Establecimiento *in vitro* de *Dendrobium* spp. a partir de explantes foliares

María Alejandra Vallejo Rendón

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Establecimiento *in vitro* de *Dendrobium* spp. a partir de explantes foliares

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

María Alejandra Vallejo Rendón

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

Establecimiento *in vitro* de *Dendrobium* spp. a partir de explantes foliares

Presentado por:

María Alejandra Vallejo Rendón

Aprobado por:

_____
Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesor Principal

_____
Miguel Vélez, Ph.D.
Director de la Carrera
Ciencia y Producción
Agropecuaria

_____
Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

_____
Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

_____
María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesor

_____
Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

_____
Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador Área Fitotecnia

RESUMEN

Vallejo Rendón, M. 2008. Establecimiento *in vitro* de *Dendrobium* spp. a partir de explantes foliares. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras.13 p.

En la clonación *in vitro* de orquídeas generalmente se sacrifica la planta madre o un brote de crecimiento, ya que se utilizan yemas como material de propagación. En la investigación se utilizaron explantes foliares como material inicial y evitando así la destrucción total o parcial de la planta, sin alterar su valor genético. El objetivo general de la investigación fue elaborar un procedimiento para el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de la orquídea *Dendrobium* spp. Se evaluaron diferentes concentraciones del regulador de crecimiento BAP (6-Bencilaminopurina) y distintos tipos de siembra con el medio basal modificado Murashige y Skoog (1962). Se realizaron dos experimentos, en el primero se evaluó cuatro concentraciones (0, 2, 4 y 6 mg/L) de BAP para determinar la concentración más adecuada para establecer *in vitro* láminas foliares de *Dendrobium* spp. En la octava semana de incubación con el tratamiento de 6 mg/L de BAP se observó un mayor porcentaje de explantes (37%) con regeneración de tejido callogénico (TC) que con los demás tratamientos ($P \leq 0.05$) El tratamiento de 6 mg/L igualmente obtuvo un mayor nivel de sobrevivencia. En el segundo experimento se evaluó la respuesta regenerativa de los explantes foliares de *Dendrobium* spp. a tres sistemas de siembra: líquido, semi-sólido con siembra polar y semi-sólido con siembra apolar, todos con la misma concentración de BAP (5 mg/L). En el tratamiento de medio semi-sólido con siembra apolar se observó un 64% de explantes con formación de TC y no presentó diferencia ($P \geq 0.05$) con el tratamiento de medio semi-sólido con siembra polar en el que se observó un 52% de explantes con regeneración de TC. El tratamiento de medio líquido no presentó regeneración de TC. El porcentaje de sobrevivencia fue de 24% en el medio semi-sólido de siembra apolar y 19% en el de siembra polar.

Palabras clave:, BAP, micropapagación, sistema de siembra, tejido callogénico.

ABSTRACT

Vallejo Rendón, M. 2008. *In vitro* establishment of *Dendrobium* spp. using foliar blades as a source of primary explants. Special project presented as a requisite to obtain the Agronomist Engineering degree, Agricultural Science and Production Career, Zamorano, Honduras. 13 p.

In vitro reproduction of plants is a process under aseptic conditions, in which one explant is capable of regenerating thousands or millions of plants genetically identical to the parent plant. In cloning orchids using *in vitro* techniques, the mother plant is usually sacrificed, since its buds are used as a source material for propagation. The objective of this research was to develop a procedure for the *in vitro* establishment of leaf explants of the orchid *Dendrobium* spp. The study evaluated different concentrations of the growth regulator BAP (6-Bencilaminopurina) and various types of planting systems using the modified Murashige and Skoog (1962) basal media. Two experiments were conducted, the first to evaluate four concentrations (0, 2, 4 and 6 mg / L) of BAP in order to determine the most appropriate level of the hormone to establish *in vitro* leaf blades of *Dendrobium* spp. At the eighth week after establishment the treatment of 6 mg/L of BAP showed a higher rate of survival and a higher percentage of explants (37%) with regeneration of callogenic tissue (CT) significantly different from all other treatments. In the second experiment the regenerative response of leaf explants of *Dendrobium* spp. was evaluated in three planting systems: liquid, semi-solid with polar planting and semi-solid with apolar planting, in a medium containing 5 mg/L of BAP. The treatment using semi-solid medium with apolar planting showed 64% of explants with formation of CT and it was not significantly different from using semi-solid medium with polar planting, which showed 52% of explants with regeneration of CT. The treatment using liquid medium did not provided any positive response to the regeneration of CT. Survival rate was 24% in the semi-solid with apolar planting and 19% in the semi-solid with polar planting.

