

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Micropropagation of orchids in plastic containers with non-autoclavable media

Micropropagación de orquídeas en recipientes plásticos con medios sin autoclave

Authors/Autores: Ramírez-Mosqueda, M.A.

ID: e1679

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1679>

Received/Fecha de recepción: May 27th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: October 15th 2024

Available online/Fecha de publicación: October 29th 2024

Please cite this article as/Como citar este artículo: Ramírez-Mosqueda, M.A. (2024). Micropropagation of orchids in plastic containers with non-autoclavable media. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1679. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1679>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo original

Micropropagación de orquídeas en recipientes plásticos con medios sin autoclave

Micropropagation of orchids in plastic containers with non-autoclavable media

Medio de cultivo sin autoclave para orquídeas/ Non-autoclave culture medium for orchid

Ramírez-Mosqueda, M.A. 

Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP, Boulevard de la Biodiversidad No. 400 Rancho las Cruces, C.P. 47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

***Corresponding Author:**

Marco A. Ramírez-Mosqueda, Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP, Boulevard de la Biodiversidad No. 400 Rancho las Cruces, C.P. 47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. Teléfono 55 387 18700 ext 84840 E-mail: marcomosqueda02@hotmail.com

RESUMEN

La importancia ornamental de las orquídeas se debe a las diversas formas, tamaños y colores de sus flores. Desafortunadamente, la propagación asexual y sexual de estas especies lleva mucho tiempo y produce un número limitado de propágulos comerciales. Por tanto, el cultivo de tejidos vegetales ha resultado una alternativa adecuada para la micropropagación. Sin embargo, algunos de los materiales utilizados en esta técnica son caros. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue proponer un método alternativo para la propagación *in vitro* que involucra el uso de recipientes desechables y un medio de cultivo que no requiere autoclave. Se evaluaron diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg•L⁻¹) en medio MS (Murashige y Skoog) autoclavado y no autoclavado, seguido de aclimatación. Luego de 45 días de incubación, se evaluó el porcentaje de contaminación, número de brotes por explante, longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces. No se observó contaminación utilizando el método alternativo y autoclave. El mayor número de brotes por explante (3.77) se produjo en 1,0 mg•L⁻¹ de BAP en medio de cultivo no autoclavado. Se observó una tasa de supervivencia del 98 % durante la fase de aclimatación. Estos resultados pueden utilizarse como una alternativa para la micropropagación comercial de orquídeas.

PALABRAS CLAVE:

Medio no estéril, envases plásticos, propagación comercial.

ABSTRACT

The ornamental importance of orchids is due to the various shapes, sizes, and colors of their flowers. Unfortunately, the asexual and sexual propagation of these species takes a long time and produces a limited number of commercial propagules. Thus, plant tissue culture has been a suitable alternative for micropropagation. However, some of the materials used in this technique are expensive. Therefore, this study aimed to propose an alternative method for *in vitro* propagation that involves the use of disposable containers and a culture medium that requires no autoclaving. Different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5 mg•L⁻¹) in MS (Murashige and Skoog) medium autoclaved and non-autoclaved were assessed, followed by acclimatization. After 45 days of incubation, assessed the percentage of contamination, number of shoots per explant, shoot length, number of leaves, number of roots, and root length. No contamination using the alternative method and autoclave was observed. The highest number of shoots per explant (3.77) was produced in 1.0 mg•L⁻¹ BAP in non-autoclaved culture medium. A 98 % survival rate was observed during the acclimatization phase. These results can be used as an alternative for the commercial micropropagation of orchids.

KEY WORDS

Non-sterile medium, plastic packaging, commercial propagation.

Introducción

La micropropagación es una técnica que nos permite obtener un gran número de plantas en un lapso corto de tiempo y en un reducido espacio (George, 2008; Pastelin-Solano *et al.*, 2020). Esta técnica ha sido utilizada con éxito en la propagación *in vitro* de diferentes especies de orquídeas (Menchaca-García *et al.*, 2012; Yam & Arditi, 2017). Sin embargo, para realizar estas técnicas es necesario procesos complejos que requieren equipos sofisticados que encarecen los costos de producción, entre ellos la esterilización del medio de cultivo en autoclave, el uso de recipientes especializados como tubos de ensayo, frascos de vidrio, biorreactores, etc. (Salgado & Peñaranda, 2019; Martínez-Rivero *et al.*, 2020). Por tal motivo, se busca el uso de alternativas para la micropropagación de orquídeas que permitan aminorar el costo económico, así como facilitar una parte del proceso de micropropagación a través del uso de envases plásticos.

