

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Inducción y análisis histológico de Cuerpos Parecidos a Protocormos de *Cymbidium* 'Rey Arturo' Miller

Induction and histological analysis of protocorm-like bodies of *Cymbidium* 'King Arthur' Miller

Authors/Autores: Soto-Contreras, A., González-Arno M. T., Ángeles-Álvarez G., Hernández-Ramírez F.

ID: e2066

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e2066>

Received/Fecha de recepción: September 21th 2025

Accepted /Fecha de aceptación: May 25th 2026

Available online/Fecha de publicación: July 06th 2026

Please cite this article as/Como citar este artículo: Soto-Contreras, A., González-Arno M. T., Ángeles-Álvarez G., Hernández-Ramírez F. (2026). Induction and histological analysis of protocorm-like bodies of *Cymbidium* 'King Arthur' Miller. *Revista Bio Ciencias*, 13, e2066. <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e2066>

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

Inducción y análisis histológico de Cuerpos Parecidos a Protocormos de *Cymbidium* 'Rey Arturo' Miller

Induction and histological analysis of protocorm-like bodies of *Cymbidium* 'King Arthur' Miller

Inducción de PLBs de *Cymbidium* 'Rey Arturo' Miller /

Induction of PLBs of *Cymbidium* 'King Arthur' Miller

Soto-Contreras, A.¹(<https://orcid.org/0000-0002-1496-9432>), González-Arno M. T.¹ (<https://orcid.org/0000-0002-4488-4229>), Ángeles-Álvarez G.² (<https://orcid.org/0000-0002-0455-4997>), Hernández-Ramírez F.^{1*} (<https://orcid.org/0000-0001-6492-302>)

¹ Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. Prolongación de Oriente 6, No. 1009, CP. 94340. Orizaba, Veracruz, México

² Instituto de Ecología A. C. Carretera Antigua a Coatepec, No. 351, CP. 91070. Xalapa, Veracruz, México

*Corresponding Author:

Fabiola Hernández-Ramírez. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. Prolongación de Oriente 6, No. 1009, 94340, Orizaba, Veracruz, México. Teléfono (+52) 271709 40 05. E-mail: fabiolhernandez@uv.mx

RESUMEN

Se evaluó la inducción de cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) del híbrido *Cymbidium* 'Rey Arturo' con segmentos de hojas y ápices *in vitro*. Se estudiaron concentraciones (0, 0.45, 2.27 y 4.54 μ M) de Tidiazuron (TDZ) con fotoperíodo (16h luz/8h oscuridad) y oscuridad durante cuatro meses. Se determinó la sobrevivencia (%), total de PLBs formados y la inducción se analizó por histología. Se formaron máximo 30 y 67 PLBs solo de ápices en 4.54 μ M de TDZ con fotoperíodo y oscuridad, respectivamente. El análisis histológico confirmó la formación vía organogénesis directa como alternativa potencial para la producción de múltiples de brotes.

PALABRAS CLAVE: Fotoperíodo, histología, oscuridad, tidiazuron.

ABSTRACT

The induction of protocorm-like bodies (PLBs) in *Cymbidium* 'King Arthur' hybrid was evaluated using leaf segments and shoot tips *in vitro*. Different concentrations (0, 0.45, 2.27, and 4.54 μ M) of thidiazuron (TDZ) were studied under photoperiod (16 h light/8 h dark) and darkness for four months. Survival (%) and the total number of PLBs formed were determined. Induction was analyzed histologically. Shoot tips only formed PLBs. A maximum of 30 and 67 PLBs were obtained with 4.54 μ M TDZ under photoperiod and darkness, respectively. Histological analysis confirmed formation via direct organogenesis as a potential alternative for producing multiple shoots.

KEYWORDS: photoperiod, histology, darkness, thidiazuron.

