

PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Laelia halbingeriana**

In vitro PROPAGATION OF *Laelia halbingeriana*

Yurixhi Atenea Raya-Montaña^{1§}, Guillermo Carrillo-Castañeda¹, Martha Elena Pedraza-Santos², Tarsicio Corona-Torres¹, José Alfredo Carrillo-Salazar¹ y Gabriel Alcantar-González³

¹Genética. Colegio de Posgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. Tel. 01 452 5233858 y 01 595 9520200. Ext. 1541, 1569 y 1593. (carrillo@colpos.mx), (tcoronat@colpos.mx), (asalazar@colpos.mx). ²Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". UMSNH. Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín, Uruapan, Michoacán. C. P. 60080. Tel. 01 452 5236474. (marelpesa@yahoo.com.mx). ³Edafología. Colegio de Posgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. Tel. 01 595 9520200. Ext. 1188. [§]Autora para correspondencia: atenea@colpos.mx.

RESUMEN

Laelia halbingeriana (Orchidaceae) es una planta epífita endémica de la cañada de Oaxaca, amenazada por la reducción de su hábitat debido a deforestación, cambios de uso de suelo, extracción ilegal de plantas. Se desarrolló una metodología en el Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas en 2010, para su propagación *in vitro* como estrategia de conservación usando el medio Murashige Skoog (MS) suplementado con 6-benciladenina (BA) (0, 2.22 y 4.43 $\mu\text{M L}^{-1}$) y 3-ácido naftalenacético (ANA) (0, 2.6, 5.2 y 10.4 $\mu\text{M L}^{-1}$). Con estos medios fueron cultivadas plántulas de 2.5 cm con tres concentraciones de sacarosa (58.43, 87.64 y 116.85 mM L^{-1}) y cinco de sales minerales del medio MS (50, 75, 100, 125 y 150%). Para el enraizamiento, las plántulas fueron cultivadas en medio MS suplementado con cinco concentraciones de ANA (0, 2.6, 7.8, 10.4 y 13 $\mu\text{M L}^{-1}$) y cinco de ácido 3-indolbutírico (AIB) (0, 4.92, 7.38, 9.84 y 12.3 $\mu\text{M L}^{-1}$). Se utilizó el diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial y diez repeticiones. En la multiplicación, el BA (2.22 $\mu\text{M L}^{-1}$) incrementó el número promedio de hojas por planta (3.93), mientras que la mayor longitud (1.11 cm) se logró al adicionar ANA (5.2 $\mu\text{M L}^{-1}$). La concentración de azúcar y las sales minerales no influyeron en la organogénesis *in vitro* de *L. halbingeriana*. El enraizamiento presentó mayor

ABSTRACT

Laelia halbingeriana (Orchidaceae) is an epiphytic plant, endemic from Oaxaca's glen, threatened by its habitat shrinking due to deforestation, land-use changes and, illegal plant extraction. A methodology was developed in the Graduated College in Agricultural Sciences in 2010, for its *in vitro* propagation as a conservation strategy using Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 6-benzyladenine (BA) (0, 2.22 and 4.43 $\mu\text{M L}^{-1}$) and 3-naphthaleneacetic acid (NAA) (0, 2.6, 5.2 and 10.4 $\mu\text{M L}^{-1}$). With these media, seedlings of 2.5 cm with three concentrations of sucrose were grown (58.43, 87.64 and 116.85 $\mu\text{M L}^{-1}$) and five mineral salts of MS medium (50, 75, 100, 125 and 150%). For rooting, the seedlings were grown on MS medium supplemented with five concentrations of NAA (0, 2.6, 7.8, 10.4 and 13 $\mu\text{M L}^{-1}$) and five 3-indole butyric acid (IBA) (0, 4.92, 7.38, 9.84 and 12.3 $\mu\text{M L}^{-1}$). A completely randomized design with factorial arrangement and ten repetitions was used. In the multiplication, BA (2.22 $\mu\text{M L}^{-1}$) increased the average number of leaves per plant (3.93), while the longest (1.11 cm) was achieved by adding NAA (5.2 $\mu\text{M L}^{-1}$). The sugar and mineral salts concentration did not influenced the *in vitro* organogenesis of *L. halbingeriana*. Rooting showed higher number of roots

* Recibido: abril de 2011
Aceptado: agosto de 2011

número de raíces por planta (2.62), se obtuvo reduciendo las sales minerales a 75%, la adición de $7.8 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA incrementó el número de raíces (2.86).

Palabras clave: Orchidaceae, fitoreguladores, sales minerales.

INTRODUCCIÓN

Laelia halbingeriana es una planta epífita endémica de la cañada de Oaxaca, en la reserva de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán, amenazada por la reducción de su hábitat debido a factores como la deforestación, cambios de uso del suelo y extracción ilegal de plantas (Hángsater *et al.*, 2005) que aumenta el riesgo de la desaparición. Existen muy pocos estudios acerca de su reproducción. En este tipo de plantas, la reproducción sexual de forma natural es limitada, debido a la naturaleza de la semilla (tamaño pequeño con poca o nula materia de reserva), por lo que la germinación así como los estados de desarrollo subsecuentes dependen de la relación simbiótica con un hongo micorrízico (*Rhizoctonia solani*) (Suárez *et al.*, 2006; Otero *et al.*, 2007; Mosquera *et al.*, 2010). Porras-Alfaro y Bayman *et al.* (2007) señalan que cada especie tiene una especificidad por el hongo micorrízico.

La germinación de semillas *in vitro* es una alternativa de reproducción viable, pues es posible sustituir la acción de los hongos micorrízicos con el medio de cultivo (Gil *et al.*, 2007; Otero y Bayman, 2009). Mediante este método se logra incrementar la variabilidad genética de la especie. Para la propagación de orquídeas, se han estudiado los medios de cultivo mínimos, la constitución de reguladores de crecimiento así como la acción benéfica de la peptona y el carbón activo entre otros aditivos (Ouyang *et al.*, 2006); sin embargo, la respuesta morfogénica de los tejidos dependen del tipo y concentración de los reguladores de crecimiento.

Para la propagación de orquídeas se han empleado citocininas naturales 2-isopenteniladenina (2iP), zeatina, citocininas sintéticas N6-benciladenina (BA) y la cinetina (6-furfuril-aminopurina), en concentraciones de 0.01 a 10 mg L^{-1} ; donde esta última es la menos eficiente de las cuatro. También se ha postulado que la concentración de sales minerales y de sacarosa, son factores determinantes en el proceso de organogénesis *in vitro* de estas plantas (Sorace

per plant (2.62), obtained by reducing 75% of mineral salts, the addition of $7.8 \mu\text{M L}^{-1}$ of NAA increased the number of roots (2.86).

Key words: Orchidaceae, mineral salts, phyto regulators.

INTRODUCTION

Laelia halbingeriana (Orchidaceae) is an epiphytic plant, endemic from Oaxaca's glen, in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve threatened by its habitat shrinking due to factors such as deforestation, land-use changes and illegal extraction of plants (Hángsater *et al.*, 2005) that increases the risk of extinction. There are very few studies on its reproduction. In this type of plant, sexual reproduction is naturally limited due to the seed's nature (small size with little or no reserve material), so that, the germination and subsequent development stages depend on a symbiotic ratio with a mycorrhizal fungi (*Rhizoctonia solani*) (Suárez *et al.*, 2006; Otero *et al.*, 2007; Mosquera *et al.*, 2010). Porras-Alfaro and Bayman *et al.* (2007) noted that each species has a mycorrhizal fungus specificity.

In vitro seed germination is a viable alternative for reproduction, since it's possible to replace the action of the mycorrhizal fungi in a culture medium (Gil *et al.*, 2007; Otero and Bayman, 2009). By using this method, an increase in the genetic variability of the species is achieved. For the propagation of orchids, the minimal growth media have been studied, the formation of growth regulators as well as the beneficial action of the peptone and, the activated carbon among other additives (Ouyang *et al.*, 2006); however, the tissues' morphogenic response depend on the type and concentration of the growth regulators.

For the propagation of orchids, natural cytokinins have been used, 2-isopentenyladenine (2iP), zeatin, synthetic cytokinins, N6-benzyladenine (BA) and kinetin (6-furfuryl-aminopurine) in concentrations of 0.01 to 10 mg L^{-1} ; where the latter is the least efficient of them all. It has also been postulated that, the concentration of mineral salts and sucrose are determining factors in the *in vitro* process of organogenesis of these plants (Sorace *et al.*, 2008). The largest number of seedlings *in vitro* of *L. speciosa* was accomplished by Sarabia *et al.* (2010), by adding to the culture medium NAA (0.5 mg L^{-1}) and gibberellic acid (GA3) (0.1 mg L^{-1}) obtaining 70% survival.

et al., 2008). La mayor formación de plántulas *in vitro* de *L. speciosa* fue lograda por Sarabia *et al.* (2010), al adicionar al medio de cultivo ANA (0.5 mg L^{-1}) y ácido giberélico (AG_3) (0.1 mg L^{-1}) quienes obtuvieron 70% de supervivencia al ser aclimatadas.

