

Desarrollo y multiplicación *in vitro* de orquídea *Brassolaeliocattleya*

Development and *in vitro* multiplication of the *Brassolaeliocattleya* orchid

Mirel Sánchez-Sotelo¹ , Teresa de Jesús-Rodríguez Rojas^{1*} , María Andrade-Rodríguez² ,
Antonio Castillo-Gutierrez¹ , J. Rolando Ramírez-Rodríguez³ 

¹ Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, (UAEM), Av. Nicolás Bravo s/n, Parque Industrial Cuautla, 62717, Xalostoc, Ayala, Morelos, México.

² Posgrado en Ciencia Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM, Av. Universidad 1001, 62209, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.

³ Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, UAEM.

*Autor para correspondencia: teresa.rodriguez@uaem.mx

Fecha de recepción:

29 de abril de 2021

Fecha de aceptación:

19 de abril de 2023

Disponible en línea:

19 de septiembre de 2023

Este es un artículo en acceso abierto que se distribuye de acuerdo a los términos de la licencia Creative Commons.



Reconocimiento-

NoComercial-

CompartirIgual 4.0

Internacional

(CC BY-NC-SA 4.0)

RESUMEN

La propagación *in vitro* es una técnica de suma importancia para la producción de orquídeas, pues de esta manera se pueden multiplicar y comercializar ejemplares con características sobresalientes que tienen más aceptación comercial. Con lo anterior, se protege a las poblaciones naturales y el aprovechamiento de orquídeas se lleva a cabo de manera sustentable. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de tres concentraciones de 6-benziladenina (BA) en crecimiento y desarrollo de protocormos a plántulas de *cattleya* (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro*. Los protocormos provenientes de semillas se subcultivaron a un nuevo medio con las mismas características, pero adicionando BA en tres diferentes tratamientos 1.0 mg·L⁻¹, 1.5 mg·L⁻¹ y 2.0 mg·L⁻¹. El crecimiento y desarrollo *in vitro* de protocormos presentó mejor resultado adicionando BA en dosis de 1.5 mg·L⁻¹, pues esto promovió la altura de la planta, la longitud de la hoja, el aumento en el número de hojas, así como en el largo de la raíz, gracias a lo cual se lograron plántulas grandes y vigorosas para el transplante y aclimatación.

PALABRAS CLAVE

Orquídea, protocormos, inducción.

ABSTRACT

In vitro propagation is an important technique to produce orchids since it allows the multiplication and marketing of specimens with outstanding characteristics that have more commercial acceptance. By following this practice, natural populations are protected and the use of orchids is carried out in a sustainable manner. The objective was to evaluate the effect of three concentrations of 6-benziladenine (BA) on the growth and development of protocorms in *cattleya* (*Brassolaeliocattleya*) seedlings *in vitro*. The protocorms from the seeds were subcultured to a new medium with the same characteristics but adding BA in three different treatments: 1.0 mg·L⁻¹, 1.5 mg·L⁻¹ and 2.0 mg·L⁻¹. The *in vitro* growth and development of protocorms presented a better result by adding BA in 1.5 mg L⁻¹ doses, where plant height, leaf length, leaf number and root length were promoted, obtaining large and vigorous seedlings for transplanting and acclimatization.

KEYWORDS

Orchid, protochorms, induction.

INTRODUCCIÓN

La palabra *orquídea* pertenece al latín *orchis*, que con el tiempo derivó en *orchidaceae*, término con el que se designó a la familia más numerosa del reino vegetal, pues, con aproximadamente de 25,000 a 35,000 especies, se le encuentra en todos los hábitats y en ambientes muy diversos (Freuler 2008). En México, se conocen más de 1,200 especies de orquídeas (Hágsater et al. 2006) y sólo 10 por ciento de éstas se comercializa de forma regulada (Tapia-Tapia y Reyes-Chilpa 2008). Las orquídeas tienen un valor comercial importante, el precio oscila entre \$206.00 MX por ejemplar (Molina-Luna et al. 2015) y llega a ser superior a \$1,000.00 MX. Dentro de éstas, *Cattleya* es considerada como una de las más comerciales y conocidas, debido a sus coloridas y hermosas flores de gran tamaño y forma (Calderón 2007), así como gracias a su delicada fragancia (Lecoufle 2006). Sus híbridos poseen flores grandes de hasta 15 cm (Fisher 2007).

