

Cultivo *in vitro* de la orquídea *Chysis bractescens* Lindley

Xóchitl Esmeralda Toledo Espinosa, Carolina Orantes García*, Alma Gabriela Verdugo Valdez

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente N°1150, Colonia Lajas Maciel, Código Postal 29039, Chiapas, México. Autor de correspondencia*, e-mail: c_orantes@hotmail.com

RESUMEN

Se desarrolló un procedimiento de cultivo *in vitro* para inducir brotes, hojas y raíces en las plántulas de *Chysis bractescens* (Orchidaceae) regeneradas a partir de protocormos derivados de semillas en un medio base Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido α -naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) y 6-benziladenina (BA). Se obtuvo un máximo de 1.2 brotes con 1mg/l ANA+3mg/l BA. Un máximo de 5.73 raíces en cada brote se obtuvo con 1 mg/l ANA + 1 mg/l AIA y un máximo de 6.73 hojas con 1mg/l ANA+3mg/l BA. El ANA fue el factor principal que controló la inducción y la elongación de los brotes, hojas y raíces. Se determinó que no es necesaria la adición de reguladores de crecimiento para promover la longitud del protocormo.

Palabras clave. *Chysis bractescens*, reguladores de crecimiento vegetal, micropropagación, inducción de brotes.

ABSTRACT

A method was developed for inducing *in vitro* culture shoots, leaves and roots of seedling *Chysis bractescens* (Orchidaceae) protocorms regenerated from seeds derived from a Murashige and Skoog basal medium (MS) supplemented with α -naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-acetic acid (IAA) and 6-benzyladenine (BA). Were obtained a maximum of 1.2 shoots with 1mg / l ANA +3 mg / l BA. A maximum of 5.73 in each sprout roots was obtained with 1 mg / l ANA + 1 mg / l IAA and a maximum of 6.73 with 1mg / l ANA +3 mg / l BA of leaves. The ANA was the main factor that controlled the induction and elongation of shoots, leaves and roots. Was determined that it is not necessary to add growth regulators to promote protocorm length.

Key words. *Chysis bractescens*, plant growth regulators, micropropagation, shoot induction

INTRODUCCIÓN

Chysis bractescens Lindley pertenece a la familia Orchidaceae. El uso ornamental de esta especie ha incrementado su demanda, pero la pérdida natural de su hábitat destruido por la deforestación hace que actualmente se encuentre catalogada como una especie amenazada dentro de la NOM-059-ECOL-2001 (*Diario Oficial*, 2002). La micropropagación podría ser una técnica útil y viable para cultivar *C. bractescens* ya que ofrece la posibilidad de producir miles de plantas del clon deseado. El desarrollo de un protocolo de micropropagación eficiente puede desempeñar un papel significativo en el cultivo comercial de especies de plantas amenazadas (Amoo *et al.*, 2009). Mediante la micropropagación con otras especies amenazadas se han obtenido buenos resultados (Bopana y Saxena, 2008). En la micropropagación los reguladores

de crecimiento son muy importantes. Se ha estudiado la influencia de diferentes dosis de benzilaminopurina (BA) y ácido α -naftalenacético (ANA), en el medio de cultivo MS en *Cattleya aurantiaca*, se obtuvo la mejor respuesta en cuanto a multiplicación de brotes en el medio suplementado con 10mg/l de BA y 0.1 mg/l de ANA, mientras que el medio suplementado con 10 mg/l de ANA ofreció el mejor desarrollo de plántulas (Mauro *et al.*, 1994). En la micropropagación de protocormos de *Lycaste aromatica*, se observó que el AIB (ácido indolbutírico) en concentraciones de 14.76 y 49.21 μ M, estimularon el crecimiento de raíces además de promover la elongación del vástago y crecimiento del pseudobulbo; 0.46 μ M de cinetina provocaron la elongación del vástago, de la raíz y el incremento diametral del pseudobulbo. La interacción de AIB (14.68 μ M) y cinetina (0.46 μ M) fomentaron el crecimiento y desarrollo de la longitud del vástago, la longitud de la

