



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**EFFECTO DE DOS SUPLEMENTOS ORGÁNICOS Y UN  
SUSTRATO ORGÁNICO EN LA RESPUESTA DE  
PROLIFERACIÓN DE PLBs y REGENERACIÓN *in vitro* DE  
PLÁNTULAS DE *Phalaenopsis* sp.**

QUE COMO TRÁMITE INICIAL PARA LA EVALUACIÓN  
PROFESIONAL DE:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

PRESENTA:

**ARELY PIÑA SAMPEDREÑO**

(41ª GENERACIÓN)

NÚMERO DE CUENTA:

(1370054)

OPCIÓN DE EVALUACIÓN PROFESIONAL: ARTÍCULO  
ESPECIALIZADO PARA PUBLICAR EN LA REVISTA TROPICAL  
AND SUBTROPICAL AGROECOSYSTEMS

ASESOR:

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO" EL CERRILLO  
PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO.

FEBRERO 2020



# EFFECTO DE DOS SUPLEMENTOS ORGÁNICOS Y UN SUSTRATO ORGÁNICO EN LA RESPUESTA DE PROLIFERACIÓN DE PLBs Y REGENERACIÓN *in vitro* DE PLÁNTULAS DE *Phalaenopsis* sp.

## EFFECT OF TWO ORGANIC SUPPLEMENTS AND AN ORGANIC SUBSTRATE ON THE RESPONSE OF PLBs PROLIFERATION AND *in vitro* REGENERATION OF *Phalaenopsis* sp. SEEDLINGS.

Arely Sampedreño, Amaury M. Arzate-Fernández\*, Tomás Héctor Norman Mondragón

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.

\*Autor para correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx

### RESUMEN

*Phalaenopsis* son plantas con valor ornamental por sus delicadas y bellas flores de corte. La germinación de orquídeas tiene limitantes, ya que el endospermo está reducido en algunas especies, mientras que en otras se encuentra ausente. Una alternativa es utilizar la técnica *in vitro* para la micropropagación, en presencia de un medio de cultivo enriquecido con suplementos orgánicos que promuevan la multiplicación, el crecimiento y el desarrollo durante su cultivo *in vitro*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dos suplementos orgánicos y un sustrato orgánico en la respuesta de proliferación de PLBs y regeneración *in vitro* de plántulas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu. Usando como suplementos orgánicos (SUO): agua de coco (AC) y pulque (PUL) y como sustrato orgánico (SO), heces del escarabajo del maní (*Ulomoides dermestoides*). Los explantes iniciales fueron PLBs obtenidos previamente *in vitro* a partir de semilla, los cuales, cinco PLBs sin disgregarse de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu fueron considerados como un cluster con un diámetro aproximado de 5 mm, y cada cluster fue como un explante. Cinco explantes se cultivaron en cada recipiente de plástico con una capacidad de 500 ml, con 30 ml de medio de cultivo CP2 que contenía MS al 50 %, adicionado con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, vitaminas MS, 4 g L<sup>-1</sup> de agar, 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado y suplementado con AC (100 ml L<sup>-1</sup>), y PUL (10 ml L<sup>-1</sup>), solos y en combinaciones con cinco concentraciones de SO (2.5, 5.0, 7.5 y 10 g L<sup>-1</sup>). Se probaron 20 tratamientos para evaluar su efecto en la tasa multiplicativa de PLBs, número de plántulas regeneradas, número y longitud de hojas, así como de raíces, en un arreglo trifactorial distribuidos al azar con tres repeticiones (20 x 3). Los resultados revelaron que el tratamiento cuatro con 100 ml L<sup>-1</sup> de AC y 7.5 g L<sup>-1</sup> de SO fue el mejor con un número promedio de 22.2 PLBs. Asimismo, en el tratamiento seis (testigo) se observó el mayor número de plántulas regeneradas con una media de 16.3.

**Palabras clave:** *Phalaenopsis*, PLBs (Protocorm-Like-Bodies), Agua de coco, Pulque, Sustrato orgánico, Proliferación.

### SUMMARY

*Phalaenopsis* are plants with ornamental value, for their delicate and beautiful cut flowers. Orchid germination has limitations, as the endosperm is reduced in some species, while in others it is absent. An alternative is to use the *in vitro* technique for micropropagation, in the presence of a culture medium enriched with organic supplements that promote multiplication, growth and development during *in vitro* culture. The objective of this study was to evaluate the effect of two organic supplements and an organic substrate on the proliferation response of PLBs and *in vitro* regeneration of *Phalaenopsis* sp seedlings. var. Dudu. Using as organic supplements (SUO): coconut water (AC) and pulque (PUL) and as an organic substrate (SO), peanut beetle feces (*Ulomoides dermestoides*). The initial explants were PLBs previously obtained *in vitro* from seed, which, five PLBs without disintegrating from *Phalaenopsis* sp. var. Dudu were considered as a cluster with a diameter of approximately 5 mm, and each cluster was an explant. Five explants were grown in each plastic container with a capacity of 500 ml, with 30 ml of CP2 culture medium containing 50 % MS, added with 20 g L<sup>-1</sup> of sucrose, MS vitamins, 4 g L<sup>-1</sup> of agar, 0.5 g L<sup>-1</sup> of activated carbon and supplemented with AC (100 ml L<sup>-1</sup>), and PUL (10 ml L<sup>-1</sup>), alone and in combination with five concentrations of SO (2.5, 5.0, 7.5 and 10 g L<sup>-1</sup>). Twenty treatments were tested to evaluate their effect on the multiplicative rate of PLBs, number of regenerated seedlings, number and length of leaves, as well as roots, in a randomly distributed three-fold arrangement (20 x 3). The results revealed that treatment four with 100 ml L<sup>-1</sup> of AC and 7.5 g L<sup>-1</sup> of SO was the best with an average number of 22.2 PLBs. In addition, treatment six (control) showed the highest number of regenerated seedlings with an average of 16.3.

