

Micropropagación de *Phalaenopsis amabilis* (Linnaeus) Blume variedad White Grull

CÉSAR VENCES CONTRERAS Y HÉCTOR GONZÁLEZ ROSAS*

Micropropagation of Phalaenopsis amabilis (Linnaeus) Blume from variety White Grull

Abstract. *Phalaenopsis amabilis* (Linnaeus) Blume from variety White Grull was asexually propagated in vitro using, as explants, floral stem buds obtained from adult plants, leaf segments, vegetative axillar bud, root apex and protocorm of plants produced in vitro. Those explants were cultured and multiplied in the Murashige and Skoog medium (1962) supplemented with N⁶- benziladenine (BA). The production of 1.37 shoots per floral bud occurred within 55 days of culture in a medium supplemented with 4.0 mgL⁻¹ of BA. The medium with 12.5 mgL⁻¹ of BA and 9.0 mgL⁻¹ of adenine sulfate was the most effective in the culture of leaf segments with the formation of 15 protocorm-like bodies after 120 days of culture. The production of 1.75 shoots per axillar bud happened 60 days after in an medium supplemented with 1.5 mgL⁻¹ of BA. The best medium for protocorms regeneration (32.0) and a subsequent plantule formation (14.87) at 40 days after the culture from protocormes sowing was that with 4.5 mgL⁻¹ of BA. In the culture of root apex, in the studies carried out, there was no response in regard to the protocormes or plantules production.

Introducción

De todos los géneros que comprenden a las orquídeas, posiblemente la llamada orquídea “mariposa” (nombre común para el género *Phalaenopsis* Bl.) es una de las más hermosas y populares, por lo que en los últimos años se ha incrementado rápidamente su demanda como planta de maceta y flor de corte. La mayor demanda de esta flor es en su presentación como flor exótica, cortada entre septiembre y diciembre y durante las fechas próximas al “día de la Madre” (a principios de mayo). También es muy solicitada para ramos nupciales y otros arreglos florales. Des-

afortunadamente, las orquídeas son plantas de crecimiento muy lento y presentan gran dificultad de propagación por métodos convencionales. Se han hecho muchos intentos para desarrollar métodos rápidos y/o simples de propagación clonal de estas plantas, pero el éxito ha sido poco y las técnicas desarrolladas no han encontrado una aplicación general. Es así que en este trabajo se intentó inducir la formación de plántulas y protocormos a partir de la siembra de yema floral de plantas adultas. La hoja, la yema axilar vegetativa, el ápice de raíz y el protocormo de plantas generadas *in vitro* se han integrado con la finalidad de estructurar una metodología que permita la propagación masiva de la especie *Phalaenopsis amabilis* (Linnaeus) Blume variedad White Grull.



I. Materiales y métodos

Material vegetativo

Para la realización del presente estudio se emplearon tallos florales de *Phalaenopsis amabilis* (Linnaeus) Blume variedad White Grull, de plantas maduras de cuatro años de edad en etapa de floración.

Aislamiento y corte de tejidos

El proceso de aislamiento y corte de tejidos se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico e instrumental de disección, bajo condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar filtrado.

* Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEM. Tel. (729) 6 55 29 y 6 55 31. Correo electrónico: cvc@coatepec.uaemex.mx

Medio de cultivo

Para la preparación de los diferentes medios de cultivo se tomaron como base las sales minerales del medio de Murashige y Skoog (1962) y un pH = 5.7 ± 0.1 .

Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales a que se sometieron los diferentes tratamientos después de la siembra del explante o inóculo, fueron: una temperatura constante de 22-25 °C, 2,000 lux de intensidad lumínica y 16 hr luz de fotoperiodo.

Serie de experimentos

El trabajo estuvo constituido por cinco experimentos establecidos en forma separada.

Experimento 1. Siembra de yema floral

Como explante inicial se utilizaron yemas extraídas de la porción media a la base de los tallos florales, los cuales se seccionaron en cada entrenudo, se removieron las escamas que cubrían las yemas localizadas en los nudos y posteriormente se colocaron en un vaso de precipitado con agua jabonosa durante tres minutos, se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante un minuto, en hipoclorito de sodio (6%) por ocho minutos y finalmente se enjuagaron con agua destilada esterilizada tres veces, dentro de la cámara de flujo laminar.