Keywords: BAP, callogenic tissue, micropropagation, planting system,

CONTENIDO

Portadilla i
Página de firmas ii
Resumen iii
Abstract iv
Contenido v
Índice de cuadros y gráficos vi

INTRODUCCIÓN 1

MATERIALES Y MÉTODOS 2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 12

LITERATURA CITADA 13

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS

Cuadro **Página**

1. Medio basal Murashige y Skoog (1962) modificado para el establecimiento *in vitro* de *Dendrobium* spp. a partir de explantes foliares. 3
2. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración de tejido callogénico a la octava semana de establecimiento *in vitro* de explantes foliares *Dendrobium* spp 7
3. Efecto del sistema de siembra en la regeneración de tejido callogénico a la octava semana de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp..... 9

Gráfico

1. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración semanal de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp 7
2. Sobrevivencia durante la evaluación de diferentes concentraciones de BAP durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp..... 8
3. Contaminación durante la evaluación de diferentes concentraciones de BAP durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp..... 8
4. Efecto del sistema de siembra sobre la regeneración semanal de tejido callogénico durante la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp..... 9
5. Sobrevivencia durante la evaluación de diferentes sistemas de siembra durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp 10
6. Contaminación durante la evaluación de diferentes sistemas de siembra durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp 11

INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica de reproducción bajo condiciones totalmente asépticas, en las que a partir de un pequeño explante, cultivado en medios nutritivos artificiales ricos en sales minerales, vitaminas y hormonas, es posible regenerar, en poco tiempo, miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre (Sánchez 2005).

El material *in vitro* se puede conservar durante varios años, sin perder sus características genéticas y en espacios reducidos, solamente variando el medio de cultivo del frasco. Adicionalmente esta técnica es de gran utilidad para la obtención de plantas libres de patógenos, por la producción de plantas en peligro de extinción, para la conservación e intercambio de germoplasma, para el incremento de la variabilidad genética y en el mejoramiento genético (Santana 2005).

En la clonación *in vitro* de orquídeas se utilizan brotes en crecimiento, de los que se extraen yemas como material de propagación. Así mismo se pueden utilizar inflorescencias u otros órganos, lo que con frecuencia con lleva a sacrificar partes de la planta (Arditti y Ernst 1993). Para la clonación se utilizan de preferencia las hojas jóvenes, ya que pueden ser inducidas mas fácilmente a formar callos en sus bases, a partir de los cuales se pueden formar protocormos, que se pueden utilizar para la multiplicación subsiguiente (Mateo 1990).

Las orquídeas son las plantas más evolucionadas del reino vegetal, son epifitas en su mayoría, lo que significa que crecen en árboles, usándolos solo de apoyo para su desarrollo. La palabra latina *Dendrobium* significa que vive sobre árbol. De todos los géneros de la familia de las orquídeas, el *Dendrobium* es probablemente el más diverso, contando con aproximadamente 900 a 1,400 especies. Los pétalos y sépalos de *Dendrobium* son de mismo tamaño y se caracterizan por su color blanco aunque muchas veces se encuentran combinaciones con rosado, amarillo oro y morado. El labio circulante es de un color contrastante con el resto de la flor, y muchas veces tienen una fragancia delicada. Las intensidades altas de luz son indispensables para su crecimiento. Durante los meses de verano, requieren mucho riego y fertilización para lograr el crecimiento óptimo (Fisher 2007).

Con esta investigación se buscó establecer un protocolo adecuado para la primera etapa de establecimiento *in vitro* de *Dendrobium* spp. utilizando explantes foliares como material inicial, sin alterar su valor genético. En el estudio se evaluaron diferentes concentraciones del regulador de crecimiento BAP (6-Bencilaminopurina) y distintos tipos de siembra usando el medio basal modificado Murashige y Skoog (1962).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos entre junio y septiembre de 2008 en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *In Vitro* (LCTRIV) de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicado a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Plantación madre

Las plantas madres de *Dendrobium* spp. fueron obtenidas de la finca del Ingeniero Rogelio Trabanino. Se colocaron en bolsas plásticas donde se llevo a cabo la siembra individual. Cada bolsa contenía carbón activado y pedazos de teja para dar soporte a la planta. El cultivo estuvo en cuarentena durante cuatro semanas en junio de 2008 haciendo aplicaciones semanales de Agrimicin® (1 g/L) y Benlate ® (1 g/L). Se fertilizó con Special Ultra Pure Orchids 19-31-17® dos veces por semana a razón de 2 g/L.

