

PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Oncidium stramineum* Lindl. UNA ORQUÍDEA AMENAZADA Y ENDÉMICA DE MÉXICO

G. Flores-Escobar^{1†}; J. P. Legaria-Solano¹;
I. Gil-Vásquez²; M. T. Colinas-León¹

¹Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.
Km. 38.5 Carretera. México-Texcoco. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.
Correo-e: gina0958@yahoo.com. ([†]Autor responsable)

²Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el medio de cultivo más apropiado para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. La germinación se realizó en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), mientras que para el desarrollo de las plántulas se probaron los medios MS (T₁), MS (T₂) suplementados con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y carbón activado y MS suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y polivinil pirrolidona (T₃). La germinación alcanzada fue de 47.69 %. Durante el desarrollo se observaron siete etapas fenológicas: imbibición a los cuatro días, semillas verdes a los ocho días, germinación a los trece días, protocormo inicial a los dieciséis días, protocormo tardío a los diecinueve días, desarrollo de hojas a los veintiocho días, desarrollo de raíces verdaderas a los treinta y cuatro días y plántula. Las variables número de brotes, longitud de hoja, ancho de hoja, número de raíces y altura de plántula fueron afectadas por los tratamientos, no así la longitud de raíces. El análisis de medias Tukey mostró diferencias significativas para las variables número de brotes, longitud de hoja, número de raíz y altura de plántula. El comportamiento de las variables evaluadas en función del tiempo mostró que el medio de cultivo (T₃) suplementado con extractos orgánicos, agua de coco, peptona y polivinil pirrolidona influyó de manera positiva en el desarrollo de las plantas, mejorando el tamaño de las hojas y la altura de las plántulas.

El mismo medio de cultivo (T₃) presentó además significancia en las correlaciones para todas las variables evaluadas. El mejor desarrollo de las plántulas de *Oncidium stramineum* Lindl. se observó en el medio de cultivo MS suplementado con 100 ml-litro⁻¹ de agua de coco, 40 g-litro⁻¹ de extractos de jitomate, manzana y plátano, 2.0 g-litro⁻¹ de peptona y 200 mg-litro⁻¹ de polivinil pirrolidona.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Trichocentrum stramineum*, epífita, polivinil pirrolidona.

In vitro PROPAGATION OF *Oncidium stramineum* Lindl., AN ENDANGERED ENDEMIC MEXICAN ORCHID

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the most suitable culture medium for *in vitro* propagation of *Oncidium stramineum* Lindl. Murashige and Skoog (MS) medium was used for germination, and for growth MS (T₁) and MS (T₂) medium supplemented with organic extracts, coconut milk, peptone and active charcoal, and MS (T₃) supplemented with organic extracts, coconut milk, peptone and polyvinyl pyrrolidone were tested.

Germination was 47.69 %. During growth seven phenological stages were observed: imbibition in four days, green seeds in eight days, germination in thirteen days, initial protocorm in sixteen days, late protocorm in nineteen days, leaf development in twenty-eight days, production of true roots in thirty-four days, and seedling development. Number of buds, leaf length, leaf width, number of roots, and seedling height were affected by the treatments, but not root length. The Tukey analysis showed significant differences among treatments in number of buds, leaf length, number of roots and seedling height. The evaluated variables showed that culture medium

(T₃) supplemented with organic extracts, coconut water, peptone and polyvinyl pyrrolidone increased leaf width, leaf length and seedling height. With MS (T₃) all the variables evaluated correlated significantly. The best growth of *Oncidium stramineum* Lindl. seedlings was observed in MS culture medium supplemented with 100 mL·litter⁻¹ coconut milk, 40 g·litter⁻¹ organic extracts from tomato, apple and banana, 2.0 g·litter⁻¹ peptone and 200 mg·litter⁻¹ polyvinyl pyrrolidone.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Trichocentrum stramineum*, epiphyte, polyvinyl pyrrolidone.

