

ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA Y ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE *LAELIA EYERMANIANA* RCHB. f. GENERADAS *IN VITRO*

Juan José Francisco Nava, Antonio Ruperto Jiménez-Aparicio,
Antonia De Jesús-Sánchez, Martha Lucía Arenas-Ocampo, Elsa Ventura-Zapata
y Silvia Evangelista-Lozano

Laboratorio de Biotecnología I. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.
Instituto Politécnico Nacional. AP 24, Yautepec, Morelos, CP 62731,
Tel.: (735) 394 20 20; Fax: (735)394 18 96. Correo electrónico: sevangel@ipn.mx

RESUMEN

En este trabajo se hizo un seguimiento morfológico de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. obtenidas *in vitro*. Se realizaron preparaciones histológicas para observar diferentes etapas, desde la germinación hasta la aclimatación *ex vitro*. Las fotomicrografías de las preparaciones mostraron varios estadios transitorios. Se identificaron y describieron siete estadios relativos de desarrollo: semilla, protocormo no fotosintético, protocormo fotosintético, protocormo en diferenciación, plántula con hojas, plántulas con hojas y raíz, plántula con hojas y dos raíces. Así como también, dos fases transitorias: masa embrionaria somática (MES) y cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) por sus siglas en inglés, obtenidos por embriogénesis somática indirecta. La densidad estomática en las hojas se duplicó bajo condiciones *ex vitro*. Este estudio contribuye al conocimiento del desarrollo morfológico de *L. eyermaniana* durante su cultivo *in vitro* y aclimatación *ex vitro*.

Palabras clave: aclimatación, morfología, orquídeas.

ABSTRACT

A morphological study of plantlets of *Laelia eyermaniana* Rchb.f. cultured *in vitro* was carried out. Histologic preparations were made to observe different stages from seed germination until *ex vitro* acclimatization of plantlets. Photomicrographs showed various transitional stages. Seven relative stages of development were identified and described: seed, non-photosynthetic protocorm, photosynthetic protocorm, differentiated protocorm, plantlets with leaves, plantlets with leaves and roots, and plantlets with leaves and two roots, as well as two transitory phases: somatic embryogenic mass (SEM) and protocorm-like bodies (PLBs) obtained by indirect somatic embryogenesis. Stomatal leaf density doubled under *ex vitro* conditions. This study contributes to the knowledge of morphological development of *L. eyermaniana* during *in vitro* culture and *ex vitro* acclimatization.

Key words: acclimatization, morphology, orchids.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son plantas poco frecuentes y de difícil reproducción natural; los periodos para su establecimiento, desarrollo y floración, son largos, por lo menos de cinco años. Adicionalmente, son recolectadas para su comercialización sin control y todo ello las pone en riesgo de extinción. Es posible disminuir el tiempo de regeneración e incrementar las poblaciones a través de técnicas de propagación *in vitro*, para ello es elemental realizar estudios relacionados con su capacidad de germinación y regeneración, en donde la respuesta depende de la especie y de las condiciones de cultivo. En la literatura se ha reportado que después de la germinación se forma una masa de células denominada protocormo, el cual puede diferenciarse en plántula o formar cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) (Arditti y Ernst, 1993). El protocormo se diferencia en una región apical, que consiste en pequeñas células que forman el ápice de brote y la parte basal conformada por grandes células parenquimatosas que funciona como un depósito orgánico (Free *et al.*, 2003). En los primeros estados de desarrollo se presentan brotes de hojas y raíces adventicias. Por ejemplo, en *Aerides crispum*, se observaron estructuras globulares originadas en las capas subepidérmicas del protocormo, constituidas por células pequeñas, que después de desarrollarse forman una protrusión (Sheelavanthmath *et al.*, 2005). Los protocormos presentan alta totipotencialidad (Batygina *et al.*, 2003). En ensayos de propagación *in vitro* se han empleado diversas estructuras como explante, tal es el caso del meristemo apical de *Cymbidium*, ápices radicales en *Cattleya* (Kerbauy, 1991); de hoja en *Oncidium* Gower Ramsey (Chen *et al.*,

