

Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación in vitro de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. “clavel”.

6-benzylaminopurine and indolacetic acid effect in the propagation of *Dianthus caryophyllus*

NORBERTO RODRÍGUEZ, Carlos¹; PRETEL SEVILLANO, Orlando²;
REYNA SÁNCHEZ, Wilson³; MERCADO PAREDES, Doris⁴

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolacético (AIA) en la estimulación de proliferación de brotes en yemas de *Dianthus caryophyllus* L. “clavel” cultivados in vitro. Se ha demostrado que la combinación de 3,0:1,5 mg/L de 6-Bencilaminopurina / Ácido Indolacético ha generado el mayor número de brotes con un promedio de 22 brotes por yema sembrados en el medio, en un periodo de tiempo de 65 días e incubada a una temperatura de 26± 2°C, iluminación 3000 lux y fotoperiodo 16/8 hrs. (luz/oscuridad) empleando fluorescentes de luz blanca.

Palabras clave: 6-bencilaminopurina, ácido indolacético,

ABSTRACT

We studied the effect of 6-Benzylaminopurina (BAP) and indolacetic acid (AIA) in the stimulation of proliferation of buds in yolks of *Dianthus caryophyllus* L. “carnation” cultivated in vitro. It has been demonstrated that the combination of 3.0:1.5 mg/L of 6-Benzylaminopurina / Sour Indolacético has generated the biggest number of buds with an average of 22 buds for yolk sowed in the means, in a period of time of 65 days and incubated to a temperature of 26 (2°C, illumination 3000 lux and fotoperiodo 16/8 hrs. (light/darkness) using fluorescent of white light.

Key words: 6-benzylaminopurine, indolacetic acid,

1. Docente Universidad Nacional de Trujillo. Email: revistamedica@ucv.edu.pe

2. Docente Universidad Nacional de Trujillo. Email: revistamedica@ucv.edu.pe

3. Docente Universidad Cesar Vallejo. Email: revistamedica@ucv.edu.pe

4. Docente Universidad Nacional de Trujillo. Email: revistamedica@ucv.edu.pe

INTRODUCCIÓN

Dianthus caryophyllus L. "clavel" pertenece a la familia Cariofyllaceae, oriunda del mediterráneo y está considerada como una flor muy apreciada, alcanzando su auge económico en el siglo XIX debido a su gran demanda. Se conocen dos tipos de clavel, el niza o clavel de cáliz "reventón" y el clavel americano de cáliz "no reventón", siendo en más apreciado el clavel americano, (1).

El clavel se propaga de preferencia en forma vegetativa lo cual permite conservar las características fenotípicas durante su propagación por varias generaciones, sin embargo esta modalidad de propagación acarrea el problema de ser causante de diseminar enfermedades sistémicas originadas por virus y micoplasmas, (1,2).

En la actualidad muchas plantas de carácter económico se propagan aplicando la Biotecnología mediante la técnica de micropropagación *in vitro* empleando como explante meristemas, raíz, hoja, tallo, óvulos, embriones, etc. Lo cual ha permitido obtener plantas libres de enfermedades, (3).

El clavel fue propagado por primera vez utilizando brotes apicales en un medio líquido empleando la fitohormona 6-Bencilaminopurina en concentraciones de 5 a 10 mg/L, esta hormona ha sido empleada para propagar plantas de carácter agroindustrial de un alto valor económico, tales

como: espárrago, piña, vid, fresa, arroz, caña de azúcar, camu camu, etc. Empleando diferentes concentraciones según la especie y el explante empleado, (4,5,6,7,8,9,10,11,12). La técnica de micropropagación frecuentemente llamada técnica *in-vitro* (en frasco); se denomina así debido a la obtención y manejo de plántulas en miniatura y en un gran número que se originan de un explante de una planta madre (hoja, raíz, tallo, ovario, óvulo, polen, etc.), (7).

Hace unos pocos años la micropropagación *in-vitro* era considerado como un tema de ciencia ficción, sin embargo hoy en día el desarrollo de esta nueva técnica ha dado grandes logros a los países industrializados. La producción de un gran volumen de plantas carentes de enfermedades así como la conservación de las características genéticas de los paternos, ha permitido no solo el incremento de productividad y calidad de numerosos cultivos, (4).

La aplicación de esta técnica en el rubro de la floricultura ha logrado su mayor expresión, lográndose incrementar la cantidad y calidad de muchas flores de ornato como rosas, claveles, jazmines, violetas, orquídeas, etc., son estos resultados los que motivaron la ejecución de este trabajo, cuya perspectiva es lograr un medio de cultivo que permita lograr una propagación masiva del clavel utilizando para ello axilares.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las plantas madres de *Dianthus caryophyllus* L. "clavel" fueron seleccionadas del vivero forestal del distrito El Porvenir-Trujillo, tomándose la variedad Americana de Cáliz "no reventón", por ser la más apreciada en el mercado interno y externo. Las plantas fueron transportadas en cajas de tecnopor envueltas en papel de filtro húmedo para evitar la deshidratación de las yemas.

2. FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO (13,14)

- a) **Medio de Iniciación.** Este medio se preparo empleando las sales de Murashig-Skoog, 1962 (cuadro N° 1) y completado con tiamina, piridoxina, Ac. Pantoténico, glicina en un pH de 5,7 (cuadro N° 2).
- b) **Medios de propagación.** Estos medios tuvieron los mismos componentes del medio de iniciación, con la diferencia que estos llevan los reguladores de crecimiento (fitohormonas) al 6-Bencilaminopurina y Acido Indolacético en las concentraciones de 1,0:0,5; 2,0:1,0; 3,0:1,5 de BAP:AIA (cuadro N° 2).

Cuadro N° 1. Composición química del medio de cultivo Murashig-Skoog (1962) empleando su cultivo de tejidos vegetales en Vitro.

Solución	Constituyentes Químicos	Concentración mg/L.	Volumen Stock/litro del Medio
1	NH ₄ NO ₃	3,300	50 ml
	KNO ₃	3,800	
	CaCl	880	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	7400	
	KH ₂ PO ₄	3400	
2	KI	166	5 ml
	H ₃ BO ₃	1240	
	MNSO ₄ .4H ₂ O	4460	
	2NSO ₄ .7H ₂ O	1720	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50	
	CuSO ₄ .4H ₂ O	5	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	5	
3	FeSO ₄ .7H ₂ O	5560	5 ml
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7460	
4	Mio-Inositol	20000	5 ml
	Ac. Nicotínico	100	
	Piridoxina HCl	100	
	Tiamina HCl	100	
	Glicina	400	

Cuadro N° 2. Composición química del medio de iniciación y los medios de propagación de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. "clavel".

Constituyentes químicos	M.C.I. mg/L.	MC-P mg/L.		
		A	B	C
- Compuestos inorgánicos:				
Sales de M. S.	Completo	Completo	Completo	Completo
- Compuestos orgánicos:				
Tiamina-HCl	0,4	0,4	0,4	0,4
Piridoxin-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	0,5	0,5	0,5	0,5
Acido nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5
6-Bencilaminopurina	-	1,0	2,0	0,3
Ac. Indolacético	-	0,5	1,0	1,5
Sacarosa	3%	3%	3%	3%
- Otros compuestos:				
Agar	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%

3. CULTIVO DE EXPLANTE IN-VITRO

a) **Medio de iniciación.** Se procedió a la desinfección de los segmentos de tallo que contienen las yemas con un lavado con agua jabonosa, se las enjuaga con agua corriente,

luego se les lavó con alcohol al 70%, por un minuto al término del cual se les enjuagó con agua destilada estéril, luego se procedió a lavarlos con hipoclorito de sodio al 2.5% por un tiempo de 10 minutos, en constante agitación lenta, se procedió luego a enjuagar

por tres veces para eliminar todo el hipoclorito de sodio. Con un bisturí y pinzas debidamente esterilizadas se procedió a retirar las yemas, de inmediato fueron transferidas a los frascos conteniendo el medio de iniciación debidamente esterilizado, se les tapó con papel aluminio. Todo este proceso se realizó en un ambiente (cámara) debidamente esterilizada con luz UV por espacio de 12 horas.

Realizado todo este proceso se procedió a colocar los frascos en los estantes del cuarto de incubación a una temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$ fotoperiodo de 16 horas y una iluminación de 3000 lux (figura N° 1).

b) **Medio de propagación.** Las yemas del medio de iniciación que lograron sobrevivir un periodo de tiempo de 15 días son transferidas a frascos conteniendo el medio de cultivo de propagación en las diferentes concentraciones de BAP y AIA. Esta transferencia se realiza bajo las condiciones de esterilidad que el trabajo amerita, y luego son colocados en el ambiente de incubación bajo las mismas condiciones que el medio de iniciación, (figura N° 2).

4. EVALUACIÓN

Las observaciones de evolución se realizan cada tres días para determinar el tiempo en que se aprecia la generación de brotes en las yemas.

RESULTADOS

Al término del presente trabajo, después realizado tres repeticiones de cada uno de los medios ensayados y haber empleado 150 yemas por cada medio se obtiene los siguientes resultados:

En el medio de iniciación se produjo una contaminación que alcanzo un 4% de los frascos cultivados, muy por debajo de los límites permisibles en este tipo de trabajos, sin embargo, las yemas no fueron mayormente afectados, alcanzando un 1.5% de contaminación.

