

Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae)

Organic supplement for in vitro propagation of the hybrid Laeliocattleya (Orchidaceae)

Letícia de Menezes Gonçalves¹, Maria de Fátima P. S. Machado², Paulina Ballesta³,
Freddy Mora^{4*}, Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez⁵, Claudete Aparecida Mangolin²

RESUMEN

El desarrollo de técnicas de micropropagación en orquídeas ofrece múltiples ventajas como la reproducción de genotipos superiores, raros, estériles o libres de enfermedades. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de plántulas del híbrido intergenérico *Laeliocattleya* (*Hadrolaelia purpurata* x *Cattleya intermedia*), comparando su respuesta con fitoreguladores de auxinas y citoquininas. Para ello se realizaron los siguientes cuatro experimentos: 1. Suplementos orgánicos comparados con diferentes concentraciones de kinetina (N6-furfuril amino purina; KIN) y ácido naftalenacético (ANA), 2. Suplementos orgánicos comparados con diferentes concentraciones de ácido 3-indolbutírico (IBA) y N6-benzyladenine (6BA), 3. Suplementos orgánicos comparados con diferentes concentraciones de IBA y KIN, y 4. Suplementos orgánicos comparados con diferentes concentraciones de ANA y 6BA. El suplemento orgánico de agua de coco fue estadísticamente superior al resto ($P < 0,01$), para la variable número de hojas, en todos los experimentos realizados, con 7,3 hojas por plántula cultivada *in vitro*. En tanto que la adición de pulpa de banana mostró los mejores resultados en el número de raíces ($P < 0,01$), para todos los experimentos en estudio, con un valor medio de 7,4 raíces. Se concluye que la adición de pulpa de banana o de agua de coco es conveniente para la producción de orquídeas híbridas por presentar un efecto positivo en el desarrollo de las plántulas, y por su costo reducido en relación con el uso de reguladores de crecimiento.

Palabras clave: pulpa de banana, agua de coco, fitohormonas, auxina, citoquinina.

ABSTRACT

The development of micropropagation techniques in orchid has many advantages such as the reproduction of elite, rare, sterile and/or disease-free genotypes. The aim of this study was to evaluate the use of organic supplements (coconut water and banana pulp) in the *in vitro* development of seedlings of *Laeliocattleya* (*Hadrolaelia purpurata* x *Cattleya intermedia*), comparing their response to plant growth regulators: auxins and cytokinins. For this, the following four experiments were carried out: 1. Organic supplements compared to different concentrations of kinetin (N6-furfuryl aminopurine; KIN) and naphthaleneacetic acid (NAA), 2. Organic supplements compared to different concentrations of 3-indolebutyric acid (IBA) and N6-benzyladenine (6BA), 3. Organic supplements compared to different concentrations of IBA and KIN, and 4. Organic supplements compared with different concentrations of ANA and 6BA. Coconut water was statistically superior to the others ($P < 0.01$) for the variable number of leaves, in all experiments performed with 7.3 leaves per seedling cultivated *in vitro*. While banana pulp showed the best results in the number of roots ($P < 0.01$) for all experiments, with an average value of 7.4 roots. The addition of banana pulp and/or coconut water is suitable for the production of orchid hybrids, which present a positive effect on the development of seedlings. Its low cost is also a plus in relation to the use of plant growth regulators.

Key words: banana, coconut water, phytohormones, auxin, cytokinine.

¹ Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Roraima. Boa Vista, Roraima, Brasil.

² Departamento de Biología Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

⁴ Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca. 2 Norte 685, Talca, Chile.

⁵ Departamento de Biología, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

* Autor por correspondencia: fmora@utalca.cl

Introducción

Orchidaceae es una de las familias más amplias de las angiospermas y taxonómicamente la más especializada de las monocotiledóneas. Comprende cerca de 700 géneros y 35.000 especies distribuidas en todo el mundo (Rego-Oliveira *et al.*, 2005), con una gran representatividad en Brasil. Debido a su gran diversidad morfológica y larga duración de flores, el comercio ornamental de las orquídeas se ha expandido notablemente en las últimas décadas. Las exportaciones brasileñas de flores llegaron a los 25 millones de dólares en 2004, con un crecimiento anual del 25%.

La propagación de plántulas de orquídea incluye métodos asexuales y sexuales. En los primeros, el agricultor puede dividir los cormos y raíces de las plantas para generar dos o más clones, mientras que el proceso de propagación vía semillas (sexual) es bastante más complejo. Las semillas son de tamaño pequeño y de endosperma reducido, por tanto la morfología de las semillas dificulta el proceso de germinación. No obstante, las semillas de orquídeas tienen una relación simbiótica con hongos micorrícicos, los que mediante digestión enzimática proporcionan a las semillas compuestos orgánicos necesarios para la germinación (Pereira *et al.*, 2005). Además, la germinación simbiótica no es necesaria si las semillas son traspasadas a un medio estéril provisto de nutrientes y una fuente de carbono.

