

Uso de Thidiazuron (TDZ) para la micropropagación de *Phalaenopsis* spp.

Use of Thidiazuron (TDZ) for the micropropagation of *Phalaenopsis* spp

Laura Lucia Parismoreno Rivas¹, Erika Vanessa Zamora Quimiz¹, Reina Concepción Medina Litardo¹, Iris Betzaida Pérez Almeida^{2*}

¹ Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias, Ecuador.

² Universidad ECOTEC, Centro de Estudios para el Desarrollo Sostenible (CEDS) Samborondón, Ecuador.

*Autor de correspondencia: iperez@ecotec.edu.ec

Resumen

Ecuador es reconocido por presentar una gran diversidad de orquídeas. *Phalaenopsis* es una epífita cultivada para el corte de flores y como ornamental. Su multiplicación vegetativa es lenta y laboriosa, adicionalmente las semillas botánicas expresan amplia variabilidad fenotípica, poco uniforme en sus características. La propagación *in vitro* se presenta como una alternativa conveniente tanto para su multiplicación como su conservación. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de la citocinina sintética Thidiazuron (TDZ) en la inducción de brotes durante la micropropagación de *Phalaenopsis*. Se establecieron cuatro tratamientos aplicando dosis de 0; 0.25; 0.5; 1.5 mg·L⁻¹ de TDZ en medio de cultivo Murashige-Skoog (1962) esterilizado, suplementado con vitaminas de Morel y Wetmore (1951); cisteína (0.3 mg·L⁻¹); sacarosa (30 g·L⁻¹); gentamicina 20 mg; Phyton 4 gotas y solidificado con Phytigel 2.2 g·L⁻¹ usando un diseño completamente al azar con 7 repeticiones, para la siembra de los explantes consistentes en yemas axilares de la vara floral. Noventa días después de la siembra se evaluaron las variables número de

Abstract

Ecuador is known for harboring a great diversity of orchids. *Phalaenopsis* is an epiphyte cultivated for cutting flowers and as an ornamental. Its vegetative multiplication is slow and laborious, while botanical seeds express wide phenotypic variability, not very uniform in their characteristics. *In vitro* propagation appears as a convenient alternative both for its multiplication and its conservation. The objective of this research was to evaluate the use of Thidiazuron (TDZ) in the shoot induction during the micro-propagation of *Phalaenopsis*. Four treatments were established applying doses of 0; 0.25; 0.5; 1.5 mg·L⁻¹ TDZ in sterilized Murashige-Skoog (1962) culture medium, supplemented with Morel-Wetmore (1951) vitamins; cysteine (0.3 mg·L⁻¹); sucrose (30 g·L⁻¹); gentamycin 20 mg; 4 drops of Phyton and solidified with Phytigel 2.2 g·L⁻¹ using a completely randomized design with 7 repetitions, for the planting of the explants consisting of axillary buds of the flower rod. Ninety days after sowing the variables number of shoots, number of leaves, leaf length (mm) and leaf diameter (mm) were evaluated. It was found that with the TDZ dose of

brotos, número de hojas, longitud de la hoja (mm) y diámetro de hoja (mm). Se encontró que con la dosis de TDZ de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se obtuvo el mayor número de brotes, con un promedio de 3 brotes/explante. Esta dosis también estimuló el mayor número de hojas y longitud, produciendo una media de 5 hojas y 3.86 mm respectivamente; mientras que la dosis de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presentó el mayor diámetro de hojas con un promedio de 5.76 mm. Los resultados mostraron que fue posible establecer *in vitro* yemas axilares del escapo floral de esta orquídea, mediante una rigurosa selección del material vegetativo inicial, desinfección, preparación de medios de cultivos adicionando TDZ y siembra aséptica. Se concluye que el TDZ estimula la proliferación de brotes axilares, favoreciendo el proceso de multiplicación vegetativa de *Phalaenopsis*.

Palabras claves: citocinina, orquídeas, cultivo *in vitro*, multiplicación asexual.

Introducción

Las orquídeas son una familia de plantas que se distingue por su belleza, diversidad de formas y complejidad de sus flores. Ocupan una posición de privilegio entre plantas con flores comerciales, llegando a alcanzar un alto valor monetario en mercados internacionales (Kalimuthu et al., 2017). Entre 2018 y 2019, Ecuador exportó orquídeas por un valor de \$14,370.58 y \$38,253.70 millones de dólares, respectivamente; con un precio por kilogramo de flor exportada de USD 16.87 por kilo (Expoflores, 2019).

