



Evaluación de la morfogénesis in vitro en explantes de hojas de *phalaenopsis* sometido a un proceso de desinfección

Bernal-Parrado, Lida A.¹; Hernández -Acosta, William A.¹.; Cuadros-Sánchez, Pedro D.¹.; Aguilar-Ortiz, Jeisson D.²; López-Muñoz, Luis G.² y Melo-Botello, Erick H.²

¹Grupo de investigación del centro agroindustrial del Meta, Centro Agroindustrial del Meta, Servicio Nacional de Aprendizaje, Villavicencio-Colombia

²Grupo de investigación Agroindustria y desarrollo, Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias agropecuarias y recursos naturales, Universidad de Los Llanos, Villavicencio-Colombia

<https://orcid.org/0009-0007-7031-9868> lbernal@sena.edu.co

<https://orcid.org/0000-0002-8217-7090> wahernandez@sena.edu.co

<https://orcid.org/0009-0002-7779-7989> pdcuadros@sena.edu.co

<https://orcid.org/0000-0001-8491-3760> jeisson.aguilar@unillanos.edu.co

<https://orcid.org/0000-0003-3186-8577> llopezm@unillanos.edu.co

<https://orcid.org/0009-0002-2461-2231> erick.melo@unillanos.edu.co

ASA/Artículo

doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.12787992>

Recibido: 23-10-2023

Aceptado: 29-06-2024

RESUMEN

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología vegetal del centro agroindustrial del Meta, ubicado en la ciudad de Villavicencio. El objetivo principal fue evaluar la morfogénesis in vitro en explantes de hojas de *Phalaenopsis*, para examinar la capacidad morfogénica de las hojas. Para el análisis se realizó una mezcla de sustratos con adiciones de fitohormonas de la siguiente manera: se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog, ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (1, 5, 10 [mg/l]) y Bencilaminopurina (BAP) (0,1; 0,5 y 1 [mg/l]). Como patrón de comparación o testigo se usó el medio de cultivo sin la adición de los estimulantes. Luego, los medios se esterilizaron en autoclave. Se evaluaron las hojas para detectar diferencias en los niveles de contaminación, fenolización, necrosis y oxidación. Esto permitió observar que el nivel de hojas no contaminadas (HNC) fue del 89%. La fenolización no se dio en mayor proporción en el tratamiento 2 (T2), lo cual permitió el control de la senescencia de *Phalaenopsis*. La oxidación se dio en un 72% en el tratamiento 2, para verificar. Finalmente, la necrosis se reportó en un 55% de los explantes de hojas de *Phalaenopsis* bajo esta variable. La aplicación de la proporción correcta de los bioestimulantes tiene una influencia considerable en la propagación de *Phalaenopsis*.

Palabras clave: *Explante, morfogénica, fenolización, hojas, phalaenopsis.*



Evaluation of in vitro morphogenesis in phalaenopsis leaf explants subjected to a disinfection process

ABSTRACT

The research was carried out in the plant biotechnology laboratory of the Meta agroindustrial center, located in the city of Villavicencio. The main objective was to evaluate in vitro morphogenesis in Phalaenopsis leaf explants, to examine the morphogenic capacity of the leaves. For the analysis, a mixture of substrates with additions of phytohormones was carried out as follows: the Murashige and Skoog culture medium, 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (1, 5, 10 [mg/l] was used.]) and Benzylaminopurine (BAP) (0.1, 0.5 and 1 [mg/l]). The culture medium without the addition of stimulants was used as a comparison standard or control. The media were then autoclaved. The leaves were evaluated for differences in levels of contamination, phenolization, necrosis, and oxidation. This allowed us to observe that the level of uncontaminated leaves (HNC) was 89%. Phenolization did not occur in a greater proportion in treatment 2 (T2), which allowed the control of Phalaenopsis senescence. Oxidation occurred at 72% in treatment 2, to verify. Finally, necrosis was reported in 55% of Phalaenopsis leaves under this variable. The application of the correct proportion of biostimulants has a considerable influence on the propagation of Phalaenopsis.

Keywords: *explant, morphogenetics, fenolization, leaves, phalaenopsis.*

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas (*Orchidaceae*) constituyen una de las familias más grandes y taxonómicamente diversas dentro de las angiospermas monocotiledóneas. Esta amplia familia abarca cerca de 700 géneros y 35,000 especies encontradas alrededor del mundo (Gonçalves et al. 2016). Las orquídeas presentan dos patrones principales de crecimiento: simpodial, en el cual surgen nuevos brotes desde yemas axilares de modo horizontal, y monopodial, con un crecimiento vertical continuo desde la yema apical, como ocurre en el género *Phalaenopsis* (Alarcón et al. 2023).

Dentro de los países con mayor producción de orquídeas se encuentran Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Países Bajos y Tailandia. (Bello et al. 2022) Aproximadamente el 75% de las orquídeas comercializadas mundialmente corresponden al género *Phalaenopsis*, lo que destaca su importancia económica y botánica (De la Cruz et al. 2017).

