



MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE *Phalaenopsis* sp. USANDO REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL, AGUAMIEL Y PULQUE (COMPLEJOS ORGÁNICOS) †

[MULTIPLICATION *in vitro* OF *Phalaenopsis* sp. USING PLANT GROWTH REGULATORS, HONEY WATER AND FERMENTED SAP (ORGANIC COMPLEXES)]

A.M. Arzate-Fernández*, R. Rosas-Chávez, T.H. Norman-Mondragón, M.C. Corona-Rodríguez and J.L. Piña-Escutia

Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMéx. Campus Universitario “El Cerrillo”, Estado de México, México. CP 50200. Email: *amaury1963@yahoo.com.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background: *Phalaenopsis* is an orchid of economic importance worldwide. Its natural reproduction is slow due to its monopodial growth (a single apical meristem). Therefore, it is necessary to make *in vitro* propagation protocols more efficient. **Objectives:** 1. To evaluate three concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in combination with three of 6-Benzyl Adenine (BA) in the *in vitro* induction of protocormic like bodies (PLBs) at from leaf explants of *Phalaenopsis* sp. var. Dudu, under three periods of darkness, 2. To test the effect of four concentrations of honey water and fermented sap, as organic complexes (CO), on the *in vitro* multiplication rate of PLBs. **Methodology:** Two tests were carried out: Test 1. Three concentrations of 2,4-D (3, 4, 5 mgL⁻¹) and three of BA (1, 2, 3 mgL⁻¹) were evaluated in leaf explants of *Phalaenopsis* sp., combined with three periods of darkness 14, 21, 28 days in a completely randomized design with a trifactorial arrangement (27x10). Test 2. Four concentrations of honey water and fermented sap (0, 10, 50, 100 mL⁻¹) were evaluated, arranged in a completely random design (8x10). **Results:** The best combination of plant growth regulators (PGR) for the formation of PLBs (14 PLBs/explant) was with 5 mgL⁻¹ of 2,4-D and 2 mgL⁻¹ of BA, during 21 days of darkness. Regarding the use of CO, the addition of 10 mL⁻¹ of fermented sap and 50 mL⁻¹ of honey water induced the highest rates of multiplication of PLBs/explant (41.4 and 39.6 PLBs). The regeneration of *Phalaenopsis* sp. from PLBs occurred in 225 days. **Implications:** The results obtained in the two trials are the basis for establishing a protocol for the multiplication of *Phalaenopsis* sp. **Conclusions:** The combination of 5 mgL⁻¹ of 2,4-D and 2 mgL⁻¹ of BA produced the highest number of PLBs/explant (14) at 21 days of darkness and subsequent light exposure for six weeks. On the other hand, the addition of 10 mL⁻¹ of fermented sap and 50 mL⁻¹ of honey water as CO induced the highest rates of PLBs multiplication (41.4 and 39.6 PLBs, respectively). 100% survival of seedlings was observed after 21 days of acclimatization, under greenhouse conditions.

Key words: Protocormic like bodies (PLBs); 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); 6-benzyladenine (BA); honey water; fermented sap; somatic embryogenesis (ES).

RESUMEN

Antecedentes: *Phalaenopsis* es una orquídea de importancia económica a nivel mundial. Su reproducción natural es lenta debido a su crecimiento monopodial (un solo meristemo apical). Por ello es necesario eficientizar los protocolos de propagación *in vitro*. **Objetivos:** 1. Evaluar tres concentraciones de 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) en combinación con tres de 6-Bencil Adenina (BA) en la inducción *in vitro* de cuerpos protocórmicos (PLBs por sus siglas en inglés) a partir de explantes de hoja de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu, bajo tres periodos de obscuridad, 2. Probar el efecto de cuatro concentraciones de aguamiel y pulque, como complejos orgánicos (CO), sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de PLBs. **Metodología:** Se llevaron a cabo dos ensayos: Ensayo 1. Se evaluaron tres concentraciones de 2,4-D (3, 4, 5 mgL⁻¹) y tres de BA (1, 2, 3 mgL⁻¹) en explantes de hoja de *Phalaenopsis* sp., combinadas con tres periodos de obscuridad 14, 21, 28 días en un diseño completamente al azar con arreglo trifactorial (27x10). Ensayo 2. Se evaluaron cuatro concentraciones de aguamiel y pulque (0, 10, 50, 100 mL⁻¹), dispuestos en un diseño completamente al azar (8x10). **Resultados:** La mejor combinación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) para la formación de PLBs (14 PLBs/explante) fue con 5 mgL⁻¹ de 2,4-D y 2 mgL⁻¹ de BA, durante 21 días de obscuridad. Respecto al uso de los CO, la adición de 10 mL⁻¹ de pulque y 50 mL⁻¹ de aguamiel indujo las tasas más

† Submitted September 20, 2021 – Accepted November 3, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.3981>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

altas de multiplicación de PLBs/explante (41.4 y 39.6 PLBs, respectivamente). La regeneración de plantas de *Phalaenopsis* sp. a partir de PLBs se dio en 225 días. **Implicaciones:** Los resultados obtenidos en los dos ensayos son la base para establecer un protocolo para la multiplicación de *Phalaenopsis* sp. **Conclusiones:** La combinación 5 mgL⁻¹ de 2,4-D y 2 mgL⁻¹ de BA produjo el número más alto de PLBs/explante (14) a los 21 días de obscuridad y posterior exposición a la luz durante seis semanas. Por otro lado, la adición de 10 mL⁻¹ de pulque y 50 mL⁻¹ de aguamiel como CO indujeron las tasas más altas de multiplicación de PLBs (41.4 y 39.6 PLBs, respectivamente). Se observó el 100% de sobrevivencia de las plántulas después de 21 días de aclimatación, bajo condiciones de invernadero.

