

**Establecimiento *in vitro* de explantes foliares
de tres genotipos de *Dendrobium* sp.**

Vivian Salas Valverde

**Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007**

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Establecimiento *in vitro* de explantes foliares de tres
genotipos de *Dendrobium* sp.**

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniera Agrónoma
en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Vivian Salas Valverde

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de éste trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Vivian Salas Valverde

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

**Establecimiento *in vitro* de explantes foliares de tres genotipos
de *Dendrobium* sp.**

Presentado por:

Vivian Salas Valverde

Aprobado:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesora principal

Miguel Vélez, Ph.D.
Director de la Carrera de Ciencia
y Producción Agropecuaria

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

José Linares, Ing. Agr.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia

DEDICATORIA

A Dios por guiar siempre mi camino.

A mis padres, Arnoldo y Flor, por ser el mejor ejemplo a seguir, por su confianza y amor incondicional y por apoyarme siempre en todas mis decisiones.

A mis hermanos, Laura y Luis por su amistad a pesar de todo, por su apoyo y por enseñarme a crecer.

AGRADECIMIENTOS

A Daniel, por enseñarme que las cosas realmente importantes en la vida, no cuestan nada. Por enseñarme a vivir en la EAP y ayudarme a continuar este camino.

A Ronald, por ser un hermano, y por que a pesar del tiempo y la distancia, siempre lo seguirá siendo.

A Julia, por su amistad, confianza y apoyo incondicional.

A la familia Gómez Pineda por brindarme una familia mientras estuve lejos de la mía.

A Sara Bonilla, por convivir conmigo durante estos cuatro años.

A Andrés Sarmiento, por tantos consejos, por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A Juan Pablo Chicaiza, por su amistad y apoyo incondicional.

A mis grandes amigos: Francisco X. Plaza, Lucía Orantes, Nelson Dávila, Carlos Molina, Kenia L. David, Karla W. Sánchez, José L. Salazar y Ana Lucía Murillo, por ser mis hermanos durante estos años y compartir conmigo siempre.

A Erika Salgado y Zoila Sandoval por su amistad y apoyo durante la elaboración de este trabajo.

A la Ing. Dinie Espinal de Rueda, por su confianza durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Alfredo Rueda y al Dr. Isidro Matamoros por su apoyo en la realización de este estudio.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A la República China-Taiwán por el patrocinio de parte de mis estudios en Zamorano.

RESUMEN

Salas Valverde, V. 2007. Establecimiento *in vitro* de explantes foliares de tres genotipos de *Dendrobium* sp. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. p. 12.

La reproducción natural de las orquídeas es poco eficiente ya que necesitan formar una simbiosis con un hongo micorriza para que la semilla pueda germinar. El cultivo *in vitro* hace que este proceso sea mucho más rápido y se obtengan mayores cantidades de plántulas. Los métodos convencionales de cultivo *in vitro* de orquídeas requieren el sacrificio de la planta madre o un brote en crecimiento, debido a que se utilizan yemas como material de propagación. Esta investigación nace del interés de los productores en clonar de manera rápida y eficiente los genotipos de *Dendrobium* sp. sin perder su valor genético. Se ensayó el cultivo de explantes foliares con la modificación de la concentración de los reguladores de crecimiento ANA (ácido naftalenacético) y BAP (6-bencilaminopurina), del medio Murashige & Skoog original. El objetivo fue determinar la combinación de hormonas más eficiente para la formación de tejido callogénico en tres genotipos de *Dendrobium* sp. (DA-845, TOM-101 y DA-790) utilizando 5 y 10 mg/L de cada una de las hormonas. Los genotipos DA-845 y DA-790 presentaron el mayor porcentaje de formación de tejido callogénico con 10 mg/L de ANA y 10 mg/L de BAP (7.4 y 4.6%, respectivamente). El genotipo TOM-101 respondió mejor al tratamiento de 10 mg/L ANA y 5 mg/L BAP para formación de tejido callogénico (5.1%). Se obtuvo un 86.7% de sobrevivencia total de los explantes. El genotipo DA-790 sobrevivió 72.7%. Para el genotipo TOM-101, el porcentaje total de sobrevivencia fue de 88.3%. El genotipo DA-845 presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia (97.9%).