raíz más larga, número de raíces y el máximo diámetro del pseudobulbo (Ruiz, 1999). Para *Guarianthe skinneri* la interacción de 6-benziladenina (BA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido α -naftalenacético (ANA) y ácido giberélico (GA3), propició la formación y elongación de brotes y raíces (Coello *et al.*, 2010). El presente estudio se realizó para determinar las concentraciones óptimas de ANA, AIA y BA para obtener la mayor longitud del protocormo, el aumento en el número de brotes, hojas y raíces de las plántulas de *C. bractescens* cultivadas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección de cápsulas y cultivo de *C. bractescens*. Las cápsulas se recolectaron en la Reserva de la Biosfera Selva El Ocote a 16° 55' 50" latitud norte y 93° 25' 7.5" latitud oeste a 708 msnm en Chiapas, México. Cinco cápsulas se lavaron durante 5 min con agua y jabón comercial. Las cápsulas fueron desinfectadas en una solución al 1% de agri-mycin 500 con base en estreptomicina+oxitetraciclina+sulfato tribásico de cobre (Pfizer®) durante 20 min en agitación constante. Se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, inmerso en 70% (v/v) de etanol durante 5 min en agitación constante, nuevamente se enjuagó con agua destilada estéril por 3 veces, en seguida se sumergió en una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 10% (m/v) de durante 20 min y se lavaron 6 veces con agua destilada estéril. 50 frascos de cristal tipo gerber® de 150 cm³ que contenían 25 ml de MS suplementado con 20 gr de sacarosa, 10 ml de quelatos, 50 mg/l -cystene, 0.5 g/l polovinil polipirrolidona y solidificado con 2.5 g de Phytigel, para evitar oxidación se agregó 1g/l de carbón activado, se esterilizaron a 1.5 kg cm⁻² durante 15 min. En los frascos con el medio esterilizado se colocaron las semillas desinfectadas, se sellaron con polietileno (kleen pack®) y fueron incubados en una cámara bioclimática con temperatura de 25° ± 2° C y fotoperíodos controlados de 16/8 h-luz/oscuridad a una intensidad lumínica de 1800 lux. Las semillas germinaron a los 43 días, a 63 días inició la fase de diferenciación de los protocormos (figura 1a,b,c,d,e), los protocormos desarrollados a los 72 días fueron trasladados 3 protocormos en cada frascos de cristal que contenían 25 ml del mismo medio MS suplementado con los reguladores de crecimiento. Los frascos fueron incubados en una cámara bioclimática con temperatura de 25° ± 2° C y fotoperíodos controlados de 16/8 h-luz/oscuridad a una intensidad lumínica de 1800 lux.

Para investigar los efectos del ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolacético (AIA) y la 6-benciladenina (BA) sobre la longitud del protocormo (mm), número de

brotes, número de hojas y números de raíces, se utilizó un diseño experimental factorial- Ortogonal L9 (3³) (Ross, 1989), se obtuvieron 9 tratamientos, siendo los factores ANA, AIA y BA en proporción de 0.0, 1.0 y 3.0 mg/l. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento, siendo el total de 45 unidades experimentales. La duración del experimento fue de 3 meses. Las características de las plántulas se sometieron a un análisis unidireccional de varianza (ANOVA) para probar las diferencias significativas. Los análisis de estos últimos se realizaron con el programa estadístico Statgraphics plus 5.1 enterprice edition (1999).

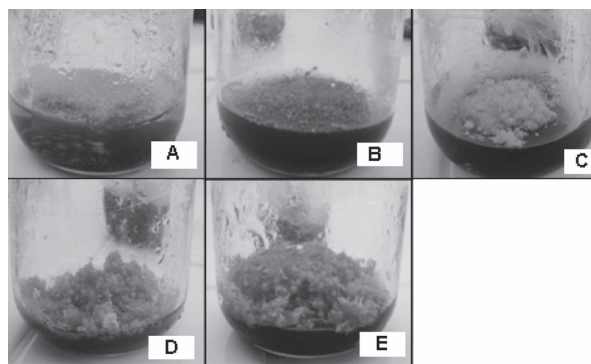


FIGURA 1

Micropropagación de *Chysis bractescens*. A) Siembra, B) germinación de las semillas (43 días), C) 53 días después de la siembra, D) Crecimiento de los protocormos (63 días), E) diferenciación de los protocormos (72 días).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del efecto de las hormonas en el crecimiento y desarrollo de *C. bractescens*

