

Fundada en 1951 por Founded in 1951 by
Miguel Raggio & Nora Moro de Raggio
Editor-in-Chief: Dr. Carlos A. Busso

FUNDACION ROMULO RAGGIO
Gaspar Campos 861, 1638 Vicente López (BA), Argentina
www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar
ISSN 0031-9457

57° ANIVERSARIO

(2008) 77: 203-215

57th ANNIVERSARY

Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae)

(Con 3 Tablas y 5 Figuras)

In vitro germination of *Encyclia adenocaula*
(La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) seeds

(With 3 Tables and 5 Figures)

Ruíz^{1,2*} BC, CA Laguna², ALG Iglesias³, A Damon⁴, HTNJ Marín⁵,
RHS Azpiroz³, MJL Moreno¹

Resumen. *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae), es una orquídea epífita que utiliza como huésped natural a los árboles de encino (*Quercus* sp), por lo que es considerada como un recurso forestal no maderable. Por la belleza de sus flores es altamente depredada. La Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2001) la reporta como una especie endémica de México en la categoría de amenazada. La presente investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo efectivo para la germinación *in vitro* de semillas inmaduras de esta especie, así como conocer el efecto del estado de maduración de las cápsulas sobre su germinación. Los medios de cultivo *in vitro* estudiados fueron: Murashige y Skoog; Vacin y Went; Dalla Rosa y Laneri K07, y Phytamax (medio de manteni-

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas. Entronque carretera costera. Huehuetán Pueblo. C.P. 30660. Huehuetán, México.

² Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. Campus El Cerrillo Km. 15 Carr. Toluca-Ixtlahuaca, Estado de México, México.

³ Lab. Biotecnología y Ecología Aplicada (LABIOTECA), Universidad Veracruzana. Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Xalapa, Veracruz, C.P. 91001, México.

⁴ El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), carretera antiguo aeropuerto Km 2.5 C.P. 30700 Tapachula, Chiapas. México.

⁵ Laboratorio de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Progreso # 5 Coyoacán, C.P. 04010. México, D.F. México.

Address Correspondence to: Carmen Ruíz Bello, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas. Entronque carretera costera. Huehuetán Pueblo. C.P. 30660. Huehuetán, Chiapas. México; e-mail: carubell6@yahoo.com.mx Teléfono y fax: (964) 6270128.

Recibido/Received 30.XII.2007. Aceptado/Accepted 5.VIII.2008.

miento de Orquídeas). Las etapas de madurez de las cápsulas fueron definidas con base a su coloración (verde, verde amarillenta, amarilla sin dehiscencia, y café con inicio de dehiscencia) en una escala de 4 valores. La germinación y el crecimiento de las plántulas fueron evaluados durante 70 días: se determinaron los días a inicio de germinación, el porcentaje de germinación, el vigor y la altura de las plántulas. Los resultados obtenidos indicaron que el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el medio Phytamax cuando se emplearon cápsulas de color verde y verde amarillenta. Además, las plántulas tuvieron mayor velocidad de crecimiento.

Palabras clave: *Encyclia adenocaula*, Orchidaceae, germinación *in vitro*, cápsulas.

Abstract. *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae) is an epiphyte orchid, which uses oak (*Quercus* sp) trees as a natural host and is thus considered a non timber-yielding forest resource. Predation of this species is high because of the beauty of its flowers. The Official Mexican Norm (NOM-059-SEMARNAT-2001) reports it as an endemic endangered species in Mexico. The objective of this research was to (1) establish an effective protocol for *in vitro* germination of immature seeds of this species, and (2) determine the effect of the capsule maturity state on seed germination. The *in vitro* cultivation mediums were: Murashige and Skoog; Vacin and Went; Dalla Rosa and Laneri K07, and Phytamax (Orchid maintenance medium). Capsule maturity stages were based on a color scale of 4 values: (1) green, (2) yellowish green, (3) yellow without dehiscence, and (4) brown with dehiscence initiation. Seed germination and seedling growth were evaluated during 70 days determining: (1) days to germination, (2) germination percentage, (3) seedling vigor and height. The obtained results indicated that the Phytamax medium showed the greatest germination percentage when green and yellowish green capsules were used. In addition, seedlings showed a greater growth rate.

