

## Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*

Manuel de Feria\*, Maité Chávez, Elisa Quiala \*Autor para la correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mdeferia@ibp.co.cu

### RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos establecer *in vitro* yemas axilares del escapo floral y germinar *in vitro* semillas botánicas de *Phalaenopsis* para obtener la formación de cuerpos protocórmicos. Como material vegetal se utilizaron yemas axilares del escapo floral y semillas botánicas, se realizaron diferentes tratamientos de desinfección con el empleo del Hipoclorito de sodio como agente desinfectante. Los resultados mostraron que fue posible establecer *in vitro* yemas axilares del escapo floral y germinar *in vitro* semillas botánicas de esta orquídea. Se determinó en el caso del establecimiento de las yemas axilares, que en el tratamiento con 2.0% de Hipoclorito de sodio y 15 minutos, se murieron el 20% de las yemas. Sin embargo, con 1.5% de Hipoclorito de sodio y 15 minutos se logró un 80% de yemas brotadas, no se produjeron pérdidas por muerte y se presentó un 20% de contaminación microbiana. Se observó además, que como promedio las yemas axilares brotaron a los 13 días de cultivo. En relación con la desinfección de las semillas botánicas, el mejor tratamiento resultó ser 1.5% de Hipoclorito de sodio y 20 minutos con 12.5% de contaminación microbiana. La germinación de las semillas botánicas se inició como promedio a los 23 días de cultivo y los primeros cuerpos protocórmicos fueron observados a las seis semanas de cultivo.

Palabras clave: cuerpos protocórmicos, desinfección, orquídeas, semillas botánicas

### ABSTRACT

The present work had as objectives to establish *in vitro* axillary buds of the floral stalk and to germinate *in vitro* botanical seeds of *Phalaenopsis* to obtain the formation of protocorm like bodies. As vegetable material axillary buds of the floral stalk and botanical seeds were used, different disinfection treatments with the employment of the Hypochlorite of sodium like disinfectant agent were carried out. The results showed that it was possible to establish *in vitro* axillary buds of the floral stalk and to germinate *in vitro* botanical seeds of this orchid. It was determined in the case of the establishment of the axillary buds that in the treatment with 2.0% of Hypochlorite of sodium and 15 minutes, 20% of the buds died. However, with 1.5% of Hypochlorite of sodium and 15 minutes 80% of sprouted buds was achieved, losses didn't take place for death and 20% of contamination was presented. It was also observed that like average the axillary buds sprouted to the 13 culture days. With relationship to the disinfection of the botanical seeds, the best treatment turned out to be 1.5% of Hypochlorite of sodium and 20 minutes, this treatment presented 12.5% of contamination. The germination of the botanical seeds began, as average, after 23 days of culture and the first protocorm like bodies were observed after six weeks of culture.

Key words: botanical seeds, disinfection, protocorm like bodies, orchids

### INTRODUCCIÓN

*Phalaenopsis* es una orquídea epífita, originaria del sureste de Asia, India, Indonesia y parte de Australia (Rittershausen y Rittershausen, 2004), se cultiva principalmente para el corte de flores y como planta ornamental para decoraciones de interiores. En Europa, sólo en el año 2002 se produjeron 22.8 millones de plantas (Hempfling y Preil, 2005).

Como resultado de extensivos trabajos de hibridación, esta orquídea se ha ofrecido a los consumidores en una gran diversidad de colores y tamaños.

Sin embargo, su crecimiento monopodial, es decir, a partir de una yema apical hace que se dificulte su multiplicación vegetativa, al tiempo que su

reproducción sexual se ha visto afectada por la esterilidad de algunos de sus híbridos (Jiménez y Guevara, 1996).

La mayoría de las *Phalaenopsis* cultivadas comercialmente son propagadas por semillas botánicas, en consecuencia se expresa un amplio espectro de variabilidad fenotípica, con diferencias en la forma de crecimiento, tiempo de floración y hasta en las características florales. También se han desarrollado protocolos para la propagación *in vitro* tanto por embriogénesis somática (Ishii *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000), como por organogénesis (Tokuhara y Mii, 2001; Park *et al.*, 2002) a partir de diferentes tejidos adultos de la planta como las hojas, los ápices radiculares, ápices caulinares y secciones del escapo floral.

