

# EFFECTO DEL PBZ SOBRE LA BROTACIÓN Y EL DESARROLLO *IN VITRO* DE LA EPIDERMIS FOLIAR DE *Cattleya mossiae* PARKER EX HOOKER PREVIO A LA ACLIMATIZACIÓN

Jhonathan Torres<sup>1</sup> y Norca Mogollón<sup>2</sup>

## RESUMEN

*Cattleya mossiae* es una orquídea endémica de Venezuela que ha sido micropropagada en la Unidad de Biotecnología de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Las vitroplantas producidas son susceptibles a desecación y retraso en el crecimiento en condiciones *ex vitro*. El propósito del presente estudio fue observar el efecto del PBZ (Paclobutrazol) sobre la anatomía de la epidermis foliar y el desarrollo del brote de vitroplantas de *C. mossiae* durante un tratamiento de endurecimiento en el estado III de la micropropagación y su posible relación con la reducción de la susceptibilidad a la desecación en condiciones *ex vitro*. Las raíces de las vitroplantas fueron sumergidas en cuatro soluciones de (PBZ): 0, 1, 2 y 4 mg/L i.a. y colocadas en un medio con las sales minerales y vitaminas de Murashige-Skoog a una intensidad lumínica de aproximadamente  $60 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  y 16 h de fotoperíodo durante 4 semanas. Con 2 mg/L de PBZ se redujo significativamente la longitud de brote, y se observó una tendencia a incrementar el número de brotes con la concentración del producto. En el tejido epidérmico, el PBZ a 2 mg/L incrementó el ancho de las células oclusivas y a 4 mg/L redujo su longitud. A 2 mg/L se redujo el grosor de la epidermis adaxial y de la lámina foliar. El índice y la densidad estomática no fueron afectados por los tratamientos.

**Palabras clave adicionales:** Orquídeas, vitroplantas, micropropagación, biotecnología, paclobutrazol

## ABSTRACT

### Effect of PBZ on budbreak and development *in vitro* of the leaf epidermis of *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker previous to acclimatization

*Cattleya mossiae* is an endemic orchid of Venezuela, that has been micropropagated in the Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Plantlets that have been cultured *in vitro* are susceptible to rapid desiccation and delay growth at *ex vitro* conditions. The aim of the present study was to the Paclobutrazol (PBZ) effect on foliar histology and shoot development of *C. mossiae* plantlets during hardening in stage III of micropropagation and its relation with the *ex vitro* desiccation. The roots of plantlets were immersed in four PBZ solutions: 0, 1, 2, and 4 mg/L a.i. and placed in a medium with Murashige-Skoog mineral salts and vitamins formulation, at a PAR of about  $60 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  and 16 h photoperiod during four weeks. PBZ significantly reduced shoot height at 2 mg/L and a slight increase trend was observed in the shoot number with the concentration of the product. On epidermic tissue, PBZ increased width of cell guards at 2 mg/L and reduced their length at 4 mg/L. The stomata index and density were not affected. The thickness of adaxial epidermic cells and foliar layer was reduced at 2 mg/L.

**Additional key words:** Orchids, vitroplants, micropropagation, biotechnology, paclobutrazol

## INTRODUCCIÓN

Durante la aclimatización de orquídeas propagadas en condiciones *in vitro* suele ocurrir marchitamiento y retraso en el crecimiento de las vitroplantas que reducen la eficiencia de los laboratorios comerciales. La orquídea *Cattleya mossiae*, especie de interés comercial como planta de pote y paisajismo, ha sido micropropagada exitosamente en la

Unidad de Biotecnología de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", pero se ha detectado un alto porcentaje de mortalidad durante las primeras cuatro semanas de ser transferidas a condiciones *ex vitro* (Torres y Mogollón, 1998). Una alternativa para solucionar tal problemática es la aplicación de Paclobutrazol (PBZ) en la última fase de cultivo, ya que dicha sustancia ha sido reportada como inhibidora de la síntesis de giberelinas,

Recibido: Marzo 3, 2001

Aceptado: Noviembre 5, 2001

<sup>1</sup> Dpto. de Ciencias Biológicas. Decanato de Agronomía. e-mail: tajhonathan@hotmail.com

<sup>2</sup> Posgrado de Horticultura. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela.