Introducción

La especie *Cymbidium* es una orquídea considerada de crecimiento semi-terrestre, originaria de Asia tropical y subtropical, altamente reconocida por su importancia ornamental y comercial (De, 2022). Esta especie ha sido objeto de estudio para programas de mejoramiento genético y se han registrado más de 18 000 híbridos ante el International Orchid Register de la Royal Horticultural Society, los cuales han aportado mayor versatilidad para la comercialización de plantas en maceta y/o como flor de corte (Royal Horticultural Society, 2025). En la floricultura mundial, los híbridos de *Cymbidium* destacan por sus flores extravagantes y multicolores que integran mejoras sobresalientes en la longevidad, tamaño y calidad de la flor (Balilashaki et al., 2023). Estas orquídeas producen una gran cantidad de semillas, pero no germinan fácilmente en la naturaleza por la ausencia de endospermo, resultando casi imposible su reproducción sexual (Cuervo-Andrade et al., 2022). Adicionalmente, la propagación convencional por la división de pseudobulbos resulta poco práctica, ya que solamente se obtiene una planta de cada pseudobulbo que tarda en florear entre tres y cuatro años (Park et al., 2021). En cambio, el cultivo *in vitro* es una estrategia biotecnológica que garantiza la obtención de múltiples brotes y de gran cantidad de plantas libres de patógenos en menor tiempo (Teixeira da Silva et al., 2015).

Para la micropropagación comercial de orquídeas se han utilizado meristemos, yemas, inflorescencias, hojas y Cuerpos parecidos a Protocormos (PLBs) (Teixeira da Silva et al., 2015). Estos últimos, presentan ventajas tales como la plasticidad y gran capacidad morfogénica al ser tejidos poco diferenciados que forman protuberancias y cada una origina varias plántulas completas (Fritsche et al., 2022). Los PLBs, pueden ser considerados embriones con un patrón de desarrollo similar al de las etapas tempranas de germinación de las semillas, pero provienen de células somáticas (Pyati, 2023). Su homogeneidad genética al derivarse de estructuras protocormoides, reduce el riesgo de variación somaclonal. Por consiguiente, los PLBs son un magnífico candidato para los programas de transformación genética dada su capacidad de proliferación y estabilidad (Zhou et al., 2025).

En general para las orquídeas la inducción de PLBs se puede realizar a partir del cultivo de ápices caulinares o radicales, segmentos de hojas, inflorescencias, entre otros, dependiendo del material disponible y del objetivo de la inducción (Pant, 2013). Los ápices caulinares o meristemos suelen ser los más utilizados (Campol et al., 2024), aunque también se ha reportado la obtención de PLBs a partir de segmentos de hojas (Cardoso et al., 2020). No obstante, la estimulación de este proceso depende de la composición del medio de cultivo, de las hormonas empleadas y de las condiciones de incubación (Mengxi et al., 2011). Los reguladores de crecimiento más utilizados son Benciladenina (BA), Kinetina (K) y Tidiazuron (TDZ) (Naderi Boldaji et al., 2023). Entre ellos, TDZ es considerado de los más efectivos incluso a bajas concentraciones, lo que favorece su uso cuando se utilizan explantes iniciales como ápices (Campol et al., 2024) o segmentos de hojas (Cardoso et al., 2020).

La evaluación de un proceso de formación de PLBs puede realizarse mediante estudios histológicos, los cuales permiten analizar las distintas etapas de desarrollo e identificar las vías de inducción directa y/o indirecta, así como el origen de la diferenciación celular (Kaewubon et al., 2010). El análisis histológico representa una herramienta de utilidad que proporciona información ilustrada para la mejor comprensión de este sistema de cultivo *in vitro* y su validación en la práctica (Julkifly et al., 2012; Kruglova et al., 2023).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar histológicamente la inducción de PLBs utilizando el híbrido *Cymbidium* 'Rey Arturo' Miller para validar el proceso morfogénico y proponer un procedimiento alternativo de multiplicación *in vitro* para esta valiosa orquídea de atractivo ornamental y económico, que se respalda por su distribución mundial. Los parámetros experimentales estudiados fueron: dos tipos de explantes, cuatro concentraciones de TDZ en el medio de cultivo y dos condiciones de incubación.

Material y Métodos

Material Biológico

Se utilizaron plántulas provenientes de la germinación *in vitro* de semillas del híbrido *Cymbidium* 'Rey Arturo' Miller en medio de cultivo basal MS (Murashige & Skoog 1962) semisólido, suplementado con sacarosa 30 gL⁻¹ y gelificado con 3 gL⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldrich, USA). Las plantas *in vitro* se propagaron sistemáticamente cada tres meses en la misma formulación de medio de cultivo y se mantuvieron expuestas a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con una intensidad lumínica de 36 µmol m⁻²s⁻¹ a una temperatura de 24 ± 2°C. Para la inducción de PLBs se usaron como explantes iniciales aislados de plantas *in vitro* después de tres subcultivos, segmentos de hojas de 5 x 5 mm con cutícula y sin nervadura, colocando horizontalmente la superficie abaxial sobre el medio de cultivo, así como ápices de aproximadamente 3 mm.