La familia *Orchidaceae* constituye una de las agrupaciones más amplias y diversas del reino plantae en cuanto a formas de vida, historias vitales, hábitats que ocupan, rasgos

morfológicos y procesos fisiológicos. Las orquídeas son mundialmente apreciadas por sus flores ornamentales, que se caracterizan por presentar una extensa longevidad en florero luego de ser cortadas (Chen et al. 2009; De, 2020). Estas plantas desarrollan inflorescencias que portan desde una hasta múltiples flores, observándose una enorme variabilidad interespecífica en el número y tamaño de las piezas florales. En las orquídeas, el pedúnculo floral cumple un rol central para conferir soporte mecánico al conjunto, facilitar el transporte hídrico y mediar el traslado de nutrientes (Zhang et al. 2018; Waterman & Bidartono, 2008; Zhang et al. 2017).

Las orquídeas del género *Phalaenopsis* son plantas ornamentales en macetas de gran valor comercial. Dentro de la industria de orquídeas, este género presenta características ventajosas como ciclos juveniles cortos, rápido crecimiento vegetativo, y una floración abundante que puede controlarse con facilidad. Estas orquídeas se distinguen por sus elegantes y exóticas formas florales, la variabilidad en el tamaño y color de sus flores, y una duradera longevidad como flor cortada (Paradiso & Pascale, 2014; Chen, 2020).

Diversos factores ambientales y agronómicos inciden sobre atributos físicos del follaje como la forma, longitud, ancho y área foliar. Entre

ellos se cuentan la temperatura diurna/nocturna y la fertilización (concentración y fórmula del fertilizante). La programación del momento de comercialización de las plantas en floración resulta decisiva para determinar el precio de mercado que alcanzarán (Lemaire et al. 2019; Feng et al. 2021).

La morfogénesis in vitro es un proceso clave en el cultivo de tejidos de orquídeas. A través de diferentes vías morfogénicas como organogénesis, embriogénesis somática y formación de protocormos, es posible regenerar plantas completas a partir de células, tejidos y órganos (Frausto, 2017).

La organogénesis directa permite la formación directa de brotes o tallos adventicios desde el explante, sin pasar por un callo intermedio. En la organogénesis indirecta, primero se induce un callo desdiferenciado para luego estimular el desarrollo de brotes (Kolomeitseva et al. 2021).

Los métodos de propagación tradicionales, así como las técnicas asociadas, resultan fundamentales para la conservación y mejoramiento de las especies vegetales. La obtención de altos porcentajes de germinación tanto simbiótica como asimbiótica constituye un aspecto central para viabilizar la preservación y multiplicación de orquídeas. El dominio de protocolos que permitan lograr niveles

satisfactorios de germinación de orquídeas, representa un savoir-faire indispensable para asegurar la perpetuación de tan apreciadas plantas. Los avances en este ámbito posibilitará optimizar las labores de conservación ex situ en bancos de germoplasma, así como implementar estrategias in vitro para la clonación y mejora genética (Sedano,2015; Herrera, 2018).

Los reguladores de crecimiento vegetal contienen fitohormonas que han sido extensamente estudiadas en cuanto a su papel en diversos procesos metabólicos de las plantas. No obstante, la información sistematizada acerca de su uso práctico en agricultura es aún escasa. Contar con dicha información integrada es clave, dado que podría ser empleada por distintos investigadores agrarios para explorar futuras aplicaciones en otros cultivos de interés. Resumiendo, si bien la influencia hormonal sobre el crecimiento, desarrollo y fisiología vegetal se comprende bastante bien científicamente, faltan más antecedentes sobre sus dosis y protocolos efectivos de administración en condiciones productivas reales. Por ello, cabe seguir investigando y difundiendo este conocimiento de modo que pueda tener mayor adopción para optimizar rendimientos y calidad de diversos cultivos a escala comercial(Borjas et al. 2020).

Dentro de los principales compuestos que regulan los procesos metabólicos en las plantas se encuentran las fitohormonas, de las cuales se han identificado diez hasta el momento: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, ácido salicílico, poliaminas, ácido jasmónico, brasinoesteroides y estrigolactonas (Takehara et al. 2018; Garay et al. 2014). Las cinco primeras son consideradas las "hormonas vegetales clásicas", cuyos descubrimientos se remontan a más de medio siglo atrás. Estas hormonas vegetales de reconocida importancia son moléculas orgánicas que, aún en concentraciones ínfimas, pueden desencadenar, inhibir o modular numerosos procesos fisiológicos en los vegetales. Su elucidación estructural y funcional sentó las bases para manipular vías metabólicas centrales en los cultivos, dando origen a toda una moderna área de reguladores vegetales ampliamente utilizados en la producción agrícola (Gollagi et al. 2019; Rodrigues et al. 2019).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la Investigación

La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología vegetal ubicado en el centro agroindustrial del Meta en la ciudad de

Villavicencio, Meta (Km 12 Vía Puerto López), coordenadas: 4° 4' 30" N, 73°35' 7" O. La precipitación anual es de 3856 mm, la temperatura promedio es de 25.5°C y la humedad promedio anual es del 83%.

