

BIOFERTILIZACIÓN Y HORMONAS VEGETALES EN LA SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE PLANTULAS DE *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*) PRODUCIDAS *IN VITRO*

Vincenzo BERTOLINI,

CRA Istituto Sperimentale per la Floricoltura Sezione di Palermo, 90011 Bagheria (PA), ITALIA;

vinbert@infinito.it

Guillermo CARRILLO CASTAÑEDA,

Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados; 56230, Montecillo, Estado de México, MÉXICO; carrillo@colpos.mx

Juan Manuel GONZALES CAMACHO,

Instituto de Socioeconómica, Estadística e Informática, Colegio de Postgraduados; 56230, Montecillo, Estado de México, MÉXICO; jmgc@colpos.mx

RESUMEN

En la producción comercial de orquídeas es prioritario reducir la mortalidad y promover el crecimiento durante la aclimatización de plantulas recién sacadas de frasco. Para reducir la mortalidad e inducir el crecimiento de híbridos micropropagados de *Phalaenopsis*, se inoculó con *Pseudomonas fluorescens* cepa AVM o *Azospirillum brasilense* cepa UAP154 o se asperjó con soluciones 10^{-5} M de ácido giberélico (AG₃) o 6-bencilaminopurina (6-BAP) en lotes con tres edades diferentes. Los dos lotes más jóvenes inoculados con *P. fluorescens*, presentaron la mortalidad inferior (6 y 2%). En término de crecimiento el lote más anciano tratado con 6-BAP presentó mayor desarrollo.

Palabras clave: Orquídea, mortalidad, crecimiento, *Azospirillum*, *Pseudomonas*.

ABSTRACT

In commercial production of orchids, a priority is to reduce mortality and promote growth during the acclimatization of *ex-vitro* plantlets. To reduce mortality and promote growth of micropropagated *Phalaenopsis*'s hybrids, lots with three different ages were inoculated with *Pseudomonas fluorescens* strain AVM or with *Azospirillum brasilense* strain UAP154 or sprayed with 10^{-5} M solution of gibberelic acid (AG₃) or 6-bencilaminopurine (6-BAP). Two younger lots inoculated with *Pseudomonas* show better response in terms of mortality (6 y 2%). Older lot treated with 6-BAP solution had the best growth.

Key words: Orchid, mortality, growth, *Azospirillum*, *Pseudomonas*.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas del género *Phalaenopsis* son las más importantes desde comercialmente. La producción de flor y de planta constituyen 60% del mercado mundial de orquídeas (McDowell, 1997), debido a la la belleza de sus flores y a su prolongada vida en florero (Goh y Arditti, 1985). El proceso de cultivo inicia con la siembra de semilla *in vitro*; al alcanzar entre 3 y 5 cm de diámetro, las plántulas son aclimatizadas en invernadero, utilizando un sustrato adecuado. Este estadio es el más crítico en pérdidas de plántulas, pues éstas aún no han desarrollado mecanismos de defensa debido a la ausencia de estrés biótico o abiótico del cultivo *in vitro*. En consecuencia, este estadio representa el mayor riesgo para el productor; sin embargo, durante el desarrollo del cultivo también pueden presentarse pérdidas debido al ataque de microorganismos patógenos. Desde el establecimiento del cultivo a la floración de las plantas transcurren de 2 a 3 años.

De manera natural las orquídeas establecen relaciones simbióticas con hongos micorrízicos (Batty *et al.*, 2000; Yoder *et al.*, 2000) cuyos efectos positivos se demuestran en diversas especies (Markovina y McGee, 2000). Similarmente, las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus* se han utilizado para promover el desarrollo de las plantas. Las células bacterianas colonizan el área de crecimiento de las raíces y tienen múltiples expresiones bacterianas que benefician a la