Muchos de estos protocolos se realizaron con el objetivo de obtener la formación de cuerpos protocórmicos a partir de los cuales se logra la regeneración de plantas, y con ello se pueden minimizar las dificultades que se presentan al emplear semillas botánicas. Los protocormos son cuerpos que se encuentran en un estado intermedio entre un embrión cigótico y un vástago, cuando estos cuerpos se forman sobre tejido adulto reciben el nombre de cuerpos protocórmicos (Pierik, 1990).

En Cuba, existe una de las mayores colecciones naturales de orquídeas del Caribe, con más de 25 000 especies y diferentes investigadores han realizado trabajos para la conservación mediante técnicas biotecnológicas de algunas especies endémicas (Rodríguez *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, no se han descrito resultados específicamente con *Phalaenopsis* y se requiere del desarrollo de protocolos para su propagación *in vitro*, es por ello, que en el presente trabajo se propuso como objetivos lograr el establecimiento *in vitro* de yemas axilares del escapo floral para inducir la formación de cuerpos protocórmicos y germinar *in vitro* semillas botánicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron plantas que tenían entre tres y cinco años de cultivo y que habían florecido al menos en dos ocasiones, a partir de ellas se obtuvieron escapos florales e inflorescencias bien desarrolladas que garantizaron la calidad del material vegetal de partida para el desarrollo de las investigaciones *in vitro*.

### Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del escapo floral

Una vez concluido el período de floración, los escapos florales con una longitud entre los 30 y 35 cm fueron cortados y a partir de ellos se

tomaron segmentos de aproximadamente 3.0 cm de longitud con una yema axilar latente (Figura 1). En el laboratorio se eliminaron las brácteas que cubrían cada yema axilar, luego se realizó un lavado a cada segmento con agua común y detergente comercial a una concentración de 0.5 g.l<sup>-1</sup>, teniendo cuidado de no dañar la yema axilar, la cual puede desprenderse con facilidad. Se realizó una primera desinfección superficial con etanol al 70% durante un minuto a todos los segmentos del escapo floral y en un primer experimento, el cual fue repetido dos veces en el tiempo, se evaluó el efecto de la inmersión de los segmentos del escapo floral durante 15 minutos en tres concentraciones de Hipoclorito de sodio (NaOCl) (1.0, 1.5 y 2.0%). A cada tratamiento de desinfección se le añadió Tween 20 a razón de 1.0 ml.l<sup>-1</sup> y se colocaron 10 segmentos por tratamiento.

El medio de cultivo empleado para el establecimiento *in vitro* de yemas axilares del escapo floral estuvo compuesto por las sales inorgánicas descritas por Vacin y Went (1949) y 200 ml.l<sup>-1</sup> de agua de coco, 4.0 mg.l<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), 2.0 g.l<sup>-1</sup> de carbón activado y 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa. El pH fue ajustado a 5.8 antes de la esterilización y como agente gelificante se empleó Phytigel a razón de 2.0 g.l<sup>-1</sup> de medio de cultivo.

Se dosificaron 15 ml de medio de cultivo por tubo de ensayo (21 mm x 115 mm) y se esterilizaron durante 15 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión y 121°C de temperatura.

Después de la desinfección superficial, y ya en condiciones de asepsia, los segmentos de todos los tratamientos fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril y las partes dañadas por la acción del Hipoclorito de sodio fueron eliminadas hasta obtener un segmento del escapo floral de aproximadamente 1.5 cm de longitud el cual fue colocado en un tubo de ensayo (Figura 2).



Figura 1. Segmento del escapo floral de *Phalaenopsis* de aproximadamente 3.0 cm de longitud, el cual contiene una yema axilar en estado latente.