INTRODUCCIÓN

En México se reconocen actualmente más de 1,200 especies y subespecies de orquídeas. Las orquídeas se ubican al sur del Trópico de Cáncer, desde las costas del Pacífico y del Golfo, en altitudes que pueden rebasar los 3,500 m (Espejo y López-Ferrari, 1998; Hágsater *et al.*, 2005; Soto, 1998). Una de las características más interesantes de esta familia es su alta proporción de especies endémicas. Se han registrado 444 especies o subespecies que corresponden aproximadamente al 40 % del total de taxa en el país (Espejo *et al.*, 2002). Lo anterior convierte a la Orchidaceae en una de las familias más ricas en endemismos entre los países de América tropical. Sin embargo, la alteración y destrucción del hábitat, así como la extracción ilegal de orquídeas silvestres para su comercio, hace que varias especies de orquídeas estén consideradas en peligro de extinción (Hágsater *et al.*, 2005). En los dos últimos siglos se han extinguido varias especies de orquídeas en México y a partir de 1998 han desaparecido al menos 22 (Hágsater *et al.*, 2005). La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 incluye a la familia Orchidaceae y a todas sus especies como amenazadas y en peligro de extinción (SEMARNAT, 2003). Por otro lado, las orquídeas presentan problemas serios para su propagación en forma natural debido a que la mayor parte de las semillas están escasamente diferenciadas por lo que no se les distinguen los cotiledones ni las radículas y carecen de endospermo (Pierik, 1990). Tradicionalmente, las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas. Sin embargo, se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de cultivo *in vitro* (Arditti, 1993). El cultivo de tejidos se ha venido utilizando para la producción comercial de orquídeas, principalmente para los géneros *Phalaenopsis*, *Oncidium*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, and *Paphiopedilum*, tal es el caso de Taiwán, donde se ha visto incrementada la producción de orquídeas del 51 % en 1998 al 85 % para el año 2000 (Pan, 2007). Diversos factores se han estudiado en la industria para la propagación de *Oncidium*, entre ellos el uso mínimo de medios de cultivo, adición de fitohormonas y otros aditivos como peptona, carbón activado, puré de plátano, entre otros (Ouyang *et al.*, 2006).

La orquídea *Oncidium stramineum* se conoce también por los sinónimos *Lophiaris straminea* y *Trichocentrum stramineum* y se denomina comúnmente “oreja de burro blanca”. Es una planta epífita, de crecimiento simpodial que se desarrolla en los bosques de encino y sobre otras

especies latifoliadas y se distribuye en los estados de Puebla y Veracruz (Bechtel *et al.*, 1981; Wiard, 1987). La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 la considera como especie amenazada y endémica de México. Por tal motivo es urgente su conservación, siendo las semillas el material de propagación más adecuado cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una población. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar la germinación. Esta metodología se ha utilizado principalmente para especies e híbridos de interés comercial; sin embargo, existen pocos trabajos donde se ha empleado con especies silvestres. Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el medio de cultivo más apropiado para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron semillas de cápsulas indehiscentes de la orquídea *Oncidium stramineum* obtenidas de plantas adultas (Figura 1). Las semillas obtenidas se sembraron 35 días después de la colecta de las cápsulas.



FIGURA 1. Flor y planta adulta de *Oncidium stramineum*.

Medios de cultivo. El medio de cultivo (T1) utilizado para la germinación fue las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 30 g·litro⁻¹ de sacarosa, 6.5 g·litro⁻¹ de agar como agente gelificante; el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1 N o HCl, antes de la esterilización en autoclave durante 20 minutos a 1.2 kg·cm⁻² de presión y 120 °C de temperatura. Para el desarrollo de las plántulas además del medio de cultivo utilizado para la germinación (T1), se ensayaron los medios de cultivo: a) MS más 30 g·litro⁻¹ de sacarosa, 2.0 g·litro⁻¹ de peptona, 2.0 g·litro⁻¹ de carbón activado, 40 g·litro⁻¹ de extractos de manzana, plátano y jitomate los cuales fueron licuados con 100 ml·litro⁻¹

de agua de coco, adicionándose al medio antes de ajustar el pH a 5.0 ± 0.1 e incorporar $6.5 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$ de agar (T2); b) Medio de cultivo similar al anterior sustituyendo el carbón activado por $200 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de polivinilpirrolidona (PVP) (T3). La esterilización se llevó a cabo bajo las condiciones antes mencionadas.