planta: 1) promover la interacción entre las raíces de las plantas con los hongos micorrízicos (Wilkinson *et al.*, 1989, 1994); 2) ejercer acción bioprotectora porque la presencia de algunos tipos de bacterias atenúa o impide la acción destructiva de los organismos patógenos, así, *P. fluorescens* se ha utilizado en el control biológico debido su efecto inhibitorio contra microorganismos patógenos (Inam-ul-Haq *et al.*, 2003; Lindow y Suslow, 2003); 3) facilitar a la planta la asimilación de sales inorgánicas y minerales; 4) promover el desarrollo vegetal, ya que además de colonizar la zona de las raíces, producen reguladores como el ácido indolacético (AIA) que es aprovechado por la planta; 5) facilitar la asimilación de nitrógeno porque *A. brasilense* fija el nitrógeno atmosférico y produce reguladores de crecimiento (Hamaoui *et al.*, 2001; Velasco *et al.*, 2001; Ravi *et al.*, 2004); especies del género *Pseudomonas* favorecen la absorción de nutrimentos y el desarrollo de la planta (Tenuta, 2003). En *Brassica napus* L., inoculada con células bacterianas se incrementa el desarrollo de las raíces, la producción de biomasa y la acumulación de aceites en las semillas, debido a la presencia AIA (Asghar *et al.*, 2004).

Por estas razones, el uso de estas especies bacterianas es conveniente, reduce el uso de agroquímicos y su impacto ambiental negativo (Zhender *et al.*, 1997; Tenuta, 2003). El uso de estos microorganismos es relativamente reciente y se requiere profundizar el conocimiento de la fisiología de las relaciones planta-hongo-bacteria. Además, el uso de auxinas y giberelinas mejora el desarrollo de las plántulas en el periodo de adaptación en un ambiente natural y en invernadero (Brasch, 1999). Las citocininas estimulan la división celular la cual promueve el crecimiento vegetal, la morfogénesis, la expansión foliar, y el desarrollo de los cloroplastos, mejorando el desarrollo vegetativo (Davies, 1995).

Por tanto, los objetivos del presente estudio fueron determinar la eficacia de la aplicación de microorganismos promotores del crecimiento y de reguladores de crecimiento en tres diferentes estadios de desarrollo de plántulas de *Phalaenopsis*, con la finalidad de promover la sobrevivencia y el crecimiento, así como identificar el estadio de desarrollo más oportuno para su tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del experimento. El experimento se realizó de mayo a noviembre de 2006 en un invernadero en la ciudad de Texcoco, Estado de México, a 19° 23' N, 98° 39' O y altitud de 2241 m. Se utilizaron tres poblaciones de plántulas de híbridos comerciales de *Phalaenopsis* en diferentes etapas de desarrollo: 1) 80 individuos, recién aclimatizados, con un tiempo cero de desarrollo en invernadero (población E0); 2) 240 individuos con 6 meses de desarrollo (población E6); 3) 100 individuos con 12 meses de desarrollo (población E12). La energía lumínica (medida con un aparato SLM-110 A.W. Sperry®) en el periodo de estudio fue 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plántulas se cultivaron en recipientes de plástico (10 cm de diámetro) con un sustrato a base de corteza de pino. Todas las plántulas recibieron un fertirriego semanal y un riego semanal con agua destilada, con un consumo de agua por plántula y por semana de 140 mL. La solución 20-20-20 de macronutrientes se preparó con agua destilada y Tricel 20® (Cosmocel S. A., México), empleando 1 g L⁻¹. Las plántulas identificadas se cambiaron de lugar a intervalos semanales de manera aleatoria, para disminuir el efecto del gradiente ambiental al interior del invernadero.

Para cada lote de plantas E0, E6, y E12 se aplicaron cinco tratamientos (dos bacterias, dos hormonas y un testigo) como se describe en el Cuadro 1. La inoculación se realizó el 16 de mayo de 2006 atomizando 1 L de suspensión bacteriana (10⁹ células mL⁻¹) por tratamiento, en la parte basal del tallo y en las raíces. Se hicieron cuatro aspersiones (1 L por tratamiento) de solución de hormonas en hojas y tallo, el 16 y 27 de mayo y el 13 y 27 de junio 2006.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos

Tratamientos	Inoculación con suspensiones bacterianas:	Aspersión con soluciones 10 ⁻⁵ M:	Población inicial (número individuos)			Población final (número individuos)		
			E0	E6	E12	E0	E6	E12
T0 (testigo)	-	-	16	48	20	10	37	19
T1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AVM	-	16	48	20	11	41	14
T2	<i>Azospirillum brasilense</i> UAP 154	-	16	48	20	10	41	19

T3	-	Acido giberélico (AG ₃)	16	48	20	11	42	20
T4	-	Benciladenina (6-BAP)	16	48	20	9	36	17
Total			80	240	100	51	197	89

Las variables de respuesta, medidas al inicio del experimento y cada treinta días durante los seis meses del experimento, fueron: mortalidad (M), el % de individuos muertos respecto al total inicial; incremento promedio del número de hojas (Nh), donde Nh es la diferencia entre el número de hojas del mes i ($i=1,2,\dots,6$) y el mes inicial $i=0$; incremento promedio del diámetro de la plántula (Dp) en mm, donde Dp es la diferencia entre el diámetro de la plántula en el mes i ($i=1,2,\dots,6$) y el mes $i=0$. El diámetro de la plántula se define como la distancia entre los extremos de las hojas opuestas (Figura 1), mediante un calibrador electrónico digital (CALDI-6MP, Truper[®] S.A de C.V.).