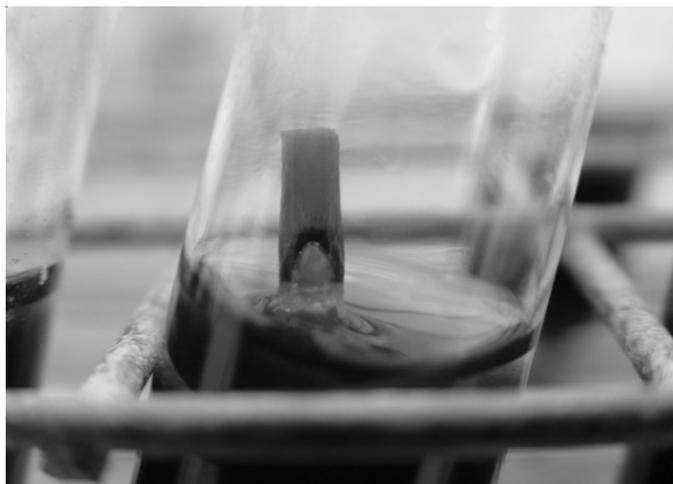


Figura 2. Segmento del escapo floral de *Phalaenopsis* con una yema axilar en estado latente, colocado en condiciones *in vitro* para su establecimiento.

La temperatura de la cámara de crecimiento de luz solar fue de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre  $45\text{-}55 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Las evaluaciones se realizaron diariamente y de forma visual durante 30 días de cultivo para determinar el tiempo de brotación de las yemas axilares (días), el número de yemas axilares brotadas por tratamiento, así como las posibles afectaciones por contaminación microbiana en cada tratamiento.

Se consideró como una yema axilar brotada, aquella que dio lugar a la formación de un brote con dos hojas bien definidas.

El procesamiento estadístico de todos los datos se realizó mediante el paquete SPSS para Windows versión 8.0 y dentro de este un ANOVA de clasificación simple con la correspondiente prueba Duncan.

#### **Germinación de semillas botánicas**

Para la germinación de las semillas botánicas, se empleó como medio de cultivo el compuesto por el 100% de las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962) y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de tiamina,  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de 6-BAP,  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de mio-inositol,  $2.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de carbón activado y  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de sacarosa, igualmente el pH fue ajustado a 5.8 antes de la esterilización y como agente gelificante se empleó Phytigel a razón de  $2.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de medio de cultivo.

Como resultado de la fecundación artificial entre flores de diferentes plantas se obtuvo la formación de cápsulas (Figura 3) que se desarrollaron y maduraron aproximadamente en cuatro meses,

momento a partir del cual fueron cortadas un total de seis cápsulas para lograr la germinación *in vitro* de las semillas botánicas.

En el laboratorio, las cápsulas fueron lavadas con agua común y detergente comercial a una concentración de  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  y se colocaron durante un minuto en etanol al 70%. Luego fueron sumergidas en una solución de NaClO al 1.5% donde permanecieron en agitación durante 10, 15 y 20 minutos.

Se colocaron dos cápsulas por cada tiempo de inmersión en el desinfectante. La solución de Hipoclorito de sodio contenía además, Tween 20 a una concentración de  $1.0 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Después de la desinfección y en condiciones de asepsia, las cápsulas de cada tratamiento fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril y se procedió a extraer las semillas botánicas de su interior. Las mismas fueron colocadas en 16 tubos de ensayo ( $21 \text{ mm} \times 115 \text{ mm}$ ) que tenían 15 ml del medio de cultivo descrito anteriormente (ocho tubos por cápsula).

Se evaluaron diariamente las posibles afectaciones por contaminación microbiana y se determinó el tiempo de germinación de las semillas (días), lo cual fue considerado cuando se observaron cambio de color (de amarillo a verde). A partir de ese tiempo se evaluó también de forma visual hasta los 90 días de cultivo la formación de los cuerpos protocórmicos.

El procesamiento estadístico de todos los datos se realizó mediante el paquete SPSS para Windows versión 8.0 y dentro de este un ANOVA de clasificación simple con la correspondiente prueba Duncan.