**Keywords:** *Phalaenopsis*, PLBs (Protocorm-Like-Bodies), Coconut water, Pulque, Organic substrate, Proliferation.

## INTRODUCCIÓN

Orchidaceae es una de las familias más amplias de las angiospermas y taxonómicamente la más especializada de las monocotiledóneas. Comprende cerca de 700 géneros y 35,000 especies distribuidas en todo el mundo (Menezes *et al.*, 2016).

Las orquídeas tienen dos tipos básicos de crecimiento: simpodial, en las que el nuevo crecimiento se produce a partir de una yema axilar en sentido horizontal, y monopodial, en las que el nuevo crecimiento se produce a partir de una yema apical en sentido vertical, como es el caso de *Phalaenopsis*. Entre los principales países productores de orquídeas están: Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Países Bajos y Tailandia. Alrededor del 75 % de las orquídeas comercializadas a nivel mundial pertenecen al género *Phalaenopsis* (De la Cruz *et al.*, 2017).

*Phalaenopsis* es una orquídea epífita, sin pseudobulbos, tienen raíces largas y carnosas, a menudo ramificadas, tallo corto, hojas con la capacidad de retener agua, su flor amplia de 7-10 cm de larga duración a veces perfumada (Aju 2009) originaria del sureste de Asia, India, Indonesia y parte de Australia (Rittershausen y Rittershausen, 2004).

Estas representan uno de los grupos de plantas ornamentales más apreciados a nivel mundial por el colorido, forma y duración de sus flores, pero a diferencia de otros géneros de orquídeas, su sistema de reproducción es difícil ya que su crecimiento en condiciones naturales es lento, debido a la dependencia de una relación simbiótica con un hongo formador de micorriza (Murad, *et al.*, 2010) lo cual ha dificultado su multiplicación vegetativa y la reproducción sexual se ha visto agravada por la presencia de altos índices de esterilidad en algunos de sus híbridos (Tirado *et al.*, 2005).

Varios factores son responsables en la extinción y amenaza de las orquídeas en todo el mundo, como la deforestación, fragmentación del hábitat especialmente en regiones tropicales, el aumento del uso de fertilizantes, la explotación excesiva del suelo y la recolección masiva (Kaur y Bhutani, 2012).

El desarrollo de técnicas de micropropagación en orquídeas ofrece múltiples ventajas como la reproducción de genotipos superiores, raros, estériles o libres de enfermedades. Particularmente el cultivo de semillas de orquídea *in vitro* ha permitido reducir los tiempos de producción de plántulas, ya que algunas especies pueden llegar a la madurez (producción de flores) en menos años (Menezes *et al.*, 2016).

El cultivo *in vitro* es una técnica que facilita la propagación de *Phalaenopsis*, ya que se lleva a cabo en condiciones asépticas, en presencia de una fuente de nutrientes y en condiciones físicas controladas, lo que potencializa su capacidad de crecimiento (Flores-Hernández *et al.*, 2017) y obtener grandes volúmenes de plantas con el fin de producir a gran escala para el comercio. No obstante, el éxito depende del tipo de explante a utilizar (Zhao *et al.*, 2010). Estudios recientes han permitido la regeneración de plántulas a partir de tallos con yemas axilares (Feria *et al.*, 2007), meristemos (Arditti y Ernst, 1993), segmentos nodales (Košir *et al.*, 2004), fragmentos de hojas, botones florales (Tokuhara y Mii, 2001) y raíces (Park *et al.*, 2003). Sin embargo, estos métodos son reportados como complicados e ineficientes (Salazar *et al.*, 2013).

Los medios y su formulación son muy importantes para maximizar el vigor de las orquídeas en condiciones de cultivo de tejidos, se requiere una disponibilidad equilibrada de nutrientes para un costo bajo, y así lograr protocolos sustentables en orquídeas (Ganasekaran *et al.*, 2010).

Desde hace algunos años los orquideólogos han desarrollado fórmulas nutricionales para la germinación aséptica de semillas de una gran variedad de orquídeas (Mineá, 2004). Estas fórmulas generalmente contienen uno o más ingredientes de composición relativamente indefinida, como el agua de coco (Withner, 1959). Por otra parte, Arditti y Lawrence (1964), así como Anderson (1967), reportaron que cuando se usó agua de coco y homogeneizados de banana y tomate como suplementos para el medio de cultivo, mejoró el porcentaje de germinación de las semillas en una variedad de géneros de orquídeas. A partir de entonces se han reportado diversos estudios relacionados con la adición de suplementos orgánicos al medio de cultivo; sin embargo, la mayor parte de los autores se ha dedicado a evaluar el efecto sobre la germinación de las semillas (Mineá, 2004), por lo que se tiene poca información en relación con los efectos sobre los procesos de desarrollo posteriores a la germinación, como el crecimiento o la formación de brotes y rizogénesis de las plántulas obtenidas (Arias-Hernández *et al.*, 2006). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos suplementos orgánicos y un sustrato orgánico en la respuesta de proliferación de PLBs y regeneración *in vitro* de plántulas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Como explantes iniciales fueron PLBs obtenidos previamente *in vitro* a partir de la germinación de semillas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu, los cuales, cinco PLBs sin disgregarse fueron considerados como un cluster con un diámetro aproximado de 5 mm, y cada cluster fue considerada como un explante (Unidad Experimental, UE) (Figura 1).

