

**Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.)  
W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México**

***In vitro* propagation of orchid *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.)  
W. E. Higgins native of Durango State, Mexico**

Tania Lizeth Cazarez Favela<sup>1\*</sup>, José de Jesús Graciano Luna<sup>2</sup>, Santiago Solís González<sup>2</sup>, Beatriz Díaz Ramírez<sup>2</sup>, Juan Abel Nájera Luna<sup>2</sup>, José Bernardo Montoya Ayón<sup>3</sup>

Cazarez Favela, T. L., Graciano Luna, J. J., Solís González, S., Díaz Ramírez, B., Nájera Luna, J. A., Montoya Ayón, J. B. Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Número 67: 19-25, enero-abril 2016.

## RESUMEN

*Prosthechea citrina* es una orquídea sujeta a protección especial debido a que presenta diversas problemáticas en su hábitat natural que inciden negativamente en su viabilidad biológica, como son el deterioro y la modificación de su entorno y la extracción de plantas. Por ello, la aplicación de técnicas o metodologías que permitan la propagación masiva de una forma rápida y eficiente de la especie proporciona una herramienta para aumentar su productividad sin afectar el entorno natural y su conservación. En el presente estudio se reporta la propagación masiva de *P. citrina in vitro*, esto mediante protocormos así cultivados en medio Murashige y Skoog (1962) MS con reguladores de crecimiento vegetal. La eficiencia observada en nuevos brotes fue de 6.75 por explante, no hubo diferencias significativas en número de hojas y raíces, la longitud máxima de hoja fue de 20.6 mm y la de raíces fue de 38.27 mm. En aclimatación se observó una supervivencia de 85%.

**Palabras clave:** organogénesis, propagación, orquídeas, enraizamiento y elongación.

**Keywords:** organogenesis, micropropagation, orchid, rooting elongation.

Recibido: 9 de septiembre de 2014, aceptado: 4 de septiembre de 2015

<sup>1</sup> Programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo Forestal Sustentable, Instituto Tecnológico de El Salto.

<sup>2</sup> División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de El Salto.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana.

\* Autor para correspondencia: tanielcf@hotmail.com

## ABSTRACT

*Prosthechea citrina* is an orchid which is in special protection due to different problems in its natural habitat that negatively affect its biological viability, like deterioration and modification of its environment and the removal of trees for timber. Thus, the application of techniques or methodologies that allows mass propagation in a fast and efficient way, provides a tool to increase its productivity without affecting the natural environment and its conservation. In the present study it is reported that mass propagation *in vitro* of *P. citrina*, through *in vitro* protocorms cultured in Murashige and Skoog (1962) MS medium with plant growth regulators. The new sprout efficiency observed was 6.75 per explant. There was no significant difference in the number of leaves and roots. The maximum leaf length was 20.6 mm and in roots it was 38.27 mm. Finally, an 85% survival was observed in acclimatization.

## INTRODUCCIÓN

Los bosques de neblina y las selvas tropicales húmedas del sur de México son los ecosistemas más favorables para la existencia de orquídeas, ya que estas se distribuyen en gran parte del territorio nacional con excepción de zonas de aridez extrema (Hágsater et al., 2005). Las áreas compuestas de complejos montañosos caracterizadas por una evidente sequía estacional albergan una diversidad moderada de especies donde predominan las terrestres, a diferencia de zonas más cálidas y húmedas donde son más comunes las especies epífitas (Salazar Chávez, 2009); dentro de estas se encuen-

tra *Prosthechea citrina*, una de las orquídeas más admiradas en México por su aroma, belleza y valor comercial.