Longitud del protocormo

A los 28 días las plántulas del tratamiento 5 adicionado con 1mg/L de ANA y de AIA, eran las de mayor altura (cuadro 1), según Bidwel (2004) las auxinas en ausencia de citocininas provocan el alargamiento celular en los tejidos cultivados. Al comparar los valores promedio finales de las alturas de las plántulas, se encontró que las plántulas en el tratamiento sin la adición de fitorreguladores alcanzaron 1.64 mm de elongación del tallo (cuadro 2) (figura 2). Hubo un retraso significativo en el crecimiento longitudinal de las plántulas en los tratamientos 6 y 9. Murashige y Skoog (1962) mencionan que un exceso de auxinas puede suprimir la división celular y aun el crecimiento celular, los tratamientos antes mencionados promovieron un efecto negativo de auxinas sobre la

altura de las plántulas, debido a que contenían 1mg/L ANA+3mg/L AIA+1mg/L BA y 3mg/L ANA+3mg/L AIA respectivamente (cuadro 2). Las plántulas de los tratamientos 2, 3, 4, 7, y 8 donde se daba la interacción de auxina-citocinina presentaron una altura por debajo de 0.625mm (cuadro 2); esto concuerda con lo dicho por Bidwel (2004), cuando las auxinas están en presencia de citocininas se obtiene una división celular mediada citocinínicamente.

Bidwell (2004), afirma que el balance entre auxinas y citocininas es un factor muy importante en la regulación del crecimiento por alargamiento o por división celular. En este caso, *C. bractescens* no precisa adición exógena de fitorreguladores, porque posiblemente produce endógenamente la cantidad que requiere para su alargamiento longitudinal.

Miceli (1999) encontró que una concentración nula de 2,4-D es adecuada para promover un mayor crecimiento en la planta de *E. cochleata*, así como la cinetina en concentración de 0.5 mg/L promovió el crecimiento de las plántulas aunque disminuye con el incremento de la concentración. El análisis estadístico (cuadros 3 y 4) señalo que las concentraciones que se requieren de fitorreguladores, con la finalidad de obtener un óptimo incremento en la longitud del protocormo en *Chysis bractescens* es 0 mg/L ANA + 3 mg/L AIA + 0 mg/L BA.

Número de hojas

La mayor proliferación de hojas se obtuvo en el tratamiento 4 adicionado con 1mg/L ANA+3mg/L BA, lo cual coincide con Hurtado y Merino (1987) pues las citocininas estimulan la formación de las hojas. Asimismo los resultados concuerdan con Velásquez (1999) quien al adicionar 1mg/L de BA en *Nicolaia elatior* obtuvo desarrollo de hojas largas y Micelli (1999) al trabajar con la orquídea *Encyclia cochleata* encontró que con respecto a la longitud de la hoja el uso de 2,4-D demostró efecto inhibitorio y la cinetina (0.5, 2.5 y 5 mg/L) influyó de manera proporcional en la longitud, este incremento fueron inversamente proporcionales a la concentración de la auxina.

Weaver (1976) sostiene que probablemente las citocininas se sintetizan en las puntas de las raíces y se desplazan por el xilema hacia las hojas donde desempeñan importantes funciones en el metabolismo y envejecimiento. En el tratamiento 9 adicionado con 3mg/L AIA+3mg/L ANA la presencia de hojas fue nula.