### Suplementos orgánicos (SUO)

Se utilizó pulque (PUL) y agua de coco (AC), cada uno por separado se filtraron a través de un filtro de cafetera y posteriormente en un filtro millipore FILTROPOR de 0.20µm, los dos suplementos orgánicos se congelaron hasta su posterior uso.

Como sustrato orgánico (SO), se usaron heces de escarabajo del maní (*Ulomoides dermestoides*) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química del sustrato orgánico (SO).

Propiedades	Concentración
pH	5.55
Nitrógeno Total	0.0555 %
Fósforo	3928.9 ppm
Potasio	1576.7 ppm
Calcio	4415.9 ppm
Magnesio	740.1 ppm
Sodio	102.5 ppm
Hierro	385.71 ppm

### Condiciones de cultivo *in vitro*

Cinco explantes fueron cultivados asepticamente por cada recipiente de 500 ml de capacidad, con 30 ml de medio de cultivo CP2 (MS al 50 %, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, vitaminas MS, 4 g L<sup>-1</sup> de agar, 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado) suplementado con AC (100 ml L<sup>-1</sup>) o PUL (10 ml L<sup>-1</sup>), solos y en combinaciones de SO (2.5, 5.0, 7.5 y 10 g L<sup>-1</sup>). Se pudo notar que al colocarse el SO al medio de cultivo el pH presentó un efecto alcalino y las orquídeas necesitan un medio ácido, por lo que se ajustó el pH final del medio a 5.5±0.1 con HCL 1.0 N, antes de adicionar el agar y después se esterilizó en autoclave, a una temperatura de 121 °C y a 1.1 Kg cm<sup>-2</sup> de presión por 20 minutos. Los explantes se incubaron en condiciones de luz usando lámparas de luz blanca (25 µmol m<sup>-2</sup>s) durante 16 horas por 13 semanas.



Figura 1. Aspecto de un explante de cinco PLBs de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu obtenidos *in vitro* a partir de la germinación de semillas (Barra = 5 mm).

### Tratamientos y variables evaluadas

Se probaron 20 tratamientos en un arreglo trifactorial 2x2x5 distribuidos en un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones (20x3); con los siguientes niveles por factor: factor A (0 y 100 ml L<sup>-1</sup> AC), factor B (0 y 10 ml L<sup>-1</sup> PUL) y factor C con cinco niveles (0, 2.5, 5.0, 7.5, y 10 g L<sup>-1</sup> SO) (Tabla 1), para evaluar estadísticamente su efecto promedio en la proliferación de PLBs y número de plántulas regeneradas *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu (tasa de multiplicación), número y longitud (cm) de hoja y raíz por tratamiento. El registro de cada dato por variable se hizo a los 90 días después del establecimiento del cultivo.

### Análisis estadístico

Para evaluar la significativa estadística de los efectos de los tratamientos probados, los datos registrados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA, Prueba de Fisher con  $\leq 0.05$ ), atendiendo al diseño experimental empleando; la comparación de medias entre los tratamientos con efecto significativamente diferente se hizo empleando la prueba de Tukey con  $\leq 0.05$ . Se usó el programa estadístico StatGraphics<sup>®</sup> versión 5.0 para Windows<sup>®</sup> para ambos procedimientos.

### Aclimatación de plántulas

Cuando las plántulas regeneradas *in vitro* alcanzaron una altura aproximada entre 4-6 cm éstas se transfirieron a un domo de plástico con una mezcla de fibra de coco y tepojal (1:1), así se mantuvieron en esas condiciones durante 21 días, realizando pequeños orificios en el domo de plástico para facilitar la adaptación de las mismas a las condiciones en el invernadero.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de los suplementos orgánicos: agua de coco (AC) y pulque (PUL) y un sustrato orgánico (SO) en la proliferación de PLBs y regeneración *in vitro* de plántulas

Los PLBs propagados *in vitro* se usan frecuentemente porque pueden obtenerse en un corto periodo de tiempo, además que se pueden regenerar fácilmente en plantas completas, y tener una mayor respuesta en masa o cluster (Sujjaritthurakarn y Kanchanapoom, 2011). La proliferación de PLBs se observó a los 15 días después de haberse establecido los tratamientos, además se observó en 16 de los 20 tratamientos evaluados. Los tratamientos en donde fue suplementado el AC y combinados con SO se observó una respuesta favorable hasta con un 100% de proliferación de PLBs, los cuales tuvieron una coloración verde limón, y PLBs de forma globular. (Figura 2 A, B, C). La regeneración de plántulas se registró a los 90 días de cultivo observándose en 13 de los 20 evaluados, siendo el seis (testigo) el mejor tratamiento sin la adición de SO, AC y PUL, obteniendo en ese, plántulas de 4-6 cm aproximadamente (Figura 2 D).