El desarrollo de técnicas de micropropagación de orquídeas ofrece múltiples ventajas como la reproducción de genotipos superiores, raros, estériles o libres de enfermedades. Particularmente el cultivo de semillas de orquídea *in vitro* ha permitido reducir los tiempos de producción de plántulas, ya que algunas especies pueden llegar a la madurez (producción de flores) en menor cantidad de años. Una gran cantidad de especies de orquídeas han sido cultivadas *in vitro*, mediante diferentes técnicas y varios propósitos (Roy *et al.*, 2007; Huan *et al.*, 2004b; Johnson *et al.*, 2007). La mayoría ha sido propagada mediante la formación de estructuras conocidas como *protocorm-like body* (PLB).

La composición del medio de cultivo es uno de los factores que determinan el éxito de generar y propagar plántulas. Todo medio está básicamente compuesto de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos y una fuente de carbono. En general, el medio C desarrollado por Knudson

(1946) es el medio más aceptado para el cultivo *in vitro* de especies de orquídeas. La inducción de una ruta morfogénica específica (organogénesis, embriogénesis, callogénesis) es regulada por la composición del medio básico de cultivo y la adición de compuestos reguladores de crecimiento. Tradicionalmente la adición de auxinas y citoquininas ha sido utilizada para regular el crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales. No obstante, el uso de estos compuestos es costoso, por tanto se han investigado sustitutos de origen natural que puedan ser una fuente de minerales, aminoácidos, vitaminas y azúcares (Vyas *et al.*, 2009). De acuerdo con Arditti *et al.* (1982), la pulpa de banana puede mejorar el crecimiento de raíces y brotes de orquídea. Sin embargo, en este mismo estudio se observó que la germinación de semillas fue inhibida por la pulpa de banana, por tanto se concluyó que este suplemento es benéfico solo en fase de plántula. Gnasekaran *et al.* (2010) reportaron una máxima proliferación de PLB en *Phalaenopsis violacea* Tijsm. & Binn en un medio suplementado con pulpa de banana. El agua de coco es otro de los suplementos escogidos para el cultivo *in vitro* de diferentes especies de orquídeas, debido a que contiene mioinositol, citoquininas, nucleótidos y compuestos orgánicos. Huan *et al.* (2004) demostraron que un medio libre de reguladores de crecimiento, y suplementado con agua de coco, promueve la formación de PLB en el género *Cymbidium*, no obstante los PLB formados no fueron uniformes. Lo *et al.* (2004) reportaron que un medio Murashige-Skoog (MS; 1962) suplementado con agua de coco promueve el crecimiento de hojas en *Cymbidium*. En adición, la propagación *in vitro* de *Epidendrum radicans* Lindl. en medio MS suplementado con agua de coco y reguladores de crecimiento aumenta la sobrevivencia de plántulas en condiciones *ex vitro* (Pateli *et al.*, 2003). A pesar de que la adición de estos suplementos ha generado resultados favorables para el cultivo *in vitro* de orquídeas, su aplicación aún es cuestionada debido que no existen reportes que esclarezcan la composición química de los suplementos naturales, y los efectos fisiológicos que estos generan en los tejidos celulares.

Debido a que el mercado de micropropagación de orquídeas es altamente competitivo, existe un interés económico por obtener mayor información respecto de las condiciones de cultivo que permitan optimizar y maximizar los procesos productivos. Este trabajo tuvo como objetivo examinar los

efectos del uso de suplementos orgánicos en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de plántulas del híbrido intergenérico *Laeliocattleya* (*Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah), comparando su respuesta con fitoreguladores, auxinas y citoquininas.

Materiales y métodos

Preparación de inóculos de *Laeliocattleya*

Se utilizaron plántulas del híbrido intergenérico *Laeliocattleya* (*Hadrolaelia purpurata* Lindl. (Chiron; Castro) x *Cattleya intermedia* Grah), obtenidas del Laboratorio de Cultivo de orquídeas del Museo Dinámico Interdisciplinar de la Universidad Estatal de Maringá, Estado de Paraná, Brasil. Las plántulas, de seis meses de edad, se obtuvieron de semillas germinadas *in vitro* en medio Murashige-Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962) reducido a la mitad de su concentración, con 0,3% de carbón activado.

Tratamientos y preparación de medios de cultivo

Las plántulas de *Laeliocattleya* previamente germinadas *in vitro* se inocularon en Medio C de Knudson (Medio KC; Knudson, 1946). Este medio KC se suplementó con pulpa de *Musa acuminata* var. Cavendish (banana “nanica”) y agua de coco (*Cocos nucifera* L.) y reguladores de crecimiento en combinaciones de auxinas y citoquininas. Los siguientes cuatro experimentos corresponden a las investigaciones realizadas en este estudio:

Experimento 1: Efecto de los suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) en la inducción de brotes, raíces y hojas de *Laeliocattleya*, comparado con diferentes concentraciones de kinetina (N6-furfuril aminopurina; KIN) y ácido naftalenacético (ANA).

Experimento 2: Efecto de los suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) en la inducción de brotes, raíces y hojas de *Laeliocattleya*, comparado con diferentes concentraciones de ácido 3-indolbutírico (IBA) y N6-benzyladenine (6BA).

Experimento 3: Efecto de los suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) en la inducción de brotes, raíces y hojas de *Laeliocattleya*, comparado con diferentes concentraciones de ácido 3-indolbutírico (IBA) y kinetina (N6-furfuril aminopurina; KIN).