Al cultivar orquídeas *in vitro* se trata en lo posible de usar tejidos que no conduzcan a la destrucción de la planta (Linares 1993). Por esta razón se cosecharon hojas jóvenes como material para propagación, ya que los explantes procedentes de hojas jóvenes responden mejor a los tratamientos (Hall 1999).

Medio de cultivo

Para la siembra de los explantes se utilizó una modificación del medio basal Murashige y Skoog (1962), según protocolo propuesto por Salas (2007) (Tabla 1), suplementado con 4 mg/L de cisteína como antioxiante según recomendación de Reyes Padilla (2001). Se utilizaron tubos de ensayo con dimensiones de 15 × 150 mm en los que se dispensaron 10 ml de solución nutritiva. La solidificación del medio de cultivo se hizo de forma inclinada con el fin de incrementar el área de contacto del explante con el medio de cultivo. Todos los utensilios y herramientas utilizados fueron esterilizados con un autoclave a 121 ° C y 15 psi durante 20 minutos.

Cuadro 1. Medio basal Murashige y Skoog (1962) modificado para el establecimiento *in vitro* de *Dendrobium* spp. a partir de explantes foliares.

Componentes	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes MS	
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
KH_2PO_4	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
Micronutrientes MS	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.02
$CoCl_2.6H_2O$	0.02
Na_2MoO_4	0.25
FeNa-EDTA	50.00
Componentes Orgánicos	
Mionositol	100.00
Tiamina	1.00
Acido cítrico	100.00
Agua de coco (ml)	10.00
Caseína hidrolizada	100.00
Cisteína	4.00
Sacarosa	30,000.00
Gelrite	2,000.00
pH	5.70

Desinfección de los explantes

Para la desinfección, las hojas se lavaron con agua y jabón líquido en un vaso de precipitación cubriendo con gasa y ajustando con una banda plástica. Seguidamente las hojas se colocaron bajo un chorro de agua potable durante 15 minutos, y luego fueron transferidas a una solución de hipoclorito de sodio al 3.25 %, (cloro comercial al 4.75% de ingrediente activo) más dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución durante 20 minutos con agitación constante (Salas 2007).

A continuación, el vaso de precipitación con las hojas en la solución desinfectante fue transferido a la cámara de flujo laminar. La solución desinfectante se vació en otro recipiente y finalmente se enjuagaron las hojas cuatro veces con agua destilada estéril para luego ser colocadas en un plato petri estéril.

Siembra de los explantes

En el plato petri se procedió a cortar todos los bordes del explante, con el fin de estimular la formación de tejido callogénico (CIAT 1991). Los explantes se cortaron en fracciones de 1 cm × 1 cm con la ayuda de pinzas y bisturí sobre platos petri estériles que se cambiaron con cada explante para evitar la contaminación cruzada. Luego de realizar los cortes, se colocó un explante por cada tubo de ensayo (15 × 150 mm). Las secciones foliares se sembraron en forma apolar o polar (según el tratamiento). Al finalizar, los tubos se sellaron con parafilm para disminuir la entrada de patógenos.

Incubación

Una vez sembrados, los tubos se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura promedio de 22 – 24°C expuestos a un fotoperíodo de 16 horas luz con lámparas fluorescentes del tipo daylight de 8 pies (2.4 m) de largo, espaciadas a 50 cm y con una intensidad de 1000 a 3000 lux.

Experimento 1: Evaluación de cuatro niveles de BAP en la regeneración *in vitro* de *Dendrobium* spp.

Se evaluaron cuatro concentraciones (0, 2, 4 y 6 mg/L) del regulador de crecimiento BAP (6-Bencilaminopurina) para determinar la concentración más adecuada para el establecimiento y regeneración *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp.

Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento, cada repetición con 20 tubos de ensayo para un total de 60 unidades experimentales por concentración y 240 unidades para el primer experimento.

Experimento 2: Evaluación de tres sistemas de siembra en la respuesta regenerativa de *Dendrobium* spp.

Se evaluaron tres sistemas de siembra para observar la respuesta regenerativa de los explantes foliares de *Dendrobium* spp.: líquido, semi-sólido con siembra polar y semi-sólido con siembra apolar, todos con la misma concentración del regulador de crecimiento BAP (5 mg/L).

