



## REVISTA

### JUVENTUD Y CIENCIA SOLIDARIA:

En el camino de la investigación

# EVALUACIÓN DE TRES FORMULACIONES PARA LA INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS A PARTIR DE HOJAS DE ORQUÍDEA

Amanda Martina Togra Fereño



Mi nombre es **Amanda Martina Togra Fereño**, tengo 17 años de edad y estudié en la Unidad Educativa Agronómico Salesiano. Me encanta leer libros, escuchar música y bailar danza folclórica. También me gusta crear nuevas experiencias y viajar a nuevos lugares. Lo más importante para mí es mi familia.

## Resumen

La proliferación de plantas a través del cultivo *in vitro* constituye una herramienta esencial en la biotecnología, particularmente en la generación de plántulas a partir de secciones vegetales, que no se reproducen con facilidad por métodos convencionales. Por ello, el presente proyecto se desarrolló con el objetivo de evaluar tres formulaciones de medios de cultivo para provocar el crecimiento de plántulas de dos variedades de *phalaenopsis* (Albufeira - White Apple) a partir de hojas mediante diferentes concentraciones de hormonas y con una correcta incubación en condiciones controladas.

**Palabras clave:** cultivo *in vitro*, hojas, orquídeas, *phalaenopsis*, plántulas.

## Explicación del tema

Las orquídeas son plantas monocotiledóneas que pertenecen a la familia *Orchidaceae*. Se estima que tienen entre 25 y 35.000 especies caracterizadas por sus diferentes formas, colores o aromas. No obstante, la pérdida de orquídeas endémicas y silvestres se ha visto amenazada por el comercio ilegal en donde pese

a tener leyes vigentes que prohíben esta práctica, las plantas se continúan recolectando y perjudicando directamente la estabilidad, disponibilidad y abundancia de dicho recurso. Esto, como se indica en [1] genera en el ecosistema un desequilibrio e incluso la desaparición de poblaciones. Además, una condición biológica importante que limita la propagación de las orquídeas es la no presencia de reservas nutricionales que permita la fácil germinación y multiplicación junto al embrión [2]. Por lo que, es importante proponer estrategias que busquen la conservación, con la necesidad de generar investigación, conocimiento y estandarización de procesos de propagación en ambientes controlados [3].

Una de las estrategias empleadas para la propagación de plantas de orquídeas en condiciones controladas es el cultivo *in vitro*, técnica de reproducción que permite obtener ejemplares en tiempos reducidos y en cantidades considerables. En [4] señalan que la organogénesis es una herramienta biotecnológica orientada a regenerar plantas a partir de una porción de tejido vegetal mediante el uso de reguladores de crecimiento. Sin embargo, en [5] destacan que su efectividad depende del tipo de corte, la posición del explante, la concentración de citoquininas y las condiciones fisicoquímicas del medio. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la eficiencia de tres formulaciones en la regeneración *in vitro* de plántulas a partir de hojas de orquídea.

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Meristemas de la Unidad Educativa Agronómico Salesiano e inició con la preparación de los medios de cultivo. La metodología empleada se basó en diversos autores, tales como [6–8], quienes realizaron estudios sobre diferentes especies de orquídeas mediante el método de organogénesis *in vitro*. Además, entre los materiales utilizados se destaca el uso de hormonas como citoquininas y auxinas, con el propósito de inducir la formación de brotes. Para garantizar la efectividad del proceso de cultivo *in vitro*, es imprescindible evitar cualquier tipo de contaminación. Por esta razón, se lleva a cabo una desinfección rigurosa

tanto del material vegetal como de los instrumentos y superficies de trabajo. Asimismo, los operarios deben utilizar el equipo de protección personal correspondiente —mandil, guantes, mascarilla y cofia— a fin de mantener condiciones de asepsia durante todo el procedimiento experimental.