Aunque ya se han establecido metodologías para la propagación *in vitro* de orquídea de diferentes géneros, existen pocos estudios en *L. halbingeriana*, por lo que es factible modificar las condiciones conocidas, para mejorar los resultados de la micropropagación como una estrategia inicial, para asegurar posteriormente la conservación en su ambiente natural. Basados en lo expuesto previamente, el objetivo de la presente investigación fue establecer un método práctico y competitivo para propagar *in vitro* *L. halbingeriana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Multiplicación de plántulas

Plántulas de *L. halbingeriana* cultivadas *in vitro* fueron proporcionadas por el Dr. Raymundo Enríquez del Valle, provenientes del laboratorio de cultivo de tejidos del Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca (ITAO).

Medios de cultivo

El medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) fue utilizado como base de los medios preparados; todos los medios de cultivo contenían $2.96 \text{ }\mu\text{M}$ de tiamina, $5.55 \text{ }\mu\text{M}$ de mio-inositol, 6 g L^{-1} de agar (Merck®) y el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 antes de agregar el agar. El medio se esterilizó a 121°C (1.05 kg cm^{-2}) durante 17 min. Todas las cantidades expresadas en la composición de los medios están dadas por litro de medio, a menos que otra cosa sea indicada.

Las plántulas fueron originalmente cultivadas en una serie de 12 medios (Cuadro 1), para determinar la condición más favorable en la multiplicación del número de plantas. Todos los cultivos fueron conservados durante 60 días en un cuarto de incubación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h de fotoperiodo con intensidad lumínica de $76 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ producida por lámparas de luz blanca fría fluorescente. Se determinó el desarrollo de las plántulas durante un periodo de 60 días.

Even though, methodologies for *in vitro* propagation of orchids on different genera have been established, there are only a few studies on *L. halbingeriana*, making it feasible to modify the known conditions in order to improve the results of micropropagation as an initial strategy to ensure further conservation in the wild. Based on these, the objective of this research was to establish a practical and competitive *in vitro* propagation of *L. halbingeriana*.

MATERIALS AND METHODS

Seedlings propagation

The *L. halbingeriana* seedlings cultured *in vitro* were provided by Dr. Raymundo Enríquez del Valle, from the tissue culture laboratory of the Agricultural Technological Institute of Oaxaca (ITAO).

Culture media

The culture medium of Murashige and Skoog (1962) was used as the groundwork for the prepared media; all the culture media contained $2.96 \text{ }\mu\text{M}$ of thiamine, $5.55 \text{ }\mu\text{M}$ of myo-inositol, 6 g L^{-1} agar (Merck®), and pH was adjusted at 5.7 ± 0.1 before adding the agar. The medium was sterilized at 121°C (1.05 kg cm^{-2}) for 17 min. All quantities expressed in the media composition are given per liter of medium, unless otherwise noted.

The seedlings were first grown in a series of 12 media (Table 1), in order to determine the most favorable condition in the multiplication on the number of plants. All cultures were maintained for 60 days in an incubation room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h photoperiod with light intensity of $76 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ produced by fluorescent cold white lighted lamps. The seedlings' development over a period of 60 days was determined.

In order to evaluate the effect on the concentration of mineral salts and sucrose in the *in vitro* seedlings' development of *L. halbingeriana*, new explants were selected about 2.5 cm in length and subjected to 15 treatments conformed by three concentrations of sucrose (58.43, 87.64 and 116.85 mM), combined with five concentrations of the total mineral salts of MS medium (50, 75, 100, 125 and 150%) as indicated in Table 2.

Cuadro 1. Composición química de los medios de cultivo, estos contenían concentración de sales minerales del medio Murashige y Skoog (MS) al 100% y 87.64 mM de sacarosa.

Table 1. Chemical composition of the culture media, containing concentrations of mineral salts from Murashige and Skoog medium (MS) at 100% and 87.64 mM sucrose.

Medio MS	BA (μM)	ANA (μM)	Medio MS	BA (μM)	ANA (μM)
1	0	0	7	2.22	5.2
2	0	2.6	8	2.22	10.4
3	0	5.2	9	4.43	0
4	0	10.4	10	4.43	2.6
5	2.22	0	11	4.43	5.2
6	2.22	2.6	12	4.43	10.4

Para evaluar el efecto de la concentración de sales minerales y sacarosa en el desarrollo de las plántulas *in vitro* de *L. halbmegeriana*, fueron seleccionados nuevos explantes de aproximadamente 2.5 cm de longitud y se sometieron a 15 tratamientos conformados por tres concentraciones de sacarosa (58.43, 87.64 y 116.85 mM), combinadas con cinco concentraciones de las sales minerales totales del medio MS (50, 75, 100, 125 y 150%) como se indica en el Cuadro 2.

In the third trial, vigorous shoots approximately 3 cm length were selected for cultivation in a series of 25 media, containing 87.64 mM of sucrose. In this case, the combination of NAA was evaluated (0, 5.2, 7.8, 10.4 and 12.3 μM) with IBA (0, 4.94, 7.38, 9.84 and 12.3 μM) to induce the *in vitro* rooting of the seedlings (Table 3). For each bottle of 100 ml capacity, 25 mL of culture medium was added, 10 explants were planted to produce a total of 30 explants per

Cuadro 2. Composición química de los medios de cultivo, estos contenían 2.22 μM de BA y 5.2 μM de ANA, más 100% del medio Murashige y Skoog (MS) y las cantidades de sacarosa indicadas.

Table 2. Chemical composition of the culture media, containing 2.22 μM of BA and 5.2 μM of NAA, plus 100% of Murashige and Skoog medium (MS) and the indicated amounts of sucrose.

Medio MS	Concentración de sales (%)	Sacarosa (mM)	Medio MS	Concentración de sales (%)	Sacarosa (mM)
13	50	58.43	21	125	87.64
14	75	58.43	22	150	87.64
15	100	58.43	23	50	116.85
16	125	58.43	23	75	116.85
17	150	58.43	25	100	116.85
18	50	87.64	26	125	116.85
19	75	87.64	27	150	116.85
20	100	87.64			

En el tercer ensayo, brotes vigorosos de aproximadamente 3 cm de longitud, se seleccionaron para cultivarlos en una serie de 25 medios que contenían 87.64 mM de sacarosa. En este caso fue evaluada la combinación de ANA (0, 5.2, 7.8, 10.4 y 12.3 μM) con AIB (0, 4.94, 7.38, 9.84 y 12.3 μM), para inducir el enraizamiento *in vitro* de las plántulas (Cuadro 3). A cada frasco de 100 ml de capacidad se adicionaron 25 mL de medio de cultivo, fueron sembrados 10 explantes para generar un total de 30 explantes por tratamiento. Los explantes se mantuvieron por 60 días en el cuarto de incubación a 25 ± 2 °C, 16 h de fotoperiodo con intensidad lumínica de $76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, producida por lámparas de luz

treatment. The explants were maintained for 60 days in the incubation room at 25 ± 2 °C, 16 h photoperiod with light intensity of $76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, produced by fluorescent cold white lighted lamps. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement of 3×4 , 5×3 and 5×5 in the first, second and third experiment, respectively.

Evaluated variables and statistical analysis

The evaluated variables for all the cases were: number and length of leaves, seedling height, root number, root length. Using these information, an analysis of variance

blanca fría fluorescente. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial 3*4, 5*3 y 55 en el primero segundo y tercer experimento, respectivamente.

and a comparison of means test, Tukey $p \leq 0.05$ using the statistical package SAS version 9.1 (SAS, 2003) were conducted.

Cuadro 3. Composición de medios que contenían 100% de sales minerales (Murashige y Skoog) MS y 87.64 mM de sacarosa. Los medios contenían las cantidades de ANA y AIB indicadas.

Table 3. Media composition containing 100% of mineral salts (Murashige and Skoog) MS and 87.64 μ M sucrose. The media contained the indicated amounts of NAA and IBA.

