

MICROPROPAGACIÓN DE *Cattleya mossiae* PARKER EX HOOK MEDIANTE BROTAÇÃO AXILAR INDUCIDA POR TIDIAZURÓN

Jhonathan Torres¹ y Norca Mogollón²

RESUMEN

Se indujo la ramificación axilar de tallos de *Cattleya mossiae* mediante cultivo en el medio de Murashige-Skoog modificado por Huang, con 1 mg/L de benciladenina (BA) y 1,0 ó 3,3 $\mu\text{M/L}$ de tiazurón (TDZ). Se detectó un efecto acumulativo y residual del TDZ sobre la multiplicación de los brotes. El primero consistió en el incremento de la ramificación axilar y la proliferación de cuerpos protocórmicos, mientras que el segundo se evidenció por el aumento de la producción de cuerpos protocórmicos y brotes fasciados. Las aplicaciones de TDZ por encima de 1 $\mu\text{M/L}$ tuvieron un efecto inhibitor del crecimiento de brotes. No se detectaron diferencias por el uso de dos tipos de soporte o concentraciones de las sales inorgánicas de MS sobre el desarrollo de las raíces.

Palabras clave adicionales: Propagación *in vitro*, orquídeas

ABSTRACT

Micropropagation of *Cattleya mossiae* Parker ex Hook through thidiazuron-induced axillary branching

High frequency axillary branching was induced in shoots of *Cattleya mossiae* on Huang's modification of Murashige and Skoog's medium containing 1 mg/L of benzyladenine (BA) and 1.0 or 3.3 $\mu\text{M/L}$ of thidiazuron (TDZ). Cumulative and residual effects of TDZ were detected. The first consisted in an increase of axillary branching and protocorm-like bodies (PLB) proliferation, and the second consisted in an increase of PLB and fasciated shoot formation. Concentrations of TDZ above 1 $\mu\text{M/L}$ had an inhibitory effect on shoot elongation. No differences were detected by the use of polypropylene membranes or two levels of MS inorganic salts on root proliferation.

Additional key words: *In vitro* propagation, orchids

INTRODUCCIÓN

La productividad en la micropropagación de muchas especies y cultivares de orquídeas ha sido base de la próspera industria mundial productora de vitroplantas (Murashige, 1974). Sin embargo, se ha observado que la tasa de multiplicación, y con ello el rendimiento de los cultivos, depende en gran medida de la metodología utilizada. De igual manera, la producción de cuerpos protocórmicos presenta rendimientos sustancialmente superiores a los de la brotación axilar, pero en contraposición, en esta última se observa menor incidencia de variación (Murashige, 1974; Huang,

1984), lo cual es un requisito indispensable para la calidad de un programa de propagación con fines comerciales. De allí que se han concentrado esfuerzos para la optimización de los procesos de micropropagación por brotación axilar (Adelberg et al., 1992; Huang, 1984). Una de las alternativas para el incremento de la proliferación de brotes ha sido la aplicación de tiazurón: TDZ (Fellman et al., 1987; Mok et al., 1987; Preece e Imel, 1991; Ranjan et al., 1997), un regulador de crecimiento de acción citocinínica que pertenece al grupo de las fenilúreas (Mok et al., 1987). El efecto del TDZ sobre la organogénesis en especies hortícolas ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, en

Recibido: Julio 30, 1999

Aceptado: Febrero 23, 2000

¹ Dpto. de Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado

² Posgrado de Agronomía. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado.

Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela.

