo debido a la espera de un año, desde la polinización hasta la obtención de semillas viables. Se observó que las plántulas provenientes de meristemas son más vigorosas que las de la misma edad originadas de embriones.

VI. CONCLUSIONES

1.- Por medio del cultivo *in vitro* de yemas apicales y embriones se puede multiplicar, en forma masiva, la orquídea *R. digbyana*.

2.- El mejor medio de cultivo tanto para la producción de protocormos como para el crecimiento de plántulas fue el de Knudson C (KC).

3.- La mejor combinación de hormonas para la producción de callos y protocormos, así como para el desarrollo de plántulas, fue el AIB (auxina) y BAP (citoquinina).

4.- De las auxinas probadas, el AIB favorece la callogénesis en el cultivo *in vitro* de yemas apicales de *R. digbyana*.

5.- La BAP favorece la organogénesis (formación de brotes) en el cultivo de yemas apicales.

VII. RECOMENDACIONES

1.- Continuar los experimentos con ápices de raíces y ápices y bases de hojas.

2.- Hacer subcultivos de callos, con mayor frecuencia, para obtener mayor número de plantas.

3.- Continuar los cultivos de plántulas en la fase de invernadero.

4.- Hacer un estudio ecológico y de población que permita conocer el estatus actual de la *R. digbyana* en Honduras.

5.- Llevar a cabo una campaña divulgativa que permita dar a conocer la importancia ecológica y simbólica de *R. digbyana* en Honduras.

VIII. LITERATURA CITADA

ALAN, J.J.; LINARES, J.L. 1992. Propagación *in vitro* de *Cattleya aurantiaca*. *In* Informe Anual de Agronomía. v. 4 Ed. por J.C. Rosas. El Zamorano, Hond., Escuela Agrícola Panamericana. p. 117-120.

AMES, O.; CORRELL, D.S. 1952. Orchids of Guatemala. Fieldiana: Botany (EE.UU.) 26(1):9-13.

ARANGO, A. 1979. Siembra de semillas de orquídeas. Orquideología (Col.) 13: 266-271

ARDITTI, J.; BALL, E.A.; REISINGER, D.M. 1977. Culture of flower-stalk buds: a method for vegetative propagation of *Phalaenopsis*. American Orchid Society Bulletin (EE.UU.) 46:236-240.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. 1983. Plant tissue culture; theory and practice. Amsterdam, Elsevier. p. 314-316. Developments in Crop Science (5).

CHURCHILL, M.E; ARDITTI, J.; BALL, E. 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. American Orchid Society Bulletin (EE.UU.) 40:109-113.

_____, M.E.; BALL, E.A.; ARDITTI, J. 1973. Tissue culture of orchids. New Phytologia (EE.UU.) 72:161-166.

_____, M.E.; BALL, E.A.; ARDITTI, J. 1972. Tissue culture of orchids II. Methods for root tips. American Orchid Society Bulletin (EE.UU.) 39:726-730.

DRESSLER, R. 1990. The orchids. Natural history and clasificación. Cambridge, EE.UU., Harvard University Press. p 4-9.

FLAMEE, M. 1978. Influence of selected media and supplements on the germination and growth of *Phaphiopedilum* seedlings. American Orchid Society Bulletin (EE.UU.) 47:419-423.

VILLALOBO, V. N. 1990. Historia del cultivo de tejidos vegetales. In Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. por C.C. Rossel y J. N. Villalobo. Roma, FAO p. 1-3. Estudio FAO y protección vegetal 105.

YAM, T.W.; WEATHERHEAD, M.A. 1990. Early growth of *Hetaeria cristata* seedlings and plantlet initiation from rhizome nodes. Lindleyana (EE.UU.) 5(3): 199-203.

_____, 1991. Leaf tip culture of several native orchids of Hong Kong. Lindleyana (EE.UU.) 6(3):147-150

YONEDA, K.; SAKAMOTO; T. SASAKI, H. 1979. Studies on mericlones of orchids. 1. Propagation of *Cattleya* protocorms by means of meristem culture. Bulletin of the College of Agricultue and Vaterinary Medicine. Tokio (Jap.). In Horticultural Abstracts (U.K.) 49(1):47.

DATOS BIOGRAFICOS DEL AUTOR

Lugar y fecha de nacimiento:

Santa Ana, El Salvador. 21 de Octubre de 1966.

Educación Secundaria:

Instituto Nacional de Santa Ana (1982 - 1984), Santa Ana, El Salvador.

Título Obtenido:

Bachiller en Comercio y Administración opción Contaduría.

Educación Superior:

Escuela Agrícola Panamericana (1988 - 1990), El Zamorano, Honduras.

Título Obtenido:

Agrónomo.