Desinfestación de semillas. Se pesó en una balanza analítica 0.273 mg de semillas y para la desinfestación se siguió el procedimiento propuesto por Sheehan (1998) el cual consiste en: a) se midió con una pipeta serológica 1.25 ml de NaClO al 5% (v/v) y se aforó con agua destilada a 25 ml en una probeta graduada; b) se agregaron las semillas a la solución de hipoclorito de sodio más dos gotas de Tween 20 cubriendo con papel parafilm y agitando durante 15 segundos hasta que las semillas se tornaron de color amarillo y, c) se colocaron en la campana de flujo laminar, esperando 5 minutos para su posterior siembra.

Siembra de semillas. Luego de desinfestar las semillas, se decantaron en un embudo con papel filtro estéril, enjuagándose cuatro veces con agua destilada estéril, procediéndose a realizar la siembra de la forma siguiente: a) con pinzas estériles se tomó el papel filtro depositándolo sobre una caja de petri estéril desdoblándose para exponer las semillas; b) con una microespátula estéril se tomaron las semillas y se distribuyeron uniformemente en el medio de cultivo seleccionado para la germinación (Pierik, 1990). Una vez terminada la siembra, los frascos se cubrieron con papel aluminio después de flamearse para evitar contaminación y finalmente se colocaron en la sala de incubación a una temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una intensidad lumínica de $41 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes (luz de día) de 30 W.

Germinación de semillas. El porcentaje de germinación se consideró cuando se observó que los embriones rompieron la testa, y se cuantificó el número de semillas germinadas por centímetro cuadrado, esto mediante la ayuda de una hoja de papel milimétrico.

Desarrollo de las plántulas. Una vez germinadas las semillas (fase de protocormo), se seleccionaron los protocormos que midieron de 2 a 3 mm de diámetro y se sembraron cuatro explantes por frasco en los medios de cultivo seleccionados para el desarrollo de las plantas.

Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia dentro de la campana de flujo laminar, los frascos con los explantes se colocaron en la sala de incubación y se subcultivaron cada treinta días en el respectivo medio de cultivo.

Desarrollo fenológico. El desarrollo fenológico de las plantas se evaluó mediante observaciones al microscopio, tomándose fotografías de cada una de las etapas de desarrollo (Figura 2A, B, C, D, E, F, G y H). Las variables evaluadas

fueron: número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número de raíces (NR), longitud de raíces (LR) y altura de plántula (AP), las cuales se registraron cada quince días utilizando un vernier (Figura 3A, B, C, D y E).

Diseño del experimento. El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con tres tratamientos (medios de cultivo) y 30 repeticiones por tratamiento (frascos). La unidad experimental estuvo constituida por cuatro plantas por repetición. Se realizó un total de cuatro evaluaciones durante el experimento.

Análisis de datos. Los datos obtenidos de las variables (NB, LH, AH, NR, LR y AP), para cada uno de los tratamientos se evaluaron mediante un análisis de varianza. Para los casos que mostraron diferencias significativas se llevó a cabo una prueba de comparación de medias de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$ con el paquete estadístico SAS versión 8.0 (SAS, 1999).

RESULTADOS

Germinación de semillas. En el presente trabajo la germinación de las semillas de *Oncidium stramineum* se consideró cuando el embrión absorbió agua e incrementó su circunferencia y longitud, llegando a romper la testa. El máximo de germinación alcanzado para la especie fue de 47.69 %.