Palabras clave: ANA, BAP, tejido callogénico.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autenticación	ii
Página de firmas	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
Resumen	vii
Contenido	viii
Índice de cuadros.....	ix
Índice de gráficos	x
Índice de anexos	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	4
CONCLUSIONES.....	9
RECOMENDACIONES.....	10
ANEXOS.....	11
LITERATURA CITADA.....	12

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Tratamientos analizados para la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Dendrobium</i> sp. Zamorano, Honduras, 2007	3
2. Formación de tejido callogénico en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Dendrobium</i> sp. según genotipo. El Zamorano, Honduras, 2007	5

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico	Página
1. Formación de tejido callogénico en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Dendrobium</i> sp. según genotipo y tratamiento. El Zamorano, Honduras, 2007	4
2. Mortalidad durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Dendrobium</i> sp. según semana de cultivo. El Zamorano, Honduras, 2007.....	5
3. Supervivencia en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Dendrobium</i> sp. según genotipo y tratamiento. El Zamorano, Honduras, 2007	6
4. Supervivencia en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Dendrobium</i> sp. según genotipo. El Zamorano, Honduras, 2007	7
5. Contaminación durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Dendrobium</i> sp. según semana. El Zamorano, Honduras, 2007.....	7

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Dendrobium</i> sp. El Zamorano, Honduras, 2007.....	12

INTRODUCCIÓN

El método de reproducción natural de las orquídeas es un proceso muy poco eficiente ya que las semillas cuentan con escasas reservas nutricionales para sobrevivir por si mismas (Alfaro Gómez 2004). Para que las semillas de orquídea puedan germinar en la naturaleza necesitan de la presencia de un hongo micorriza que provea los nutrientes a la semilla que estimulen la germinación. El cultivo *in vitro* hace que este proceso sea mucho más eficiente, cubriendo las necesidades de la semilla al brindarle un medio nutritivo para su crecimiento (Pierik 1990).

Los métodos convencionales de cultivo *in vitro* de orquídeas requieren el sacrificio de la planta madre o de un brote en crecimiento, debido a que se utilizan yemas como material de propagación. De igual manera, el uso de inflorescencias y otros órganos implica dañar o sacrificar partes de la planta (Arditti y Ernst 1993).

La idea del trabajo investigativo nace del interés de los productores en poder propagar, de manera rápida y eficiente los genotipos de *Dendrobium* sp. sin perder su valor genético. Esto se ensayó por medio de la clonación a través del cultivo de tejidos utilizando explantes foliares. En el estudio se propuso la modificación de la concentración de los reguladores de crecimiento ANA (ácido naftalenacético) y BAP (6- bencilaminopurina), del protocolo original Murashige & Skoog (MS) según Arditti y Ernst (1993) (Anexo 1). El objetivo fue determinar la concentración de hormonas más eficiente para la formación de tejido calogénico en cada genotipo de *Dendrobium* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo entre marzo y septiembre de 2007, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *in vitro* (LCTRIV) de Zamorano, ubicado a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Las orquídeas se ubicaron en un macrotúnel donde se sembraron individualmente en contenedores con pedazos de teja para dar soporte y estabilidad a las raíces. El cultivo se mantuvo en cuarentena durante cuatro semanas en marzo de 2007, haciendo aplicaciones semanales con Benlate^{®1} y Agrimicin^{®2}. Se regó dos veces al día con 210 mL por cada planta.

Entre enero y febrero de 2007 se fertirrigó con Peters 30-10-10^{®3} y a partir de marzo se comenzó con un plan de fertilización con 1.65 g MAP, 8.25 g Ca(NO₃)₂, 4.95 g SO₄ y 5.5 g MgSO₄ en cada jornada de riego. A partir del 18 de septiembre de 2006 se aumentaron las cantidades de fertilizantes en 50% de lo ya establecido.

Se trabajó con tres genotipos de *Dendrobium* sp.: DA-845, DA-790 y TOM-101, escogidos de manera aleatoria. Se eligieron 10 plantas madre de cada genotipo que presentaban hojas jóvenes y en buen estado fisiológico. Se cosecharon las hojas jóvenes fisiológicamente activas como material de propagación, ya que los explantes jóvenes responden mejor a los tratamientos (Hall 1999). Las hojas fueron cortadas en la base con bisturí y transportadas en bolsas plásticas al laboratorio en un lapso de una hora.

