

## EFFECTO DEL AMBIENTE DE DESARROLLO SOBRE LA ANATOMÍA DE LA EPIDERMIS FOLIAR DE *Cattleya jenmanii* Rolfe

Jhonathan Torres<sup>1</sup>, Libia Laskowski<sup>1</sup> y María E. Sanabria<sup>2</sup>

### RESUMEN

La orquídea *C. jenmanii* es una planta de interés ornamental endémica de Venezuela. En este trabajo se comparó la epidermis foliar en condiciones de orquideario, multiplicación *in vitro* y aclimatización. Se cultivaron plantas adultas en orquideario y líneas *in vitro* en medio Murashige-Skoog. Las vitroplantas enraizadas fueron aclimatizadas en un propagador de neblina durante una semana, cámara húmeda por cuatro semanas y orquideario durante tres semanas. Las muestras se procesaron mediante técnicas de microtecnia clásica. Las prácticas de cultivo *in vitro* indujeron el desarrollo de una epidermis con las siguientes alteraciones de la anatomía normal: mayor tamaño de las células típicas, menor espesor de las paredes anticlinales, menor tamaño de los estomas, además de la formación de estomas y tricomas en la superficie adaxial. En las hojas provenientes de la aclimatización hubo una tendencia a revertirse las alteraciones observadas *in vitro*, con el incremento de tamaño de los estomas y el engrosamiento de las paredes anticlinales de las células típicas, lo cual sugiere que para lograr su adaptación al orquideario, las hojas sufren cambios en sus células típicas conducentes al incremento de su resistencia mecánica y rigidez. Sin embargo, la permanencia de tricomas glandulares y estomas en la superficie adaxial sugieren que la adaptación de las hojas a las condiciones *ex vitro* no se completó durante las ocho semanas de aclimatización.

**Palabras clave adicionales:** Propagación *in vitro*, aclimatización, orquídeas

### ABSTRACT

#### Environmental effect during growth on anatomical characteristics of leaf epiderm in *Cattleya jenmanii* Rolfe

The orchid *C. jenmanii* is an important endemic ornamental plant in Venezuela. In this research, leaf epidermal structure development under three environments (orchid house, *in vitro* multiplication phase and acclimatization) was compared. Adult plants were cultivated in orchid house, and organogenic lines propagated *in vitro* using Murashige-Skoog medium. Rooted micropropagated plants were acclimatized in a mist propagator for one week, humid chamber for four weeks, and orchid house during three weeks. The samples were processed by means of classical microtechnique procedures. The leaf epiderm *in vitro* development was abnormal, with increased dimensions of typical epidermic cells, reduction in anticlinal wall thickness, reduction of stomata size, and neo-formation of stomata and epidermic hairs in the adaxial surface. In contrast, leaves developed during acclimatization showed a reversion of abnormalities observed *in vitro*, with an increase of stomata size and anticlinal walls thickness. However, the permanence of adaxial leaf hairs and stomata suggest an incomplete adaptation of leaves to the external environment during the eight-week acclimatization.

**Additional key words:** *In vitro* propagation, acclimatization, orchids

### INTRODUCCIÓN

La producción comercial de orquídeas depende de un conjunto de técnicas de propagación *in vitro* que varían de acuerdo a las características y naturaleza del material vegetal que se requiere propagar. Independientemente del método empleado, los ejemplares obtenidos deben ser aclimatizados. En esta etapa ocurren pérdidas

considerables que se deben, principalmente, a fallas en la adaptación al ambiente *ex vitro* (Masooma et al., 1998; Majada et al., 2000). La superación parcial de tales fallas requiere de medidas que pueden incrementar los costos de producción, además de dificultar las labores de cultivo. El conocimiento acerca de la manera en que el ambiente de desarrollo *in vitro* y aclimatización afectan la anatomía de las

---

Recibido: Octubre 31, 2005

Aceptado: Julio 31, 2006

<sup>1</sup> Dpto. de Ciencias Biológicas. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". e-mail: jhonathanortorres@ucla.edu.ve