Etapas fenológicas. Durante el desarrollo *in vitro* de *Oncidium stramineum* se observaron las siguientes etapas: 1) **imbibición**; a los cuatro días de sembradas las semillas se presentó un hinchamiento pronunciado y una coloración verde pálido del embrión ocasionado por la absorción de agua; ciertos autores (Pierik, 1990; Arditti, 1992; Arditti y Gani, 2000) consideran a ésta como la primer etapa en la germinación de las semillas de orquídeas (Figura 2A); 2) **semillas verdes**; a los ocho días, las semillas mostraron una coloración verde muy acentuada y el tamaño de los embriones aumentó hasta en cinco veces (Figura 2B); 3) **germinación**; el embrión absorbió agua incrementando su circunferencia y longitud, rompiendo la testa e iniciando la germinación, lo que se manifestó a los trece días (Figura 2C), tiempo similar al obtenido por Kalimuthu *et al.* (2007) en la germinación de *Oncidium* sp.; 4) **protocormo inicial**; se formó un complejo de células color verde tenue; se observó la aparición de un primordio foliar de color más intenso formándose estructuras diminutas llamadas rizoides, presentándose esta etapa a los dieciséis días (Figura 2D); 5) **protocormo tardío**; el protocormo continuó su desarrollo, incrementando su volumen, desarrollándose por completo y apareciendo en el ápice un primordio foliar, ocurriendo a los diecinueve días después de la siembra (Figura 2E); 6) **desarrollo de hojas**; el primordio foliar continuó su desarrollo y el cuerpo del protocormo disminuyó su volumen, completándose el desarrollo de las hojas, lo cual ocurrió a los veintiocho días (Figura 2F); 7) **desarrollo de raíces verdaderas**; el primor-

dio de raíz se desarrolló muy cercano a la base de las hojas en la parte superior del cuerpo del protocormo, presentándose a los treinta y cuatro días después de la siembra (Figura 2G); y 8) **plántula**; se incrementó el número de raíces y el cuerpo del protocormo desapareció formándose nuevos brotes (Figura 2H).

Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de las plantas

El análisis de varianza de los resultados obtenidos (Cuadro 1) mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.05$) para las variables número de brotes (NB), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH), número de raíces (NR) y altura de plántula (AP). La longitud de raíces (LR) no se vio afectada por los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de las plantas. Los valores del coeficiente de determinación (R^2) fueron superiores a cero para todas las variables estudiadas. La variable número de raíces (NR) mostró el valor más alto (0.379), lo que sugiere que tal variable depende fuertemente de los tratamientos. Por otro lado la longitud de raíz (LR) presentó el valor menor para este coeficiente, lo que indica que la longitud de raíz depende tan solo en un 0.7 % de los tratamientos.

En el Cuadro 2 se muestra los resultados de comparación de medias para las variables estudiadas en tres medios de cultivo durante la propagación de *Oncidium stramineum*; sólo las variables AH y LR no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

Dinámica de las variables. La Figura 3 muestra el comportamiento de las variables evaluadas en función del tiempo.

Correlaciones entre las variables evaluadas. El Cuadro 3 muestra el grado de asociación existente entre las variables evaluadas en los tratamientos.

CUADRO 1. Análisis de varianza para número de brotes, longitud y ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula en la reproducción *in vitro* de *Oncidium stramineum*.

F.V.	G.L.	NB	LH	AH	NR	LR	AP
Trat.	2	2.539*	0.676*	0.014*	5.955*	0.047 ^{NS}	2.730*
Error	87	34.916	5.061	0.186	9.731	6.087	18.714
Total	89	37.455	5.738	0.200	15.686	6.135	21.444
C.V.		24.576	23.615	17.173	22.337	38.900	25.679
R ²		0.0677	0.117	0.073	0.379	0.007	0.127

^{NS}, *: No significativo, significativo con $P \leq 0.05$.

CUADRO 3. Correlaciones entre las variables longitud de hoja, ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula en los medios de cultivo para la reproducción *in vitro* de *Oncidium stramineum*.

Medio de cultivo	Variables	AH	NR	LR	AP
T ₁ T ₂ T ₃	LH	0.2490 ^{NS}	0.1235 ^{NS}	0.4825*	0.3367 ^{NS}
		0.6400*	0.2099 ^{NS}	0.3700*	0.3080 ^{NS}
		0.7287*	0.6431*	0.8093*	0.8025*
T ₁ T ₂ T ₃	AH		-0.0741 ^{NS}	0.1849 ^{NS}	0.0557 ^{NS}
			-0.0702 ^{NS}	0.0906 ^{NS}	-0.0138 ^{NS}
			0.5163*	0.7557*	0.6992*
T ₁ T ₂ T ₃	NR			0.5202*	0.8857*
				0.4719*	0.9303*
				0.6095*	0.9117*
T ₁ T ₂ T ₃	LR				0.8571*
					0.7624*
					0.8813*

LH: Longitud de hoja; AH: Ancho de hoja; NR: Número de raíces; LR: Longitud de raíces; AP: Altura de plántula.
^{NS}, *: No significancia estadística $P \leq 0.05$. El asterisco (*) indica las correlaciones con una significancia de $P \leq 0.05$.