Estas cualidades han favorecido la extracción masiva de individuos de las poblaciones silvestres que presentan bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos, lo que aunado a la modificación y deterioro de su hábitat natural ha contribuido a que esta especie se encuentre bajo la categoría de Protección especial (Pr) dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010). La condición de sus hábitats es muy variable a lo largo de su distribución, ya que hay zonas frecuentemente muy degradadas, con árboles forófitos aislados rodeados de bosquetes secundarios, zonas agrícolas, represas y asentamientos humanos; mientras que en otras regiones en general sus hábitats parecen estar bien conservados, aunque muchos sitios muestran signos de extracción importante de madera, que podría modificar las condiciones microclimáticas necesarias para el establecimiento de esta epífita (Soto Arenas y Solano Gómez, 2007).

La importancia del estudio de las orquídeas en su hábitat natural radica en el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales que exige la aplicación de técnicas o metodologías que permitan aumentar la productividad sin afectar el entorno natural (Salazar Chávez, 1996). Sin embargo, en el estado de Durango aún hace falta la realización de estudios orquídeológicos que indiquen la situación actual de la distribución ecológica, así como de las condiciones de las zonas donde habitan estas plantas.

Dada la importancia ornamental y comercial de las orquídeas se han desarrollado diversos métodos de propagación, tanto sexual (a través de semillas) como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos (explantes) (Ávila Díaz y Salgado Garciglia, 2006). Una técnica eficaz es el cultivo de tejidos vegetales, considerada una herramienta biotecnológica para la propagación de especies amenazadas, debido a que permite obtener altas tasas de multiplicación a partir de un explante inicial, ya que por semillas o por métodos asexuales, es poco eficiente su reproducción (Pence, 2011).

Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es el sistema más eficiente, si se considera la eficiencia como el

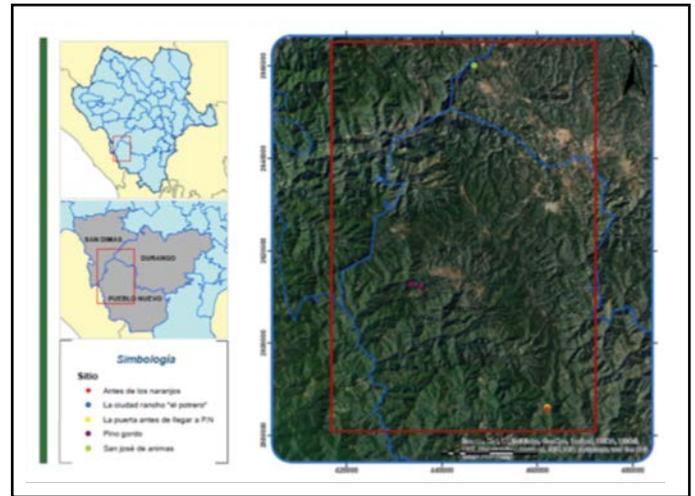


Figura 1. Localización del área de estudio de *P. citrina*.

número de plantas regeneradas por unidad de tiempo. Mediante este sistema se pueden obtener cantidades virtualmente ilimitadas de plantas, ya que todo supone que por cada célula suspendida en el medio de cultivo se está diferenciando una planta (Roca y Mroginski, 1991). Por tanto, el objetivo del presente estudio fue la propagación masiva *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* como alternativa para la conservación biológica de esta especie, para contribuir al manejo sustentable de recursos naturales forestales no maderables.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

La zona en donde se realizó la colecta del presente estudio se denomina "La puerta", ubicada en el municipio de Pueblo Nuevo, Durango; el cual presenta un clima templado subhúmedo, con un tipo de suelo litosol de tipo calcáreo con textura media, la fisiografía se da en la sierra alta con cañadas. El tipo de geología de esta zona es un área que presenta afloramientos de rocas ígneas, extrusivas, predominando las ácidas del tipo asociación riolita-toba ácida del terciario superior y su vegetación es bosque de pino-encino con una pendiente de 9% (Figura 1) (González et al., 2005).