Torres (1989) menciona que los altos niveles de auxinas tienden a suprimir o reducir la morfogénesis, siendo comúnmente el ANA menos inhibitorio para la morfo-

génesis que el AIA. En tanto Salisbury y Ross (1978), consideran que comúnmente la auxina AIA promueve el crecimiento de hojas, tal es el caso de los resultados obtenidos por Coello *et al.*, (2010) quienes obtienen que los reguladores ANA, AIA y BA (3:3:3 mg/L) promovieron una mayor longitud de las hojas en *Guarithe skinneri*. De igual forma Paek y Yeung (1991), obtuvieron formación y desarrollo de hojas en rizomas de *Cymbidium forrestii* al aplicar la auxina ANA y la 6-benciladenina favoreció la formación de tallos y hojas. Por tanto, se observa que el efecto de las auxinas no es genérico para todas las especies y se comprueba que existe especificidad en tipo y concentración de la auxina adicionada. Según los datos arrojados por el análisis estadístico (cuadros 3 y 4) las concentraciones óptimas de fitorreguladores en las plántulas de *C. bractescens* para la producción de hojas debe ser 0mg/L ANA + 3 mg/L AIA + 3 mg/L BA.

Número de raíces

Las plántulas del tratamiento 5 adicionado con 1 mg/L ANA + 1 mg/L AIA, presentaron un efecto favorable en número de raíces; mientras que en los tratamientos donde las concentraciones de estas auxinas eran elevadas se causo un efecto de inhibición sobre la aparición de raíces (cuadro 2). Velázquez (1999), observó que el enraizamiento *in vitro* de *Nicolaia elatior* fue promovido satisfactoriamente con 0.3 mg/L de ANA. Weaver (1976), sostiene que aun cuando no se puede esperar que las citocininas estimulen el desarrollo de las raíces, ya que por lo común estimulan el desarrollo de brotes y se oponen al enraizamiento, se han presentado algunos informes en el sentido de que las bajas concentraciones de citocininas estimulan la iniciación de las raíces. Con base en lo obtenido se coincide con Weaver (1976), quien afirma que la auxina ANA es usada con frecuencia en la promoción de las raíces, este compuesto es tóxico y debe evitarse en concentraciones excesivas ya que provoca daños a la planta, pero resulta más efectivo que el AIA, pues éste es muy inestable en las plantas. También se coincide con Pierik (1990), quienes encontraron al trabajar con *Gerbera jamesonii* que la auxina AIA a altas concentraciones (5mg/L) provocó un crecimiento pobre de raíces mientras que ANA a bajas concentraciones (1mg/L) provocó un crecimiento favorable de raíces adventicias en raíces *in vitro*.

Hartmann y Kester (2000), especifican que la adición de auxinas a baja concentración estimula el crecimiento de las plántulas. Pierik (1990) mostró cómo el ANA promovió la formación de raíces en plántulas de algunas bromeliáceas, que a su vez estimularon el crecimiento de la plántula. También demostraron que la mayor parte de

las plantas necesitan auxinas para conseguir una regeneración radial eficaz y que esta necesidad no es constante ya que después de la iniciación de la raíz (para la que se necesita elevada concentración de auxina) el desarrollo de los primordios radicales requiere una baja concentración, por ejemplo, en *Asparagus officinalis*, el alargamiento de las raíces adventicias disminuyó a medida que se fue aumentando la concentración de ANA.

Se asume entonces que con *C. bractescens* también sucede lo que menciona Pierik (1990) al sostener que con el tiempo AIA se descompone a la luz, lo que significa que los primordios radicales producidos pueden desarrollarse posteriormente con facilidad, por lo cual esta auxina se utiliza frecuentemente para el enraizado de las plantas herbáceas. Asimismo se coincide con lo obtenido por Hurtado y Merino (1987) quienes afirman que el papel de las citocininas en el crecimiento de las raíces es extremadamente limitado, pues al tratar secciones de cultivo de raíz adicionadas con una citocinina combinada con auxinas da como resultado la estimulación de la división celular, lo que normalmente no conduce a un incremento en la elongación de la raíz pero sí a una estimulación en la división de las células que están destinadas a diferenciarse en tejidos vasculares.

Bidwell (2004), menciona que probablemente las citocininas participan en el control del desarrollo del sistema vascular en las raíces, aspecto que no se ha determinado exactamente. El análisis estadístico (cuadros 3 y 4) indicó que las concentraciones óptimas de fitorreguladores para obtener raíces en *Chysis bractescens* es 1 mg/L ANA + 3mg/L AIA + 0mg/L BA.