Se evaluaron cinco concentraciones de N⁶-benciladenina (BA) (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0 mgL⁻¹), con la finalidad de inducir a la producción de brotes vegetativos. La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye (25 x 200 mm) que contenía 10 ml de medio de cultivo con un explante. Se realizaron de ocho a diez repeticiones por tratamiento.

Experimento 2. Siembra de hoja

Una vez generadas las plántulas a partir de la yema floral, se extrajeron sus hojas y se seccionaron en porciones de 6-8 x 6-8 mm, colocándolas en los diferentes tratamientos con la superficie del envés en contacto con el medio de cultivo. El medio básico fue suplementado con ácido naftalenacético (ANA) a 1.0 mgL⁻¹. Se evaluaron 25 tratamientos producto de la combinación de cinco concentraciones de BA (5.0, 7.5, 10.0, 12.5 y 15.0 mgL⁻¹) y cinco concentraciones de sulfato de adenina (SA) (8.0, 9.0, 10.0, 11.0 y 12.0 mgL⁻¹) con la finalidad de inducir la formación de protocormos. La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye con una sección de hoja utilizada como explante. Se verificaron cinco repeticiones por tratamiento.

Experimento 3. Siembra de yema axilar vegetativa

De los mismos brotes generados en el experimento 1, se

aislaron secciones de tallo con nudo y yema axilar para establecer el experimento 3. Se evaluaron cinco concentraciones de BA (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mgL⁻¹) con la finalidad de regenerar plántulas. La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye con una sección de tallo con yema axilar vegetativa empleada como explante. Se llevaron a cabo ocho repeticiones por tratamiento.

Experimento 4. Siembra de protocormo

Los protocormos que se generaron a partir de la siembra de hoja se aislaron y se sembraron en diferentes tratamientos. Se empleó el mismo medio básico, a excepción del agar, para de esta forma hacer líquido el medio nutritivo. Se evaluaron ocho concentraciones de BA (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 mgL⁻¹) con el objeto de regenerar una mayor cantidad de protocormos. La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye con un protocormo empleado como explante. Se realizaron ocho repeticiones por tratamiento. Los cultivos se sometieron a las mismas condiciones ambientales que los experimentos anteriores, pero con una agitación constante de 90 rpm para favorecer la oxigenación del explante.

Experimento 5. Siembra de ápice de raíz

De las raíces generadas por las plántulas en los experimentos 1 y 3 se seccionaron puntas de 5 mm de longitud, las cuales sirvieron como explante para evaluar nueve tratamientos producto de la combinación de tres concentraciones de ANA (10, 20 y 30 mgL⁻¹) y tres de BA (40, 50 y 60 mgL⁻¹). La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye con una porción de raíz empleada como explante, con diez repeticiones por tratamiento.

II. Resultados y discusión

Siembra de yema floral

Las investigaciones llevadas a cabo sobre el cultivo *in vitro* de estas yemas indican tiempos de hasta cinco meses de cultivo para la obtención de plántulas. Con base en los resultados aquí obtenidos, se lograron acortar los tiempos hasta 55 días para la variedad White Grull.

Por otro lado, otros autores mencionan altos porcentajes de contaminación, problema que no se presentó en nuestro experimento, debido probablemente al tamaño del explante que se manejó (yema floral y sección de tallo de 2 mm), que comparado con los tamaños de hasta 4 cm manejados por tales autores es mucho menor. Dicha medida evitó el acarreo de agentes contaminantes.

En cuanto al porcentaje de oxidación, los tratamientos más afectados fueron los suplementados con 5.5 y 6.0 mgL⁻¹ de BA con 50 y 55% respectivamente, debido a que existió una ligera tendencia hacia el incremento de la oxidación

del explante a medida que la concentración de BA se aumentó después de los 5.0 mgL⁻¹ (ver figura 1). De acuerdo con los informes de Arditti *et al.* (1977), se han obtenido porcentajes de oxidación de hasta 100% para el mismo explante.

El mejor tratamiento resultó ser el suplementado con 4.0 mgL⁻¹ de BA, que tuvo un tiempo promedio de 10.62 días al inicio de la brotación; una producción de 1.37 brotes por explante sembrado; con una longitud de 32.31 mm y 3.25 hojas con una longitud de 13.21 mm a los 55 días que duró el experimento (ver cuadro 1).