### Formación de cuerpos protocórmicos

Cuando las hojas del brote obtenido de la yema axilar alcanzaron un tamaño de aproximadamente 5.0 cm de largo, fueron separadas de tal forma que el meristemo no se dañara y se pudiera formar un nuevo par de hojas. Las hojas cortadas fueron divididas en secciones de 0.7-1.5 cm de largo por 0.5 a 0.7 cm de ancho y fueron colocadas con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo (Figura 4) en recipientes de cultivo con un volumen total de 500 ml y que contenía 60 ml de un medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962) y 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 10.0 mg.l<sup>-1</sup> de adenina, 30.0 mg.l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 10.0 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de ácido naftalen acético, 100 mg.l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2.0 g.l<sup>-1</sup> de carbón activado y 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa.

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 previo a la adición de 2.0 g.l<sup>-1</sup> de Phytigel, fue esterilizado en autoclave a una presión de 1.2 kg·cm<sup>-2</sup> y 121°C de temperatura durante 20 minutos. Inicialmente los

cultivos fueron incubados en condiciones de oscuridad durante 15 días a 26±1.0 °C para luego ser transferidos a cámaras de crecimiento de luz solar con 28 ± 2°C de temperatura y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre 45-55 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Se colocaron un total de nueve secciones de hojas por recipiente de cultivo y un total de 10 recipientes, los subcultivos de estas secciones de hojas se realizaron cada 21 días, y se evaluó el tiempo de aparición de los cuerpos protocórmicos y el número de secciones de hojas que formaron estas estructuras.

El procesamiento estadístico de todos los datos se realizó mediante el paquete SPSS para Windows versión 8.0 y dentro de este un ANOVA de clasificación simple con la correspondiente prueba Duncan.

En el caso de las semillas botánicas, estas no fueron subcultivadas y permanecieron por espacio de tres meses en el mismo tubo de ensayo, transcurrido ese tiempo se realizó el subcultivo de los cuerpos protocórmicos que se formaron.



Figura 3. Cápsula de cuatro meses de cultivo, obtenida a partir de la fecundación artificial de diferentes flores de *Phalaenopsis*.



Figura 4. Secciones de hojas obtenidas a partir del brote formado de la yema axilar del escapo floral de las plantas de *Phalaenopsis* después de 30 días de cultivo y que fueron colocadas con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo para la formación de cuerpos protocórmicos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del escapo floral

Se observó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con 1.5 y 2.0% de NaOCl con respecto al número de yemas axilares brotadas y con presencia de contaminación microbiana (Tabla 1). Sin embargo, en el tratamiento con 2.0% se produjo la muerte como promedio de dos yemas axilares probablemente por la acción del NaOCl durante el proceso de desinfección. Se observó además, que en el caso de las yemas axilares que brotaron, el inicio de esta brotación se ocurrió como promedio a los 13 días de cultivo.

Autores como Borges *et al.* (2004) describieron en *Guadua angustifolia* que los mayores porcentajes de muerte en yemas desinfectadas con NaOCl, coincidieron con los tratamientos de mayor concentración (2.0 y 3.0%).

Estos mismos autores mencionan cómo a medida que se incrementó la concentración de NaOCl, disminuyeron las pérdidas por contaminación microbiana, lo cual demuestra una vez más el papel de este compuesto como agente desinfectante.

Los resultados del presente trabajo coinciden con los descritos en *Phalaenopsis* por Reynoso *et al.* (2004), estos autores lograron la desinfección del mayor número de yemas axilares del escapo floral con una concentración de 1.5% de NaOCl durante 15 minutos.

A partir de los resultados, se seleccionó como mejor tratamiento para la desinfección de los segmentos del escapo floral de plantas de *Phalaenopsis*, el que combinó 1.5% de NaOCl con un tiempo de 15 minutos, con lo cual se obtuvo como promedio un 80% de establecimiento *in vitro* y no se produjo la muerte de ninguna yema axilar.

### Germinación de semillas botánicas

Se observó que como promedio la germinación de las semillas botánicas se produjo a los 23 días de cultivo, sin diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, lo que demuestra la uniformidad en el desarrollo y la maduración de las semillas botánicas provenientes de las distintas cápsulas colectadas para este estudio.