### Material biológico

El estudio se realizó durante dos años consecutivos con la orquídea *P. citrina*, el material biológico original fueron semillas maduras de flores fecundadas (Figura 2 a y b) establecidas *in vitro* (material vegetal aséptico). Inició con protocormos *in vitro* (Figura



**Figura 2.** Orquídea nativa de la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango. a) Planta completa de *P. citrina*; b) Flor fecundada de *P. citrina*; c) Protocormos *in vitro* en medio MS al 30%. Imagen de José Bernardo Montoya Ayón.

2c) en el laboratorio de biotecnología vegetal del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana (ITVG), ubicado en el Ejido Villa Montemorelos del municipio de Victoria de Durango, con domicilio en carretera Durango-México km 22.5.

#### Medio de cultivo y reguladores de crecimiento

Se empleó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 2 g l<sup>-1</sup> de Phytigel, el pH se ajustó a 5.70 ± 0.01. Se utilizaron los reguladores de crecimiento vegetal 6-bencil-aminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA), resultando la combinación BAP/ANA en concentraciones de 1.0–0.1 a 3.0–0.3 mg l<sup>-1</sup> para organogénesis y para enraizamiento la combinación ANA/BAP, en concentraciones de 1.0–0.1 a 3.0–0.3 mg l<sup>-1</sup>. Se utilizaron frascos tipo Gerber® de 100 (ml) a los cuales se agregaron 20 ml del medio de cultivo. Estos se esterilizaron a 120 °C, 15 psi por 20 min.

#### Siembra del material vegetal en el medio de cultivo

Los protocormos completos fueron establecidos en el medio para organogénesis en diferentes concentraciones de BAP/ANA (1.0–0.1 a 3.0–0.3 mg l<sup>-1</sup>) colocando cuatro explantes por frasco, se sellaron con Parafilm™ y se etiquetaron con fecha de siembra y nombre de la especie de orquídea.

Después de cuatro meses, estos fueron subcultivados al medio para enraizamiento siguiendo el mismo proceso para organogénesis.

#### Condiciones del cultivo

El cultivo se llevó al área de crecimiento, se ordenó linealmente por tratamiento. Se mantuvieron en condiciones controladas durante un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/obscuridad) con luz fluorescente a una irradiancia de 54 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con humedad relativa de 80% y una temperatura de 27 ± 2 °C, durante un periodo de cuatro meses en cada una de las etapas.

#### Aclimatación

Se realizó a través de una selección de plantas con una altura entre 35 y 80 mm, estas fueron retiradas del frasco y sus raíces se enjuagaron con agua de la llave para eliminar los restos del medio de cultivo. Cada plántula se trasplantó a vasos de plástico transparentes perforados con tapa con una capacidad de 349 ml que contenían mezclas de tres diferentes sustratos constituidos por: corteza de pino, perlita, tezontle, estípote de palma, zeolita, corteza de encino y carbón (1:1:1) (Tabla 1), con 70% de humedad relativa. Se siguió el proceso de aclimatación con disminución paulatina de la humedad

**Tabla 1.** Sustratos para aclimatación de *Prosthechea citrina*

Mezclas de sustratos	Relación	Repeticiones
S <sub>1</sub> = corteza de pino + perlita + tezontle + carbón	1:1:1:1	20
S <sub>2</sub> = Estípote de palma + zeolita + carbón	1:1:1	20
S <sub>3</sub> = Corteza de encino + tezontle + carbón	1:1:1	20

**Tabla 2.** Combinaciones de reguladores de crecimiento en medio MS (1962) para inducir brotación y enraizamiento

Brotación			Repeticiones	Enraizamiento			Repeticiones
Tratamientos	BAP mg L <sup>-1</sup>	ANA mg L <sup>-1</sup>		Tratamiento	ANA mg L <sup>-1</sup>	BAP mg L <sup>-1</sup>	
B <sub>1</sub>	1.0	0.1	5	E <sub>1</sub>	1.0	0.1	6
B <sub>2</sub>	1.5	0.15	5	E <sub>2</sub>	1.5	0.15	6
B <sub>3</sub>	2.0	0.2	5	E <sub>3</sub>	2.0	0.2	6
B <sub>4</sub>	2.5	0.25	5	E <sub>4</sub>	2.5	0.25	6
B <sub>5</sub>	3.0	0.3	5	E <sub>5</sub>	3.0	0.3	6

relativa, que consiste en abrir la tapa poco a poco (una hora diaria) por espacio de 15 días posteriores al trasplante. Durante este periodo se realizaron riegos con pulverizaciones de agua cada tercer día.

#### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con cinco tratamientos (medio de cultivo MS con reguladores de crecimiento vegetal BAP/ANA en concentraciones de 1.0 a 3.0 y 0.1 a 0.3 mg L<sup>-1</sup>) con cinco repeticiones para brotación, se utilizaron las mismas concentraciones de ANA/BAP 1.0 a 3.0 y 0.1 a 0.3 mg L<sup>-1</sup>) con seis repeticiones (frascos) por cada tratamiento para enraizamiento. Esto hizo un total de 25 y 30 frascos o unidades experimentales (Tabla 2). Las variables a evaluar en la respuesta de organogénesis, enraizamiento y elongación fueron el número de brotes, hojas y raíces, tamaño de hojas y raíces; estas fueron analizadas en el programa estadístico InfoStat versión 2008 en el paquete de diseños experimentales. La comparación de medias se realizó con la prueba de Duncan con una  $P > 0.05$ .

## RESULTADOS

#### Iniciación y multiplicación de brotes

En la fase de organogénesis se observó que al agregar BAP al medio de cultivo en concentraciones de 1.0 a 3.0 mg L<sup>-1</sup> se logra el proceso de brotación. Se obtuvo un promedio de 6.75 brotes por explante en la concentración BAP 1.5/ ANA 0.15 mg L<sup>-1</sup>, la que resultó ser estadísticamente diferente a los demás tratamientos. En lo que respecta a las variables número de hojas y raíces no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, se evaluaron las variables de forma individual en la combinación BAP/ANA (Tabla 3).

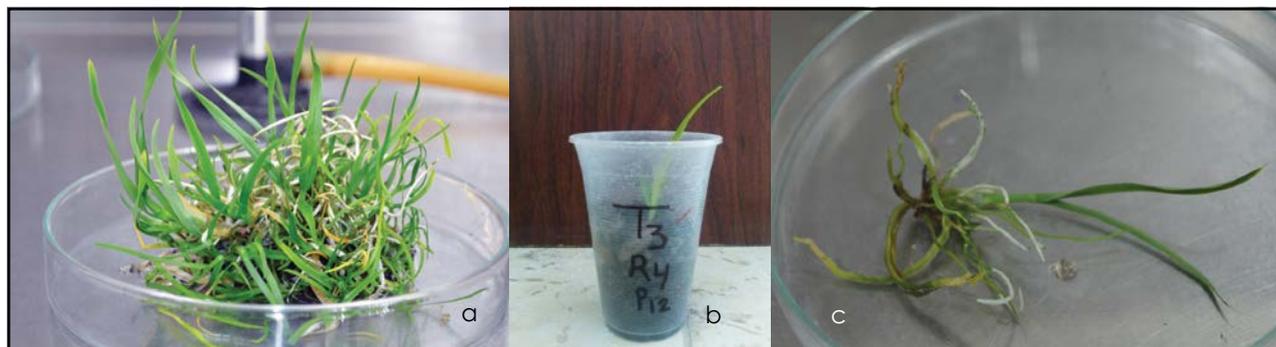
**Tabla 3.** Numero de brotes (organogénesis) de protocormos en *P. citrina*