Al igual que en el primer experimento se llevaron a cabo tres repeticiones por cada sistema de siembra, con 20 tubos de ensayo para un total de 60 unidades experimentales por sistema y 180 unidades para el segundo experimento. Al momento de la incubación la consistencia líquida permaneció en agitación constante por medio de un agitador orbital a una velocidad de 40 rpm

Variables medidas

Las variables que se midieron en ambos experimentos fueron: regeneración de tejido callogénico (TC) y sobrevivencia de los explantes durante un periodo de 8 semanas. La regeneración de tejido callogénico se evaluó categorizando de la siguiente manera: 1 indicando un 1-25% del explante inicial regenerado con TC, 2 para un 26-50% del explante regenerado con TC, 3 indicando un 51-75% del explante regenerado con TC y 4 para una regeneración callogénica de > 76% cubriendo el explante.

Los datos se analizaron usando un diseño completamente al azar y con una separación de medias Duncan con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, utilizando el programa estadístico "Statistical Analysis System" (SAS® 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento I: Evaluación de cuatro niveles de BAP en la regeneración *in vitro* de *Dendrobium* spp.

Regeneración de tejido callogénico (TC). En la quinta semana del estudio se comenzó a observar la presencia TC en todos los tratamientos (Gráfico 1). En la octava semana de incubación el tratamiento con 6 mg/L de BAP obtuvo el mayor porcentaje (37%) de regeneración callogénica y fue superior ($P \leq 0.05$) al resto de los tratamientos. El tratamiento de 4 mg/L presentó un 25% de regeneración de TC y los tratamientos de 2 mg/L y 0 mg/L presentaron 22% y 19% de formación callogénica, respectivamente.

El tejido callogénico se puede definir como una masa parenquimatosa de células obtenidas por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados. Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras que otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares. La inducción de TC a partir de una porción vegetal sucede cuando el inóculo ya estéril se coloca en contacto directo con un medio de cultivo que mantenga su crecimiento (Hurtado y Merino 1994) y puede ser estimulado por una variedad de auxinas y citocininas (Montoya 1991). Existen especies que para la inducción de tejido callogénico *in vitro* requieren el suplemento de una auxina solamente, otras requieren de la presencia única de una citocinina y otras simplemente responden al estimulo del medio bajo el cual se encuentran.

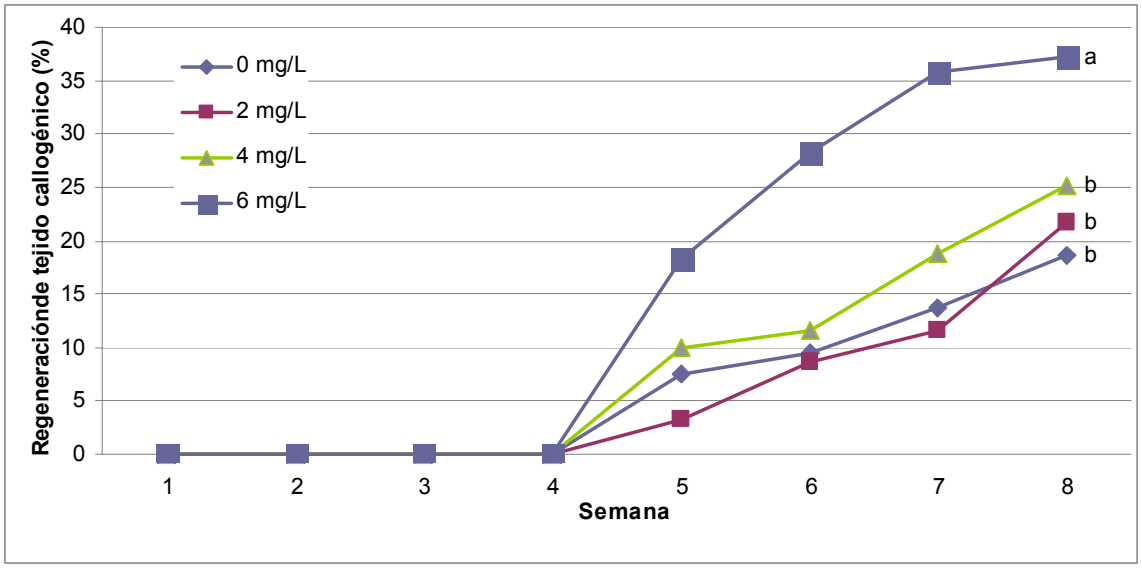

Gráfico 1. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración semanal de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp. [a,b] Porcentajes con igual letra no difieren entre si ($P \geq 0.05$).