Número de brotes

En relación con el número brotes se observó una mayor proliferación en el tratamiento 4 adicionado con 1mg/L ANA+3mg/L BA y un efecto negativo en el tratamiento 9 adicionado con 3mg/L AIA+3mg/L ANA. La 6-benciladenina promovió la formación de brotes, pero a mayor concentración de auxinas (ANA y AIA) se

acrecentaba la inhibición, lo anterior concuerda con De Klerk (2002) cuando menciona que la mayor parte de las plantas necesitan citocininas para la formación de brotes adventicios, mientras que las auxinas impiden esta formación. Coincide también con Pierik (1990) quien menciona que la 6-benciladenina, es posiblemente la más eficaz en promover la formación de brotes adventicios en muchas plantas.

Los resultados obtenidos concuerdan con Velásquez (1999) quien al trabajar con *Nicolaia elatior* y adicionarla con 0.3 mg/L ANA y 1 mg/L BA obtuvo el mayor número de brotes y también un incremento considerable en la longitud de los mismos. Según el análisis estadístico (cuadro 3) las concentraciones óptimas de fitorreguladores para la obtención de brotes en *C. bractescens* es adicionando al medio nutritivo 0mg/L ANA + 1mg/L AIA + 3mg/L BA.

CONCLUSIONES

- La germinación de las semillas de *C. bractescens* se obtuvo a los 43 días.
- Para su crecimiento longitudinal las plántulas de *C. bractescens* no necesitan adición de fitorreguladores.
- Con una alta concentración de citocinina y baja de auxina (1mg/L ANA+3mg/L BA) se obtuvo una mayor proliferación de hojas.
- Concentraciones bajas de auxinas presentaron un efecto favorable en número de raíces (1 mg/L ANA + 1 mg/L AIA). El mayor número de raíces se obtuvo con 1 mg/L ANA + 1 mg/L AIA
- La interacción de citocinina/auxinas provocó un efecto negativo en producción de raíces.
- Altas concentraciones de BA promueven la formación de brotes (1mg/L ANA+3mg/L BA), pero a mayor concentración de auxinas la inhibición se acrecienta.
- Un exceso de auxinas provoca inhibición del crecimiento longitudinal, de hojas y de raíces en plántulas de *C. bractescens*.

Tratamiento	ANA	AIA (mg/L)	BA	Long. protocormo (mm)	Nº de hojas	Nº de raíces	Nº de brotes
1	0	0	0	1.64	4.46	3.53	0.33
2	0	1	1	0.55	1.40	0	0.26
3	0	3	3	0.51	1.33	0.40	0.13
4	1	0	3	0.56	6.73	0.46	1.20
5	1	1	0	1.35	3.80	5.73	0.46
6	1	3	1	0.24	1.13	0	0.06
7	3	0	1	0.62	4.53	0	0.06
8	3	1	3	0.52	2.66	0	0.33
9	3	3	0	0.21	0	0	0

CUADRO 1

Efectos de diferentes concentraciones de ácido naftalenacético, ácido indolacético y 6-benciladenina, sobre el crecimiento y desarrollo en plántulas de *C. bractescens* cultivadas *in vitro*.

Factor	Long. protocormo			Nº de hojas			Nº de raíces			Nº de brotes		
	Promedio global: 0.69			Promedio global: 2.72			Promedio global: 1.13			Promedio global: 0.295		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
ANA	0.94	0.81	0.32	5.24	2.09	0.82	1.34	1.91	0.13	0.53	0.29	0.07
AIA	0.80	0.45	0.83	2.22	2.71	3.22	1.18	0.16	2.04	0.18	0.49	0.22

CUADRO 2

Promedios de la longitud del vástago, número de hojas, raíces y brotes en plántulas de *C. bractescens* cultivada *in vitro* y adicionada con los 3 reguladores del crecimiento (nivel 1=0mg/L, nivel 2=1mg/L y nivel 3=3mg/L).