La generación de plántulas a través de la organogénesis sigue un protocolo de diferentes pasos:

1. Desarrollo de los medios de cultivo, los cuales contienen todos los nutrientes necesarios para que el explante (porción de tejido a utilizar como material vegetal a experimentar) actúe de acuerdo al propósito requerido.
2. Los reactivos previamente se pesan en una balanza de acuerdo a las formulaciones previstas, para ser colocadas en un Erlenmeyer junto con agua destilada.
3. Colocación de las hormonas con sumo cuidado y de una forma lenta para que pueda disolverse completamente con las sales minerales y la sacarosa.
4. Medición del pH con las tirillas de papel hasta obtener un valor entre 5.7 a 5.8.
5. Colocación del agente gelificante (Agar Agar) para luego ser sellado con algodón y papel de aluminio y llevado a la autoclave durante 15 minutos a 120°C
6. Finalmente se dispensa en las cajas de Petri dentro de la cámara de flujo laminar.

Es importante recalcar que, los medios contenían Bencilaminopurina (BAP), agua de coco (AC) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) como reguladores de crecimiento, estos se colocaron en diferentes concentraciones detalladas en la siguiente tabla en donde LB1: Laboratorio Meristemas 1, LB2: Laboratorio Meristemas 2:

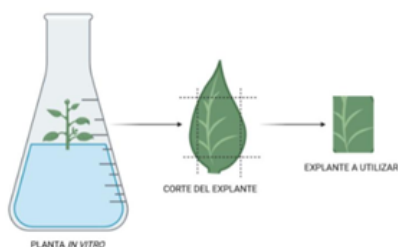
Una vez que se tiene los medios de cultivo esterilizados, se procede con la siembra de los explantes. El corte para estos se desarrolla de las hojas de mayor tamaño

de las dos variedades de orquídeas en cuadrados de aproximadamente tres a cinco cm de lado, (véase en la Figura 1). Luego se disponen cinco hojas por cada

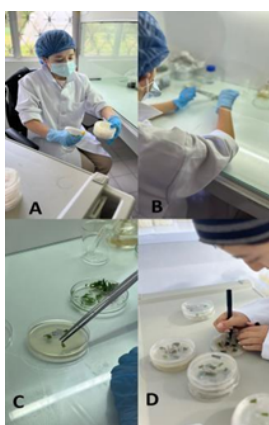
**Tabla 1.** Tratamientos evaluados de medios de cultivo para el brotamiento en hojas de orquídeas, expuestos en ml.

Tratamiento	Formulación	BAP	2-4 D	AC
T1	LB1	10		40
T2	MS 1/2	2	2	
T3	LB2	5	5	30

una en las cajas de Petri con la ayuda de una pinza quirúrgica. Este proceso se repite para las tres formulaciones.

**Figura 1.** Diagramación del Corte de la hoja a utilizar  
Fuente: Autora

Para finalizar, las cajas de Petri se cierran con papel plástico, se extrae todo y se procede a limpiar el área de trabajo y los materiales empleados. Este procedimiento se puede observar en la Figura 2.

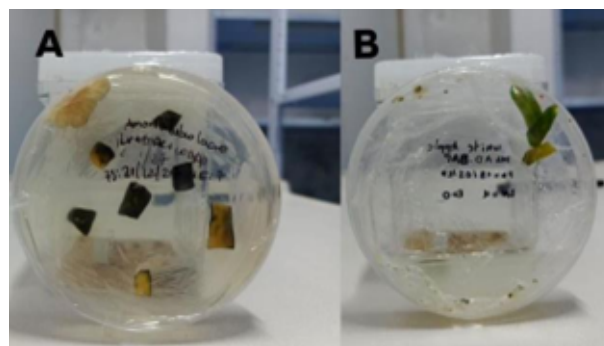
**Figura 2.** Desarrollo de siembra de explantes en medios de cultivo  
Fuente: Autora

A: Difusión de alcohol al material a utilizar, B: Corte de explantes, C: Colocación de explantes en medio de cultivo,

D: Etiquetado (nombre, fecha, medio, número de explantes)

**Figura 3.** Posibles respuestas de los explantes en los medios de cultivo  
Fuente: Autora

Finalmente, el material trabajado se colocó en el área de incubación, debidamente rotulado con su respectivo nombre y fecha de producción. Asimismo, se registró la cantidad de explantes utilizados y se mantuvo una temperatura constante entre 23 °C y 26 °C, con una humedad relativa del 60 % al 80 %. Además, fue necesario garantizar la oscuridad del entorno para favorecer la acción de las hormonas en los cortes realizados en las hojas, lo que permitió observar dos posibles respuestas en el proceso de regeneración (véase Figura 4).

