

Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) a partir de plantas obtenidas por cultivo de meristemos

Introducción

En los últimos años, la floricultura ha devenido en un negocio de grandes proporciones y la exportación internacional de flores frescas ha ascendido a 7 390 millones de dólares (Traub, 2010). De esta cifra, los claveles representan aproximadamente el 6 %, por lo que se encuentran entre las flores más cotizadas en el mercado internacional debido a su belleza, su duración después de cortados, su posibilidad de florecer todo el año y su resistencia al embalaje y al transporte. Los claveles que se cultivan en Cuba se destinan principalmente al mercado nacional, aunque su demanda no se encuentra satisfecha debido principalmente a la ausencia de métodos de propagación seguros y eficientes, ya que en las condiciones climáticas de la isla, el clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) generalmente no produce semillas y se multiplica a partir de esquejes, lo que facilita la diseminación de plagas y enfermedades.

Los métodos de propagación in vitro presentan determinadas ventajas sobre los métodos tradicionales, como son: el incremento del coeficiente de multiplicación de plantas genéticamente idénticas, obtenidas a partir de una sola planta; se desarrollan en áreas relativamente pequeñas, lo que facilita la manipulación en un tiempo breve; permiten optimizar las condiciones ambientales y evitar la erosión genética (Alvarenga, 2007). Uno de los métodos de propagación in vitro es el cultivo de meristemos, que tiene el valor añadido de que permite obtener plantas

libres de virus. Si el cultivo de meristemos se utiliza en combinación con otro método de propagación in vitro como la multiplicación de esquejes, entonces es posible obtener numerosas plantas sanas, en un corto período de tiempo.

Los brasinoesteroides son considerados hormonas del crecimiento vegetal que actúan a concentraciones varias veces menores que las fitohormonas tradicionales y estimulan el crecimiento vegetal aun en condiciones de estrés, no causan deformaciones en las plantas y tienen baja toxicidad. En los experimentos de cultivo in vitro es posible sustituirlos parcial o totalmente por los reguladores del crecimiento tradicionales ya que frecuentemente inducen respuestas similares a las provocadas por éstos y en ocasiones actúan de forma sinérgica o aditiva con los mismos (Núñez y Robaina, 2000). En Cuba se producen análogos de brasinoesteroides que tienen una actividad biológica similar a los brasinoesteroides naturales y poseen una tentadora relación costo / beneficio, por lo que es posible utilizarlos en los medios de cultivo con el objetivo de incrementar los coeficientes de multiplicación de especies de interés ornamental como el clavel español, cuya producción se encuentra deprimida en el mercado cubano en estos momentos, y al mismo tiempo, disminuir los costos del medio de cultivo. Por estas razones, nos propusimos de determinar el efecto del Biobrás-16 en la propagación por esquejes de clavel español a partir de plantas obtenidas por cultivo de meristemos, utilizando este análogo como sustituto de la Kinetina.

2. Materiales y Métodos

Fueron utilizadas plántulas de clavel español de aproximadamente 35 días de edad obtenidas a partir del cultivo de meristemos en medios con diferentes concentraciones de Biobrás-16 en sustitución de la Kinetina (Fig.1). Aunque no se le añadió este análogo de brasinoesteroide al medio de cultivo para la propagación por esquejes, se respetaron los tratamientos anteriores de donde provenían las plántulas, ya que en estudios precedentes en el cultivo del clavel ha sido señalado que el efecto del Biobrás-16 puede manifestarse en subcultivos posteriores (Castilla, 2004; Domínguez, 2005). Estas plántulas fueron seccionadas en esquejes de 1cm de longitud, a los que le fueron desprendidas las hojas. Los esquejes fueron sembrados en tubos de ensayo con 10 mL de medio Murashige-Skoog (MS) (1962) suplementado con $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa y $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Gelrite, siguiendo un Diseño Completamente Aleatorizado.

Para la segunda propagación se tomaron las plántulas provenientes de la primera propagación y los esquejes fueron sembrados en condiciones idénticas a las de éstas, manteniendo el tratamiento de origen (Fig. 1).