<sup>2</sup> Posgrados de Agronomía. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: mesanabria@ucla.edu.ve

vitroplantas es necesario para diseñar prácticas de manejo más eficaces. Esto ha sido demostrado en los estudios realizados por Donnelly et al. (1985) en *Rubus idaeus*, Dami y Hughes (1995) en vid, Pospisilová et al. (1998) en tabaco, Zobayed et al. (1999) en papa, Majada et al. (2000; 2002) en clavel, Seon et al. (2000) en *Rehmannia glutinosa* y Anita et al. (2000) en *Dendrobium*. Estos autores describieron los efectos del ambiente sobre la anatomía de vitroplantas y señalaron que son determinantes para la adaptación en las condiciones *ex vitro*.

La orquídea, *Cattleya jenmanii* Rolfe, una especie endémica de interés hortícola en Venezuela (Foldats, 1970), presenta dificultades de adaptación que producen altas tasas de fallo durante la fase de aclimatización. Por tanto, el propósito del presente trabajo fue describir y comparar la anatomía de la epidermis foliar de esta planta en orquideario, multiplicación *in vitro* y aclimatización a fin de contribuir al conocimiento de las posibles causas anatómicas que influyen en la aclimatización de la especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 plantas adultas cultivadas en el orquideario del Posgrado de Horticultura de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, en Tarabana, estado Lara, Venezuela, bajo una luminosidad máxima de 180 a 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . Durante la micropropagación se utilizaron dos líneas pertenecientes a la Unidad de Biotecnología de la misma universidad.

Se empleó la modificación del medio de Murashige-Skoog (1972) utilizada para el cultivo de *Cattleya* por Torres y Mogollón (1997) con 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Bencil Adenina (BA). La luminosidad en el cuarto de crecimiento fue de 37,8  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , el fotoperíodo de 16 h y la temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Se usaron recipientes de cristal con tapa translúcida precintada con Paraplast. Al final del período de propagación *in vitro* se tomaron dos muestras de 24 individuos diferentes y el resto de las vitroplantas cultivadas se transfirieron a la fase de aclimatización.

Las vitroplantas enraizadas fueron tratadas con una solución de 3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ridomil y plantadas en maceteros de 8 cm de diámetro en fibra molida de helecho arborescente y colocadas en propagador de neblina, con una frecuencia de aspersión de 5 minutos cada 24 horas, durante una semana.

Luego fueron transferidas a una cámara húmeda con una luminosidad de 40 a 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  durante 4 semanas y al orquideario durante 3 semanas, al cabo de las cuales se realizó la toma de muestras en 24 plantas.

Para el estudio anatómico comparado se emplearon 48 muestras de cada condición de cultivo, que consistieron en secciones extraídas del tercio medio de hojas adultas del simpodio más reciente. Estas secciones fueron posteriormente subdivididas y fijadas en FAA (Roth, 1964).

Las extracciones de epidermis se realizaron por hidrólisis en caliente con una mezcla 1:1 de ácido nítrico y ácido crómico al 10% en agua durante 3 a 5 minutos (Roth, 1964) para las plantas provenientes del orquideario, y con hipoclorito de calcio comercial al 70 % durante 5 a 7 minutos para las provenientes de multiplicación *in vitro* y aclimatización. Se tiñeron con safranina y se montaron en Permount las provenientes del orquideario o glicerol al 50%, las de las restantes condiciones de cultivo.

Las observaciones se realizaron en el Laboratorio de Microscopía del Instituto de Biología Molecular y Celular de las Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, España. Se utilizó un microscopio óptico Nikon Eclipse E600.

Las variables de longitud, anchura y densidad de células típicas epidérmicas, grosor de paredes anticlinales, longitud y anchura de estomas, anchura de células oclusivas, densidad estomática e índice estomático, se midieron en fotomicrografías tomadas con una cámara digital de la casa Soft Imaging System y el procesamiento de imágenes con el programa AnalySIS 3.1.