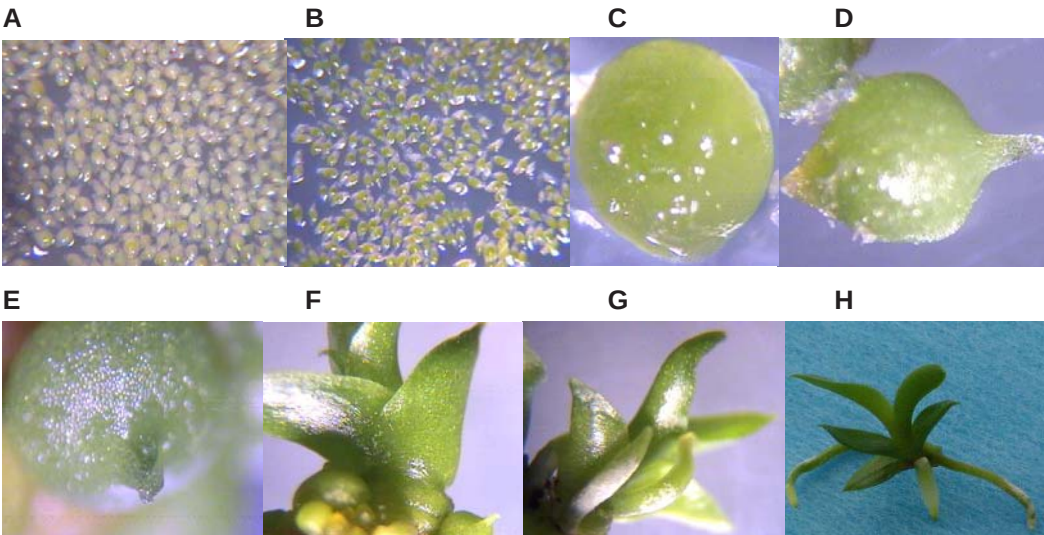


FIGURA 2. Etapas del desarrollo *in vitro* de *Oncidium stramineum*. A: imbibición; B: semillas verdes; C: germinación; D: protocormo inicial; E: protocormo tardío; F: desarrollo de hojas; G: desarrollo de raíces verdaderas; H: plántula.

CUADRO 2. Comparación de medias para número de brotes, longitud de hoja, ancho de hoja, número y longitud de raíces y altura de plántula para tres medios de cultivo durante la reproducción *in vitro* de *Oncidium stramineum*.

T	NB	T	LH	T	AH	T	NR	T	LR	T	AP
3	2.750 a	3	1.142 a	3	0.287 a [*]	2	1.741 a	3	0.712 a [*]	3	2.051 a
1	2.633 ba	1	0.977 b	2	0.260 a	3	1.608 a	2	0.665 a	2	1.700 b
2	2.350 b	2	0.944 b	1	0.260 a	1	1.141 b	1	0.662 a	1	1.666 b
DMS	0.39		0.148		0.028		0.205		0.162		0.285

^{*}Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DMS: Diferencia mínima significativa; NB: Número de brotes; LH: Longitud de hoja en centímetros; AH: Ancho de hoja en centímetros; NR: número de raíces; LR: Longitud de raíces en centímetros; AP: Altura de plántula en centímetros; T: tratamiento.