A las plántulas obtenidas en cada propagación se les realizaron las siguientes evaluaciones a los 45 días de cultivo: porcentaje de regeneración, número de nudos, número de brotes y porcentaje de plantas con raíces. Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple, previa comprobación del cumplimiento de sus premisas. Las medias fueron comparadas según la prueba de rangos múltiples de Tukey. Se utilizó el programa SPSS 11.5 para Windows. Para las variables expresadas en porcentaje se realizó una prueba de comparación de proporciones (prueba de chi-cuadrado).

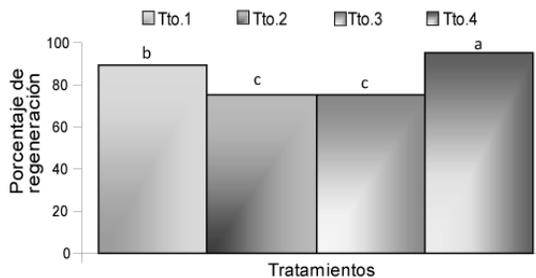


FIG. 2. PORCENTAJE DE REGENERACIÓN DE LAS PLANTAS OBTENIDAS EN LA PRIMERA PROPAGACIÓN POR ESQUEJES DE CLAVEL ESPAÑOL (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.). $S \chi^2_{0,058}^*$.

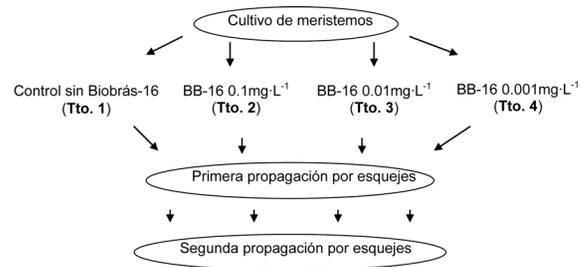


FIG. 1. ESQUEMA DEL CULTIVO DE MERISTEMOS Y LA PROPAGACIÓN POR ESQUEJES DE CLAVEL ESPAÑOL.

3. Resultados y Discusión

3.1. Primera propagación

De manera general, en la primera propagación por esquejes se obtuvieron elevados porcentajes de regeneración y diferencias significativas entre los porcentajes de regeneración de los diferentes tratamientos. El valor más elevado (95 %) se obtuvo en el tratamiento 4, en el cual fue empleada la menor concentración de Biobrás-16 ($0,001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), lo que pudiera deberse a que estas fitohormonas son activas a muy bajas dosis, comparables con su contenido natural (Khripach et al., 1999). En el tratamiento control se obtuvo una regeneración del 90 %, seguido por los tratamientos 2 y 3, con un 75 % de regeneración (Fig. 2).

Otros autores al evaluar la tasa de pérdida durante el primer ciclo de multiplicación de distintas variedades de clavel español, han obtenido valores de regeneración que variaron desde el 65 al 92 %, asociados con un proceso de oxidación como consecuencia de la hiperhidratación de los explantes (Afanador, 2005).

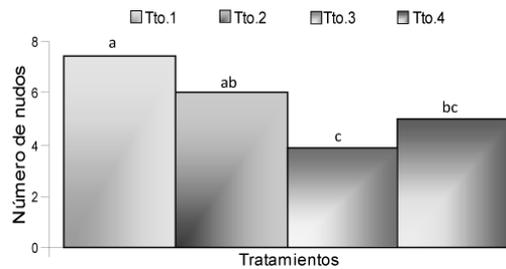


FIG. 3. FORMACIÓN DE NUDOS EN LAS PLANTAS OBTENIDAS EN LA PRIMERA PROPAGACIÓN POR ESQUEJES DE CLAVEL ESPAÑOL (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.). $S \chi^2_{0,513}^*$.

Con respecto a la formación de nudos, los mayores números de nudos por planta se alcanzaron en el tratamiento control (7,45 nudos) y en el tratamiento 2 (6,05 nudos); sin embargo, aunque estos valores difieren de los alcanzados en los tratamientos 3 y 4, es de destacar que en los mismos se alcanzó un número de nudos que se considera satisfactorio para esta etapa de la propagación in vitro (Fig. 3).