Key words: *Encyclia adenocaula*, Orchidaceae, *in vitro* germination, capsules.

INTRODUCCIÓN

Las flores de las orquídeas han sido apreciadas desde tiempos remotos. Los Mayas y los Aztecas las utilizaban tanto como plantas ornamentales como medicinales, y algunas otras para elaborar pegamentos. Ossenbach (2005) ha informado algunos de los múltiples usos que proveían estas plantas. La biología reproductiva de las orquídeas es compleja. Sus flores desarrollan mecanismos de atracción a los polinizadores que les permite producir semillas y perpetuar su especie (Anderson et al., 2005; Huber et al., 2005). La propagación natural de las orquídeas se dificulta porque sus semillas son diminutas y carecen de endosperma. Por esta razón, requieren de una relación obligada con hongos micorrízicos que permita la germinación de las semillas (Arditti, 1984). Entender esta simbiosis micorrízica es de gran

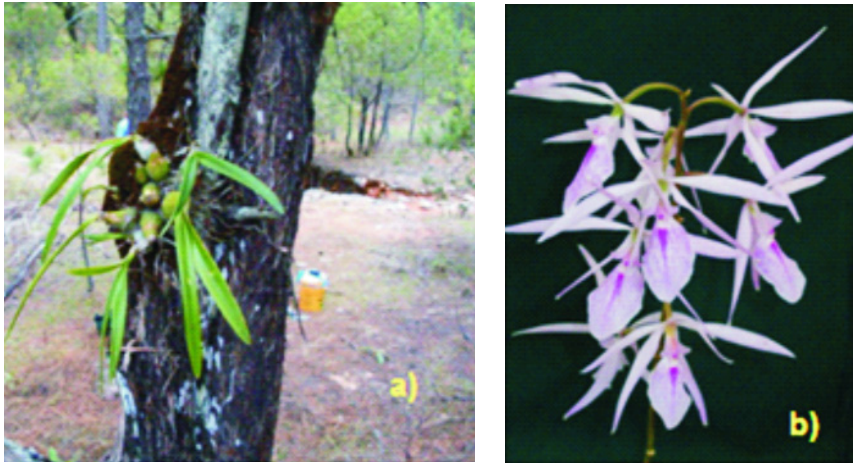
importancia ya que existe una especificidad micorrízica para la germinación de semillas de orquídeas (Taylor et al., 2003; Otero et al., 2004). La disponibilidad de hongos simbioses para la distribución y diversidad de las orquídeas también es de gran importancia (Otero et al., 2002).

Debido a la dificultad que presentan las semillas de las orquídeas para germinar en forma natural, se han desarrollado metodologías de germinación asimbiótica bajo condiciones *in vitro* (Arditti y Ernst, 1993; Serna, 1999; Mckendrick, 2000; Cavalcante et al., 2001; Damon et al., 2004; Pedroza et al., 2005; Yamazaki y Kasumitsu, 2006; Pedroza y Mican, 2006; Haddix et al., 2006; Steele, 2007). Sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar, por lo que hay que investigar cual es el medio de germinación adecuado para cada una de ellas. Damon et al. (2004), informaron que la madurez de las semillas al momento de la germinación es un factor importante y poco estudiado en la propagación de las orquídeas.