Experimento 4: Efecto de los suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) en la inducción de brotes, raíces y hojas de *Laeliocattleya*, comparado con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y N6-benzyladenine (6BA).

Los experimentos se realizaron en 50 mL de medio KC por frasco. El número de réplicas por tratamiento fue de cuatro, con 10 plántulas por réplica. El pH de todos los medios de cultivo se ajustó a 5,3, utilizando KOH 1N y HCl 50% v/v. Posteriormente se añadió agar (6,5 g L⁻¹) y sacarosa (20 g L⁻¹). Los medios de cultivo se autoclavaron por 20 min a una presión de 1 atm. Al término del periodo de experimentación (ocho meses) se verificaron los valores de pH finales alcanzados en el medio de las plántulas. La pulpa de banana se licuó con 50 mL de agua destilada, y fue añadida en medio KC hasta alcanzar un volumen de 1 L, mientras que el agua de coco se utilizó al 10% v/v. Después de la transferencia de las plántulas, las réplicas se mantuvieron en una sala climatizada, con temperatura de 25 ± 2°C y luz fluorescente continua.

Recolección de datos y análisis estadístico

Después de ocho meses de establecido el ensayo se midieron las variables número de hojas (NH), número de raíces (NR) y el número de brotes (NB). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando la metodología de Modelos Lineales Generalizados, con el procedimiento GENMOD del programa SAS (SAS Institute Inc., 2007). Se asumió una distribución de Poisson para las variables NF y NR, y Binomial Negativa para NB, debido a superdispersión e inflación de ceros. En ambas distribuciones se asumió una función de ligación logarítmica (Myers *et al.*, 2002; Uribe *et al.*, 2011). El test de Chi-cuadrado se utilizó para verificar las diferencias específicas entre tratamientos, con la opción CONTRAST del procedimiento GENMOD.

Resultados

Se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P < 0.0001$) en los cuatro experimentos, de acuerdo con el análisis de varianza del procedimiento de modelación lineal generalizada (Tabla 1). El criterio de información de Akaike (AIC) confirmó la significancia del efecto debido a los tratamientos aplicados en la

Tabla 1. Resultado del análisis de modelación lineal generalizada de cada experimento de propagación *in vitro* de *Laeliocattleya*. Experimento 1: suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) y diferentes concentraciones de kinetina y ácido naftalenacético. Experimento 2: suplementos orgánicos y diferentes concentraciones de ácido 3-indolbutírico y N6-benciladenina. Experimento 3: suplementos orgánicos y diferentes concentraciones de ácido 3-indolbutírico y kinetina. Experimento 4: suplementos orgánicos y diferentes concentraciones de ácido naftalenacético y N6-benciladenina.

	Número de hojas		Número de raíces		Número de brotes	
	χ^2	$P > \chi^2$	χ^2	$P > \chi^2$	χ^2	$P > \chi^2$
Experimento 1						
Tratamientos	51,48	< 0,0001	115,42	< 0,0001	81,43	< 0,0001
Δ AIC		17,5		81,4		47,4
Experimento 2						
Tratamientos	96,78	< 0,0001	148,89	< 0,0001	58,58	< 0,0001
Δ AIC		62,8		114,9		24,6
Experimento 3						
Tratamientos	62,8	< 0,0001	152,3	< 0,0001	326,2	< 0,0001
Δ AIC		28,8		118,3		292,2
Experimento 4						
Tratamiento	62,0	< 0,0001	136,5	< 0,0001	79,1	< 0,0001
Δ AIC		28,0		102,5		45,1

P: probabilidad; AIC: Criterio de información de Akaike; χ^2 : test de Chi-cuadrado. Delta AIC: AIC modelo reducido (sin efectos de tratamiento) menos el valor de AIC para el modelo con efecto de tratamientos.

inducción de número de hojas, raíces y brotes de *Laeliocattleya*. Los valores de delta AIC (es decir, los valores de AIC del modelo sin efectos de tratamiento menos el valor de AIC para el modelo con efecto de tratamientos) fueron siempre mayores que 10, confirmando la existencia de significativas diferencias entre los tratamientos.

Las Tablas 2, 3, 4 y 5 muestran las diferencias puntuales entre los valores medios de cada tratamiento para cada experimento. El suplemento orgánico de agua de coco fue estadísticamente superior al resto, para la variable número de hojas de *Laeliocattleya* en todos los experimentos realizados, con 7,3 hojas por plántula cultivada *in vitro*. Este mismo suplemento evidenció las peores respuestas para el número de raíces por plántula. En tanto que el suplemento orgánico compuesto de pulpa de banana mostró los mejores resultados en el número de raíces, para todos los experimentos en estudio. Los niveles de brotes fueron siempre inferiores que 1, en promedio, en todos los experimentos, por lo que se descartaría como una variable relevante a considerar en esta etapa de multiplicación *in vitro* de *Laeliocattleya*.