Ecuador fue declarado "País de las Orquídeas" en 2013, mediante Acuerdo Ministerial, orientado a fortalecer el desarrollo del turismo de naturaleza y ecoturismo, tomando nuevas iniciativas locales,

$0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ the highest number of shoots was obtained, with a mean of 3 shoots by explant. This dosage also stimulated the greatest number of leaves and length, producing an average of 5 leaves and 3.86 mm respectively; while the dose of $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presented the largest diameter of leaves with an average of 5.76 mm. The results showed that it was possible to establish *in vitro* axillary buds of the floral scape of this orchid, through a rigorous selection of the initial vegetative material, disinfection, preparation of culture media adding TDZ and aseptic seeding. It is concluded that TDZ stimulates the proliferation of axillary shoots, favoring the vegetative multiplication process of *Phalaenopsis*.

Keywords: cytokinin, orchids, *in vitro* culture, asexual multiplication.

Introduction

Orchids are a family of plants that is distinguished by its beauty, diversity of forms and complexity of its flowers. They occupy a privileged position among commercial flowering plants, reaching a high monetary value in international markets (Kalimuthu et al., 2017). Between 2018 and 2019, Ecuador exported orchids worth 14,370.58 and 38,253.70 million dollars, respectively; with a price per kilogram of exported flower of USD 16.87 per kilo (Expoflores, 2019).

Ecuador was declared "Country of Orchids" in 2013, through Ministerial Agreement, aimed at strengthening the development of nature tourism and ecotourism, taking new local, provincial and national initiatives for conservation (Andrade, 2015); the largest number of species corresponds to terrestrial ones, followed by epiphytes. Among this plant wealth there are about 4,300 species of orchids, that is to say that almost one in four

provinciales y nacionales para la conservación (Andrade, 2015); el mayor número de especies corresponde a las terrestres, seguido por las epífitas. Entre esta riqueza vegetal se cuentan unas 4,300 especies de orquídeas, es decir que casi una de cada cuatro especies de plantas que crecen en los hábitats silvestres de Ecuador es una orquídea y representan más del 18 % del total de especies de orquídeas del mundo (Sánchez y Rodríguez, 2018). A pesar de que el país es reconocido por presentar una gran diversidad de orquídeas; muchas de las especies están en peligro de extinción. La deforestación ha provocado serios daños especialmente en las poblaciones de orquídeas epífitas, las cuales, al ser tan especializadas en su ecología, se ven seriamente afectadas por los cambios ambientales (Placencia, 2010).

Phalaenopsis es una orquídea epífita, originaria del sureste de Asia, India, Indonesia y parte de Australia. Presenta un crecimiento monopodial; carece de pseudobulbos; las hojas son dísticas y carnosas. Las flores son de diferentes tamaños y colores, lo cual les confiere un aspecto muy atractivo como planta ornamental (Chen y Lin, 2012). La mayoría de estas especies son reproducidas por semillas, en consecuencia, se expresa un amplio espectro de variabilidad fenotípica, con diferencias en la forma de crecimiento, tiempo de floración y hasta en las características florales (Feria et al., 2017).

El Thidiazuron (TDZ) se usa como herbicida sintético y como regulador de crecimiento para plantas; posee un alto rango de estimulación para la proliferación de brotes axilares en muchas especies maderables y plantas herbáceas. El TDZ promueve el crecimiento vegetativo (hojas) debido

species of plants that grow in the wild habitats of Ecuador is an orchid and they represent more than 18% of the total species of orchids in the world (Sánchez and Rodríguez, 2018). Despite the fact that the country is recognized for presenting a great diversity of orchids; many of the species are in danger of extinction. Deforestation has caused serious damage, especially in the populations of epiphytic orchids, which, being so specialized in their ecology, are seriously affected by environmental changes (Placencia, 2010).

Phalaenopsis is an epiphytic orchid, native to Southeast Asia, India, Indonesia, and part of Australia. It has a monopodial growth; lacks pseudobulbs; the leaves are distal and fleshy. The flowers are of different sizes and colors, which gives them a very attractive appearance as an ornamental plant (Chen and Lin, 2012). Most of these species are reproduced by seeds, consequently, a wide spectrum of phenotypic variability is expressed, with differences in the form of growth, flowering time and even in the floral characteristics (Feria et al., 2017).