Las mayores afectaciones por la presencia de contaminación microbiana (50.0%) se produjeron en el tratamiento con 10 minutos de desinfección, es decir, el menor tiempo, mientras que, a medida que se incrementaron los tiempos de desinfección estos porcentajes disminuyeron hasta 12.5%.

Autores como Rodríguez *et al.* (2001), utilizaron 3.5% de cloro activo durante cinco minutos y lograron desinfectar y germinar *in vitro* semillas botánicas de cuatro especies de orquídeas cubanas, ellos observaron que las primeras semillas botánicas germinaron a los 56 días, mientras que la especie que más demoró en germinar fue *Oeceoclade maculata* que necesitó 168 días de cultivo.

Por su parte, Rodríguez *et al.* (2003) con la especie de orquídea *Cattleya labiata* emplearon entre otros compuestos para la desinfección de las cápsulas, NaOCl al 1.0% durante cinco minutos y obtuvieron en dependencia de la composición del medio de cultivo y el estado físico de estos, que las semillas germinaron entre los 35 y 71 días de cultivo.

Tanto estos resultados como los obtenidos en el presente trabajo, demuestran la influencia que tiene el genotipo en el comportamiento *in vitro* de cada especie en particular.

Por su parte, Quiala *et al.* (2005) al desinfectar semillas botánicas de *Guettarda clarensis*, una especie endémica de Cuba, obtuvieron los mejores resultados (50% de desinfección) empleando 2.0% de NaOCl combinado con el mayor tiempo (25 minutos) de inmersión de las semillas botánicas en dicho compuesto.

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de Hipoclorito de sodio aplicadas durante 15 minutos, en la desinfección de yemas axilares del escapo floral de plantas de *Phalaenopsis*, después de 30 días de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro* (n=10).

Concentración de NaOCl (%) (v/v de cloro libre)	No. de yemas axilares brotadas	No. de yemas axilares del escapo floral contaminadas
1.0	4.0 b	5.0 a
1.5	8.0 a	2.0 b
2.0	7.0 a	1.0 b

Medias identificadas con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para  $p < 0.05$  según la prueba de Duncan.

De forma similar ocurrió en el presente estudio a pesar de trabajar con un material vegetal de diferentes características, lo cual deja abierta la necesidad de evaluar nuevos tratamientos de desinfección con el objetivo de reducir o eliminar los porcentajes de contaminación microbiana obtenidos (12.5%) con el mayor tiempo de exposición de las cápsulas al desinfectante.

El NaOCl es uno de los desinfectantes más ampliamente empleados para la introducción *in vitro* de material vegetal libre de contaminantes microbianos exógenos (Rodríguez *et al.*, 2003; Posada-Pérez *et al.*, 2004; Quiala *et al.*, 2004). Los principales estudios al respecto evalúan el empleo de diferentes concentraciones de este producto combinadas con diferentes tiempos de exposición del material vegetal a la presencia de este compuesto (Collado *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2004; Quiala *et al.*, 2005).

Los resultados del presente trabajo confirman la necesidad de evaluar y profundizar en los estudios relacionados con la desinfección de las cápsulas de *Phalaenopsis*, para disminuir o incluso erradicar la presencia de contaminantes microbianos que luego se pueden manifestar *in vitro*.

#### Formación de cuerpos protocórmicos

La formación de cuerpos protocórmicos se observó en el caso de las secciones de hojas entre las cuatro y cinco semanas de cultivo. Estas estructuras se presentaron en forma de pequeñas protuberancias de color verde, confinadas mayormente a los márgenes foliares que fueron cortados, y donde eventualmente alguna dio lugar a un nuevo brote.

Se determinó además, que el 91.3% de las secciones de hojas formaron este tipo de estructura. En el caso de las secciones de hojas, el mayor número de cuerpos protocórmicos se obtuvo entre los 70 y 90 días de cultivo, es decir, entre el cuarto y quinto subcultivo. Estas estructuras se expandieron gradualmente desde adentro hacia fuera, en forma de una gran masa. Una característica de las mismas fue que no hubo interferencia mutua, es decir, cada protocormo pudo ser separado fácilmente del otro.