Encyclia adenocaula (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) es una orquídea endémica de México. Su nombre común es “Trompillo” ó “Trompillo morado”. Por la belleza de sus flores se encuentra amenazada [Norma Oficial Mexicana -059-SEMARNAT-2001(2002)] con riesgo de llegar a extinguirse; su principal utilidad es como planta ornamental. Se distribuye en los estados de: México, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Guerrero y Oaxaca. Su hábitat varía desde 1200 a 2000 msnm. Su floración es de Mayo a Junio. Es una planta epífita que vive sobre los encinos (*Quercus* sp) (Fig. 1). Las epifitas son plantas que crecen sobre otras plantas adheridas a los troncos y ramas de árboles y arbustos principalmente (Granados et al., 2003). Las orquídeas epifitas son el grupo de plantas que han podido colonizar con más éxito las copas de los árboles (Hágsater et al., 2005). Sin embargo, éstas son altamente depredadas por lo que se considera que se les debe brindar una protección especial (Hágsater y Soto, 2002). Además, se debe contribuir a su conservación y restauración, mediante el desarrollo de metodologías eficientes de propagación. El presente trabajo es parte de un estudio encaminado a la conservación de esta especie de orquídea, en la búsqueda de productos alternativos económicamente rentables para los productores del municipio de Temascaltepec, estado de México. Con el propósito de contribuir a evitar su extinción, hemos trabajado en su cultivo *in vitro* a fin de establecer un protocolo efectivo para la germinación asimbiótica de las semillas de *E. adenocaula*. Con este objetivo, se propuso conocer el efecto de 4 medios de cultivo, y el estado de madurez de las cápsulas, sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de esta especie. Los resultados a obtener contribuirán a encontrar estrategias efectivas de propagación y de conservación de este valioso recurso genético.

Fig. 1. *E. adenocaula*. a) en su hospedero natural (*Quercus* sp), b) Flores.

Fig. 1. *E. adenocaula*. a) on its natural host (*Quercus* sp), b) flowers.



MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. En el Ejido “El Peñón” (19° 02′ 33.5″ N, 100° 07′ 41.7″ O, 1689 m.s.n.m), del municipio de Temascaltepec, estado de México, se obtuvieron cinco plantas de *E. adenocaula* en floración. El municipio se localiza en el Sudoeste del Estado. El clima se clasifica como Semicálido con lluvias en verano A(C) (w₂); los meses más cálido y más frío son mayo y diciembre, con 18 °C y 8 °C, respectivamente. La temperatura media anual es de 15 a 20 °C. La precipitación media anual es de 1100 mm (Morales, 2006).

Las plantas obtenidas crecieron luego bajo condiciones de invernáculo. Como producto de la fecundación natural se obtuvieron cuatro cápsulas que maduraron en diferente tiempo. Las semillas de estas cápsulas se sembraron en diferentes medios de cultivo.

Selección de medios de cultivo. Se seleccionaron cuatro medios de cultivo, de uso común para la germinación de semillas de orquídeas: M1. Murashige y Skoog (1962); M2. Vacin y Went (1949); M3. Dalla Rosa y Laneri K07 (Dalla Rosa y Laneri, 1977), y M4. Phytamax Orchid Maintenance Médium (SIGMA®). El pH se ajustó de acuerdo a la reco-

mendación para cada uno de los medios de cultivo previo a la adición del gelificante (agar bacteriológico marca Bioxon). Se utilizaron frascos gerber de 100 ml a los cuales se agregaron 20 ml de cada medio de cultivo. Éstos se esterilizaron en un autoclave vertical AESA (modelo CV30) a 120 °C (15 libras de presión) durante 20 minutos.

Desinfección de las cápsulas. Las cápsulas se cortaron entre los siete y ocho meses de edad, considerando su tamaño, textura y coloración (Fig. 2). Cada una de ellas se clasificó, conforme a su madurez establecida en base a su coloración, en una escala de 4 valores: (C1) Cápsula verde (195 días), (C2) Cápsula verde amarillenta (210 días), (C3) Cápsula amarilla sin dehiscencia (240 días), y (C4) Cápsula café con inicio de dehiscencia (255 días). Éstas se llevaron al laboratorio para llevar a cabo su desinfección, la que se realizó bajo condiciones asépticas, dentro de una cámara de flujo laminar horizontal ALDER (modelo CFH-13). Cada cápsula se tomó con una pinza, y se sumergió en alcohol etílico al 75%. Inmediatamente luego se la flameó, hasta consumirse el alcohol impregnado en la misma. Cambiando la posición de la pinza, el procedimiento se repitió tres veces. Una vez desinfectadas, éstas se dejaron enfriar en placas de Petri previo a la extracción de sus semillas para efectuar la siembra.