Figura 1. Modalidad de determinación del diámetro de la plántula.

Análisis estadístico. El análisis estadístico de los datos se realizó considerando cada población de manera independiente. El análisis de la mortalidad debido al efecto de tratamiento se basó en el análisis de los porcentajes de individuos muertos durante el experimento (Cuadro 1). Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento se consideró un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos e igual número de repeticiones inicial, para cada población E0, E6 y E12 (Cuadro 1). Para

cada mes i de observación, el número de repeticiones por tratamiento disminuyó debido a la muerte de plántulas. Se utilizó el procedimiento GLM (SAS, V8) fue utilizado para efectuar los análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$). Este procedimiento permitió hacer el análisis del experimento con repeticiones desiguales, en los casos en que se registraron individuos muertos (Martínez Garza, 1994).

Dado que el mayor interés de este estudio fue evaluar el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de *Phalaenopsis* al término de los seis meses, únicamente se reporta el análisis estadístico para noviembre del 2004. Además se presentan las gráficas que muestran la evolución temporal de las variables para cada población estudiada, considerando en cada mes las plántulas que sobrevivieron durante todo el experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mortalidad de plántulas. En la población E0, la mortalidad de plántulas en los individuos tratados con *Pseudomonas* (T1) fue 6.3% en octubre, a diferencia de los tratamientos T0, T4 y T2 que registran mayor grado de mortalidad ($M = 18.8\%$) desde el primer mes (Figura 2). Así la inoculación de las plántulas E0 con *Pseudomonas*, puede considerarse una práctica útil para proteger de las plántulas.

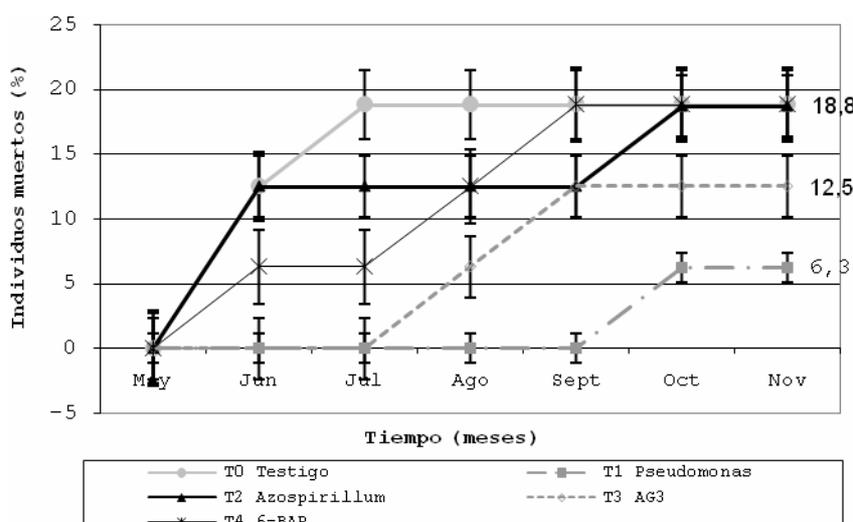


Figura 2. Evolución de la mortalidad de *Phalaenopsis*, población E0.

En la población E6, la mortalidad se registra desde el primer mes del experimento y es menor que en la población E0, a excepción del tratamiento con 6-BAP (T4) con

una mortalidad de 16.7% (Figura 3). En la población E12, solo las plántulas tratadas con *Pseudomonas* (T1) registran una mortalidad de 10% a los 6 meses (no se ilustra gráficamente).