1999 y Chen *et al.*, 2002); protocormos en *Rhynchosstele bictoniensis* (Espinosa, 2004) y nudos de la rama floral de *Phalaenopsis* (Košir *et al.*, 2004). Las plántulas obtenidas *in vitro* realizan fotosíntesis, sin embargo, al transferirse a las condiciones *ex vitro* para su aclimatación, generalmente disminuye el desarrollo y rendimiento fotosintético, esto, debido a las condiciones particulares del cultivo *in vitro* como son alta humedad relativa, baja intensidad luminosa y baja concentración de CO₂ (Kadleček *et al.*, 2001). Tales condiciones dan lugar a plántulas morfológica, anatómica y fisiológicamente anormales (Pospisilova *et al.*, 1999), por ejemplo, en comparación con una planta en su ambiente natural, pueden presentar alta o baja densidad de estomas, aparato estomatal poco funcional y baja tasa fotosintética entre otras características. Para corregir estas anomalías se requiere de un periodo de aclimatación. *Laelia eyermaniana* Rchb. f., es endémica de México, se distribuye en la Sierra Madre Occidental y porción sur de la Planicie Central, es considerablemente apreciada en los estados donde se localiza: Chihuahua, Durango, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Querétaro, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (Espejo y López, 1997). Esto por las características arquitectónicas de la inflorescencia (20-100 cm de longitud, racimo de 3-12 flores, engrosamiento verde en el ápice de la superficie externa de los sépalos), color de sépalos y pétalos: rosa o lila y la fragancia delicada de sus flores (Halbinger y Soto, 1997). A pesar de su importancia comercial, hasta ahora no existen reportes sobre el cultivo *in vitro* de esta especie. Derivado de lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar los distintos estadios de desarrollo de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*, a través de una exploración

morfológica, que abarcó desde la formación del protocormo hasta la generación de planta y aclimatación de la misma.

MÉTODOS

Material vegetal, acondicionamiento y cultivo *in vitro*

Las cápsulas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. en madurez fisiológica (obtenidas de semillas donadas en proceso de germinación por el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del IB-UNAM y cultivadas y subcultivadas en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional, fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1%, posteriormente se extrajeron las semillas y fueron sembradas mediante el procedimiento descrito por Arditti y Ernst (1993). Para ello se utilizaron 30 ml de medio de cultivo basal MS (Espinosa *et al.*, 2010) al 50% de nutrimentos suplementado con 30 g•L⁻¹ de sacarosa, 8 g•L⁻¹ de agar como agente gelificante y 0.5 g•L⁻¹ de carbón activado; el pH del medio se ajustó a 5.8. Previo a su esterilización en autoclave (1.04 Kg•cm⁻² de presión durante 15 min), el medio se depositó en frascos de vidrio tipo “gerber”; se sembraron cuatro semillas por frasco. Las condiciones de incubación fueron: 25 ± 1°C de temperatura, fotoperiodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 46 μmol m⁻²s⁻¹ proveniente de lámparas fluorescentes de 74 W colocadas a 50 cm de altura.

Identificación y descripción estructural

Después de ocho meses de inducida la germinación, se hizo la identificación de los diferentes los estadios o fases de desarrollo, con base en las características morfológicas

de las estructuras regenerantes reportadas por varios autores (Batigny *et al.*, 2003; Litz *et al.*, 2004; Espinosa, 2004; Shimura y Koda, 2004; Santos *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2007). Para ello se hicieron observaciones en un microscopio estereoscópico (American Optical) provisto con zoom óptico de 1-10X. De igual manera se hicieron cortes histológicos los cuales se tiñeron con la técnica dicrómica safranina “O”-verde rápido FCF (Sandoval, 2006) y se montaron en resina sintética. Las observaciones se realizaron en un microscopio fotónico (Carl Zeiss Modelo Axioskop), provisto con una cámara digital. Con base en las fotomicrografías de cada estadio establecido, se identificaron y describieron diversas estructuras regenerantes tales como: *a*) protocormos no fotosintéticos, fotosintéticos y en diferenciación; *b*) plántulas: con hojas, con hojas y raíz, con hojas y dos raíces y *c*) las fases transitorias: masa embrionaria somática (MES) y PLBs.