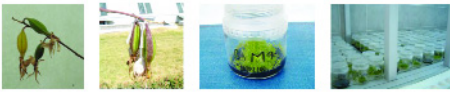


Fig. 2. Cápsulas y semillas germinadas *in vitro* de *E. adenocaula*.

Fig. 2. *In vitro* germinated capsules and seeds of *E. adenocaula*.

Siembra de las semillas en cuatro medios de cultivo. Se cortaron los extremos de las cápsulas, y seguidamente se efectuó un corte longitudinal procurando introducir el bisturí en una de las hendiduras de las mismas. Una vez abiertas se esparció una delgada capa de semillas en la superficie de cada uno de los frascos conteniendo los medios de cultivo: M1, M2, M3, o M4. Los frascos se sellaron con parafilm, y se identificaron con su fecha de siembra, número de la cápsula y el medio de cultivo correspondiente.

Condiciones del cultivo. Los cultivos se llevaron a una cámara de incubación ordenándolos linealmente por tratamiento. Éstos se mantuvieron durante todo el experimento bajo un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C y una intensidad lumínica de 2000 lux (Fig.2).

Diseño del experimento y análisis estadístico. Se utilizó un diseño de bloques al azar con cuatro tratamientos (medios de cultivo), cuatro bloques (cápsulas con diferente grado de maduración: C1-C4), y 11 repeticiones (frascos) por cada bloque. Esto hizo un total de 176 frascos o unidades experimentales. Los datos obtenidos [días a inicio de germinación, porcentaje de germinación, vigor de plántula (escala de 1 a 10) y altura de plántula (mm)] fueron analizados estadísticamente con el programa SAS. Previo al análisis de varianza (ANOVA), los datos de porcentaje de germinación y vigor de plántula se transformaron a Arc Sen ($\sqrt{\%}$) y $\sqrt{(x+0,5)}$, respectivamente. La comparación de medias cuando las pruebas de F fueron significativas fueron analizadas por la prueba de Tukey ($p=0,05$). Se realizó además un análisis de correlación lineal entre las variables en estudio.

RESULTADOS

El estado de madurez de las cápsulas y el medio de cultivo tuvieron un efecto altamente significativo ($p=0,01$) sobre el porcentaje de germinación de las semillas (Tabla 1). No se encontraron, sin embargo, diferencias significativas ($p>0,05$) del efecto de la madurez de las cápsulas, pero sí de los medios de cultivo ($p=0,01$), sobre el vigor y la altura de las plántulas (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de F calculados del análisis de varianza de las variables estudiadas.

Table 1. Calculated F values from the analysis of variance of the study variables.

Variable	Cápsula	Medio de Cultivo	CV (%)	Media	EE
Germinación (%)	8,39**	11,77**	34,60	49,94	17,28
Vigor (%)	2,21 NS	21,89**	20,60	2,39	0,49
Altura (mm)	0,73 NS	8,32**	54,95	4,12	2,27

(**): altamente significativo ($p=0,01$); (NS): no significativo; CV: Coeficiente de variación; EE: error estándar.

(**): highly significant ($p=0.01$); (NS): non significant; CV: Variation coefficient; EE: standard error.

Los días a inicio de germinación de las semillas fueron estadísticamente iguales ($p>0,05$) en los medios 1,3 y 4 (Tabla 2). No se observó germinación en el medio 2 (sólo se apreció hidratación de las semillas; Tabla 2). Los porcentajes de germinación fueron similares ($p>0,05$) en M1, M3 y M4, y mayores ($p<0,05$) en éstos que en M2 (Tabla 2). Mientras el vigor fue mayor ($p<0,05$) en M1 y M4 que en M2 y M3, la altura fue similar ($p>0,05$) en M1, M3 y M4, y mayor ($p<0,05$) en éstos que en M2 (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de los medios de cultivo sobre las variables de germinación y crecimiento evaluadas.

