



**Antonio Siverio
Núñez*, Alba del
Rocío Hernández
Padilla, Miguel
Corbella Tena &
Eduardo Sobrino
Vesperinas**

Escuela Politécnica
Superior de Ingeniería
(Sección de Ingeniería
Agraria). Universidad
de La Laguna (ULL).
Islas Canarias.
*asiverio@ull.es

Figura 1. Variabilidad inducida por hibridación intraespecífica en el género *Phalaenopsis*. Original de M. Melchor.

Medios de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas de *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*) y su empleo en la inducción repetitiva de la embriogénesis de protocormos zigóticos

Se describe el procedimiento que se ha seguido para obtener de un modo sencillo, rápido y económico un número elevado de plántulas de *Phalaenopsis* que permita iniciar un cuidadoso trabajo de selección, a fin de obtener híbridos comerciales. Para ello, semillas extraídas de cápsulas verdes procedentes de la polinización manual de dos variedades comerciales de *Phalaenopsis* se sembraron *in vitro* en cinco medios de cultivo: P0931, P1056, P6668 y P6668 a la mitad de concentración. En la mayor parte de ellos las semillas germinaron satisfactoriamente y, en algunos casos, dieron lugar a protocormos que se seccionaron y cultivaron en nuevos medios: XE, P6793, XER y MS a mitad de concentración. Algunos de ellos fueron complementados puntualmente con determinados principios activos.

En cuanto a la germinación y en las condiciones experimentales utilizadas, el medio que se mostró más eficiente fue P6668, lográndose la germinación en todas las repeticiones a los 37 días. Una respuesta similar se obtuvo con P6668 a la mitad de concentración (P6668 [1/2]), aunque en este caso el período de germinación se prolongó hasta los 39 días. Así mismo, los resultados sugieren que la presencia de carbón activo en ciertos medios (P6668, P6668 [1/2] y P1056) tuvo un efecto muy favorable. En cuanto a la inducción embrionaria de protocormos zigóticos, los de mayor tamaño (diámetro) se obtuvieron en el medio P6793, mientras que la respuesta más uniforme (aunque con diámetros menores) se observó en MS a mitad de concentración suplementado con agua de coco, TDZ, peptona y mioinositol (MS modificado). A su vez, este medio fue el que se mostró más adecuado para favorecer la elongación y la morfogénesis de los protocormos.

PALABRAS CLAVE: Cultivo *in vitro*, micropropagación, orquídeas, *Phalaenopsis*, multiplicación masiva.

transferencia tecnológica

| ornamentales |

El género *Phalaenopsis* pertenece a la familia *Orquidaceae* y engloba a más de sesenta especies nativas de toda la región tropical de Asia (Tsai y col., 2012). Los trabajos de mejora vegetal en esta orquídea han empleado como parentales especies de *Phalaenopsis* originarias de distintos hábitats (ambientes secos, fríos o húmedos) (Christenson, 2001), obteniéndose híbridos con una elevada capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Esta plasticidad, junto a la belleza y duración de sus inflorescencias (Figura 1), ha potenciado ampliamente las posibilidades de *Phalaenopsis* en horticultura ornamental, siendo Taiwán uno de los mayores productores de este género, llegando a exportar en 2015 unos 50 millones de plantas (UNEP-WCMC, 2017). La importancia del género *Phalaenopsis* queda puesta de manifiesto en recientes números (octubre y noviembre 2017) que la American Orchid Society le dedica. Muestran información relevante sobre las especies más interesantes y de los híbridos desarrollados (Lin, 2017), así como de avances en hibridación (McClellan, 2017).

El cultivo de orquídeas y en particular las del género *Phalaenopsis* presenta, por consiguiente, interesantes posibilidades de desarrollo en España. Para ello resultaría conveniente impulsar la creación de viveros especializados en esta familia y con un adecuado nivel tecnológico, ya que presenta notables diferencias con respecto a otras plantas. En ellos se podría abordar la realización de programas de mejora genética utilizando técnicas de hibridación intra e interespecífica, junto con métodos de cultivo *in vitro* y de genética molecular.

El principal objetivo que se pretende en este trabajo es la transmisión de metodología que permita la germinación eficaz *in vitro* de semillas de *Phalaenopsis*, así como la micropropagación por embriogénesis repetitiva de protocormos.