El proceso de esterilización de medios de cultivo se puede realizar a través de un equipo especializado como la autoclave o de manera química (Martínez-Rivero *et al.*, 2020). Sin embargo, el equipo como las autoclaves tienen un alto costo en el mercado, adicionalmente el uso de estas representa un consumo excesivo de energía eléctrica pues su principio de funcionamiento se basa en el calentamiento de una resistencia a través de la energía eléctrica para poder obtener la temperatura y presión adecuada (Ormeño-Orrillo & Dávila, 1999; DeSantis, 2021). Se menciona que, durante la micropropagación de orquídeas, el gasto en energía eléctrica asciende al 23 % del costo total de producción. (Chen, 2016). Se menciona que el consumo de energía eléctrica de la autoclave asciende al 3 % del costo de producción. Por otro lado, el uso de recipientes de vidrio es limitado por su

disponibilidad y precio del mercado, debido a esto se implementa el uso de recipientes de otros materiales (Sáez *et al.*, 2012; Vahdati *et al.*, 2017). Por esta razón, se están evaluando alternativas para superar estas limitaciones, como el uso de esterilizantes químicos de bajo costo y fácil acceso para el medio de cultivo, los instrumentos y los recipientes de cultivo (Quiala *et al.*, 2002; Martínez-Rivero *et al.*, 2020). El hipoclorito de sodio (NaOCl) se utiliza frecuentemente como desinfectante y se puede utilizar para esterilizar recipientes de cultivo y medios utilizados para micropropagación (Pais *et al.*, 2016; Suaib *et al.*, 2018).

El género *Cattleya* tiene 114 especies de importancia económica por sus grandes flores y múltiples colores (van den Berg, 2014; Caballero-Villalobos *et al.*, 2017). En este sentido, se han llevado a cabo investigaciones enfocadas al desarrollo de híbridos comerciales con características ornamentales atractivas (Cardoso *et al.*, 2016; van den Berg, 2019). Un híbrido con características atractivas es la *Rhyncholaeliocattleya*. Como la mayoría de las orquídeas, tiene limitaciones de propagación debido al largo tiempo que tarda en producir pseudobulbos (Murguía *et al.*, 2016; Murthy *et al.*, 2018), Mientras que la reproducción sexual (semilla), se ve limitada por los bajos porcentajes de germinación de manera natural (Shao *et al.*, 2017; Yeh *et al.*, 2021). Por tanto, el objetivo de este estudio fue proponer una alternativa para la propagación *in vitro* de *Rhyncholaeliocattleya*, a través del uso de frascos desechables y medio sin esterilización en autoclave.

Material y Métodos

Material vegetal y germinación asimbiótica

Se colecto una capsula de aproximadamente 8 meses de madurez de híbrido comercial *Rhyncholaeliocattleya* (Rlc). La cápsula se obtuvo de autopolinización asistida, fue pretratada mediante lavados con detergente comercial y enjuagado con agua corriente. Posteriormente, la cápsula fue llevada a la campana de flujo laminar, en donde se sumergió en etanol 96° durante 1 minuto bajo constante agitación, luego con ayuda de unas pinzas se retiró la cápsula del etanol para flamearla en el mechero, este paso se repitió en tres ocasiones. Posteriormente, se realizaron cortes longitudinales en la cápsula con un bisturí para extraer las semillas. Se sembraron en medio MS (Murashige & Skoog 1962) adicionado con 30 g•L⁻¹ sacarosa y 2.5 g•L⁻¹ Phytigel® como agente gelificante. Se dosificaron 20 mL de medio a cada frasco y se esterilizó en autoclave a 1.5 kg•cm⁻² y 121°C durante 20 min. Finalmente, los frascos de cultivo se incubaron a 25 ± 2 °C bajo irradiación de 50 μmol•m⁻²•s⁻¹ proporcionada por lámparas LED.

Propagación

El material utilizado en este trabajo consistió en plántulas de Rlc germinadas *in vitro* (brotes individuales que miden ~ 1 ± 0.2 cm de longitud. Estas plántulas fueron transferidas a medio MS adicionado con 30 g•L⁻¹ sacarosa y 2.5 g•L⁻¹ Phytigel® como agente gelificante. Se evaluaron diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5 mg•L⁻¹) como regulador del crecimiento vegetal (PGR). Después de 45 días de cultivo se evaluaron variables como porcentaje de contaminación, número de brotes, longitud del brote, número de hojas, número y longitud de raíces.

Método con autoclave

Se dosificó un volumen de 20 mL a cada frasco de vidrio y se esterilizó en autoclave a $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min (Figura 1A). Los frascos se cubrieron con papel de aluminio y se sellaron con una película autoadherente. Finalmente, los frascos de cultivo se incubaron a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo irradiación de $50 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas LED.