Las yemas transferidas al medio de propagación que fueron de un promedio de 48 yemas en cada repetición, se observó que a la segunda semana de incubación se aprecian ligeras formaciones, las cuales al término de 30 días se aprecia un crecimiento manifiesto de la yema (figura N° 2).

A los 55 y 60 días se pudo visualizar con claridad el desarrollo de un gran número de brotes

que alcanzan una altura promedio de 1 cm. (figura N° 3). al promediar los 75 días los brotes tienen altura promedio de 2 cm. (figura N° 4). A partir de este tiempo se aprecia que los brotes comienzan a enraizar en el medio de propagación. (figura N° 5).

El crecimiento de los brotes generados se ha producido en los tres medios empleados en el presente trabajo de investigación.

Al realizar el conteo de los brotes logrados en cada medio de propagación se determinó que el medio "C" que contiene 3,0 mg/L de BAP y 15 mg/L de AIA, tiene un mayor efecto en la formación de brotes en las condiciones de incubación realizada, con un promedio de 21,0 brotes por yema seguido del medio "B" con un promedio de 13,0 brotes por yema y el medio "A" con un promedio de 08 brotes por medio. (cuadro N° 3).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo tiene semejanza a los obtenidos por Gutiérrez J. 2002.

Cuadro N° 3. Brotes obtenidos por yema de *Dianthus caryophyllus* L. "clavel" en los medios de propagación "A", "B" y "C".

Repeticiones	Yemas Sembradas	MC-I (sobreviven)	MC-P "A"	MC-P "B"	MC-P "C"
1	50	48	10	15	20
2	50	49	6	12	24
3	-	46	9	11	18
	X	48	8	12,6	20,6

X= Representa el promedio de brotes de tres repeticiones obtenidos en cada yema sembrada en cada uno de los medios de propagación.

DISCUSIÓN

La diferencia de propagados que se ha generado en las yemas sembradas en cada uno de los medios, se debe a la relación auxina-citocinina, tal como puede observarse en el cuadro N° 3, en donde la 6-Bencilaminopurina se encuentra en mayor concentración en el medio "C" en el cual se presentó el mayor número de brotes. Este hecho está en razón que la auxina (BAP) es la más efectiva para la formación y desarrollo de yemas, (14).

Un balance hormonal entre auxinas y citocinas 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 iniciación de las hojas nuevas y la proliferación de brotes, (15).

Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales entre ellos la regulación de los fenómenos de diferenciación,

por ello estas sustancias son ampliamente usadas en trabajos de micropropagación, por lo que son incorporados en los medios de cultivo para estimular el crecimiento de callos, suspensión de células u órganos, para regular la morfogénesis, especialmente en interacción con las citocininas (AIA) como es el caso del presente trabajo. Concentraciones altas de auxinas (>10 mg/L) inducen la formación de callos en los explantes, caso que no se ha dado en el presente trabajo por haber empleado hasta 3,0 mg/L en los medios de cultivo, así mismo las bajas concentraciones de citocininas (AIA) inducen la rizogénesis de los brotes, esto puede ser como resultado que el tiempo de 75 días de logrados los brotes la concentración de auxina (BAD) en el medio haya disminuido, aumente la concentración de citocinina (AIA) a que el brote produzca su propia fitohormona que le permite iniciar una diferenciación reticular, (13).

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos del presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. El medio que genera un mayor número de brotes en las yemas de *Dianthus caryophyllus* L. es el medio "C" que contiene 3,0 mg/L de BAP y 1.5 mg/L de AIA.
2. La formulación de este medio no ha generado la formación de callos en los explantes sembrados, lográndose que las plántulas obtenidas presenten invariable el patrón genético del progenitor.
3. Se ha demostrado que el *Dianthus caryophyllus* L. "clavel" puede ser propagado a gran escala empleando la técnica de la micropropagación *in-vitro* empleando yemas axilares.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda emplear esta técnica tecnológica en la micropropagación de clavel, así como de cualquier otra planta ornamental.
- Es necesario recordar que un buen balance de auxinas-citocininas empleados en los medios de cultivo dará mejores resultados.
- Es conveniente encontrar una relación auxina-citocinina óptima para lograr una proliferación mucho más abundante del "clavel".
- Es necesario que la planta madre sea de buena calidad y joven.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ellen, S. y R.W. Langhans. 1978. Epicuticular wax and cuticle formation in meristem regenerated plantlets of carnation (abstracts). *Horscience*, 13:348.
2. Espinoza, N. y COL. 1989. Cultivo de tejidos. Micropropagación. Conservación y exportación de germoplasma de papa. Guía de Investigación. CIP. Centro Internacional de la papa. 22pp.
3. Fujino, M. 1990. Growing disease free cuttings of carnations. In *Farming Japan*. Vol. 24:5. The Bimonthly Publication on Agriculture Forestry and Fisheries.
4. Hughes, K. W. 1981. Ornamental species. En *Cloning Agricultural Plants via in vitro Techniques* B.V. (ed) CRC Press. Boca Ratón. Florida. Pp.110-115.
5. Hu, C. y Wan G. 1983. Meristen, Shoot tip and Bud Culture. In *Handbook of plant cell News letter*. 46(8):1-5.
6. Mejía, R. 1994. Propagación de 312 especies de plantas por cultivo *in vitro*, primera edición.
7. Mejía, R. y C. Vitorelli. 1988. Cultivo *in vitro* de plantas de papa. Manual de laboratorio: Programa de Investigación INAA. 111 pp.
8. Miranda de Larra, J. 1975. Cultivos ornamentales. Ed. Aedor, España. p.317.
9. Nomberto, C. 1994. Obtención de clones de *Sparragus officinalis*, mediante cultivo en yemas *in vitro* para la