Material y métodos

Las semillas de *Phalaenopsis* spp. utilizadas en este ensayo se obtuvieron de cápsulas verdes (Figura 2) procedentes de la polinización manual de dos híbridos comerciales.

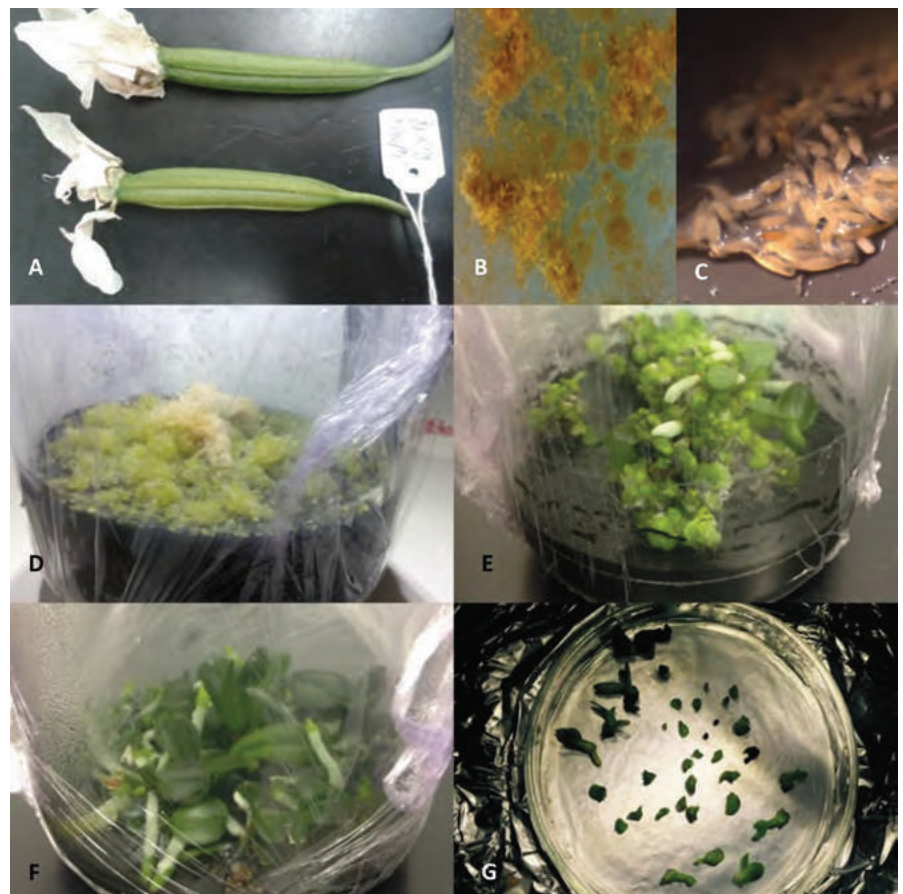


Figura 2. Obtención de plántulas de *Phalaenopsis* por cruzamiento y embriogénesis de protocormos. A. Cápsulas verdes recolectadas de *Phalaenopsis* procedentes de cruzamientos experimentales entre híbridos comerciales. B y C. Semillas de *Phalaenopsis* procedentes de la hibridación experimental. D. Protocormos. E. Inicio de la formación de plántulas a partir de protocormos. F. Plántulas obtenidas desde los protocormos. G. Fragmentación de protocormos zigóticos.

Los materiales empleados tanto en la fase de germinación como en la de cultivo fueron adecuadamente esterilizados, y las operaciones descritas realizadas bajo campana de flujo laminar para asegurar la mayor asepsia posible durante el procedimiento.

Las cápsulas se recolectaron a los cuatro meses de la polinización, se lavaron con una solución detergente (agua destilada y unas gotas de Tween-20) y se desinfectaron mediante inmersión con agitación en una disolución de lejía comercial (5% NaClO) durante 30 min. A continuación, se extrajeron de la disolución con ayuda de pinzas estériles y se dejaron escurrir colocándolas sobre una lámina de papel de aluminio previamente esterilizada. Finalmente, se humedecieron con etanol (96%) mediante un pulverizador manual y se flamearon. Este proceso se reiteró dos veces más

con el fin de evitar posibles contaminaciones y asegurar una correcta esterilización. Las cápsulas se trasladaron de forma individual a cajas Petri donde, con ayuda de un bisturí, se les practicaron varios cortes longitudinales que facilitaron su apertura y la extracción de las semillas.