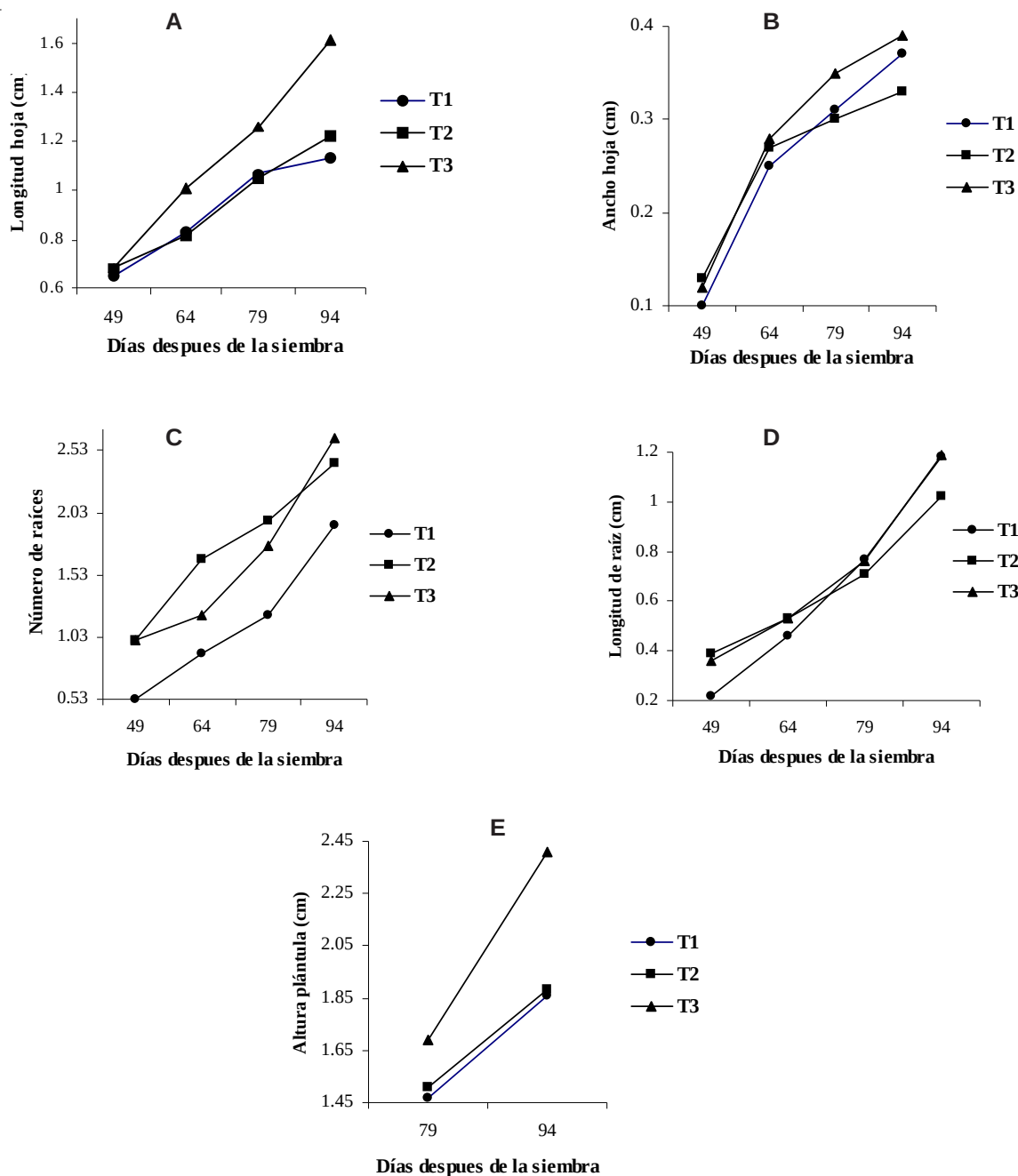


FIGURA 3. Dinámica de las variables; A: Ancho de la hoja; B: Longitud de la hoja; C: Número de raíces; D: Longitud de raíz; E: Altura de plántula, durante el cultivo *in vitro*. Cada punto representa el promedio de 30 repeticiones.

DISCUSIÓN

El máximo de germinación alcanzado para la especie fue de 47.69 %, considerándose un porcentaje de germinación relativamente bajo ya que, de acuerdo con Arditti (1992), los porcentajes de germinación de orquídeas epifitas tropicales alcanzados sobre un medio asimbiótico son mayores a 50 %. Santos *et al.* (2005), por ejemplo, reporta un porcentaje de germinación de 70 a 90 % para *Laelia albida* utilizando el medio de Knudson C, suplementado con extracto de papa. En la regeneración *in vitro* de *Oncidium sp* (Kalimuthu *et al.*, 2007) adicionaron con 2.0 mg.litro⁻¹ de BAP al medio MS obteniendo una reproducción satisfactoria.