Table 2. Effect of the cultivation media on the germination and growth study variables.

Medio de Cultivo	Días a germinación	Germinación (%)	Vigor (%)	Altura (mm)
M1	27 a	62.43 a	2.67 a	4.25 ab
M2	0 b	5.74 b	0.70 b	0.0 b
M3	28 a	62.43 a	2.98 b	4.25 ab
M4	25 a	69.16 a	3.24 a	8.0 a

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey ($p=0,05$).

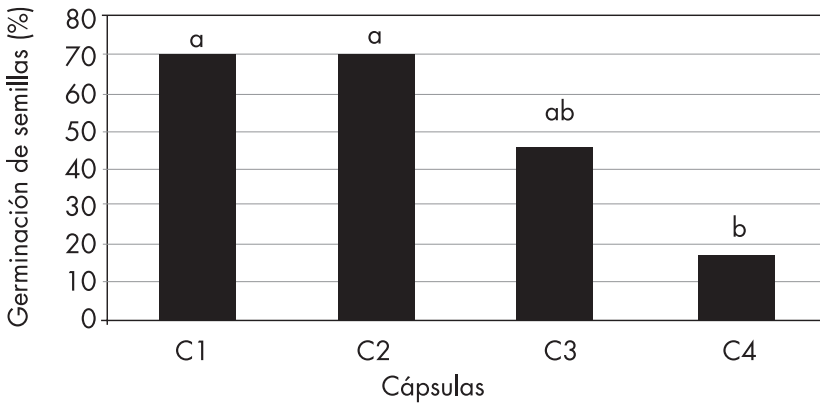
Values followed by the same letter are statistically equal, according to Tukey's Test ($p=0.05$).

Los mayores ($p<0,05$) porcentajes de germinación (68.94%) se observaron al emplear las cápsulas C1 (verde) y C2 (verde-amarillenta) (Fig. 3). Las cápsulas C3 y C4 tuvieron un porcentaje de germinación similar ($p>0,05$) (Fig. 3).

Las variables de altura y vigor de plántula no presentaron diferencias significativas entre cápsulas pero si ($p<0,05$) entre los medios de cultivo evaluados (Fig. 4).

Fig 3. Porcentaje de germinación por cápsula de *E. adenocaula*. 1-4 Cápsulas con diferente grado de madurez. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey ($p=0,05$).

Fig 3. Percentage germination per capsule of *E. adenocaula*. 1-4 capsules with different maturity degrees. Values followed by the same letter are statistically equal, according to Tukey's test ($p=0.05$).



En la actualidad se han venido desarrollando numerosos estudios encaminados a definir los medios de cultivo más adecuados para propagar cada especie de orquídeas. Esto se ha efectuado con el fin de incrementar la variabilidad genética y rescatar especies raras, que estén amenazadas o en peligro de extinción (Stephenson y Fahey, 2004). Sin embargo, pocos estudios al respecto se han llevado a cabo en *E. adenocaula*.

En la Fig. 5 se pueden observar plántulas de *E. adenocaula* cultivadas en medio de cultivo *in vitro* Phytamax (Orchid maintenance medium), aptas para ser transplantadas en un sustrato adecuado y proceder a su aclimatación en fase de invernadero.

Análisis de correlación. Los mayores ($p<0,01$) valores de correlación se obtuvieron entre el porcentaje de germinación de semillas y el vigor de las plántulas ($r=0,87^{**}$), y entre la altura y el vigor de las plántulas ($r=0,79^{**}$) (Tabla 3). También fue significativa ($p<0,05$) la correlación entre el porcentaje de germinación de las semillas y la altura de las plántulas ($r=0,60^*$) (Tabla 3).