Método sin autoclave

Se vertieron 20 mL de medio en cada recipiente de plástico desechable de polipropileno (PP) (Figura 1B-C). El medio de cultivo y los recipientes no fueron esterilizados en autoclave; en cambio se utilizó el siguiente procedimiento para su esterilización. Los recipientes plásticos (envases de poliolefina termoplástica de 250 mL de capacidad (plástico grado alimenticio) y sus respectivas tapas fueron lavados con agua y jabón y se dejaron secar. En la campana de flujo laminar, se enjuagaron los frascos y tapas en una bandeja plástica con una solución de 10 % NaClO (v/v) (cloro doméstico con 6 % de ingrediente activo). Posteriormente, se humedeció una franela limpia con esta solución de NaClO y se colocaron por encima los frascos y tapas boca abajo, se dejaron en la campana de flujo laminar hasta que se secan (este tipo de esterilización se realiza por medio de los gases del NaClO). Posteriormente se taparon y mantuvieron en condiciones estériles. El medio de cultivo se esterilizó calentándolo hasta el punto de ebullición ($100 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 1 min. Luego, dentro de la cabina de flujo laminar, se transfirieron 20 mL de medio de cultivo a cada recipiente desechable y se sembró el material vegetal. Los recipientes se sellaron con una película autoadherente. Finalmente, los frascos se incubaron a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo irradiación de $50 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas LED.

Enraizamiento y aclimatización

Los brotes de orquídeas produjeron raíces durante la fase de propagación (experimento con BAP); por lo tanto, no fue necesaria una fase de enraizamiento. Para la aclimatización se utilizaron 120 plantas Rlc. Los brotes de 3 cm de longitud y con adecuado desarrollo radicular se enjuagaron con agua corriente para eliminar los residuos del medio de cultivo. Posteriormente se sembraron en un sustrato compuesto de roca volcánica (tezontle) y agrolita (tipo de perlita) (1:1 v/v) (Leyva-Ovalle *et al.*, 2020), que habían sido previamente esterilizados por exposición al sol durante 72 h; se utilizaron bandejas plásticas de 60 pocillos con tapa. Después de sembrar los brotes, se colocó la tapa de plástico encima de cada bandeja para mantener una humedad relativa alta; los brotes se rociaron con agua una vez por semana durante 14 días. Después de este período, se retiró la tapa plástica y las plántulas se regaron con agua corriente dos veces por semana y se fertilizaron con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Go Green® una vez por semana. El porcentaje de supervivencia se evaluó después de 60 días de cultivo.

Análisis estadístico

Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado para todos los experimentos, incluyendo tres réplicas. En cada una de las réplicas se utilizaron 20 brotes por tratamiento. Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente con el software IBM SPSS Statistics (versión 21). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) para determinar si las diferencias entre tratamientos eran estadísticamente significativas.

Resultados y Discusión

Germinación asimbiótica

Después de 45 días de cultivo, se observó germinación en aproximadamente el 100 % de las semillas plantadas.

Método con autoclave vs método sin autoclave

Para la propagación (utilizando brotes individuales), no se observó contaminación en los contenedores desechables utilizando el método de autoclave y el método sin autoclave. En general, las variables evaluadas fueron mayores en el método sin autoclave que en el método con autoclave (Figura 1) (Tabla 1).



Figura 1. Propagación *in vitro* de *Rhyncholaeliocattleya*. A) Frascos de vidrio con medio de cultivo autoclavado, B) Recipientes plásticos con medio de cultivo no autoclavado, C) Recipientes plásticos utilizados en la micropropagación de Rlc. Fuente: Elaboración propia con base en resultados.

El mayor número de brotes por explante (3.77) se obtuvo en medio de cultivo no autoclavado suplementado con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (Figura 2E), seguido de 3.50 en medio de cultivo no autoclavado suplementado con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP. 3.14 brotes en medio de cultivo no autoclavado suplementado con $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (Figura 2F). El menor número de brotes por explante (1.52) se observó en el medio de cultivo autoclavado sin BAP (Figura 2A).

Por otra parte, la longitud de los brotes fue de 3.26 cm en medio de cultivo no autoclavado suplementado con $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP (Figura 2F), seguido de 2.47 cm en medio de cultivo no autoclavado con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP (Figura 2E). La longitud más baja de los brotes (1.23 cm) se observó en el medio de cultivo autoclavado sin BAP (Figura 2A). El mayor número de hojas fue de 2.56 cm en el medio de cultivo no autoclavado suplementado con $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (Figura 2F), seguido de 2.23 cm en el medio de

cultivo autoclavado con $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (Figura 2C). La longitud de brotes más baja (1.22) se observó en el medio de cultivo autoclavado suplementado con $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP. En cuanto a las raíces, el tratamiento suplementado con $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP mostró los resultados más altos: 2.57 raíces por explante de 2.39 cm de longitud (Figura 2E). En contraste, el medio de cultivo autoclavado con $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP mostró los resultados más bajos (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de BAP y método de esterilización sobre la multiplicación in vitro de Rlc.