Thidiazuron (TDZ) is used as a synthetic herbicide and as a growth regulator for plants; it has a high stimulation range for the proliferation of axillary shoots in many timber species and herbaceous plants. TDZ promotes vegetative growth (leaves) due to its biological activity that is similar to an N-substituted cytokinin and also induces the synthesis and accumulation of endogenous cytokinins (Zahoor and Fahem, 2009).

The natural or sexual propagation of orchid seeds requires symbiosis with a specific fungus to achieve germination; as a result, its most important organs develop leaves and roots. In order to respond to the growth in demand for *Phalaenopsis*,

a su actividad biológica que es similar a una citocinina N-sustituida y también induce a la síntesis y acumulación de citocininas endógenas (Zahoor y Fahem, 2009).

La propagación de manera natural o sexual de las semillas de las orquídeas necesita de simbiosis con un hongo específico para alcanzar la germinación; como resultado se desarrollan sus órganos más importantes hojas y raíces. Para poder responder el crecimiento de la demanda de *Phalaenopsis*, es necesario optimizar los procesos de producción con el fin de asegurar que se libere al mercado el producto en cantidad suficiente y de alta calidad (Hew y Yong, 2015).

La propagación natural de *Phalaenopsis* es difícil y demanda de bastante tiempo; las técnicas de cultivo *in vitro* han permitido obtener grandes volúmenes de *Phalaenopsis* con el objetivo de producir plantas a gran escala para el comercio. Sin embargo, es indispensable la utilización de medios de cultivos simples, que permitan disminuir los costos de producción. No obstante, el éxito también depende del tipo de explante a utilizar (Tirado et al., 2015).

En este trabajo se estudia la micropropagación vegetal de la orquídea *Phalaenopsis* a partir de varas florales evaluando el uso de la citocinina sintética TDZ en la inducción de brotes vegetativos.

Materiales y Métodos

Material vegetal. Fueron seleccionadas varas florales con yemas axilares donde se encuentran los entrenudos que se utilizan para realizar la micropropagación del material vegetal (Figura 1A). El corte se realizó en los sitios donde estaban ubicadas las yemas neoformadas (Figura 1A).

it is necessary to optimize production processes in order to ensure that the product is released in sufficient quantity and of high quality to the market (Hew and Yong, 2015).

The natural propagation of *Phalaenopsis* is difficult and time consuming; *In vitro* culture techniques have made it possible to obtain large volumes of *Phalaenopsis* with the aim of producing plants on a large scale for trade. However, the use of simple culture media is essential to reduce production costs. However, success also depends on the type of explant to be used (Tirado et al., 2015).

In this work, the plant micropropagation of the *Phalaenopsis* orchid from flower rods is studied, evaluating the use of cytokinin TDZ in the induction of vegetative shoots.

Materials and methods

Vegetal material. Floral rods with axillary buds were selected where the internodes that are used to carry out the micropropagation of the plant material are found (Figure 1A). The cut was made at the sites where the newly formed buds were located (Figure 1A).



Figura 1. Vara floral de *Phalaenopsis*. A. Se muestran las yemas axilares y sitios de corte para la obtención de micro-estacas. B. Se muestran las micro-estacas listas para ser desinfectadas.

Figure 1. *Phalaenopsis* flower rod. A. The axillary buds and cutting sites for obtaining micro-stakes are shown. B. The micro-stakes are shown ready to be disinfected.

El proceso de corte consistió en tomar con pinza y realizar los cortes con ayuda de un bisturí, obteniendo las micro-estacas (Figura 1B), que se iban colocando sobre una toalla absorbente previamente esterilizada. Se obtuvieron 18 micro-estacas de diferentes tamaños antes de proceder a la desinfección (Figura 1B).

Desinfección de explantes

Se colocaron las micro-estacas en un Erlenmeyer de 500 mL; luego fueron enjuagadas con agua corriente como primer paso; posteriormente se

The cutting process consisted of taking with forceps and making the cuts with the help of a scalpel, obtaining the micro-stakes (Figure 1B), which were placed on a previously sterilized absorbent towel. Eighteen micro-stakes of different sizes were obtained before proceeding to disinfection (Figure 1B).