orquídeas existen escasos reportes, especialmente para el género *Cattleya*. El propósito de la presente investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de TDZ durante la fase de multiplicación, sobre la producción de brotes y raíces en *Cattleya mossiae*, la flor nacional de Venezuela, y conocer el efecto de la concentración de las sales minerales en el medio de enraizamiento y el tipo de soporte de tejidos, sobre la formación y crecimiento de las raíces.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue realizada en la Unidad de Biotecnología del Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, en Tarabana, estado Lara y fueron consideradas las fases de iniciación, multiplicación y enraizamiento (Murashige, 1974). La iniciación del cultivo aséptico se realizó a partir de ápices caulinares provenientes de yemas en reposo del tipo A (Torres y Mogollón, 1995) es decir, aquellas producidas en el último flujo de crecimiento tomadas de un plantel donador y cultivadas sobre puentes de papel de filtro. Durante la multiplicación se estudió el efecto de la concentración de TDZ sobre la proliferación (número de brotes) y el crecimiento (longitud) de brotes de origen axilar, así como sobre la rizogénesis. Además, se realizó un ensayo para detectar el efecto residual del TDZ aplicado en subcultivos anteriores. Como punto de partida se tomó el medio de Murashige y Skoog (1962) modificado por Huang (1984). Las concentraciones probadas fueron 0, 0,5, 1,0, 3,3, 6,6, 13,2 y 19,8 $\mu\text{M/L}$. Los brotes o divisiones que no enraizaron en el medio de multiplicación fueron utilizados para estudiar el efecto de dos concentraciones de las sales inorgánicas (50 y 100%) del medio de Murashige-Skoog (MS) y dos tipos de soporte de tejidos (agar al 0,8% y balsas de membrana microporosa) sobre la formación y crecimiento radical. Todos los ensayos fueron realizados con tratamientos distribuidos al azar y un número de repeticiones que osciló entre 10 y 16.

RESULTADOS

Los resultados de la adición de cinco concentraciones de TDZ al medio de

multiplicación en el primer subcultivo se muestran en el Cuadro 1. En el mismo se detecta una tendencia al incremento del número de brotes/tubo al aumentar la concentración de TDZ desde 0 hasta aproximadamente 3,3 $\mu\text{M/L}$, presentándose los mayores valores para 1,0 y 3,3 $\mu\text{M/L}$ con 10,38 y 10,13 brotes/tubo, respectivamente. Además se observó disminución del crecimiento de brotes por el incremento de la concentración de TDZ. La longitud de brotes/tubo varió de 3,27 cm con 0 $\mu\text{M/L}$ hasta 1,78 cm con 3,3 $\mu\text{M/L}$ y 1,96 cm con 6,6 $\mu\text{M/L}$. La rizogénesis fue inhibida en todos los tratamientos con TDZ. El vigor de los brotes, representado por su aspecto general, fue similar para todas las divisiones y se encontraron brotes fasciados en 1,0, 3,3 y 6,6 $\mu\text{M/L}$ de TDZ.

Cuadro 1. Efecto del TDZ sobre el desarrollo de brotes en *C. mossiae* en el primer subcultivo.

TDZ ($\mu\text{M/L}$)	Número brotes/tubo	Long. brotes/tubo (cm)
0	4,13 ns	3,27a
0,5	4,88	3,23ab
1,0	10,38	2,49abc
3,3	10,13	1,78c
6,6	6,63	1,96bc
C.V. ^a	9,95	7,05

Prueba de Duncan al 5%.

^aPara valores transformados de acuerdo a $Y=\arctn(X+1)$.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de la aplicación de cuatro concentraciones de TDZ en un segundo subcultivo. En este caso, no se detectaron efectos significativos sobre la multiplicación o crecimiento de brotes. Se observa que con 13,2 $\mu\text{M/L}$ se produjo el mayor promedio de brotes/tubo con 7,8 y con 19,8 $\mu\text{M/L}$, el menor con 3,0.

Cuadro 2. Efecto del TDZ sobre el desarrollo de brotes en *C. mossiae* en el segundo subcultivo.

TDZ ($\mu\text{M/L}$)	Número brotes/tubo	Long. brotes/tubo (cm)
0	3,40 ns	2,70 ns
6,6	3,20	2,81
13,2	7,80	2,82
19,8	3,00	2,85
C.V. ^a	12,80	7,27

^aPara valores transformados de acuerdo a $Y=\arctn(X+1)$.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del ensayo para la detección del efecto residual del TDZ. El mayor número de brotes (10,80 brotes/tubo) se observó cuando el material vegetal estuvo expuesto a 6,6 $\mu\text{M/L}$ de TDZ durante dos subcultivos sucesivos, y los menores cuando el

material no fue expuesto a TDZ en el primer o ambos subcultivos, con 3,20 y 3,80 brotes/tubo, respectivamente. Asimismo, se observó la aparición de cuerpos protocórmicos y brotes fasciados cuando el TDZ se añadió en el primer o en ambos subcultivos.