Concentración de BAP ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de las raíces (cm)
Método con autoclave					
0	1.52 ± 0.26^d	1.23 ± 0.12^c	1.30 ± 0.09^{cd}	1.44 ± 0.21^c	1.48 ± 0.29^b
0.5	2.46 ± 0.21^c	1.25 ± 0.10^c	1.35 ± 0.11^{cd}	2.00 ± 0.22^{bc}	1.68 ± 0.21^b
1.0	2.58 ± 0.24^c	1.86 ± 0.14^b	1.85 ± 0.10^{bc}	2.10 ± 0.17^{bc}	2.16 ± 0.26^a
1.5	2.09 ± 0.12^d	2.15 ± 0.19^b	2.23 ± 0.11^b	2.63 ± 0.18^b	2.28 ± 0.15^a
2.0	2.17 ± 0.19^c	2.05 ± 0.15^c	1.68 ± 0.08^c	1.98 ± 0.24^c	1.14 ± 0.17^c
2.5	1.82 ± 0.14^d	1.28 ± 0.07^c	1.22 ± 0.13^d	1.05 ± 0.19^c	1.09 ± 0.20^c
Método sin autoclave					
0	2.57 ± 0.20^c	1.65 ± 0.13^c	1.41 ± 0.10^c	1.60 ± 0.24^c	2.00 ± 0.32^a
0.5	3.50 ± 0.22^b	1.64 ± 0.11^c	1.59 ± 0.09^c	2.14 ± 0.25^{bc}	1.73 ± 0.21^a
1.0	3.77 ± 0.27^a	2.47 ± 0.12^b	1.92 ± 0.12^b	2.50 ± 0.22^b	2.36 ± 0.26^a
1.5	3.14 ± 0.14^c	3.26 ± 0.22^a	2.56 ± 0.13^a	3.57 ± 0.20^a	2.39 ± 0.27^a
2.0	2.88 ± 0.26^c	2.34 ± 0.17^b	1.84 ± 0.10^{bc}	3.00 ± 0.30^{ab}	1.41 ± 0.14^b
2.5	2.50 ± 0.18^c	1.44 ± 0.11^c	1.52 ± 0.10^c	1.25 ± 0.25^c	1.20 ± 0.20^b

Se representa la media \pm error estándar. Letras diferentes expresan diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Fuente: Elaboración propia con base en resultados.

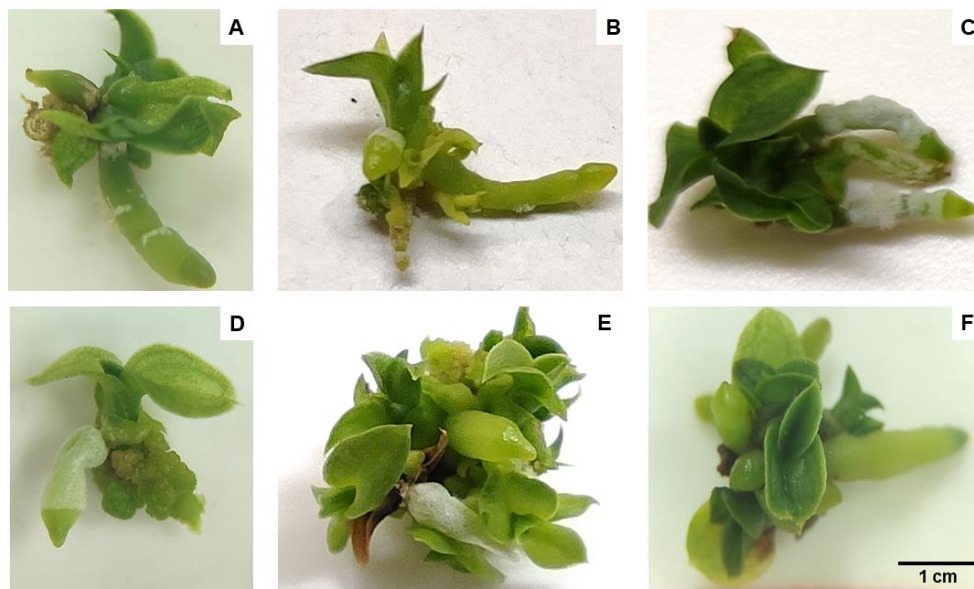


Figura 2. Efecto de la 6-bencilaminopurina y el método de esterilización sobre la multiplicación de *Rhyncholeliocattleya*. A-C) Medio de cultivo autoclavado (0, 1.0 y 1.5

mg•L⁻¹ BAP, respectivamente), D-F) Medio de cultivo no autoclavado (0, 1.0 y 1.5 mg•L⁻¹ BAP, respectivamente). Fuente: Elaboración propia con base en resultados.