Factor	Long. de protocormo		Nº de hojas		Nº de raíces		Nº de brotes	
	Óptimo	C*	Óptimo	C*	Óptimo	C*	Óptimo	C*
ANA	1	0.25	1	2.53	2	0.78	1	0.24
AIA	3	0.14	3	0.50	3	0.92	2	0.19
BA	1	0.38	3	0.33	1	1.96	3	0.19
Total		1.46		6.07		4.79		0.92
Ga*		0.69		2.71		1.13		0.30
Incremento		0.77		3.35		3.66		0.62

C*= Contribución GA*= Grand average

CUADRO 3

Niveles óptimos calculados en los diferentes factores para el crecimiento y desarrollo de las plantas de *C. bractescens* cultivada *in vitro*.



FIGURA 2 Plántulas de *C. bractescens* obtenidas a los 84 días, sin adición de fitoreguladores (0ANA-0AIA-0BA mg/L).

LITERATURA CITADA

- AMOO, S.O., FINNIE, J.F. Y VAN STADEN, J., 2009. *In vitro* propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 96:273-278.
- BIDWELL, R.G.S., 2004. *Fisiología Vegetal*. 2ª edición. AGT. México. 643 pp.
- BOPANA, N. Y SAXENA, S., 2008. *In vitro* propagation of a high value medicinal plant: *Asparagus racemosus* Willd. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 44:525-532.
- COELLO, G.C.Y., M.C.L., MICELI G.C., ORANTES L. DENDOOVEN & M. F.A. GUTIÉRREZ, 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E.Higgins. *Gayana Bot.* 67(1): 19-26.
- DE KLERK, G.J., 2002. Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 38:415-422.
- DIARIO OFICIAL, 2002. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001*. Diario oficial de la Federación, 6 de marzo del 2002. 2ª. sección México, México.
- HARTMAN, H. Y D.E. KESTER, 2000. *Propagación de plantas: principios y prácticas*. Ed CECSA; México, D.F. 549Pp.
- HURTADO, D. Y M.E. MERINO, 1987. *Cultivo de tejidos vegetales*. 1ª edición. Trillas. México. 230 pp.
- MICELI, M.I., 1999. *Micropropagación de Encyclia cochleata: influencia del soporte, reguladores de crecimiento y fuentes de carbono*. Tesis de ingeniería, Instituto Tecnológico. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 70 pp.

- MAURO, M., D. SABAPATHY & S.R.A. SMITH, 1994.** Influence of benzylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. *Physiol. Plant.* 16:237-322.
- MAURO, M., D. SABAPATHY & S.R.A. SMITH, 1994.** Influence of benzylaminopurine and alpha-naphthaleneacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. *Physiol. Plant.* 16:237-322.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG, 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- PAEK, K.Y. & E.C. YEUNG, 1991.** The effect of 1-naphthaleneacetic acid and N⁶-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestri* rhizome in vitro. *Plant cell, tissue and organ culture.* 24:65-71
- PIERIK, R.L.M., 1990.** *Cultivo in vitro de plantas superiores.* Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 326 p.
- ROSS, P.J., 1989.** *Taguchi techniques for quality engineering. Loss function, orthogonal experiments, parameter and tolerance design.* McGraw-Hill International Editions New York. pp. 270-279.
- RUIZ, G.R., 1999.** *Cultivo in vitro de protocormos de Lycaste aromatica (Hooker) Lindl. Orchidaceae.* Tesis de licenciatura. Escuela de biología, Unicach. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 67 pp.
- SALISBURY, F.B. Y C.W. ROSS, 1978.** *Plant physiology.* 2nd edition. Wadsworth pub. Co. Belmont, California. 422 p.
- TORRES, K.C., 1989.** *Tissue culture techniques for horticultural crops.* Ed. An A VI Book U.S.A. 66 p.
- VELÁZQUEZ, M.A.M., 1999.** *Cultivo in vitro de Nicolaia elatior (Horan) Lindl. Zingiberáceas.* Tesis de licenciatura, Escuela de Biología, UNICACH. Tuxtla Gutiérrez Chiapas. pp. 58-64
- WEAVER, R.J., 1976.** *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura.* Trillas. México. pp. 103, 123, 145-146, 154.