Palabras clave: Cuerpos protocórmicos (PLBs); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 6-benciladenina (BA); aguamiel; pulque; embriogénesis somática (ES).

INTRODUCCIÓN

Phalaenopsis es un género de orquídeas que comprende 66 especies (Chu *et al.*, 2012). Presentan facilidad de cultivo en condiciones artificiales y larga vida en florero (Jia-Hua y Jen-Tsung, 2014); debido a su alta demanda en el mercado es preciso mejorar sus protocolos de multiplicación (Griesbach, 2002), a fin de asegurar su abastecimiento. Su crecimiento monopodial (un solo meristemo apical) dificulta su propagación vegetativa (Feria *et al.*, 2007), por ello, se ha recurrido a la utilización de diversas técnicas biotecnológicas, destacando la embriogénesis somática (ES) (SEDICI, 2017). Con esta técnica se ha obtenido un número mayor de plantas en espacios reducidos, a bajos costos (Salazar-Mercado *et al.*, 2013) y en un periodo de tiempo relativamente corto (Musharof *et al.*, 2013), además de facilidad en su manipulación y transporte (Chien *et al.*, 2015).

La ES puede ser inducida de manera directa o indirecta, la primera reduce el tiempo de propagación y pocas posibilidades de que ocurra variación somaclonal (Košir *et al.*, 2004), dependiendo de ciertos factores como el genotipo (Arnold *et al.*, 2002), el estado de desarrollo y tamaño del explante, así como el medio de cultivo (Viñas y Jiménez, 2011), pero principalmente del tipo y combinación del regulador de crecimiento vegetal usado. Hasta ahora los protocolos de ES se han orientado a la formación de cuerpos protocórmicos o Protocorm-Like Bodies (PLBs, por sus siglas en inglés), por su alto grado de totipotencia (Real *et al.*, 2007), y por la relativa facilidad de regeneración de plantas (Feria *et al.*, 2007). Se ha observado que la interacción de las citocininas con las auxinas se utiliza para regular la neoformación de órganos *in vitro* y controlar la dominancia apical, fundamental en la industria de la micropropagación (Celestino *et al.*, 2005), además es el método más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* (Freire, 2003). Tirado *et al.* (2005) reportaron una media de 8.2 PLBs por explante en *Phalaenopsis* sp., en medio de Murashige y Skoog (MS) al 50% de su concentración, suplementado con 5 mgL⁻¹ de Thidiazuron (TDZ) y 15 gL⁻¹ de sacarosa, en inmersión temporal RITA, mientras que Cheng y Chang (2006) obtuvieron una media de 13.8 PLBs en un medio MS al 50% con 3 mgL⁻¹ de TDZ. Real *et al.*

(2007) por su parte, indujeron una media de 4.6 PLBs en un medio MS con 0.5 mgL⁻¹ de BA en explantes de *Mormodes maculata*. Asimismo, David *et al.* (2008) obtuvieron un promedio de 9 PLBs por explante en *Vanda helvola* en un medio basal Knudson C (KC) en combinación de 2 mgL⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.5 mgL⁻¹ de ácido 1-naftalenacético (NAA). Paek *et al.* (2011) reportaron un rango de 10 a 20 PLBs en un medio Vacin y Went (VW) con 3 mgL⁻¹ de bencil adenina (BA), 1 mgL⁻¹ de TDZ y 10% de agua de coco, mientras que Sinha y Jahan (2011) lograron una media de inducción a las 8 semanas de cultivo de 44.5 PLBs en un medio de cultivo MS al 50%, 10% de agua de coco, 150 mgL⁻¹ L-glutamina, 2% de sacarosa, 2 gL⁻¹ de peptona y 1 gL⁻¹ de carbón activado.

Por otra parte, los complejos o aditivos orgánicos (CO) se han empleado en el mejoramiento de los medios de cultivo para la germinación, proliferación, multiplicación y desarrollo de orquídeas (Pant, 2013). El agua de coco es el más común debido a su alto contenido de sustancias nutritivas y hormonales (Tan *et al.*, 2012). Sin embargo, se siguen buscando otras fuentes de nutrimentos. Al respecto, el aguamiel obtenido del agave pulquero (*Agave salmiana*), es un néctar dulce, incoloro y transparente, posee un ligero olor herbáceo y contiene minerales, aminoácidos, carbohidratos y proteínas. Sus características fisicoquímicas son: densidad 1.29 gL⁻¹, índice de refracción 1.3, sólidos solubles 11.44 °Brix, acidez 1.65%, humedad 87%, proteínas 3.41 gL⁻¹, cenizas 0.53 g, azúcares reductores 1.63 gL⁻¹, glucosa 2.31 mgL⁻¹, fructuosa 4.70 mgL⁻¹, calcio 11.70 mg/100g bs, hierro 0.81 y tiamina 10 mg (Flores *et al.*, 2006).

De la fermentación del aguamiel se produce el pulque. Éste es un líquido de color blanco, olor fuerte y viscoso; sus características fisicoquímicas son densidad 1.01 gL⁻¹, sólidos solubles 4.653 °Brix, humedad 79%, proteínas 0.350 gL⁻¹, cenizas 0.275 g, calcio 10 mg/100g bs, fósforo 10 mg, tiamina 0.02 mg, riboflavina 0.02 mg, niacina 0.3 mg, ác. ascórbico 6.2 mg, pH 4.31, índice de refracción 1.34, acidez 0.45%, azúcares reductores 0.330 gL⁻¹ (Arroyo-Cruz y Reynoso-Ocampo, 2016).