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas, extremadamente ligeras y se producen en grandes cantidades. Su propagación se realiza en forma agámica y por semillas, pero, de estas últimas, sólo unas pocas germinan y perpetúan la especie (Arditti y Ghani 2000; Lallana et al. 2016), debido a que las orquídeas presentan factores intrínsecos como la dependencia de la relación simbiótica que realizan con los hongos micorrízicos (Sedano et al. 2015).

El cultivo asimbiótico o la siembra *in vitro* de orquídeas es una técnica muy relevante desde el punto de vista comercial y también ecológico. Las plantas producidas de esta manera son de gran interés para programas de reintroducción de especies nativas en áreas de preservación ambiental (Martini et al. 2001). Las técnicas de micropropagación permiten producir un gran número de plantas, seleccionando los medios de cultivos y los nutrimentos adecuados, los cuales sustituyen la función del micobionte en su habitat natural (Menchaca et al. 2012). Con estas técnicas se obtiene una germinación que va de 80 a 100 por ciento.

Una técnica eficaz es el cultivo de tejidos vegetales, considerada una herramienta biotecnológica para la propagación de especies con potencial comercial y en peligro de extinción, debido a que permite obtener tasas altas de germinación y posterior multiplicación

(Pence 2011). En la propagación *in vitro* de orquídea es importante establecer protocolos de multiplicación, con la finalidad de obtener y desarrollar los protocormos y promover su crecimiento hasta plántulas, con el objetivo de iniciar la multiplicación masiva para producción comercial o para la conservación de las especies (Gil et al. 2016). El medio de cultivo usado para la germinación *in vitro* es más complejo que las condiciones donde germina en su hábitat natural, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada (McKendrick 2000).

El medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) ha sido evaluado en la germinación y crecimiento de muchas especies con resultados óptimos, debido a su contenido en sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, que proporcionan altos niveles de nitrógeno y el potasio necesario para su nutrición (Salazar y Cancino 2021). Otros autores como Dalzotto (2013) y Andrade-Rodríguez et al. (2015) comprobaron que el medio de cultivo idóneo y adecuado para la germinación de semillas de *Gomesa bifolia* (Sims) M.W.Chase & N.H.Williams es el medio MS suplementado con 3 por ciento de sacarosa, pH ajustado a 5.7 y 0.6 por ciento de agar, y con 100 mg·L⁻¹ de mioinositol, 1 mg·L⁻¹ de tiamina HCl, 1 mg·L⁻¹ de piridoxina HCl, 1 mg·L⁻¹ de niacina, 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg·L⁻¹ de glicina y 1.0 g de carbón activado. Adicionalmente, Chyuam-Yih y Norihan (2011) estudiaron el efecto de cantidades de citoquininas (BA y kinetina: 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg·L⁻¹, cada uno) en la inducción de cuerpos protocormales en un medio MS para la propagación *in vitro* de *Paphiopedilum*, gracias a lo cual observaron que la adición de BA no tuvo efecto significativo, algo que sí ocurrió con la adición de 1.0 mg L⁻¹ de kinetina, la cual sí tuvo efecto significativo en la inducción de protocormos.