Aclimatación de las plántulas

Las plántulas para aclimatación, se subcultivaron en el medio MS, hasta que presentaron dos o más hojas y raíces. Con base en los criterios sugeridos por Rawson y Gómez (2001), las plántulas se clasificaron en: grandes (mayores de 3 cm, con dos o más hojas y raíces), medianas (1.5 a 3 cm; 1 a 2 hojas y raíces) y pequeñas (menores 1.5 cm con una hoja y raíz). Posteriormente se transfirieron a macetas de plástico de 6.7 cm de altura y 6.0 cm de ancho, utilizando como sustrato fibra de palma soyate (*Brahea dulcis* (H.B.K.) (Francisco *et al.*, 2007). Las macetas se colocaron en charolas con domo transparente y se expusieron a un ambiente controlado [temperatura de 25 + 2°C, fotoperiodo de 16/8 hr. de oscuridad

y $46 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa (Quantum Meter Apogee Mod. QMSW-SS)]. Cada 15 días el domo se fue abriendo de manera paulatina hasta que las plántulas quedaron completamente expuestas, lo cual ocurrió a los 45 días. Permanecieron bajo las mismas condiciones hasta completar 90 días de cultivo. El porcentaje de supervivencia se obtuvo al multiplicar el número de plantas que sobrevivieron al final del periodo de aclimatación por 100, dividiendo el resultado entre el número inicial de plántulas sometidas a este proceso. Por otro lado, se cuantificó el número de estomas por mm^2 en la región abaxial y adaxial en hojas de plantas *in vitro*, y a los 90 días de aclimatadas.

RESULTADOS

Identificación y descripción estructural de los diferentes estadios

En la figura 1 se muestra una imagen de las semillas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. (primer estadio). Como se puede observar, éstas fueron ovoides alargadas, de color café amarillento opaco, la testa en forma de red (estriada) y de consistencia esponjosa; el embrión tenía una coloración café verdoso al centro y el pedicelo con el que se adhiere a la placenta (suspensor) era corto; las semillas presentaron germinación sincrónica (estadios simultáneos) (Litz *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2007).

Durante la germinación se observó un hinchamiento del embrión, el cual se separó de la testa para formar una estructura globular compacta y translúcida (Fig. 2A) conformada por células con contenidos celulares indeterminados. La porción apical corresponde al meristemo del embrión y la porción basal a la que origina los rizoides

(Free *et al.*, 2003). En la figura 2B se observa la morfología de las células la capa uniestratificada de la epidermis.

Los protocormos translúcidos, cambiaron a una forma cónico-esférica de tonalidad verde y verde amarillento (Fig. 2C). La coloración en la epidermis del protocormo indica la presencia de clorofila y por lo tanto de cloroplastos. En el ápice se observaron células meristemáticas y en la base del protocormo, células con abundantes contenidos indeterminados y de mayor tamaño que las del ápice (Fig. 2D); además de presentar rizoides de un tamaño aproximado a un 1 mm (identificado como tercer estadio).

En el cuarto estadio, los protocormos continuaron diferenciándose (Fig. 2E y 2F); se observan los primordios foliares en la región apical.

En el quinto estadio (Fig. 2G); el protocormo se convirtió en una plántula de 0.5 y 1 cm de longitud, con una base globosa, dos hojas en desarrollo y rizoides. En los cortes histológicos se observó la formación del brote. (Fig. 2H).