De acuerdo con lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron: 1) Evaluar el efecto de 2,4-D y BA, con tres

periodos de oscuridad (14, 21 y 28 días), en la inducción *in vitro* de PLBs a partir de explantes de hoja de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu, y 2) Evaluar el efecto del aguamiel y pulque, como complejos orgánicos (CO), en la multiplicación de PLBs a partir de PLBs de *Phalaenopsis* sp. obtenidos en el primer ensayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó semilla de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu, procedente de la empresa “Flores de Chiltepec”. La germinación de las semillas se realizó utilizando el medio de cultivo reportado por Salazar-Mercado *et al.* (2013), y se observó a los 27 días, después de establecidas. De las plántulas obtenidas se utilizaron secciones de hoja como explantes para la inducción de cuerpos protocórmicos (PLBs), obtenidos en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

Ensayo 1: Inducción de PLBs a partir de secciones de hoja

Se evaluó el efecto combinado del 2,4-D (Factor A) en concentraciones de 3, 4 y 5 mgL⁻¹ y BA (1, 2 y 3 mgL⁻¹) (Factor B), sometidos a tres periodos de oscuridad (14, 21 y 28 días) (Factor C) sobre la inducción de PLBs. Como explantes se utilizaron secciones de hoja, de 5 ± 1 mm, sumergidas durante 2 horas en una solución para el lavado de fenoles, compuesta por las sales del medio MS al 50% y 20 mgL⁻¹ de ácido ascórbico. Después del lavado los tratamientos se incubaron a una temperatura de 25±1 °C. Se evaluó el efecto de 27 tratamientos en un diseño completamente al azar con arreglo trifactorial y cada tratamiento tuvo ocho explantes de hoja como repeticiones (27 x 8). Cada explante fue considerado como una unidad experimental. El medio de cultivo utilizado fue el MS al 25% adicionado con 60 gL⁻¹ de sacarosa, vitaminas L2, 8 gL⁻¹ de agar, Fe-EDTA al 25%, ajustando el pH a 5.7± 0.1, antes de adicionar el agar; se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.1 kgcm⁻², por 20 min. Después de los periodos de oscuridad, los tratamientos se incubaron por 6 semanas en condiciones de luz (25 μmolm⁻²s) con un fotoperiodo de 16 horas y se subcultivaron cada 2 semanas en medio de cultivo fresco. Posteriormente, se registró el número de PLBs por tratamiento. Se contaron aquéllos con estructura esférica, sin primordios foliares y con aproximadamente 3-4 mm de diámetro. Una vez cuantificada la variable, los PLBs obtenidos en este ensayo se sometieron adicionalmente en condiciones de luz durante 3 semanas en el mismo medio de cultivo, sin RCV, antes de ser utilizados en el segundo ensayo.

Ensayo 2: Multiplicación de PLBs

En esta fase, se evaluó el efecto de aguamiel y pulque, como complejos orgánicos (CO), en la multiplicación de PLBs, a partir de los PLBs provenientes del tratamiento en el que se indujo el número mayor de protocormos del ensayo anterior (5:2 mgL⁻¹ de 2,4-D:BA y 21 días de oscuridad). Se probaron cuatro concentraciones de cada CO: 0, 10, 50 y 100 mL⁻¹, para un total de ocho tratamientos en un diseño completamente al azar con diez repeticiones (8 x 10); el explante consistió en un clúster de cinco PLBs considerado como una unidad experimental. Todos los tratamientos se establecieron en cajas Petri, colocando diez explantes por caja en medio de cultivo previamente esterilizado: MS al 50% adicionado con 20 gL⁻¹ de sacarosa, vitaminas MS, 4 gL⁻¹ de agar, 0.5 gL⁻¹ de carbón activado, y como RCV: 1 mgL⁻¹ de 2,4-D y 7 mgL⁻¹ de BA, y la concentración del CO a probar, ajustando el pH a 5.2 ± 0.1, antes de adicionar el agar, y se incubaron inicialmente a una temperatura de 25±1 °C en condiciones de oscuridad durante 2 semanas y después por 6 semanas con lámparas de luz blanca (25 μmolm⁻²s) durante 16 horas. Los explantes se subcultivaron cada 2 semanas en medio de cultivo fresco. Posterior a las 8 semanas del establecimiento (SDE), se evaluó la respuesta de los explantes en cada tratamiento y se determinó el número de PLBs.

Germinación de PLBs

Para la germinación de los PLBs producidos en el ensayo 2, éstos se subcultivaron en un medio de cultivo CP2, el cual consistió en las sales del medio MS al 50%, 20 gL⁻¹ de sacarosa, 10% de agua de coco, 4 gL⁻¹ de agar y 0.5 gL⁻¹ carbón activado. Todos los tratamientos se incubaron bajo condiciones de luz, con lámparas de luz blanca (25 μmol m⁻²s) y 16 horas de fotoperiodo, y se mantuvieron en esta fase por 30-45 días.

Aclimatización de plántulas en condiciones *ex vitro*

Cuando las plántulas regeneradas *in vitro* alcanzaron una altura aproximada entre 4-6 cm, se transfirieron a una charola de plástico cubierta con un domo del mismo material, usando como sustrato una mezcla de corteza de pino, musgo y tepojal (1:2:1), durante 21 días como periodo de aclimatización; así, cada 7 días se realizaron pequeños orificios en el domo para facilitar su adaptación. Posteriormente, las plántulas aclimatadas se trasplantaron a macetas de 4 pulgadas usando la misma mezcla de sustrato y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero para su crecimiento.