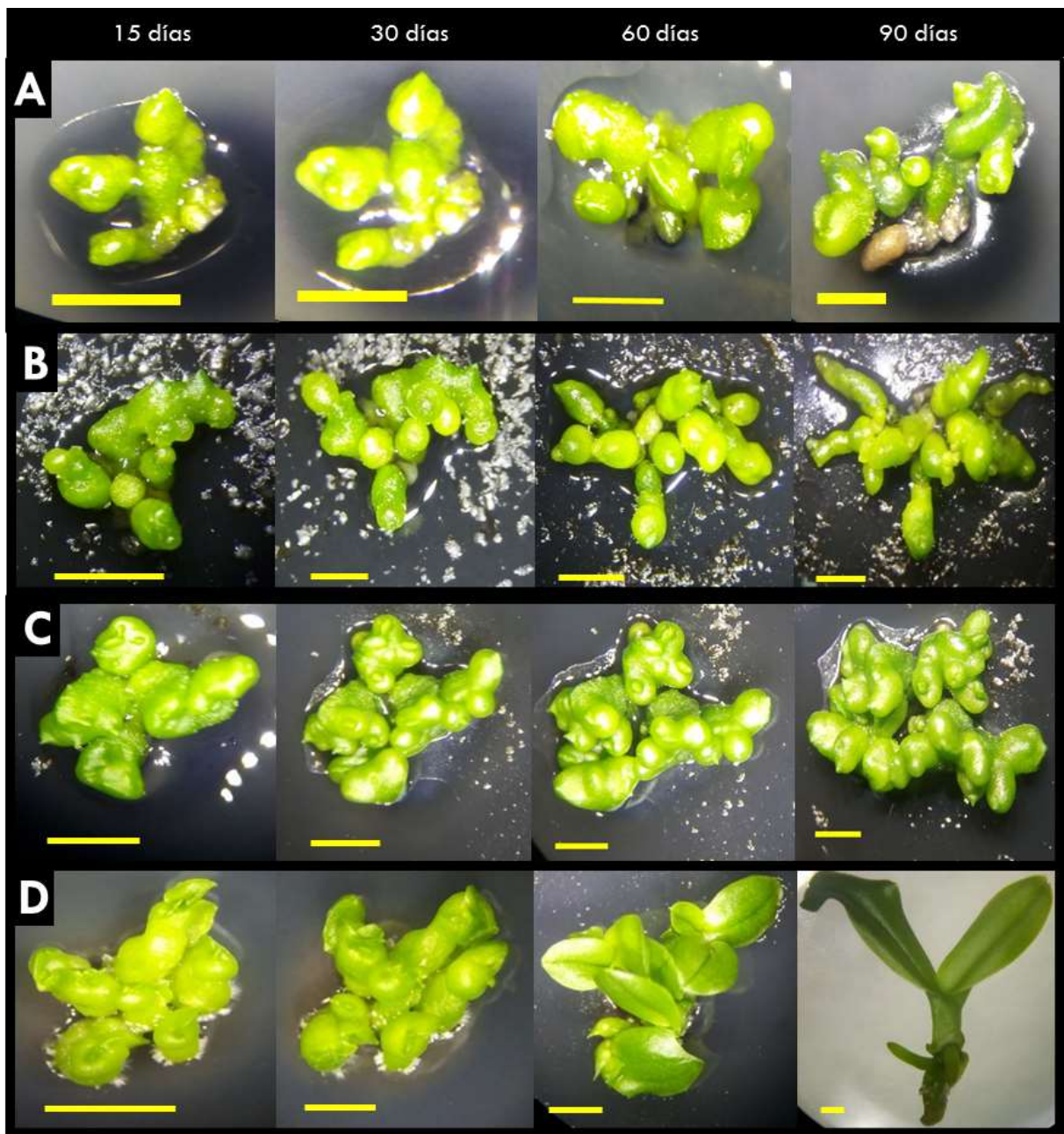


Figura 2. Proliferación *in vitro* de PLBs y plántulas regeneradas de *Phalaenopsis* var. Dudu a partir de explantes de PLBs, en medio de cultivo CP2. **A) Tratamiento uno**, con 100 ml L<sup>-1</sup> AC. **B) Tratamiento diez**, con 10 g L<sup>-1</sup> SO. **C) Tratamiento cuatro**, con 7.5 g L<sup>-1</sup> SO + 100 ml L<sup>-1</sup> AC. **D) Tratamiento seis**, sin la adición de CO ni SO. (Barra = 5 mm).

Se ha reportado que la incorporación de suplementos orgánicos en el medio de cultivo de orquídeas es simple y beneficiosa y puede considerarse como un método convencional para mejorar los medios utilizados en producción comercial (Ichihashi e Islam, 1999). Los suplementos orgánicos los han usado con éxito porque contienen carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas, compuestos fenólicos y un bajo nivel de aminoácidos y ácidos orgánicos que pueden influir en el crecimiento y desarrollo de protocormos (Rahman *et al.*, 2004). En esta investigación se encontró que el valor más alto en la proliferación de PLBs fue en el tratamiento cuatro con 7.5 g L<sup>-1</sup> SO + 100 ml L<sup>-1</sup> AC con una media de 22.2 PLBs por explante (Tabla 2). Muy probablemente esa respuesta se debió al potencial del agua de coco para inducir la división celular en tejidos diferenciados, por ser una fuente nutritiva para los embriones (Caplin y Steward, 1948). Así mismo (Intuwong y Sagawa, 1973) reportaron que el agua de coco está relacionada con su capacidad de inducir división celular, promoviendo así la diferenciación temprana de protocormos (PLBs).