Metodología de medición y análisis de variables.

El explante de hojas *Phalaenopsis* fue sometido a medios nutritivos con el fin de identificar su desarrollo morfogénético, para ello se plantearon las siguientes fases: Preparación de medios nutritivos, caracterización morfogénética, condiciones ambientales controladas y análisis estadístico.

Preparación de medios nutritivos.

En la morfogénesis de hojas se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (1, 5, 10 [mg/l]) (T1, T2, T3) y Bencilaminopurina (BAP) (0,1; 0,5 y 1 [mg/l])(T1,T2,T3). Se ajustó el pH a 5.8 y se empleó Phytigel como agente gelificante (2 g/l). Se esterilizó los medios a 121°C a 15 psi durante 15 minutos.

Caracterización morfogénética de *phalaenopsis*.

Se llevó a cabo un proceso de observación con la ayuda de un estereoscopio establecidos en el laboratorio, se registró histológicamente el

desarrollo de los explantes de hojas a partir de las vías de morfogénesis directa e indirecta, permitiendo reconocer cada uno de sus diferentes estadios, hasta la formación de una vitroplanta de *Phalaenopsis*. Mediante el uso del estereoscopio se realizó un seguimiento detallado para documentar las transformaciones histológicas.

Condiciones ambientales controladas

Se realizó un seguimiento diario de variables ambientales como temperatura, intensidad lumínica y humedad relativa. Los explantes fueron sometidos a condiciones de 25-30°C de temperatura, 1500-3000 lux de intensidad luminosa, 82-85% de humedad relativa, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Esto permitió establecer las condiciones óptimas para un correcto desarrollo de los explantes expuestos a los diferentes medios nutritivos, logrando la adecuada formación de vitroplantas de *Phalaenopsis*. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa infostat para evaluar la eficiencia de los medios de cultivo y variables ambientales en la inducción de la morfogénesis a partir de hojas de *Phalaenopsis*. Mediante el control y seguimiento de factores como la composición nutricional del medio, temperatura, intensidad lumínica, humedad relativa y fotoperiodo; fue posible determinar las

combinaciones más favorables para la organogénesis y formación de plántulas in vitro a partir de los diferentes explantes.

Análisis Estadístico

Para analizar los datos se utilizó estadística inferencial, aplicando la prueba de Kruskal-Wallis para detectar diferencias significativas entre tratamientos. También se empleó estadística descriptiva a través de medidas de tendencia central (media, desviación estándar, varianza muestral y coeficiente de variación) para las variables evaluadas. Asimismo, los datos de todos los ensayos fueron sometidos a análisis de normalidad mediante la prueba Shapiro-Wilk, análisis de igualdad de varianzas por Intervalos de Confianza de Bonferroni, y comparación entre grupos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, utilizando un nivel de significancia del 95%. A través de este conjunto de pruebas estadísticas se buscó caracterizar adecuadamente el comportamiento y relaciones entre tratamientos, determinando si existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las variables de respuesta analizadas en los procesos morfogenéticos estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se logran expresar en cada una de los cuadros expuestos seguidamente, estos resultados fueron tomados y analizados por medio de la comparación de medias por el test de Kruskal Wallis para datos no paramétricos, esto debido a la distribución no normal que arrojó el test de Shapiro-Wilk, lo que nos llevó a iniciar una demostración no paramétrica de estos datos.

Cuadro 1. Porcentaje de hojas contaminadas.

Tratamiento	Método	HC(%)	HNC(%)
T1	1	0	100±0
T1	2	20±10,0	78±10,0
T2	1	9±9,5	91±9,5
T2	2	4±2,5	96±2,5
T3	1	8±7,9	92±7,9
T3	2	0	100±0
Blanco	1	29±12,5	72±12,5
Blanco	2	19±12,4	82±12,4

(N.A.) No aplica fuente: Elaboración propia (2023).

En el Cuadro 1 se representa el porcentaje de hojas con nivel de contaminación (HC) y hojas ausentes de contaminación (HNC), la ausencia de contaminación es un patrón positivo para la iniciación morfogénica de *phalaenopsis* a partir de explantes de hojas. La verificación de la interacción de cada método permite observar

las variaciones morfológicas que puede tener los explantes de hojas en las etapas de crecimiento de *phalaenopsis*, para nuestro estudio en todos los tratamientos de cada método la contaminación de las hojas estuvo en un promedio de 89% de efectividad en ambos métodos, en el Cuadro 2 se puede observar la efectividad de forma directa e indirecta en el desarrollo de los explantes de hojas, donde se evidencia que no hay diferencia estadística significativa y en el proceso de contaminación, sin embargo se denota que las condiciones de humedad relativa no interfieren en la recolección de los datos.

Cuadro 2. Comparación de los métodos.

