

Protocolo para la propagación *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. a partir de semilla botánica

Leonardo J. Moreno-Bermúdez¹, <https://orcid.org/0000-0002-6626-0732>

Lourdes R. García¹, <https://orcid.org/0000-0003-1016-6939>

Mariana La O¹, <https://orcid.org/0000-0003-2300-2458>

Yenny Padrón¹, <https://orcid.org/0000-0002-2413-7672>

Melisa María Hernández-Pérez¹, <https://orcid.org/0000-0002-2574-3754>

Yanet Fernández¹, <https://orcid.org/0000-0002-9370-6699>

Leonardo Rivero¹, <https://orcid.org/0000-0003-3627-9421>

Laisyn Posada-Pérez¹, <https://orcid.org/0000-0001-5154-5965>

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

*Autora para correspondencia e-mail: laisyn@ibp.co.cu

RESUMEN

Dendrobium phalaenopsis Fitzg. es una especie de orquídea con gran popularidad entre coleccionistas y cultivadores de este grupo de plantas. Posee inflorescencias de numerosas flores atractivas en cuanto a forma, tamaño, color y longevidad. A pesar de que se han realizado numerosos estudios en la especie enmarcados en el campo de la biotecnología vegetal, no se dispone de un protocolo de propagación masiva por cultivo *in vitro*. Basado en lo anterior el objetivo del presente trabajo fue presentar un protocolo para la propagación de *D. phalaenopsis* a partir de semilla botánica. A través de la metodología que se describe es posible obtener plantas y un coeficiente de multiplicación de 8.0. No se requiere de una fase de enraizamiento previo a la aclimatización *ex vitro* de las plantas propagadas *in vitro*.

Palabras clave: orquídeas, plantas ornamentales, propagación *in vitro*

Protocol for *in vitro* propagation of *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. from botanic seeds

ABSTRACT

Dendrobium phalaenopsis Fitzg. is an orchid species with great popularity among collectors and growers of this group of plants. It has inflorescences of numerous attractive flowers in terms of shape, size, color and longevity. Despite the fact that numerous studies have been carried out in this species framed in the field of plant biotechnology, there is no a mass propagation protocol by *in vitro* culture. Based on the above mentioned, the objective of this work was to establish a protocol for the propagation of *D. phalaenopsis* from botanical seed. Through the described methodology, it is possible to obtain plants and 8.0 multiplication coefficient. A rooting phase is not required prior to the *ex vitro* acclimatization of the *in vitro* propagated plants.

Keywords: *in vitro* propagation, orchids, ornamental plants

INTRODUCCIÓN

El género *Dendrobium* de la familia *Orchidaceae* agrupa alrededor de 1190 especies que presentan una diversificación ecológica distintiva. Se pueden encontrar plantas epífitas, litófitas y terrestres (Basavaraj et

al., 2020). Además de los valores ornamentales que posee, se encuentran plantas con efectos terapéuticos con actividad hepatoprotectora (Ganpathy et al., 2013), antioxidante, antiglicación (Mukharjee et al., 2012) y actividad inhibidora sobre hongos fitopatógenos (Akarsh et al., 2016).

La especie *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. es nativa de Indonesia, ampliamente cultivada por coleccionistas y cultivadores de este grupo de plantas. Está entre las más preferidas después de las *Phalaenopsis* por su similitud con estas, durabilidad y número de flores de sus inflorescencias, y es muy usada como especie parental en la hibridación de orquídeas (Widiastoet *et al.*, 2010; Ivakdalam y Pugesehan, 2016). Como características botánicas destacan sus flores anchas con labelo puntiagudo, pseudobulbos y hojas de color verde oscuro. Pueden ser epífitas o litófitas, y necesitan humedad, alta luminosidad y buen drenaje alrededor de las raíces para un buen desarrollo (Schelpe y Stewart, 1990).