Se pudo observar que el TC se forma independientemente de la concentración de BAP que se use, aunque al utilizar la concentración más alta se observó una mayor regeneración. Sin embargo, las diferencias en la regeneración de tejido callogénico no fueron significativas a la octava semana de cultivo entre los tratamientos que recibieron BAP (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración de tejido callogénico a la octava semana de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp.

Concentración de BAP (mg/L)	Regeneración de tejido callogénico (TC) [1]
6	2.15 [a]
4	1.85 [b]
2	1.52 [b]
0	1.41 [b]

[a] Medias con igual letra no difieren entre si ($P \leq 0.05$).
[1] Promedio de TC: = 1-25%, 2= 26-50%, 3= 51-75%, 4= >76% del área total del explante inicial cubierto por TC.

Sobrevivencia. En general la sobrevivencia fue baja. El tratamiento con 6 mg/L fue el que tuvo mayor porcentaje de sobrevivencia (14%), seguido del tratamiento con 4 mg/L (10%). Los tratamientos con 2 y 0 mg/L de BAP presentaron 6% y 4% de sobrevivencia, respectivamente. El experimento en general tuvo un promedio de sobrevivencia de 9% (Gráfico 2). Independientemente de las concentraciones de BAP que se utilice se obtuvo sobrevivencia.

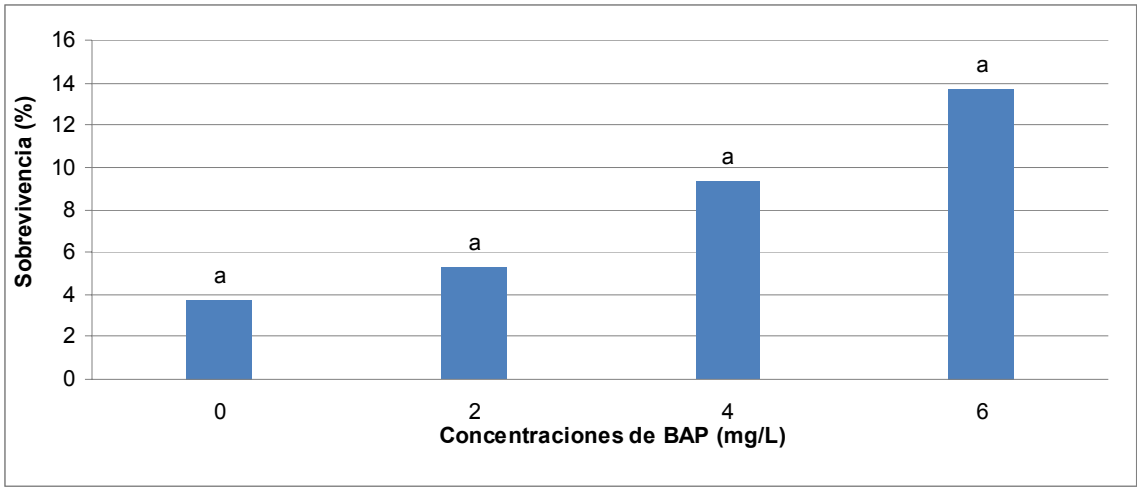

Gráfico 2. Sobrevivencia durante la evaluación de diferentes concentraciones de BAP durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp.
[a] Valores con igual letra no difieren entre si ($P \geq 0.05$).

Contaminación. A partir de la primera semana después de la siembra se observó contaminación en todos los tratamientos. El tratamiento de 0 mg/L obtuvo el mayor porcentaje de contaminación (81%) seguido con 79% en el tratamiento de 2 mg/L; los tratamientos con 6 mg/L y 4 mg/L presentaron (63% y 75%) de contaminación (Gráfico 3). Durante todo el estudio la contaminación se dio en todos los tratamientos, al final se obtuvo un promedio de 74% de contaminación en todo el experimento, debido a la alta presencia de hongos endógenos provenientes del material vegetal.