Método	HC(%)	HNC(%)
1	12±9,1	88±9,1
2	11±8,3	87±8,3

(N.A.) No aplica fuente: Elaboración propia (2023).

Los diferentes medios nutritivos resultan sumamente importantes para la propagación in vitro de orquídeas, dado sus particulares requerimientos nutricionales. Tal como señalan Kumara et al (2022), la elección adecuada del medio de cultivo permite que los explantes se adapten de mejor manera y muestran mayor efectividad frente a diversos tipos de

contaminación. Asimismo, la composición nutritiva puede potenciar distintas cualidades en los tejidos cultivados. Este hecho fue confirmado en este estudio, donde se evidenciaron claras fortalezas de los explantes, manifestadas en menores niveles de contaminación, necrosis, oxidación y fenolización, dependiendo del medio de cultivo suministrado. Esto demuestra que una cuidadosa formulación de sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento en los medios, es decisiva para obtener altas tasas de supervivencia y óptimo desarrollo morfológico de los explantes de orquídeas cultivados in vitro. Los tipos y dosis de estos compuestos modulan procesos metabólicos centrales, otorgando resistencia frente a trastornos fisiológicos, hecho de gran relevancia cuando se busca la propagación masiva de genotipos superiores.

La contaminación en explantes de hojas de orquídeas se ha venido evaluando con diferentes investigaciones en donde el tratamiento con 5 mg/L de NAA (naftalenacético) resultó en el mayor número promedio de hojas (4-5 hojas) en las plántulas de *P. labukensis* después de 150 días de cultivo. Por el contrario, el tratamiento con 2,0 mg/L de BAP produjo el número promedio más bajo de hojas (Mercado et al.

2020). Si bien altas concentraciones de BAP y NAA (1,5-2,0 mg/L) no contribuyeron a la formación de más hojas, estas concentraciones en realidad inhibieron la formación de hojas en *P. labukensis*. Específicamente, los tratamientos con 2,0 mg/L de NAA y BAP resultaron en un promedio de sólo 2,00 y 1,00 explantes hojas por plántula, respectivamente (Mayo et al. 2020; Bhowmik et al. 2017). En otro estudio realizado en *Phalaenopsis amabilis* se encontró una contaminación en los explantes de hojas de 5,93 hojas/plántulas en su momento in vitro, en este estudio usaron diferentes reguladores de crecimiento vegetal cultivados en los medios nutritivos utilizados en nuestra metodología (Asa & Kaviani, 2020).

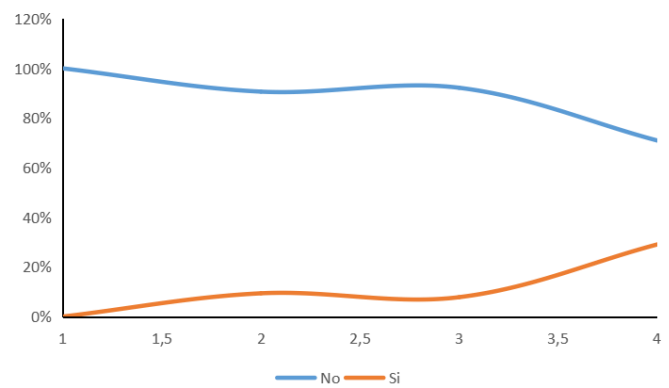


Figura 1. Porcentaje de contaminación en función del tiempo método 1.

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

La Figura 1 demuestra el comportamiento de los tratamientos al paso del tiempo, como inicia a perder su efecto la hormona utilizada como precursor para aumentar el nivel de resistencia a la contaminación ambiental, en el método 1 se mantiene unas condiciones relativas estables con las que se logra observar cuales pueden ser los factores de contaminación de cada uno de los productos, en el caso de la Figura 2 se observa que la intersección de los tratamientos se da en un valle en el cual el tratamiento llevó una eficiencia total, las hormonas vegetales son moléculas señalizadoras que se localizan en los diferentes tejidos de una planta y en cantidades específicas de acuerdo al proceso que regulan. Los cambios en la concentración y distribución de las hormonas vegetales modulan el desarrollo y las respuestas al estrés (Porta & Jimenez, 2019).

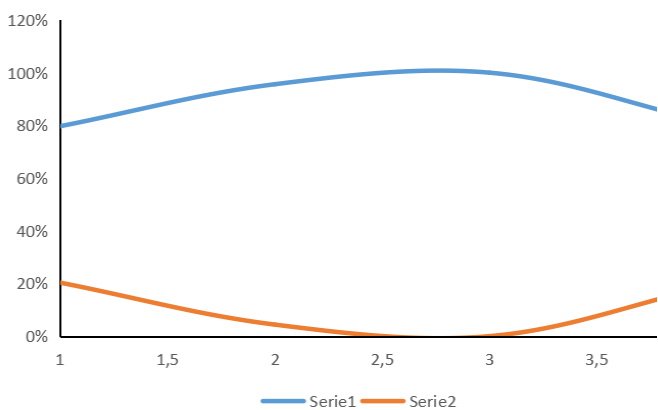


Figura 2. Porcentaje de contaminación en función del tiempo método 2.