Se han efectuado diversos estudios para cada una de las fases de la propagación *in vitro* de orquídeas, pero existe una fase intermedia entre la germinación y la aclimatación —el crecimiento y el desarrollo del protocormo—, la cual inicia desde la semilla hasta la obtención de la plántula. La fase requiere nutrimentos diferentes a los que se proporcionan durante la germinación. Por ello, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de tres concentraciones de 6-benziladenina (BA) en el crecimiento y desarrollo

de protocormos para obtener plántulas de *Cattleya (Brassolaeliocattleya) in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se efectuó en el laboratorio de biotecnología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (UAEM), Morelos, México (18° 44' 39" N y 98° 54' 34" O, 1 294 msnm). El clima en la región es cálido semi-húmedo, con una temperatura promedio de 21-24 °C, humedad relativa baja y precipitaciones promedio que varían entre 720 y 820 mm (García-Rubio et al. 2015).

Material vegetal. El material vegetal fueron protocormos provenientes de un estudio previo de germinación *in vitro* de semillas de *Brassolaeliocattleya*, de donde se seleccionó el material vegetal con una o dos pequeñas hojas.

Medio de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo MS modificado por Andrade-Rodríguez et al. (2015), suplementado con 100 mg·L⁻¹ de mioinositol, 1 mg·L⁻¹ de tiamina HCl, piridoxina HCl, niacina, ácido nicotínico y glicina, 3 por ciento de sacarosa; el pH se ajustó a 5.7 y se agregó 0.6 por ciento de agar nutritivo (Cat. No. 7141, MCD LAB, Ciudad de México, México) y 1.0 g de carbón activado, pues este último absorbe sustancias inhibitorias indeseables como etileno o pigmentos tóxicos, además de que propicia el desarrollo de raíces (Flores-Escobar et al. 2011). Se adicionaron tres tratamientos de 6-Bencilaminopurina (BA, Cat. No. B3274-50 ml, Sigma Aldrich, Naucalpan de Juárez, México) (1, 1.5 y 2 mg·L⁻¹). El medio se sirvió en frascos de 100 mL, en los cuales se colocaron 20 mL de medio de cultivo y se esterilizó en una autoclave Stik® MJ-54 A (Proveedor de Laboratorios, S.A. de C.V., Tlajomulco de Zúñiga, México), durante 18 minutos a 120 °C y 1.5 kg·cm⁻².

Establecimiento de tratamientos. En una campana de flujo laminar se extrajeron los protocormos de orquídeas, y se colocaron 5 por frasco con medio de cultivo por cada tratamiento. Los frascos con los explantes se colocaron en incubación en una cámara climática con temperatura de 25 °C, fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, e intensidad luminosa de 29 μE·m⁻²·s⁻¹.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar para estudiar tres tratamientos de BA y 20 repeticiones, donde la unidad experimental fue cada uno de los frascos con 5 protocormos de orquídea.

Variables evaluadas. Las variables evaluadas fueron porcentaje de sobrevivencia, altura de la planta, longitud de hoja, ancho de hoja, número de hojas, número de raíces, longitud de raíces, y número de brotes por protocormo.

Análisis estadístico. Los datos de porcentaje de supervivencia se normalizaron mediante la raíz cuadrada más uno y se procesaron mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el software SAS versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza indicó que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia, debido a que los protocormos provenían de una germinación *in vitro* previa, lo que permitió el porcentaje de supervivencia de 100 por ciento.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($p \leq 0.05$) entre concentraciones de BA, para altura de la planta, número de hojas y longitud de raíz, y significativo para longitud de hoja, sin diferencias significativas para el ancho de la hoja y número de raíces (Cuadro 1).

El medio de cultivo MS adicionado con 1.5 mg·L⁻¹ de BA fue el que generó mejor resultado. La adición del BA al medio está relacionada con mayor cantidad de brotes (Peña-Ramírez et al. 2010). Y contrasta con lo reportado por Chyuam-Yih y Norihan (2011), quienes estudiaron el efecto de cantidades de citoquininas (BA y kinetina: 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg·L⁻¹ cada uno) en la inducción de protocormos en un medio MS para la propagación *in vitro* de *Paphiopedilum*, donde la adición de BA no mejoró los resultados.