Las orquídeas del género *Dendrobium* se propagan fácilmente por métodos convencionales como la separación de pseudobulbos, hijuelos desarrollados en las varas florales después de la floración (keikies), o mediante esquejes vegetativos. Sin embargo, estos métodos son muy lentos y pueden originar solo unos pocos propágulos al año (Venturieri y Pickscius, 2013). En cambio, el cultivo de tejidos *in vitro*, proporciona una solución alternativa para producir una gran cantidad de plántulas genéticamente similares, de alta calidad fitosanitaria y fisiológica en un período de tiempo limitado. En este proceso, un alto porcentaje de supervivencia, asociado con un alto estándar de plántulas aclimatizadas, son características deseables en laboratorios comerciales y empresas involucradas en la propagación *in vitro* de orquídeas (Da Silva *et al.*, 2017).

En la literatura científica se encuentran numerosos trabajos sobre micropropagación de orquídeas del género *Dendrobium* entre ellas *D. phalaenopsis* (Da Silva *et al.*, 2016; Setiari *et al.*, 2018), sin embargo, en esta especie no ha sido descrito aún un protocolo detallado para la obtención de elevados volúmenes de plantas a través del uso de la biotecnología. Basado en lo anterior el objetivo del presente trabajo fue presentar un protocolo de propagación *in vitro* para *D. phalaenopsis* a partir de semilla botánica.

PROCEDIMIENTOS

En este protocolo se tuvieron en cuenta los criterios de Da Silva *et al.* (2016) y Setiari *et al.* (2018) para la propagación *in vitro* de *Dendrobium*.

I. Fase 0. Selección y preparación del material vegetal de partida

Materiales

Material vegetal

Frutos maduros de *D. phalaenopsis* con aproximadamente tres meses después de la polinización. La maduración del fruto y consecuentemente de las semillas, se podrá constatar cuando en el fruto comience a observarse un cambio de coloración de verde pálido a ligeramente amarillo (Figura 1).

Otros materiales

- Tijeras o bisturíes para cortar los frutos de las plantas
- Recipientes limpios para la colecta del material vegetal



Figura 1. Frutos inmaduros de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. en desarrollo.

Precauciones y medidas de seguridad

- Tres días antes de la colecta del material vegetal para su traslado al laboratorio, a las plantas donadoras se le debe retirar el riego.

Procedimiento

- Cortar los frutos de la planta donante y dejar un segmento del pedúnculo que lo sostiene a la planta no menor de 2.0 cm de longitud.
- Retirar los frutos de la planta e introducirlos en los frascos limpios en los cuales serán trasladados al laboratorio. *Nota:* Emplear guantes. Lavarse las manos al concluir el ensayo.

II. Fase I. Establecimiento o iniciación del cultivo *in vitro*

Materiales

Material vegetal: frutos maduros de *D. phalaenopsis* con aproximadamente tres meses después de la polinización.

Medio de cultivo de germinación: Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% de su concentración, vitaminas MS 10 ml l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹, agar E 6 g l⁻¹ (BIOCEN), pH 5.8.

Otros materiales

- Agua corriente
- Agua destilada estéril
- cepillo dental
- Detergente comercial
- Hipoclorito de sodio (NaOCl)
- Recipientes para la manipulación del material vegetal (placas de Petri, platos metálicos)
- Frascos de cultivo plásticos de 500 ml
- Vaso de precipitado de 500 ó 1000 ml

Equipos e instrumental

- Agitador orbital
- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas
- Espátulas

Precauciones y medidas de seguridad

- Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector

de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes.

- Evitar el contacto de la piel y la inhalación de vapores de las soluciones de hipoclorito de sodio que pueden causar quemaduras e irritación, respectivamente.