Explant disinfection

The micro-stakes were placed in a 500 mL Erlenmeyer flask; then they were rinsed under running water as a first step; subsequently, they

lavarón con jabón líquido bactericida más agua destilada estéril, dos gotas de Phytón (Marketing Arm International, USA) más cuatro gotas de Tween 20 (Fisher, USA), por 3 min ya que el exceso de este producto puede producir quemaduras al tejido. Una vez que se observó que el tejido estaba libre de espuma se colocó en 100 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 20 % (3.5 % i.a.) con 4 gotas de Tween 20 por 10 min para la eliminación de microorganismos. Finalmente se realizaron 4 enjuagues con agua destilada estéril.

Medios de cultivo. El medio de cultivo utilizado para la inducción de yemas neoformadas fue preparado con las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con vitaminas de Morel y Wetmore (1951); cisteína ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); gentamicina 20 mg; Phytón 4 gotas y solidificado con Phytigel (Sigma-Aldrich, USA) $2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como agente gelificante; el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 , antes de la esterilización en autoclave durante 20 min a $1.2 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de presión y $120 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura.

Tratamientos. Se establecieron cuatro tratamientos aplicando Thidiazuron (Sigma-Aldrich, USA) (TDZ) en dosis de 0; 0.25; 0.5; $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ añadiéndose al medio de cultivo antes de ajustar el pH a 5.7.

were washed with bactericidal liquid soap plus two drops of Phytón (Marketing Arm International, USA) plus four drops of Tween 20 (Fisher, USA), using sterile distilled water, for three minutes, since the excess of this product can cause burns to the tissue. Once it was observed that the tissue was free of foam, it was placed in 100 mL of a 20 % sodium hypochlorite solution with 4 drops of Tween 20 for 10 min to eliminate microorganisms. Finally, 4 rinses were performed with sterile distilled water.

Culture media. The culture medium used for the induction of newly formed buds was prepared with the salts of Murashige y Skoog (1962) (MS) supplemented with vitamins from Morel and Wetmore (1951); cysteine ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); sucrose ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); gentamicin 20 mg; 4 drops of Phytón and solidified with Phytigel (Sigma-Aldrich, USA) $2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ as a gelling agent; pH was adjusted to 5.7 ± 0.1 , before sterilization in autoclave for 20 min at $1.2 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ pressure and $120 \text{ }^\circ\text{C}$ temperature.

Treatments. Four treatments were established applying Thidiazuron (TDZ) (Sigma-Aldrich, USA) in doses of 0; 0.25; 0.5; $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to the culture medium before adjusting the pH to 5.7.

***In vitro* seeding of explants**

The explants were inoculated into containers with culture medium for induction of axillary bud formation (Figure 2A; 2B).

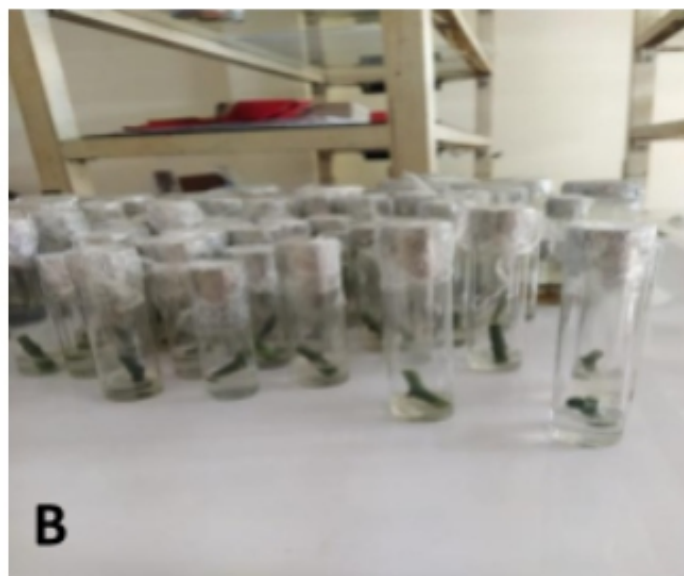


Figura 2. A. Fase inicial de siembra aséptica de micro-estacas de *Phalaenopsis*. B. Micro-estacas en medio de cultivo listas para ser ubicadas en los estantes de crecimiento.