Fig 4. Variación en el porcentaje de germinación de las semillas, altura y vigor de las plántulas de *E. adenocaula* en los cuatro medios de cultivo evaluados [M1. Murashige y Skoog (1962); M2. Vacin y Went (1949); M3. Dalla Rosa y Laneri K07 (Dalla Rosa y Laneri, 1977), y M4. Phytamax Orchid Maintenance Medium (SIGMA®)]. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey ($p=0,05$).

Fig 4. Variation in seed germination percentage, height and vigor on seedlings of *E. adenocaula* in the four study media [M1. Murashige and Skoog (1962); M2. Vacin and Went (1949); M3. Dalla Rosa and Laneri K07 (Dalla Rosa and Laneri 1977), and M4. Phytamax Orchid Maintenance Medium (SIGMA®)]. Values followed by the same letter are statistically equal, according to Tukey's test ($p=0.05$).

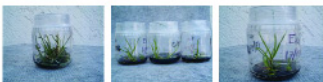
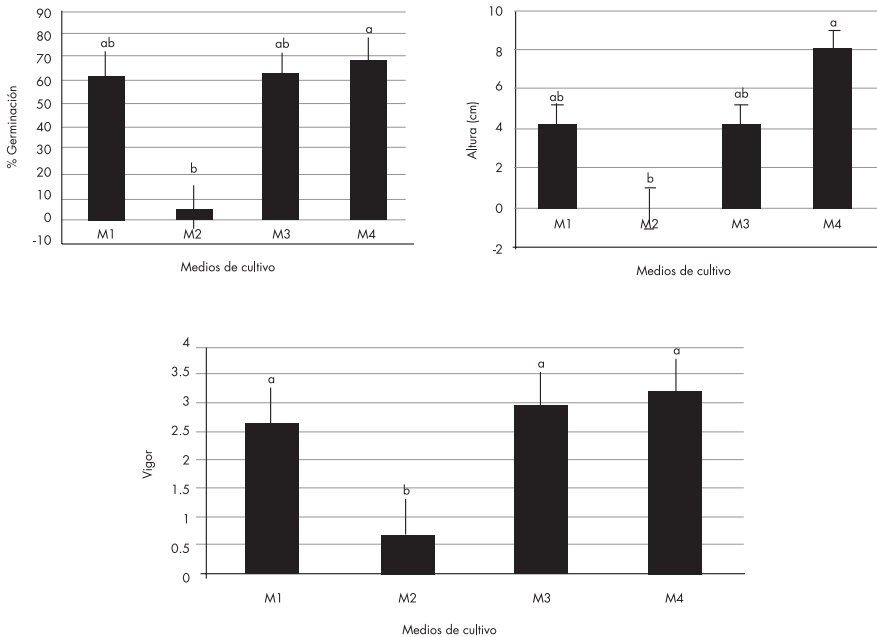


Fig. 5. Plántulas de *E. adenocaula* en invernáculo aptas para su aclimatación.

Fig. 5. Greenhouse seedlings of *E. adenocaula* ready for acclimation.

Tabla 3. Valores de correlación lineal entre las variables evaluadas**Table 3.** Linear correlation values among the study variables.

	Germinación de semillas (%)	Altura de Plántula (mm)	Vigor de Plántula (%)
Germinación de semillas (%)	-		0,87**
Altura de Plántula (mm)	0,60*	-	0,79**
Vigor de Plántula (%)	0,87**	0,79**	-

(*): significativo ($p=0,05$); (**): altamente significativo ($p=0,01$).
 (*): significant ($p=0.05$); (**): highly significant ($p=0.01$).