Para el cultivo se utilizó el medio MS suplementado con 4 ml/L de cisteína como antioxidante según protocolo propuesto por Reyes Padilla (2001). Se utilizaron tubos de ensayo con puentes de papel filtro de 1 × 2 cm y se dispensó 10 mL de solución nutritiva en cada uno. Los tubos fueron esterilizados a una temperatura de 121°C, con una presión de 15 psi durante 30 minutos.

Para la desinfección se lavaron las hojas con jabón líquido, luego se sumergieron en la solución de cloro (3.25% NaOCl) en un biker de 500 mL durante 20 min que se mantuvo en agitación constante. Luego se adicionó jabón líquido al biker y fueron puestas bajo el flujo de agua de la llave durante 15 min para eliminar residuos de NaOCl y jabón. El biker se llevó a la cámara de flujo laminar en donde se lavaron las hojas con agua destilada estéril cuatro veces. Luego se procedió a pasar las hojas a platos petri para ser manejadas dentro de la cámara.

¹ Benlate WP[®] (Benomil). Du Pont[®]. Argentina. 1 g/L.

² Agrimicin 100[®] (Estreptomycina y oxitetraciclina). Casa Comercial Agropecuaria S.A. de C.V. 1 g/L.

³ Peters 30-10-10[®] Produquímica Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, Brasil. 1.25 g/L

Todos los instrumentos utilizados se esterilizaron previamente, y antes de cada uso, se flamearon con un mechero y se enfriaron con agua destilada estéril. Los explantes se cortaron en tamaño de 1 × 1 cm con bisturí sobre papel previamente esterilizados. Los tubos sembrados se colocaron en el cuarto de crecimiento, a una temperatura promedio de 22°C, con 16 h de iluminación con lámparas fluorescentes Sylvania Daylight[©] F96T12/D/EX⁴. Permanecieron siete semanas para la toma de datos que se realizó semanalmente mediante observación de cada tubo de ensayo.

Los tratamientos fueron el resultado de la combinación de los dos reguladores de crecimiento (ANA y BAP) y las dos concentraciones (5 y 10 mg/L) (Cuadro 1). Las variables que se midieron fueron: Formación de tejido callogénico y sobrevivencia de los explantes. Para la evaluación de la formación de tejido callogénico se clasificaron los explantes en dos categorías: Presencia o ausencia de cristalización del tejido.

Cuadro 1. Tratamientos analizados para la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* sp. El Zamorano, Honduras, 2007.

Genotipo	Concentración (mg/L)	
	ANA	BAP
DA-845	5	5
DA-845	5	10
DA-845	10	5
DA-845	10	10
TOM-101	5	5
TOM-101	5	10
TOM-101	10	5
TOM-101	10	10
DA-790	5	5
DA-790	5	10
DA-790	10	5
DA-790	10	10