Siembra de hoja

Sólo unas cuantas especies o híbridos de orquídeas se han estudiado para analizar su potencial regenerativo a partir de segmentos de hoja. El primer signo de actividad celular en los segmentos de hoja cultivados fue la aparición de minúsculas protuberancias, que se desarrollaron rápidamente en protocormos. Estos protocormos generados pueden dejarse para el desarrollo de plántulas, o bien someterse a un medio líquido para incrementar su número, como se realizó en este trabajo. Los tratamientos del T-12 al T-25 se oxidaron por completo antes del término del experimento. De los restantes, el más afectado fue el T-3 con un 40% (ver cuadro 2).

Para el porcentaje de oxidación, en los tratamientos suplementados con 5.0, 7.5 y 15.0 mgL⁻¹ de BA existe una marcada tendencia a la oxidación del tejido a medida que se incrementa la concentración de SA. Ésta resultó crítica o total, sobre todo a concentraciones de 11.0 y 12.0 mgL⁻¹. Para las concentraciones de 10.0 y 12.5 mgL⁻¹ de BA no existe esta tendencia tan marcada, pero sí persiste la oxidación completa del tejido a concentraciones de 10.0, 11.0 y 12.0 mgL⁻¹ de SA.

El tratamiento con 10 mgL⁻¹ de BA y 8.0 mgL⁻¹ de SA obtuvo los mejores promedios en cuanto a tiempo de inicio de brotación (6.67 días), pero el suplementado con 12.5 mgL⁻¹ de BA y 9.0 mgL⁻¹ de SA fue el que alcanzó la mayor producción de protocormos (15 por sección de hoja) a los 120 días de cultivo (ver cuadro 3).

Siembra de yema axilar vegetativa

Para la producción de brotes en la siembra de yema axilar vegetativa, el medio de cultivo adicionado con 1.5 mgL⁻¹ de BA obtuvo promedios de 1.75 brotes por explante sembrado, 3.75 hojas por brote y 6.25 por explante, 25.05 mm en la longitud de las hojas por explante y 4.5 raíces por brote, por ello se consideraría el mejor para la siembra de este explante a los 60 días después de la siembra (ver cuadro 4).

Siembra de protocormo

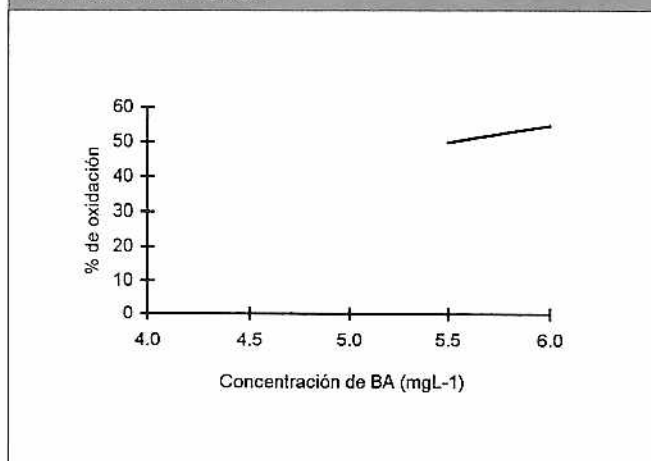
En cuanto a la siembra de protocormos, el tratamiento

con 4.5 mgL⁻¹ de BA fue de los que obtuvo mayores promedios en cuanto al número de plántulas (14.87), número de protocormos (32.0), número de hojas por plántula (2.39) y longitud de plántulas (10.76). Finalmente, para la producción de raíces, los tratamientos con 1.0, 1.5 y 2.0 mgL⁻¹ de BA alcanzaron los mejores promedios con 1.25, 0.5 y 1.0 raíces por protocormo sembrado a los 40 días de cultivo (ver cuadro 5).

Siembra de ápice de raíz

La respuesta que presentaron los cultivos de punta de raíz para todos los tratamientos aquí probados fue de un incremento en longitud y diámetro de los explantes hasta los 120 días que duró el cultivo, sin la producción de plántulas o protocormos, como ha sido apuntado por varios autores; esto último no fue significativo para el presente estudio, debido a que el objetivo inicial era la producción de protocormos o plántulas, pero creemos conveniente re-

FIGURA 1. EFECTO DE CINCO CONCENTRACIONES DE BA SOBRE EL PORCENTAJE DE OXIDACIÓN EN LA SIEMBRA DE YEMA FLORAL *IN VITRO* DE *PHALAENOPSIS AMABILIS* VARIEDAD WHITE GRULL