Proliferación de yemas. Una vez elongados los brotes (fase de inducción), se subcultivaron los explantes con 0.5 a 1 mm de diámetro y se sembraron dos explantes por frasco (unidad experimental) en los medios de cultivo seleccionados para el desarrollo de las plantas, los cuales se incubaron a 25°C con fotoperiodo de 16h de luz/día. Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia dentro de la campana de flujo laminar. Los frascos con los explantes se colocaron en la sala de incubación y se subcultivaron cada 30 días en el respectivo medio de cultivo.

Diseño del experimento.

Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 7 repeticiones. Se realizó el análisis de varianza y se compararon las medias mediante la prueba de Duncan al 5%, con el paquete estadístico el paquete estadístico SAS (Versión 9.2 para Windows, SAS Institute, USA).

Bud proliferation. Once the shoots were elongated (induction phase), the explants with 0.5 to 1 mm in diameter were subcultured and two explants per bottle (experimental unit) were seeded in the culture media selected for the development of the plants, which were incubated at 25 ° C with a photoperiod of 16h of light / day. The entire process was carried out under aseptic conditions inside the laminar flow hood. The flasks with the explants were placed in the incubation room and subcultured every 30 days in the respective culture medium.

Experimental Design

A completely randomized design with 4 treatments and 7 repetitions was used. Analysis of variance was performed and the means were compared using Duncan's test at 5%, with the statistical package SAS (Version 9.2 for Windows, SAS Institute, USA).

Analyzed parameters. In each experimental unit the average number of shoots; average number of

Parámetros analizados. En cada unidad experimental se determinó el promedio del número de brotes; promedio del número de hojas; longitud de hoja (mm) promedio; y el promedio de diámetro de hoja (mm). Las evaluaciones se realizaron a los 90 días después de la siembra de los explantes.

Resultados y Discusión

Para favorecer la micropropagación vegetativa de la orquídea *Phalaenopsis* a partir de micro-estacas extraídas a partir de las varas florales, se establecieron diferentes tratamientos aplicando varias dosis de la citocinina TDZ, en medios de cultivo, experimentos que nos permitieron obtener los resultados resumidos en el Cuadro 1.

sheets; average blade length (mm); and average blade diameter (mm) was determined. Evaluations were carried out 90 days after sowing the explants.

Results and Discussion

To favor the vegetative micropropagation of the *Phalaenopsis* orchid from micro-cuttings extracted from the flower rods, there were established different treatments by applying various doses of the cytokinin TDZ in culture media; the results of the experiments are summarized in Table 1.

Cuadro 1. Efecto de los tratamientos aplicados de Thidiazuron (TDZ) sobre inducción *in vitro* de brotes y crecimiento vegetativo de *Phalaenopsis* spp

Table 1. Effect of the Thidiazuron (TDZ) treatments applied on the *in vitro* induction of shoots and vegetative growth of *Phalaenopsis* spp.

Tratamiento	Concentración de TDZ	Valores promedio**			
		Nº de brotes	Nº de hojas	Longitud de hojas (mm)	Diámetro de hojas (mm)
1	0.00 mg·L ⁻¹	1 b	2 b	1.70 b	3.57
2	0.25 mg·L ⁻¹	3 a	5 a	3.86 a	3.57
3	0.50 mg·L ⁻¹	2 ab	4 a	3.03 a	5.76
4	1.50 mg·L ⁻¹	2 ab	3 ab	3.14 a	4.71
Significancia		**	**	**	n.s.
Media		2	4	2.93	4.40
Coeficiente de Variación (C.V.) %		4.57	4.38	29.66	4.43

*Medias seguidas de letras distintas son estadísticamente diferentes según la prueba de Duncan (p = 0,05).

Número de brotes. Se observó el mayor número de brotes con un promedio de 3 brotes en el tratamiento 2 (TDZ) en dosis de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, igual estadísticamente a los tratamientos 3 (TDZ en dosis de $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y 4 (TDZ en dosis de $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con un promedio de dos brotes respectivamente ($p = 0.05$), difieren estadísticamente del tratamiento testigo el cual presentó el menor número de brotes con un promedio de un brote. En la Figura 3 se muestran brotes obtenidos con el tratamiento 2.