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

Cuadro 3. Porcentaje de hojas variable necrosis.

Tratamiento	Método	HN(%)	HNN(%)
T1	1	9±8,2	88±8,2
T1	2	21±8,6	79±8,6
T2	1	28±9,5	72±9,5
T2	2	29±9,8	71±9,8
T3	1	27±11,0	73±11,0
T3	2	55±8,5	45±8,5
Blanco	1	45±7,8	55±7,8
Blanco	2	70±2,5	30±2,4

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

En la Cuadro 3 se observan las interacciones del porcentaje de hojas evaluadas que llegaron a un proceso de necrosis, el T3 con el método indirecto fue el que mayor porcentaje de necrosis tuvo con un 55%, el T1 con el método directo se mantuvo con un 9% de necrosis, realizando la comparación de las medias se observa que los tratamientos son diferentes significativamente agrupándose en 4 grupos donde estadísticamente T1:1, T1:2, T2:1, T2:2 y T3:1 son iguales en la proporción de necrosis mientras que con los otros mantienen una diferencia significativa, esto se constata en el tratamiento reportado con menor necrosis y el reportado con mayor necrosis, en la comparación de los métodos se obtuvo una necrosis de 44% en la morfogénesis indirecta, en la comparación de la morfogénesis

directa se observó que el 72% de necrosis en los explantes de hojas de *phalaenopsis* (ver Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de los métodos.

Método	HN(%)	HNN(%)
1	28±9,9	72±9,9
2	44±9,6	56±9,6

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

Estudios en los cuales se usan diversos protocolos de higienización y medios de cultivos en diferentes concentraciones se han encontrado diferencias significativas en los procesos de desarrollo de los explantes utilizados, según De Paw et al. (1995) en su investigación la aparición de pardeamiento en los explantes podría deberse a condiciones de cultivo subóptimas. Específicamente, un balance nutricional deficiente en el medio de cultivo o niveles insuficientes de reguladores del crecimiento agregados podrían provocar la aparición de zonas parduzcas en el tejido vegetal.

En el cultivo in vitro de *Vanda testacea*, se observó que el regulador de crecimiento NAA (naftalenacético) en concentraciones elevadas mostró efectos inhibitorios sobre el desarrollo de explantes de hojas (Kaur & Bhutani, 2014).

Específicamente, altos niveles de NAA provocaron una reducción en el número de explantes de hojas desarrollados, así como también causaron daño necrótico extensivo al tejido cultivado (Hossain et al. 2010). Por lo tanto, en esta especie de orquídea, el NAA a concentraciones por encima de cierto nivel óptimo resultó perjudicial, inhibiendo la organogénesis de los explantes y ocasionando necrosis máxima del tejido en cultivo in vitro (Nelson et al. 2023).

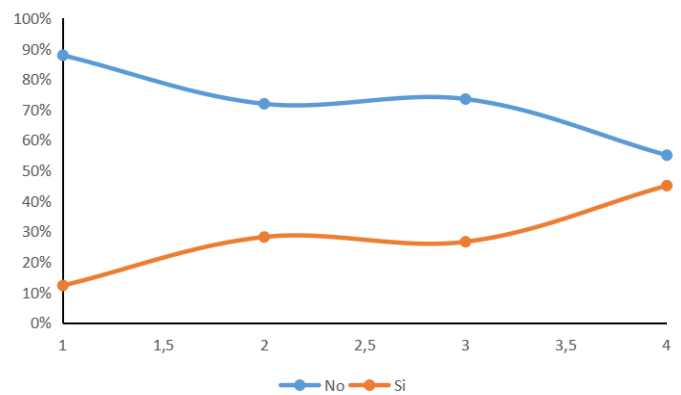


Figura 3. Porcentaje de necrosis en función del tiempo método 1.

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

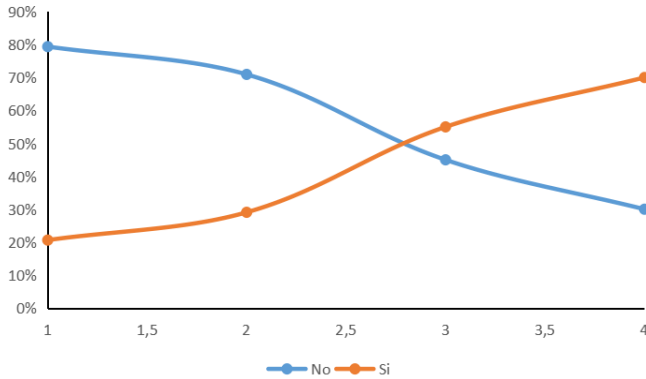


Figura 4. Porcentaje de necrosis en función del tiempo método 2.

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

En la Figura 1 se muestra una variación en el método 1 donde la tendencia en el paso del tiempo a una intersección, mayor a 32 días; en la Figura 2 se observa la intersección en el paso del tiempo en aproximación del tercer día donde se encontró una equivalencia en los tratamientos 3.