Tratamiento mg L <sup>-1</sup>	Organogénesis	Desviación Estándar
<b>Número de brotes (n)</b>		
BAP 1.5 ANA 0.15	6.75 a	2.66
BAP 3.0 ANA 0.3	5.8 a b	2.26
BAP 2.0 ANA 0.2	5.7 a b	1.97
BAP 1.0 ANA 0.1	3.9 a b	1.67
BAP 2.5 ANA 0.25	3.65 b	1.93
<b>Número de hojas (n)</b>		
BAP 1.5 ANA 0.15	4.38 a	0.68
BAP 3.0 ANA 0.3	4.16 a	0.61
BAP 2.5 ANA 0.25	4.0 a	0.4
BAP 2.0 ANA 0.2	3.84 a	0.53
BAP 1.0 ANA 0.1	3.78 a	0.15
<b>Número de raíces (n)</b>		
BAP 1.0 ANA 0.1	1.76 a	0.33
BAP 1.5 ANA 0.15	1.5 a	0.5
BAP 3.0 ANA 0.3	1.22 a	0.9
BAP 2.0 ANA 0.2	1.22 a	0.7
BAP 2.5 ANA 0.25	0.88 a	1.22

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, Duncan  $\alpha = 0.05$ .

#### Elongación y enraizamiento

En la Tabla 4 se muestran los resultados de elongación y enraizamiento, muestran mayor longitud hojas y raíces en la concentración ANA 3.0 /BAP 0.3 mg L<sup>-1</sup>, se obtuvieron plántulas con un promedio de longitud máxima en hojas de 20.6 mm y en raíces de 38.27 mm. La adición de BAP en bajas concentraciones



**Figura 3.** Aclimatación de *P. citrina* en invernadero. a) Brotes generados *in vitro* en MS; b) Aclimatación en sustrato; c) Planta aclimatada. Imagen de José Bernardo Montoya Ayón.

0.1 a 0.3 mg l<sup>-1</sup> promovió el desarrollo en esta planta y permitió que los brotes experimentaran incrementos en las variables, tamaño de hojas y raíces.

**Tabla 4.** Elongación y enraizamiento en brotes de *P. citrina*

Tratamiento mg L <sup>-1</sup>	Enraizamiento	Desviación Estandar
<b>Longitud de hojas (mm)</b>		
ANA 3.0 BAP 0.3	20.6 a	3.94
ANA 1.0 BAP 0.1	15.44 a b	2.65
ANA 2.0 BAP 0.2	12.95 b	5.72
ANA 1.5 BAP 0.15	10.81 b	5.5
ANA 2.5 BAP 0.25	10.67 b	2.96
<b>Longitud de raíces (mm)</b>		
ANA 3.0 BAP 0.3	38.27 a	1.48
ANA 2.5 BAP 0.25	33.03 ab	8.69
ANA 1.5 BAP 0.15	24.58 b c	7.26
ANA 2.0 BAP 0.2	22.83 b c	8.31
ANA 1.0 BAP 0.1	21.99 c	4.28

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, Duncan  $\alpha=0.05$ .

### Aclimatación de plantas

A los 30 días se obtuvo la aclimatación de las plántulas y se encontró que el mejor sustrato fue el S3 (1:1:1 corteza de encino, tezontle y carbón) con 85% de plántulas, las cuales mostraron nuevos brotes y raíces, en el caso del S<sub>1</sub> y del S<sub>2</sub> se observó que a los pocos días de su aclimatación las plantas empezaron a morir, ya que el S<sub>1</sub> fue el menos apto para la especie y el S<sub>2</sub> no tenía muy buen drenado (Figura 3).

## DISCUSIÓN

El medio MS es ampliamente utilizado para diversas especies de orquídeas en diferentes proporciones y suplementado con reguladores de crecimiento vegetal y otras sustancias como el agua de coco, ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), tidiazuron (TDZ), etcétera, con lo que se han obtenido resultados favorables. Así sucedió en el presente estudio con *P. citrina*, en el cual se obtuvo un promedio de 6.75 brotes por explante a partir de protocormos *in vitro*. En el caso del estudio de Suárez Quijada et al. (2007), en el que se propagaron plantas *in vitro* de *Euchile mariae*, con medio de cultivo MS y BAP/ANA adicionado para obtener brotes o *protocorm-like body* (PLB) con un promedio de 11.00 ± 9.55 PLB por explante, se observó que la adición de BAP tiene una mayor influencia que ANA.