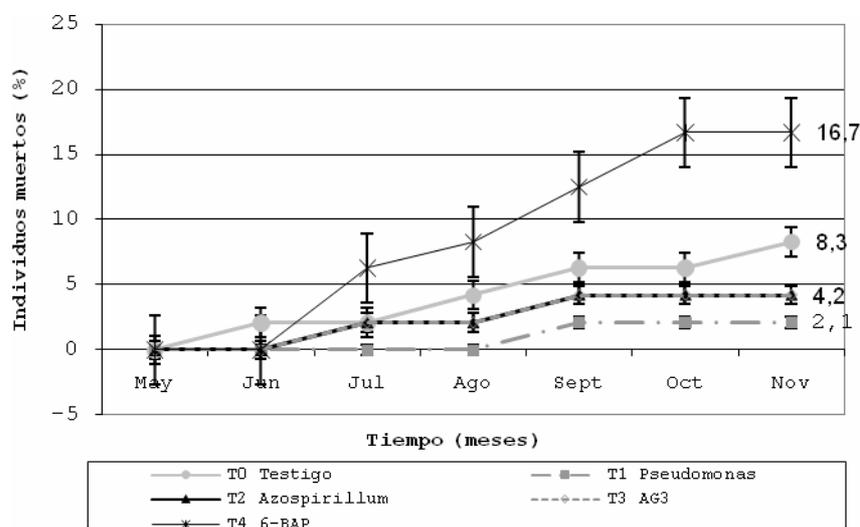


Figura 3. Evolución de la mortalidad de *Phalaenopsis*, población E6.

En la población E0 se registra la mayor mortalidad y se constata la máxima diferencia entre plántulas inoculadas con células de *Pseudomonas* ($M = 6.3\%$) y las plántulas testigo ($M = 18.8\%$). En consecuencia, para reducir al máximo la mortalidad de plántulas, la inoculación debe realizarse en la etapa inicial del desarrollo. Estos resultados coinciden con que las plántulas de orquídea recién transplantadas del frasco de cultivo *in vitro* que no han recibido agresión alguna y sin mecanismos de defensa desarrollados, son más susceptibles al ataque de microorganismos patógenos.

La utilización de *Pseudomonas* como biofertilizante produce antibióticos que protegen a las plantas contra el ataque de bacterias patógenas (Tenuta, 2003). Además las bacterias promotoras del crecimiento son importantes para reducir el ataque por *Erwinia tracheifila* (Zhender *et al.*, 1997). Sin embargo, en la población E12 ocurrió lo contrario ya que solo algunas plántulas del tratamiento con *Pseudomonas* (T1) murieron. La protección que *Pseudomonas* puede brindar a las plántulas tiene límites, pues no puede funcionar contra cualquier eventualidad. Wilkinson *et al.* (1989 y 1994) señalan que las plantas de orquídea en invernadero pueden ser colonizadas por células bacterianas nativas.

La población E0 inoculada con *Azospirillum* (T2), tuvo una mortalidad similar a la de las plántulas testigo en los últimos meses de evaluación ($M = 18.8\%$), debido a

que la acción fundamental de *Azospirillum* es fijar nitrógeno atmosférico más que bioproteger mediante la producción de antibióticos (Velasco *et al.*; 2001). La inoculación con *Azospirillum* de la población E6, tuvo resultados positivos en la sobrevivencia (M = 4.2%), aunque de menor impacto que *Pseudomonas*. La mortalidad se reduce debido a que la fijación del nitrógeno, inducida por *Azospirillum*, es más eficiente para producir plántulas mejor nutridas y más resistentes. La utilización de AG₃ (T3) para reducir la mortalidad, tuvo resultados positivos en las poblaciones E0 (M = 12.5%) y E6 (M = 4.2%). Según Brasch (1999), el uso de auxinas y giberelinas promueve el desarrollo de la planta y su aclimatización en condiciones de invernadero.

Crecimiento de plántulas. Incremento promedio del número de hojas. La población E0 no presenta diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.019$) con respecto a la producción foliar. Similarmente la población E6, no presenta diferencias significativas ($p>0.05$) entre tratamientos con relación al incremento promedio del número de hojas Nh en noviembre(Figura 4).