En orquídeas, la micropropagación ha sido una alternativa para producir una gran cantidad de propágulos comerciales (Bhattacharyya *et al.*, 2018; Leyva-Ovalle *et al.*, 2020). En este sentido, la producción de un alto número de plantas de orquídeas de interés ornamental traerá una mayor utilidad económica para los productores (Murthy *et al.*, 2018). La proliferación de diferentes especies de orquídeas se ha logrado principalmente mediante la suplementación con 6-Benzylaminopurine (BAP). Pastelin-Solano *et al.* (2020) micropropagaron *Vanilla planifolia* con 2 mg•L⁻¹ BAP, produciendo 7.9 brotes por explante. Souza *et al.* (2021) micropropagaron *Cattleya crispata* con 0.5 mg•L⁻¹ BAP, obteniendo 5 brotes por explante. Estos hallazgos son consistentes con nuestros resultados ya que obtuvimos 3.77 brotes por explante de *Rhyncholaeliocattleya* utilizando medio suplementado con 1 mg•L⁻¹ BAP. Esto indica que el BAP es un regulador de crecimiento que puede ser utilizado en la micropropagación de diferentes especies de orquídeas, particularmente de este híbrido del género *Cattleya*.

El medio de cultivo no autoclavado presentó valores superiores en las variables evaluadas en comparación con el medio de cultivo autoclavado. Martínez-Rivero *et al.* (2020) mencionaron que en el medio de cultivo que no se sometió a condiciones de autoclavado (altas temperaturas y alta presión), hubo menor degradación de nutrientes y reguladores de crecimiento. Harabi *et al.* (2016) diseñaron un filtro cerámico útil en la esterilización de medios de cultivo utilizados en la micropropagación de plantas, concluyendo que no calentar los medios de cultivo durante su esterilización contribuye a preservar la calidad de las sustancias orgánicas termolábiles.

Para la propagación *in vitro* de orquídeas se pueden utilizar diversos tipos de recipientes (frascos de vidrio, cajas magenta, tubos de ensayo, etc.) (Sáez *et al.*, 2012; Vahdati *et al.*, 2017; Singh, 2018; Gago *et al.*, 2021). Sin embargo, la disponibilidad de estos recipientes limita la propagación *in vitro* de estos cultivos. Por ello, el presente estudio demuestra la idoneidad de las botellas de plástico desechables para este fin, lo que podría traducirse en menores costes de producción. En nuestro estudio, el uso de hipoclorito de sodio permitió la correcta desinfección de los recipientes de cultivo. Weber *et al.* (2015) determinaron que el NaClO al 0.1 % v/v funcionó para esterilizar recipientes mediante inmersión de tapas y fondos, para la micropropagación de papa.

El material de los recipientes utilizados para los cultivos *in vitro* es de suma importancia debido a la difusión de la luz a través de ellos, lo que debería permitir que los brotes cultivados muestren una mejor respuesta morfogénica (Emara *et al.*, 2018; Sarikhani *et al.*, 2021). En este sentido, el presente estudio demostró que los recipientes plásticos desechables permitieron una adecuada difusión de la radiación luminosa, lo que produjo una respuesta morfogénica normal.

Además, los costos operativos de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, incluida la electricidad, aumentan los costos de producción (Cardoso *et al.*, 2018; Dhiman *et al.*, 2021). Para reducir el consumo de energía, este estudio evaluó un medio de cultivo que no fue esterilizado en autoclave (electricidad), sino a través del

punto de ebullición. Así como frascos esterilizados mediante esterilización química (vapor de NaClO). Esto evitó la contaminación de los medios de cultivo y posibilitó la micropropagación de *Rhyncholaeliocattleya*. Este hallazgo es extremadamente relevante, ya que el método de esterilización evaluado representa un ahorro en el gasto de energía durante los procesos de propagación *in vitro*.

Enraizamiento y Aclimatización

Durante la fase de multiplicación, las orquídeas produjeron raíces (Figura 3A); por lo que no fue necesaria una etapa de enraizamiento. Con respecto a la aclimatación, se observó una supervivencia del 98 %, independientemente de si provenían del medio autoclavado o no autoclavado (Figura 3B).