- propagación y conservación del germoplasma. Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN)–UNT.
10. Nomberto, C. 1996. Obtención de planta in vitro de *Ananas comosus* L. "piña" mediante cultivo de yemas axilares. Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN)–UNT.
 11. Nomberto, C. 1999. Regeneración de planta de *Saccharum officinarum* L. a través del cultivo de callos in vitro. Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN)–UNT.
 12. Nomberto, C. 2000. Micropropagación de *Museaceas* sp. "plátano" mediante el cultivo de yemas apicales in vitro empleando Bencilaminopurina (BAP). Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN)–UNT.
 13. Nomberto, C. 2001. Efecto de las Auxinas y Citocininas en la inducción de callos y regeneración de plantas de *Oryza sativa* "arroz" in vitro. Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN)–UNT.
 14. Nomberto, C. 2003. Efecto de 6-Bencilaminopurina y Ácido indolbutírico en la micropropagación de *Opuntia ficus indica* "tuna". Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN)–UNT.
 15. Robles, R. F. 2000. Producción de plantas de *Fragaria vesca* var. Chandler "fresa" por cultivo de meristemas in vitro empleando Bencilaminopurina, Ac. Naftalenacético y Ac. Indolbutírico. Tesis de Post-grado. UNT.

ANEXO



Figura N° 1. Medios de iniciación cultivados con yemas de *Dianthus coryphyllus* L. en proceso de incubación.

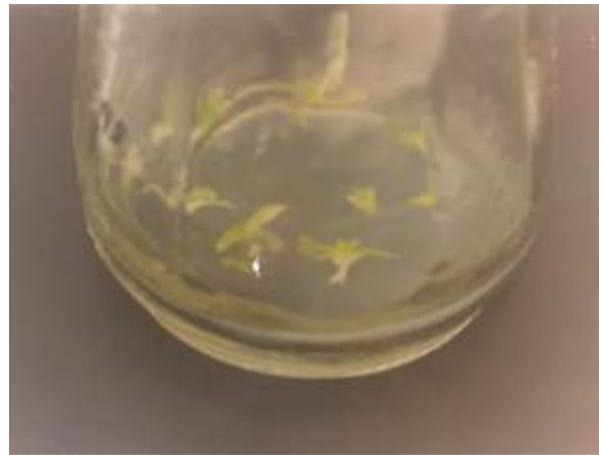


Figura N° 2. Yemas de *Dianthus coryphyllus* L. "clavel" de 30 días en medio de propagación.



Figura N° 3. Yemas de *Dianthus coryphyllus* L. "clavel" mostrando la proliferación de brotes a los 60 días de incubación con una altura promedio de 1,0 cm.

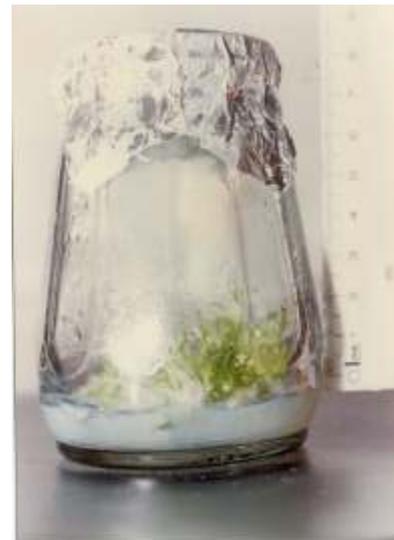


Figura N° 4. Yemas de *Dianthus coryphyllus* L. "clavel" mostrando un mayor número de brotes al término de 75 días con una altura promedio de 2,0 cm.



Figura N° 5. Brotes de *Dianthus coryphyllus* L. “clavel” en proceso de enraizamiento a cabo de 75 días de incubación.

RECIBIDO: 05.06.2007 ■ ACEPTADO: 02.10.2007