Domínguez (2005) al realizar la primera propagación por esquejes de clavel chino en diferentes variantes de medio MS con el empleo o no de Biobrás-16, utilizando concentraciones similares a las empleadas en el presente estudio, obtuvo mejores resultados en los medios que no contenían Biobrás-16, con respecto a los medios donde fue empleado este biorregulador. Además, se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos, con valores del número de nudos que variaron desde 3,95 nudos en el tratamiento donde se utilizó Biobrás-16 a una dosis de 0,01 mg·L⁻¹, hasta 4,76 nudos en el tratamiento de 0,001 mg·L⁻¹. Estos resultados son comparables con los obtenidos en clavel español, donde en tratamientos semejantes se obtuvieron, respectivamente, 3,90 y 5 nudos por planta en esta etapa de la propagación. A pesar de constituir dos especies distintas, se observa la semejanza en cuanto a la respuesta de explantes similares en los cuales se han empleado las mismas dosis de este análogo de brasinoesteroide en el cultivo in vitro, comportamiento que coincide con lo señalado por Nuñez et al. (2004) para otros cultivos.

Para el número de brotes, el mayor valor se obtuvo en el tratamiento 3 (Foto 1), con una media de 9,55 brotes por cada plántula obtenida. En el resto de los tratamientos se obtuvieron valores que variaron desde 6,1 en el control hasta 3,65 en el tratamiento 2 (Fig. 4), no difiriendo estadísticamente. En este caso, es de destacar que aunque el tratamiento 3 resultó favorecido, se considera que la concentración endógena de Biobrás-16 que presentan los explantes fue suficiente para provocar la inducción de los brotes de las plántulas



FOTO 1. FORMACIÓN DE BROTES EN LAS PLANTAS DEL TRATAMIENTO 3 DE LA PRIMERA PROPAGACIÓN DE CLAVEL ESPAÑOL (D. CARYOPHYLLUS L.).

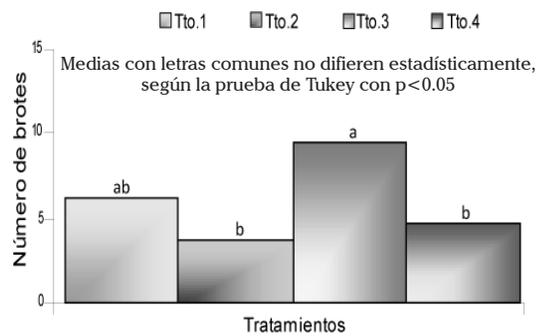


FIG. 4. FORMACIÓN DE BROTES EN LAS PLANTAS OBTENIDAS EN LA PRIMERA PROPAGACIÓN POR ESQUEJES DE CLAVEL ESPAÑOL (DIANTHUS CARYOPHYLLUS L.). $S^2_{0,204}$ *

de clavel español en su primera propagación, coincidiendo con los resultados de Castilla (2004).

En este sentido, en el caso de la micropropagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill), han sido obtenidos resultados favorables en la inducción de brotes con el empleo de Biobrás-16 a las concentraciones de 0,05 y 0,01 mg·L⁻¹, como complemento de los biorreguladores ANA y 6-BAP y como único suplemento hormonal (Rodríguez, 2008).

La presencia de raíz en la primera propagación de manera general no estuvo favorecida por el Biobrás-16, ya que los porcentajes de plantas con raíz se mantuvieron por debajo del 50 % (Fig. 5). Sólo en el tratamiento 2 (0,1 mg·L⁻¹) se obtuvo un incremento en el número de plantas con raíces, con respecto al tratamiento 1 (control). Ha sido señalado por Khrupach et al. (1999) que los resultados con respecto al crecimiento de las raíces con el empleo de los brasinoesteroides son contradictorios, obteniéndose en algunos ensayos incrementos de los valores y en otros inhibición.

En la fase de enraizamiento del híbrido de piña CBCE-74, Rodríguez (2008) plantea que el Biobrás-16 no tuvo un efecto positivo en los indicadores morfofisiológicos de las plantas in vitro, ya que el control superó en todas las variables a los tratamientos que contenían a este análogo de brasinoesteroide. Autores como Hernández, Moré y Núñez (1999) señalaron que en la propagación por esquejes de la papa, otro análogo de brasinoesteroide: el Biobrás-6, tuvo una influencia marcada y significativamente superior sobre el número de raíces, desde la primera hasta la última evaluación realizada, sin embargo el Biobrás-16 no presentó diferencias significativas con respecto al control en ninguna de las evaluaciones.