CUADRO 1

VALORES MEDIOS DE RESPUESTA AL EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BA Y SU COMPARACION DE MEDIAS POR EL METODO DMS (P<0.01) DE CINCO VARIABLES DE ESTUDIO EN LA SIEMBRA DE YEMA FLORAL *IN VITRO* DE *PHALAENOPSIS AMABILIS* VARIEDAD WHITE GRULL

TRAT. BA (mgL ⁻¹)	T.I.B.	N.B.	L.B.	N.H.B.	L.H.B.
VALOR MEDIO					
4.0	10.62 _b	1.37 _a	32.31 _a	3.25 _a	13.21 _a
4.5	29.71 _{bc}	1.28 _a	14.25 _b	1.76 _c	7.43 _{ab}
5.0	39.37 _{ab}	1.37 _a	12.37 _b	1.79 _b	5.98 _b
5.5	13.50 _{cd}	1.00 _a	8.50 _b	1.00 _b	6.50 _b
6.0	50.00 _a	1.25 _a	6.25 _b	1.00 _e	4.62 _b

MEDIAS CON LA MISMA LETRA NO DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE.
 T.I.B. = TIEMPO DE INICIO DE BROTAÇÃO (EN DÍAS).
 N.B. = NÚMERO DE BROTES; L.B. = LONGITUD DE BROTES (EN MM).
 N.H.B. = NÚMERO DE HOJAS POR BROTE.
 L.H.B. = LONGITUD DE HOJAS POR BROTE (EN MM).

CUADRO 2

VALORES MEDIOS DE RESPUESTA AL EFECTO DE 25 TRATAMIENTOS DE TRES VARIABLES DE ESTUDIO EN LA SIEMBRA DE HOJA *IN VITRO* DE *PHALAEOPSIS AMABILIS* VARIEDAD WHITE GRULL

TRATAMIENTO	(MGL ⁻¹)		% DE OXIDACIÓN	N.P.	T.I.B.
	BA	SA			
T-1	5.0	8.0	0	2.00	40.00
T-6		9.0	0	6.00	48.00
T-11		10.0	20	4.00	46.20
T-16		11.0	100	0.00	-
T-21		12.0	100	0.00	-
T-2	7.5	8.0	20	1.75	22.50
T-7		9.0	20	7.50	22.50
T-12		10.0	100	1.00	-
T-17		11.0	100	0.00	-
T-22		12.0	100	0.00	-
T-3	10.0	8.0	40	1.67	6.67
T-8		9.0	0	8.20	39.00
T-13		10.0	100	0.00	-
T-18		11.0	100	0.00	-
T-23		12.0	100	0.00	-
T-4	12.5	8.0	20	2.20	48.75
T-9		9.0	0	15.00	35.00
T-14		10.0	100	0.00	-
T-19		11.0	100	0.00	-
T-24		12.0	100	0.00	-
T-5	15.0	8.0	0	11.00	38.00
T-10		9.0	20	5.50	35.00
T-15		10.0	100	0.00	-
T-20		11.0	100	0.00	-
T-25		12.0	100	0.00	-

N.P. = NÚMERO DE PROTOCORMOS.

T.I.B. = TIEMPO DE INICIO DE BROTAÇÃO (EN DÍAS).

CUADRO 3

VALORES MEDIOS DE RESPUESTA AL EFECTO DE ONCE TRATAMIENTOS Y SU COMPARACIÓN DE MEDIAS POR EL METODO DMS (P<0.01) DE DOS VARIABLES DE ESTUDIO EN LA SIEMBRA DE HOJA *IN VITRO* DE *PHALAEOPSIS AMABILIS* VARIEDAD WHITE GRULL

TRATAMIENTO (MGL ⁻¹)	TRATAMIENTO		T.I.B. VALOR MEDIO	N.P.
	SA	BA		
T-1	8.0	5.0	40.00 _{ABCD}	2.00 _f
T-2		7.5	22.50 _e	1.75 _f
T-3		10.0	6.67 _f	1.67 _f
T-4		12.5	48.75 _a	2.25 _{ef}
T-5		15.0	38.00 _{cd}	11.00 _b
T-6	9.0	5.0	48.00 _{ab}	6.00 _{cd}
T-7		7.5	22.50 _e	7.50 _c
T-8		10.0	39.00 _{bcd}	8.20 _{bc}
T-9		12.5	35.00 _b	15.00 _a
T-10		15.0	35.00 _b	5.50 _{cde}
T-11	10.0	5.0	46.25 _{abc}	4.00 _{def}