Discusión

Los métodos de propagación convencionales de orquídeas (e.g. vía pseudobulbos) han demostrado ser lentos y poco confiables. Por este motivo, la

producción de plantas *in vitro* ha aumentado en los últimos años, ya que representa una metodología apropiada para el cultivo de especies de orquídea. La adición de diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento (ANA, IBA, 6BA y KIN), pulpa de banana y agua de coco a un medio KC, tuvo un efecto positivo en plántulas de *Laeliocattleya* luego de un mes de cultivo. Por ejemplo, plántulas cultivadas en medio KC sin combinaciones de reguladores o suplementos orgánicos, no desarrollaron brotes (NB).

Las respuestas morfogénicas (NH, NR y NB) variaron según el tipo de tratamiento. El número de hojas (NH) fue superior en plántulas cultivadas en un medio KC suplementado con agua de coco. Lo *et al.* (2004) observaron que un medio MS suplementado con agua de coco estimuló la formación de hojas en plántulas de *Laeliocattleya* y en otras especies de orquídeas. De acuerdo con Arditti *et al.* (1982), el agua de coco contiene ribósidos de zeatina, los que poseen un efecto similar a una citoquinina. Además, el número de raíces (NR) fue más bajo en plántulas que contenían agua de coco en su medio de cultivo. La presencia de citoquininas en el agua de coco podría inhibir la formación de raíces y estimular el crecimiento de partes aéreas y la proliferación de brotes (Trigiano y Gray, 2005). No obstante, los resultados del presente estudio demostraron que el número de hojas (NH) y brotes (NB) no fueron positivamente relacionados en los tratamientos probados. Los

Tabla 2. Diferencias entre tratamientos del experimento 1: suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) y diferentes concentraciones de kinetina y ácido naftalenacético, expresadas en mg L⁻¹.

Tratamiento	NH	Tratamiento	NR	Tratamiento	NB
COCO	7,3 a	BANANA	7,4 a	ANA-KIN(1,0-0,5)	0,75 a
ANA-KIN(1,5-0)	5,6 b	ANA-KIN(1,5-0,5)	5,9 b	ANA-KIN(1,0-1,0)	0,50 ab
ANA-KIN(1,5-0,5)	5,3 bc	ANA-KIN(1,0-0,5)	5,9 b	ANA-KIN(0,5-0)	0,45 abc
ANA-KIN(1,5-1,0)	5,1 bcd	ANA-KIN(0-0)	5,8 b	ANA-KIN(0-1,0)	0,45 abc
ANA-KIN(0,5-1,5)	5,1 bcd	ANA-KIN(0,0-0,5)	5,6 bc	ANA-KIN(0-1,5)	0,33 bcd
ANA-KIN(1,0-0)	5,1 bcde	ANA-KIN(1,0-1,5)	5,6 bc	ANA-KIN(0-0,5)	0,33 bcd
ANA-KIN(0,5-0,5)	5,0 bcde	ANA-KIN(1,5-0)	5,6 bc	ANA-KIN(0,5-0,5)	0,28 bcd
ANA-KIN(1,5-1,5)	5,0 bcde	ANA-KIN(0,5-0)	5,5 bc	COCO	0,28 bcd
ANA-KIN(1,0-1,0)	5,0 bcde	ANA-KIN(1,5-1,0)	5,5 bc	ANA-KIN(1,5-0,5)	0,25 bcd
ANA-KIN(0,5-0)	5,0 bcde	ANA-KIN(1,5-1,5)	5,4 bc	BANANA	0,23 bcd
ANA-KIN(0-0,5)	5,0 bcde	ANA-KIN(1,0-0)	5,3 bc	ANA-KIN(0,5-1,0)	0,23 bcd
ANA-KIN(0,5-1,0)	4,9 cde	ANA-KIN(0,5-1,5)	5,1 bc	ANA-KIN(1,5-1,0)	0,23 bcd
ANA-KIN(1,0-1,5)	4,9 cde	ANA-KIN(1,0-1,0)	5,1 bc	ANA-KIN(1,5-1,5)	0,20 bcd
ANA-KIN(1,0-0,5)	4,9 cde	ANA-KIN(0-1,5)	5,0 bc	ANA-KIN(1,5-0)	0,20 bcd
ANA-KIN(0-1,0)	4,5 cde	ANA-KIN(0-1,0)	5,0 bc	ANA-KIN(1,0-1,5)	0,13 bcd
BANANA	4,5 cde	ANA-KIN(0,5-1,0)	4,7 c	ANA-KIN(1,0-0)	0,08 cd
ANA-KIN(0-1,5)	4,5 de	ANA-KIN(0,5-0,5)	4,6 c	ANA-KIN(0,5-1,5)	0,08 cd
ANA-KIN(0-0)	4,3 e	COCO	2,6 d	ANA-KIN(0-0)	0,00 e

NH: número de hojas; NR: número de raíces; NB: número de brotes; ANA: ácido naftalenacético; KIN: kinetina; COCO: agua de coco; BANANA: pulpa de banana.

Tabla 3. Diferencias entre tratamientos del experimento 2: suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) y diferentes concentraciones de ácido 3-indolbutírico y N6-benciladenina, expresadas en mg L⁻¹.