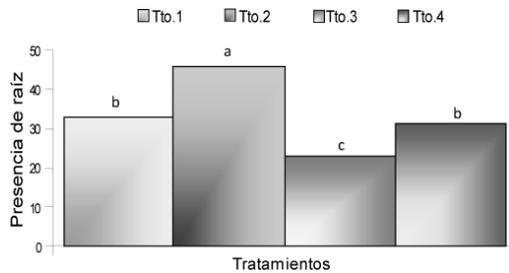


FIG. 5. FORMACIÓN DE RAÍZ EN LAS PLANTAS OBTENIDAS EN LA PRIMERA PROPAGACIÓN POR ESQUEJES DE CLAVEL ESPAÑOL (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.). $S \times$: 0,262**

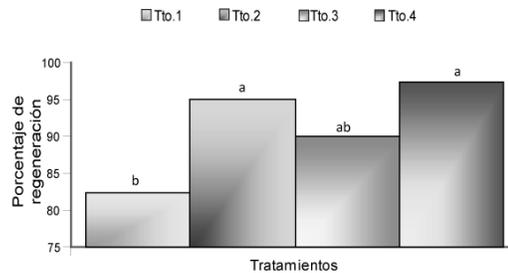


FIG. 6. PORCENTAJES DE REGENERACIÓN DE LAS PLANTAS OBTENIDAS EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS DE LA SEGUNDA PROPAGACIÓN DE CLAVEL ESPAÑOL (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.). $S \times$: 0,445**

3.2. Segunda propagación

La regeneración obtenida en la segunda propagación de las plantas de clavel español se considera que mantuvo valores aceptables para esta etapa (Fig. 6). En el tratamiento control la regeneración fue del 82,5 %, en cambio otros autores (Norberto et al., 2007) han obtenido un 96 % de regeneración al realizar la propagación in vitro de yemas de clavel español (var. Americana) en medio MS, lo cual pone de manifiesto que las diferencias entre los porcentajes de regeneración pueden deberse al efecto de las diferencias entre ambos genotipos (Chabaud Red y Americana, respectivamente).

En los tratamientos donde se empleó Biobrás-16, aunque no se observaron diferencias significativas entre ellos, el mayor valor se obtuvo en el tratamiento 4, donde se empleó la menor concentración de Biobrás-16, evidenciándose una tendencia similar a la obtenida en la primera propagación con respecto a una mayor efectividad de los brasinoesteroides mientras su aplicación sea realizada a bajas concentraciones (Khrpach et al., 2000; Núñez y Robaina, 2000).

El número de nudos de la segunda propagación fue estadísticamente similar para los tratamientos control, 2 y 4, en los cuales se emplearon, respectivamente, 0,1

y 0,001 mg·L⁻¹ de Biobrás-16, por lo que se considera que este biorregulador fue capaz de provocar un efecto sobre la formación de nudos en la segunda propagación de las plántulas de clavel español (Fig. 7). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Castilla (2004), donde se obtuvo un elevado número de nudos durante la segunda propagación de clavel español empleando estas dosis de Biobrás-16 como sustituto de la auxina, por lo que se confirma que el efecto de este análogo de brasinoesteroide permanece al menos hasta la segunda propagación.

Solamente en el tratamiento 3 (0,01 mg·L⁻¹ de Biobrás-16) se obtuvo un valor para esta variable (4,20 nudos) algo inferior al del resto de los tratamientos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Domínguez (2005), en los cuales para la segunda propagación del clavel chino en el tratamiento con 0,01 mg·L⁻¹ de Biobrás-16 se obtuvo una media de 4,46 nudos. Es necesario resaltar que esta autora probó diferentes variantes de medios de cultivo con y sin Biobrás-16 para las propagaciones de clavel chino, pero los mejores resultados se obtuvieron en aquellas variantes que carecían de este biorregulador, lo cual produce un abaratamiento del medio e indica que el efecto acumulativo del Biobrás-16 muestra mejores resultados que el efecto aditivo (Domínguez, 2005).