MEDIAS CON LA MISMA LETRA NO DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE

T.I.B.= TIEMPO DE INICIO DE BROTAÇÃO (EN DÍAS)

N.P.= NÚMERO DE PROTOCORMOS

CUADRO 4

VALORES MEDIOS DE RESPUESTA AL EFECTO DE CINCO CONCENTRACIONES DE BA Y SU COMPARACIÓN DE MEDIAS POR EL METODO DMS (P<0.01) DE CINCO VARIABLES DE ESTUDIO EN LA SIEMBRA DE YEMA AXILAR VEGETATIVA *IN VITRO* DE *PHALAEOPSIS AMABILIS* VARIEDAD WHITE GRULL

TRAT. BA (MGL ⁻¹)	N.B.	N.H.B.	N.H.E.	L.H.E.	N.R.B.
0.5	1.50 _A	3.21 _{AB}	4.62 _A	19.56 _{AB}	1.75 _B
1.0	2.00 _A	3.06 _{AB}	6.12 _A	22.90 _{AB}	2.62 _{AB}
1.5	1.75 _A	3.75 _A	6.25 _A	25.05 _{AB}	4.50 _A
2.0	1.75 _A	2.32 _B	3.50 _A	29.09 _A	3.25 _{AB}
2.5	1.37 _A	2.12 _B	2.87 _A	14.21 _B	2.75 _{AB}

MEDIAS CON LA MISMA LETRA NO DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE.

N.B. = NÚMERO DE BROTES.

N.H.B. = NÚMERO DE HOJAS POR BROTE.

N.H.E. = NÚMERO DE HOJAS POR EXPLANTE.

L.H.E. = LONGITUD DE HOJAS POR EXPLANTE (EN MM).

N.R.B. = NÚMERO DE RAÍCES POR BROTE.

CUADRO 5

VALORES MEDIOS DE RESPUESTA AL EFECTO DE OCHO CONCENTRACIONES DE BA Y SU COMPARACIÓN DE MEDIAS POR EL METODO DMS (P<0.01) DE CINCO VARIABLES DE ESTUDIO EN LA SIEMBRA DE PROTOCORMO *IN VITRO* DE *PHALAEOPSIS AMABILIS* VARIEDAD WHITE GRULL

TRAT. BA (MGL ⁻¹)	N.PR.	N.PL.	L.PL.	N.H.PL.	N.R.PL.
1.0	30.00 _{AB}	0.50 _e	15.25 _A	2.75 _{AB}	1.25 _A
1.5	17.50 _e	3.75 _b	8.39 _B	2.09 _B	0.50 _{ABC}
2.0	5.75 _f	3.50 _{DE}	15.91 _A	3.94 _A	1.00 _{AB}
2.5	17.75 _{DE}	2.37 _{DE}	7.78 _B	2.00 _B	0.00 _C
3.0	15.75 _E	4.75 _{CD}	8.40 _B	1.99 _B	0.25 _{BC}
3.5	26.25 _{BC}	10.75 _B	7.63 _B	1.75 _B	0.00 _C
4.0	22.00 _{CD}	7.25 _C	7.59 _B	2.28 _{AB}	0.00 _C
4.5	32.00 _A	14.87 _A	10.76 _{AB}	2.39 _{AB}	0.20 _{BC}

MEDIAS CON LA MISMA LETRA NO DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE.

N.PR. = NÚMERO DE PROTOCORMOS.

N.PL. = NÚMERO DE PLÁNTULAS.

L.PL. = LONGITUD DE PLÁNTULAS (EN MM).

N.H.PL. = NÚMERO DE HOJAS POR PLÁNTULA.

N.R.PL. = NÚMERO DE RAÍCES POR PLÁNTULA.

portarlo para ser tomado en cuenta para posibles trabajos que se realicen con la misma especie.

Adaptación *in situ* de las plantas generadas *in vitro*

Se logró la adaptación de las plantas obtenidas al final del estudio con cuatro riegos diarios basados en niebla, con una periodicidad de 15 minutos cada uno, en un lapso de 25 días. Los brotes fueron sembrados en charolas con agrolita como sustrato y presentaron un porcentaje de adaptación de 98%.