Se tomaron datos de dos a diez campos en 10 hojas de cada ambiente y se analizaron mediante el programa Statgrafics Plus 5.1. Para ello se realizaron transformaciones de datos, análisis de varianza y prueba de medias de Duncan para aquellos datos que se ajustaban a la distribución normal, mientras que los datos que no se ajustaban a dicha distribución se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS

### Descripción anatómica de la epidermis adaxial

En las láminas foliares de las plantas *in vitro* y aclimatizadas se observó que la epidermis adaxial

presentó tricomas glandulares, formados por tres células y que dejaban una cicatriz al caer. En las plantas adultas cultivadas en orquideario se observó una epidermis glabra.

Las células típicas epidérmicas resultaron ser poligonales alargadas, predominantemente hexagonales, aunque también pentagonales, heptagonales y octagonales en las plantas *in vitro*, aclimatizadas y adultas. Las paredes anticlinales de estas células se observaron ligeramente engrosadas y para el caso de las hojas de plantas de orquideario presentaban punteaduras primarias, visibles al microscopio óptico.

Los estomas, que se presentaron aislados en áreas de la lámina cercanas al margen, resultaron del tipo tetracítico en hojas anfiestomáticas provenientes de plantas *in vitro* y aclimatizadas, mientras que las hojas de plantas de orquideario resultaron ser hipoestomáticas (Figura 1).

#### Cuantificación de variables en la epidermis adaxial

El ambiente de desarrollo afectó la longitud y el grosor de las paredes anticlinales de las células epidérmicas típicas en la superficie adaxial de las hojas, pero no la anchura y densidad de las mismas (Cuadro 1). La longitud varió desde un máximo de 64,7  $\mu\text{m}$  en aclimatización, hasta un mínimo de 56,1  $\mu\text{m}$  en orquideario. El grosor de las paredes anticlinales varió desde un máximo de

5,3  $\mu\text{m}$  en orquideario hasta un mínimo de 1,8  $\mu\text{m}$  en multiplicación *in vitro*.

#### Descripción anatómica de la epidermis abaxial

La epidermis abaxial del tercio medio de las láminas foliares de plantas del orquideario, propagadas *in vitro* y aclimatizadas de *C. jenmanii* resultó ser glabra.

Las células epidérmicas típicas fueron poligonales alargadas, predominantemente hexagonales en las aclimatizadas, pentagonales o también hepta o hexagonales en las hojas de plantas *in vitro* y adultas.

Con relación a las paredes celulares anticlinales engrosadas, éstas se observaron rectas, aunque en las aclimatizadas algunas las presentaron arqueadas. Los estomas fueron numerosos y de tipo predominantemente tetracítico, distribuidos de forma desordenada, fundamentalmente con cuatro o cinco células subsidiarias y hasta seis en hojas de plantas *in vitro* (Figura 2).

#### Cuantificación de variables en la epidermis abaxial

El ambiente de desarrollo afectó el ancho y grosor de las paredes anticlinales de las células epidérmicas típicas, así como la longitud y anchura de estomas, y la anchura de células oclusivas en la superficie abaxial de las hojas, aunque no la longitud de las células típicas (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Dimensiones, densidad celular promedio y grosor de paredes anticlinales en la epidermis adaxial de hojas de *C. jenmanii* desarrolladas en orquideario, fase de multiplicación *in vitro* y aclimatización.

| Ambiente de desarrollo foliar  | Long. cel. típicas ( $\mu\text{m}$ )* (1)(2) | Anchura células típicas ( $\mu\text{m}$ ) | Densidad células ( $\text{cel}\cdot\text{mm}^2$ ) | Grosor paredes anticlinales( $\mu\text{m}$ )*(3)(4) |
|--------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Orquideario                    | 56,1 c                                       | 33,5 a                                    | 747,4 a                                           | 5,3 a                                               |
| Multiplicación <i>in vitro</i> | 60,1 b                                       | 34,3 a                                    | 780,9 a                                           | 1,8 c                                               |
| Aclimatización                 | 64,7 a                                       | 33,6 a                                    | 817,7 a                                           | 2,2 b                                               |

Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar, n= 80 de 10 hojas diferentes

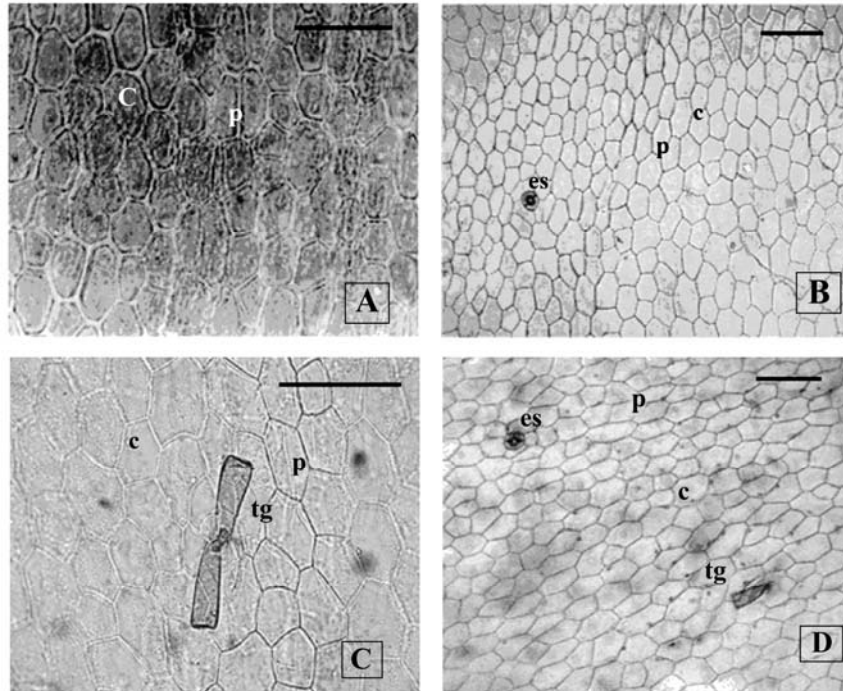
(1) Prueba de Duncan; (2) Para valores transformados de acuerdo a la ecuación  $Y=\log 10(X)$

(3) Prueba de Kruskal-Wallis; (4) Determinado mediante gráficos de caja y bigote

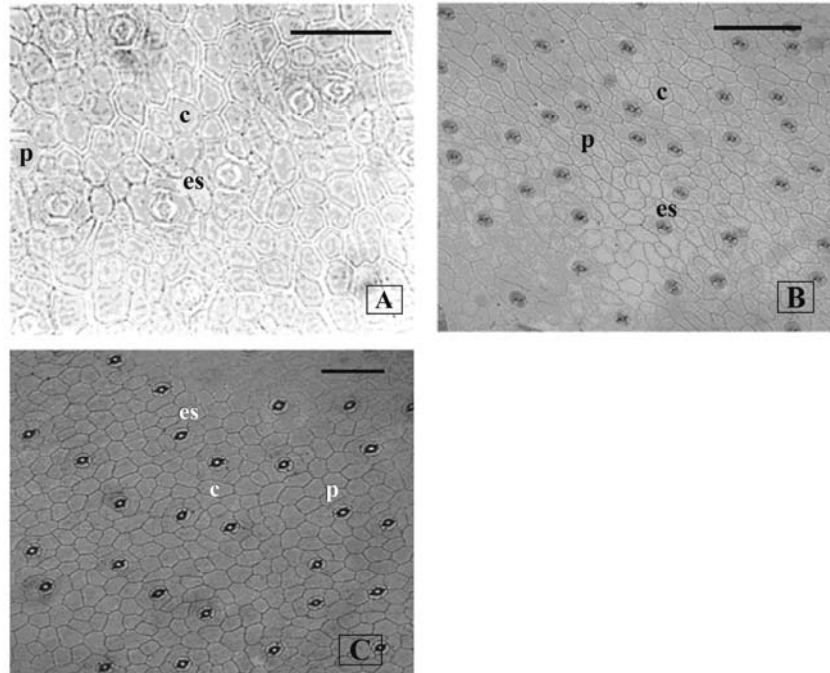
La anchura de las células típicas varió desde un máximo de 30,4 y 30,0  $\mu\text{m}$  en multiplicación *in vitro* y aclimatización, respectivamente, hasta un mínimo de 26,1  $\mu\text{m}$  en orquideario. El grosor de las paredes anticlinales varió desde un máximo de 4,73  $\mu\text{m}$  en orquideario, hasta un mínimo de 1,66  $\mu\text{m}$  en multiplicación *in vitro*.