El sexto estadio se caracterizó por presentar estructuras típicas de una planta: raíces de 1 a 2 cm, apegaminadas, inicialmente envainantes, con tres a cuatro estructuras foliares de 0.5 cm de largo. La raíz fue de rápido crecimiento (aproximadamente 0.04 cm/día) comparado con el de las hojas. Su color fue blanquecino, aérea (geotropismo negativo), de aspecto esponjoso, raramente penetraba al medio de cultivo y de mayor tamaño que el cormo de la planta (Fig. 2I y 2J). Se observó un mayor número de hojas diferenciadas y la presencia de estomas. En

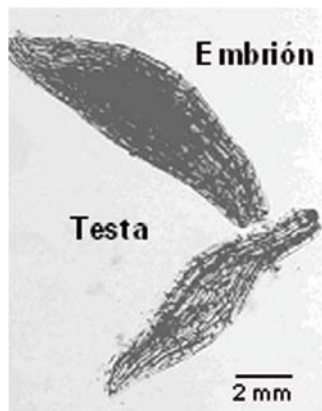


Fig. 1. Fotomicrografía de la semilla de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. (primer estadio).

el séptimo estadio, se desarrolló la segunda raíz y las plantas se consideraron aptas para su traslado a condiciones *ex vitro* (Figs. 2K y 2L), ya que de acuerdo a lo señalado por Steeves y Sussex, (1989), en este estadio son organismos funcionales.

Algunos de los protocormos en crecimiento formaron cúmulos de masa callosa amorfa en un periodo de 15 días, a los que se les denominó masa embrionaria somática (MES), (Batygina *et al.*, 2003; Shimura y Koda, 2004). Su forma fue irregular, fácilmente disgregables y de color verde-amarillento a blanquecino (Fig. 2M). Con base en los cortes histológicos de *L. eyermaniana*, se observó que la MES se caracterizó por grandes células asimétricas, seguida de una inmediata organización (30 días) y formación de múltiples regiones o brotes meristemáticos (Fig. 2N). Posteriormente esta masa callosa dio lugar a la formación de cuerpos parecidos a protocormos (PLBs), (Figs. 2O y 2P).

Aclimatación

La supervivencia *ex vitro* en fibra de palma soyate, a los 90 días de haber iniciado el proceso de aclimatación fue en promedio de 46.9%, obteniéndose un valor más alto con plantas grandes. El mayor porcentaje de mortalidad, ocurrió entre los 60 y 90 días, principalmente en plántulas pequeñas (21.87) y medianas (31.25). Por otra parte, la densidad de estomas en la región abaxial en hojas de 90 días de aclimatación se duplicó, pasando de 56 (Fig. 3A) a 103 por mm² (Fig. 3B); mientras que en la adaxial tanto de plantas *in vitro*, como de aclimatadas fue muy baja (un promedio de 2.5 por mm²).

DISCUSIÓN

Al observarse esta región con luz polarizada (imágenes no presentadas) se identificaron gránulos de almidón que presentaron una coloración azulosa característica, así como la cruz de Malta. Estas particularidades