Tabla 2. Efecto del medio CP2 suplementado con dos suplementos orgánicos (AC y PUL) y un sustrato orgánico (SO) en la respuesta de proliferación de PLBs y regeneración *in vitro* de plántulas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a los 90 días de cultivo.

Tratamiento	SO (g L <sup>-1</sup> )	AC (ml L <sup>-1</sup> )	PUL (ml L <sup>-1</sup> )	No de PLBs	No de plántulas	No de hojas	Longitud de hoja	No de raíces	Longitud de raíz
1	0	100	0	7.9 defg	0.8 bc	2.6 a	2.8 abc	2 ab	1.5 cde
2	2.5	100	0	20.8 ab	0 c	-	-	-	-
3	5	100	0	2.1 hi	0.4 bc	2 b	3.4 ab	1.4 bc	2.8 a
4	7.5	100	0	22.2 a	0 c	-	-	-	-
5	10	100	0	13.2 cd	0 c	-	-	-	-
6	0	0	0	12.7 cde	3.2 a	2.6 a	2.4 c	2.4 a	1.1 e
7	2.5	0	0	10.4 cdef	2.8 a	2 b	3.1 abc	1.6 bc	1.8 bcd
8	5	0	0	1.8 hi	0.6 b	2 b	2.2 c	1.6 bc	1.3 de
9	7.5	0	0	15.2 c	0.6 bc	2 b	2.5 bc	1.4 bc	1.3 de
10	10	0	0	15.6 bc	0.4bc	1.4 cd	2.8 abc	1 c	2.5 ab
11	0	100	10	0.6 i	0 c	2 b	2.4 c	1.4 bc	5.2 e
12	2.5	100	10	0 i	1.3 b	1.8 bc	3.5 a	1 c	1.8 bcd
13	5	100	10	0 i	0 c	-	-	-	-
14	7.5	100	10	4.6 ghi	0 c	-	-	-	-
15	10	100	10	7.2 efgh	0.4 bc	1.2 d	2.5 bc	1.2 c	1.6 cde
16	0	0	10	0 i	0 c	-	-	-	-
17	2.5	0	10	6.9 fgh	0.6 bc	1.8 bc	2.4 c	1.6 bc	2.1 abc
18	5	0	10	8.1 defg	0.5 bc	1 d	2.5 bc	1 c	1 e
19	7.5	0	10	5 fghi	0 c	-	-	-	-
20	10	0	10	8.4 defg	0.4 bc	2.2 ab	2.6 bc	1.4 bc	1.6 cde

Los resultados son promedio de tres repeticiones por tratamiento.

Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Santoso *et al.* (1996), Huan *et al.* (2004), Ritcher *et al.* (2005) reportaron que el agua de coco es otro de los suplementos orgánicos para medios de cultivos *in vitro* que se utiliza en diferentes especies de orquídeas ya que incrementa la proliferación de PLBs, en comparación con otros suplementos orgánicos, debido a que contiene aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, mioinositol, citoquininas. Además, demostraron que un medio libre de reguladores de crecimiento y suplementado con agua de coco, promueve la formación de PLBs (Menezes *et al.*, 2016). En la presente investigación los resultados mostrados en el tratamiento uno con 100 ml L<sup>-1</sup> AC donde afectó la proliferación de PLBs obteniendo 7.9 PLBs por explante (Tabla 2).

El nivel de respuesta en la proliferación de PLBs y la regeneración de plántulas varió con la cantidad de SO y en combinación del AC, como se observa en el tratamiento cuatro con 7.5 g L<sup>-1</sup> SO + 100 ml L<sup>-1</sup> AC en donde se superó con 2.8 veces más al tratamiento uno con solo 100 ml L<sup>-1</sup> AC y al tratamiento diez con 1.4 veces al usar 10 g L<sup>-1</sup> SO los cuales fueron los tratamientos con los niveles más altos y con los cuales se pudo incrementar la proliferación de PLBs (Figura 3 a). Para el caso de regeneración de plántulas, el tratamiento seis (testigo) sin CO ni SO con el que se obtuvo la mayor cantidad de plántulas seguido del tratamiento siete con 2.5 g L<sup>-1</sup> SO (Figura 3 b) de manera que debe considerarse que el SO tiene una gran cantidad de nitrógeno (Tabla 1) y en combinación con AC hace suponer una mejor proliferación de PLBs y regeneración de plántulas. Estudios relacionados por Chen y Chang (2002) señalan que una concentración eficiente de nitrógeno orgánico puede promover el crecimiento de explantes. Al respecto en el tratamiento tres con 5 g L<sup>-1</sup> SO + 100 ml L<sup>-1</sup> AC, se observó una mejor respuesta favorable en la longitud de raíz con una media de 2.8.