Number of shoots. The highest number of outbreaks, with an average of 3, was observed with Treatment 2 (TDZ) in a dose of $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, statistically similar to treatments 3 (TDZ in doses of $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and 4 (TDZ in doses of $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) with an average of 2 outbreaks each respectively, they differ statistically ($p = 0.05$) from the control treatment in which it was observed the least number of outbreaks with an average of 1. In Figure 3 the sprouts obtained with treatment 2 are shown.



Figura 3. Explantes de orquídeas *Phalaenopsis* mostrando brotes vegetativos.

Figure 3. *Phalaenopsis* orchid explants showing vegetative shoots.

Número de hojas. - El tratamiento 2 (TDZ en dosis de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) generó el mayor número de hojas con un promedio de cinco, igual estadísticamente a los tratamientos 3 (TDZ en dosis de $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y 4 (TDZ en dosis de $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con un promedio de cuatro y tres hojas respectivamente; difieren estadísticamente del tratamiento testigo ($p = 0.05$), donde se presentó

Number of sheets. Treatment 2 (TDZ in doses of $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) generated the highest number of leaves with an average of 5 leaves, statistically similar to treatments 3 (TDZ in doses of $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and 4 (TDZ in doses of $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) with an average of 4 and 3 leaves respectively, these data differ statistically ($p = 0.05$) from the control treatment, in which the lowest average number of

el menor promedio de número con dos hojas (Cuadro 1). Resultado que coincide con Ernst (1994), quien encontró que al aumentar la dosis de TDZ, se ven afectadas negativamente la cantidad de hojas por explantes de *Phalaenopsis*.

Longitud de hojas. – En el tratamiento 2 de TDZ en dosis de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se obtuvo la mayor longitud de hojas con un promedio de 3.86 mm, igual estadísticamente a estadísticamente a los tratamientos 3 (TDZ en dosis de $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y 4 (TDZ en dosis de $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con un promedio 3.03 y 3.14 mm respectivamente, difieren estadísticamente ($p = 0.05$) del tratamiento testigo en el cual se observó el menor promedio de longitud de hoja con 1.70 mm (Figura 8). Chen y Chang (2001) investigando el efecto de las hormonas en *Oncidium* mencionan que el TDZ ha sido una citocinina utilizada en cultivos de tejidos de plantas para estimular la formación de brotes y lograr mayor cantidad de hojas.

Diámetro de hoja. - A pesar de no presentar significancia estadística ($p = 0.05$), el tratamiento 3 de TDZ en dosis de $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ indujo el mayor diámetro de la hoja con un promedio de 5.76 mm, el tratamiento 2 (TDZ en dosis de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y testigo obtuvieron el menor promedio del diámetro de la hoja con 3.57 mm respectivamente (Figura 9). Resultado que coincide con Zahoor y Fahem (2009), quienes estudiaron la micropropagación de la papa y mencionan que el TDZ promueve el crecimiento vegetativo, principalmente formación de hojas, debido a su actividad biológica que es similar a una citocinina natural.

Conclusiones

Se logró establecer una metodología para propagar *in vitro* la orquídea *Phalaenopsis* spp., en

leaves with 2 leaves was observed (Table 1). These results are in agreement with Ernst (2014), who found that the number of leaves was negatively affected in *Phalaenopsis* explants.

Length of sheets. Treatment 2 of TDZ in a dose of $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ obtained the longest leaf length with an average of 3.86 mm, statistically the same as treatments 3 (TDZ in doses of $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and 4 (TDZ in doses of $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) with an average 3.03 and 3.14 mm respectively, differing statistically ($p = 0.05$) from the control treatment that yielded the lowest average leaf length with 1.70 mm (Figure 8). Chang and Cheng (2015) mentioned that TDZ could be used in plant tissue culture to stimulate shoots and to achieve a greater number of leaves.

Blade diameter. Despite not presenting statistical significance ($p = 0.05$), TDZ treatment 3 at a dose of $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ induced the largest leaf diameter with an average of 5.76 mm; treatment 2 (TDZ in doses of $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and the control obtained the smallest average of the diameter of the leaf with 3,57 mm respectively (Figure 9). These results coincide with those of Zahoor and Fahem (2009), working in potato micropropagation. They mentioned that TDZ promotes vegetative growth, mainly leaf formation, due to its biological activity, which is similar to a natural cytokinin.