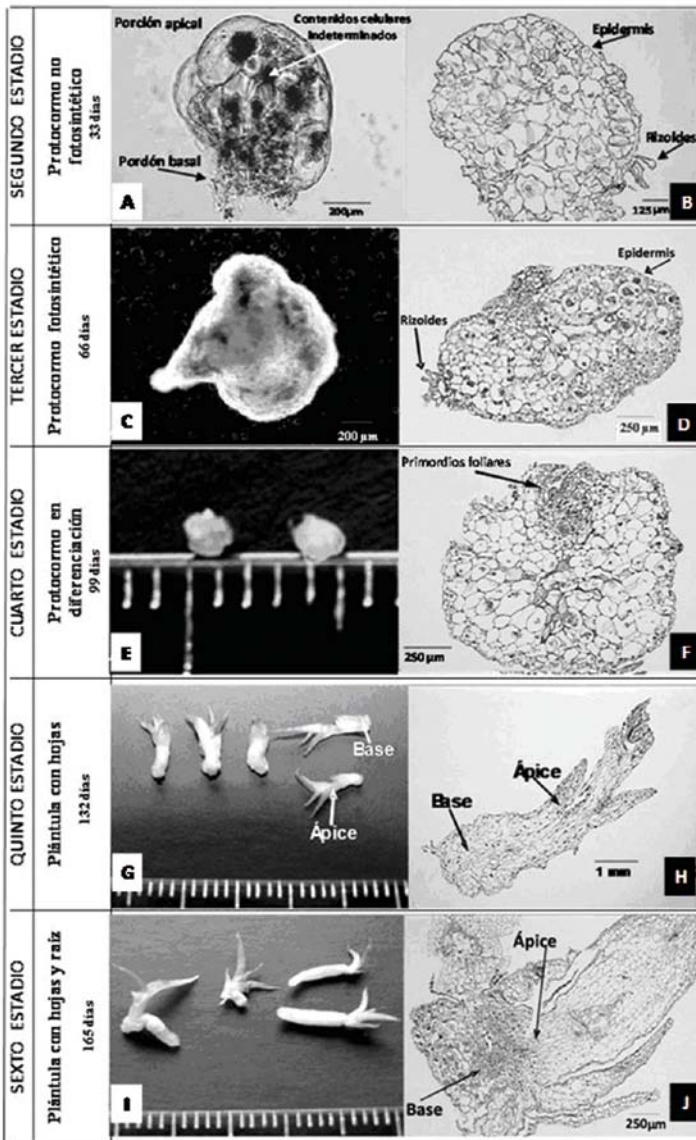


Fig. 2. Fotomicrografías de los estadios: segundo al sexto en la germinación de *Laelia eyermaniana* Rchb. F; (A, C, E, G y I) observación del espécimen completo con microscopio estereoscópico; (B, D, F, H y J) observación del corte histológico con microscopio óptico.

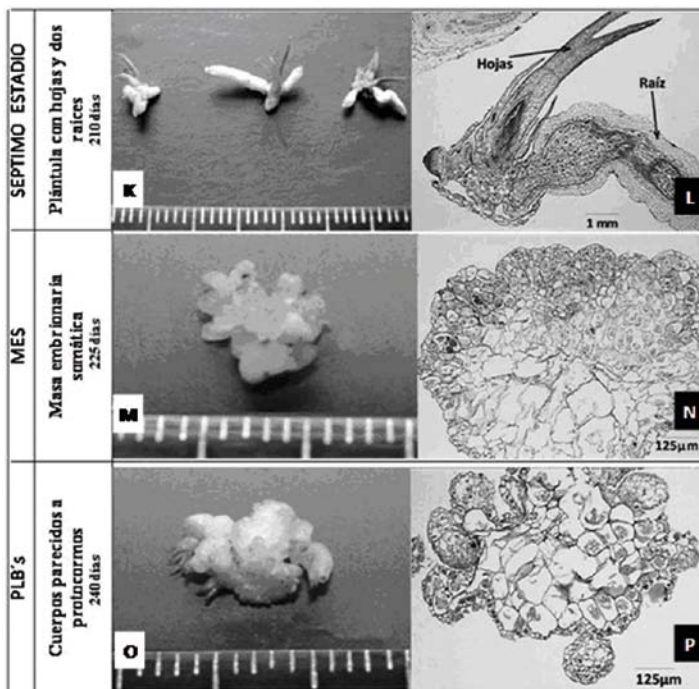


Fig. 2 (cont.). Fotomicrografías de los estadios: séptimo en la germinación, MES y PLBs de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. (K, M y O) observación del espécimen completo con microscopio estereoscópico; (L, N y P) observación del corte histológico con microscopio óptico. A partir del segundo hasta el séptimo estadio, el ciclo tarda aproximadamente 210 días con diferencias entre 30 y 35 días para cada uno de los ciclos. Los estadios MEB y PLBs se repitieron de manera cíclica, en periodos de uno a dos meses.