Inducción de PLBs

La inducción se realizó colocando los dos tipos de explantes (segmentos de hojas y ápices) en medio basal MS semisólido suplementado con 1-Fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea (TDZ) a las concentraciones de 0, 0.45, 2.27 y 4.54 µM. Los cultivos se incubaron a 24 ± 2 °C expuestos al fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) o en oscuridad total. Los experimentos se monitorearon mensualmente, se evaluó la sobrevivencia (%) y el número de PLBs formados, así como se determinó el número total de PLBs obtenidos y el porcentaje de explantes que los produjeron al cabo de cuatro meses de cultivo. La unidad experimental fue n=10.

Análisis histológico

Para el análisis histológico se aplicó la técnica en Resina JB-4 (Valley, 1976) y se monitoreó el proceso de inducción mensualmente. Los tejidos se fijaron en 200 mL de glutaraldehído al 2 % durante 24 h, se lavaron con agua destilada por 3 h y realizaron cambios cada 30 min. Posteriormente, se procedió a la deshidratación en acetona a concentraciones graduales (30, 50, 70, 85, 96 y 100 %) durante 3 h en cada solución. Se retiró la acetona remanente y se realizó una pre-fijación agregando 25 mL de la mezcla JB-4 Plus (Solución A) y 225 mg de Catalizador JB-4 cubriendo completamente a los tejidos que se incubaron 48 h a temperatura ambiente.

Las muestras pre-fijadas se transfirieron a nuevos tubos y se agregaron 25 mL de la mezcla de JB-4 Plus (Solución A), 225 mg de Catalizador JB-4 y 1 mL de JB-4 Plus (Solución B), hasta llenar completamente los tubos, los cuales se cerraron herméticamente y mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido el tiempo de inclusión, los bloques sólidos JB-4 formados se extrajeron cuidadosamente de los tubos, se seccionaron en bloques y se adhirieron en cuadrados de madera de 2 x 2 cm utilizando un pegamento líquido transparente.

Se realizaron cortes longitudinales de 5 µm de grosor con ayuda de un microtomo marca American Optical (AO) modelo 860 con cuchillas de acero y las muestras se colocaron posteriormente sobre portaobjetos humedecidos con 3 gotas de agua y se tiñeron con 3 gotas de azul de toluidina durante 5 min. Seguidamente, se procedió a realizar el lavado de los portaobjetos con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente por 2-3 min. Se añadieron 2 gotas de medio de montaje Politec Luzitron (resina) e inmediatamente se colocaron los cubreobjetos. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 8 h. Los cortes montados se observaron en un Estereoscopio marca Nikon SMZ 1500 y se tomaron al menos 10 fotografías utilizando una cámara Nikon D4 con formato completo. Se visualizaron las distintas etapas del proceso de inducción y se realizó el análisis histológico mensual del efecto de las concentraciones de TDZ y de las condiciones de incubación hasta los cuatro meses de cultivo.

Resultados y Discusión

Efecto del tipo de explante

Bajo ninguna de las condiciones de cultivo estudiadas se logró la inducción de PLBs utilizando segmentos de hojas como explantes. La oxidación ocurrió a partir del primer mes, evidenciada por una coloración café que avanzó desde los contornos hasta cubrir totalmente las hojas y ocasionó un daño vital irreversible en los tejidos.

Estos resultados demuestran la necesidad de incorporar un antioxidante para evitar la pérdida de viabilidad cuando se utilizan segmentos de hojas en la inducción de PLBs *del híbrido Cymbidium 'Rey Arturo'*. Teixeira da Silva en 2013 demostró que la adición de ácido ascórbico, α -tocoferol o carbón activado al medio de cultivo, si bien no influía en la producción y desarrollo de PLBs del híbrido *Cymbidium Twilight Moon 'Day Light'*, evitaba la oxidación de los meristemos utilizados como explantes de inducción (Teixeira da Silva, 2013). Por consiguiente, estos antioxidantes pudieran ser evaluados en futuros estudios como alternativas para la obtención de PLBs.