Los resultados obtenidos mostraron que la adición de 1.5 mg·L⁻¹ de BA generó un mejor desarrollo de protocormos y un mayor crecimiento de su raíz, lo cual dio lugar a una plántula. También estimuló la regeneración secundaria de nuevos protocormos, adheridos al mismo sistema radical, observado en un aumento en el diámetro y la longitud (Figura 1).

En contraste, el menor crecimiento y desarrollo se observó en el medio de cultivo con 2.0 mg·L⁻¹ de BA, en donde no se desarrollaron completamente las raíces (Figura 2). La regeneración secundaria de protocormos

Cuadro 1. Cuadrados medios (CM) y coeficiente de variación (CV) del análisis de varianza de seis variables evaluadas en tres tratamientos de benziladenina (BA) en *Brassolaeliocattleya*.

Variable	CM	CV %
Altura de la planta (mm)	10.13**	23.1
Largo de la hoja (mm)	2.97*	26.7
Ancho de la hoja (mm)	0.17ns	25.8
Número de hojas	2.65**	30.3
Número de raíces	0.029ns	35.2
Longitud de raíz (mm)	4.14**	29.14

ns: no significativo $p \geq 0.05$, **: altamente significativo $p \leq 0.05$

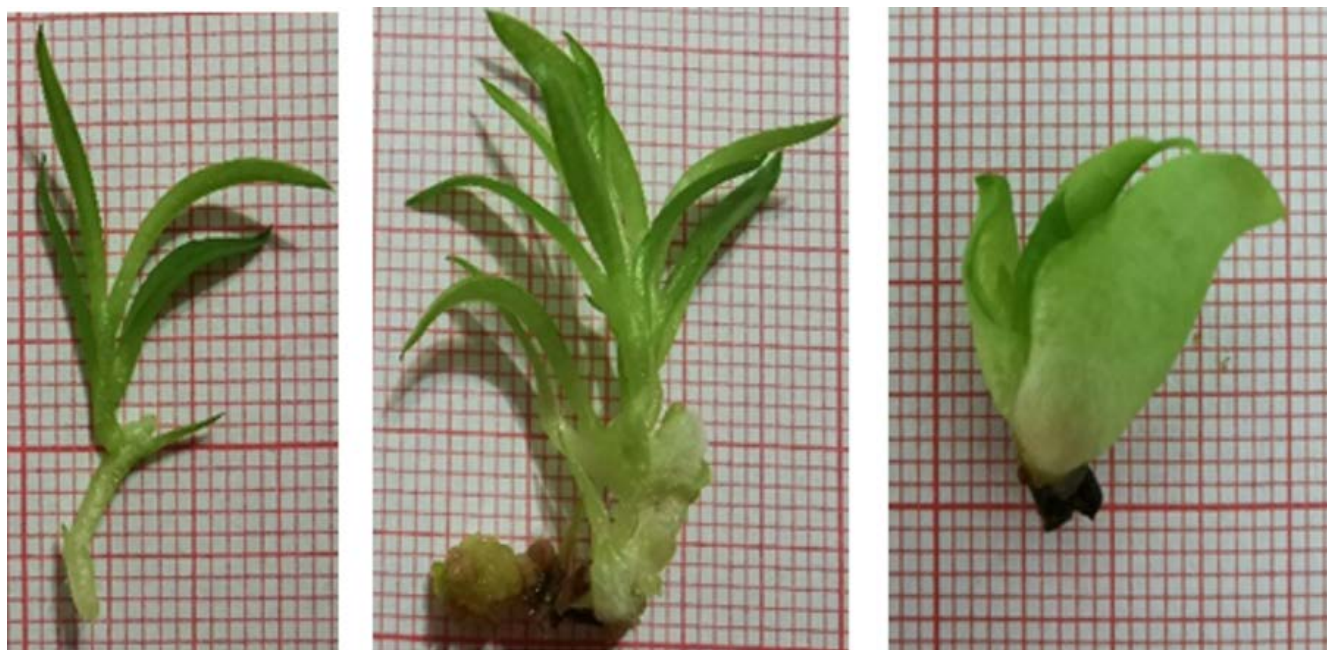


Figura 1. Plántulas de *Brassolaeliocattleya* desarrolladas a partir de protocormos en tres diferentes concentraciones de BA: a) $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, b) $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y c) $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