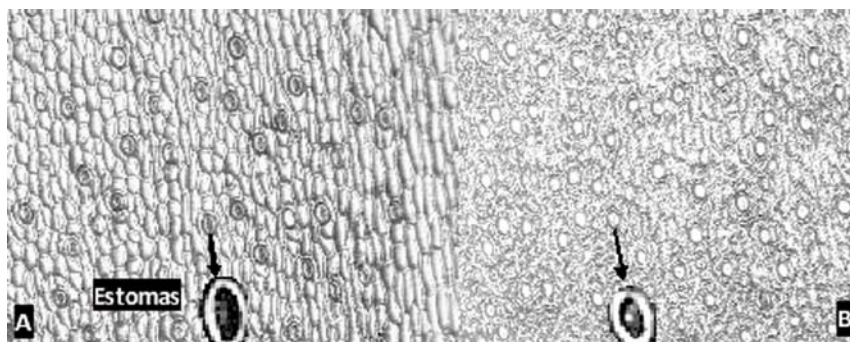


Fig. 3. Fotomicrografías de la región abaxial de las hojas de *L. eyermaniana*: (A) cultivada *in vitro* y (B) después de 90 días de aclimatación.

coincidieron con lo reportado por Batygina *et al.* (2003) para diversas orquídeas. Tales autores observaron que la región apical está conformada principalmente por células pequeñas, las cuales darán lugar a la formación del ápice del brote; mientras que la parte basal está formada por grandes células parenquimatosas que dan lugar a las estructuras rizoidales y que tienen la función de un “depósito orgánico”.

Cabe señalar que en *Dactylorhiza maculata*, los protocormos se reportaron como pequeñas protuberancias (Batygina *et al.*, 2003).

En la fase transitoria del primer subcultivo de explantes de MES en medio MS sin reguladores del crecimiento (Fig. 2O) se observó que en el 20% de los explantes, la formación de cuerpos globosos provenientes del protocormo tardó ocho semanas; éstos se diferenciaron en un ápice y una base (Fig. 2P) o protocormos parecidos a embriones somáticos (origen no cigótico) (Kobayashi *et al.*, 2001) y que se han denominado como PLBs; característica que coincidió con lo reportado por otros autores (Chávez y Litz, 1992; Arditti y Ernst, 1993; Batygina *et al.*, 2003 y Litz *et al.*, 2004). Posteriormente cada región meristemática de los PLBs, formaron plántulas o más PLBs y no MES; particularidad que evidenció una masa embriogénica somática. Cabe señalar que en la propagación vegetativa intensiva de orquídeas con alto valor comercial, los PLBs son los explantes de mayor demanda debido a su rápido desarrollo *in vitro*; además de que con ellos, se tiene la certeza de la semejanza fenotípica con los progenitores (Sagawa, 1991).

De esta manera, los protocormos tienen la capacidad de transitar del segundo al tercer estadio o bien de diferenciarse en plántula. La MES se presentó de manera temporal. Batygina *et al.* (2003) reportaron resultados semejantes para *Dactylorhiza maculata*; quienes observaron un estado transitorio entre protocormo y plántula, conformado básicamente por masa callosa.

Se sabe que las orquídeas como *L. eyermaniana* son plantas que presentan metabolismo del ácido crasuláceo (CAM) y por lo tanto, cuentan con estructuras anatómica y fisiológicamente adaptadas a ambientes epifitos que tienen por objeto, reducir la pérdida de agua. Entre ellas destacan hojas con una baja relación entre superficie de transpiración-volumen de agua ocluida, cutículas gruesas, células grandes profusamente vacuoladas y con una gran capacidad de turgencia, así como una reducción del tamaño y/o número estomatal (Cushman, 2001). Como consecuencia, diferentes órganos tales como las hojas y el pseudobulbo, les permiten almacenar una mayor cantidad de agua durante los primeros días de desarrollo (Santos *et al.*, 2005). Por otra parte, la función principal de los estomas es la de regular el intercambio gaseoso y con ello, evitar la excesiva pérdida de agua (Fan *et al.*, 2004). En este caso las hojas de *L. eyermaniana* en condiciones de aclimatación, a pesar de haber diferenciado un mayor número de estomas, el tamaño de éstos se vio reducido (Figs. 3A y 3B) probablemente como respuesta al cambio en las condiciones ambientales (estrés abiótico), a pesar de que el acondicionamiento se realizó de manera gradual (Pospíšilova *et al.*, 1999). En este sentido, será interesante realizar estudios morfométricos para esta especie tanto de la cutícula y de la

superficie de transevaporación (Kadleček *et al.*, 2001), como del tamaño celular y su organización (Cushman, 2001; Litz *et al.*, 2004). Por otra parte, se observó que las plantas pequeñas murieron a diferencia de las grandes, probablemente por no presentar un pseudobulbo desarrollado y por lo tanto, no tener la posibilidad de acumular agua en cantidades suficientes como para lograr su sobrevivencia.