La longitud y la anchura de estomas variaron

desde un máximo de 27,7 y 31,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente, en orquideario, hasta un mínimo de 25,7 y 26,0  $\mu\text{m}$ , respectivamente, en multiplicación *in vitro*. La anchura de las células oclusivas varió desde un máximo de 10,55  $\mu\text{m}$  en aclimatización, hasta un mínimo de 9,08  $\mu\text{m}$  en orquideario mientras que la longitud de las células típicas fue similar en las tres condiciones.



**Figura 1.** Vista frontal de la epidermis adaxial en hojas maduras de *C. jenmanii* cultivadas en condiciones de A: orquideario (160X), B: multiplicación *in vitro* (200X), C: multiplicación *in vitro* (400X) y D: vitroplantas aclimatizadas (200X), c: célula epidérmica típica, p: pared celular, es: estoma y tg: tricoma glandular. La barra representa 100 µm



**Figura 2.** Vista frontal de la epidermis abaxial en hojas maduras de *C. jenmanii* cultivadas en condiciones de A: orquideario (160X), B: fase de multiplicación *in vitro* (200X) y C: vitroplantas aclimatizadas (200X). c: célula epidérmica típica, p: pared celular, es: estoma. La barra representa 100 µm.

**Cuadro 2.** Dimensiones anatómicas en la epidermis abaxial de hojas de *C. jenmanii* desarrolladas en orquideario, fase de multiplicación *in vitro* y aclimatización

| Ambiente de desarrollo foliar  | Long. cel. típicas (μm) | Anchura cel. típicas (μm)*(1)(2) | Grosor paredes anticlinales (μm)*(1)(2) | Long. estomas (μm)*(1)(2) | Anchura estomas (μm)*(1)(2) | Anchura células oclusivas (μm)*(3)(4) |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Orquideario                    | 43,2 a                  | 26,1 b                           | 4,73 a                                  | 27,7 a                    | 31,8 a                      | 9,08 b                                |
| Multiplicación <i>in vitro</i> | 43,2 a                  | 30,4 a                           | 1,66 c                                  | 25,7 b                    | 26,0 b                      | 9,39 b                                |
| Aclimatización                 | 44,0 a                  | 30,0 a                           | 2,00 b                                  | 27,0 a                    | 26,5 b                      | 10,55 a                               |

Cada valor representa la media, n= 80 de 10 hojas diferentes

(1) Prueba de Kruskal-Wallis; (2) Determinado mediante gráficos de caja y bigote

(3) Prueba de Duncan; (4) Para valores transformados de acuerdo a la ecuación  $Y=\log 10(X)$

## DISCUSIÓN

Los resultados permitieron describir el efecto del ambiente de cultivo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *C. jenmanii*. Al comparar las células epidérmicas típicas del tercio medio de la hoja de plantas cultivadas *in vitro* con las desarrolladas en aclimatización y orquideario se encontró que las primeras presentaron una anchura similar a las de aclimatización y mayor que las de orquideario en la superficie abaxial. En la cara adaxial la menor longitud de las células típicas también correspondió a las plantas del orquideario.