Cuadro 5. Porcentaje de hojas variable oxidación.

Tratamiento	Método	HO(%)	HNO(%)
T1	1	32±10,9	68±10,9
T1	2	49±9,4	52±9,4
T2	1	56±8,8	44±8,8
T2	2	72±2,6	28±2,6
T3	1	38±12,7	62±12,7
T3	2	55±12,3	45±12,3
Blanco	1	31±10,9	68±10,9
Blanco	2	13±6,7	87±6,7

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

En el Cuadro 5 el T2 reflejó una oxidación en las hojas (HO) del 72% en el contacto indirecto (Figura 5) en la observación de la morfogénesis de *phalaenopsis*, mientras que el blanco en contacto indirecto tiene un reporte de hojas sin oxidación (HNO) del 87%, para el contacto directo se tiene un reporte de hojas oxidadas (HO) del 56% en el T2(Figura 6), la oxidación de las hojas es un cambio característico de las plantas que se observa en el cambio de color.

Los resultados de oxidación logrados en este estudio fueron relativamente altos en comparación con otros reportes para una producción a gran escala sustentable. Específicamente, Košir et al. (2004) y Gow et al. (2008) obtuvieron una oxidación en un rango del 8-15% de explantes oxidados respectivamente mediante organogénesis directa. Por lo tanto, los niveles de oxidación alcanzados en este trabajo son poco competitivos en términos de una propagación masiva viable para productores. Se necesitan tasas de oxidación más bajas, similares a las logradas por otros autores con diferentes especies de orquídeas, para que el proceso sea económicamente rentable a nivel comercial, esto lo confirma Frausto et al. (2019) en donde muestra las características morfogénicas de diferentes explantes recolectados de las

variedades *Phalaenopsis* utilizando el método de nuestro estudio.

Cuadro 6. Comparación de los métodos.

Método	HO(%)	HN0(%)
1	39±11,0	61±11,0
2	47±10,8	53±10,8

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

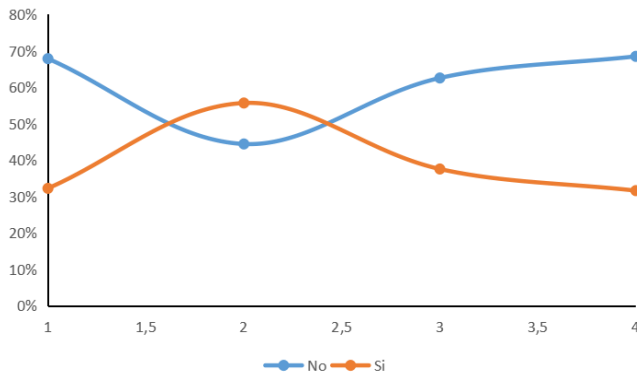


Figura 5. Porcentaje de oxidación en función del tiempo método 1.

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

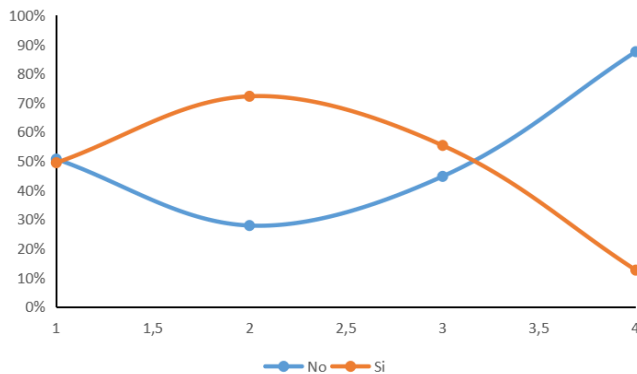


Figura 6. Porcentaje de oxidación en función del tiempo método 2.

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

Cuadro 7. Porcentaje de hojas variable fenolización.

Tratamiento	Método	HF(%)	HNF(%)
T1	1	51±5,9	49±5,9
T1	2	44±7,1	56±7,1
T2	1	42±7,1	58±7,1
T2	2	34±9,1	66±9,1
T3	1	11±7,1	89±7,1
T3	2	18±9,0	82±9,0
Blanco	1	5±5,0	95±5,0
Blanco	2	5±4,7	95±4,7

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

Cuadro 8. Comparación de los métodos.

Método	HO(%)	HN0(%)
1	27±8,8	73±8,8
2	25±8,9	75±8,9

No aplica (NA) Fuente: Elaboración propia (2023).

En la Cuadro 7 se observa una diferencia de la fenolización donde se aprecia que los explante de hoja sin fenolización (HNF) son mayor teniendo el tratamiento 3 como un controlador de fenolización con un 89% en aplicación directa, El control de la fenolización es un aspecto crucial para el éxito de cualquier procedimiento de cultivo de tejidos vegetales. Una vez que se desencadenan las reacciones de oxidación de fenoles en los tejidos dañados por

la manipulación, este proceso se hace irreversible, lo que conlleva a una pérdida significativa de la calidad de los explantes y compromete la posterior regeneración de plantas (Suárez et al. 2019; Valdez, 2002).