Análisis estadístico

Para el ensayo 1 se consideró la variable número de PLBs obtenidos por explante (sección de hoja) y por tratamiento; y para el ensayo 2 se evaluó el número de nuevos PLBs obtenidos por tratamiento. En ambos ensayos las variables fueron evaluadas a través de un análisis de varianza completamente al azar utilizando el programa StatGraphics® versión 5.0 para Windows®. En el ensayo 1 se evaluaron 27 tratamientos en un arreglo trifactorial con distribución completamente al azar con ocho repeticiones; en el ensayo 2 se evaluaron ocho tratamientos con distribución al azar y diez repeticiones. La comparación de medias en ambos ensayos se efectuó mediante la prueba de Tukey a un nivel de confianza de 95%, mediante el programa estadístico StatGraphics® versión 5.0 para Windows®, y para el cálculo de la diferencia mínima significativa de la Tabla 2 se usó el programa OPSTAT (Sheoran *et al.*, 1998). La variable porcentaje de adaptación se determinó con la fórmula: [Número de plántulas sobrevivientes a los 21 días]*[100]/Número total de plantas adaptadas en condiciones *ex vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los RCV en la inducción de PLBs a partir de secciones de hoja

Musharof *et al.* (2013), señalan que la respuesta embriogénica *in vitro* de las orquídeas varía de acuerdo con las combinaciones y concentraciones de los RCV presentes en el medio de cultivo. En el presente estudio, el análisis de varianza reveló diferencias estadísticamente significativas entre las nueve concentraciones de RCV, y en la interacción trifactorial sobre la inducción de PLBs a partir de explantes de hoja, mientras que en los tres periodos previos de obscuridad (14, 21 y 28 días), no se observaron diferencias (Tabla 1).

En la Tabla 2 se muestra el número promedio de PLBs obtenidos en cada uno de los 27 tratamientos probados. Estos resultados parecen indicar que las bajas

concentraciones de BA tienen un efecto negativo sobre esta inducción, ya que la combinación de 1 mgL⁻¹ de este RCV con 4 mgL⁻¹ de 2,4-D sólo indujo una media de 1.75 PLBs por explante, a los 28 días de obscuridad. En la cuarta semana de exposición a la luz se observó la presencia de PLBs a partir de secciones de hoja cultivadas *in vitro* con 5 mgL⁻¹ y 2 mgL⁻¹ de 2,4-D y de BA, respectivamente, sometidos a un periodo de 21 días de obscuridad (Figura 1).

Con relación a la interacción de los tres factores estudiados, en el misma Tabla 2 se observa también que las mejores combinaciones de 2,4-D y BA fueron 5:2 mgL⁻¹ y 4:3 mgL⁻¹ en las que se obtuvo en promedio 14 y 12.25 PLBs por explante, respectivamente, después de 21 días de obscuridad.

Los resultados obtenidos en el presente ensayo, comparados con otros autores, sin considerar una fase previa de obscuridad, superaron a los de So Young *et al.* (2001) quienes obtuvieron una media de 11.5 PLBs en *Phalaenopsis*, al usar 20 mgL⁻¹ de BA y 1 mgL⁻¹ de 2,4-D. Por su parte, Feria *et al.* (2007) también reportaron un porcentaje de 91.3 de inducción de PLBs al usar 10 mgL⁻¹ de BA y 1 mgL⁻¹ de ANA. De igual manera, Sheelavanthmath *et al.* (2005) señalaron que las altas concentraciones de BA inducen la formación de PLBs en *Phalaenopsis* sp. Según Reyes (2017a) esto se puede deber a que el BA inhibe el efecto del control que ejerce el eje embrionario sobre el crecimiento coordinado de las células que constituyen el embrión, produciéndose un cambio en las divisiones celulares lo que daría lugar a la formación de embriones somáticos. Balilashaki *et al.* (2014), afirman que además debe considerarse el tamaño, edad y orientación del explante, porque según Reyes (2017a) los tejidos más próximos a las zonas donde ocurre el rejuvenecimiento provocado por el proceso de división celular, son los más aptos para la iniciación de la embriogénesis somática. Sin embargo, hay autores que coinciden en que al usar concentraciones superiores a 5 mgL⁻¹ de BA pueden provocar malformaciones en las hojas en plantas regeneradas de *Phalaenopsis* (Tanaka y Sakanishi, 1978).

Tabla 1. Análisis de varianza para evaluar el efecto de 2,4-D y BA en tres periodos de obscuridad para la inducción de PLB's de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a las 6 SDE.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.valor	Pr>F
2,4-D	2	453.675926	226.837963	5.60	0.0043
BA	2	537.898148	268.949074	6.65	0.0016
Obscuridad	2	117.398148	58.699074	1.45	0.2371
2,4-D × BA	4	414.101852	103.525463	2.56	0.0401
2,4-D × Obscuridad	4	486.268519	121.567130	3.00	0.0196
BA × Obscuridad	4	175.212963	43.803241	1.08	0.3666
2,4-D × BA × Obscuridad	8	1323.953704	165.494213	4.09	0.0002
Error	189	7649.50926	40.47288		
Total	215	11157.88426			

R² = 0.314442

CV = 180.57

Tabla 2. Número de PLBs producidos a partir de explantes de hoja de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu, en la interacción de 2,4-D y BA con el periodo de obscuridad, después 6 semanas de exposición a la luz.