Tratamiento	NH	Tratamiento	NR	Tratamiento	NB
COCO	7,3 a	BANANA	7,4 a	IBA-6BA(0,5-0,5)	0,43 a
IBA-6BA(0,5-0)	4,8 b	IBA-6BA(0,5-0)	6,0 b	COCO	0,28 ab
BANANA	4,5 bc	IBA-6BA(0-0)	5,8 bc	IBA-6BA(1,0-1,5)	0,25 abc
IBA-6BA(0,5-0,5)	4,5 bc	IBA-6BA(1,5-0)	5,3 bcd	BANANA	0,23 abc
IBA-6BA(0-0)	4,3 bc	IBA-6BA(0,5-0,5)	5,1 bcd	IBA-6BA(0-0,5)	0,15 bc
IBA-6BA(1,5-1,5)	4,3 bc	IBA-6BA(1,0-0)	5,1 bcde	IBA-6BA(0-1,0)	0,13 bcd
IBA-6BA(1,0-1,0)	4,2 bc	IBA-6BA(1,5-1,5)	4,8 bcdef	IBA-6BA(0,5-0)	0,08 cd
IBA-6BA(1,0-0,5)	4,2 bc	IBA-6BA(0-0,5)	4,7 cdef	IBA-6BA(1,5-1,5)	0,08 cd
IBA-6BA(1,5-0)	4,1 bc	IBA-6BA(1,0-0,5)	4,5 cdef	IBA-6BA(0,5-1,0)	0,05 cde
IBA-6BA(1,5-1,0)	4,1 bc	IBA-6BA(1,0-1,0)	4,5 def	IBA-6BA(1,5-1,0)	0,05 cde
IBA-6BA(0,5-1,5)	3,9 bc	IBA-6BA(1,5-1,0)	4,5 def	IBA-6BA(0-1,5)	0,03 de
IBA-6BA(0,5-1,0)	3,9 bc	IBA-6BA(0,5-1,0)	4,4 def	IBA-6BA(1,5-0)	0,03 de
IBA-6BA(1,0-1,5)	3,8 c	IBA-6BA(1,5-0,5)	4,3 def	IBA-6BA(1,0-0,5)	0,03 de
IBA-6BA(1,5-0,5)	3,8 c	IBA-6BA(0-1,0)	4,2 def	IBA-6BA(1,0-0)	0,03 de
IBA-6BA(1,0-0)	3,8 c	IBA-6BA(0-1,5)	4,1 def	IBA-6BA(0,5-1,5)	0,03 de
IBA-6BA(0-1,0)	3,7 c	IBA-6BA(1,0-1,5)	3,8 ef	IBA-6BA(1,0-1,0)	0,00 e
IBA-6BA(0-1,5)	3,7 c	IBA-6BA(0,5-1,5)	3,7 f	IBA-6BA(1,5-0,5)	0,00 e
IBA-6BA(0-0,5)	3,5 c	COCO	2,6 g	IBA-6BA(0-0)	0,00 e

NH: número de hojas; NR: número de raíces; NB: número de brotes; COCO: agua de coco; BANANA: pulpa de banana; 6BA: N6-benciladenina; IBA: ácido 3-indolbutírico.

valores de NB obtenidos en medios suplementados con agua de coco son estadísticamente comparables a medios KC con combinaciones de ANA-KIN (1,0-1,0 mg L⁻¹; 0,5-0,0 mg L⁻¹; ANA-KIN 0,0-1,0 mg L⁻¹) e IBA-6BA (0,5-0,5 mg L⁻¹; 1,0-1,5 mg L⁻¹); sin embargo, combinaciones de reguladores ANA-6BA

e IBA-KIN tuvieron resultados superiores a los obtenidos con agua de coco. El efecto citoquininas en la formación de brotes ha sido descrito por Trigiano y Gray (2005). Por lo demás, una alta concentración de la citoquinina BAP (1,5 mg L⁻¹) generó un mayor número de brotes en *Dendrobium nobile* Lindl.,

Tabla 4. Diferencias entre tratamientos del experimento 3: suplementos orgánicos y diferentes concentraciones de ácido 3-indolbutírico y kinetina, expresadas en mg L⁻¹.