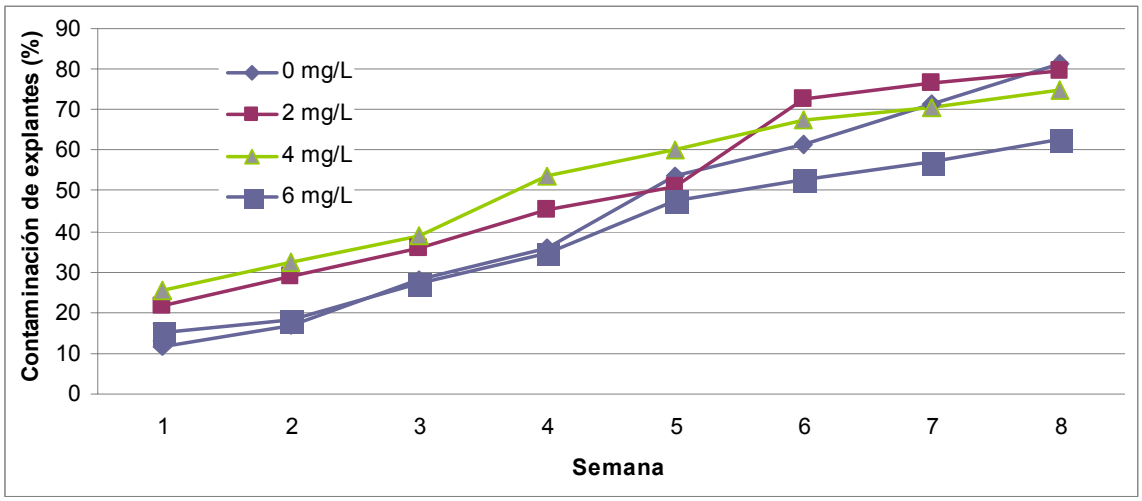

Gráfico 3. Contaminación durante la evaluación de diferentes concentraciones de BAP durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp.

Experimento II: Evaluación de tres sistemas de siembra en la respuesta regenerativa de explantes foliares de *Dendrobium* spp.

Regeneración de tejido callogénico (TC). La regeneración de TC depende mucho del tipo de material vegetativo usado y generalmente es mucho más lenta sobre medios sólidos, que sobre medios líquidos. El suministro de oxígeno es mejor sobre medios líquidos y los callos pueden fragmentarse cuando se encuentran en medio líquido, incrementando así su superficie y la absorción de nutrientes del medio (Mateo 1990).

Al igual que el experimento anterior, la presencia de TC se comenzó a observar en la quinta semana de la siembra (Gráfico 4). El tratamiento del medio semi-sólido con siembra apolar mayor porcentaje (64%) de TC regenerado a la octava semana que el tratamiento de medio semi-sólido en siembra polar con 52%, aunque sin diferencia estadística. En el tratamiento en el medio líquido no se presentó formación de tejido callogénico.

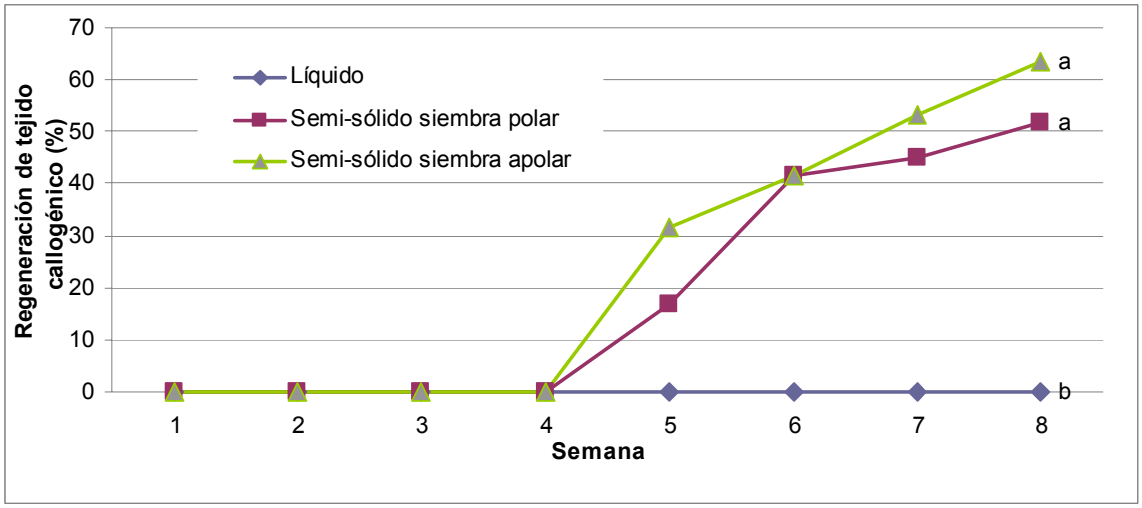

Gráfico 4. Efecto del sistema de siembra sobre la regeneración semanal de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp. [a,b] Porcentajes con igual letra no difieren entre si ($P \geq 0.05$).