Cuadro 3. Efecto de la presencia del TDZ en dos subcultivos sucesivos sobre el número de brotes/tubo de *C. mossiae*.

TDZ ($\mu\text{M/L}$)		Número brotes/tubo (Segundo subcultivo)
Primer subcultivo	Segundo subcultivo	
0	0	3,60 b
0	6,6	3,20 b
6,6	0	8,80 ab
6,6	6,6	10,80 a
C.V. ^a		9,28

Prueba de Duncan al 5%. ^aPara valores transformados de acuerdo a $Y=\arctn(X+1)$.

Durante los ensayos de la fase de multiplicación se observó rizogénesis espontánea en los tratamientos sin TDZ. La magnitud y calidad del sistema radical formado dependió de la composición del medio de cultivo. El porcentaje de enraizamiento osciló entre 87,5 y 100 para los tratamientos con el medio de multiplicación usado como punto de partida, MS modificado por Huang, sin endospermo de coco y sin TDZ, y llegó a 0 con 6,6 $\mu\text{M/L}$ de TDZ (datos no mostrados).

En el Cuadro 4 se presenta el efecto de dos tipos de soporte de tejidos y dos concentraciones de sales inorgánicas de MS sobre el desarrollo de

raíces en las divisiones no enraizadas espontáneamente durante los ensayos de multiplicación. A pesar de que no se detectaron diferencias estadísticas, se observó que el número de raíces/división tendió a ser mayor en los tratamientos de balsas, con 4,63 y 4,13 para 50 y 100% de sales, respectivamente. Por el contrario, la longitud de raíces/división lució ligeramente superior en los tratamientos de agar con 2,96 y 2,60 cm en 50 y 100 %, respectivamente. El mejor aspecto general, tanto del sistema radical como del follaje, se observó en los tratamientos con balsas de membrana microporosa.

Cuadro 4. Efecto del soporte de tejidos y la concentración de sales inorgánicas sobre el enraizamiento *in vitro* de *C. mossiae*.

Soporte	Sales (%)	Raíces/ división	Long. raíces/ división (cm)
Agar	100	3,13 ns	2,60 ns
Balsas	100	4,13	2,55
Agar	50	3,63	2,96
Balsas	50	4,63	2,68
C.V. ^a		5,63	4,19

^aPara valores transformados de acuerdo a $Y=\arctn(X+1)$.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados muestran el efecto del TDZ sobre *C. mossiae* durante la multiplicación, observándose que la proliferación de brotes (expresada como número de brotes/tubo) se incrementó con la concentración del producto hasta alcanzar el máximo entre 1,0 y 3,3 $\mu\text{M/L}$. Esto coincide con lo reportado por Ranjan et al.

(1997) quienes lograron incrementar gradualmente el número de brotes/planta en *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* y *D. moschatum* con el aumento de la concentración de TDZ en el medio de cultivo, hasta alcanzar un óptimo a partir del cual descendió. En dicho trabajo la concentración óptima fue de 2,2 $\mu\text{M/L}$ para *C. aloifolium* y 4,5 $\mu\text{M/L}$ para *D. aphyllum* y *D. moschatum*. Sin embargo, hubo reducción de la

longitud de brotes debido al acortamiento de entrenudos ocurrido con el incremento de la concentración, haciéndose más marcado el efecto a partir de 1 $\mu\text{M/L}$. Esto coincide con los resultados de Fellman et al. (1987) quienes señalan que aplicaciones de TDZ pueden reprimir el alargamiento de yemas brotadas o los brotes.

Por otra parte, en el presente estudio se observó de manera generalizada que la aplicación del TDZ aparentemente inhibió el desarrollo del sistema radical de las divisiones, lo cual está en concordancia con lo reportado por Jordan et al. (1993) en *Solanum muricatum*.