En la Tabla 1 se presenta la evaluación mensual de la sobrevivencia de ápices cultivados para la inducción de PLBs. Cuando no se adicionó TDZ al medio MS y las muestras se incubaron expuestas al fotoperiodo, la sobrevivencia de los explantes se mantuvo al 100 % durante los cuatro meses de cultivo. Bajo esta condición de incubación, la sobrevivencia disminuyó gradualmente oscilando de 90 a 60 % a la concentración de 0.45 μ M entre el primer y cuarto mes. En cambio, para las concentraciones de 2.27 y 4.54 μ M de TDZ, se mantuvo al 80 % a partir del segundo mes.

Table 1. Effect of TDZ concentration (μ M) on survival (%) of shoot-tips of the hybrid *Cymbidium 'King Arthur'* grown under two incubation conditions for four months.

Condición de incubación	Meses	Sobrevivencia (%) [*]			
		Concentración TDZ (μ M)			
		0	0.45	2.27	4.54
Fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad)	1	100	90	95	100
	2	100	80	80	80
	3	100	70	80	80
	4	100	60	80	80
Oscuridad	1	100	90	95	100
	2	90	80	80	100
	3	80	70	80	100
	4	80	60	80	100

Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

Cuando no se adicionó TDZ al medio de cultivo y las muestras permanecieron en total oscuridad, la sobrevivencia de los explantes se redujo del 100 al 80 % a partir del tercer mes (Tabla 1). No obstante, se evidenció la misma tendencia que la obtenida con el fotoperiodo a las concentraciones de 0.45 μ M (disminución de 90 a 60 %) y 2.27 μ M (disminución de 95 a 80 %). En cambio, con la adición de 4.54 μ M de TDZ, la sobrevivencia se mantuvo al 100 % independientemente del tiempo de cultivo en oscuridad.

De manera general, los porcentajes de sobrevivencia obtenidos bajo las condiciones experimentales estudiadas demostraron como primer requisito, que mínimo el 60 % de los explantes de inducción permanecieron vivos para potencialmente generar PLBs.

En la Tabla 2, se muestran los resultados obtenidos en la inducción de PLBs. Se puede observar que la formación inició a partir del primer mes en todos los medios y muestras cultivadas con fotoperiodo. El número máximo (30) de PLBs se logró adicionando la concentración más elevada (4.54 μ M) de TDZ. El número total de PLBs formados y el porcentaje de explantes que los formaron después de cuatro meses de cultivo, osciló desde 4 del 40 % de los explantes en el medio MS, hasta 30 del 70 % de los explantes en el medio suplementado con 4.54 μ M de TDZ.

Para las muestras cultivadas en total oscuridad, la aparición de PLBs se retrasó hasta el segundo mes en el medio con menor contenido (0.45 μ M) de TDZ y hasta el tercero, en el medio MS desprovisto de hormona. En cambio, la formación de PLBs ocurrió a partir del primer mes en aquellos medios que contenían TDZ a las concentraciones más elevadas (2.27 o 4.54 μ M). El número de PLBs a los cuatro meses de cultivo superó prácticamente al doble lo producido a las mismas concentraciones de TDZ con la exposición a la luz. En oscuridad, se alcanzó un número máximo de 67 PLBs formados del 80 % de los ápices.

De manera general, se detectó que no todos los explantes vivos formaban PLBs y que los porcentajes de los tejidos que los produjeron aumentaron en la medida en que se incrementó la concentración de TDZ para ambas condiciones de incubación.

Posterior a los cuatro meses, no se detectó mayor proliferación ni siquiera en las mejores condiciones de cultivo (datos no mostrados). Simultáneo a la producción de PLBs, se observó la generación adicional de algunos brotes a partir del mismo explante inicial. Su desarrollo organogénico fue directo a través de tejidos elongados bien definidos con sus respectivos primordios foliares. La coloración verde intensa fue distintiva del cultivo en fotoperiodo y la blanquecina, la de los brotes cultivados en oscuridad.