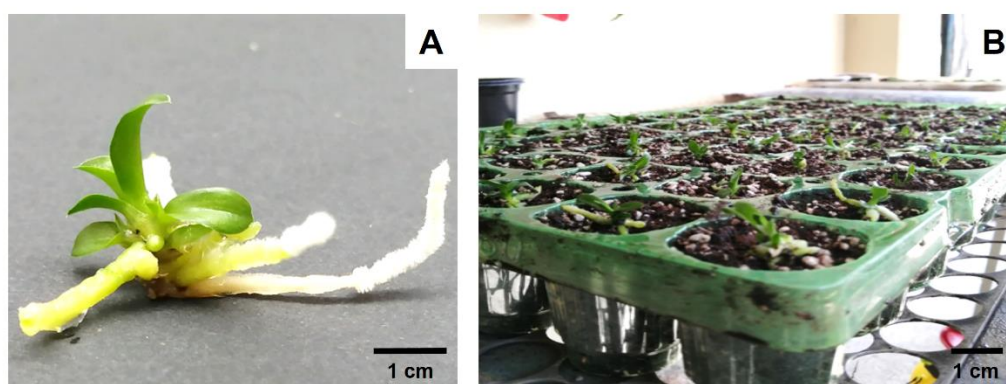


Figura 3. Aclimatación de Rlc. A) Plantas *in vitro* en fase de multiplicación; B) Plantas en proceso de aclimatación 30 días. Fuente: Elaboración propia con base en resultados.

Como mencionan Manokari *et al.* (2021), las plantas necesitan sistemas radicales para una correcta absorción de nutrientes, los cuales implican una facilitación para asegurar la supervivencia de la planta. Las raíces pueden adherirse a una estructura que les brinde soporte físico, como una corteza, una vara de madera o de bambú; además, en las orquídeas, la fotosíntesis también se lleva a cabo en las raíces, por lo que la presencia de estas estructuras es de suma importancia (Ma *et al.*, 2019).

La aclimatación se considera la fase más crítica en el proceso de micropropagación debido a que es el último paso que define el éxito de todo el proceso (Hazarika, 2003; Naaz *et al.*, 2019). Un gran número de autores mencionan que la aclimatación es una de las etapas más complejas, y que se generan tasas de supervivencia bajas (Varshney & Anis, 2012; Indacochea-Ganchozo *et al.*, 2017; Valencia-Juárez *et al.*, 2019).

En el presente estudio, logramos una supervivencia del 98 % de las plantas producidas mediante cultivo de tejidos. Aunque se han reportado casos exitosos de aclimatación en una amplia variedad de orquídeas, es importante destacar que cada una de estas especies requiere un protocolo particular para asegurar la supervivencia de las plantas obtenidas. En la actualidad, se han reportado casos de

micropropagación de orquídeas del género *Cattleya*, como el estudio de Menezes-Sá *et al.* (2021), quienes propagaron *Cattleya tigrina in vitro*, y Mantovani *et al.* (2017), quienes micropropagaron *Cattleya guttata* utilizando silicio y silicato de sodio.

Conclusiones

En este estudio se proponen técnicas alternativas para la micropropagación de orquídeas (*Rhyncholaeliocattleya*) que podrían ser utilizadas en la producción y propagación a gran escala de varios tipos de híbridos de este género. Los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de factibilidad de establecer estas técnicas alternativas para la micropropagación *in vitro*, es decir, el uso de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP, recipientes plásticos de cultivo esterilizados con una solución de hipoclorito de sodio y la esterilización del medio de cultivo sin autoclave (simplemente por ebullición).

Contribución de los autores

Ramírez-Mosqueda: Conceptualización del trabajo, Investigación, Metodología, Redacción del borrador original y Redacción-revisión y Edición.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

El autor agradece al “Consejo Veracruzano para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (COVEyDET)” por el financiamiento parcial de esta investigación con el proyecto 150325.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

El autor agradece al Ingeniero Agrónomo Rodrigo Martínez Ramírez por su apoyo en la realización de algunos de los experimentos durante su estancia como tesista en la Universidad Veracruzana.

Referencias

- Martínez-Rivero, A., Ramírez-Mosqueda, M. A., Mosqueda, F. O. Rivas, P. M., & Bello-Bello, J. J. (2020). Influence of Vitrofur® on sugarcane micropropagation using temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 141, 447-453. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01800-x>
- Bhattacharyya, P., Paul, P., Kumaria, S., & Tandon, P. (2018). Transverse thin cell layer (t-TCL)-mediated improvised micropropagation protocol for endangered medicinal orchid *Dendrobium aphyllum* Roxb: an integrated phytomolecular approach. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2703-y>