El efecto acumulativo del TDZ, manifestado en el incremento de la proliferación de brotes y la presencia de cuerpos protocórmicos en las divisiones tratadas al menos en dos subcultivos sucesivos, así como el efecto residual detectado con la aparición de brotes fasciados se corresponden con lo reportado por Capelle et al. (1993) quienes lograron cultivos de *Phaseolus lunatus* en medio libre de citocininas, cuando éstos fueron previamente expuestos a TDZ. Mok et al. (1987) indican que el TDZ presenta efecto residual de incremento de la autonomía de los tejidos frente a las citocininas, debido posiblemente, a que estimula la biosíntesis endógena de estas hormonas o altera su metabolismo interno, lo cual resulta en un incremento en los niveles de citocininas naturales del tejido.

La estimulación residual del desarrollo de cuerpos protocórmicos podría ser un aspecto útil en investigaciones de esa naturaleza, pero su uso prolongado podría resultar contraproducente en la micropropagación clonal. Otro aspecto negativo en la aplicación de TDZ en *Cattleya* fue la tendencia a formación de brotes fasciados, por lo que, aparentemente, no convendría su uso por más de dos subcultivos sucesivos.

Durante la fase de enraizamiento se observó un escaso efecto del tipo de soporte de tejidos y de la concentración de sales minerales del medio sobre la rizogénesis, aunque se observó que el sistema radical de las divisiones cultivadas sobre balsas de membrana microporosa lucían más vigorosas que las cultivadas en agar. Estos resultados contradicen de modo parcial lo reportado por Adelberg et al. (1992), quienes indican haber logrado mayor enraizamiento y mejor calidad del sistema radical de híbridos de

Cattleya en los cultivos sobre balsas de membrana. Tales diferencias podrían ser explicadas por las características propias de las especies bajo estudio.

La metodología empleada en el presente trabajo puede ser de utilidad para la estimulación de la brotación axilar, en la propagación clonal de cattleyas meritorias desde el punto de vista hortícola. Sin embargo, deben ser tomados en consideración los efectos adversos observados, como son la formación de brotes fasciados y la aparición de cuerpos protocórmicos.

CONCLUSIONES

La aplicación de 3,3 $\mu\text{M/L}$ de TDZ al medio de multiplicación incrementó la proliferación de brotes y redujo su longitud.

La aplicación de TDZ presentó efecto acumulativo y residual, consistente en el incremento de la proliferación de brotes, formación de cuerpos protocórmicos y aparición de brotes fasciados, por lo que sería inconveniente su aplicación en más de dos subcultivos sucesivos.

El uso de balsas de membrana microporosa y la concentración de sales minerales del medio de enraizamiento entre 50 y 100% no afectaron la rizogénesis.

LITERATURA CITADA

1. Adelberg, J., N. Desamero, A. Hale y R. Young. 1992. Orchid micropropagation on polypropylene membranes. Amer. Orchid Soc. Bull. 61(7): 688-695.
2. Capelle, S., P. Mok, S. Kirchner y M. Mok. 1993. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N^6 - (A²-isopentenyl) [8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol. 73: 796-802.
3. Fellman, C., P. Read y M. Hosier. 1987. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. HortScience 22(6): 1197-1200.
4. Huang, L. 1984. Alternative media and method for *Cattleya* propagation by tissue

- culture. Amer. Orchid Soc. Bull. 53(2): 167-170.
5. Jordan, M., M. Obando; L. Iturriaga, A. Goreux y J. Velozo. 1993. Organogenesis and regeneration of some andean fruit species. Acta Horticulturae 336. 279-283.
6. Mok, M., D. Mok, J. Turner y C. Mujer. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivates in tissue culture systems. HortScience 26 (6):1194-1197.
7. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.
8. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
9. Preece, J. y M. Imel. 1991. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* `P.J.M. Hybrids´. Scientia Horticulturae 48 (1-2):159-170.
10. Ranjan, N., S. Prasad y S. Patnaik. 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* y *D. moschatum*, through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. Scientia Horticulturae 71(3-4): 243-250.
11. Torres, J. y N. Mogollón. 1995. Observaciones sobre el crecimiento y desarrollo de *Cattleya lueddemanniana* Reichb. f. bajo manejo hortícola. XII Congreso Venezolano de Botánica. Ciudad Bolívar. Resúmenes. Venezuela. p. 125.