En la Figura 1 se ilustra el proceso de formación de PLBs mediante el cultivo de ápices en medio suplementado con 4.54 μ M de TDZ a las dos condiciones de incubación estudiadas: (Figura 1a-c) fotoperiodo y (Figura 1d-f) total oscuridad.

Análisis histológico durante el proceso de formación de PLBs

En las Figuras de la 2 a la 4, se muestran como ejemplo cortes histológicos realizados a ápices cultivados en total oscuridad a la concentración de 4.54 μ M de TDZ. Se seleccionó esta condición por ser en la que se indujo mayor proliferación de PLBs. La Figura 2a y b ilustra ápices recién cultivados que presentan células en diferentes fases de división celular. Al mes de cultivo se evidenció el inicio de la deformación del explante en las zonas de concentración de células meristemáticas y junto a ellas, células grandes del parénquima con gránulos de almidón (Figura 2c, d, e y f). A los dos meses de cultivo, continuó la deformación de las zonas meristemáticas de crecimiento y el desarrollo morfológico de dichas estructuras, además, se apreciaron células parenquimatosas en expansión con paredes delgadas y onduladas (Figura 3). A los tres meses de cultivo, los PLBs se observaron completamente definidos con nódulos de células y núcleos de distintos tamaños, evidenciándose un proceso de disgregación del explante inicial (Figura 4a y b). A los cuatro meses de cultivo, se completó la individualización de estructuras globulares definidas como PLBs (Figura 4c), las cuales posteriormente continuaron diferenciándose en brotes.

Table 2. Effect of TDZ concentration (μM) on the formation of Protocorm-Like Bodies (PLBs) from apices of the hybrid *Cymbidium* 'King Arthur' grown for four months exposed to photoperiod or darkness.

Condición	Meses	Número de PLBs formados Concentración TDZ (μM)			
		0	0.45	2.27	4.54
Fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad)	1	1	1	1	2
	2	1	3	3	5
	3	1	2	2	11
	4	1	1	16	12
No. total de PLBs formados		4	7	22	30
Explantos que formaron PLBs (%)		40	50	60	70
Oscuridad	1	0	0	3	2
	2	0	2	5	12
	3	2	5	11	21
	4	2	6	24	32
No. total de PLBs formados		4	13	43	67
Explantos que formaron PLB (%)		50	60	70	80

Fuente: Elaboración propia en base a resultados. n=10

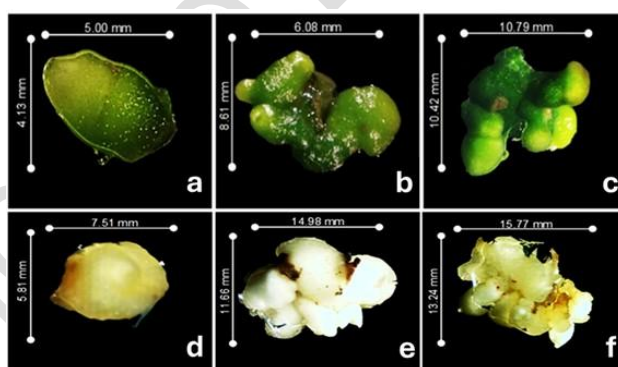


Figure 1. Stages of PLBs formation during culture of hybrid *Cymbidium* 'King Arthur' apices on medium supplemented with 4.54 μM TDZ under two incubation conditions. Photoperiod (16 h light/8 h darkness): a) Apice after 15 days of culture; b) Formation and growth of PLB during the second month; c) Four-month PLBs growth. In total darkness: d) Etiolated apice from 15 days of culture; e) Formation and growth of PLB during the second month; f) Four-month PLBs growth.

Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

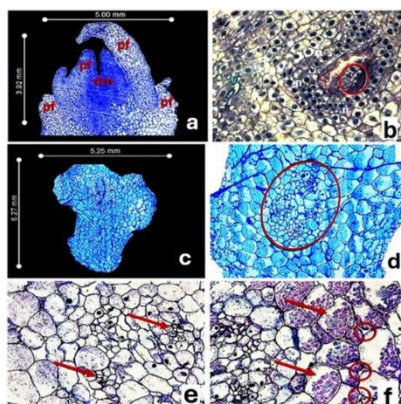


Figure 2. Histological analysis of obtained PLBs from apices of the hybrid *Cymbidium* 'King Arthur' cultured in darkness on medium supplemented with 4.54 μ M TDZ. a) Freshly grown apices (1X), md: meristematic dome, pl: primordia leaf, b) meristematic cells in different phases of cell division (100X), n: nuclei, circle: vacuolated cells; c) Deformation of the meristematic zone (1X); d) oval: Cell growth nodules during PLB formation (1X); e) Arrows: Cell division between the nodules (100X); f) Arrows: large number of parenchymatous cells with starch grains, circles: intercellular spaces (100X). Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