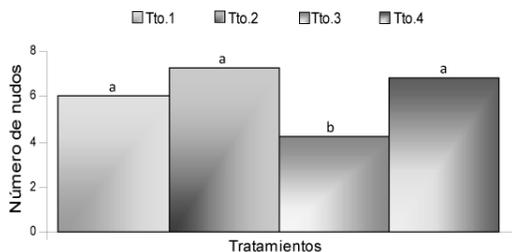


FIG. 7. NÚMERO DE NUDOS DE LAS PLANTAS OBTENIDAS EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS DE LA SEGUNDA PROPAGACIÓN POR ESQUEJES DE CLAVEL ESPAÑOL (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.). $S \times$: 0,392*

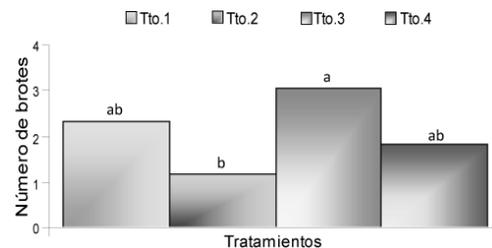


FIG. 8. FORMACIÓN DE BROTES DE LAS PLANTAS OBTENIDAS EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS DE LA SEGUNDA PROPAGACIÓN POR ESQUEJES DE CLAVEL ESPAÑOL (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.). $S \times$: 0,172*

Aunque en la segunda propagación de manera general se obtuvo un número menor de brotes con respecto a la primera propagación, se reitera el tratamiento 3 como el que mejores resultados presentó con respecto a esta variable, con una media de 3,05 brotes por planta, seguido por el tratamiento control, con una media de 2,30 brotes por planta (Fig. 8). El tratamiento 2 coincide como el que menor número de brotes se obtiene, semejante a lo ocurrido en la primera propagación, por lo que al parecer la concentración de 0,1 mg·L⁻¹ de Biobrás-16 no tiende a favorecer la formación de brotes en las plantas de clavel español.

En otros trabajos realizados en el clavel español han sido obtenidos entre 8 y 21 brotes por planta al emplear diferentes proporciones entre la auxina AIA y la citoquinina 6-BAP, por lo que se plantea que un balance hormonal entre auxinas y citoquininas es la clave en la división celular y el crecimiento de la región meristemática presente en las yemas, que es a su vez, lo que determina la proliferación de hojas nuevas y la iniciación de los brotes (Norberto et. al., 2007).

La presencia de raíz se comportó de manera diferente para cada tratamiento, obteniéndose el mayor porcentaje de plantas con raíces en el tratamiento 4 (92,3 %), donde se utilizó la menor concentración de Biobrás-16. En el tratamiento 2 también se obtuvo un elevado número de plantas con raíces (Fig. 9) y sólo en el tratamiento 3 el número de plantas con raíces no superó al obtenido en el control.

Núñez y Robaina (2000) afirman que las respuestas de la formación de las raíces por los brasinoesteroides son diversas y fisiológicamente diferentes a las de los tallos, por lo que deben ser cuidadosamente considerados aspectos tales como la formulación, la aplicación y el tiempo necesario de exposición. Según De la Fe, Ortiz y Jiménez (1998), ha sido señalado por algunos autores un efecto positivo de los brasinoesteroides en la promoción del enraizamiento en tallos clonados de *Matricaria chamomilla*, en cortes de hipocotilo de soya, en posturas trasplantadas de *Pinus radiata* y en posturas o plantas de remolacha, trigo, maíz, tabaco y arroz.