Conclusions

It was possible to establish a methodology to propagate *Phalaenopsis* spp orchids *in vitro*, in a MS nutrient medium, from micro-cuttings from flower rods, obtaining favorable results with the application of the cytokinin Thidiazuron.

According to the results obtained, it is concluded what the application of TDZ in doses of $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ yielded the highest number of shoots with an average of three shoots; also the highest number

medio nutritivo MS, a partir de micro-estacas provenientes de varas florales, obteniéndose resultados favorables con la aplicación de la citocinina sintética Thidiazuron.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye lo que la aplicación de TDZ en dosis de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, indujo el mayor número de brotes con un promedio de tres brotes; asimismo con esta dosis se obtuvieron los mejores valores promedios de número de hojas formadas y de la longitud de las mismas, con cinco hojas y 3.86 mm respectivamente.

Los esquejes tratados con la aplicación de TDZ en dosis de $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presentaron el mayor diámetro de la hoja con un promedio de 5.76 mm.

Se concluye que el TDZ estimula la proliferación de brotes axilares, favoreciendo el proceso de multiplicación clonal de *Phalaenopsis* para la obtención de mayor número de plantas.

and length of leaves was obtained with this dose with an average of 5 leaves and 3.86 mm respectively.

Cuttings treated with an application of TDZ in doses of $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presented the largest diameter of the blade with an average of 5.76 mm.

It is concluded that TDZ stimulates the proliferation of axillary shoots, favoring the clonal multiplication process in *Phalaenopsis* in order to obtain a larger number of plants.

Literatura Citada

Andrade, L., 2015, Desarrollo de un modelo de marca para el lanzamiento y crecimiento sustentable de orquídeas en el sector Cumbayá. Trabajo de titulación de grado. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en:

Chang, C., and Cheng, W.C., 2015, Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misercor*, *Plant Cell Report*, vol. 17, no. 4, pp. 251-255. DOI: 10.1007/s002990050387

Expoflores. 2019. Informe Anual de Exportaciones. Ecuador. Disponible en:

Chen, J.T., and Chang, W.C., 2001, Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Growth Regulation*, vol. 34, no. 2, pp. 229 - 232. DOI:10.1023/A:1013304101647

Chen, C., and Lin, S.R., 2012, CO₂ uptake patterns in *Phalaenopsis amabilis*. *African Journal of Agricultural Research*, vol. 7, no. 1, pp. 128-141. DOI: 10.5897/AJAR11.1221.

Ernst, R., 1994, Effects of Thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, vol. 39, no. 3, pp. 273-275. DOI: 10.1007/BF00035982

Feria, M., Chávez, M. and Quiala, E., 2017, Establecimiento *in vitro* de *Phalaenopsis*, *Biotecnología Vegetal*, vol. 7, no. 1, pp. 27-33.

Hew, C. and Yong, J. W., 2015. The physiology of tropical Orchids in relation to the industry. 2^{da} ed. World Sci. Publ., Singapore. 370 pp. DOI: 10.1142/9789812819871_0004

Kalimuthu, K., Senthilkumar, R. and Vijayakumar, S., 2017, *In vitro* micropropagation of orchid *Oncidium* sp. (Dancing Dolls), *African Journal Biotechnology*, vol. 6. no. 10, pp. 1171-1174.

Morel, G. and Wetmore, R.H. 1951, Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany*, vol. 38, pp. 138-140.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473-497.

Sánchez, A. E. and Rodríguez, K. S., 2018, Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí, Ecuador, *Revista Ecovida*, vol. 8, no. 1, pp. 64-83.

Placencia, M., 2010., Efecto de dos fitohormonas en la fase de introducción de la orquídea *Epidendrum* sp. bajo condiciones *in vitro*, Trabajo de titulación. Universidad Técnica del Norte. Ecuador. Disponible en:

Tirado, J., Naranjo, J. and Atehortua, L., 2015, Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA", *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 7, no. 1, pp. 25-31.

Zahoor, A.S and Faheem, A., 2009. Effect of thidiazuron (TDZ) on *in vitro* micropropagation of *Solanum tuberosum* L. cvs. Desiree and cardinal, *Pakistan Journal of Botany*, vol. 41, no. 4, pp. 1811-1815.