Coello et al. (2010) reportaron un promedio de 10.6 brotes por explante en el medio de cultivo MS con la orquídea *Guarianthe skinneri*. Pérez Molphe Balch et al. (1999) mencionan que la organogénesis indirecta es cuando primero se forma un tejido calloso y partir de este se forman los órganos (hojas, raíz y cormos). En el estudio de Sarabia Ochoa et al. (2010) reportan que la adición de ANA/BAP para producir brotes en el medio MS y concentraciones de 2.5 para ANA y 1.0 en BAP proporcionó una medida de 0.7 mm en PLB para *Laelia speciosa*.

Se observó que en los tres estudios antes mencionados se obtuvieron resultados mayores al presente trabajo al agregar compuestos orgánicos al medio, ya que estos proporcionan respuestas favorables; mientras que con la adición de reguladores de crecimiento vegetal como las auxinas y citoquininas la respuesta depende de la concentración añadida

al medio. En el caso del número de hojas y raíces no se observaron diferencias entre las concentraciones de los reguladores vegetales.

Pierik (1990) menciona que la rizogénesis es la inducción de raíz y a la vez se presenta el crecimiento de la planta conocida también por elongación. Se observó un efecto positivo en el tamaño de las hojas y raíces de acuerdo a la concentración de reguladores de crecimiento vegetal en el medio MS con respecto a este trabajo, se tuvo un promedio de longitud de hojas de 2.06 cm; en la investigación de Cadavid Correa y Salazar Andrade (2008) se reporta un promedio de 2.26 cm de longitud de hojas en el medio MS en la orquídea *Cattleya quadricolor*. Raya Montaña et al. (2011) reportan un promedio de 1.45 cm en la longitud de hojas con la adición de ANA en el medio de cultivo para la especie *Laelia halbingerina*.

En la elongación de raíces se obtuvo un promedio de 3.83 cm en *P. citrina*, en la investigación de Raya Montaña et al. (2011) se reportó un promedio de 1.12 cm de longitud en raíces sin la adición de ANA en *Laelia halbingerina*. Lallana et al. (2010) reportan la propagación de la orquídea *Oncidium bifolium* Sims var. *bifolium* en el medio MS con un promedio de 1.50 cm para la elongación de la raíz, por lo que se observan resultados más favorables en la presente investigación. Pierik (1990) menciona que las citoquininas son utilizadas frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo; generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina.

La supervivencia de las plantas aclimatadas depende mucho de los componentes de los sus-

tratos, ya que de estos depende su aclimatación. Domínguez Rodríguez y Hernández Del Valle (2006) reportan 100% de sobrevivencia de plántulas de la orquídea *Encyclia phoenicia* (Ldl.) Neum. en el tratamiento con turba, carbón vegetal y grava (1:1:1) y el de menor respuesta fue el que contenía corteza de pino y turba (6:3), en donde se encontró que para *P. citrina* y *E. phoenicia* la corteza de pino no es muy favorable para la aclimatación de estas plantas. En el presente estudio se obtuvo 85% de sobrevivencia, al igual que en el trabajo de Moreno Martínez y Menchaca García (2007), que propagaron la orquídea *Stanhopea tigrina* Bateman y las colocaron en un sustrato compuesto por tepezil y carbón triturados (en una proporción de (2:1).

## CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo de propagación *in vitro* que puede contribuir a disminuir la sobreexplotación de *P. citrina* en sus poblaciones naturales, además puede garantizar su disponibilidad para repoblación y potencial explotación comercial.