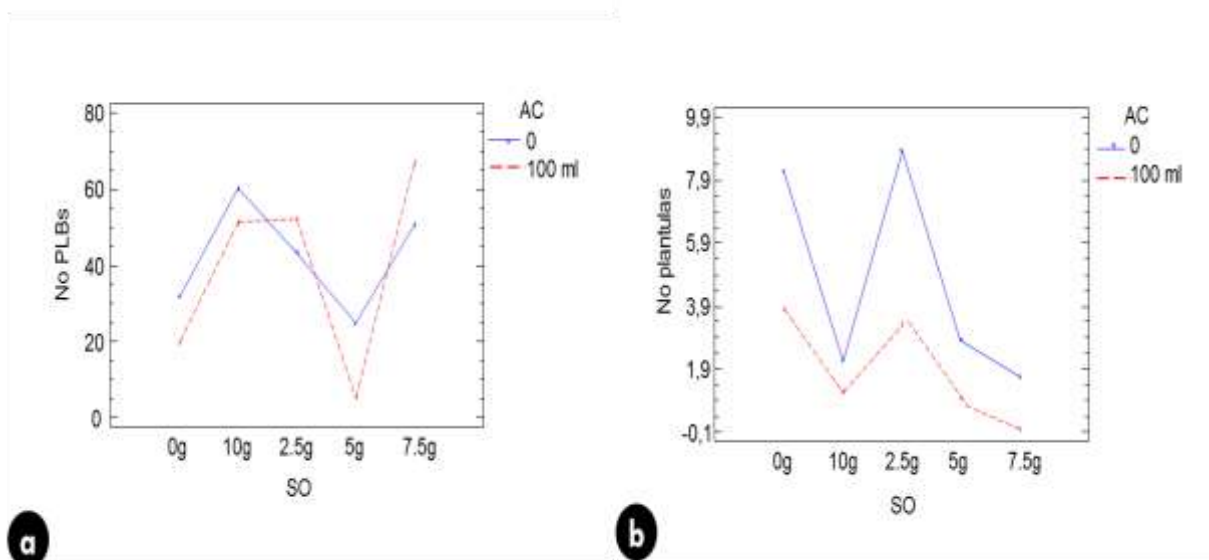


Figura 3. Efecto del AC y diferentes concentraciones de SO en el medio de cultivo CP2 a los 90 días de cultivo de *Phalaenopsis* var. Dudu. a) Proliferación de PLBs. b) Regeneración de plántulas.

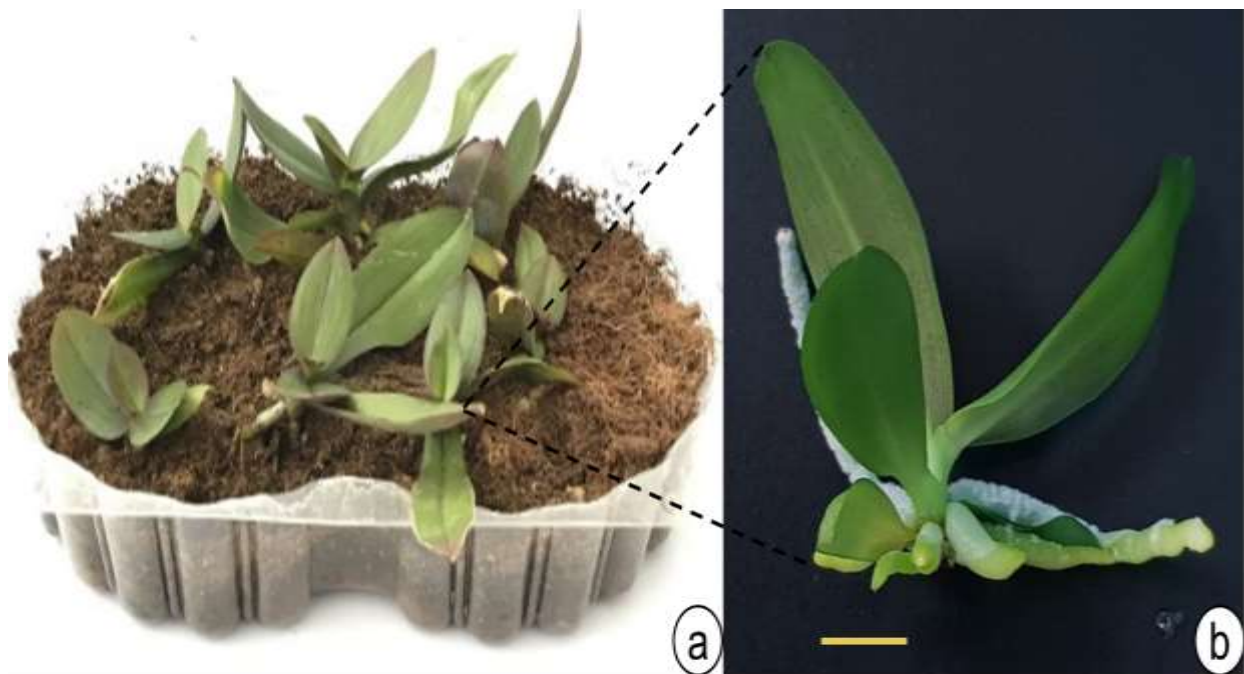
Anderson (1967) sugirió que los suplementos orgánicos tienen la capacidad de influir en la multiplicación de los PLBs y el crecimiento de las plantas de orquídea tales como, jugo de manzana, homogenizado de banano, agua de coco, extracto de maíz, jugo de tomate etc., dado que estos suplementos orgánicos se han utilizado en diferentes especies de orquídeas como *Paphiopedilum* spp. (Flamee, 1978), híbridos de *Vanda* (Mathews y Rao, 1980), *Acampe praemorsa* (Krishnamohan y Jorapul, 1986), *Catleya*, *Encydia*, *Oncidium* y *Stanhopea* (Villolobus y Muños, 1994), *Dendrobium* (Sudeep *et al.*, 1997), *Doritaenopsis* (Choedhury *et al.*, 2003), *Phalaenopsis gigantea* (Murad *et al.*, 2006).