Las semillas se sembraron en idénticas condiciones en 5 medios de cultivo P0931, P1056, P6668, P6668 [1/2] (Sigma) y Vacint & Went (Duchefa Biochemie B.V.) elaborados a partir sus preparados comerciales (Tabla 1).

La dosificación utilizada en cada caso fue la indicada por el fabricante excepto para P6668 [1/2], que fue exactamente la mitad (Tabla 2). Los diferentes medios se prepararon diluyendo la cantidad necesaria de producto comercial en el correspondiente volumen de agua destilada ($CE_{25^{\circ}C} < 6 \mu S \text{ cm}^{-1}$), en

/ El principal objetivo que se pretende en este trabajo es la transmisión de metodología que permita la germinación eficaz *in vitro* de semillas de *Phalaenopsis* y la inducción embrionaria de protocormos zigóticos /

caliente (sin llegar a la ebullición) y con agitación constante hasta la disolución. Una vez que la mezcla se enfrió lo suficiente se determinó el pH (PHM210 Radiometer) y se ajustó al valor óptimo mediante la adición de pequeños volúmenes de KOH 1M o de HCl 1M. A continuación, se tomaron veinte vasos de cultivo de 98.5 mm de altura y 200 mL de capacidad (V 0633 Sigma), se llenaron con el correspondiente medio de cultivo hasta una altura de 15 mm (cuatro frascos con cada medio), se taparon, se identificaron adecuadamente y se esterizaron en autoclave a 120°C durante 30 min. Finalmente, se sembraron e introdujeron en la cámara de crecimiento con fotoperiodo 16/8 h. La temperatura media durante el periodo de germinación fue de 23°C. Una vez que las semillas germinaron y dieron lugar a protocormos, se seleccionaron los frascos donde el porcentaje de germinación fue mayor, concretamente P6668 a la dosis estándar y P6668 a la mitad de concentración. Los recipientes se desinfectaron exteriormente con una disolución de hipoclorito de sodio (5%) y se destaparon en la cámara de flujo laminar para extraer los protocormos, que se colocaron en cajas Petri estériles. Los proto-

Componentes	Germinación				Multiplicación masiva			
	P0931	P1056	P6668	VW	XE	XER	MS [1/2]	P6793
Preparados comerciales (g L⁻¹)								
MS (Sigma)					2.183			
Macroelementos (mg L⁻¹)								
NH ₄ NO ₃	825	825	825		500	500		825
(NH ₄) ₂ SO ₄				500				
Ca ₃ (PO ₄) ₂				200				
CaCl ₂	166	166	166					166
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O					500	500		
MgSO ₄ x 7H ₂ O					122	122		
MgSO ₄	90.35	90.35	90.35	122				90.35
K ₂ HPO ₄					30	30		
KH ₂ PO ₄	85	85	85	250	250	250		85
KNO ₃	950	950	950	525	500	500		950
Microelementos (mg L⁻¹)								
Na ₂ EDTA	37.24	37.24	37.24	37	37.3	37.3		37.24
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.85	27.85	27.85	28	27.8	27.8		27.85
H ₃ BO ₃	3.1	3.1	3.1		0.5	0.5		3.1
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.013	0.013	0.013		0.025	0.025		0.0125
MnSO ₄ x 2 H ₂ O					3	3		
MnSO ₄ x H ₂ O	8.45	8.45	8.45	5.68				8.45
MnSO ₄ x 4H ₂ O					0.025	0.025		
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O								0.125
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.125	0.125	0.125					
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5.3	5.3	5.3		0.5	0.5		5.3
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.013	0.013	0.013					0.0125
Reguladores de crecimiento (mg L⁻¹)								
MES	1000	1000	1000					1000
Mioinositol	100	100	100				100	100
Ácido nicotínico	1	1	1					0.5
Ácido cítrico							200	
Adenina (mL L ⁻¹)							10	
Piridoxina	1	1	1					0.5
Tiamina	10	10	10					1
BA								2
NAA								0.5
KI	0.415	0.415	0.415					0.415
TDZ (mL L ⁻¹)						1	3	
Compuestos orgánicos (g L⁻¹)								
Fructosa					15	20		
Glucosa					15			
Peptona	2	2	2				2	2
Sucrosa	20	20	20	20				20
Sacarosa							45	
Agua de coco (mL L ⁻¹)					100		200	
Carbono activo		2	2					
Banana Powder		30						
Agente gelificante (g L⁻¹) y pH								
Agar	8	8	8	8	10	5	8	8
pH	5	5.2	5.4	5.7	5.5	5.5	5.8	5.4