CONCLUSIONES

Las características morfogénicas de los explantes de hoja de *Phalaenopsis* permitieron observar la eficiencia de la combinación de los fitoestimulantes. Se puede constatar que para todas las variables evaluadas, el mejor resultado se obtuvo con el tratamiento T2 seguido del T3. Aunque este último tenía una mayor concentración de bioestimulantes, esto resultó ser una contrariedad, ya que concentraciones elevadas de dichos compuestos pueden llegar a generar una variación genética del material vegetal a obtener.

Este hecho se puede verificar a través de las alteraciones registradas en cada una de las variables y el aumento de procesos oxidativos evidenciados en el explante.

La aplicación de fitoestimulantes requirió determinar una concentración óptima, que potencie los procesos fisiológicos sin desencadenar efectos tóxicos o apoptosis celular. Los bioensayos realizados demostraron que en

Phalaenopsis la combinación empleada en el tratamiento T2 tuvo el efecto más favorable para promover la diferenciación y metabolismo de los explantes foliares, sin ocasionar reacciones perjudiciales como las observadas con dosis más elevadas (T3).

REFERENCIAS

- Alarcón Pulido, S. A., García Muñoz, S. A., Hernández Sánchez, M. D. L. L., Rodríguez Betancourt, A., & Enríquez García, F. (2023). El cultivo de orquídeas *Phalaenopsis*. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 10(2), 115–122. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v10i2.433>
- Asa, M. y Kaviani, B. (2020). Propagación in vitro de la orquídea *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume var. Jawa. *Revista iraní de fisiología vegetal*, 10 (2), 3113–3123.
- Bello Castañeda, N., Coy Barrera, C. A., & Perez, M. M. (2022). Revisión sistemática sobre tipos de sustratos utilizados en la propagación de orquídeas bajo invernadero. *Revista Mutis*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.21789/22561498.1887>
- Borjas-Ventura, R., Julca-Otiniano, A., & Alvarado-Huamán, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 150–164. <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200150>

- Chen, C. (2020). The fundamental issue in the phalaenopsis industry in the Netherlands. *Journal of Agriculture and Forestry*, 67(2), 89–100.
- Chen, X. Q., Liu, Z. J., Zhu, G. H., Lang, K. Y., Ji, Z. H., Luo, Y. B. (2009). “Orchidaceae,” in *Flora of China*. Vol. 25. eds. Z. Y. Wu, P. H. Raven and D. Y. Hong (Beijing/St. Louis: Science Press/Missouri Botanical Garden Press)
- De Pauw, M. A., Remphrey, W. R., & Palmer, C. E. (1995). The cytokinin preference for in vitro germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany*, 75(3), 267–275. <https://doi.org/10.1006/anbo.1995.1020>
- 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.
- De, L. C. (2020). Morphological diversity in orchids. *Int. J. Bot. Stud*. 5, 229–238. doi: 10.13140/RG.2.2.24041.31849.
- Frausto Jaime, K. A. (2017). MORFOGÉNESIS in vitro EN LAS ORQUÍDEAS *Phalaenopsis* spp. (Blume) Y *Cattleya* sp. (Lindley). [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma De Nuevo León].
- Frausto Jaime, K. A., Ojeda Zacarías, Ma. del C., Alvarado Gómez, O. G., García Zambrano, E. A., Rodríguez Fuentes, H., & Rodríguez Pérez, G. (2019). Inducción de brotes a partir de varas florales de la orquídea *Phalaenopsis* spp. (Blume) in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1207–1218. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.608>
- Garay Arroyo A, de la Paz Sánchez M, García Ponce B, Álvarez Buylla ER, Gutiérrez C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Rev Educ Bioquím* ;33(1):13-22.
- Gollagi SG, Lokesha R, Dharmpal S, Sathish BR.(2019).Effects of growth regulators on growth, yield and quality of fruits crops: A review. *J Pharmacog phytochem*;8(4):979-81.
- Gonçalves, L. de M., Machado, M. de F. P. S., Ballesta, P., Mora, F., Gutierrez, M. A. M., & Mangolin, C. A. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo in vitro del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *Idesia*, 34(1), 47–54. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>
- Gow, W. P.; Chen, J. T. and Chang, W. C. 2008. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant*. 30:507512.<https://doi.org/10.1007/s11738-008-0148-4>.
- Herrera, HH, García-Romera, I., Meneses, C., Pereira, G., Arriagada, CC, Wan, J., Tsai, WC (2018). Propagación de orquídeas: de laboratorios a invernaderos: métodos y protocolos. *Micorrizas*, 9 (1), 1–16. Obtenido de <http://www.mdpi.com/2076-3417/9/3/585%0Ahttps://doi.org/10.1080/14620316.2020.1727782%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.tplants>.