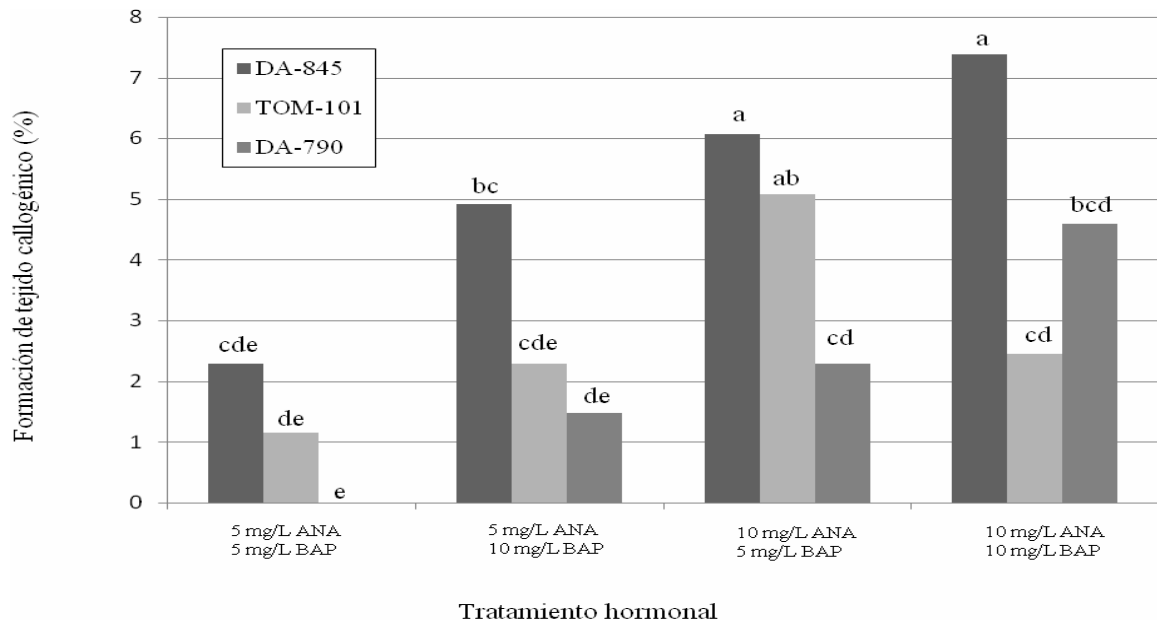
Los datos se analizaron con un diseño completamente al azar y con una separación de medias Duncan con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, utilizando el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS[®] 2005).

⁴ Osram Sylvania[©]. Danvers, Massachusetts, U.S.A.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la etapa de establecimiento *in vitro* de los tres genotipos de *Dendrobium* sp. se analizaron la formación de tejido callogénico y la sobrevivencia de los explantes durante siete semanas. En este tiempo, no hubo formación directa de brotes a partir de los explantes, únicamente se observó una cristalización de tejido que indica formación de tejido callogénico.

Formación de tejido callogénico. A partir de la quinta semana de sembrados los explantes se observó la cristalización del tejido. Independientemente del tratamiento al cual fue sometido, el genotipo DA-845 siempre presentó los mayores porcentajes de formación de tejido callogénico. Para los genotipos DA-845 y DA-790, los tratamientos con 10 mg/L de ANA y 10 mg/L de BAP presentaron los mayores porcentajes de formación de tejido callogénico (7.4% y 4.6%, respectivamente). Para el genotipo TOM-101 el tratamiento con 10 mg/L de ANA y 5 mg/L de BAP presentó el mayor porcentaje de formación de tejido callogénico (5.1%) (Gráfico 1.)



a,b,c, d,e Porcentajes con igual letra no difieren entre sí ($P < 0.05$).

Gráfico 1. Formación de tejido callogénico en la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* sp. según genotipo y tratamiento. El Zamorano, Honduras, 2007.

El genotipo influencia en la formación de tejido callogénico (FTC), independientemente de la concentración de ANA y BAP aplicadas. El genotipo DA-845 mostró en todos los tratamientos la mayor respuesta ($P < 0.05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de formación de tejido callogénico en la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* sp. según genotipo. El Zamorano, Honduras, 2007.

Genotipo	Formación de tejido callogénico
DA-845	50.8 ^a
TOM-101	25.0 ^b
DA-790	24.2 ^b

a,b Porcentajes con igual letra no difieren entre sí ($P < 0.05$).

Sobrevivencia. A partir de la semana cuatro se presentó mortalidad de algunos explantes, probablemente debida a deficiencias nutricionales. La mortalidad fue aumentando semana a semana hasta llegar a 13.3% en la séptima semana (Gráfico 2). La mortalidad se presentó como una necrotización del tejido celular, empezando desde el centro del explante hacia los extremos.