Procedimiento

- Cepillar suavemente los frutos con un cepillo dental de cerdas suaves para evitar su apertura en el proceso. El cepillado se realizará con detergente comercial y agua corriente.
- Enjuagar los frutos con agua desionizada estéril una vez realizado el lavado y depositarlos en frascos estériles.
- Añadir etanol al 70% (v/v) y mantenerlos durante 1 min.
- Posteriormente, decantar el etanol del frasco de desinfección y añadir a los frutos una solución de NaOCl al 2% (v/v) en agua desionizada estéril y Tween 20 (una gota por cada 100 ml de solución). El volumen del líquido debe ser tres veces el volumen que ocupe el material vegetal dentro del frasco.
- Mantener los frascos con los frutos y la solución desinfectante en agitación constante en un agitador orbital a 90 rpm por 15 min.
- Eliminar la solución desinfectante por decantación dentro de la cabina de flujo laminar, una vez transcurrido ese tiempo.
- Enjuagar tres veces con agua desmineralizada estéril.
- Colocar los frutos en los platos metálicos estériles para la manipulación del material vegetal y cortarlos longitudinalmente a la mitad con el bisturí.
- Tomar con una espátula las semillas contenidas dentro del fruto mediante raspado. Esparcir las semillas dentro del frasco de cultivo con la espátula, o dando ligeros toques al cabo del utensilio con el dedo índice de la mano con que este se sostiene.
- Una vez extraídas todas las semillas del fruto, tomarlo con una pinza, posicionarlo en la parte superior del recipiente de cultivo sin tocarlo, con la cavidad interna del fruto orientada hacia el medio de cultivo y dar ligeros toques a la pinza con un bisturí. De esta manera caerán al medio de cultivo las semillas restantes que no pudieron ser tomadas con la espátula.
- En caso de que caigan semillas al recipiente de manipulación del fruto, tomarlas con el bisturí y esparcirlas con el mismo en el medio de cultivo.

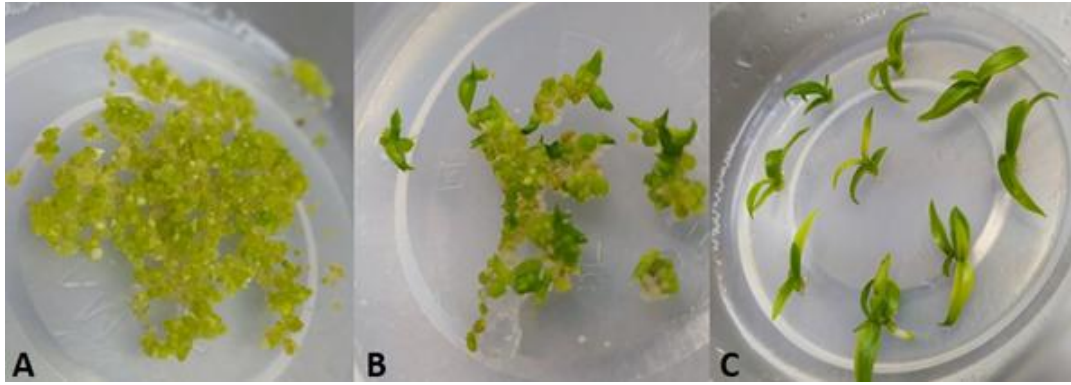


Figura 2. Plántulas de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. formadas a partir de semilla botánica. (A) Protocormos a partir de la germinación de las semillas, (B) Plántulas obtenidas a partir de protocormos, (C) Plantas formadas independizadas y en crecimiento.

- Colocar los frascos de cultivo en estantes en cámaras de crecimiento con luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $48.0 - 62.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Notas:

- Transcurridos 15 días del establecimiento *in vitro*, sobre el medio de cultivo a partir de las semillas comenzará a notarse un hinchamiento y cambio de coloración de pardo a verde claro (Figura 2 A). Lo anterior corresponde al proceso de germinación y formación de los primeros protocormos.
- Después de 45 días posteriores al establecimiento, toda la masa de protocormos formados se transferirá a un medio de cultivo fresco con la misma composición del anterior. En ese momento las primeras plántulas formadas (Figura 2 B) serán independizadas y colocadas en frascos de cultivo con plántulas del mismo tamaño aproximadamente, para continuar con su crecimiento (Figura 2 C).
- Posteriormente, y durante el transcurso de un período de aproximadamente tres meses, a partir del frasco con protocormos se estarán formando nuevas plántulas. Estas también serán subcultivadas hacia nuevos frascos de cultivo con medio de cultivo y con el objetivo que se mencionó en la nota anterior.

III Fase II. Multiplicación *in vitro* y enraizamiento

Materiales

Material vegetal: Plantas *in vitro* de *D. phalaenopsis*.