Combinación/concentración del RCV (mgL ⁻¹)		Número de PLBs/explante Periodo de obscuridad (días)		
2,4-D	BA	14	21	28
3	1	0.38±2.25 ^{bcd}	0.13±2.25 ^d	2.63±2.25 ^{abcd}
	2	2.38±2.25 ^{abcd}	2.13±2.25 ^{abcd}	12.13±2.25 ^{abc}
	3	4.25±2.25 ^{abcd}	0.25±2.25 ^{cd}	4.38±2.25 ^{abcd}
4	1	0.00±2.25 ^d	0.00±2.25 ^d	1.75±2.25 ^{bcd}
	2	0.00±2.25 ^d	0.13±2.25 ^d	2.50±2.25 ^{abcd}
	3	0.00±2.25 ^d	12.25±2.25 ^{ab}	0.88±2.25 ^{bcd}
5	1	2.25±2.25 ^{abcd}	3.00±2.25 ^{abcd}	2.13±2.25 ^{abcd}
	2	5.38±2.25 ^{abcd}	14.00±2.25 ^a	7.13±2.25 ^{abcd}
	3	8.8±2.25 ^{abcd}	0.00±2.25 ^d	6.25±2.25 ^{abcd}

DMS = 11.94 No existe diferencias estadísticas entre letras iguales. Tukey ≤ 0.05 .



Figura 1. Presencia de PLBs de *Phalaenopsis* sp., sobre secciones de hoja sometidas al tratamiento con 5 mgL⁻¹ de 2,4-D y 2 mgL⁻¹ de BA, en 21 días de obscuridad, y 4 semanas después de su exposición a la luz. Barra = 1 mm.

Efecto de los complejos orgánicos en la multiplicación de PLBs

En el ensayo 2, la producción de PLBs fue gradual (Figura 2A, 2B, 2C) y se cuantificó en la 8ª semana de cultivo, cuando los PLBs alcanzaron, como mínimo, un diámetro de 3 mm (Figura 2D), como lo sugieren Sujjarittharakarn y Kanchanapoom (2011), encontrando diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados ($P > 0.05$) (Tabla 3). Al realizar la prueba de comparación de medias se observó que los tratamientos con 10 mL⁻¹ de pulque y 50 mL⁻¹ de aguamiel promovieron el mayor número de PLBs por explante (41.4 y 39.6, respectivamente), mientras que a una mayor concentración (100 mL⁻¹) en ambos complejos produjo una menor respuesta (13.5 y 22.2) siendo aún menor que la registrada en su ausencia (32.4 PLBs/explante) (Tabla 4). Los resultados obtenidos indican que la presencia de aguamiel o pulque en el medio de cultivo resultó favorable, no obstante, su diferente composición bioquímica en

proteínas, vitaminas, hormonas y carbohidratos como lo señalan Flores *et al.* (2006); Chugh *et al.* (2009). Según Matías *et al.*, (2019), una de las principales diferencias entre ambos complejos se refiere a la mayor concentración de azúcares totales: 25 gL⁻¹ en aguamiel, comparado con 1 gL⁻¹ en la composición del pulque, así como una mayor concentración de proteínas totales: 3.7 gL⁻¹ que el pulque (1 gL⁻¹), y éste último con una mayor cantidad de tiamina (5-20 mg). De acuerdo a esto, es posible que la interacción entre la concentración de azúcares y tiamina explique los resultados del presente estudio, pues la tiamina es esencial en el ciclo de Krebs para la producción de energía, asimilación del nitrógeno y metabolismo de los aminoácidos (Bunik y Fernie, 2009). Se sabe que la tiamina es un cofactor enzimático en el metabolismo de los carbohidratos, glicólisis, ruta de la pentosa fosfato y ciclo del ácido tricarbóxico (Goyer, 2010); también Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011) han señalado que la adición de carbohidratos estimula la histodiferenciación. Según Körbes y Droste (2005), la

concentración de sacarosa puede afectar la inducción morfológica, como fuente nutritiva y como regulador del potencial osmótico del medio de cultivo, el cual actúa como agente estresante de las células somáticas. En altas concentraciones (8-10%) puede provocar un efecto negativo en la formación de la clorofila e inhibir su desarrollo (Reyes-Díaz *et al.*, 2017b). También se ha encontrado que la fuente de nitrógeno en el medio tiene un rol crucial en la embriogénesis somática (Kohlenbach, 1978). A este respecto, Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011), indican que la capacidad embriogénica de los callos cultivados *in vitro* de *Agave angustifolia* en un medio MS a un cuarto de su concentración fue casi seis veces mayor que la obtenida con el medio MS al 100%. Esto parece indicar la necesidad de un equilibrio de los iones amonio y nitrato en el medio de cultivo,

principalmente con una baja concentración de las dos formas, para favorecer la mejor respuesta morfológica. Asimismo, se ha reportado que las vitaminas intervienen en las funciones catalíticas de los sistemas enzimáticos, especialmente en el crecimiento de las células vegetales cultivadas *in vitro* (Al-Khayri, 2001).

Otros investigadores tales como Sinha y Jahan (2011) obtuvieron una media de inducción de 44.5 ± 3.2 PLBs/explante en un medio de cultivo MS al 50% de su concentración, suplementado con 10% de agua de coco, contra 20.4 PLBs sin adicionar este complejo orgánico. Por su parte, Paek *et al.* (2011) reportaron un promedio de 10 a 20 PLBs usando como medio de cultivo VW (Vacin y Went), suplementado con el mismo porcentaje de agua de coco.