también se presentó en el tratamiento con $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA, pero en porcentajes más bajos, pues el sistema radical fue escaso y las raíces muy débiles y pequeñas, en algunos casos ausentes y oxidadas. Al respecto, Chyuam-Yih y Norihan (2011) reportan que la adición de BA inhibe la inducción de la formación secundaria de protocormos, y raíces débiles y pequeñas, por lo que coincide con lo observado por Ávila-Díaz et al. (2009) en la orquídea *Laelia speciosa* (Kuth) Schltr.

Los resultados indican que la adición de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA al medio MS estimuló la formación de nuevos protocormos y que afecta significativamente la altura de la planta (5.1 mm), el número de hojas (2.0 mm) y el largo de raíz (2.7 mm), pero sin ser no significativo para las variables largo de la hoja, ancho de la hoja y número de raíces. Esto puede atribuirse principalmente a que la planta, al absorber las hormonas, envía

mensajes para acelerar procesos como la elongación del sistema radical, la expansión foliar y la liberación de enzimas hidrolíticas. Pero una misma hormona puede expresarse de forma pleiotrópica, es decir, una misma hormona participa en diferentes procesos; dependiendo de su concentración, puede generar una respuesta estimuladora o inhibitoria, además puede intervenir en un mismo efecto y su respuesta ocurrir en un tiempo determinado (Melgarejo 2010). De la misma forma, Wegier et al. (2013) establecen que los reguladores de crecimiento son sustancias que, a bajas o altas concentraciones, estimulan, inhiben o modifican de alguna manera los procesos fisiológicos. Con lo anterior mencionado y los resultados obtenidos en esta investigación, es evidente que las plantas *in vitro* requieren reguladores de crecimiento, pero, en diferentes dosis, la respuesta de hormesis es distinta para

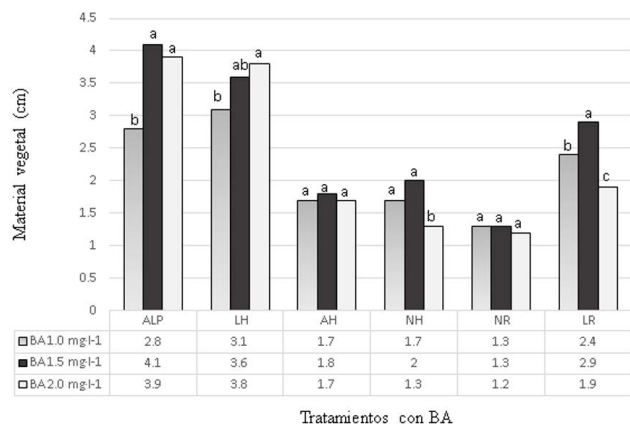


Figura 2. Efecto de tres concentraciones de BA adicionadas a un medio de cultivo MS, en *Brassolaeliocattleya*. ALP: altura de la planta (cm), LH: Longitud de la hoja (cm), AH: ancho de la hoja (cm), NH: Número de hojas, NR: Número de raíces y LR: longitud de raíz (cm). Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey 0.05).

algunas variables, pues controla el crecimiento y desarrollo de manera específica.

CONCLUSIONES

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de protocormos de *Brassolaeliocattleya* presentó mejor resultado al adicionar BA en dosis de 1.5 mg·L⁻¹, lo que promovió el aumento en la altura de la planta, la longitud de la hoja, el número de hojas y la longitud de raíz, lo que dio lugar a la obtención de plántulas grandes y vigorosas para el trasplante y la aclimatación.