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en el ensayo. 1.- Para la germinación de semillas de *Phalaenopsis*: P0931, P1056, P6668 son medios comerciales (Sigma) y VW es el medio (Vacín & Went, 1949) (Duchefa Biochemie). 2.- Para la multiplicación masiva de protocormos de *Phalaenopsis*: XE (Yam et al., 1991), P6793 (Sigma), XER (Ernst, 1994) y MS [1/2] (Murashige & Skoog, 1962).

cormos se seccionaron siguiendo el método de Arditti (2008) y se trasplantaron a tubos de cultivo de vidrio (18 cm de longitud, 4 cm de diámetro) en cuatro medios diferentes: XE (Yam y col., 1991), P6793 (Sigma), XER (Ernst, 1994) y MS [1/2] (Murashige & Skoog, 1962) complementados en algunos casos con otras sustancias (MS modificado), según se indica en la Tabla 1. Se plantaron cinco tubos de cada medio (cinco repeticiones), colocando cuatro segmentos de protocormo en cada tubo, que se

distribuyeron del modo más uniforme posible. Los tubos se cubrieron con papel de aluminio para protegerlos de la luz e inducir la morfogénesis y la formación callos, y se introdujeron en una cámara de cultivo. A los treinta días se retiró el papel de aluminio de los tubos, que se mantuvieron en la cámara hasta su evolución. La eficacia de los tratamientos aplicados (medios de cultivo) se valoró teniendo en consideración, entre otras variables, la formación de callo, el crecimiento en diámetro de los protocormos y

la morfogénesis. La existencia o no de diferencias significativas entre tratamientos para cada variable se comprobó mediante la prueba "t" de Student para muestras independientes. El estudio estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS ver 20.0 (IBM Corp., 2011).

Resultados y discusión

Desinfección de cápsulas

El método de desinfección de cápsulas utilizado en este ensayo (Arditti, 1967) fue muy eficaz, reduciendo el porcentaje de contaminación en la fase de enraizamiento a casi un 7%, que es inferior al obtenido por Feria y col. (2007) utilizando hipoclorito sódico al 1.5% durante 20 min.

Germinación *in vitro* de *Phalaenopsis*

Normalmente se considera que las semillas de *Phalaenopsis* spp. han germinado cuando la coloración de las mismas evoluciona de una tonalidad amarilla a verde. De acuerdo con esto, el tiempo de germinación más corto se obtuvo en el medio P6668, apreciándose el cambio de coloración cuando habían transcurrido 37 días desde la siembra, y el más largo, en el medio P0931, cumplidos sesenta días. En los medios P6668 [1/2], VW y P1056 el cambio de coloración se produjo a los 39, 40 y 43 días respectivamente (Tabla 3). De lo anterior se deduce que, a excepción de P0931, la influencia de los medios utilizados en este ensayo sobre el tiempo de germinación fue relativamente similar, y en el caso de P6668, la diferencia de concentración [1/1] o [1/2] tampoco lo modificó de un modo sustancial. En cualquiera de los casos, los tiempos de germinación se encuentran comprendidos entre los treinta y los 60 días, y por tanto se pueden considerar como normales. El mayor porcentaje de placas germinadas se obtuvo con el medio P6668, tanto a su concentración habitual [1/1], como a la mitad de concentración [1/2], alcanzándose en ambos el 100%.

Sin embargo, en P6668 [1/1] la proporción de semillas germinadas se valoró en un 90%, mientras que en P6668 [1/2] tan solo alcanzó el

	Medio de cultivo				
	P6668	P6668[1/2]	P1056	P0931	VW
Días desde la siembra	37	39	43	60	40
Germinación (%)*	100	100	60	40	20

* Porcentaje de medios de cultivo que germinaron.

Tabla 3. Días transcurridos desde la siembra hasta el final de la germinación (tres días consecutivos sin cambios apreciables de aspecto) y porcentaje de placas germinadas.