capaz de retardar el crecimiento de cultivos e incrementar su resistencia al estrés, por lo que presenta potencial para mejorar la aclimatización (ICI, 1984; Smith et al., 1990; Eliasson et al., 1994). En este sentido, se estima que en orquídeas micropropagadas pueda incrementar la resistencia de las vitroplantas a las condiciones *ex vitro* y con ello su sobrevivencia. El presente trabajo tuvo el propósito de estudiar el efecto del PBZ sobre el desarrollo del brote y el desarrollo de la epidermis foliar de esta especie durante una fase de endurecimiento, previa a la aclimatización.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon vitroplantas de un clon de *C. mossiae* var. Color cultivadas hasta enraizamiento en el medio de Murashige-Skoog (MS) (1962), modificado por Torres y Mogollón (1998). El sistema radical de las mismas fue sumergido durante 5 minutos en soluciones de PBZ en concentraciones de 0, 1, 2 y 4 mg i.a./L. Posteriormente, las vitroplantas fueron cultivadas en un medio con las sales minerales y vitaminas de MS (1962) a 56,75  $\mu\text{mol}/\text{sm}^2$  y 16 horas de fotoperíodo. A las 4 semanas se midió el número y la longitud máxima de brotes/división. Además, se fijaron en FAA cinco muestras por cada tratamiento, con las que fueron elaboradas láminas permanentes de secciones transversales de la lámina foliar de acuerdo a la metodología clásica de Sass (1958) y Roth (1964) y montajes permanentes de epidermis elaborados mediante

hidrólisis en caliente de láminas foliares con una mezcla a partes iguales de soluciones acuosas de ácido nítrico y ácido crómico al 10% (Roth, 1964), a fin de estudiar, a nivel histológico, las alteraciones ocurridas durante el desarrollo foliar por efecto del PBZ.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se detectó efecto del PBZ sobre el número de brotes/vitroplanta, pero se observó una tendencia al incremento con 2 y 4 mg/L (Cuadro 1), en concordancia con Pathania y Sehgal (1999), quienes reportaron la optimización de la multiplicación de brotes de *Dendrobium* Sonia en el medio de Murashige-Skoog (1962) con 2  $\mu\text{mol}$  de ácido naftalenacético, 6  $\mu\text{mol}$  de benciladenina y 3,4  $\mu\text{mol}$  de PBZ. Adicionalmente, Ellington et al. (1997) encontraron que la producción de cormelos de *Colchium autumnale* fue superior en un medio con 10 mg/L de PBZ que en aquel sin regulador. Por otra parte, el incremento de la concentración de PBZ redujo la longitud de brotes/vitroplanta alcanzando su menor valor con 2 y 4 mg/L (Cuadro 1). Ello coincide con lo señalado por Smith et al. (1990) y con Roberts y Matthews (1995), quienes reportaron reducción de la longitud tallos de vitroplantas de crisantemo tratadas con 1 ó 2 mg/L de PBZ, así como con Eliasson et al. (1994), que observaron reducción de la longitud de brotes en *Prunus serotina* cultivados *in vitro* en un medio con adición de PBZ.

**Cuadro 1.** Efecto del PBZ sobre la brotación *in vitro* de *C. mossiae* durante la fase previa a la aclimatización.\*

PBZ (mg/L)	Número de brotes/vitroplanta	Longitud máxima de brotes/vitroplanta (mm)
0	2,33 ns	34,88a
1	2,44	24,22b
2	3,11	16,11c
4	3,66	18,22c
CV	7,03	1,27

\*Para valores transformados de acuerdo a la ecuación  $Y = \text{Arctan}(1+X)$ .

Prueba de Duncan al 1%

En la sección transversal de hojas de plantas tratadas con PBZ se determinó que el espesor de la epidermis adaxial y de la lámina foliar se redujeron, alcanzando los menores valores de 12,11 y 148,62  $\mu\text{m}$  respectivamente, con la dosis de 2 y 1 mg/L (Cuadro 2). Proietti et al. (1997) trabajando con plantas *ex vitro* de *Castanea sativa*, también encontraron reducción del espesor total de la lámina foliar y de la epidermis abaxial con 2 g de PBZ/planta.

Este hecho representa una reducción importante de la succulencia y un incremento de la capacidad de control de la pérdida de humedad por parte de las hojas de las vitroplantas tratadas. Por otra parte, en las superficies foliares no se observó efecto de la concentración de PBZ sobre la densidad e índice estomático (Cuadro 3). Sin embargo, Blanco et al. (1997) trabajando con plantas *ex vitro* de durazno reportaron aumento de la densidad estomática por incremento en la concentración de PBZ. Tal respuesta puede

deberse a las diferencias entre las especies y en las condiciones de cultivo. Además, se observó un incremento en el ancho de las células oclusivas, pero una reducción de la longitud y de la relación longitud/ancho (Cuadro 3), lo cual se corresponde con el trabajo de Blanco et al. (1997) señalado anteriormente, al reportar disminución del tamaño de los estomas de durazno en condiciones de campo por incremento de la concentración de PBZ aplicada. Por su parte, Zobayed et al. (1999) encontraron que los estomas de las vitroplantas de papa cultivadas bajo condiciones de fotoautotropismo presentaban capacidad de cierre, al contrario que aquellos de condiciones fotomixotrópicas; además eran más anchos y largos significativamente. De allí que las diferencias morfológicas de los estomas de las vitroplantas de *Cattleya* tratadas con PBZ, en comparación con aquellas no tratadas, se podrían interpretar como posibles señales de incremento en su capacidad de cierre.