Estos resultados en conjunto, sugieren que las plantas de *L. eyermaniana* micropropagadas deberán colocarse por lo menos 60 días en un ambiente controlado. Así también, el proceso de aclimatación tendrá una mayor probabilidad de llevarse a cabo exitosamente cuando las plantas tengan un tamaño superior a 3 cm, cuenten con un mayor número de hojas y de raíces (más de cuatro) y con pseudobulbos más conspicuos; con ello se estaría asegurando el contenido de humedad necesario para lograr su adecuado desarrollo. Durante la aclimatación, las raíces crecieron entrelazadas y se dañaban o rompían fácilmente, debido a que en su mayoría fueron aéreas; por lo que se optó colocarlas en cúmulos de plántulas (3-6) por maceta obteniéndose un total de 150 plantas. Se clasificaron como: grandes, medianas y pequeñas.

El pH del sustrato se mantuvo en 7.5, sin embargo, a los 90 días se observó una ligera disminución de éste (en promedio 0.5 unidades) posiblemente debido a la degradación del sustrato y la liberación de compuestos que son producto de su descomposición (Aguilera, 1989).

Al presentar estomas en ambas regiones laminares se definen como plantas anfistomáticas.

CONCLUSIONES

Se logró la propagación *in vitro* de la orquídea silvestre *Laelia eyermaniana* Rchb. f. mediante la germinación de semillas y a través de PLBs. El desarrollo morfológico desde su germinación hasta la formación de plantas, presentó siete fases regenerantes claramente definidas. La aclimatación de las plantas se logró a los 60 días de exposición a un ambiente controlado en ejemplares de tamaño grande, que presentaron pseudobulbo, y de dos a cuatro hojas y raíces desarrolladas. Las condiciones ambientales predominantes durante la adaptación a las condiciones *ex vitro*, indujeron la duplicación de la densidad estomatal.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo financiero al proyecto SIP20070099 y al CONACYT por la beca otorgada a los estudiantes.

LITERATURA CITADA

- Aguilera, H. N., 1989. *Tratado de Edafología*. Tomo 1, Facultad de Ciencias UNAM; México, pp. 95.
- Arditti, J. y Ernst R., 1993. *Micropropagation of Orchids*. John Wiley & sons, Inc. New York, USA, pp. 37-38, 55-57.
- Batygina, T.B.; Bragina E.A. y Vasilyeva V.E. 2003. "The reproductive system and germination in orchids". *Acta Biologica Cracoviensia*; Series Botánica, **45**(2); 21-34.