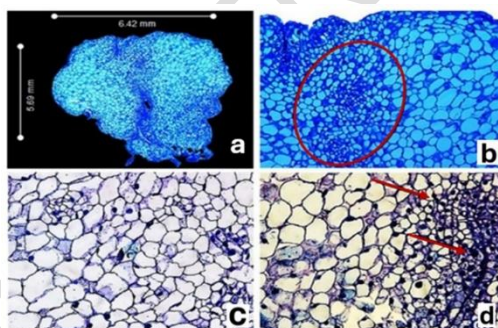


Figure 3. Histological analysis of obtained PLBs from apices of the hybrid *Cymbidium* 'King Arthur' after the second month of culture in darkness on medium supplemented with 4.54 μ M TDZ. a) Continuity of deformation in the meristematic zone (1X); b) Oval: group of cells in full cell division activity, forming PLB (1X); c) Thin, wavy walls of expanding parenchymal cells (100X); d) Arrows: Active cell division (100X). Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

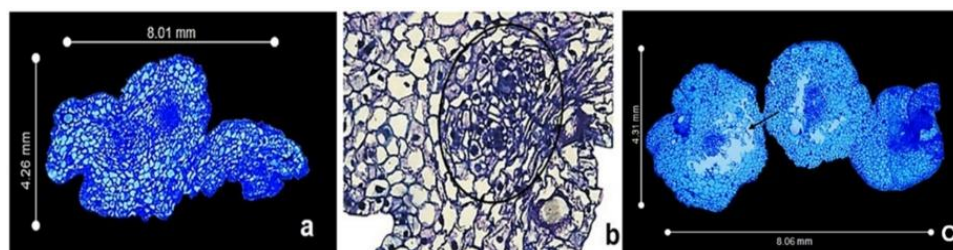


Figure 4. Histological analysis of obtained PLBs from apices of hybrid *Cymbidium* 'King Arthur' after the third month of culture in darkness on medium supplemented with 4.54 μ M TDZ. a) Start of PLB individualization (1X); b) Circle: Nodule of cells with nuclei of different sizes (100X). c) Arrow: individualization of three globular structures defined as PLB (1X) at the fourth month of culture. Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

Los estudios realizados en este trabajo con el híbrido *Cymbidium* 'Rey Arturo' demostraron la factibilidad de formar PLBs mediante el cultivo de ápices de plantas *in vitro* bajo dos condiciones de incubación y favorecida por el incremento (de 0.45 a 4.54 μ M) de la concentración de TDZ adicionada al medio MS. Otros autores en cambio, observaron la formación espontánea de PLBs a partir de ápices del híbrido *Cymbidium* Twilight Moon 'Day Light' sin la adición de reguladores de crecimiento pero en el medio VW (Teixeira da Silva, 2013). Las diferencias en este estímulo morfogénico pueden deberse a la composición del medio de cultivo. La formulación VW se considera clásica para el desarrollo *in vitro* de orquídeas especialmente del género *Cymbidium* (Teixeira da Silva, 2013). Sin embargo, el medio MS ha resultado ser más efectivo que VW para la formación de PLBs, la germinación de semillas y producción de plántulas en *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. (Bhowmik & Rahman, 2017). La utilización de TDZ en el medio MS ha sido también reportada con éxito para la producción de PLBs en otras orquídeas como vainilla (Retheesh y Bhat, 2011) y un híbrido de *Doritaenopsis* (Park et al., 2002).