Medio MS	ANA (μ M)	AIB (μ M)	Medio MS	ANA (μ M)	AIB (μ M)
28	0	0	41	7.8	9.84
29	0	4.94	42	7.8	12.3
30	0	7.38	43	10.4	0
31	0	9.84	44	10.4	4.94
32	0	12.3	45	10.4	7.38
33	5.2	0	46	10.4	9.84
34	5.2	4.94	47	10.4	12.3
35	5.2	7.38	48	13	0
36	5.2	9.84	49	13	4.94
37	5.2	12.3	50	13	7.38
38	7.8	0	51	13	9.84
39	7.8	4.94	52	13	12.3
40	7.8	7.38			

Variables evaluadas y análisis estadístico

Las variables evaluadas en todos los casos fueron: número y longitud de hojas, altura de plántula, número de raíces, longitud de raíces. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza y se llevó a cabo una prueba de comparación de medias Tukey a una $p \leq 0.05$ con el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tipo y concentración de fitohormonas en la etapa de multiplicación *in vitro* de plántulas de *L. halbingeriana*

Se observaron diferencias estadísticas significativas en la respuesta de las plantas, respecto a los tratamientos. Con la adición de 2.22 μ M de BA se obtuvieron hasta 3.93 hojas en promedio, mientras que al duplicar dicha concentración, la formación de hojas se redujo 13% (Figura 1A). El número de hojas no se vio afectado por la presencia de ANA en el medio de cultivo (Figura 1B). En cuanto a la longitud

RESULTS AND DISCUSSION

Type and concentration of phytohormones effect at the *in vitro* multiplication stage of *L. Halbingeriana*'s seedlings.

There were statistically significant differences in the response of the plants with respect to the treatments. With the addition of 2.22 μ M of IBA, 3.93 leaves were obtained on average, while doubling the concentration, the leaves formation was reduced at 13% (Figure 1A). The number of leaves was not affected by the presence of NAA in the culture medium (Figure 1B). As for the length of the leaves, it was found that, with the addition of IBA there were no differences between treatments for this variable (Figure 1C). In the hybrid *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow' Araujo *et al.* (2006), found in this species that the addition of low concentrations of IBA increased the number of shoots.

These results agree with those reported by Sarabia *et al.* (2010), who, with the addition of IBA obtained the greatest callus formation, and the best quality of it in *L. speciosa*;

de las hojas se encontró, que con la adición de BA no se observaron diferencias entre los tratamientos para esta variable (Figura 1C). En el híbrido de *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow' Araujo *et al.* (2006), encontraron en esta especie que la adición de bajas concentraciones de BA incrementaron el número de brotes.

however, it was possible to stimulate the length of the leaves by using NAA in the culture medium, considering that with $5.2 \mu\text{M L}^{-1}$ of NAA, the leaves length was increased to 1.45 cm and, by reducing its concentration to $2.6 \mu\text{M L}^{-1}$, the length was reduced at 31% (Figure 1D). These data contrasted with those reported by Coello *et al.* (2010), who

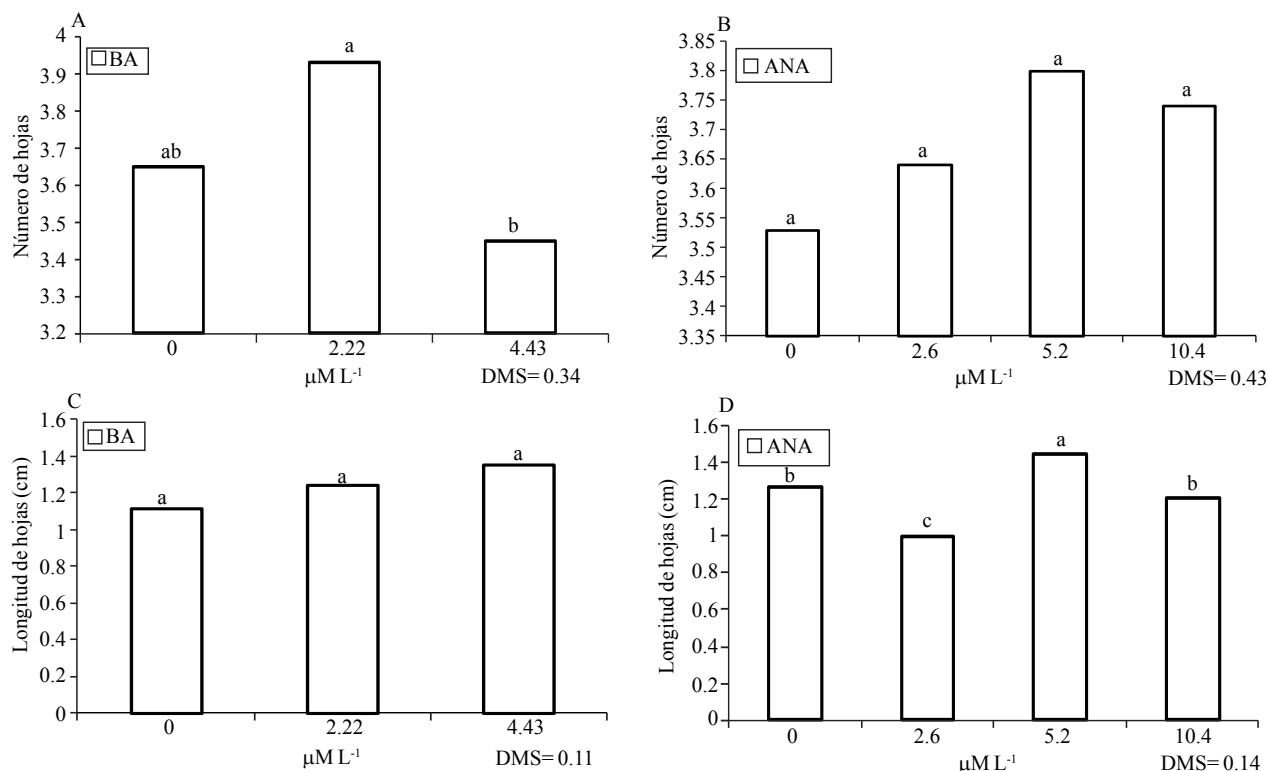


Figura 1. Efecto de la concentración de BA (A y C) y concentración de ANA (B y D), en el número y longitud de las hojas formadas *in vitro* de *L. halbingeriana* en un periodo de 60 días.

Figure 1. BA (A and C) and NAA (B and D) concentration effect on the number and length of the leaves formed *in vitro* of *L. halbingeriana* over a period of 60 days.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Sarabia *et al.* (2010), quienes con la adición de BA obtuvieron la mayor formación de callo, así como la mejor calidad del mismo en *L. speciosa*; sin embargo, se logró estimular la longitud de hojas al utilizar ANA en el medio de cultivo, pues con $5.2 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA se incrementó la longitud de las hojas hasta 1.45 cm y al reducir su concentración a $2.6 \mu\text{M L}^{-1}$ la longitud se redujo 31% (Figura 1D). Estos datos contrastan con los registrados por Coello *et al.* (2010), quienes en *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins, obtuvieron el mayor número de brotes (10.6) al utilizar concentraciones de 16.1 y $0.0023 \mu\text{M}$ de BA. En el estudio realizado por Suárez *et al.* (2007), encontraron que la adición de BA tiene mayor influencia que el ANA en la propagación *in vitro* de *Euchile mariae*.

in *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins, obtained the highest number of shoots (10.6) when using concentrations of 16.1 and $0.0023 \mu\text{M}$ of IBA. In the study by Suárez *et al.* (2007), it was found that, the addition of IBA had more influence than NAA for the *in vitro* propagation of *Euchile mariae*.

The absence of IBA in the culture medium negatively influenced the growth of the seedlings grown *in vitro*, growing only 1.96 cm (Figure 2A); however, by adding $4.43 \mu\text{M L}^{-1}$ of IBA, the plant height got increased (2.19 cm). A similar response was found when adding NAA to the culture medium, since with $5.2 \mu\text{M L}^{-1}$, the highest explant height (2.24 cm) was obtained, and when reduced at $2.6 \mu\text{M L}^{-1}$, the height of the seedlings decreased on average (1.97 cm),

La ausencia de BA en el medio de cultivo influyó negativamente en el crecimiento de las plántulas desarrolladas *in vitro*, ya que sólo alcanzaron 1.96 cm de altura (Figura 2A); sin embargo, al adicionar 4.43 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BA, se incrementó la altura de planta (2.19 cm). Se encontró una respuesta similar al adicionar ANA al medio de cultivo, ya que a 5.2 $\mu\text{M L}^{-1}$ se obtuvo la mayor altura por explante (2.24 cm), y cuando se redujo hasta 2.6 $\mu\text{M L}^{-1}$, la altura de las plántulas disminuyó en promedio (1.97 cm), además se observó que tanto la ausencia de ANA en el medio como la concentración de 10.4 $\mu\text{M L}^{-1}$, presentaron el mismo efecto inhibitorio en la altura promedio de las plántulas.