DISCUSION

Existe preocupación por conservar las orquídeas que se encuentren en peligro de desaparecer (Szalanski et al., 2001; Avila y Oyama, 2007). El cultivo de tejidos vegetales constituye una herramienta poderosa. El mismo permite la germinación de semillas *in vitro*, que de otra forma no sería posible, como es el caso de *E. adenocaula* (que se encuentra registrada como amenazada).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la utilidad de emplear el medio Phytamax Orchid maintenance medium SIGMA® (M4) para lograr mayores porcentajes de germinación de las semillas inmaduras de *E. adenocaula*. Sin embargo, los medios Murashige y Skoog (M1) y Dalla Rosa y Lanery K07 (M3) también obtuvieron resultados favorables de germinación. El vigor de las plántulas fue ligeramente superior en M4, en el mismo grupo de respuesta de M1 y M3. Las plántulas obtenidas en M4 fueron de mayor calidad y se observó mayor velocidad en su crecimiento. El análisis comparativo de los diferentes medios de cultivo *in vitro* aportó resultados para su utilización inmediata para la germinación de semillas de esta orquídea y la época de aprovechamiento de las cápsulas. Estos resultados son importantes a fines de obtener el mayor número de plántulas para conservar la especie, evitando su extinción. La utilización de semillas como fuente de propagación mantiene la variabilidad genética natural. Por lo tanto, las plantas obtenidas pueden destinarse para la repoblación de las áreas naturales, o bien para su venta legal, beneficiando a los productores de la zona. El medio Phytamax se comer-

cializa en polvo, lo cual representa una ventaja para quien no desea preparar todo el medio de cultivo. Hurtado y Merino (1987) mencionan que el medio nutritivo desarrollado por Murashige y Skoog (1962) es utilizado con éxito en casi todas las especies. Estos resultados coinciden con esta investigación, ya que también resultó favorable para la germinación de semillas inmaduras de *E. adenocaula*. Damon et al. (2004) informan que se sabe muy poco de la propagación de la gran mayoría de las orquídeas que son epifitas. Estos autores utilizaron con éxito el medio de cultivo Dalla Rosa y Laneri K07 para germinar semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. Este mismo medio fue utilizado en este experimento obteniendo buenos resultados en el porcentaje de germinación de las semillas; los resultados fueron similares a los que se obtuvieron cuando se utilizó el medio Murashige y Skoog. La ventaja de utilizar semillas inmaduras es que las semillas dentro de la cápsula se encuentran estériles. Cuando las semillas son liberadas de la cápsula y almacenadas, y se requiere utilizarlas posteriormente, hay que buscar una metodología para desinfectarlas, y en este proceso se desconoce si la germinación resulta afectada. Hay que tener presente que no es fácil conseguir cápsulas de semillas y éstas tardan muchos meses en madurar en algunas especies. Las cápsulas de *E. adenocaula* pueden ser obtenidas en el campo sin necesidad de extraer las plantas. El aprovechamiento de las plantas bajo estas condiciones contribuye a la propagación de la especie, y a reducir la actual extracción de plantas bajo condiciones de campo naturales.

Este trabajo reporta un procedimiento muy sencillo y práctico para la desinfección de las cápsulas, menos complicado que lo reportado por algunos autores (Damon et al., 2004; Mckendrick, 2000), obteniendo altos porcentajes de germinación de semillas *in vitro*. En este trabajo también se define el medio de cultivo más adecuado para la propagación de este valioso recurso genético. Así, se cumple una de las primeras etapas efectuadas con el propósito de lograr la conservación y mantenimiento de la variabilidad genética de esta especie.

CONCLUSIONES

El uso de cápsulas verde y verde amarillenta (de 195 a 210 días) de *E. adenocaula* permitió obtener los mayores porcentajes de germinación.

El medio de cultivo M4 (Phytamax orchid maintenance, medium SIGMA®) fue el más adecuado para obtener el mayor porcentaje de germinación de semillas (69,16%).

La estrategia de germinación de semillas de *E. adenocaula in vitro* contribuye al manejo sustentable de esta especie, conservando su variabilidad genética y evitando su depredación y extinción.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al M. en F. César Vences Contreras por las instalaciones y servicios otorgados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Ruíz BC desea agradecer el apoyo financiero de una beca otorgada por la Universidad Autónoma de Chiapas y PROMEP, México, para realizar esta investigación.