En el caso de las semillas botánicas los primeros cuerpos protocórmicos fueron observados entre las seis y siete semanas de cultivo, estos se presentaron en forma de pequeños grupos con una apariencia globular y en los cuales la diferenciación en plantas ocurrió con mayor frecuencia respecto a las estructuras que se formaron en las secciones de hojas.

#### CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis* a partir tanto de las yemas axilares del escapo floral,

como de las semillas botánicas. Ambos tipos de materiales vegetales dieron lugar a la formación de cuerpos protocórmicos.

Al emplear secciones de hojas obtenidas de las yemas axilares que brotaron del segmento del escapo floral, se pudo disponer de material vegetal sin depender de la época de floración de la planta, debido a los continuos subcultivos que se realizaron a los brotes que se produjeron de las yemas establecidas *in vitro*. Sin embargo, si bien es cierto que al trabajar con semillas botánicas el protocolo se limitó a la época de floración de la planta, esta vía resultó muy eficiente en cuanto al número de cuerpos protocórmicos que se obtuvieron en comparación con las secciones de hojas y por lo tanto, se convirtió en una alternativa para la propagación de esta orquídea cuando se disponga de los progenitores de un determinado híbrido que se desee multiplicar.

#### REFERENCIAS

- Borges, M, Ros C, Castellanos Y, Milanes S y Velásquez R (2004) Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. Biotecnología Vegetal 4 (4): 237-242
- Collado, R, Barbón, R, Agramonte, D, Jiménez, F, Pérez, M, Gutiérrez, O y Ramírez, D (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King. Biotecnología Vegetal 4 (3): 143-146
- Chen, YC, Chang C y Chang WC (2000) A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 36 (5): 420-423
- Hempfling, T, Preil W (2005) Application of a temporary immersion systems in mass propagation of *Phalaenopsis*. En: Hvoslef-Eide AK y Preil W (Eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 231-242. Springer. Dordrecht
- Ishii, Y, Takamura T, Goi M, Tanaka M (1998) Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Report* 17 (6-7): 446-450
- Jiménez, V, Guevara E (1996) Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*) mediante el cultivo de secciones de ejes florales después de la senescencia de las flores. *Agronomía Costarricense* 20 (1): 75-79
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- Park, SY, Murthy HN, Paek KY (2002) Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 38: 168-172
- Pierik, KL (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi Prensa, p. 301. Madrid
- Posada-Pérez, L, Gómez R, Gallardo J, Reyes M, Herrera I (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99. Biotecnología Vegetal 4 (3): 153-158
- Quiala, E, Montalvo G, Matos J, Chávez M, de Fera M, Mederos R (2005) Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Guettarda clarensis*, especie endémica de Cuba en peligro de extinción. Biotecnología Vegetal 5 (1): 23-26

- Quijala, E, Montalvo G, Matos J, de Feria M, Mederos R, Chávez M (2004) Establecimiento *in vitro* de *Erythroxylum echinodendron*. Biotecnología Vegetal 4 (3): 187-190
- Reynoso, GA, Mejía JB, Navarro I, Pérez R (2004) Propagación masiva de *Phalaenopsis* a través de secciones foliares. En: V Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO 04. (Junio). Republica Dominicana
- Rittershausen, B, Rittershausen W (2004) Growing orchids. Southwater, p. 256. London
- Rodríguez, L, González R, Díaz A, Fajardo E, Sánchez E, Hernández J, Castañeira M, de la Cruz G, González J (2003) Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiata*. Biotecnología Vegetal 3 (2): 119-121
- Rodríguez, L, Valles JR, González R, Alvarado K, Téllez E, Díaz A, Sánchez E (2001) Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. Biotecnología Vegetal 1 (2): 115-116
- Tokuhara, K, Mii M (2001) Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 37 (4): 457-461
- Vacin, E, Went F (1949) Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*. 110: 605-613