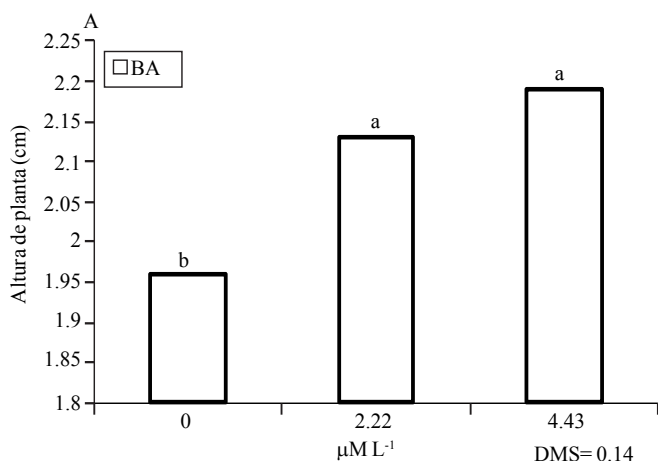


Figura 2. Efecto de la concentración de BA (A) y ANA (B) en la altura de plantas formadas *in vitro* de *L. halbingeriana* en un periodo de 60 días.

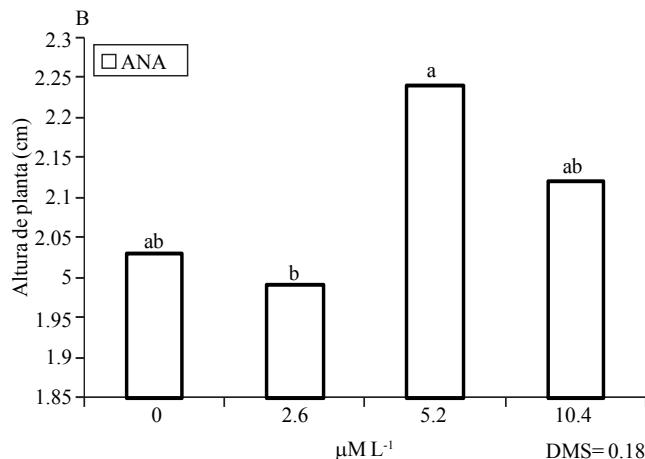
Figure 2. IBA (A) and NAA (B) concentration effect on *L. halbingeriana*'s height of *in vitro* formed plants over a period of 60 days.

El proceso de rizogénesis también fue afectado por los dos tipos de fitohormonas utilizadas (Figura 3). La presencia de BA influyó en el número de raíces ya que al adicionar 2.22 y 4.43 $\mu\text{M L}^{-1}$ se obtuvieron 1.82 raíces en promedio sin ser estadísticamente diferente al testigo sin BA en el cual únicamente se obtuvieron 1.55 raíces en promedio por plántula. En cuanto a la longitud promedio de las plántulas, la adición de 4.43 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BA numéricamente fue mejor al obtener una longitud de 1.14 cm sin ser estadísticamente diferentes a las plantas de los otros tratamientos utilizados.

Con el regulador de crecimiento ANA la respuesta de las plántulas fue negativa, ya que al no adicionar esta fitohormona el número de raíces fue mayor (1.89) y al adicionar 10.4 $\mu\text{M L}^{-1}$ se inhibe la formación en 20%; la longitud de raíces tuvo un efecto similar al encontrarse que numéricamente es mejor en ausencia de ANA en el medio (1.12 cm), mientras que la adición de 10.4 $\mu\text{M L}^{-1}$ sólo se obtuvo un incremento promedio de 1.02 cm.

it was also observed that, for both, the absence of NAA in the medium as well as the concentration of 10.4 $\mu\text{M L}^{-1}$, showed the same inhibitory effect on the average height of the seedlings.

Rhizogenesis process was also affected by the two types of phytohormones used (Figure 3). The presence of IBA influenced the number of roots, and by adding 2.22 and 4.43 $\mu\text{M L}^{-1}$ was obtained on average, 1.82 roots not statistically different from controls without IBA, in which only 1.55 roots on average were obtained per seedling. Regarding the average length of the seedlings, the addition



of 4.43 $\mu\text{M L}^{-1}$ BA was numerically better to get a length of 1.14 cm, not being statistically different from the plants from the other treatments.

With NAA, the seedling's response was negative, because when this phytohormone was not added, the number of roots was higher (1.89) and by adding 10.4 $\mu\text{M L}^{-1}$, the formation is inhibited by 20% on the roots length, an effect quite similar to that found numerically better in the absence of NAA in the middle (1.12 cm), while the addition of 10.4 $\mu\text{M L}^{-1}$ only produced an average increase of 1.02 cm.

Sucrose and mineral salts concentration on *L. halbingeriana* propagation

Sucrose concentration did not affect the *in vitro* organogenesis of *L. halbingeriana* (Table 4). However, the concentration of 87.64 $\mu\text{M L}^{-1}$ did favored its growth, due to the osmotic potential generated by this quantity of

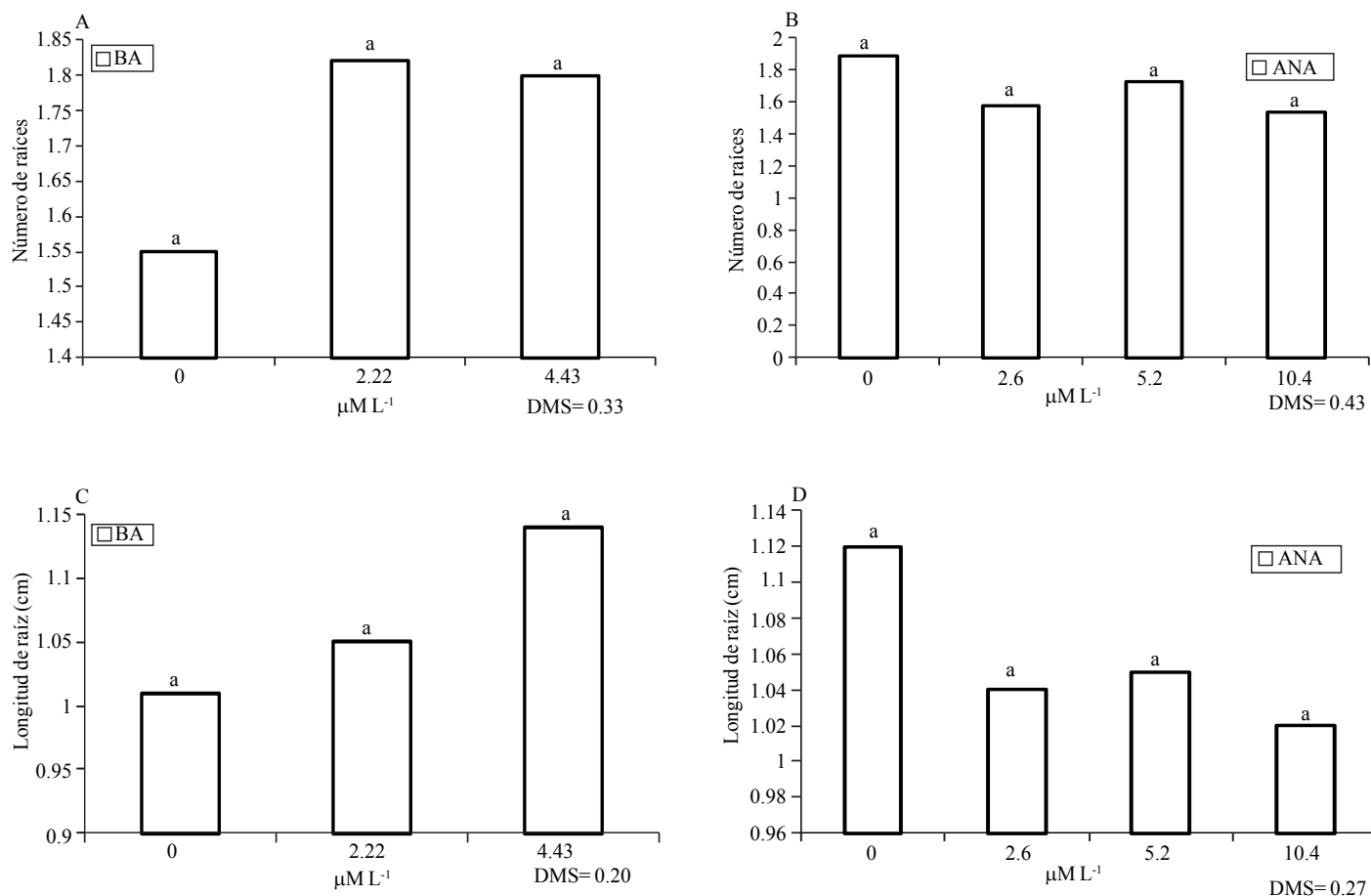


Figura 3. Efecto de la concentración de BA (A y C) y de ANA (B y D) sobre el número y longitud de las raíces formadas *in vitro* de *L. halbingieriana* a 60 días de incubación.