Tratamiento	NH	Tratamiento	NR	Tratamiento	NB
COCO	7,3 a	BANANA	7,4 a	IBA-KIN(0-0,5)	0,28 a
IBA-KIN(0,5-1,0)	4,9 b	IBA-KIN(1,0-0,5)	6,8 ab	IBA-KIN(0-1,0)	0,23 a
IBA-KIN(1,5-1,5)	4,9 b	IBA-KIN(0,5-0)	6,6 ab	IBA-KIN(0-1,5)	0,08 b
IBA-KIN(1,5-0,5)	4,8 b	IBA-KIN(0-1,5)	6,6 ab	IBA-KIN(0,5-0)	0,05 b
IBA-KIN(1,0-0)	4,7 b	IBA-KIN(1,5-0)	6,5 b	IBA-KIN(0,5-0,5)	0,05 b
IBA-KIN(0-1,0)	4,7 b	IBA-KIN(1,0-1,5)	6,3 b	IBA-KIN(0,5-1,0)	0,03 b
IBA-KIN(0,5-0,5)	4,6 b	IBA-KIN(0-0,5)	6,2 b	IBA-KIN(0,5-1,5)	0,03 b
IBA-KIN(1,0-1,0)	4,6 b	IBA-KIN(0-1,0)	6,1 b	IBA-KIN(1,0-0)	0,03 b
BANANA	4,5 b	IBA-KIN(0,5-1,5)	6,0 bc	IBA-KIN(1,0-0,5)	0,03 b
IBA-KIN(1,5-0)	4,5 b	IBA-KIN(0-0)	5,8 bc	IBA-KIN(1,0-1,0)	0,03 b
IBA-KIN(1,5-1,0)	4,4 b	IBA-KIN(1,5-1,5)	5,6 c	IBA-KIN(1,0-1,5)	0,00 c
IBA-KIN(1,0-1,5)	4,4 b	IBA-KIN(1,5-0,5)	5,3 cd	IBA-KIN(1,5-0)	0,00 c
IBA-KIN(0,5-0)	4,3 b	IBA-KIN(0,5-1,0)	5,3 cd	IBA-KIN(1,5-0,5)	0,00 c
IBA-KIN(0-0)	4,3 b	IBA-KIN(1,0-0)	5,2 cd	IBA-KIN(1,5-1,0)	0,00 c
IBA-KIN(0,5-1,5)	4,3 b	IBA-KIN(1,0-1,0)	5,0 cd	IBA-KIN(1,5-1,5)	0,00 c
IBA-KIN(1,0-0,5)	4,3 b	IBA-KIN(0,5-0,5)	4,9 d	BANANA	0,00 c
IBA-KIN(0-1,5)	4,2 b	IBA-KIN(1,5-1,0)	4,7 d	COCO	0,00 c
IBA-KIN(0-0,5)	4,2 b	COCO	2,6 e	IBA-KIN(0-0)	0,00 c

NH: número de hojas; NR: número de raíces; NB: número de brotes; COCO: agua de coco; BANANA: pulpa de banana; IBA: ácido 3-indolbutírico; KIN: Kinetina.

Tabla 5. Diferencias entre tratamientos del experimento 4: suplementos orgánicos (agua de coco y pulpa de banana) y diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y N6-benciladenina (6BA), expresadas en mg L⁻¹.

Tratamiento	NH	Tratamiento	NR	Tratamiento	NB
COCO	7,3 a	BANANA	7,4 a	ANA-6BA(1,5-0,5)	0,85 a
ANA-6BA(1,0-1,0)	5,4 b	ANA-6BA(1,0-1,0)	6,2 b	ANA-6BA(1,0-1,5)	0,78 ab
ANA-6BA(0,5-1,0)	5,1 bc	ANA-6BA(0-0)	5,8 b	ANA-6BA(0-1,0)	0,75 abc
ANA-6BA(1,0-1,5)	5,0 bc	ANA-6BA(1,0-0,5)	5,6 b	ANA-6BA(1,0-0,5)	0,63 abc
ANA-6BA(1,0-0)	5,0 bc	ANA-6BA(1,5-1,5)	5,4 b	ANA-6BA(0,5-1,5)	0,53 abc
ANA-6BA(1,5-1,5)	5,0 bc	ANA-6BA(1,5-0)	5,4 b	ANA-6BA(0,5-1,0)	0,48 abcd
ANA-6BA(1,5-1,0)	4,9 bc	ANA-6BA(0,5-1,0)	5,3 b	ANA-6BA(1,0-0)	0,45 abcd
ANA-6BA(0,5-0)	4,8 bcd	ANA-6BA(1,5-1,0)	5,3 b	ANA-6BA(1,5-1,5)	0,43 bcd
ANA-6BA(0,5-1,5)	4,8 bcd	ANA-6BA(0,5-0)	5,2 bc	ANA-6BA(0,5-0,5)	0,38 cd
ANA-6BA(0-1,0)	4,7 bcd	ANA-6BA(1,0-0)	5,0 bc	ANA-6BA(1,5-0)	0,35 d
ANA-6BA(0,5-0,5)	4,7 bcd	ANA-6BA(1,0-1,5)	4,9 c	ANA-6BA(1,0-1,0)	0,33 de
ANA-6BA(1,0-0,5)	4,6 bcd	ANA-6BA(0-0,5)	4,7 c	ANA-6BA(0,5-0)	0,33 de
ANA-6BA(1,5-0)	4,6 bcd	ANA-6BA(0,5-0,5)	4,6 c	COCO	0,28 de
BANANA	4,5 bcd	ANA-6BA(0-1,0)	4,5 c	ANA-6BA(1,5-1,0)	0,25 de
ANA-6BA(0-0,5)	4,4 cd	ANA-6BA(1,5-0,5)	4,5 c	BANANA	0,23 de
ANA-6BA(0-1,5)	4,4 cd	ANA-6BA(0-1,5)	4,1 c	ANA-6BA(0-0,5)	0,18 e
ANA-6BA(0-0)	4,3 cd	ANA-6BA(0,5-1,5)	4,1 c	ANA-6BA(0-1,5)	0,08 e
ANA-6BA(1,5-0,5)	4,0 d	COCO	2,6 d	ANA-6BA(0-0)	0,00 f

NH: número de hojas; NR: número de raíces; NB: número de brotes; COCO: agua de coco; BANANA: pulpa de banana; ANA: ácido naftalenacético; 6BA: N6-benciladenina.

mientras que altas dosis de KIN generaron un mayor largo de los brotes (Asghar *et al.*, 2013). En adición, Duan *et al.* (1996) verificaron que la utilización de BA en la propagación de *Phalaenopsis* spp. generó un aumento en el número de yemas por brotes,

mientras que en *Cymbidium aloifolium* (L.), BA indujo la diferenciación de un mayor número de brotes (Nayak *et al.*, 1998).