Independientemente de la posición de siembra, la formación de TC se presentó en el medio semi-sólido (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del sistema de siembra en la regeneración de tejido callogénico a la octava semana de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp.

Sistema de siembra	Regeneración de tejido callogénico (TC)[1]
Líquido	0.00[b]
Semi-sólido siembra polar	1.75[a]
Semi-sólido siembra apolar	1.89[a]

[a,b] Medias con igual letra no difieren entre si ($P \geq 0.05$).

[1] Promedio de TC: 1= 1-25%, 2= 26-50%, 3= 51-75%, 4= >76% del área total del explante inicial cubierto por TC.

Sobrevivencia. El sistema de medio semi-sólido con siembra apolar presentó un 24% de sobrevivencia y el sistema semi-sólido con siembra polar uno de 19% sin diferencia significativa entre ellos. Para el segundo experimento de evaluaciones de sistema de siembra se obtuvo un 14.25% de sobrevivencia total (Gráfico 5).

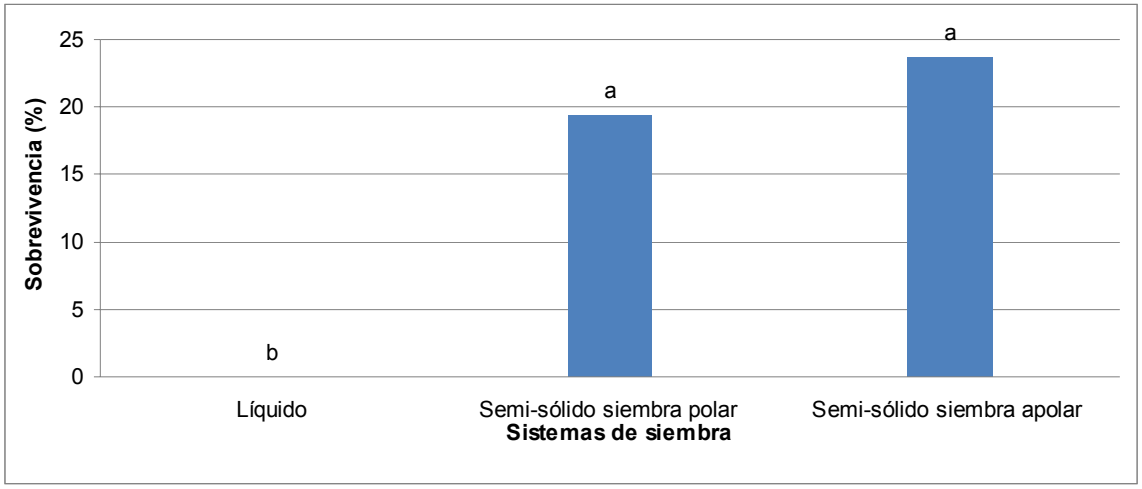

Gráfico 5. Sobrevivencia durante la evaluación de diferentes sistemas de siembra durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp.
[a] Porcentajes con igual letra no difieren entre si ($P \geq 0.05$).

Ambos sistemas de siembra con formulaciones semi-sólidas presentaron sobrevivencia mientras que el sistema líquido de siembra no permitio en lo absoluto la sobrevivencia de los explantes, probablemente por problemas de aireación en el medio líquido y al uso de tubos de ensayo como contenedores.

Contaminación. Desde las primeras semanas de siembra, se pudo observar una alta contaminación con hongos, principalmente en el tratamiento de medio líquido que llegó a un 100% de contaminación a la octava semana. En los tratamientos de formulación semi-sólida se observó un 48% y 37% de contaminación para las siembras polar y apolar, respectivamente (Gráfico 6). La contaminación promedio fue de 62%.