Figure 3. IBA (A) and NAA (B) concentration effect on *in vitro* *L. Halbingieriana*'s roots number and length at 60 days of incubation.

Efecto de la concentración de sacarosa y sales minerales en la propagación de plántulas de *L. halbingieriana*

La concentración de sacarosa no afectó la organogénesis *in vitro* de *L. halbingieriana* (Cuadro 4). Sin embargo, la concentración de 87.64 mM L^{-1} favoreció su crecimiento, debido que el potencial osmótico que generó esta cantidad de sacarosa permitió a la plántula absorber agua y nutrientes. En cambio, el adicionar 116.85 mM L^{-1} de sacarosa al medio de cultivo, disminuyó considerablemente el potencial osmótico, lo que dificulta la absorción de agua y nutrientes hacia el interior de las plántulas, por lo que el crecimiento de las hojas fue limitado.

sucrose enabled the seedling to absorb water and nutrients. In contrast, the addition of 116.85 mM L^{-1} on sucrose medium significantly decreased the osmotic potential, hindering the absorption of water and nutrients into the seedlings, so the leaf growth was too limited.

The concentration of mineral salts in the medium did not affect the number and length of the leaves, which contrasts with that obtained by Romero *et al.* (2007), who pointed out that, using mineral salts at 50 and 100% concentration, a greater number of seedlings grown *in vitro* of *L. anceps* would be obtained. Rhizogenesis process was affected by the concentration of mineral salts, as both the high concentrations as low concentrations of inorganic salts (150 and 50%) decreased the formation of roots (1.65) on average;

Cuadro 4. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la organogénesis *in vitro* de *Laelia halbingeriana* a 60 días de incubación.

Table 4. Sucrose concentration effect on *in vitro* organogenesis of *Laelia halbingeriana* at 60 days of incubation.

Sacarosa (mM L ⁻¹)	Número de hojas	Longitud de hojas (cm)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Longitud del explante (cm)
58.43	3.59 a ^z	0.98 b	1.95 a	0.78 a	0.82 a
87.64	3.77 a	1.07 a	1.91 a	0.82 a	0.88 a
116.85	3.69 a	1.00 ab	2.11 a	0.80 a	0.87 a
DMS	0.24	0.07	0.57	0.23	0.07

^z= medias con la misma letra en cada columna son iguales estadísticamente a $p \leq 0.05$ prueba de tukey.

La concentración de sales minerales en el medio no afectó el número y la longitud de hojas, resultados que contrastan con los obtenidos por Romero *et al.* (2007), quienes señalan que al utilizar sales minerales a 50 y 100% de su concentración, se obtiene una mayor cantidad de plántulas desarrolladas *in vitro* de *L. anceps*. El proceso de rizogénesis fue afectado por la concentración de las sales minerales, ya que tanto las altas concentraciones como las bajas concentraciones de sales minerales (150 y 50%), disminuyen la formación de raíces (1.65) en promedio; mientras que una concentración de 75% promueve su formación (2.62) raíces por planta en promedio. Sin embargo, la concentración de sales minerales no afectó el crecimiento de las raíces (Cuadro 5). Estos datos contrastan con los obtenidos por Romero *et al.* (2007), quienes determinaron que en los medios MS al 50% y al 100% no existen diferencias en el enraizamiento de *L. anceps* subsp. *Anceps*.

while a 75% concentration did promote its growth, (2.62) on average per plant roots. However, the concentration of mineral salts did not affect the growth of the roots (Table 5). These data contrast with those obtained by Romero *et al.* (2007), who found that in MS media at 50% and 100% there is no difference in the rooting of *L. anceps* subsp. *Anceps*.

Differences were observed in the average leaf's formation, due to the interaction between sucrose concentrations and mineral salts contained in the culture medium. The Figure 4A shows that the medium with 150% mineral salts, and 116.85 $\mu\text{M L}^{-1}$ sucrose, favored the formation of leaves per plant (4.03), while decreasing the percentage of mineral salts at 50% concentration, with the same amount of sucrose was observed a decrease in the average

Cuadro 5. Efecto de la concentración de sales minerales MS sobre la organogénesis *in vitro* de *L. halbingeriana* a 60 días de incubación.

Table 5. MS mineral salts concentration effect on the organogenesis *in vitro* of *L. halbingeriana* at 60 days of incubation.

Sales minerales (%)	Número de hojas	Longitud de hojas (cm)	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Longitud del explante (cm)
150	3.82 a	1.03 a	1.68 b	0.85 a	0.88 a
125	3.7 a	0.98 a	1.78 ab	0.83 a	0.89 a
100	3.85 a	1.06 a	2.15 ab	0.87 a	0.9 a
75	3.52 a	0.99 a	2.62 a	0.74 a	0.83 a
50	3.56 a	1.04 a	1.65 b	0.66 a	0.79 a
DMS	0.36	0.1	0.85	0.34	0.1

^z= medias con la misma literal en cada columna son iguales estadísticamente a $p \leq 0.05$ prueba de tukey.

Se observaron diferencias en el promedio de formación de hojas, por efecto de la interacción entre concentraciones de sacarosa y sales minerales contenidas en el medio de cultivo. En la Figura 4A se muestra que el medio con 150% de sales minerales y 116.85 mM L⁻¹ de sacarosa, favoreció

yield of leaves per seedling to 3.13. These data contrasts with the results by Sorace *et al.* (2008), who pointed out that adding 116.85 $\mu\text{M L}^{-1}$ sucrose and 50% of the concentration of mineral salts in MS medium, the further development of *Oncidium baueri*'s seedlings would be obtained.

la formación de hojas por planta (4.03); mientras que al disminuir el porcentaje de sales minerales a 50% de concentración, con la misma cantidad de sacarosa, se observó una disminución del promedio de producción de hojas por plántula a 3.13. Estos datos contrastan con los resultados obtenidos por Sorace *et al.* (2008), quienes señalan que al adicionar 116.85 mM L^{-1} de sacarosa y 50% de la concentración de sales minerales en el medio MS, se obtiene mayor desarrollo de plántulas de *Oncidium baueri*.

The treatment containing 50% mineral salts and $87.64 \mu\text{M L}^{-1}$ sucrose did favored the length of the leaves (1.12 cm); while $58.43 \mu\text{M L}^{-1}$ sucrose and 75% mineral salts decreased the length of the leaves (0.84 cm) (Figure 4B). These results agreed with those of Tirado *et al.* (2005), who by adding $58.43 \mu\text{M L}^{-1}$ of sucrose led to increasing the leaf's growth in *Phalaenopsis* hybrids.

The rhizogenesis process in *L. halbingeriana* was unaffected by the combination of mineral salts and sucrose in the culture medium; Moreno and Menchaca (2007)