De acuerdo con los resultados, el agua de coco fue un notorio inductor del desarrollo de

partes aéreas de las plántulas de *Laeliocattleya*. Sin embargo, plántulas cultivadas en medios suplementados con agua de coco reportaron los valores más bajos de número de raíces (NR), e incluso fueron estadísticamente inferiores a plántulas cultivadas en medios sin combinaciones de reguladores o suplementos orgánicos. Trigiano y Gray (2005) sostienen que las citoquininas poseen un efecto negativo en la formación de raíces *in vitro*. Reski (2006) encontró que, en medios con altas concentraciones de KIN, las células son incitadas a traspasar de la fase G1 a S, de modo que varias proteínas en G1 dejan de ser sintetizadas. Varias de estas proteínas están relacionadas con la diferenciación y especialización celular, por tanto la inhibición de su síntesis genera que las células no lleguen a estados de especialización como la formación de primordios radicales. En células meristemáticas de *Datura innoxia* Mill. y *Daucus carota* L., la fase G1 ocurre en un menor tiempo en medios suplementados con KIN, en cuanto a las fases S, G2 y M son inalteradas. Complementariamente se ha descrito que micro-RNA de interferencia pueden generar interferencia en la síntesis de las proteínas en G1 (Thore *et al.*, 2006).

En el presente estudio el número de raíces fue superior en plántulas cultivadas en medio KC suplementado con pulpa de banana. Vyas *et al.* (2009) verificaron que la pulpa de banana (12,5%) en el cultivo de brotes de *Dendrobium lituiflorum* Lindl. induce a la multiplicación y alargamiento de raíces. Además se determinó que en *Paphiopedilum* spp. la pulpa de banana indujo el desarrollo de yemas caulinares, pero no raíces (Huang *et al.*, 2001). Esto prueba que depende de la especie es el efecto que tiene la pulpa de banana. La pulpa de banana además es recomendada en fase de plántulas para el desarrollo radicular (Shiau *et al.*, 2002), y no para germinación de semillas (Arditti *et al.*, 1982). En adición, Stancato *et al.* (2008) determinaron en tres especies de orquídeas que la pulpa de banana estimuló el desarrollo de plántulas con mayor desarrollo y materia seca total. Los resultados del estudio indicaron que un medio KC suplementado con pulpa de banana generó mayor cantidad de raíces en contraste con cualquiera de los otros tratamientos a excepción de la combinación IBA-KIN, el que tuvo un efecto estadísticamente igual. En otras especies de orquídea como *Satyrium nepalense* D. Don., se ha determinado que IBA puede ser utilizado en forma independiente en un

medio de cultivo y generar un alto porcentaje de enraizamiento (Mahendran y Narmatha-Bai, 2009). Se ha demostrado además que la aplicación *ex vivo* de la auxina IBA genera buenos resultados para enraizamiento de plantas, ya que incrementa el contenido endógeno de auxinas, y es bastante estable contra el catabolismo e inactivación por conjugación.

Las auxinas estimulan la formación de raíces, y también puede inhibir su crecimiento durante el cultivo si las concentraciones son muy altas. Esto se debe a que las auxinas estimulan la síntesis de etileno, el que inhibe el crecimiento vegetal (Triago y Gray, 2005). Los resultados indicaron que las plántulas de *Laeliocattleya* mantenidas en medio KC conteniendo altas concentraciones de IBA (sobre 0,5 mg L⁻¹), en ausencia de citoquininas, se inhibe la formación de raíces y favorece el crecimiento de estructuras aéreas. Las auxinas NAA e IBA fueron igual de eficientes para promover el crecimiento de raíces usando las tres concentraciones usadas. Sin embargo IBA parece más efectiva que NAA para inducir formación de raíces, mientras que NAA fue más eficiente para inducir producción de partes aéreas. Por el contrario, en *Cymbidium aloifolium* altas concentraciones de NAA (5 mg L⁻¹) han sido efectivas para inducir formación de raíces (Nayak *et al.*, 1998), por tanto todo tratamiento debe ser optimizado de acuerdo con la especie. En relación con los efectos de las citoquininas, en los medios suplementados con KIN se desarrolló un mayor número de raíces (y hojas) que en medios suplementados con 6BA, no obstante estos valores no fueron estadísticamente superiores a los obtenidos en los medios control (ausencia de reguladores).