**Figura 4.** Presencia de hongos en el tratamiento 3  
Fuente: Autora

Transcurridas 24 y 72 horas, se procedió a evaluar la presencia de contaminación en los tres tratamientos, evidenciándose su ausencia en todos los casos. Sin embargo, al cabo de 38 días se observó contaminación fúngica en dos de los tratamientos. Posteriormente, se registró la contaminación y oxidación —manifestada como pardeamiento del explante— en la totalidad del tratamiento 3 (véanse Tablas 2 y 3).

**Tabla 2.** Porcentaje de contaminación de la variedad Albufeira

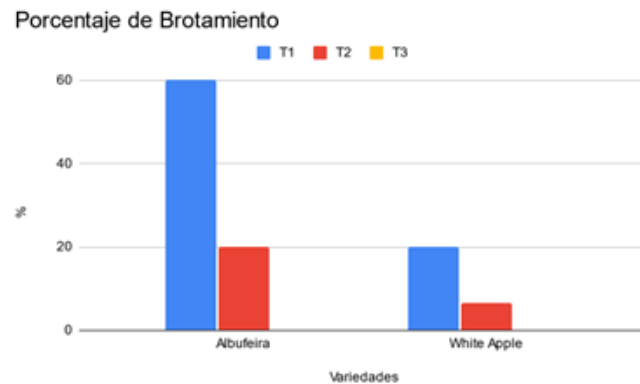
	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
<b>Contaminación</b>	Contaminación	Contaminación	Contaminación
<b>Variedad: Albufeira</b>	15 explantes	15 explantes	15 explantes
<b>% Contaminación</b>	33.33%	33.33%	100%

**Tabla 3.** Porcentaje de contaminación en la variedad White Apple

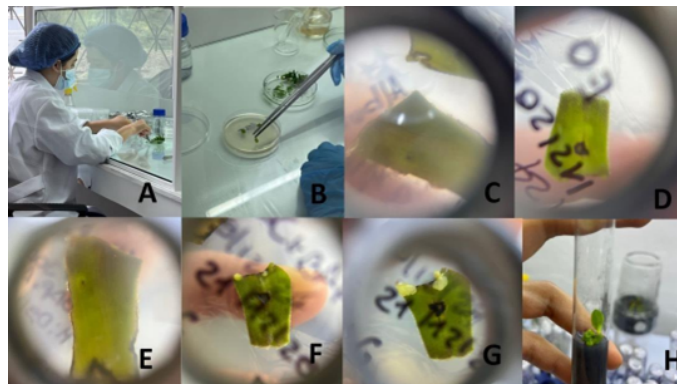
	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
<b>Contaminación</b>	Contaminación	Contaminación	Contaminación
<b>Variedad: White Apple</b>	15 explantes	15 explantes	15 explantes
<b>% Contaminación</b>	0%	0%	66.66%

En el tratamiento 1, transcurridos 40 días después de la siembra, se obtuvieron resultados satisfactorios, evidenciándose el desarrollo de plántulas en el 60 % de los explantes correspondientes a la variedad *Albufeira* y en el 20 % de los explantes de la variedad *White Apple*.

Los nuevos brotes se observan inicialmente como pequeñas circunferencias transparentes alrededor de la hoja, las cuales posteriormente adquieren una tonalidad verde claro, indicando el inicio del desarrollo de brotes. Para una mejor comprensión del proceso descrito, consúltese la Figura 6.