Por su parte, durante el cultivo *in vitro*, las paredes anticlinales de las células típicas fueron más delgadas y su espesor se incrementó en las condiciones expuestas al ambiente externo hasta alcanzar su máximo valor en el orquideario. Así mismo, la densidad de las células típicas desarrolladas en el orquideario fue menor que en

el resto de las condiciones (Cuadro 3). Esto parece indicar que para lograr su adaptación al orquideario, las hojas deben sufrir cambios que conduzcan al incremento de su resistencia mecánica reducción del tamaño de las células típicas para dar espacio al desarrollo de una pared celular engrosada que confiera una mayor rigidez (Apóstolo et al., 2005). De allí que las células típicas desarrolladas en el orquideario sean más pequeñas, pero con una densidad menor a causa de la superficie ocupada por sus paredes anticlinales engrosadas.

Al respecto, Kevers y Gaspar (1986) y Majada et al. (2000; 2002) indicaron que la epidermis foliar desarrollada durante la multiplicación *in vitro* de clavel presentó anomalías anatómicas severas, entre las que se encuentra la reducción del grosor de la pared celular. Estos autores lo interpretaron como una hipolignificación y formación imperfecta de la pared secundaria.

**Cuadro 3.** Densidades celulares y estomáticas en la epidermis abaxial de hojas de *C. jenmanii* desarrolladas en orquideario, fase de multiplicación *in vitro* y aclimatización

| Ambiente de desarrollo foliar  | Densidad cel. típicas (cel/mm <sup>2</sup> )*(1)(2) | Densidad estomática (estomas/mm <sup>2</sup> )* (1)(2) | Índice estomático (%) |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------|
| Orquideario                    | 1165,5 b                                            | 69,2 b                                                 | 5,62 a                |
| Multiplicación <i>in vitro</i> | 1371,7 a                                            | 85,9 a                                                 | 5,77 a                |
| Aclimatización                 | 1373,6 a                                            | 85,9 a                                                 | 5,82 a                |

Cada valor representa la media ± error estándar, n= 22 de 11 hojas

(1) Prueba de Kruskal-Wallis; (2) Determinado mediante gráficos de caja y bigote

Respecto a las células epidérmicas especializadas, en la superficie adaxial de las hojas desarrolladas *in vitro* se presentaron apéndices epidérmicos y estomas que fueron menos frecuentes en la hojas provenientes de aclimatización y estuvieron ausentes en las hojas de orquideario.

En la superficie abaxial, los estomas de las hojas de cultivo *in vitro* fueron más pequeños y

sus dimensiones se incrementaron en la medida que ocurrió la adaptación al ambiente externo, hasta alcanzar su máximo valor en orquideario. En cambio el índice estomático no sufrió alteraciones en las condiciones de cultivo estudiadas (Cuadro 3). De tal manera que las hojas de cultivo *in vitro* y aclimatización pueden ser clasificadas como anfiestomáticas, con

predominio de la superficie abaxial, mientras que las hojas de orquideario pueden ser clasificadas como hipoestomáticas.

En la condición *in vitro*, la magnitud de la transpiración es pequeña debido a la restricción de flujo gaseoso en los recipientes de cultivo y la condición semiheterótrofa de los cultivos, mientras que bajo condiciones de orquideario la planta requiere de una mayor tasa de intercambio gaseoso con el ambiente, lo que podría resultar en un aparato estomático de mayores dimensiones.

Estos resultados coinciden con lo señalado por Anita et al. (2000), quienes encontraron una reducción significativa de las dimensiones estomáticas de *Dendrobium* durante la micropropagación *in vitro* y la posterior recuperación de las mismas durante la aclimatización. Por otra parte, los estomas de tipo tetracítico y la ausencia de tricomas en las hojas adultas han sido reportados en otras especies de orquídeas pertenecientes a la tribu *Vanilleae* (Stern y Judd, 2000).

La variación en las dimensiones de las células típicas epidérmicas y los estomas desarrollados durante la aclimatización podría ser interpretada como señal de un mayor control del balance hídrico, pero tales indicadores del restablecimiento de la anatomía normal de la epidermis contrastaron con las características intermedias entre la epidermis desarrollada *in vitro* y la desarrollada en el orquideario, como la presencia de tricomas glandulares y estomas aislados en la superficie adaxial (Pospisilová et al., 1999; Couceiro et al., 2006). Esto podría indicar que el tiempo transcurrido durante la aclimatización en este experimento no fue suficiente para igualar la anatomía foliar de las vitroplantas a la de las plantas del orquideario.