Medio de cultivo: Sales MS 100%, vitaminas MS 10 ml l^{-1} , sacarosa 30 g l^{-1} y agar E 6 g l^{-1} (BIOCEN), pH 5.8.

Otros materiales: recipientes para la manipulación del material vegetal (placas de Petri, platos metálicos u otro).

Equipos e instrumental

- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas

Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto con la piel.

Procedimiento

Nota:

- Una vez que las plantas después de su formación sean independizadas hacia nuevos frascos de cultivo en la fase previa, comenzarán a formar múltiples brotes axilares (Figura 3 A).
- Separar los brotes de la planta originaria y colocados en nuevos recipientes con medio de cultivo de multiplicación clasificados (de manera visual) de acuerdo con su tamaño

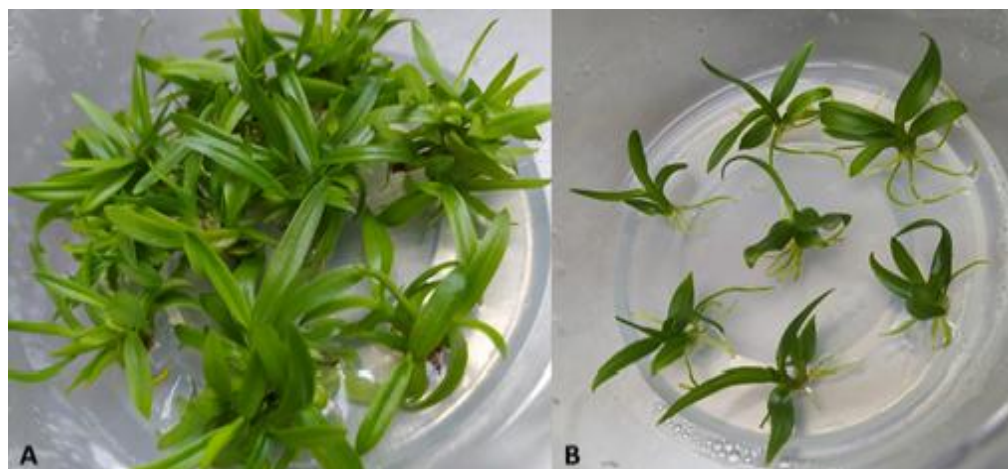


Figura 3. Explantes de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. (A) Material *in vitro* para iniciar la fase de multiplicación *in vitro*, (B) Explantes de *D. phalaenopsis* en fase de multiplicación inmediatamente después de su manejo.

(Figura 3 B). *Nota:* El objetivo de lo anterior es obtener en un mismo recipiente, explantes de tamaño homogéneo para su posterior aclimatización *ex vitro* cuando tengan las características necesarias para esa fase.

- Colocar los frascos de cultivo en estantes en cámaras de crecimiento con luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $48.0 - 62.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Realizar subcultivos cada 30-40 días. Para ello individualizar los explantes y mantener la clasificación de acuerdo con su tamaño.

Notas:

- Durante toda la fase de multiplicación se irán obteniendo explantes de diferentes tamaños, creciendo cada uno en forma de agrupaciones de brotes axilares alrededor de la planta que los originó.

- Aquellas agrupaciones de plantas (dos o más plantas) en las que la mayoría de sus brotes tengan un tamaño de entre 2.0 y 3.5 cm de longitud (medido desde la base de la planta hasta el ápice de la última hoja) (Figura 4 A y Figura 4 B), serán individualizadas cada planta y continuarán el proceso de multiplicación de acuerdo con lo especificado con anterioridad.

- En aquellas agrupaciones en las que la mayoría de sus brotes tengan un tamaño mayor o igual a 3.5 cm (Figura 4 C), se individualizarán solo los brotes de menor tamaño y se transferirán hacia otros frascos de cultivo con medio de cultivo fresco. Los brotes de 3.5 cm de longitud

en lo adelante que no fueron individualizados, serán transferidos cada 30 días hacia medio de cultivo fresco (Figura 4 D), hasta alcanzar las características deseadas para su aclimatización *ex vitro*.