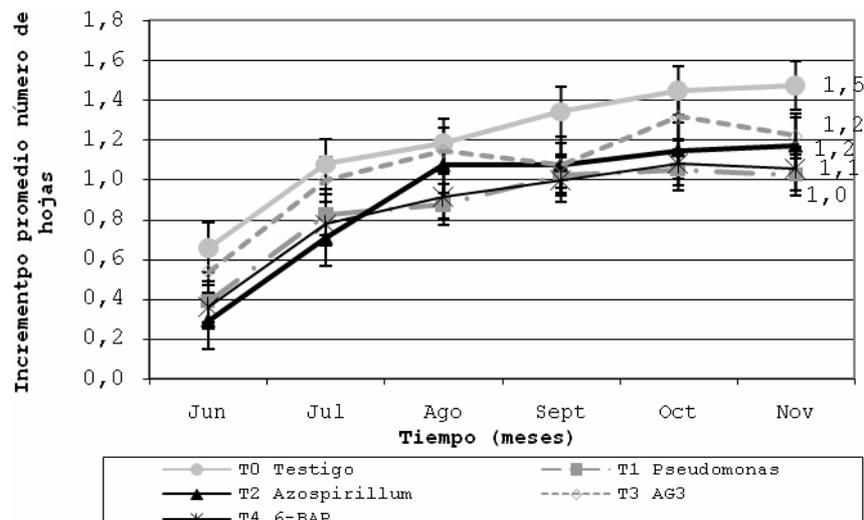


Figura 4. Evolución del incremento promedio del número de hojas de *Phalaenopsis*, población E6.

En noviembre en la población E12 no hubo una diferencia significativa ($p>0.525$) entre tratamientos. En la figura 5 se muestra el comportamiento de esta variable para cada tratamiento aplicado.

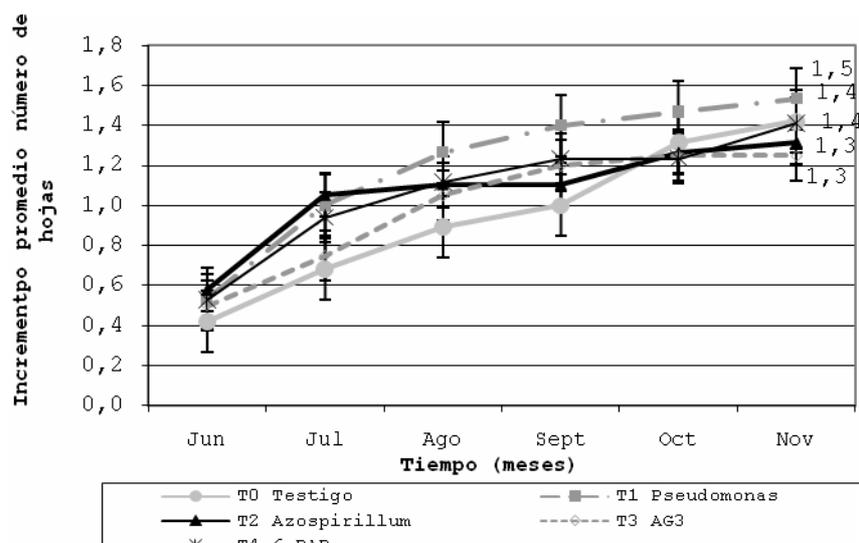


Figura 5. Evolución del incremento promedio del número de hojas de *Phalaenopsis*, población E12.

Diámetro promedio de la plántula. En la población E0 el incremento promedio del diámetro de plántulas (Dp), no tuvo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.752$) en noviembre. La inoculación con *Pseudomonas* (T1) presenta un incremento promedio del Dp de 6.1 mm, mientras que en el tratamiento testigo (T0) Dp fue 6.0 mm. En contraste, en la población E6, el incremento del diámetro de plántula presentó diferencias significativas ($p \leq 0.003$) entre tratamientos (Cuadro 2 y Figura 6).

Cuadro 2. Análisis de varianza, incremento promedio del diámetro de plántula Dp, mes de noviembre, población E6.

FV	GL	SC	CM	Fc	Pr > F	T	Media	N
Modelo	4	12145.8	3036.5	4.22	0.0028	T0	54.2A	35
Error	173	124506.8	719.7			T3	48.5A	41
Corregido total	177	136652.6				T1	39.8A	36
CV %	62					T4	32.3B	32
RCME	26.8					T2	30.8B	34

Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

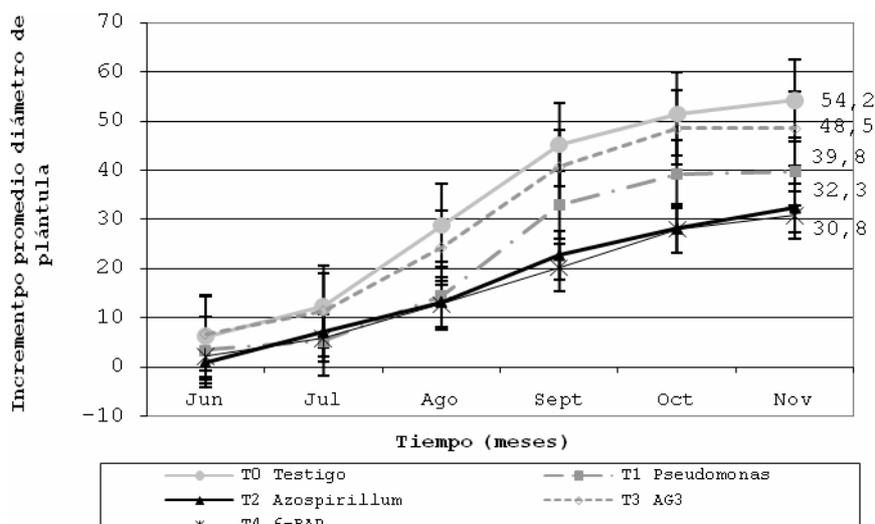


Figura 6. Evolución del incremento promedio del diámetro de plántula de *Phalaenopsis*, población E6.

En la población E12 el incremento promedio del diámetro promedio de plántula (Dp) no fue diferente ($p > 0.05$) entre tratamientos (Figura 7).

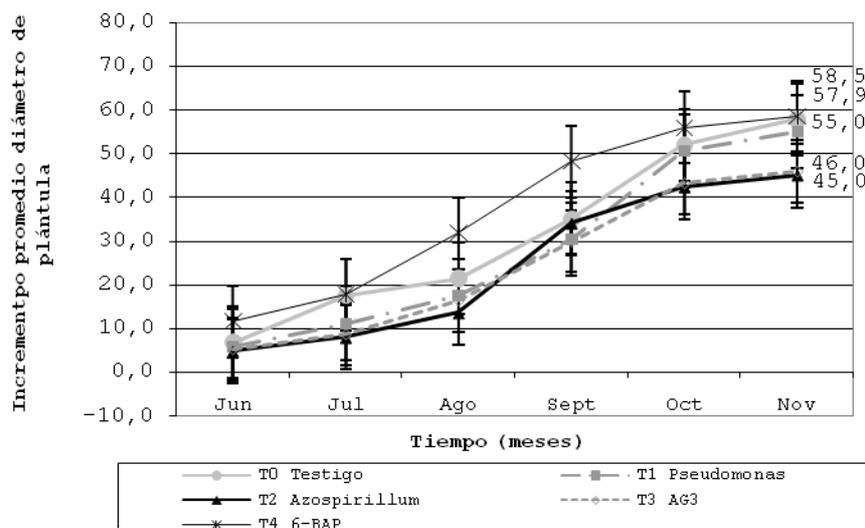


Figura 7. Evolución del incremento promedio del diámetro de la plántula en la población E12.

Con base en los resultados se constata que el crecimiento, en las tres poblaciones estudiadas (E0, E6 y E12), no fue diferente ($p > 0.05$) entre tratamientos. Esto no coincide con los resultados de Wilkinson *et al.* (1994), quienes observaron un efecto promotor del crecimiento de estas bacterias debido a un efecto sinérgico con hongos micorrízicos. Los resultados obtenidos con el tratamiento con AG₃ (T3) no concuerdan con los de Goh y Arditti (1985) ni con Brasch (1999), quienes encontraron que esta hormona

favorece la adaptación de las plántulas tratadas a nuevas condiciones ambientales y la emisión de hojas en orquídeas monopodiales. El tratamiento con 6-BAP (T4) tampoco promovió el crecimiento en las poblaciones E0 y E6. En este estudio se esperaba un efecto positivo del tratamiento con *Azospirillum* (T2) debido a su capacidad para mejorar la fijación de nitrógeno (Pérez-Zamora y Cigales-Rivero, 2001); sin embargo, sus efectos no se evidenciaron.

Respecto al desarrollo vegetativo, en la población E12 los el tratamiento hormonal AG₃ (T3) causó un efecto inferior al testigo (Dp = 46.0 mm), mientras que, el tratamiento 6-BAP (T4) fue el más favorable (Dp = 58.5 mm, p>0.05). Una posible causa podría ser el nivel de concentración de las hormonas. La concentración de 6-BAP posiblemente fue muy alta para la población E0, lo cual inhibió en vez de estimular su desarrollo, ya que esta hormona estaba presente en el medio de cultivo *in vitro* de las plántulas. En cambio, en la población E12, el nivel utilizado de 6-BAP podría ser el óptimo para la promoción de desarrollo vegetativo.