- 2019.06.004%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.11.026%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00445-9%0Ahttp://dx.doi.org/10.
- Kaur, S., & Bhutani, K. K. (2014). In vitro conservation and asymbiotic propagation of *Coelogyne flaccida* (Lindl.): A threatened orchid. *Plant Biosystems*, 148(5), 935–944. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.801368>
- Košir, P.; Škof, S. and Luthar, Z. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Agric. Slovenica*. 83(2):233-242.
- Kumar Bhowmik, T., Rahman, M. M., Tapash, C., Bhowmik, K., & Bhowmik, T. K. (2017). Effect of different basal media and PGRs on in vitro seed germination and seedling development of medicinally important orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. ~ 167 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(1), 167–172.
- Hossain, M. M., Sharma, M., Teixeira da Silva, J. A., & Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.10.009>
- Kolomeitseva, G. L., Babosha, A. V., Ryabchenko, A. S., & Tsavkelova, E. A. (2021). Megasporogenesis, megagametogenesis, and embryogenesis in *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). *Protoplasma*, 258(2), 301–317.
- <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01573-2>
- Mantovani, A. (2022). SIZE DEPENDENT ALLOCATION TO VEGETATIVE AND REPRODUCTIVE ORGANS OF THE ORCHID *LANKESTERELLA CERACIFOLIA* (SPIRANTHINAE). *Lankesteriana*, 22(3), 225240. <https://doi.org/10.15517/lank.v22i3.53115>
- Nelson, H. V., Gansau, J. A., Mus, A. A., Mohammad, N. N., Shamsudin, N. A., Amin, J., & Rusdi, N. A. (2023). Developing *Paraphalaenopsis labukensis* (Shim, A. Lamb & C.L. Chan), an Orchid Endemic to Sabah, Borneo, Asymbiotic Seed Germination and In Vitro Seedling Development. *Horticulturae*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060681>
- Paradiso, R., & De Pascale, S. (2014). Effects of plant size, temperature, and light intensity on flowering of *Phalaenopsis* hybrids in mediterranean greenhouses. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/420807>
- Porta, H., & Jiménez-Nopala, G. (2019). Papel de las hormonas vegetales en la regulación de la autofagia en plantas. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico- Biológicas*, 22. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.209.0.160>
- Mayo-Mosqueda, A., Maceda-López, L. F., Andrade-Canto, S. B., Noguera-Savelli, E., Caamal-Velázquez, H., Cano-Sosa, J. del S., & Alatorre-Cobos, F. (2020). Efficient protocol for in vitro

- propagation of *Laelia rubescens* Lindl. from asymbiotic seed germination. *South African Journal of Botany*, 133, 264–272.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.030>
- Mercado, S. A. S., Caleño, J. D. Q., & Rozo, L. Y. M. (2020). Improvement of the methodology of the tetrazolium test using different pretreatments in seeds of the genus *Epidendrum* (orchidaceae). *Journal of Seed Science*, 42. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v42231028>
- Rodrigues, J. P., Amador Salomão, P. E., Freitas, S. D. J., Rodrigues, W. P., Struiving, T. B., & Vale, P. (2019). Efeito de reguladores de crescimento na maturação dos frutos e qualidade da bebida de café. *Research, Society and Development*, 8(6), e17861026.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v8i6.1026>
- Sedano, G., Manzo, A., Roldán, R., & Castellanos, J. (2015). Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 451– 456. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263139243061.pdf>
- Suárez-Rebaza, L., Ganoza-Yupanqui, L., Zavala- Urtecho, D., & Alva-Plasencia, M. (2019). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos y acuosos de frutos de *Prosopis pallida* “algarrobo.” *Agroindustrial Science*, ISSN-e 2226-2989, Vol. 9, No. 1, 2019 (Ejemplar Dedicado a: Agroindustrial Science), Págs. 87-91, 9(1), 87–91. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7023252&info=resumen&idoma=SPA>
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7023252>
- Takehara S, Ueguchi-Tanaka M. Gibberellin. En: Hejátko J, Hakoshima T,(2018). *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*. Switzerland: Springer Nature;. p. 83-95. DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0_6
- Valdez Balero, A., Orellana, P., García, L., Veitia, N., Bermudez-Carballoso, I., R. García, L., & Padrón, Y. (2002). Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. Sp 70-1284) en la formación de callos. *Biotechnología Vegetal*, 2(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/125>
- Waterman, R. J., and Bidartondo, M. I. (2008). Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *J. Exp. Bot.* 59, 1085– 1096. doi: 10.1093/jxb/erm366.
- Zhang, F. P., Yang, Y. J., Yang, Q. Y., Zhang, W., Brodribb, T. J., Hao, G. Y., et al. (2017). Floral mass per area and water maintenance traits are correlated with floral longevity in *Paphiopedilum* (Orchidaceae). *Front. Plant Sci.* 8:50
- Zhang, S. B., Yang, Y. J., Li, J. W., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., et al. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity* 40, 196–208. doi: 10.1016/j.pld.2018.06.003.