La presencia de estomas en la superficie adaxial podría ser el resultado de la ausencia de estímulos ambientales de los que depende el desarrollo de la epidermis foliar.

La permanencia en hojas aclimatizadas de algunas características de las hojas desarrolladas *in vitro*, como los tricomas glandulares y los estomas en la superficie adaxial llevan a pensar que la adaptación de las vitroplantas a las condiciones de crecimiento *ex vitro* es un proceso más lento de lo inicialmente estimado.

## CONCLUSIONES

Durante la propagación *in vitro* hubo un incremento del tamaño de las células típicas, reducción del espesor de las paredes anticlinales, reducción del tamaño de los estomas en la superficie abaxial y la formación de estomas y tricomas en la superficie adaxial, en comparación con las hojas de las plantas del orquideario.

Durante la aclimatización se observó una tendencia a revertir las alteraciones observadas en la multiplicación *in vitro*, con el incremento de las dimensiones de los estomas y el engrosamiento de las paredes anticlinales.

Luego de una aclimatización de ocho semanas las hojas formadas por las vitroplantas presentaron una anatomía de la epidermis foliar que aún no presentó todas las características de las plantas del orquideario.

## AGRADECIMIENTO

A Dra. María D. Gómez. Laboratorio de Microscopía del IBMCP-CESIC. Valencia, España.

## LITERATURA CITADA

1. Anita, S., L. Priya, K. Rajmohan y S. Alex. 2000. Comparison of chlorophyll content, water loss, and anatomical features of leaves of the normal, *in vitro* cultured and, hardened *Dendrobium* hybrid plants. J. Orchid Soc. India 14(1-2): 41-46.
2. Apóstolo, N., C. Brutti y B. Llorente. 2005. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In vitro* Cellular & Developmental Biology 41: 307-313.
3. Couceiro, M., F. Afreen, S. Zobayed y T. Kozai. 2006. Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant 42: 272-282.
4. Dami, I. y H. Hughes. 1995. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 179-184.

5. Donnelly, D., W. Vidaver y K. Lee. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 43-50.
6. Foldats, E. 1970. Flora de Venezuela. Vol. XV *Orchidaceae*. Parte III. Instituto Botánico de Venezuela. Caracas. pp. 122-128.
7. Kevers, C. y T. Gaspar. 1986. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiol. Veg.* 24: 647-653.
8. Majada, J., F. Tadeo, M. Fal y R. Sánchez-Tamés. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 207-214.
9. Majada, J., M. Fal, F. Tadeo y R. Sánchez-Tamés. 2002. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 272-278.
10. Masooma, A., H. Hughes y F. Safadi. 1998. Studies on stomatal function, epicuticular wax and stem-root transition region of polyethylene glycol-treated and nontreated *in vitro* grape plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 1-7.
11. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
12. Pospisilová, J., N. Wilhelmova, H. Synkova, J. Catsky, D. Krebs, I. Tichá, B. Hanackova y J. Snopek. 1998. Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 49(322): 863-869.
13. Pospisilová, J., I. Tichá, P. Kadlec, D. Haisel y S. Plazaková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol. Plant.* 42: 481-497.
14. Roth, I. 1964. *Microtecnia Vegetal*. Ediciones Biblioteca UCV. Caracas, Venezuela.
15. Seon, J., Y. Cui, T. Kozai y K. Paek. 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 135-142.
16. Stern, W. y W. Judd. 2000. Comparative anatomy and systematics of the orchid tribe Vanilleae excluding Vanilla. *Bot. J. Linnean Society* 134: 179-202.
17. Torres, J. y N. Mogollón. 1997. Micropropagación clonal masiva de *Cattleya lueddemanniana* Rchb. f. Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture 41: 92-98.
18. Zobayed, S., F. Afreen-Zobayed, C. Kubota y T. Kozai. 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 183-188.