CONCLUSIONES

La inoculación con bacterias promotoras del crecimiento para mejorar la sobrevivencia de *Phalaenopsis* es una aplicación biotecnológica reciente y prácticamente desconocida en orquídeas. En este trabajo, la sobrevivencia de plántulas de *Phalaenopsis* aumentó significativamente con la inoculación con células de *Pseudomonas*. El momento de la inoculación de las plántulas de orquídeas, en relación con su estado de desarrollo, es determinante ya que ésta se efectúa al inicio del establecimiento del cultivo se reduce la mortalidad de plántulas. El impacto real que tiene este tratamiento está por determinarse, si se considera que en los invernaderos se concentran grandes poblaciones de plantas del mismo tipo y que la presencia de una planta enferma puede ocasionar la mortalidad masiva.

LITERATURA CITADA

Asghar, H. N.; Zahir, Z. A.; Arshad, M. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield and oil contents of canola (*Brassica napus* L.). *Austr. J. Agric. Res.*, v.55, p.187-194, 2004.

Batty, A. L.; Dixon, K. W.; Sivasithamparam, K. Soil seed-bank dynamics of terrestrial orchids. *Lindleyana*, v.15, n.4, p.227-236, 2000

Brasch, J. D. *Ex situ* management of orchid species using plant growth regulators. *Orchid Cons. News* v.2, p.14-15, 1999.

Davies, P. J. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. 883p., 1995.

Goh, C. J.; Arditti, J. Orchidaceae. *In: CRC Handbook of Flowering*. Vol. I. Halevy A.H. (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. p. 309-336, 1985.

Hamaoui, B.; Abbad, J. M.; Burdman, S.; Rashid, A.; Sarig, S.; Okon, Y. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* v.21, p.553-560, 2001.

Inam-ul-Haq, M.; Javed, N.; Ahmad, R.; Rehman, A. Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biological control of *Fusarium* Wilt Chickpea. *Pak. J. Plant Pathol.* v.2, n.1, p.65-74, 2003.

Lindow, S. E.; Suslow, T. V. Temporal dynamics of the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in flowers in inoculated pear trees. *Phytopathol.* v.93, p.727-737, 2003.

Markovina, A. L.; McGee, P. A. Comparison of symbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandae; Orchidaceae). *Lindleyana* v.15, n.2, p.68-72, 2000.

Martinez Garza, A. Experimentación Agrícola: Métodos estadísticos. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 357 p. 1994.

McDowell, D. Beginner's choice. *Orchids. The Magazine Am. Orchids Soci.* v.66, n.1, p.18-24, 1997.

Pérez-Zamora, O.; Cigales-Rivero, M. Tensión de humedad del suelo y fertilización nitrogenada en melón cantaloupe. *Agrociencia* v.35, p.479-488, 2001.

Ravi, S.; Gadagi, P.; Krishnaraj, U.; Kulkarni, J. H.; Sa, T. The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Scientia Horticulturae* v.100, p.323-332, 2004.

Tenuta, M. The plant growth promoting Rhizobacteria: prospects to increasing nutrient acquisition and diseases control. Department of Soil Science, University of Manitoba, Canada. http://www.umanitoba.com.ca/afs/agronomists_conf/2003/pdf/tenuta_rhizobacteria.pdf, 2003. (consultado en Julio 2005)

Velasco V. J.; Ferrera-Cerrato, R.; Almaraz S. J. J. Vermicomposta, micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cáscara. *Terra* v.19, p.241-248, 2001.

Wilkinson, K. G.; Dixon, K. W.; Sivasithamparam, K. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytol.* v.112, p.429-435, 1989.

Wilkinson, K. G.; Sivasithamparam, K.; Dixon, K. W.; Fahy, P. C. ; Bradley, J. K. Identification and characterisation of bacteria associated with western australian orchids. *Soil Biol. Biochem.* v.26, n.1, p.137-142, 1994.

Yoder, J. A.; Zettler, L. W.; Stewart, S. L. Water requirement of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Sci.* v.156, p.145-150, 2000.

Zhender, G.; Kloepper, J.; Yao, C.; Wie, G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Econ. Entomol.* v.90, n.26, p.391-396, 1997