- Durante toda la fase de multiplicación las plantas de mayor tamaño irán desarrollando raíces en el mismo medio de cultivo empleado en esta fase. Por lo anterior, no se requiere de una fase y medio de cultivo específico para el enraizamiento para la posterior aclimatización *ex vitro* de las plantas.

- Se pueden realizar varios subcultivos de multiplicación según los intereses de los propagadores.

- Durante esta fase se puede llegar a obtener un coeficiente de multiplicación de 8.0 a partir del segundo subcultivo.

IV Fase III: Aclimatización *ex vitro*

Materiales

Material vegetal: planta *in vitro* de *D. phalaenopsis* con al menos dos brotes por explante, cada uno mayor a 8.0 cm de longitud) (Figura 5).

Sustrato: fibra de coco desagregada y/o triturada (40%), corteza de pino macho (*Pinus caribea* Morelet) triturada (40%), fragmentos de barro cocido (aproximadamente 1-2 cm³) (20%) (Figura 6).

Otros materiales: agua corriente, bandejas de polipropileno.

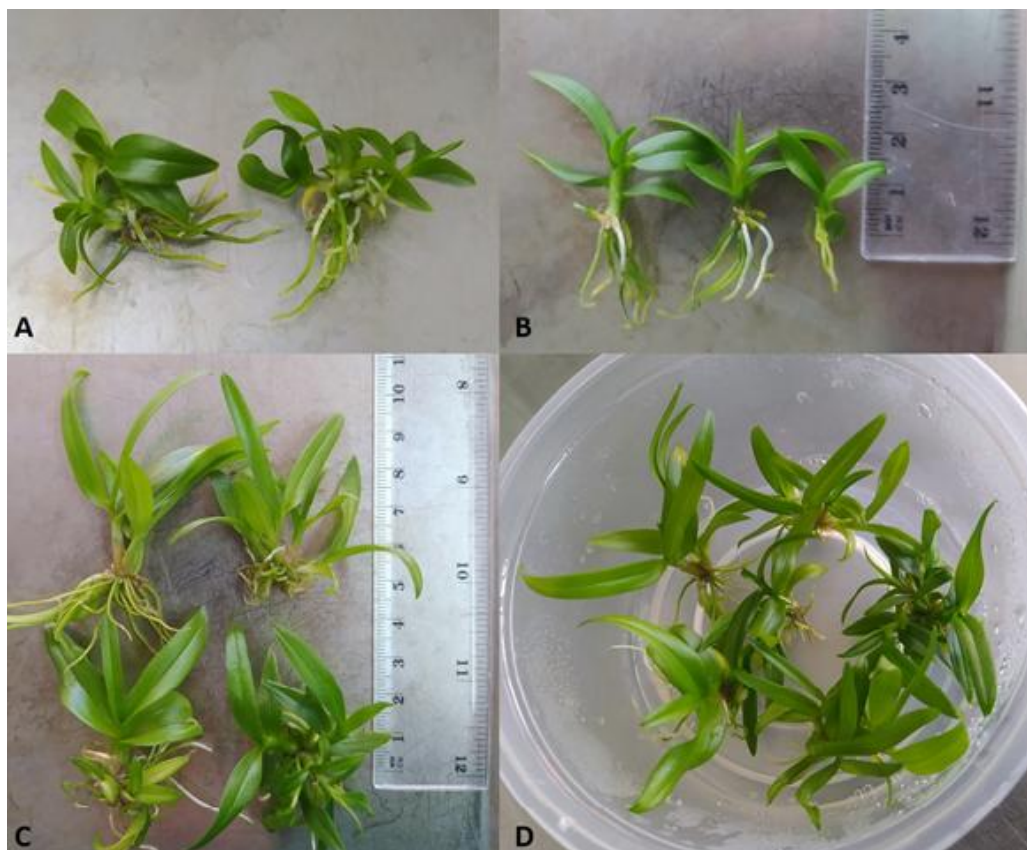


Figura 4. Explantes de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. en fase de multiplicación y enraizamiento. (A) y (B) Agrupaciones de plantas con características para continuar con la multiplicación *in vitro* (dos o más brotes por explante de entre 2.0 y 3.5 cm de longitud), (C) y (D) Plantas *in vitro* con características para continuar su crecimiento hasta la fase de aclimatización *ex vitro* (dos o más brotes por explante con una longitud $\geq$ a 3.5 cm).