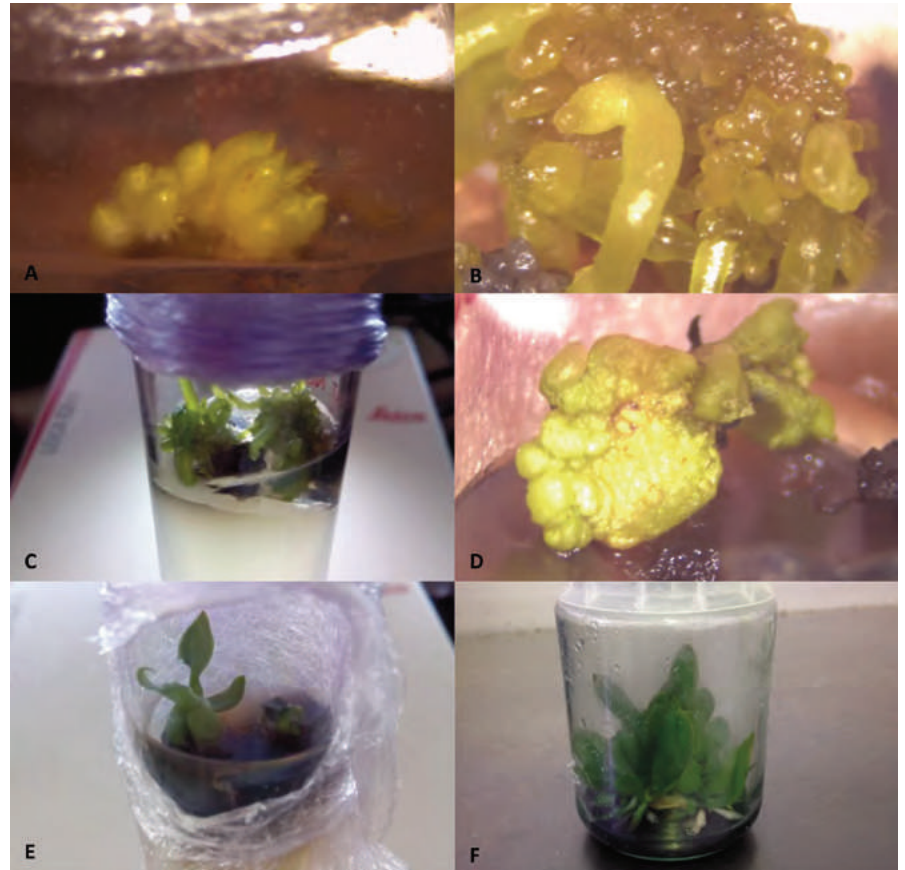


Figura 3. Protocormos en crecimiento después de 30 días en oscuridad. A. Detalle. B. Sobre el medio de cultivo. C. Embriogénesis de los protocormos divididos bajo iluminación a los 90 días. D. Callo. E. Plántulas procedentes del callo. F. Plántulas obtenidas por embriogénesis de protocormos zigóticos.

75%. En los demás medios, P1056, P0931 y VW, el porcentaje de placas germinadas fue del 60%, 40% y 20% respectivamente (Tabla 3). Los mejores resultados se obtuvieron con los medios que incluían carbón activo en su composición (P6668 y P1056, ver Tabla 1), lo que pone de manifiesto que su presencia contribuye a estimular y mejorar los procesos de desarrollo de protocormos y plántulas de diferentes orquídeas (Margara, 1988), especialmente de *Dendrobium* (Zhou, 1995). El carbón activo mejora la aireación del medio y favorece la retención de etileno

-que puede inhibir el crecimiento y la diferenciación-, de hidroximetilfurfural producido por deshidratación de la sacarosa durante el proceso de autoclavado, y de varios compuestos fenólicos y carboxílicos producidos por los tejidos (Arditti & Ernst, 1993). También tiene un efecto estabilizador del pH (Pedroza-Manrique, 2008).

Inducción a la morfogénesis

El contenido de los tubos de ensayo se evaluó a los noventa días de la siembra (Figura 3), habiendo perma-

necido durante los treinta primeros en condiciones de total oscuridad (Arditti, 2008).