REFERENCIAS

- Anderson, B., S.D. Johnson y C. Carbutt (2005). Exploitation of a specialized mutualism by a deceptive orchid. *American Journal of Botany* 92: 1342-1349.
- Arditti, J. (1984). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press. Ithaca, USA. 432 p.
- Arditti, J. y R. Ernst (1993). *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & Sons, New York. USA. 640 p.
- Avila, D.I. y Oyama K. (2007). Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94: 184-193.
- Cavalcante, M.P., L. Willadino, A.G. Dias y S.D.V.M. Tenório (2001). Propagacao de orquídea *Górgora quinquerervis* por semeadura *in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras.* 36: 1319-1324.
- Dalla Rosa, M. y U. Laneri (1977). Modification of nutrient solutions for germination and growth "in vitro" of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. *American Orchid Society Bulletin* 46: 813-820.
- Damon, A., G.E. Aguilar, L. Rivera. y V. Nikolaeva (2004). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10: 195-203.
- Granados, S.D., R.G.F. López, G.M.A. Hernández y G.A. Sánchez (2003). Ecología de las plantas epífitas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. Vol. IX. Núm. 2.
- Haddix, M., G.M. Kamp y C. Raczkowski (2006). *In vitro* Shoot and leaf proliferation of *Encyclia tampensis* (Lind.) Orchidaceae. Abstracts of the ASHS Southern Region 66th Annual Meeting. 2-4 February. *HortScience* Vol. 40(3) June.
- Hágsater, E., A.M.A. Soto, Ch.G.A. Salazar, M.R. Jiménez, R.M.A. López y R.L. Dressler (2005). *Las Orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México, 304 pp.
- Hágsater, E., y M. Soto (2002). *Icones orchidacearum*. Herbario AMO, Apartado postal 53-123, 11320. México, D. F.
- Huber, F.K., R. Kaiser, W. Sauter y F.P. Schiestl (2005). Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecología* 142: 564-575.
- Hurtado, M.D.V. y M.M.E. Merino (1987). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas, S.A. de C.V. México, D.F. 232 p.
- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Copyright, Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- Morales, H.J.L. (2006). *Densidad de Orquídeas Epífitas en el Municipio de Temascaltepec, Méx.* Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad Autónoma del Estado de México. 91 p.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Norma, Oficial Mexicana NOM-059-SEMAR/NAT-2001 (2002). *Diario Oficial de la federación*, de fecha 06 de marzo. México.
- Ossensbach, C. (2005). History of orchids in Central America part I: from prehispanic times to the independence of the new Republics. *Harvard Papers in Botany* 10: 183-226.

- Otero, J.T., J.D. Ackerman y P. Bayman (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* 89: 1852-1858.
- Otero, J.T., J.D. Ackerman y P. Bayman (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology* 13: 2393-2404.
- Pedroza, M.J. y G.Y. Mican (2006). Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rehb.F. (Orchidaceae) under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42: 543-547.
- Pedroza, M.J., L.Ch. Fernández y S.A. Suarez (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 38-843.
- Serna, A.L. (1999). Propagación *in vitro* de orquídeas a partir de semilla sexual. FIT TECNIA No. 034 Genética. Diciembre, Universidad de Caldas, A.A. 275. Manizales, Colombia.
- SIGMA. Phytamax Orchid Maintenance Medium. P6668. Sigma Aldrich.
- Steele, W.K. (2007). Propagation protocol for ram's head lady's slipper (*Cypripedium arietinum*). *Native Plants Journal* 8: 58-64.
- Stephenson, K.K. y J. W. Fahey (2004). Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. Germoplasma. *Economic Botany* 58(Supplement): S116-S124.
- Szalanski, A.L., G. Steinauer, R. Bishop y J. Petersen (2001). Origin and conservation genetics of the threatened Ute Ladies'-Tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 88: 177-180.
- Taylor, D.L., T.D. Bruns, T. M. Szaro, y S.A. Hodges (2003). Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany* 90: 1168-1179.
- Vacin, E.F. y F.W. Went (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette* 110: 605-613.
- Yamazaki, J. y M. Kazumitsu (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 98: 1197-1206.