Figura 5. Planta *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. con las características adecuadas para su aclimatización *ex vitro*.

Equipos e instrumental

- Sistema de riego por aspersión.

Precauciones y medidas de seguridad

Utilizar un sustrato libre de semillas de plantas de otras especies y de microorganismos dañinos como pueden ser nemátodos, bacterias y hongos patógenos para la planta. Se debe emplear guantes. Lavarse bien las manos al concluir el ensayo.

Nota: Para el caso de la corteza de pino macho esta debe estar libre de resina lo cual se puede lograr manteniendo el material vegetal a la intemperie por períodos de tiempo prolongados. Para eliminar la resina de una manera rápida la corteza triturada puede ser hervida durante 20 min en agua y repetir este proceso tres veces; cada vez el agua para hervir debe ser renovada.

Procedimiento

- Mezclar homogéneamente los materiales especificados que conformarán el sustrato

(Figura 6 D), para luego depositarlos en los recipientes donde se crecerán las plantas *in vitro* aclimatizadas.

- Utilizar contenedores que pueden ser bandejas de polipropileno o plástico compuestas o no por alveolos y/o envases o macetas de plástico. *Nota:* Se recomienda no usar contenedores de barro para evitar la desecación rápida del sustrato.
- Clasificar las plantas de acuerdo con su tamaño para lograr uniformidad al momento de su plantación.
- Llenar los contenedores para la aclimatización con el sustrato.
- Colocar los contenedores en casas de cultivo con cobertor plástico y la regulación de la luz solar a un 80% a través, de malla de sombra de color negro.
- Regar el sustrato con agua corriente hasta que se encuentre bien humedecido.
- Colocar las plantas en el sustrato y asegurarse de que el sistema radical quede completamente cubierto (Figura 7 A).

Notas:

- En caso de que la aclimatización *ex vitro* de las plantas se realice en contenedores sin la



Figura 6. Materiales utilizados como sustrato para la aclimatización *ex vitro* de plantas *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. (A) fibra de coco triturada, (B) corteza de pino macho (*Pinus caribea* Morelet) triturada, (C) fragmentos de barro cocido, (D) mezcla homogénea de los materiales para realizar la plantación.



Figura 7. Plantas de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. obtenidas por propagación *in vitro* y aclimatizadas *ex vitro*. (A) plantas *in vitro* recién plantadas en bandejas de plástico, (B) Plantas *in vitro* recién plantadas en contenedores sin divisiones a una distancia de plantación aproximada de 6-7 cm, (C) plantas aclimatizadas a los seis meses de su plantación.

presencia de alvéolos la distancia de plantación debe ser de aproximadamente 6-7 cm para evitar que las raíces de las plantas se mezclen entre sí durante el crecimiento (Figura 7 B). Esto facilitará el trasplante hacia nuevos contenedores sin daño a las raíces, una vez que las plantas hayan crecido lo suficiente.

- El riego de las plantas recién aclimatizadas, debe efectuarse cada cuatro horas durante un minuto. De esta manera se evitará el encharcamiento de agua en los contenedores usados para la aclimatización, a la vez que se podrá mantener una elevada humedad relativa.

- La duración de esta fase es de aproximadamente seis meses. La supervivencia es de 90% en estas condiciones.

- Para alcanzar resultados óptimos durante la fase de aclimatización, debido a que esta especie es de lento crecimiento, las plantas deben ser fertilizadas regularmente. Se obtienen buenos resultados con la aplicación de FitoMas-E (Montano *et al.*, 2007), 6 ml l⁻¹, una vez cada 15 días a partir de los 15 posteriores a la plantación.

- Al final de la fase las plantas tendrán como mínimo dos pseudobulbos de una altura aproximada de entre 15-17 cm de longitud, medidos desde la base de la planta hasta el ápice de la última hoja completamente emitida. El aspecto de estas plantas puede apreciarse en la figura 7 C.