Por otra parte, respecto a la regeneración de plántulas, siendo el tratamiento seis (testigo) sin la adición de SO, AC y PUL, fue considerado el mejor con una media de 3.2 plántulas, así como el número de hojas con una media de 2.6 y una media de 2.4 en el número de raíz a los 90 días de cultivo (Tabla 2). Efectos similares (Arias-Hernández *et al.*, 2006) se obtuvieron 0.8 número de brotes, 1.80 en el número de raíces y 2.10 cm en altura de plántula. Ensayos previos sugieren que bajas concentraciones de pulque son las que promueven un mayor número de PLBs. En nuestra investigación al suplementar PUL al medio de cultivo se pudo observar que se inhibió la proliferación de PLBs (datos no reportados). Sin embargo el tratamiento doce con 2.5 g L<sup>-1</sup> SO + 100 ml L<sup>-1</sup> AC + 10 ml L<sup>-1</sup> PUL favoreció en la longitud de hoja al alcanzar 3.5 (Tabla 2).

### Aclimatación de plántulas a condiciones *ex vitro*

Las plántulas regeneradas *in vitro* fueron transferidas a un domo de plástico en condiciones de ambiente controladas por un periodo de 21 días, realizando pequeños orificios en el domo de plástico para facilitar la adaptación de las plántulas en el invernadero (Figura 4 a). Posteriormente, cada una de ellas con una altura aproximada entre 4-6 cm (Figura 4 b) se trasladaron a macetas de 4 pulgadas con el mismo sustrato: fibra de coco y tepojal (1:1). El porcentaje de sobrevivencia de las plántulas fue del 94%. Esto concuerda con Moreno y Menchaca, (2007) quienes informan que un factor importante es la adición de suplementos orgánicos en los medios de cultivo, ya que aumento el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro*.





**Figura 4. a)** Adaptación de plántulas regeneradas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a condiciones *ex vitro* en invernadero **b)** Plántula de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu barra = 1 cm.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que las combinaciones de 7.5 g L<sup>-1</sup> de SO con 100 ml L<sup>-1</sup> de AC, suplementados al medio de cultivo CP2, influyeron en la proliferación de PLBs de *Phalaenopsis* sp var. Dudu, teniendo una media de 22.2 PLBs por explante. Sin embargo, el medio de cultivo CP2, sin ningún suplemento ni sustrato orgánico promovió un efecto positivo al regenerar plántulas de *Phalaenopsis* sp. var. Dudu a partir de PLBs, después de los 90 días de cultivo. La utilización solo de AC en el medio de cultivo promovió una media de 2.6 hojas. En el medio de cultivo que contenía solo PUL no se obtuvo ninguna respuesta en la proliferación de PLBs ni de plántulas regeneradas. Se logró el 94% de sobrevivencia de plántulas en invernadero. Se puede utilizar el medio de cultivo del tratamiento cuatro donde se obtuvieron resultados favorables en la proliferación de PLBs, y posteriormente pasar esos PLBs al medio de cultivo del tratamiento seis, el cual no contenía ningún SUO ni SO dado que ahí se regeneraron la mayor cantidad de plántulas, reduciendo los costos al no tener ningún suplemento orgánico, ni sustrato orgánico.

### Agradecimiento

Al Dr. Amaury Martin Arzate Fernández, investigador titular, por la asistencia financiera y asesor del estudio. Al M. Tomás Héctor Norman Mondragón, por las sugerencias y aportes brindados en el análisis estadístico. Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF) y al laboratorio de Biología Molecular Vegetal (LBMV) de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAMex) por todas las facilidades brindadas para el uso de equipo e instalaciones.