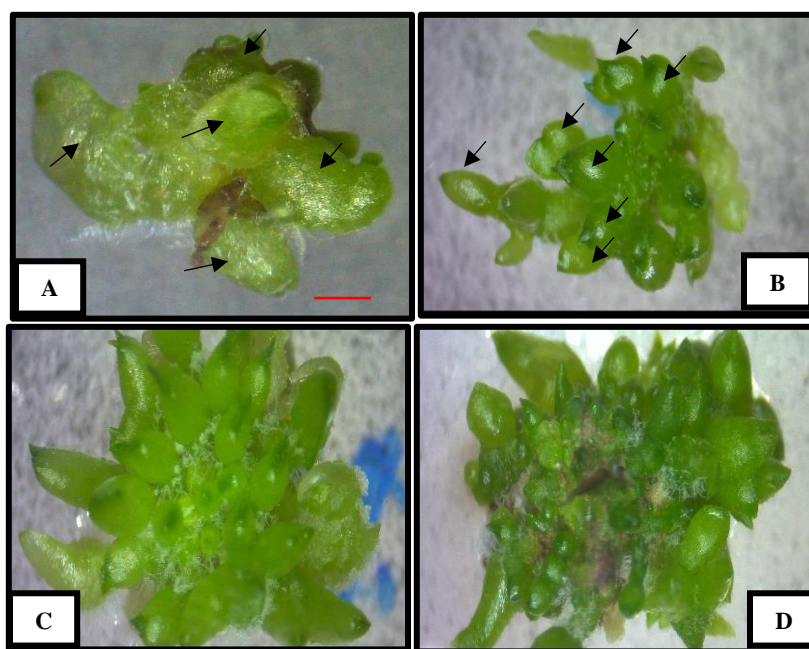


Figura 2. Efecto de la concentración de 10 mL^{-1} de pulque en la inducción y multiplicación *in vitro* de PLBs de *Phalaenopsis* sp. a partir de explantes de PLBs. A) Inducción de PLBs de 3 mm de diámetro (flechas) a las 0 semanas de establecido el experimento (SDE) (Barra = 5 mm). B) Multiplicación de PLBs (flechas) a las 2 semanas de SDE. C) Proliferación de PLBs a las 5 semanas de SDE. D) PLBs formados a las 8 semanas de cultivo.

Tabla 3. Evaluación del efecto de las concentraciones de aguamiel y pulque (CO) en la inducción de PLBs en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu, a las 8 semanas de cultivo.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F _{cal}	P>0.05
CO	1	911.25	911.25	19.93	0.0001
Concentraciones	3	4310.10	1436.70	31.42	0.0001
CO × Concentraciones	3	3076.65	1025.55	22.43	0.0001
Error	72	3292.20	45.725		
	79	11590.20			
CV = 23.602		R ² = 0.716			

Tabla 4. Comparación de medias (N = 10), para evaluar el efecto del aguamiel, y del pulque como complejos orgánicos (CO) y sus concentraciones en la inducción de PLBs a partir de explantes de PLBs en *Phalaenopsis* sp. var. Dudu, a las 8 semanas de cultivo.

Tratamiento	Concentración (mL ⁻¹)	Media (No. PLBs)
Pulque	100	13.5 ± 2.1e
Pulque	50	13.8 ± 2.1e
Pulque	10	41.4 ± 2.1a
Pulque	0	32.4 ± 2.1c
Aguamiel	100	22.2 ± 2.1d
Aguamiel	50	39.6 ± 2.1ab
Aguamiel	10	33.9 ± 2.1cb
Aguamiel	0	32.4 ± 2.1c

No existen diferencias estadísticas significativas entre letras iguales. Tukey 5%. Se utilizó la desviación estándar.

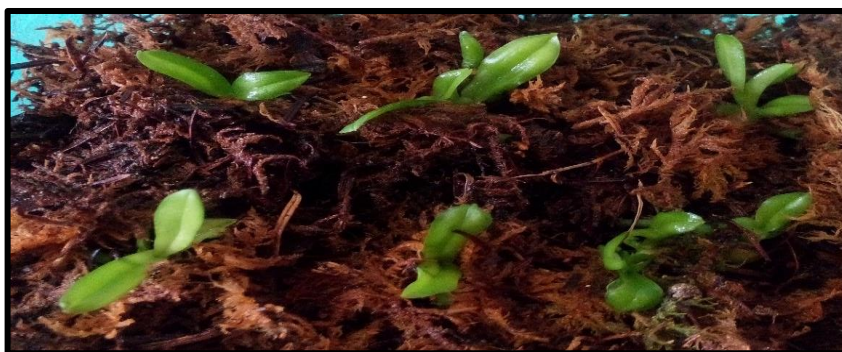


Figura 3. Adaptación de plántulas regeneradas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a condiciones *ex vitro*, 21 días después del periodo de adaptación.

Aclimatación de plántulas a condiciones *ex vitro*

Las plántulas obtenidas *in vitro*, fueron transferidas a un domo de plástico usando como sustrato una mezcla de corteza de pino, musgo y tepojal (1:2:1) durante 21 días como periodo de aclimatación (Figura 3). Posteriormente, cada una de ellas se trasplantó a macetas de 4 pulgadas con el mismo sustrato para transferirse a condiciones de invernadero. El porcentaje de sobrevivencia de las plántulas fue del 100 %.

CONCLUSIONES

El mejor tratamiento para la inducción de PLBs (14 PLBs/explante), se observó con la combinación de 5 mgL⁻¹ de 2,4-D y 2 mgL⁻¹ de BA, durante 21 días de obscuridad. En el ensayo 2, las mayores tasas de multiplicación de PLBs/explante (41.4 y 39.6) se obtuvieron con la adición al medio de 10 mL⁻¹ de pulque y 50 mL⁻¹ de aguamiel respectivamente, a partir del cultivo de PLBs obtenidos en el ensayo 1. Se obtuvo 100% de sobrevivencia de las plántulas después de 21 días de adaptación. Se pudieron regenerar plantas completas de *Phalaenopsis* sp. a partir de PLBs después de 225 días de iniciado el experimento.

Acknowledgments

The author Rodrigo Rosas Chávez thanks the Autonomous Mexico State University for his academic training during his stay at the Faculty of Agricultural Sciences.

Funding. It is a self-financing project.