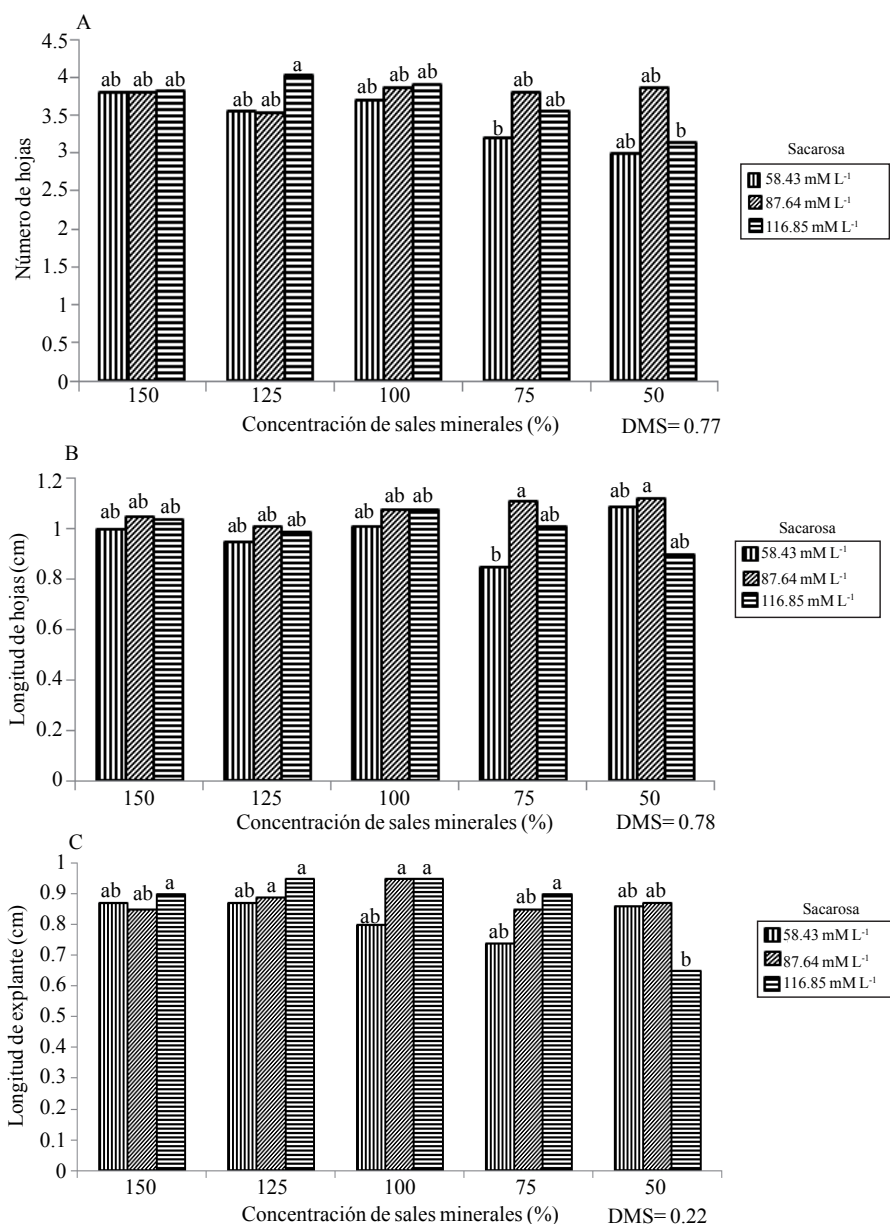


Figura 4. Número de hojas (A), longitud de hojas (B), altura de planta (C) desarrollados *in vitro* de *Laelia halbingeriana* en un periodo de 60 días.

Figure 4. Number of leaves (A), length of leaves (B), plant height (C) developed *in vitro* of *Laelia halbingeriana* over a period of 60 days.

El tratamiento que contenía 50% de sales minerales y 87.64 mM L⁻¹ de sacarosa favoreció la longitud de las hojas (1.12 cm de longitud); mientras que 58.43 mM L⁻¹ de sacarosa y 75% de sales minerales disminuyeron la longitud de las hojas (0.84 cm) (Figura 4 B). Estos resultados coinciden con los de Tirado *et al.* (2005), quienes al adicionar 58.43 mM L⁻¹ de sacarosa propiciaron un mayor crecimiento foliar en híbridos de *Phalaenopsis*.

El proceso de rizogénesis en *L. halbingeriana* no fue afectado por la combinación de sales minerales y sacarosa en el medio de cultivo; Moreno y Menchaca (2007) observaron que al adicionar pulpa de plátano al medio de cultivo, se aumenta el número de raíces formadas *in vitro*, así como la formación de pseudobulbos en *Stanhopea tigrina* Bateman.

La concentración de sales minerales de 150, 125, 100, 75% en interacción con 116.85 mM L⁻¹ de sacarosa, indujeron mayor altura de planta (0.95 cm de altura) (Figura 4 C), este mismo resultado se observó en la interacción de 100% de sales minerales y 87.64 mM L⁻¹. Por el contrario, la reducción de las sales minerales a 50% con 116.85 mM L⁻¹ de sacarosa afectó negativamente el crecimiento de las plántulas de *L. halbingeriana*, ya que sólo se obtuvo 0.65 cm de altura de planta. Estos resultados contrastan con los de Sorace *et al.* (2008), quienes utilizaron la concentración de sales minerales al 100% del medio Knudson C, para crecer *in vitro* el híbrido de *Dendrobium nobile*; esta concentración favoreció el crecimiento de la parte aérea del híbrido.

Efecto de la fuente y concentración de auxina en la rizogénesis *in vitro* de *L. halbingeriana*

En la Figura 5A se observa que en ausencia de ANA, disminuye el número de raíces y su aplicación lo incrementa, aunque no se encontraron diferencias significativas con dosis entre 5.2 y 13 µM L⁻¹ de ANA.

Se observó que tanto la ausencia como la concentración alta de ANA (13.00 µM L⁻¹), produjeron plántulas con raíces de menor longitud, 0.67 y 0.75 cm respectivamente (Figura 5C); en contraste, Pardo *et al.* (2008) encontraron que el número de raíces de brotes en *Billbergia rosea*, se incrementan (8.95) con una concentración de ANA 1 mg L⁻¹.

observed that, by adding banana pulp into the culture medium, it did increased the number of roots formed *in vitro* as well as the formation of pseudobulbs in *Stanhopea tigrina* Bateman.

The concentration of mineral salts 150, 125, 100, 75% in interaction with 116.85 µM L⁻¹ sucrose induced a higher plant height (0.95 cm) (Figure 4 C), this very result was observed in the interaction 100% minerals and 87.64 µM L⁻¹. On the other hand, the reduction at 50% mineral salts with 116.85 µM L⁻¹ of sucrose adversely affected the seedling's growth of *L. halbingeriana*, as only 0.65 cm was obtained from the plant height. These results contrasted with those of Sorace *et al.* (2008), who used the concentration of mineral salts 100% of Knudson C medium to grow *in vitro* the hybrid *Dendrobium nobile*; this concentration favored the aerial-growth part of the hybrid.

Auxin's source and concentration effect on the *in vitro* rhizogenesis of *L. halbingeriana*

The Figure 5A shows that in the absence of NAA, the number of roots decreases and its application will increase it, although, there were no significant differences at doses between 5.2 and 13 µM L⁻¹ NAA.

It was observed that both the absence and the high concentration of NAA (13 µM L⁻¹), produced seedlings with shorter roots, 0.67 and 0.75 cm respectively (Figure 5C); in contrast, Brown *et al.* (2008) found that, the number of root's sprouts in *Billbergia rosea* increased (8.95) with a concentration of 1 mg L⁻¹ NAA.

IBA marginally affected the rooting, as both its absence and the addition of 7.38 µM L⁻¹ promoted the formation of roots at concentrations of 2.98 and 2.86 µM L⁻¹ respectively. However, with 9.84 µM L⁻¹ of IBA, it decreased 22% of root formation (Figure 5B). The Figure 5D shows the effect of the concentration of IBA in the length of the roots. These results showed that for a greater length of roots, the addition of 7.38 and 12.3 µM L⁻¹ IBA, and the lack of it, promoted the size of the roots (0.9 cm), this may be due to endogenous content of auxins from the explants; however, by adding 3.12 µM L⁻¹ of IBA, the length of the roots decreases 41%. By adding 13 µM L⁻¹ of NAA to the medium, the maximum number of leaves (3.8 leaves per plant) was obtained, but 5.2 µM L⁻¹ NAA had the highest