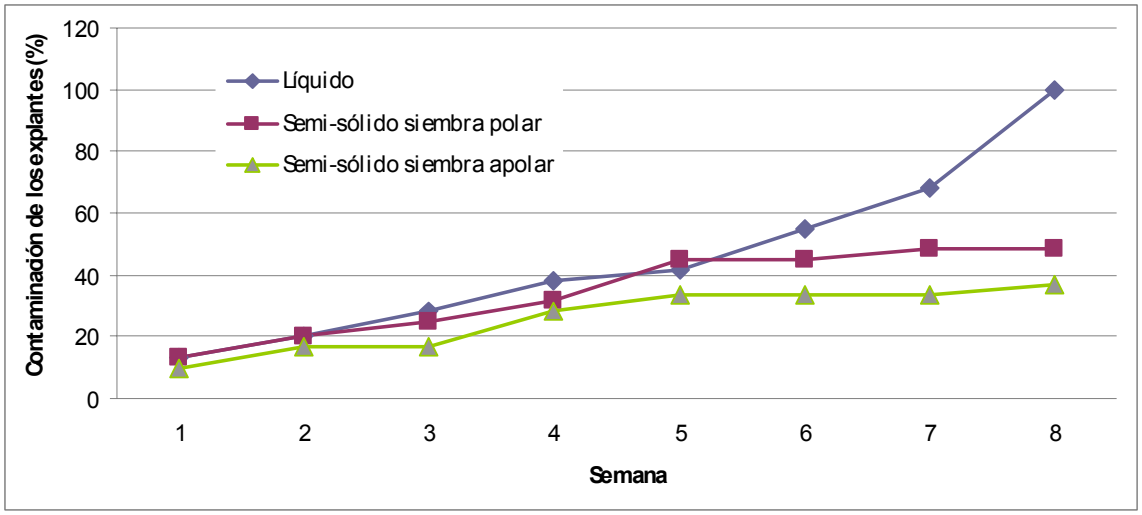

Gráfico 6. Contaminación durante la evaluación de diferentes sistemas de siembra durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* spp.

CONCLUSIONES

- Al utilizar concentraciones de 6 y 4 mg/L de BAP se obtuvo un mayor porcentaje de explantes cubiertos por tejido callogénico.

- Al utilizar concentraciones de 6 y 4 mg/L de BAP se obtuvo un mayor porcentaje de tejido callogénico cubriendo el explante.

- Al utilizar la siembra apolar se presentó un mayor porcentaje de regeneración de tejido callogénico y una mayor sobrevivencia.

- El medio líquido presentó un alto grado de contaminación y mortalidad.

RECOMENDACIONES

- Evaluar concentraciones mayores de 6 mg/L de BAP, ya que con las concentraciones altas que se utilizaron en el estudio se obtuvieron mayores porcentajes de regeneración de tejido callogénico y sobrevivencia.

- Evaluar otro tipo de citocininas: Kinetina y Zeatin.

- Utilizar otro tipo de material vegetativo: yemas florales y embriones.

- Evaluar otras formulaciones nutritivas recomendadas para explantes de *Dendrobium* spp.

- Utilizar la siembra apolar al sembrar láminas foliares de *Dendrobium* spp.

- Usar erlenmeyers para el tratamiento de medio líquido en sistema de siembra y aumentar las revoluciones en el agitadora orbital para mejorar la aireación.

- Identificar el tipo de contaminación que afecta la sobrevivencia durante el establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Dendrobium* spp.

LITERATURA CITADA

Arditti, J. y Ernst, R. 1993. Micropropagation of Orchids. New York, USA. John Wiley & Sons, Inc. 289 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W; Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia Editorial XYZ 970 p.

Fisher, A. 2007. Cultivos de Orquídeas. Grulla. Argentina. Buenos Aires, Argentina 96 p.

Hall, R. D. 1999. Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols. Vol. CXI. New Jersey, USA. 421 p.

Hurtado, D y Merino, M. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México, D.F. México. 232 p.

Linares, J. 1993. Propagación *in vitro* de la orquídea *Rhyncholaelia digbyana.* Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 88 p.

Mateo, L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi Prensa. España Madrid, España. 326 p.

Montoya, L. 1991. Cultivos de Tejidos Vegetales. Editorial EALON. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 77 p.

Reyes Padilla, B.A. 2001. Uso de L-cisteina y acido ascórbico para el control de la oxidación durante el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de ápices meristematicos de tres cultivares de plátano (*Musa* spp.) incubados bajo condiciones de luz y oscuridad. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 52 p.

Salas Valverde, V. 2007. Establecimiento *in vitro* de explantes foliares de tres genotipos de *Dendrobium* sp. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 12 p.

Sánchez, J. 2005. La multiplicación vegetativa (En línea). Consultado: 12 de Junio de 2008. Disponible http://www.arbolesornamentales.com/multiplicacionvegetativa.htm

Santana, J. 2005. Cultivo *in vitro* (En línea). Consultado: el 10 de Junio de 2008. Disponible en: http://jardinactual.com/articuloshtm2.php?articulo=278