Conflict of interest. The authors declare that there are no conflicts of interest associated with the results of this publication.

Compliance with ethical standards. The authors declare that this research do not required supervision by the Internal Bioethics Committee of the Autonomous Mexico State University.

Data availability. Data is available from Dr. Amaury-M. Arzate-Fernández (corresponding author: amaury1963@yahoo.com.mx), upon request.

Author contribution statement (CRediT). AM Arzate-Fernández - Conceptualization, funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing, review and editing., R. Rosas-Chávez – Visualization, formal analysis,

Research, data curation, writing – original draft., **JL Piña-Escutia** – review., **TH Norman-Mondragón**, **MC Corona-Rodríguez** – Writing, validation, review and editing.

REFERENCIAS

- Al-Khayri, J.M., 2001. Optimization of biotin and thiamine requirement for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, [e-journal] (37) pp. 453-456. <http://doi.org/10.1007/s11627-001-0079-x> [Accessed 18 July 2017].
- Arnold, S.V., Sabala, I., Bozhhov, P., Dyachok, J. and Filonova, L., 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, [e-journal] (69), pp. 233–249. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015673200621> [Accessed 15 may 2017]
- Arroyo-Cruz, C. and Reynoso-Ocampo, C.A., 2016. Efecto de las bajas temperaturas en las características fisicoquímicas del pulque (*Agave salmiana* Xamini). *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, [e-journal] 3(6) pp. 19-24. https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Ciencias_Naturales_y_Agropecuarias/v03num6/Revista_Ciencias_Naturales_V3_N6.pdf [Accessed 20 August 2017].
- Arzate-Fernández, AM. and Mejía-Franco, R., 2011. Embryogenic capacity of induced calli on zygotic embryonic axis of *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(2), pp. 101-106. <http://doi.org/10.35196/RFM.2011.2.101>
- Balilashaki, K., Naderi, R., Kalatari, S. and Soorni, A., 2014. Micropropagation of cv. Cool ‘Breeze’ with using of flower stalk nodes and leaves of sterile obtained from nodes cultures. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, [e-journal] 3(7), pp. 823-829. <http://doi.org/10.13140/2.1.1226.2086> [Accessed 10 Jun 2017].
- Bunik, V.I. and Fernie A.R., 2009. Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. *Biochemistry Journal*, [e-journal] (422) pp. 405-421. <http://doi.org/10.1042/BJ20090722> [Accessed 18 Jul. 2017].
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D. and Toribio, M., 2005. La embriogénesis somática *Phalaenopsis amabilis* como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistema de Recursos Forestales*, [e-journal] 14(3)pp. 345-357. <http://dx.doi.org/10.5424/srf/2005143-00925> [Accessed 12 May 2017].
- Cheng, J.T. and Chang, W.C., 2006. Directed somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf of. *Biologia Plantarum*, [e-journal] 50(2) pp. 169-173. <https://doi.org/10.1021/je0502389> [Accessed 20 jul 2017].
- Chien, Kai-Wen, Chandra, A.D., Tsay, Hsin-Sheng, Chang, and Chin-An., 2015. Elimination of mixed ‘Odontoglossum ringspot’ and ‘Cymbidium mosaic’ viruses from *Phalaenopsis* hybrid ‘V3’ through shoot-tip culture and protocorm-like body selection. *Crop Protection*, [e-journal] (67) pp. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.008> [Accessed 19 August 2017].
- Chu, C., Chung, Y., Shium, Y., Lin, W., and Hung, C., 2012. Plastid TRNL intron polymorphisms among *Phalaenopsis* species used for identifying the plastid genome type of *Phalaenopsis* hybrids. *Scientia Horticulturae*, [e-journal] (142) pp. 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.004> [Accessed 20 Jun 2017].
- Chugh S., Guha, S., and Rao U.I., 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants *Scientia Horticulturae*, [e-journal] (122) pp. 507–520. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016> [Accessed 11 Jul 2017].
- David D., Gansau, J.A. and Abdullah, J.O., 2008. Effect of NAA and BAP on protocorm proliferation of Borneo Scented Orchid, *Vanda helvola*. *AsPac Journal Molecular Biology Biotechnologist*, [e-journal] 18(1) pp. 221-224. <http://doi.org/10.4236/ajps.2017.86094> [Accessed 22 jul 2019].
- Feria, M., Chávez, M. and Quiala, E., 2007. Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*. *Biología Vegetal*, [e-journal] 7(1) pp. 27-33. Corpus ID: 85796510 [Accessed 22 May 2018].
- Flores, M.A., Coyotl, H.J., Hernández, T.M., Velásquez, J.L. and Hernández, A., 2006.