## REFERENCIAS

- Ajú, U.M.M. 2009. "Las orquídeas bases generales para conocimiento y enseñanza". Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de Maestría, Guatemala. 78 pp.
- Anderson L. 1967. Literature review of orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin*. 36: 304-308.
- Arditti J, Lawrence D. 1964. A new medium for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*. 33: 766-768.
- Arditti, J. y Ernst, R. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley-Sons, INC. New York.
- Arias-Hernández, Lourdes; Santibáñez, Sánchez Raúl; Rincón. Rosales Reiner; Ayora-Talavera, Teresa; Gutiérrez-Miceli Federico A. 2006. Efecto de agua de coco y homogeneizados de jitomate y plátano sobre el crecimiento de la orquídea *Guarianthe skinnerii*, cultivada *in vitro*. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 23-28 pp.
- Caplin S. y Steward F. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science*. 108:655-657.
- Chen J.T., Chang W.C. 2002. Effects of tissue culture conditions and explants characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium 'Gower Ramsey'*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69: 41-44.
- Chowdhury I., Rahman A.R.M., Islam M.O., Matsui S. 2003. Effect of plant growth regulators on callus proliferation, plantlet regeneration and growth of plantlets of *Doritaenopsis* orchid. *Biotechnology*. 2: 214-221.
- De La Cruz C. D. I; Ruiz S. M. E; Guerrero-Abad, J, C. 2017. Respuesta de la embriogénesis somática directa en tres regiones foliares de *Phalaenopsis amabilis*. *Rev. Investig. Agroproducción Sustentable*. 1: 72-78.
- Feria, M., Chávez, M., Quiala, E. 2007. "Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*". *Biotecnología Vegetal*. 7:27-33.
- Flamee M. 1978. Influence of selected media on the germination and growth of *Paphiopedilum* seedlings. *American Orchid Society Bulletin*. 47: 419-423.
- Flores-Hernández, L. A., Robledo-Paz, A., Jiménez-Montiel, M.J. 2017. Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8:1315-1328.
- George E. F. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer. 3:115-173.
- Gnasekaran, P.; Rathinam, X.; Sinniah, U.R.; Subramaniam, S.A. 2010. Study on the use of organic additives on the Protocorm-Like Bodies (PLBs) growth of *Phalaenopsis violacea* (Orchid). *Journal of Phytology*, .2:229-233.
- Huan, L.V.T.; Takamura, T.; Tanaka, M. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*. 166 (6): 1443-1449.
- Ichihashi S., Islam M.O. 1999. Effect of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science*. 68: 269-274.
- Intuwong O., Sagawa Y. 1973. Clonal propagation of sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescences. *American Orchid Society Bulletin*. 42: 264-270.
- Kaur Saranjeet., Bhutani K.K. 2012. Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Hort. Sci. (Prague)*. 39: 47-52.
- Košir, P., Škof, S., Luthar, Z. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta agriculturae Slovenica*. 83(2): 233 - 242.

- Krishnamohan P.T., Jorapur S.M. 1986. *In vitro* seed culture of *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatt. and McC. In: Vij S.P. (ed.). *Biology, Conservation and Culture of Orchids*. New Delhi, East-West Press.437–439.
- Mathews V.H., Rao P.S. 1980. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrids through tissue culture technique. *Plant Science Letters*. 17: 383–389.
- Menezes, G., Leticia; P. S. Machado María de Fátima; Ballesta, Paulina; Mora, Freddy; Milaneze, Gutierre, María Auxiliadora. 2016. Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laelio Cattleya* (Orchidaceae) IDESIA (Chile). 34: 47-54.
- Minea, M. 2004. A Study on Seed Germination and Seedling Development of *Spathoglottis* Bl. *Orchid Kasetsart Journal*. 38: 141-156.
- Moreno D. y Menchaca G. 2007. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Universidad Veracruzana, Mexico. Foresta veracruzana*. 9(2): 27-32.
- Murdad R., Hwa S.K., Seng C.K., Latip A.M., Aziz A.Z., Ripin R. 2006. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique. *Scientia Horticulturae*. 111: 73–79.
- Murdad, R., Adb, L.M., Abdul, A.Z., Ripin, R. 2010. Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol*. 18
- Park, S.Y., Murthy, H.N., Paek, K. 2003. Protocorm-Like Body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science*. 164: 919-923.
- Rahman, A.R.M.M., Islam, M.O., Prodhan, A.K.M.A. and Ichihashi, S. 2004. Effect of complex organic extracts on plantlet regeneration from PLBs and plantlet growth in the *Deritaenopsis* orchids. *JARQ*. 38: 55- 59.
- Ritcher, E. M.; Jesus, D. P.; Muñoz, R. A. A.; Lago, C. L.; Agnes, L. 2005. Determination of anions, cations, and sugars in coconut water by capillary electrophoresis. *Journal of the Brazilian of the Chemical Society*. 16: 1134-1139.
- Rittershausen, B.; Rittershausen, W. 2004. *Growing orchids*. London: Southwater. 256.
- Salazar, M.S.A., Amaya, N.A.Z., Barrientos, R.F. 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol*. 2: 97-105.
- Santoso U, Kubo K, Ota T, Tadokoro T, Mackawa A .1996. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chem*. 57(2): 299-304.
- Sudeep R., Rajeevan P.K., Valasalakumari P.K., Geetha C.K. 1997. Influence of organic supplements on shoot proliferation in *Dendrobium*. *Journal of Horticulture*. 3: 38–44.
- Sujjaritthurakarn, P., Kanchanapoom, K. 2011. Efficient direct Protocorm-Like Bodies induction of dwarf *Dendrobium* using thidiazuron. *Notulae Scientia Biologicae*. 3 (4): 88-92.
- Tirado, JM., Naranjo, JE, 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: 25-31.
- Tokuhara, K., y 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 & Developmental Biology – Plant*. 37: 457-461.
- Villolobus L., Munoz A.M. 1994. Tissue culture of orchids *Cattleya*, *Encyclia*, *Oncidium* and *Stanhopea*. *Orchid Review*. 102: 58–62.
- Withner Cl. 1959. *The Orchid: A Scientific Survey*. New York: Ronald Press.

Zhao, Y., Yang, S.H., Ge, W.Y., Li, Q., Chen, H.X., Ge, H. 2010. The metabolism of phenolics and reactive oxygen species in relation to the explant browning differences among the varieties of *Phalaenopsis* during the tissue culture. *Acta Horticulturae*. 37: 963–970.