**Cuadro 2.** Efecto del PBZ sobre el espesor de la epidermis y la lámina foliar de *C. mossiae* producidas *in vitro*.\*

PBZ (mg/L)	Espesor de epidermis adaxial ( $\mu\text{m}$ )	Espesor de lámina foliar ( $\mu\text{m}$ )
0	26,92a	224,77a
1	14,61b	148,62c
2	12,11c	159,00bc
4	14,81b	168,46b
CV	1,22	0,7

\* Para valores transformados de acuerdo a la ecuación  $Y = \arctan X$   
Prueba de Duncan al 5%

Con base en los resultados obtenidos es posible afirmar que la reducción de la longitud de los brotes, la reducción del espesor de la epidermis y la lámina foliar así como las variaciones morfológicas de los estomas, son efectos que podrían determinar una disminución del marchitamiento durante las primeras

horas de la aclimatización, lo que conllevaría a incrementar la sobrevivencia de las vitroplantas de *C. mossiae*, tal como se ha observado en vitroplantas de crisantemo (Roberts y Matthews, 1995) sometidos a tratamientos con PBZ previos a la fase de aclimatización.

**Cuadro 3.** Efecto del PBZ sobre la epidermis abaxial de *C. mossiae* producida en condiciones *in vitro*.\*

PBZ (mg/L)	Estomas/ $\text{mm}^2$	Índice estomático	Longitud células oclusivas (L) ( $\mu\text{m}$ )	Ancho células oclusivas (A) ( $\mu\text{m}$ )	L/A
0	68,8 ns	6,93ns	13,80a	4,35b	3,22a
1	60,8	6,15	13,50a	4,60b	2,96ab
2	59,2	7,63	14,75a	5,15a	2,87ab
4	54,4	7,20	12,50b	4,75ab	2,59b
CV	0,57	4,11	0,58	1,84	3,84

\*Para valores transformados de acuerdo a la ecuación  $Y = \arctan X$ .  
Prueba de Duncan al 5%

### CONCLUSIONES

La aplicación de PBZ produjo los siguientes efectos:

- Reducción de la longitud máxima de los brotes y aparentemente un leve incremento en la proliferación de los mismos.
- Reducción del grosor de la lámina foliar y la epidermis adaxial.
- Reducción de la longitud y cierto incremento del ancho de las células oclusivas.
- No afectó la densidad y el índice estomático.

### LITERATURA CITADA

1. Blanco, A., E. Monge y J. Val. 1997. Effects of Paclobutrazol on stomatal size and density in peach leaves. *Acta Horticulturae* 463: 159-162.
2. Eliasson, M., C. Beyl y P. Barker. 1994. *In vitro* responses and acclimatization of *Prunus serotina* with Paclobutrazol. *J. Plant Growth Regul.* 13: 137-142.
3. Ellington, E., T. Adserias, A. Coma, J. Bastida, F. Viladomat y C. Codima. 1997. Effect of Paclobutrazol on *in vitro* culture of *Colchium autumnale* corm. *In: Proceedings of the Third International ISHS Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding.* *Acta Horticulturae* 447: 131-133.
4. Pathania, N. y O. Sehgal. 1999. *In vitro* propagation of *Dendrobium* cv. Sonia. *Journal of Ornamental Horticulture* 2(2): 97-100.
5. Proietti, P., A. Palliotti, E. Antognozz y F. Ferranti. 1997. Patterns of anatomy differentiation, rowth and physiology activity following Paclobutrazol application in chestnut. *Acta Horticulturae* 463: 177-184.
6. ICI. 1984. Paclobutrazol, Regulador de Crecimiento Vegetal para Frutas. Imperial Chemical Industries. Surrey, Inglaterra.
7. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
8. Roth, I. 1964. *Microtecnia Vegetal.* Ediciones Biblioteca UCV. Caracas, Venezuela.
9. Roberts, A. y D. Matthews. 1995. The preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplantation to soil 5. The 2s, 3s enantiomer of Paclobutrazol improves resistance to desiccation. *Plant, Tissue and Organ Culture* 40:191-193.
10. Sass, J. 1958. *Vegetal Microtechnique.* Iowa State University Press. Iowa.
11. Smith, E., A. Roberts y J. Mottley. 1990. The preparation *in vitro* chrysanthemum for transplantation to soil. 2. Improved resistance to desiccation conferred by Paclobutrazol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21:133-140.
12. Torres, J. y N. Mogollón. 1998. Micropropagación clonal de *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 42:87-92.
13. Zobayed , S., F. Afreen-Zobayed, C. Kubota y T. Kozai. 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotropic conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 183-188.