- Gestión de calidad de una miel obtenida a partir de aguamiel de maguey pulquero (*Agave salmiana*). *IV Congreso Internacional XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica*, [e-journal] <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/353/html> [Accessed 25 August 2019].
- Freire, S.M., 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotechnología Vegetal*, [e-journal] 3(4) pp. 195 – 209. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263/html> [Accessed 29 August 2018].
- Goyer, A., 2010. Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, [e-journal] (71) pp. 1615-1624. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.022> [Accessed 20 Jun 2019].
- Griesbach, R.J., 2002. Development of *Phalaenopsis* Orchids for the Mass-Market. *Trends in new crops and new uses*. Proceedings of the Fifth National Symposium, Atlanta, Georgia, USA. November, 10-13, 2001. J. Janick and A. Whpkey, ed. Alexandria, USA. pp. 458-465. [23 August 2018].
- Jia-Hua, Feng and Jen-Tsung, Chen, 2014. A Novel *in vitro* Protocol for Inducing Direct Somatic Embryogenesis in *Phalaenopsis aphrodite* without Taking Explants. *The Scientific World Journal*, [e-journal], pp. 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/263642> [17 de junio de 2017].
- Kohlenbach, H.W., 1978. Comparative somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (Ed.). *Frontiers of Plant Tissue Culture*, University of Calgary Press, pp. 59-66.
- Körbes, A.P., and Droste, A., 2005. Carbon sources and polyethylene glycol on sobean somatic embryo conversion. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [e-journal] (40) pp. 211-216. <http://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000300003> [Accessed 25 May 2017].
- Košir, P., Škof, S. and Luthar, Z., 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Agriculturae Slovenica*, [e-journal] 83(2) pp. 233-242. http://img3.wikia.nocookie.net/_cb20091018105039/orchids/en/images/a/aa/Direct_shoot_regeneration_from_nodes_of_Phalaenopsis_orchid.pdf [Accessed 16 Jun 2018].
- Matías-Luis, G., Peña-Caballero, V., Reyna-González, W., Domínguez-Díaz, L.R. and Martínez-Hernández, J.J., 2019. Valor nutricional y medicinal del pulque. *Journal of Negative and No Positive Results*, [e-journal]. 4(12) pp. 1291-1303. <http://doi.org/10.192307/jonnpr.3148> [20 May 2020].
- Musharof, M.H., Ravi, K., Pham, T.V., Budi, W., Songjun, Z. and Teixeira da Silva, J., 2013. The Application of Biotechnology to Orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, [e-journal] 32(2) pp. 69-139. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.715984> [Accessed 27 August 2018].
- Paek, K.Y., Hahn, E.J. and Park, S.Y., 2011. Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, [e-journal] 7(10) pp. 293-306. http://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_20 [Accessed August 2019].
- Pant, M., 2013. Brahama Kamal-the spiritually revered, scientifically ignored medicinal plant. *Current Science*, [e-journal] 104(6) pp. 685-686. <https://www.currentscience.ac.in/Volumes/104/06/0685.pdf> [Accessed 21 May 2017].
- Real, C.S., Moreno, M.D. and Menchaca, G.R.A., 2007. Cultivo de protocormos de *Mormodes maculata* var. *Unicolor* L.O. Williams (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, [e-journal] 9(1) pp. 55-58. <https://www.uv.mx/personal/tkromer/files/2021/05/Menchaca-et-al.-2021-Las-Orquideas-de-Veracruz-Cap.-12.pdf>
- Reyes D., J. I., 2017a. *Clonación de Agave angustifolia* HAW. mediante técnicas biotecnológicas. [e-book] 92 p. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/67351> [Accessed 25 Jun 2018].
- Reyes-Díaz, J.I., Arzate-Fernández, A.M., Piña-Escutia, J.L. and Vázquez-García, L.M., 2017b. Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops and Products*, (108) pp. 81-85. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>
- Salazar-Mercado S.A., Amaya-Nieto A. Z. and Barrientos-Rey F., 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el

- desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, [e-journal] 15(2) pp.97-105. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41268> [Accessed 10 Jul 2017].
- SEDICI, 2017. Cultivo *in vitro*. Disponible en http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/22114_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6. [Accessed 25 February 2017].
- Sheelavanthmath, S.S., Murthy, H.N., Hema, P.E., Hahn, E.J. and Paek, K. Y., 2005. High frequency of protocorm like bodies (PLB's) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. *Scientia Horticulturae* [e-journal] 106(3) pp. 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.04.012> [Accessed 28 Jul 2018].
- Sheoran, O.P; Tonk, D.S; Kaushik, L.S; Hasija, R.C and Pannu, R.S., 1998. Statistical Software Package for Agricultural Research Workers. Recent Advances in information theory, Statistics & Computer Applications by D.S. Hooda & R.C. Hasija Department of Mathematics Statistics, CCS HAU, Hisar pp. 139-143. <http://14.139.232.166/opstat/>
- Sinha, P. and Jahan, M.A.A., 2011. Clonal propagation of *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL. Cv. 'Golden Horizon' through *in vitro* culture of leaf segments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, [e-journal] 46 (2) pp. 163-168. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v46i2.8182> [Accessed 25 September 2017].
- So-Young, P., Hosakatte, N. M. and Kee-Yoeup, P., 2001. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, [e-journal] (38) pp. 168–172. <https://doi.org/10.1079/IVP2001274> [Accessed 28 May 2019].
- Sujjarittharakarn, P. and Kanchanapoom, K., 2011. Efficient direct protocorm-like bodies induction of dwarf *Dendrobium* using thidiazuron. *Notulae Scientia Biologicae*, [e-journal] 3(4) pp. 88-92. <http://doi.org/10.15835/nsb.3.4.6356> [Accessed 30 April 2019].
- Tan, A.M., Danial, M., Mahmood, M. and Subramaniam, S., 2012. Exquisite protocol of callus induction and protocorm-like bodies (PLB's) regeneration of *Dendrobium Sonia*-28. *Australian Journal of Crop Science*, [e-journal] 6(5) pp. 793-800. http://www.cropj.com/sabrumanian_6_5_2012_793_800.pdf [Accessed 21 Jun 2018].
- Tanaka, M. and Sakanishi Y., 1978. Factors affecting the growth of *in vitro* cultured lateral buds from *Phalaenopsis* flower stalks. *Scientia Horticulturae*, (8) pp. 169-178. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NL19780298435> [Accessed 18 July 2017].
- Tirado, J.M., Naranjo, J.E. and Atehortua, L., 2005. Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(1) pp. 25-31. <http://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Viñas, M. and Jiménez, V.M. 2011. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de Palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2) pp. 229-242. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/28028> [Accessed 22 Jul 2019].