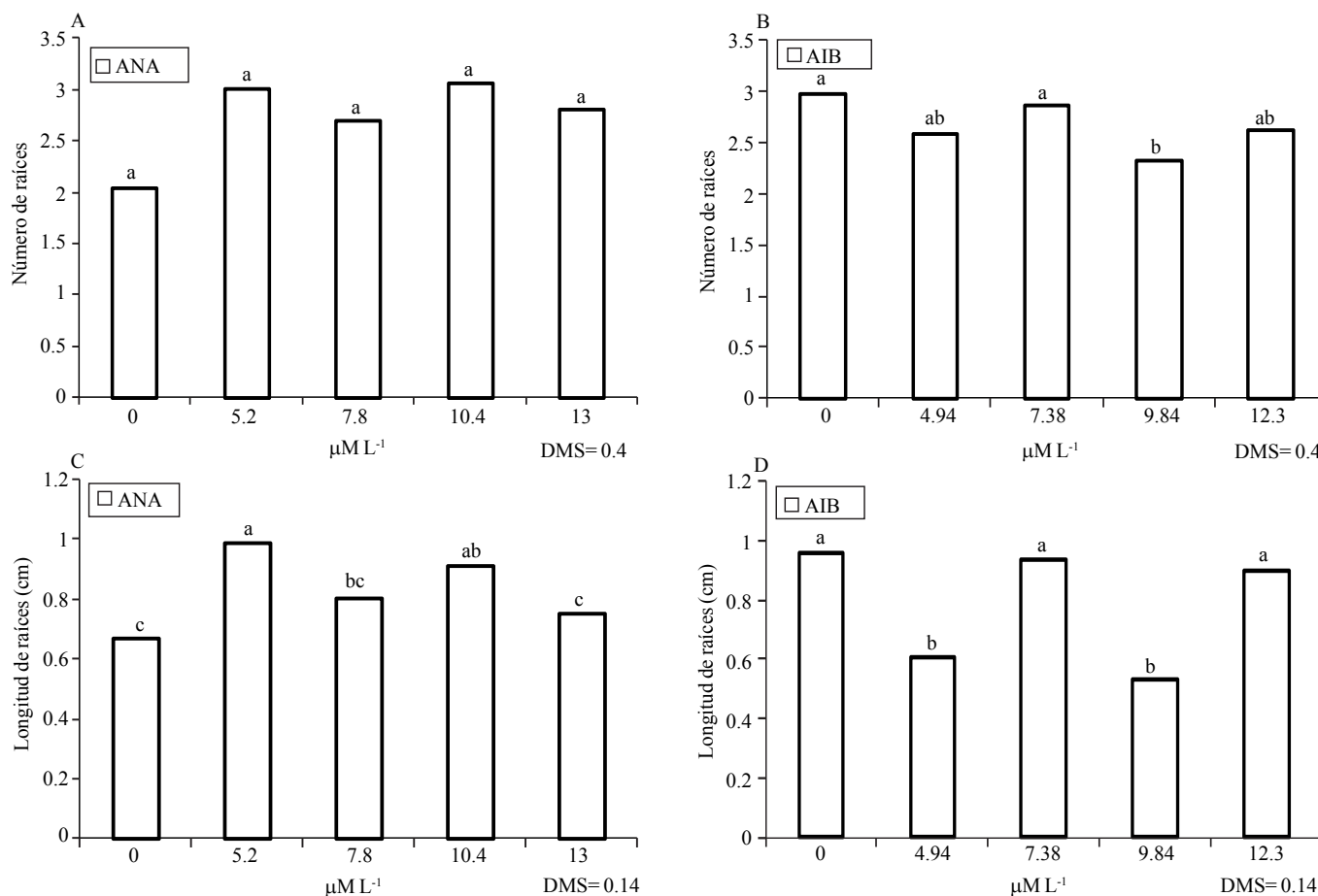


Figura 5. Influencia de la concentración de ANA (A y C) y concentración de AIB (B y D), sobre el número y longitud de las raíces formadas *in vitro* de *L. halbingeriana* a 60 días de incubación.

Figure 5. NAA (A and C) and IBA (B and D) concentration influence on the number and length of roots formed *in vitro* of *L. halbingeriana* at 60 days of incubation.

El AIB afectó marginalmente la rizogénesis, ya que tanto su ausencia como la adición de $7.38 \mu\text{M L}^{-1}$ promovieron la formación de raíces, en concentraciones de 2.98 y $2.86 \mu\text{M L}^{-1}$ respectivamente. Sin embargo, con $9.84 \mu\text{M L}^{-1}$ de AIB disminuyó 22% la formación de raíces (Figura 5 B). En la Figura 5D se observa el efecto de la concentración de AIB en la longitud de las raíces. Los resultados mostraron, que para una mayor longitud de raíces la adición de 7.38 y $12.3 \mu\text{M L}^{-1}$ de AIB, así como la ausencia de ella, promovieron el tamaño de las raíces (0.9 cm), esto se puede deber al contenido endógeno de auxinas de los explantes; sin embargo, al adicionar $12.3 \mu\text{M L}^{-1}$ de AIB la longitud de las raíces disminuye 41%. Al adicionar $13 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA al medio, se obtuvo el máximo número de hojas (3.8 hojas por planta); sin embargo, con $5.2 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA se obtuvo la mayor longitud de 1.25 cm. En la Figura 6A y 6C se observa que la ausencia de la hormona produjo menor número de hojas por planta (3.1) y longitud (1.07 cm) de hojas.

length 1.25 cm. The Figure 6A and 6C shows that, the absence of the hormone produced a lower number of leaves per plant (3.1) and leaf's length (1.07 cm).

Furthermore, the concentration of $7.38 \mu\text{M L}^{-1}$ of IBA was more favorable, as it was on average 3.67 leaves per plant, and by increasing the concentration to $9.84 \mu\text{M L}^{-1}$, the number of leaves decreased by 10%. With respect to the length of the leaves, 0 and $7.38 \mu\text{M L}^{-1}$ produced longer leaves at 1.25 and 1.31 cm respectively. However, it was adversely affected at 20% of the length of the leaves when the concentration of IBA was $12.3 \mu\text{M L}^{-1}$ (Figures 6B and 6D).

Regarding the plant's height, the high concentration of $13 \mu\text{M NAA L}^{-1}$ produced the tallest plants, 1.13 cm on average, but in the absence thereof, achieved only 86% of its growth

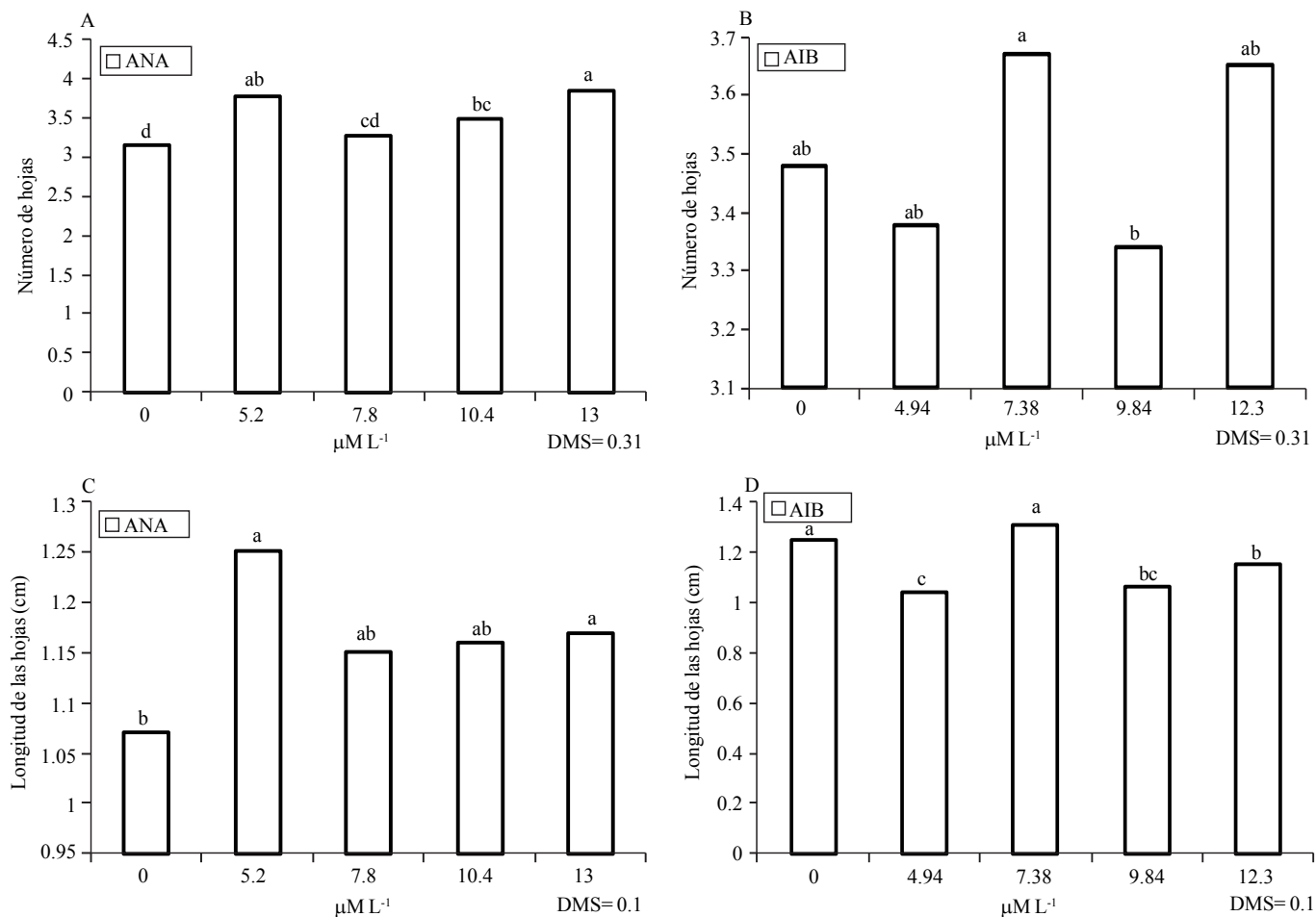


Figura 6. Influencia de la concentración de ANA (A y C) y concentración de AIB (B y D) en el número y longitud de hojas formadas *in vitro* de *L. halbingeriana* a los 60 días de incubación.