Para el presente trabajo, la baja germinación de las semillas de *Oncidium stramineum* sembradas *in vitro* en el medio MS pudo deberse a factores diversos, entre ellos a que no todas las semillas de una cápsula se forman completamente o son fértiles y sólo germinan aquellas con un embrión viable (Arditti y Ghani, 2000). También, en muchos casos el embrión es muy pequeño con relación a la testa por lo que el volumen de la semilla puede estar ocupado por un 96 % de aire (Arditti, 1992) y la humedad no llega al embrión. Por otro lado, en la germinación de algunas orquídeas influye también la concentración de ABA de las semillas, de tal forma que si su concentración es alta, la germinación es baja. Sin embargo, en comparación con lo que ocurre en la naturaleza, donde germina sólo el 5 % de las semillas producidas y de éstas sólo un porcentaje muy pequeño alcanza la etapa adulta (Pierik, 1990), el porcentaje de germinación obtenido en este trabajo es satisfactorio.

La adición de extractos orgánicos de plátano, manzana, tomate y agua de coco al medio de desarrollo (T₂, T₃) para *Oncidium stramineum*, mostró diferencia en la respuesta de la variable número de raíces en comparación al medio donde no se adicionaron nutrientes orgánicos (T₁). A partir de los 49 días la presencia de raíces es mucho mayor en los medios T₂ y T₃ con extractos orgánicos que en las plántulas desarrolladas en el medio sin la adición de éstos (T₁) (Figura 3C). Lo anterior sugiere que agregar extractos orgánicos al medio de cultivo para el desarrollo de plántulas de *Oncidium stramineum* es positivo, sobre todo para la proliferación de raíces. En el caso de *Oncidium stramineum* el uso de carbón activado adicionado al medio para el desarrollo de las plántulas (T₂) presentó efecto positivo en las variables; longitud de hoja y número de raíces, comparado con el medio de cultivo de Murashigue y Skoog (T₁). Posiblemente debido al efecto que el carbón activado presenta sobre el desarrollo de las plántulas, como lo muestra la Figura 3B y C.

Abenavoli y Pennisi (1998) estudiaron el efecto de PVP sobre la formación de callo en *Castanea sativa*, una especie leñosa que produce ácidos insolubles polifenólicos y los excreta al medio induciendo necrosis seguida de la muerte de los explantes. Encontraron que el uso de polivinil pirrolidona (PVP) incluida en el medio de cultivo para dicha

especie redujo el necrosamiento del tejido. También, Pérez *et al.* (2001) utilizaron PVP en el establecimiento y multiplicación de *Leucadendron discolor* para evitar la oxidación.

En el presente estudio, la adición de PVP en el medio de cultivo para el desarrollo de *Oncidium stramineum* mostró su efectividad para promover el crecimiento.

Las variables longitud de hoja, ancho de hoja, número de raíces y altura de plántula presentaron un mayor desarrollo en T₃ que en los medios de cultivo que carecieron de PVP (T₁ y T₂) a partir de los 49 días. Lo anterior se observa en las Figuras 3A, B, C y E. Por el contrario, para la variable longitud de raíz la diferencia no se apreció con claridad (Figura 3D). La mayor efectividad del medio de cultivo adicionado con PVP (T₃) en el desarrollo de *Oncidium stramineum* pudo deberse a la mayor capacidad de acción antioxidante de la PVP.

Las correlaciones positivas y significativas encontradas entre las variables evaluadas para el tratamiento T₃ dan idea de la adaptación que tendrán las plantas *ex vitro*, ya que a mayor área foliar las plantas tienen una mayor capacidad de producir fotosintatos y con ello desarrollar favorablemente. Las hojas en las orquídeas tienen la función principal de realizar la fotosíntesis y por tanto, el contar con una gran superficie foliar expuesta a la luz, sobre todo en lugares sombreados y en situaciones bastante húmedas, es de importancia para el buen desarrollo de la planta (Hágsater *et al.*, 2005). Sirven también de almacenamiento y deben persistir por largo tiempo.