- Caballero-Villalobos, L., Silva-Arias, G. A., Buzatto, C. R., Nervo, M. H., & Singer, R. B. (2017). Generalized food-deceptive pollination in four *Cattleya* (Orchidaceae: *Laeliinae*) species from Southern Brazil. *Flora*, 234, 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.07.014>
- Cardoso, J. C., Martinelli, A. P., & Teixeira da Silva, J. A. (2016). A novel approach for the selection of *Cattleya* hybrids for precocious and season-independent flowering. *Euphytica*, 210, 143-150. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1714-2>
- Cardoso, J. C., Sheng-Gerald, L. T., & Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Loyola-Vargas, V., & Ochoa-Alejo, N. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1815. Humana Press, New York, NY, pp 17-46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2
- Chen, C. (2016). Cost analysis of plant micropropagation of *Phalaenopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126, 167-175. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0987-4>
- DeSantis, P. (2021). Steam sterilization in autoclaves. In: Agalloco, J., DeSantis, P., Grilli, A., & Pavell, A. (eds) *Handbook of Validation in Pharmaceutical Processes*. CRC Press, FL, pp 217-230. <https://doi.org/10.1201/9781003163138>
- Dhiman, N., Devi, K., & Bhattacharya, A. (2021). Development of low cost micropropagation protocol for *Nardostachys jatamansi*: A critically endangered medicinal herb of Himalayas. *South African Journal of Botany*, 140, 468-477. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.002>
- Emara, H. A., Nower, A. A., Hamza, E. M., & El Shaib, F. (2018). Evaluation of photomixotrophic technique and several carbohydrate sources as affecting banana micropropagation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(10), 788-804. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.088>
- Gago, D., Vilavert, S., Bernal, M. Á., Sánchez, C., Aldrey, A., & Vidal, N. (2021). The Effect of Sucrose Supplementation on the Micropropagation of *Salix viminalis* L. Shoots in Semisolid Medium and Temporary Immersion Bioreactors. *Forests*, 12(10), 1408. <https://doi.org/10.3390/f12101408>
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. D. (2008). Plant tissue culture procedure-background, In: George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. D. (eds.), *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, pp. 1-28. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1
- Harabi, A., Bouzerara, F., Foughali, L., Boudaira, B., Guechi, A., & Brihi, N. (2016). Elaboration and characterization of low cost ceramics microfiltration membranes applied to the sterilization of plant tissue culture media. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 59, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.07.032>

- Hazarika, B. N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85(12), 1704-1712.
- Indacochea-Ganchozo, B., Parrales-Villacreses, J., Castro-Piguave, C., Vera-Tumbaco, M., & Gabriel-Ortega, J. (2017). Aclimatación *in vitro* de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(2), 124-134.
- Leyva-Ovalle, O. R., Bello-Bello, J. J., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, R., & Ramírez-Mosqueda, M. A. (2020). Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W.E. Higging in temporary immersion systems. *3 Biotech*, 10(26). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2010-3>
- Ma, H., Egamberdieva, D., Wirth, S., Li, Q., Omari, R. A., Hou, M., & Bellingrath-Kimura, S. D. (2019). Effect of biochar and irrigation on the interrelationships among soybean growth, root nodulation, plant p uptake, and soil nutrients in a sandy field. *Sustainability*, 11(23), 6542. <https://doi.org/10.3390/su11236542>
- Manokari, M., Priyadharshini, S., Jogam, P., Dey, A., & Shekhawat, M. S. (2021). Meta-topolin and liquid medium mediated enhanced micropropagation via ex vitro rooting in *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 146, 69–82. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02044-z>
- Mantovani, C., Galdiano, R. F., Delgado, J. M., Prado, R. M. & Pivetta, K. F. L. (2017). In vitro growth of *Cattleya guttata* and *Epidendrum schomburgkii* with acid silicate. *Acta Horticulturae*, 1224, 51-56. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1224.8>
- Menchaca-García, R. A., Lozano-Rodríguez, M. Á., & Sánchez-Morales, L. (2012). Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(13), 09-16.
- Menezes-Sá, T. S. A., Costa, A. S. D., Arrigoni-Blank, M. D. F., Blank, A. F., Moura, G. M. S., & Soares, C. A. (2021). *In vitro* propagation and conservation of *Cattleya tigrina* A. Rich. *Ciência Rural*, 52(5). <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200517>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murguía-González, J., Leyva-Ovalle, O. R., Lee-Espinosa, H. E., Galindo-Tovar, M. E., Pardío-Sedas, V. T., & Llarena-Hernández, R. C. (2016). Sistemas de producción de orquídeas (Orquidaceae) en Veracruz, México. *Agroproductividad* 9(6), 62-66.
- Murthy, H. N., Paek, K. Y., & Park, S. Y. (2018). Micropropagation of orchids by using bioreactor technology. In: Lee, Y. I., & Yeung, E. T. (eds.), *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols*. Humana Press, New York, pp 195-208. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_9