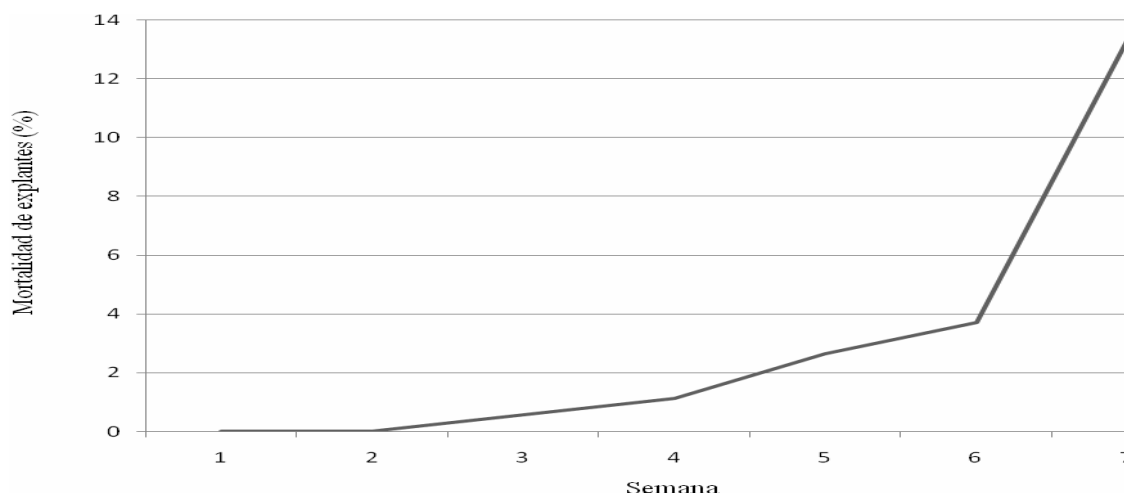
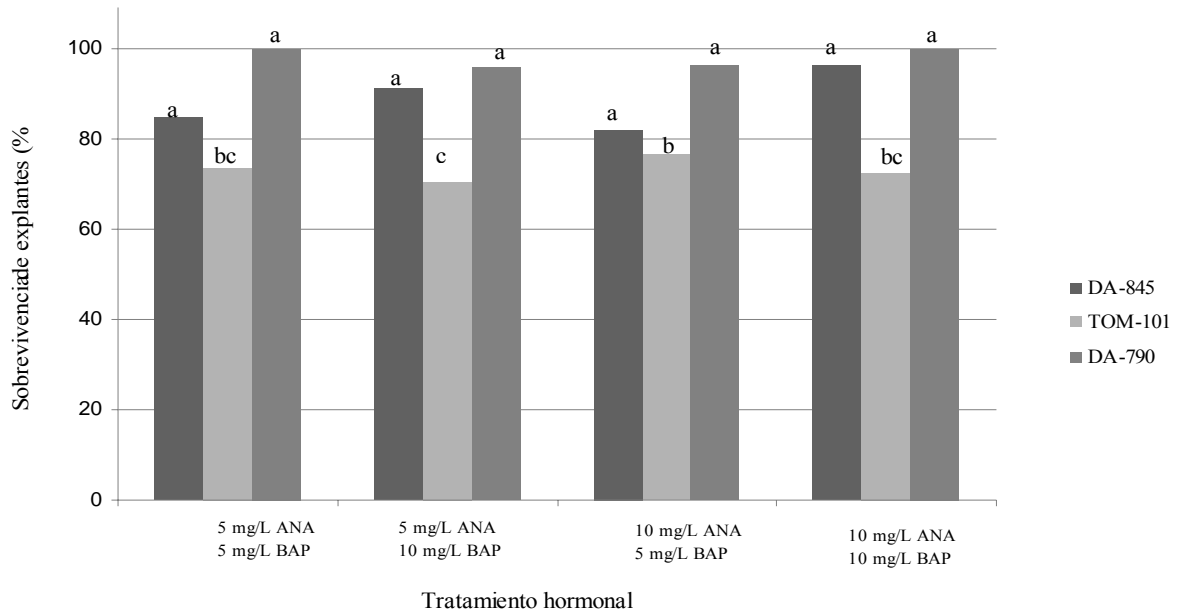


Gráfico 2. Mortalidad durante la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* sp. según semana de cultivo. El Zamorano, Honduras, 2007.