El número y la longitud de las raíces es también favorable para el establecimiento de las plantas fuera del medio de cultivo *in vitro* en el que se han desarrollado. Debido a que las orquídeas epifitas se distinguen por la presencia de raíces aéreas, mismas que utilizan tanto para nutrirse como para anclarse a las plantas hospederas, la correlación encontrada entre las variables número y longitud de raíces es importante porque permitirán una mayor sobrevivencia de *Oncidium stramineum* durante el establecimiento en el invernadero. Aunque en las especies epifitas como *Oncidium stramineum* la función principal de las raíces es el anclaje (Arditti, 1992), también son capaces de fotosintetizar dado que contienen clorofila (Hágsater *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este trabajo, para la reproducción *in vitro* de *Oncidium stramineum* se recomienda utilizar el medio de cultivo MS suplementado con 30 g.litro⁻¹ de sacarosa y 6.5 g.litro⁻¹ de agar, 100 ml.litro⁻¹ de agua de coco, 40 g.litro⁻¹ de extractos de manzana, plátano y jitomate, 2.0 g.litro⁻¹ de peptona y 200 mg.litro⁻¹ de polivinil pirrolidona (PVP).

LITERATURACITADA

- ABENAVOLI, M. R.; PENNISI, A. M. 1998. The effect of PVP on chestnut callus formation. *Acta Hort (ISHS)* 457: 17-20.
- ARDITTI, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. Department of Developmental and Cell Biology. Ed. John Wiley and Sons. USA. 691 p.
- ARDITTI, J. 1993. Micropropagación of orchids. Ed. John Wiley and Sons. New York. 949 p.
- ARDITTI, J.; GHANI, A. K. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145 (3): 367-421.
- PAN, CH. L. 2007. Marching Towards the Market: The Business Potential of Agricultural Biotechnology in the Republic of China, pp. 89- 92. *In: Business Potential for Agricultural Biotechnology Products*. TENG, S. P. (ed). The Asian Productivity Organization. Tokio, Japon.
- BECTHEL, H; CRIBB, P; LUANERT, E. 1981. The Manual of cultivated orchids species. Ed. Eugen Ulmer GmbH and Co. West Germany. 444 p.
- ESPEJO S. A.; J. GARCÍA; A. R. LÓPEZ F.; R. JIMÉNEZ M.; L. SÁNCHEZ S. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D. F. México. 332 p.
- ESPEJO, S. A.; A. R. LÓPEZ-FERRARI. 1998. Las monocotiledóneas mexicanas una sinopsis florística 1. Lista de referencia Parte VII. Orchidaceae I. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, DF. 90 p.
- HAGSATER, E.; M. A. SOTO ARENAS; G. A. SALAZAR CHÁVEZ; R. JIMÉNEZ MACHORRO; M. A. LÓPEZ ROSAS; R. L. DRESSLER. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, 303 p.
- KALIMUTHU, K; SENTHILKUMAR, R; VIJAYAKUMAR, S. 2007. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium sp.* (Dancing Dolls). *African Journal of Biotechnology* 6(10): 1171-1174.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A Revised Medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- OUYANG, T. CHEN, S. WANG F. S. 2006. Key Technology study on *Oncidium* industrial propagation by tissue culture. *Forest Research* 19(5): 606-611.
- PÉREZ, F. J. F.; RAVELO, B. J.; RODRÍGUEZ, P. J. A. 2001. *In vitro* establishment and proliferation of axillary bud cultures of *Leucadendron discolor* (Proteaceae). *Acta Horticulturae* 545: 179-185.
- PIERIK, R. L. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- SANTOS, H. L.; MARTÍNEZ GARCÍA, M.; CAMPOS, J. E.; AGUIRRE L. 2005. *In vitro* Propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in México. *HortScience* 40(2): 439-442.
- SEMARNAT. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, 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. 6 de marzo de 2002.
- SHEEHAN, T. J. 1998. Orquídeas. *In: Introducción a la floricultura*. Editor. Larson, A. R. Editorial AGT. Editores S.A. México. 119-146 p.
- SOTO ARENAS, M. A. 1988. Listado Actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea (Méx.)* 11: 233-276.
- WIARD, L. 1987. An introduction to the Orchids of Mexico. Comstock. Pub. Assoc. Hardcover. 239 p.