- Naaz, A., Hussain, S. A., Anis, M., & Alatar, A. A. (2019). Meta-topolin improved micropropagation in *Syzygium cumini* and acclimatization to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 63(1), 174-182.
- Ormeño-Orrillo, E., & Dávila, D. Z. (1999). Optimización del tiempo de esterilización de soportes basados en suelo y compost en la producción de inoculentes para leguminosas. *Revista Peruana de Biología*, 6(2), 181-184. <https://doi.org/10.15381/rpb.v6i2.8313>
- Pais, A. K., da Silva, A. P., de Souza, J. C., Teixeira, S. L., Ribeiro, J. M., Peixoto, A. R., & da Paz, C. D. (2016). Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. *African Journal of Biotechnology*, 15(36), 1995-1998. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15405>
- Pastelín-Solano, M. C., Ramírez-Mosqueda, M. A., Bogdanchikova, N., Castro-González, C. G., & Bello-Bello, J. J. (2020). Las nanopartículas de plata afectan la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agrociencia*, 54(1), 1-13.
- Quiala, E., Jiménez, E., de Fera, M., Alvarado, Y., Chávez, M., Agramonte, D., & Capote, A. (2002). Empleo del Vitrofurcal en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. híbrido var Cuba 87-51. *Biotecnología Vegetal*, 2(4), 221-226.
- Sáez, P. L., Bravo, L. A., Latsague, M. I., Sánchez, M. E., & Ríos, D. G. (2012). Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. *Scientia Horticulturae*, 138, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.005>
- Salgado, J. M., & Peñaranda, L. V. (2019). Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción *in-vitro* de orquídeas. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 6(1), 16-28. <https://doi.org/10.23850/24220582.1815>
- Sarikhani, H., & Sarikhani-Khorami, H. (2021). Effect of light quality on micropropagation and some morphological properties of cadaman avimag (*Prunus persicax P. davidiana*) rootstock. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 8(1), 51-65. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2020.298841.351>
- Shao, S. C., Burgess, K. S., Cruse-Sanders, J. M., Liu, Q., Fan, X. L., Huang, H., & Gao, J. Y. (2017). Using in situ symbiotic seed germination to restore over-collected medicinal orchids in Southwest China. *Frontiers in Plant Science*, 8, 888. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00888>
- Singh, A. (2018). Efficient micropropagation protocol for *Jatropha curcas* using liquid culture medium. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 21, 89-94. <https://doi.org/10.1007/s12892-017-0004-0>

- Souza, D. M. S. C., Fernandes, S. B., Molinari, L. V., Avelar, M. L. M., & Brondani, G. E. (2021). Activated charcoal application for the micropropagation of *Cattleya crispata* (Thunb.) Van den Berg. *Nativa*, 9(4), 352-358. <https://doi.org/10.31413/nativa.v9i4.12164>
- Suaib, S., Arief, N., Sadimantara, G. R., Suliartini, N. W. S., & Rakian, T. C. (2018). In vitro seeds germination and plantlets growth of hot pepper (*Capsicum frutescens* L.) on non-autoclaved murashige and skoog basal medium. *Asian Journal of Plant Sciences*, 17(4), 173-181. <https://doi.org/10.3923/ajps.2018.173.181>
- Vahdati, K., Asayesh, Z. M., Aliniaiefard, S., & Leslie, C. (2017). Improvement of ex vitro desiccation through elevation of CO₂ concentration in the atmosphere of culture vessels during *in vitro* growth. *HortScience*, 52(7), 1006-1012. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11922-17>
- Valencia-Juárez, M. C., Escobedo-López, D., Díaz-Espino, L. F., & González-Pérez, E. (2019). Aclimatación ex vitro de plántulas de *Fragaria x ananassa* Duch. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(1), 91-100. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i1.1633>
- van den Berg, C. (2014). Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). *Phytotaxa*, 186(2), 75-86. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.186.2.2>
- van den Berg, C. (2019). Nomenclatural notes on Laeliinae-VIII. Overlooked new combinations in *Cattleya*, and new infrageneric nothotaxa. *Neodiversity*, 12(1), 1-5. <http://dx.doi.org/10.13102/neod.121.1>
- Varshney, A., & Anis, M. (2012). Improvement of shoot morphogenesis in vitro and assessment of changes of the activity of antioxidant enzymes during acclimation of micropropagated plants of Desert Teak. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 859-867. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0883-9>
- Weber, B. N., Witherell, R. A., & Charkowski, A. O. (2015). Low-cost potato tissue culture with microwave and bleach media preparation and sterilization. *American Journal of Potato Research*, 92, 128-137. <https://doi.org/10.1007/s12230-014-9423-7>
- Yam, T. W., & Arditti, J. (2017). Micropropagation of orchids. Vol III. John Wiley & Sons Ltd. NJ, USA pp 2180. <https://doi.org/10.1002/9781119187080.fmatter3>
- Yeh, C. H., Chen, K. Y., & Lee, Y.I. (2021). Asymbiotic germination of *Vanilla planifolia* in relation to the timing of seed collection and seed pretreatments. *Botanical Studies*, 62,6. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00311-y>