CONCLUSIONES

Con el empleo de la metodología descrita se pueden obtener volúmenes considerables de plantas de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. El

protocolo desarrollado puede ser utilizado en laboratorios comerciales, para satisfacer demandas existentes en el mercado de la orquídea. El protocolo permite además obtener plantas homogéneas en cuanto a tamaño, características morfológicas y calidad fitosanitaria; aspectos que contribuyen al éxito de su comercialización.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Gobierno de Santa Clara (Cuba) a través del proyecto de desarrollo local: Mejora genética y propagación *in vitro* de especies ornamentales de interés comercial, producción de plantas y flores.

Conflicto de interés

Los autores no declaran conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización LJMB y LGR; Conservación de datos LJMB; Análisis formal LJMB y LGR; Adquisición de fondos LGR y LJMB; Investigación LJMB, LGR, MO, YP, MMHP, YF, LR; Metodología LJMB y LGR; Escritura: Primera redacción LJMB, Escritura: Revisión y Edición LGR, LPP.

REFERENCIAS

Akarsh S, Prashith TR, Ranjitha MC, Vidya P, Firdos G F (2016) Inhibitory activity of some plants against *Colletotrichum capsici* and *Fusarium oxysporum* f. sp. zingiberi. Journal of Medicinal Plants Studies 4(4): 165-168

Basavaraj B, Nagesha N, Jadeyegowda M (2020) Molecular Characterization of

- Dendrobium* Orchid Species from Western Ghat Region of Karnataka using RAPD and SSR Markers. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 9(1): 2157-2169; doi: 10.20546/ijcmas.2020.901.246
- Da Silva JAT, Winarto B, Dobránszki J, Cardoso JC, Zeng S (2016) Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium in vitro* culture. Folia Horticulturae 28(1): 57-75
- Da Silva JAT, Hossain MM, Sharma M, Dobránszki J, Cardoso JC, Songjun (2017) Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. Horticultural Plant Journal 3(3): 110-124; doi: 10.1016/j.hpj.2017.07.009
- Ganapaty S, Ramaiah M, Yasaswini K, Nuthakki VK, Harikrishna RD (2013) Quantitative phytochemical estimation and evaluation of hepatoprotective activity of methanolic extract of *Dendrobium ovatum* (L.) Kraenzl whole plant against CCl₄ induced hepatotoxicity. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2(3): 113-118
- Ivakdalam LM, Pugesehan DJ (2016). Diversity of orchid species (*Orchidaceae*) in Angwarmase Nature Reserve, Regency of West Southeast Maluku. Jurnal Agroforestri 11(3): 161–168
- Montano R, Zuaznábar R, García A, Viñals M, Villar J (2007) FitoMas-E. Bionutriente Derivado de la Industria Azucarera. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar 41(3): 14-21
- Mukherjee S, Phatak D, Parikh J, Jagtap S, Shaikh S, Tupe R (2012) Antglycation and antioxidant activity of a rare medicinal orchid *Dendrobium aqueum* Lindl. Medicinal Chemistry & Drug Discovery 2(2): 17-29
- Setiari N, Purwantoro A, Moeljopawiro S, Semiarti E (2018) Micropropagation of *Dendrobium phalaenopsis* orchid through overexpression of embryo gene AtRKD4. AGRIVITA, Journal of Agricultural Science 40(2): 284-294; doi: 10.17503/agrivita.v40i2.1690
- Schelpe S, Stewart J (1990) *Dendrobiums*: an introduction to the species in cultivation. Orchid Sundries, Stour Provost
- Widiastoety D, Solvia N, Soedarjo M (2010) Potential of *Dendrobium* in increasing variety and quality of orchids. Jurnal Litbang Pertanian 29(3): 101–106
- Venturieri GA, Pickscius FJ (2013) Propagation of noble dendrobium (*Dendrobium nobile* Lindl.) by cutting. Acta Scientiarum Agronomy 35(4): 501-504

Recibido: 27-06-2021

Aceptado: 22-07-2021

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.