Respecto a las condiciones de incubación, se ha comprobado que la exposición a la luz puede retrasar el proceso de embriogénesis y a su vez, contribuir a la necrosis de los explantes. Así ocurrió con dos especies de *Phalaenopsis* (Gow et al., 2009) y con la orquídea tropical *Oncidium flexuosum* (Mayer et al., 2010), para la cual el cultivo en oscuridad fue un factor crucial en la proliferación de PLBs. Esos resultados coinciden con los de este trabajo y la conveniencia de mantener los explantes de *Cymbidium* 'Rey Arturo' en oscuridad para lograr mayor producción de PLBs. Sin embargo, la exposición al fotoperiodo, especialmente a diferentes espectros de luz LED ha demostrado ser más efectiva en la inducción, proliferación y regeneración de PLBs en otras orquídeas debido a su impacto en la reprogramación y división celular, aspectos críticos para la formación y desarrollo de PLBs (Naderi Boldaji et al., 2023).

A través del análisis histológico se observó la presencia de células de parénquima al lado de células meristemáticas (Figuras 3 y 4). Las células parenquimatosas pueden considerarse meristemos potenciales, ya que en determinadas condiciones se pueden desdiferenciar y retomar su división celular (Zhao et al., 2007). La multiplicación a través de PLBs representa una característica única de las especies de orquídeas que puede ser eficazmente aprovechada para la producción de plantas a gran escala. Su mayor ventaja radica en la gran cantidad de PLBs que se puede obtener a corto plazo a partir de un solo explante o material de inducción (So Young et al., 2000).

Conclusiones

En este trabajo se definió y validó histológicamente, una propuesta metodológica efectiva para la producción de PLBs a partir de ápices provenientes de plantas *in vitro* del híbrido *Cymbidium* 'Rey Arturo'. La mayor capacidad de respuesta se obtuvo cuando se adicionó TDZ al medio MS semisólido a una concentración de 4.54 μM y se mantuvieron los cultivos a la oscuridad durante cuatro meses. Los fragmentos de hojas *in vitro* del mismo híbrido no resultaron ser un explante adecuado para este propósito. El análisis histológico confirmó la formación de PLBs como un proceso organogénico directo, demostrando el potencial de esta estrategia biotecnológica para la obtención masiva de plantas genéticamente estables. A pesar de que se han realizado diversos estudios con otras orquídeas, hasta la fecha, no existen reportes metodológicos sobre la inducción de PLBs en el híbrido 'Rey Arturo' perteneciente al género *Cymbidium*.

Contribución de los autores

ASC: Investigación, Metodología, Redacción-Borrador Original. MTGA: Conceptualización del trabajo, Redacción-Revisión y Edición, Visualización. GAA: Investigación, Metodología Conceptualización y Revisión. FHR: Conceptualización, Metodología, Revisión y Edición, Visualización. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada con fondos propios.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana y al Instituto de Ecología A. C. por las facilidades brindadas para llevar a cabo este trabajo.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés de los resultados de investigación.

Referencias

- Cuervo-Andrade, J. L., Gutiérrez-Rodríguez, G. A., Albarracin-Bohórquez, N., Sánchez-Sánchez, J. M., Escobar-Pardo, O. F., Flautero-Murillo, C. L., Mancera-Rodríguez, L. P., Beltrán-Zapata, G. D., & Pacheco-Salamanca, R. A. (2022). Generalidades del cultivo *Cymbidium*. Corporación Unificada Nacional de Educación Superior CUN. <https://repositorio.cun.edu.co/handle/cun/3582>
- Balilashaki, K., Martinez-Montero, M. E., Vahedi, M., Cardoso, J. C., Silva Agurto, C. L., Leiva-Mora, M., Feizi, A., & Musharof Hossain, M. (2023). Medicinal use, flower trade, preservation and mass propagation techniques of *Cymbidium* orchids-An overview. *Horticulturae*, 9(6), 690. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060690>
- Bhowmik, T. K., & Rahman, M. M. (2017). Effect of different basal media and PGRs on *in vitro* seed germination and seedling development of medicinally important orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6, 167-172.
- Campol, J. R., Naing, A. H., Aung, H. M., Cho, S. B., Kang, H., Chung, M. Y., & Kim, C. K. (2024). Production of genetically stable and Odontoglossum ringspot virus-free *Cymbidium* orchid 'New True' plants via meristem-derived protocorm-like body (PLB) subcultures. *Plant Methods*, 20(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01269-1>
- Cardoso, J. C., Zanello, C. A., & Chen, J. T. (2020). An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 985. <https://doi.org/10.3390/ijms21030985>