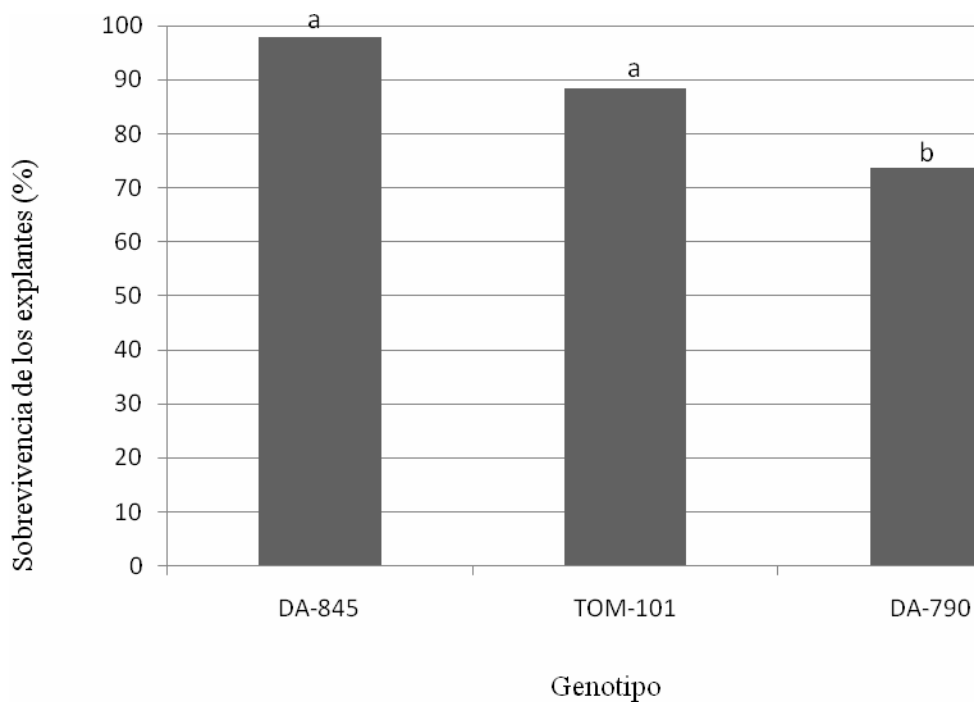
Para el genotipo DA-845 el mayor porcentaje de sobrevivencia (96.2%) se encontró con el tratamiento de 10 mg/L de ANA y 10 mg/L de BAP. Para el genotipo TOM-101 el mayor porcentaje de sobrevivencia fue de 76.2% obtenido al ser tratado con 10 mg/L de ANA y 5 mg/L de BAP. Para el genotipo DA-790 el mayor porcentaje de sobrevivencia (100%) presentó con el tratamiento de 5 mg/L de ANA y 5 mg/L de BAP al igual que al ser tratado con 10 mg/L de ANA y 10 mg/L de BAP (Gráfico 3).



a,b,c Porcentajes con igual letra no difieren entre sí ($P < 0.05$).

Gráfico 3. Sobrevivencia en la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* sp. según genotipo y tratamiento. El Zamorano, Honduras, 2007.

Al comparar los genotipos, independientemente de las concentraciones de hormonas se encontró que los genotipos DA-845 y TOM-101 presentaron mayores porcentajes de sobrevivencia que el genotipo DA-790 (Gráfico 4).



a,b Porcentajes con igual letra no difieren entre sí ($P < 0.05$).

Gráfico 4. Sobrevivencia en la etapa de establecimiento de explantes foliares de *Dendrobium* sp. según genotipo. El Zamorano, Honduras, 2007.

Contaminación. Se presentó un mayor porcentaje de contaminación en la segunda semana. A partir de la tercera semana los porcentajes de contaminación fueron bajos (Gráfico 5).