**Figura 5.** Porcentaje de brotamiento para las dos variedades con los tres tratamientos  
Fuente: Autora



**Figura 6.** Resultados del tratamiento 1 con explantes procedentes de Albufeira  
Fuente: Autora

## Conclusiones

Al finalizar este proyecto experimental, se puede concluir que la organogénesis o cultivo in vitro constituye una técnica exitosa y eficiente para la obtención de brotes, así como un método factible para la multiplicación controlada de orquídeas. No obstante, para alcanzar resultados satisfactorios, esta metodología depende de diversos factores, entre ellos el uso adecuado de hormonas, la correcta selección del material vegetal y el mantenimiento de condiciones ambientales y de asepsia apropiadas.

Por otro lado, es importante señalar que, a pesar de las interrupciones eléctricas ocasionadas por el estiaje nacional y de los episodios de contaminación que retrasaron el desarrollo del proyecto, la técnica demostró tener un alto potencial, ya que se observaron respuestas significativas —dos positivas y una negativa— en los tres tratamientos aplicados a las dos variedades de orquídeas Phalaenopsis. La variedad Albufeira mostró un mejor desempeño que White Apple, pues al exponer los explantes a las diferentes concentraciones de hormonas y agua de coco presentó un mayor porcentaje de brotamiento de plántulas, mientras que White Apple evidenció un nivel más alto de oxidación. Finalmente, se concluye que el tratamiento LB2 + 5BAP + 5 2,4D + 30AC (Tratamiento 3) no es recomendable, ya que, al desarrollarse en un medio líquido, favorece la proliferación de contaminantes y provoca la muerte del explante.

## Referencia

- [1] A. Emeterio-Lara, V. Palma-Linares, L. Vázquez-García, and J. Mejía-Carranza, “USOS Y COMERCIALIZACIÓN DE ORQUÍDEAS SILVESTRES EN LA REGIÓN SUR DEL ESTADO DE MÉXICO,” *Polibotánica*, vol. 0, no. 42, Jul. 2016. [Online]. Available: <https://shorturl.at/UPnJS>
- [2] A. I. Gil C., C. A. Araiza C, L. M. Castillo T., L. E. Salgado D., L. Branda Sánchez, and L. E. Vanegas M., “Inducción de organogénesis in vitro con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f.” *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, vol. 22, no. 2, Sep. 2019. [Online]. Available: <https://shorturl.at/J3Z6K>
- [3] K. Bustamante, S. P. Rocha, S. E. Sharry, M. P. Guerra, and F. O. Niella, “Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC,” *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 121, no. Especial 2, p. 102, Nov. 2022. [Online]. Available: <https://shorturl.at/171W2>
- [4] E. F. George, M. A. Hall, and G.-J. De Klerk, *Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background*. Springer Science & Business Media, 2007, vol. 1.
- [5] C. C. Blackburn and N. R. Manley, “Developing a new paradigm for thymus organogenesis,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 4, pp. 278–289, Apr. 2004. [Online]. Available: <https://shorturl.at/7wJl7>
- [6] R. A. Ríos-Villanueva, G. C. Sánchez-López, O. Gregorio-Ramírez, C. A. Dávila-Figueroa, E. Villalobos-Amador, A. Santiago-Martínez, M. M. Camacho-Martínez, and G. González-Adame, “ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO DE PLANTAS MODELO, PLANTAS MEDICINALES DE LA SIERRA JUÁREZ Y ORQUÍDEAS DE VALLE NACIONAL, OAXACA.”
- [7] M. Sugiyama, “Organogenesis in vitro,” *Current opinion in plant biology*, vol. 2, no. 1, pp. 61–64, 1999, ISBN: 1369-5266 Publisher: Elsevier.
- [8] J. Shin, S. Bae, and P. J. Seo, “De novo shoot organogenesis during plant regeneration,” *Journal of Experimental Botany*, vol. 71, no. 1, pp. 63–72, Jan. 2020. [Online]. Available: <https://shorturl.at/ZbGDw>