- De, L. C. (2022). Good Agricultural Practices of *Cymbidium* Orchids. *Vigyan Varta*, 3(3), 44-56.
- Fritsche, Y., Sanches-Ornellas, T., Stefenon, V. M., & Guerra, M. P. (2022). Ploidy mosaics: does endopolyploidy in explants affect the cytogenetic stability of orchids regenerated from PLBs?. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 149(3), 697-713. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02238-z>
- Gow, W. P., Chen, J. T., & Chang, W. C. (2009). Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(2), 363-369. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0243-6>
- Julkifle, A. L., Poobathy, R., Samian, R., & Subramaniam, S. (2012). Histological analyses of PLBs of *Dendrobium sonia*-28 in the recognition of cell competence for regeneration and *Agrobacterium* infection. *Plant Omics*, 5(6), 514-517. https://www.pomics.com/subaramanian_5_6_2012_514_517.pdf
- Kaewubon, P., Sangdam, S., Thammasiri, K., & Meesawat, U. (2010). Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus-derived PLBs of tropical slipper orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Pfitz.). *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 4(1), 29-35.
- Kruglova, N., Zinatullina, A., & Yegorova, N. (2023). Histological approach to the study of morphogenesis in callus cultures *in vitro*: a review. *International Journal of Plant Biology*, 14(2), 533-545. <https://doi.org/10.3390/ijpb14020042>
- Mayer, J. L. S., Stancato, G. C., & Appezzato-Da-Glória, B. (2010). Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(3), 411-416. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9782-9>
- Mengxi, L., Zhigang, X., Yang, Y., & Yijie, F. (2011). Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 106, 1–10 <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9887-1>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3). <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naderi Boldaji, H., Dianati Daylami, S., & Vahdati, K. (2023). Use of light spectra for efficient production of PLBs in temperate terrestrial orchids. *Horticulturae*, 9(9), 1007. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9091007>
- Pant, B. (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of plant science*, 7(10), 448-467. <https://doi.org/10.5897/ajps2013.1031>
- Park, J., Lee, H. B., An, S. K., Lee, J. H., & Kim, K. S. (2021). Increasing duration and intensity of nighttime supplemental lighting promotes growth and photosynthesis in young *Cymbidium* plants. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 62(5), 679-690. <https://doi.org/10.1007/s13580-021-00352-z>
- So Young, P., Murthy, H. N., & Kee Yoeup, P. (2000). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(1), 67-72. <https://doi.org/10.1023/A:1006420116883>
- Park, S. Y. E. C., Yeung, E., Chakrabarty, D., & Paek, K. (2002). An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Reports*, 21(1), 46-51. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0480-x>
- Pyati, A. N. (2023). *In vitro* Regeneration of an Endangered Medicinal Orchid *Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxton through Protocorm like bodies. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 33(1), 1-8. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v33i1.66753>
- Retheesh, S. T., & Bhat, A. I. (2011). Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from protocorm-like bodies of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20(2), 262-269. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0057-2>
- Royal Horticultural Society. (2025, diciembre 30). International Orchid Register. <https://apps.rhs.org.uk/horticulturaldatabase/orchidregister/orchidregister.asp>

- Teixeira da Silva, J. A. (2013). Impact of paper bridges, activated charcoal, and antioxidants on growth and development of protocorm-like bodies of hybrid *Cymbidium*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(4), 414-420. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9532-x>
- Teixeira da Silva, J. A., Cardoso, J. C., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). *Dendrobium* micropropagation: a review. *Plant cell reports*, 34(5), 671-704. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1754-4>
- Valley P. (1976). JB-4 embedding kit. Polysciences Inc. Warrington. Printed in U.S.A. 1-3.
- Zhao, P., Wang, W., Feng, F.S., Feiwu, Yang, Z. & Wang, J. W. (2007). High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium Candidum* Wall Ex Lindl. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 90, 131–139. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9181-4>
- Zhou, Y., Yang, Y., He, S., Xing, X., Qu, Y., & Xu, Y. (2025). Highly Efficient *Agrobacterium*-mediated Stable Transformation of *Cymbidium goeringii*. *HortScience*, 60(7), 1026-1031. [10.21273/HORTSCI18574-25](https://doi.org/10.21273/HORTSCI18574-25)