Para la formación de brotes la combinación BAP 1.5/ANA 0.15 mg l<sup>-1</sup> fue la que mostró el mayor promedio de plántulas por explante (6.75), ya que favoreció el desarrollo de hojas y raíces nuevas. En las fases de crecimiento de hojas y de enraizamiento la combinación ANA3.0/BAP 0.3 mg l<sup>-1</sup> fue la que mostró el mayor desarrollo de hojas y raíces nuevas, ya que hubo incrementos en los parámetros de evaluación en el tamaño de hojas con una longitud máxima de 20.6 mm y raíces de 38.37 mm. Las plantas aclimatadas con el sustrato S<sub>3</sub> (corteza de encino + tezontle + carbón en relación 1:1:1) fueron las que mostraron mayor supervivencia con 85% durante 30 días.

## LITERATURA CITADA

- ÁVILA DÍAZ, I. y SALGADO GARCIGLIA, R. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. *Biológicas*, 8, 138-149, 2006.
- CADAVID CORREA, I. C. y SALAZAR ANDRADE, S. *Micropropagación de Cattleya quadricolor*. Universidad EAFIT. Escuela de Ingeniería. Departamento de Ingeniería de procesos. Medellín, Colombia, 28-43, 2008.
- COELLO, C. Y. et al. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E. Higgins. *Gayana Botánica*, 67(1): 19-26, 2010.
- DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, Y. y HERNÁNDEZ DEL VALLE, G. Aclimatación de plantas *in vitro* de *Encyclia phoenicia* (Ldl.) Neum. (Orchidaceae) en diferentes sustratos. *Biotecnología Vegetal*, 6(4): 225-240, 2006.
- GONZÁLEZ, E. M. et al. Diversidad, endemismo y estado de conservación de la flora de Durango. Memorias. *Simposio Internacional El conocimiento botánico en la gestión ambiental y el manejo de ecosistemas y 2º Simposio botánico del norte de México*. Durango, Dgo., pp. 13-15, septiembre de 2005.
- HÁGSATER, E. M. et al. *Las orquídeas de México*. D. F., México: Instituto Chinoín, A.C. 304 pp., 2005.
- LALLANA, V. H. et al. Germinación y desarrollo de plántulas *in vitro* de *Oncidium bifolium* Sims var. *bifolium* (Orchidaceae). En C. Gallardo y E. Gagliano (Comps.), *Libro de resúmenes del V Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales* (272-274). Paraná, Universidad Nacional de Entre Ríos, 2010.
- MORENO MARTÍNEZ, D. y MENCHACA GARCÍA, R. A. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, 9(2): 27-32, 2007.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497, 1962.
- PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1): 176-187, 2011.
- PÉREZ MOLPHE BALCH, E. M. et al. *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 180 pp., 1999.
- PIERIK, R. L. M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, España: Ed. Mundi- Prensa. 326 pp., 1990.
- RAYA MONTAÑO, Y. A. et al. Propagación *in vitro* de *Laelia halbingeriana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3, 539-553, 2011.
- ROCA, W. M. y MROGINSKI, L. A. (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 969, 1991.
- SALAZAR CHÁVEZ, G. A. Conservation. En E. Hágsater y V. Dumont (Eds.), *Orchids: Status Surrey and Conservation Action Plan* (6-10). Cambridge, UK: Inter Natural Union for the Conservation of Nature/ Species Survival Commission, 1996.
- SALAZAR CHÁVEZ, G. A. Orquídeas. En A. Lot y Z. Cano Santana (Eds.), *Biodiversidad del Ecosistema de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel* (153-169). Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
- SARABIA OCHOA, M. E. et al. Callus Growth and Plant Regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 10(1): 13-18, 2010.
- SEMARNAT (SECRETARÍA DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, jueves 30 de diciembre de 2010.
- SOTO ARENAS, M. A. y SOLANO GÓMEZ, A. R. Ficha técnica de *Euchile citrina*. En M. A. Soto-Arenas (Comp.). *Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL2000*. D.F., México: Instituto Chinoín A.C., Herbario De la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029, 2007.
- SUÁREZ QUIJADA, I. et al. Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1-2): 388-393, 2007.