Figure 6. NAA (A and C) and IBA (B and D) concentration influence on the number and length of leaves formed *in vitro* of *L. halbingeriana* at 60 days of incubation.

Por otro lado, la concentración de $7.38 \mu\text{M L}^{-1}$ de AIB fue más favorable, ya que se obtuvieron en promedio 3.67 hojas por planta, y al incrementar la concentración hasta $9.84 \mu\text{M L}^{-1}$, disminuyó el número de hojas 10%. Con respecto a la longitud de las hojas, 0 y $7.38 \mu\text{M L}^{-1}$ produjeron hojas más largas en 1.25 y 1.31 cm respectivamente. Sin embargo, se afectó negativamente hasta 20% la longitud de las hojas cuando la concentración de AIB fue de $12.3 \mu\text{M L}^{-1}$ (Figuras 6B y 6D).

Con respecto a la altura de planta, la concentración alta de ANA de $13 \mu\text{M L}^{-1}$ produjo las plantas más altas, de 1.13 cm en promedio; sin embargo, en ausencia del mismo, sólo alcanzaron 86% de este crecimiento (Figura 7A). El AIB produce un valor máximo de altura de planta a la concentración de $7.38 \mu\text{M L}^{-1}$, valores superiores o inferiores disminuyen esta variable respuesta hasta en 20% (Figura 7B).

(Figure 7A). IBA produced a maximum value of the plant's height at the concentration of $7.38 \mu\text{M L}^{-1}$, higher or lower values to reduce this variable's response in 20% (Figure 7B).

CONCLUSIONS

Based on the results, for the *in vitro* propagation of *Laelia halbingeriana* a practical method was able to be established.

For the leaves' formation, the best promoter was IBA in a concentration of $2.22 \mu\text{M L}^{-1}$ in Murashige and Skoog medium.

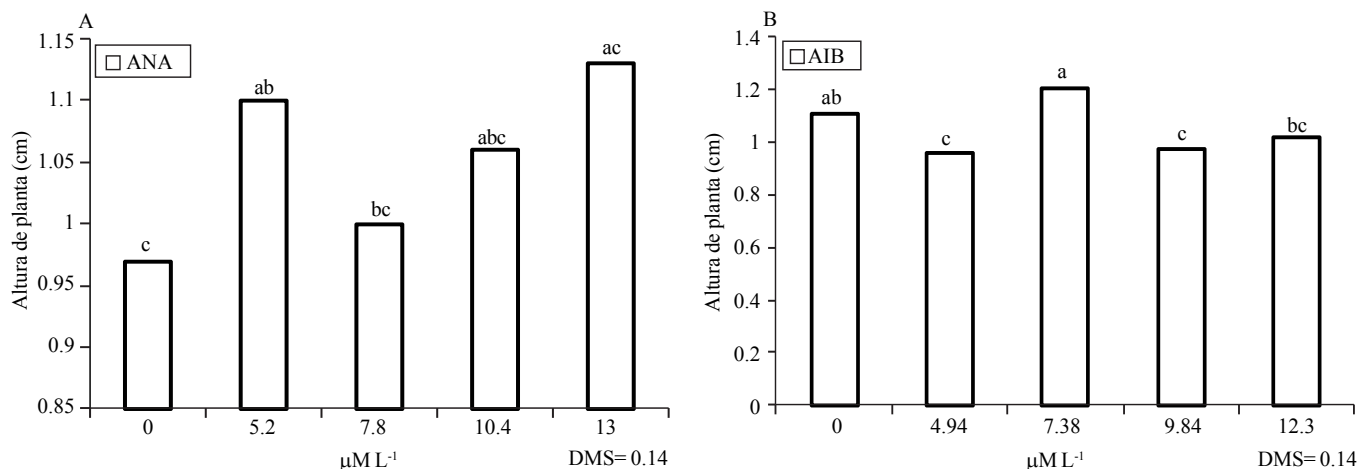


Figura 7. Efecto de la concentración de ANA (A) y de AIB (B) en la altura de plantas formadas de *L. halbingeriana* *in vitro* a 60 días de incubación.

Figure 7. NAA (A) and IBA (B) concentration effect on the plant's height consisting of *L. halbingeriana* *in vitro* at 60 days of incubation.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este trabajo, para la propagación *in vitro* de *Laelia halbingeriana* se logró establecer un método práctico.

Para la formación de hojas el mejor promotor fue BA en una concentración de 2.22 µM L⁻¹ en el medio de cultivo Murashige y Skoog.

De manera general la concentración de sales minerales en el medio y la concentración de azúcar, no influyeron en la formación de hojas y raíces generadas *in vitro* de *Laelia halbingeriana*.

En la fase de enraizamiento *in vitro* la adición de ANA al medio de cultivo promovió el enraizamiento.

LITERATURA CITADA

Araujo, A. G.; Pasqual, M. Pereira, A. R. y Souza, R. H. 2006. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orquidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e carvão ativado. Plant Cell Culture & Micropropagation. 2(2):53-106.

Generally, the concentration of mineral salts in the medium and the concentration of sugar did not influence the formation of the leaves and roots generated *in vitro* of *Laelia halbingeriana*.

For the *in vitro* rooting phase, the addition of NAA into the culture medium, promoted the rooting.

End of the English version



- Coello, C. Y.; Miceli, C. L.; Orantes, C.; Dendooven, L. and Gutiérrez, F. A. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier and Higgins, W. E. Gayana Bot. 67(1):19-26.
- Gil, I. V.; Bastida, A. T.; Flores, G. E. y Navarro, E. L. 2007. Reproducción y manejo de orquídeas Mexicanas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 31-42 pp.
- Hágsater, E.; Soto, A. M. A.; Salazar, C. G. A.; Jiménez, M. M. A.; López, R. Y. y Dressler, R. L. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México. 304 p.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Am Orchid Soc Bull. 15:214-217.

- Moreno, M. D. y Menchaca, G. R. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*. 9(2):27-32.
- Mosquera, E. A.; Bayman, P. y Túoac, O. J. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrizico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*. 59(3):316-326.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.
- Otero, J.; Flanagan, N.; Herre, A.; Ackerman, J. and Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (orchidaceae) *Am. J. Bot.* 94(12):1944-1950.
- Otero, J. T. y Bayman, P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica*. 58(4):270-276.
- Ouyang, T. Chen, S. and Wang, F. S. 2006. Key technology study on *Oncidium* industrial propagation by tissue culture. *Forest Res.* 19(5):606-611.
- Pardo, A.; Michel, C. A.; Magallón, N. y Alvarado, G. 2008. Regeneración *in vitro* de *Billbergia rosea* hortus ex beer a partir de ápices caulinares *Bol. Centro Invest. Biol.* 42(4):491-505.
- Porras-Alfaro, A. y Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of vanilla: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycology*. 99(4):510-525.
- Romero, T. R.; Rosales, S. B. A. L. y Álvarez, A. B. 2007. Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*. *Lankesteriana*. 7(1-2):353-356.
- Sarabia, O. M. E.; Ávila, D. I.; Gómez, A. C. and Salgado, G. R. 2010. Call us growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Lankesteriana*. 10(1):13-18.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). 2003. SAS/STAT User's Guide Release 9.1 ed, Cary, NC, USA.
- Sorace, M.; Tadeu, F. R.; Damasceno, J. C. V.; Gomes, G. P.; Muniz, B. C.; Nesello, F. G.; Lopez, S. G.; Assari, T. L. S. y Schnitzer, A. J. 2008. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 29(4):775-782.
- Suárez, Q. I.; Hernández, A. M.; Chávez, A. V.; Sandoval, Z. y Martínez, P. 2007. Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). *Lankesteriana* 7(1-2):388-393.
- Suárez, J. P.; Michael, W.; Abele, A.; Garnica, S.; Oberwinklerb, F. and Kottke, I. 2006. Diverse tulasnelloid ungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol. Res.* 110:1257-1270.
- Tirado, M. J.; Naranjo, E. J. y Atehorutúa, L. 2005. Propagación *in vitro* de *Phalenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal. "Rita". 7(1):25:31.