LITERATURA CITADA

- Andrade-Rodríguez M, Vargas-Araujo J, Villegas-Torres OG, López-Martínez V, Guillen-Sánchez D, Alia-Tejagal I. 2015. Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *cattleya* (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro*. *Interciencia* 40: 549-553.
- Arditti J, Ghani AKA. 2000. Tansley review no. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145: 367-421. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>
- Ávila-Díaz I, Oyama K, Gómez-Alonso C, Salgado-Garciglia R. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 335-343. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>
- Calderón DE. 2007. Libro rojo de las plantas de Colombia. Volumen 6. Orquídeas, Primera parte. Instituto Alexander von Humboldt/Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá, Colombia.
- Chyuam-Yih N, Norihan MS. 2011. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 193-202. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9851-0>
- Dalzotto CA. 2013. Efecto de medios de cultivo en el crecimiento *in vitro* de *Oncidium bifolium* Sims. "Federal". *Revista Científica Agropecuaria* 17: 7-15.
- Fisher AL. 2007. Cultivo de orquídeas. Grupo. Imaginador de ediciones. Buenos Aires, Argentina.
- Flores-Escobar G, Gil-Vásquez I, Colinas-León MT, Mata-Rosas M. 2011. Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17: 5-8.
- Freuler MJ. 2008. Orquídeas. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina.
- García-Rubio LA, Vargas-Ponce O, Ramírez-Mireles FJ, Munguía-Lino G, Corona-Oceguera CA, Cruz-Hernández T. 2015. Distribución geográfica de *Hylocereus* (Cactaceae) en México. *Botanical Sciences* 93: 921-939. <https://doi.org/10.17129/botsci.282>
- Gil CAI, Contreras PDF, Gutiérrez RLC. 2016. Establecimiento *in vitro* de protocormos de *Prosthechea* sp. bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético. *Mutis* 6: 6-15. <https://doi.org/10.21789/22561498.1108>
- Hágsater E, Soto MA, Salazar GA, Jiménez R, López MA, Dressler RL. 2006. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. Distrito Federal, México.
- Lallana VH, Billard CE, Martínez VA, García LF, Barsanti MV, Di Persia JF, Dalzotto C, Scimpft KM, De la Cruz V. 2016. Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos "in vitro". *Ciencia, Docencia y Tecnología. Suplemento* 6: 94-121.
- Lecoufle M. 2006. Orquídeas. Ed. Omega. Barcelona, España.
- Martini PC, Willadino L, Alves GD, Donato VMTS. 2001. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36: 1319-1324.
- McKendrick S. 2000. Manual para la germinación *in vitro* de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Madison, Estados Unidos.
- Melgarejo LM. 2010. Experimentos en fisiología vegetal. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

- Menchaca RA, Lozano MÁ, Sánchez L. 2012. Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 3: 9-16.
- Molina-Luna NG, Arellanes Y, Martínez E. [internet]. 2015. El papel de la comercialización, orquídeas y bromelias de mercados de los Valles Centrales de Oaxaca. La subsistencia campesina. *Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*. [citado 2021 ene 6]. Disponible en: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx/2015/orquideas.html>
- Pence VC. 2011. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47: 176-187. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9323-6>
- Peña-Ramírez YJ, Juárez-Gómez J, Gómez-López L, Jerónimo-Pérez JL, García-Sheseña I, González-Rodríguez JA, Manuel LR. 2010. Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: An improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 46: 149-160. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9280-0>
- Salazar S, Cancino G. 2012. Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14: 53-59.
- Sedano CG, Manzo GA, Roldán HR, Castellanos SJA. 2015. Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1: 451-456.
- Tapia-Tapia EdelC, Reyes-Chilpa R. 2008. Productos forestales no maderables en México: aspectos económicos para el desarrollo sustentable. *Madera y Bosques* 14: 95-112.
- Wegier A, Barba-Escoto L, García-Campusano F, Pérez J y Flores Á. 2013. Método para el establecimiento in vitro de caoba (*Swietenia macrophylla*) King a partir de explantes vegetativos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Distrito Federal, México.