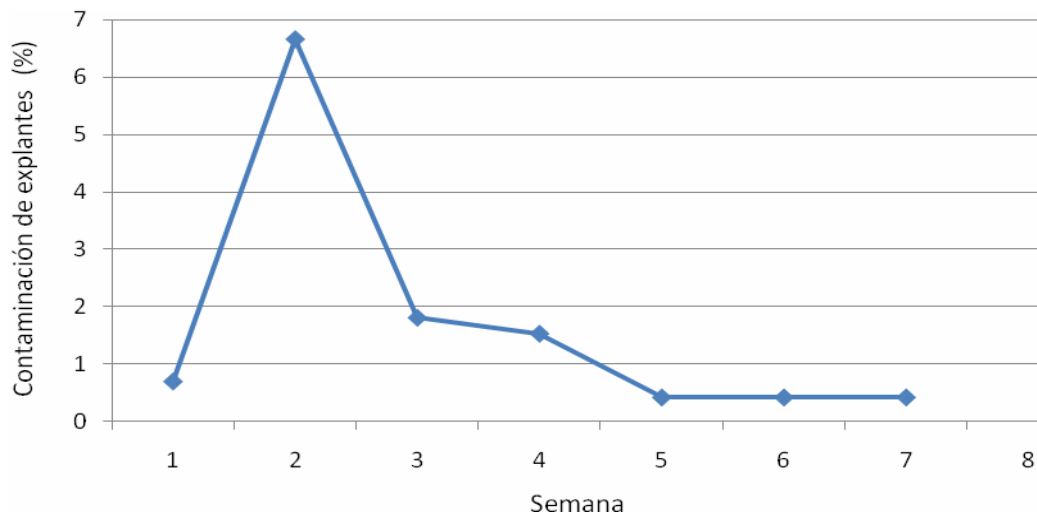


Gráfico 5. Contaminación durante la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* sp. según semana. El Zamorano, Honduras, 2007.

Durante todo el experimento se presentó un 12.9% de contaminación que se debió en su totalidad a hongos, lo que se atribuye a errores en la manipulación del material vegetal. De los tres genotipos, el TOM-101 presentó el mayor porcentaje de contaminación (5.7%) y el DA-790 presentó el menor porcentaje de contaminación (3.5%).

CONCLUSIONES

- Los genotipos DA-845 y DA-790, tuvieron la mejor formación de tejido callogénico con el tratamiento de 10 mg/L de ANA y 10 mg/L de BAP.
- El genotipo TOM-101 tuvo una mejor formación de tejido callogénico al ser tratado con 10 y 5 mg/L de ANA y BAP respectivamente.
- Los genotipos DA-845 y DA-790 presentaron mayor sobrevivencia de los explantes independientemente del tratamiento al que fueron sometidos.

RECOMENDACIONES

- Utilizar medio solidificado para que el explante esté en su totalidad en contacto directo con los nutrientes.
- Si se utiliza medio líquido, cortar explantes de menor tamaño para que la absorción de nutrientes sea uniforme.
- Extender la toma de datos ya que la literatura estipula un rango de ocho semanas para observar un crecimiento de tejido callogénico y formación de brotes a partir del explante en la reproducción *in vitro* de *Dendrobium* sp.
- Continuar las investigaciones con los seis genotipos restantes que se encuentran en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) utilizado para el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Dendrobium* sp. El Zamorano, Honduras, 2007.

Componentes	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
KH ₂ PO ₄	170.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.0
Micronutrientes	
KI	0.830
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600
Na ₂ MoO ₄	0.250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FeNa EDTA	37.300
Componentes Orgánicos	
Mionositol	100.0
Tiamina	1.0
Acido Cítrico	100.0
Agua de Coco (mL/L)	10.0
Caseína hidrolizada	100.0
Sacarosa	30,000.0
Ph	5.7

Fuente: Arditti y Ernst (1993).

LITERATURA CITADA

Alfaro Gómez, R.N. 2004. Estudio de Factibilidad para el Establecimiento de un Laboratorio de Producción *in vitro* y Comercialización de Orquídeas en San Salvador, El Salvador. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Hn. Escuela Agrícola Panamericana. p. 69.

Arditti, J. y Ernst, R. 1993. Micropropagation of Orchids. New York, USA. John Wiley & Sons, Inc. p. 289.

Hall, R. D. 1999. Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols. Vol. CXI. New Jersey, USA. p. 421.

Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Trad. Ayerbe, L. Madrid, España. Edit. Mundi Prensa. p. 326.

Reyes Padilla, B.A. 2001. Uso de L-cisteína y ácido ascórbico para el control de la oxidación durante el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de ápices meristemáticos de tres cultivares de Plátano (*Musa* spp.) incubados bajo condiciones de luz y oscuridad. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Hn. Escuela Agrícola Panamericana. p. 52.