Conclusiones

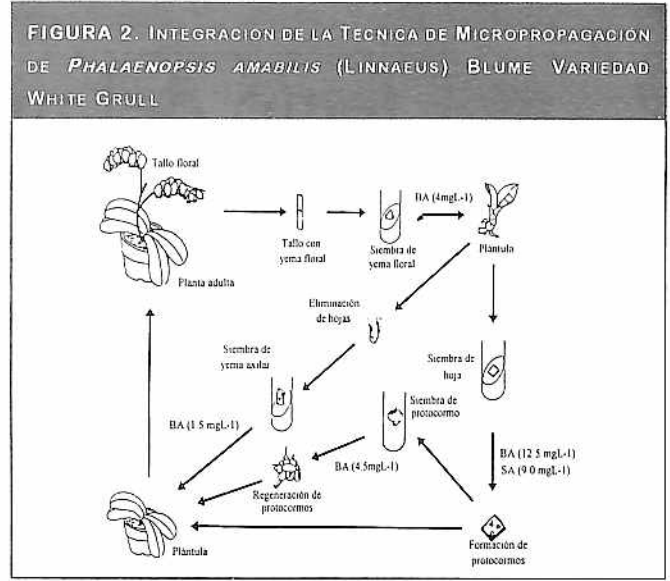
El tiempo de propagación y los porcentajes de oxidación tanto de los métodos convencionales como de algunos métodos de cultivo *in vitro* reportados en la literatura, lograron reducirse en este experimento.

Se pudo integrar una metodología para la propagación de la especie estudiada, lo que podría ser aplicado a otras dentro del mismo género (ver figura 2).

La técnica descrita en el presente trabajo permite obtener una producción teórica mínima de 38 mil plantas a partir de un solo explante de yema floral en tan sólo nueve meses de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Arditti, J.
 _____ (1977). "Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissue Culture", en *Orchid Biology*. Comstock Publ. Assoc., Cornell Univ. Press, Ithaca, Nueva York, Estados Unidos.
 _____; Ball, E. A. y Reisinger, D. M. (1977). "Culture of Flower-Stalk Buds: A Method for Vegetative Propagation of *Phalaenopsis*", en *Amer. Orchid Soc. Bull.* 46.
 Churchill, M. E.; Ball, E. A. y Arditti, J. (1972). "Tissue Culture of Orchids II. Methods for Root Tips", en *Amer. Orchid Soc. Bull.* 41.
 Gutiérrez, R. y Exposito, J. (1990). *The Cultivation of Phalaenopsis*. The South Florida Orchid Society, Inc. Bull. 33(1).
 Intuwong, O. y Sagawa, Y. (1974). "Clonal Propagation of *Phalaenopsis* by Shoot tip Culture", en *Amer. Orchid Soc. Bull.* 43.



Morel, G. M. (1964). "Tissue Culture: A New Means of Clonal Propagation of Orchids", en *Amer. Orchid Soc. Bull.* 33.
 Rotor, G. (1949). "A Method of Vegetative Propagation of *Phalaenopsis* Stem Cuttings", en *Amer. Orchid Soc. Bull.* 18.
 Scully, R. M. (1966). "Stem Propagation of *Phalaenopsis*", *Amer. Orchid Soc. Bull.* 35.
 Sweet, H. R. (1980). *The Genus Phalaenopsis*. The Orchid Digest, Inc. CA, USA.
 Tanaka, M. y Sakanishi, Y. (1977). "Clonal Propagation of *Phalaenopsis* by Leaf Tissue Culture", en *Amer. Orchid Soc. Bull.* 46.
 Tse, A. T.; Smith, R. J. y Hackett, W. P. (1971). "Adventitious Shoot Formation on *Phalaenopsis* Nodes", en *Amer. Orchid Soc. Bull.* 40.

Quivera

Orden de pedido:
 Nacional \$30.00, Internacional \$10.00 DLLS.
Enviar giro postal a:

Universidad Autónoma del Estado de México
 Facultad de Planeación Urbana y Regional
 Matamoros esq. Tollocan
 Toluca, Edo. de México, C.P. 50000
 metro@coatepec.uaemex.mx

Editorial Plaza y Valdés
 Manuel María Contreras 73,
 Col. San Rafael, México 06470, D.F.
 Tels: 705 5120 y 705 5646
 pyvedito@servidor.unam.mx