Conclusión

De los resultados obtenidos se desprende que la adición de pulpa de banana a un medio de cultivo KC *in vitro* puede reproducir los efectos de auxinas (IBA o ANA), e incluso obtener mejores respuestas en el desarrollo radicular de plántulas del híbrido *Laeliocattleya*, mientras que la adición de agua de coco a un medio de cultivo KC puede simular los efectos de citoquininas (6BA o KIN) en el desarrollo de brotes y hojas. El tratamiento de agua de coco fue superior a cualquier combinación de reguladores de crecimiento y suplementos, para la producción de hojas en plántulas *Laeliocattleya* en medio KC. A pesar de que el uso de reguladores es una técnica

mayormente reproducible y exacta, desde un punto de vista comercial es más conveniente para los productores de orquídeas utilizar pulpa de banana y agua de coco debido al bajo costo en contraste a los reguladores auxinas y citoquininas.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a CAPES-Brasil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por su apoyo financiero.

Literatura Citada

- Arditti, J.; Clements, G.; Fast, G.; Hadley, G.; Nishimura, G.; Ernst, R.
1982. Orchid seed germination and seedling culture – manual. En: Arditti, J.; Clements, G.; Fast, G.; Hadley, G.; Nishimura, G.; Ernst, R. (eds.). *Orchid biology: Reviews and Perspective II*. New York: Cornell University. 390p.
- Asghar, S.; Ahmad, T.; Hafiz, I.A.; Yaseen, M.
2013. In vitro propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *Afr. J. Biotechnol.*, 10 (16): 3097-3103.
- Duan, J.-X.; Chen, H.; Yazawa, S.
1996. In Vitro Propagation of *Phalaenopsis* via Culture of Cytokinin-Induced Nodes. *J. Plant Growth Regul.*, 15: 133-137.
- Huan, L.V.T.; Takamura, T.; Tanaka, M.
2004b. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*, 166 (6): 1443-1449.
- Huang, L.-C.; Lin, C.-J.; Kuo, C.-I.; Huang, B.-L.; Murashige, T.
2001. *Paphiopedilum* cloning in vitro. *Sci. Hortic.*, 91:111-121.
- Johnson, T.R.; Stewart, S.L.; Dutra, D.; Kane, M.E.; Richardson, L.
2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)-preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant cell Tiss. Org. Cult.*, 90 (3): 313-323.
- Knudson, L.
1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Amer. Orch. Soc. Bulletin*, 15: 214-217.
- Lim, W.L.; Loh, C.S.
2003. Endopolyploidy in vanda miss Joaquim (Orchidaceae). *New Phytologist*, 159 (1): 279-287.
- Lo, S.-F.; Nalawade, S.M.; Kuo, C.L.; Chen, C.-L.; Tsay, H.-S.
2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino-a medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40: 528-535.
- Mahendran, G.; Bai, V.N.
2009. Mass propagation of *Satyrium nepalense* D. Don. A medicinal orchid via seed culture. *Sci. Hortic.*, 119 (2): 203-207.
- Murashige, T., y F. A. Skoog.
1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-497.
- Myers, R.H.; Montgomery, D.C.; Vining, G.G.
2002. Generalized linear models, with applications in engineering and the sciences. John Wiley and Sons Press, New York. USA. 342 pp.
- Nayak, N.R.; Chand, P.K.; Rath, S.P.; Patnaik, S.N.
1998. Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. Seed-derived rhizomes in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34: 185-188.
- Pateli, P.; Papafiotou, M.; Chronopoulos, J.
2003. Influence of in vitro culture medium on *Epidendrum radicans* seed germination, seedling growth and ex vitro establishment. *Acta Hortic.*, 616: 189-192.
- Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Rollemberg, C.L.; Borges, A.C.
2005. Indução in vitro da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. *Rev. Bras. Cienc. Solo*, 29: 199-206.
- Rego-Oliveira, L. do V.; Faria, R.T. de.
2005. In vitro propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Sci-Agro*. 27 (1): 1-5.
- Reski, R.
2006. Small molecules on the move: homeostasis, crosstalk, and molecular action of phytohormones. *Plant Biol.* 8 (3): 277-280.
- Roy, J.; Naha, S.; Majumdar, M.; Banerjee, N.
2007. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). *Plant cell Tiss. Org. Cult.*, 90 (1): 31-39.
- SAS. Institute Inc.
2007. SAS 9.1.3 for Windows Microsoft. SAS Institute Inc, Cary, 212 pp.
- Stancato, G.C.; Abreu, M.F.; Furlani, A.M.C.
2008. Crescimento de orquídeas epífitas in vitro: adição de polpa de frutos. *Bragantia*, 67: 51-57.
- Thore, S.; Leibundgut, M.; Ban, N.
2006. Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science*, 312 (5777): 1208-1211.
- Uribe, M.E.; Durán, R.; Bravo, G.; Mora, F.; Cartes, P.; Delaveau, C.
2011. Propagación vegetativa de *Berberidopsis corallina* Hook. F., una especie en peligro de extinción, endémica de Chile. *Gayana Bot.*, 68 (2): 135-140.
- Trigiano, R.N.; Gray, D.J.
2005. Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton-EEUU. 358 pp.
- Vyas, S.; Guha, S.; Bhattacharya, M.; Rao, I.U.
2009. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. *Sci. Hortic.* 121: 32-37.