La evolución de los protocormos fue diferente dependiendo del medio de cultivo, así, mientras que los sembrados en XER (Ernst, 1994) y XE (Yam y col., 1991) se tornaron de color oscuro y entraron en un periodo de latencia, los que crecieron en P6793 y MS modificado aumentaron de tamaño, alcanzando un diámetro medio de 4.75 mm en el primer caso, y de 1 mm en el segundo ($p < 0.05$).

Esta diferencia confirma que P6793 fue más adecuado para el crecimiento de los protocormos que MS modificado. En todos los tratamientos se observó la elongación de los protocormos y su diferenciación (morfogénesis), dando lugar frecuentemente a plántulas. El tamaño medio de los nó-

dulos fue de 8.3 mm en P6792 y de 2.4 mm en MS modificado ($p < 0.05$), mientras que la longitud media de las plántulas fue de 6.33 mm en P6793 y de 5.60 mm en MS modificado. En este caso, la diferencia resultó pequeña y no significativa ($p > 0.05$).

Conclusiones

En las condiciones experimentales en que se desarrolló el ensayo, el medio que resultó más favorable para la germinación fue P6668, lográndose una germinación adecuada en todas las repeticiones a los 37 días. Una respuesta similar se obtuvo con P6668 a la mitad de concentración, si bien, en algún caso, el tiempo de germinación se alargó hasta los 39 días. Los resultados comentados sugieren que la presencia de carbón activo en ciertos medios (P6668, P668[1/2] y

P1056) tuvo un efecto favorable.

En cuanto a la inducción embrionaria de protocormos zigóticos, los de mayor tamaño (diámetro) se obtuvieron en el medio P6793, mientras que la respuesta más uniforme (aunque con diámetros menores) se observó en MS modificado.

Por último, indicar que el medio que se mostró como más adecuado para favorecer la elongación y morfogénesis de los protocormos fue también MS modificado.

Agradecimientos: Los autores expresamos nuestro agradecimiento al Sr. M. Melchor por su contribución a este artículo con la imagen de la Figura 1.

Bibliografía

- ! Arditti, J. (1967). Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. *Botanical Review* 33, 1-97.
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of Orchids 2E 2Vs* (Malden, MA; Oxford: Wiley-Blackwell).
- Arditti, J., & Ernst, R. (1993). *Micropropagation of orchids* (New York: Wiley).
- Christenson, E.A. (2001). *Phalaenopsis: A Monograph* (Portland, Oregon: Timber Press).
- Ernst, R. (1994). Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 39, 273-275.
- Feria, M. de, Chávez, M., & Quiala, E. (2007). Establecimiento in vitro de *Phalaenopsis*. *Biotechnología Vegetal* 7.
- IBM Corp. (2011). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- Lin P. (2017). Novelty *Phalaenopsis*. *The Bulletin of the American Orchid Society. Supplement to orchids*. 86: 44-47.
- Margara, J. (1988). *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro: los meristemas y la organogénesis* (Mundi-Prensa Libros S.A., Madrid).
- McClellan, T. (2017). A novice's adventure in hybridizing. *The Bulletin of the American Orchid Society*. 86: 832-847.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Pedroza-Manrique, J.A. (2008). *Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones in vitro* (Universidad Distrital Francisco José de Caldas).
- Tsai, C.-C., Chiang, Y.-C., Lin, Y.-S., Liu, W.-L., & Chou, C.-H. (2012). Plastid trnL intron polymorphisms among *Phalaenopsis* species used for identifying the plastid genome type of *Phalaenopsis* hybrids. *Scientia Horticulturae* 142, 84-91.
- UNEP-WCMC (2017). *CITES trade statistics derived from the CITES Trade database*. Cambridge:UNEP World Conservation Monitoring Centre. Disponible en: <https://trade.cites.org>
- Vacin, E.F., & Went, F.W. (1949). Some pH Changes in Nutrient Solutions. *Botanical Gazette* 110, 605-613.
- Yam TW, Arditti J, & Weatherhead, MA. (1989). The use of darkening agents in seed germination and tissue culture media for orchids: a review. *Journal of the Orchid Society of India* 3, 35-39.
- Zhou, T.S. (1995). In vitro culture of *Doritaenopsis*: comparison between formation of the hyperhydric protocorm-like-body (PLB) and the normal PLB. *Plant Cell Rep.* 15, 181-185.