De manera general, se considera que se obtuvo un mayor efecto del Biobrás-16 en la segunda propagación por esquejes que en la primera, a pesar de no haber sido utilizado directamente en el

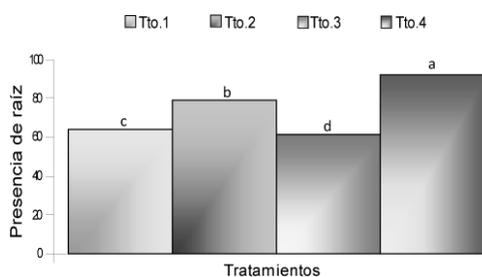


FIG. 9. FORMACIÓN DE RAÍZ DE LAS PLANTAS OBTENIDAS EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS DE LA SEGUNDA PROPAGACIÓN POR ESQUEJES DE CLAVEL ESPAÑOL (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.).
S.X : 0,075**

medio de cultivo. Esta peculiaridad se conoce como efecto tardío (long lasting effect) y puede resultar característico en los análogos de brasinoesteroides, ya que presentan un anillo espirocetálico que constituye un cambio estructural con respecto a los naturales, lo que puede conllevar a que aquellos sean transformados a formas biológicamente activas. Además, por esta misma causa, el transporte puede ser más lento y pueden existir diferencias en el reconocimiento análogo de brasinoesteroide-receptor (Mazorra, 2004).

4. Conclusiones

El Biobrás-16 tuvo un efecto positivo sobre la mayoría de las variables evaluadas en los diferentes tratamientos.

El efecto del Biobrás-16 fue mayor en la segunda propagación por esquejes, que en la primera. **T**

Yanelis Castilla Valdés

María Esther González Vega

Departamento de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Bibliografía:

- Afanador, A.M.
2005 Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Tesis de Diploma. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Carrera de Biología. Bogotá, Colombia.
- Alvarenga, S.
2007 Laboratorio Cultivo de Tejidos I. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 76 p.
- Castilla, Y.

- 2004 Efecto del Biobrás-16 en la propagación in vitro del clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). En: "Taller de Biotecnología Vegetal", Congreso Científico del INCA (14: 2004, nov. 9-12, La Habana). Memorias. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISBN 959-7023-27-X.
- De la Fe, C.F., Ortiz R. y M. Jiménez.
- 1998 Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. II. Efecto de análogos de brasinoesteroides en la multiplicación, el enraizamiento y la adaptación de las vitroplantas. Cultivos Tropicales. 19 (3): 45-48.
- Domínguez, R.
- 2005 Empleo de diferentes medios de cultivo para la germinación y propagación in vitro de claveles chinos (*Dianthus chinensis* L.). Tesis de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
- Hernández, M.M.; M. Moré y M. Nuñez.
- 1999 Empleo de análogos de brasinoesteroides en el cultivo in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L.). Cultivos Tropicales. 20 (4): 41-44.
- Khripach, V.A.; V.N. Zhabinskii y A.E. de Groot.
- 1999 Brassinosteroids: A new class of plant hormones. San Diego: Academic Press.
- Khripach, V.A.; V.N. Zhabinskii y A.E. de Groot.
- 2000 Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. Annals of Botany 86: 441-447.
- Mazorra, L.M.; M. Nuñez, M.C. Nápoles, S. Yoshida, C. Robaina, F. Coll y T. Asami.
- 2004 Effects of structural analogs of brassinosteroids on the recovery of growth inhibition by a specific brassinosteroid biosynthesis inhibitor. Plant Growth Regulation. 44 (2): 183-185.
- Murashige, T. y Skoog, F.
- 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum. 15: 473-497.
- Norberto, C.; O. Pretel ; W. Reyna y D. Mercado.
- 2007 Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. "clavel". Revista Médica Vallejana. 4 (2): 132-138.
- Núñez, M. y C. Robaina.
- 2000 Brasinoesteroides: Nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas en la agricultura. Documentos IAC, 68.
- Núñez, M.; W. J. Siquiera; M. M. Hernández; M. A. T. Zullo; C. Robaina y F. Coll.
- 2004 Efecto del Biobrás-6 y el MH-5 en la inducción de callos y brotes en lechuga (*Lactuca sativa* L.). Cultivos Tropicales. 25 (4): 5-9.
- Rodríguez, D.
- 2008 Utilización de biorreguladores en las fases de multiplicación y enraizamiento in vitro de dos híbridos cubanos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Tesis de Maestría. Universidad de La Habana.
- Traub, A.
- 2010 Las flores de corte en una nueva disyuntiva: ¿por cuál camino transitar? Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Chile. [Consultado el: 16/ febrero/2011]. Disponible en: <http://www.odepa.gov.cl>.