- Chávez, V.M y Litz, R.E., 1992. "Somatic Embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **30**: 99-105.
- Chen, J.T.; Chang C. y Chang, W.C., 1999. "Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration". *Plant Cell Reports*, **19**: 143-149.
- Chen, J.T.; Chang C., 2002. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on somatic embryogenesis in *Oncidium "Gower Ramsey"*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **69**: 41-44.
- Cushman, J.C., 2001; Crassulacean Acid Metabolism. "A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Enviroments". *Plant Physiology*, **127**: 1439-1448.
- Espejo, S.A.y López F.A.R., 1997; Las monocotiledóneas Mexicanas, una sinopsis florística, Parte VII, "Orchidaceae 1"; Consejo Nacional de la Flora de México A.C., UAMCONABIO México; pp. 74.
- Espinosa, G.A.M., 2004. "Proliferación de *Rhynchostele bictoniens* (*Orchidaceae*) a partir de semillas y explante material cultivado in vitro". FES-Iztacala. México; pp.
- Espinosa, H.E.L., Cerda A.L., González J.M. y Buzzy, N.Z., 2010. "A protocol of somatic embryogenesis for the *in vitro* regeneration and characterization of *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*". *Revista Fitotecnica Mexicana*, **33**(4); 323-332.
- Fan, L.M., Zhao Z. y Assmann, S.M., 2004. "Guard cells: a dynamic signaling model". *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 537-546.
- Francisco, N.J.J., Chávez Ávila V.M., Escamilla Olivera A. y Evangelista Lozano S.. 2007. "Aclimatización *ex vitro* de plántulas de *Laelia eyermaniana* Rchb.F., 53va. Reunión de la Sociedad Interamericana para la Horticultura Tropical. Morelia Michoacán, México; p 65.
- Free, A.; Pasternak T.P. y Dudits D., 2003. "Transition of somatic plant cell to an embryogenic state". *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, **74**: 202-228.
- Halbinger, F. y Soto, M., 1997; "Laelias of México; Orquídea (Méx.)". *Revista del Herbario AMO*, **15**: 104-108.
- Kadleček, P.; Tichá I.; Haisel D.Č.V. y Schäfer C., 2001. "Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth". *Plant Science*, **161**: 695-701.
- Kerbaui, G.B., 1991. "In vitro conversion of *Cattleya* Root Tip Cells into Protocorm-like Bodies". *J. Plant Physiol*, **138**: 248 -251.
- Kobayashi, T.; Higashi K. y Kamada H., 2001. "Stimulatory and Inhibitory Conditioning Factors that Regulate Cell Proliferation and Morphogenesis in Plant Cell Cultures Review". *Plant Biotechnology*, **18**(2): 93-99.
- Košir, A., 2004. *Microcodium* revisited: root calcification products of terrestrial

- plants on carbonate-rich substrates; *Journal of Sedimentary Research*, **74**; 845-857.
- Litz, R.E., Moon P.A., Benson E.M., Stewart J. y Chávez V.M., 2004. "A Biotechnology Strategy for Medium- and Long-Term Conservation of Cycads. *The Botanical Review*, **70**(1); 38-46.
- Litz, R.E., Moon P.A. y Chávez V.M., 2005. *Somatic Embriogénesis and regeneration of Endangered Cycad Species*; Proc. IInd IS on Biotech.of Trop & Subtrop. Species; Eds. W: C: Chang y R. Drew, *Acta Hort*, **692**, ISHS, pp 75-79.
- Pospíšilová, J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D. y Plzáková, Š. 1999, "Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions". *Biología Plantarum*, **42**(4); 481-497.
- Rawson, M.H. y Gómez M.H., 2001. "Trigo regado" Sección 3. *Evaluación y medición del cultivo*. Organización de Las Naciones Unidas y la Alimentación. FAO. Roma.
- Sagawa, Y., 1991. "Clonal Propagation of Orchids". *Plant Tissue Culture Manual*, **1**: 1-7.
- Sandoval, Z.E., 2005. *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Cuadernos 38. Instituto de Biología. UNAM. México; pp. 35-36, 39, 53-60, 70, 91, 95, 97, 109-111.
- Santos, H.L.; Martínez G.M.; Campos J.E. y Aguirre L.E., 2005. "In vitro propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in México". *Hort. Science.*, **40**(2): 439-442.
- Sheelavanthmath, S.S., Murthy H.N., Hema B.P., Hahn E.J., y Paek K.Y., 2005. "High frequency of protocormo like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocormo and leaf sections of *Aerides crispum*". *Scientia Horticulturae*, **106**: 395-401.
- Shimura, H. y Koda, Y., 2004. "Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **78**: 273-276.
- Steeves, T.A. y Sussex, I.M., 1989. *Patterns in plant development*. Cambridge University Press. First published. N. Y. USA, pp. 1-3, 20, 22, 30, 46, 100, 255.
- Suárez, Q.I., Sandoval Z.E., Hernández A.M. y Chávez, A.V.M., 2007. "Determinación histológica de regenerantes de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (Orchidaceae) obtenidos a partir de protocolos cultivados *in vitro*". *Lankesteriana*, **7**(1-2): 394-39.