

COMUNICACIÓN CORTA

CONSERVACIÓN *in vitro* DEL CULTIVO DE CLAVEL ESPAÑOL (*Dianthus caryophyllus* L.) A PARTIR DE SALES MINERALES¹

Liudmila Jiménez-Mariña², Juan José Silva-Pupo³, Misterbino Borges-García³, Milvia Fonseca-Arias²

RESUMEN

Conservación *in vitro* del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) a partir de sales minerales. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la concentración de sales descritas por Murashige y Skoog (MS) en la conservación *in vitro* a corto plazo de segmentos nodales de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG), en el período 2012-2013. Los tratamientos consistieron en la adición en el medio de cultivo de sales MS (100; 75; 50; 25%) y un control (100% + reguladores de crecimiento). La disminución de hasta un 25% de la concentración de las sales del medio de cultivo redujo la velocidad de crecimiento, pudiendo conservarse por un tiempo de seis meses en estas condiciones. Se obtuvo una supervivencia y recuperación del 91,3%.

Palabras claves: cultivo de tejidos, conservación biológica, nutrientes minerales.

ABSTRACT

***In vitro* conservation of the cultivation of spanish carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from mineral salts.** The objective of the present study was to determine the effect of the salts concentration described by Murashige and Skoog (MS) in short term *in vitro* conservation of nodal segments of Spanish Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). The investigation was developed in the Center of Vegetable Biotechnology Studies (CEBVEG), in the period 2012- 2013. The treatments consisted on the addition of MS salts (100; 75; 50; 25%) and a control (100% + growing regulators) in medium culture. Decreasing until 25% of salts concentration in culture medium reduced the growing speed, being able to conserve for six months under these conditions. A survival and recovery of 91,3% was obtained.

Keywords: tissue culture, biological preservation, mineral nutrients.

INTRODUCCIÓN

Una de las plantas más utilizadas como flor de corte es el clavel español (*Dianthus caryophyllus*

L.), la cual es herbácea perenne perteneciente a la familia *Caryophyllaceae*. Los claveles representan aproximadamente el 12% de la exportación mundial de flores, siendo una de las más cotizadas en el

¹ Recibido: 18 de noviembre, 2014. Aceptado: 28 de julio, 2015. Parte de la tesis del primer autor para obtener el grado de Máster en Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma, Cuba.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", Bayamo 85100, Granma, Cuba. ljimenez@dimitrov.cu, mfonseca@dimitrov.cu

³ Universidad de Granma, Facultad de Ciencias Agrícolas, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Bayamo 85100 Granma, Cuba. jsilvap@udg.co.cu, mborgesg@udg.co.cu



mercado internacional; presenta además diversidad de colores, duración después de cortados y resistencia al embalaje y transporte (Castilla et al., 2014).

Cuba no participa en la exportación internacional de claveles, al contrario, estos se importan principalmente de Colombia, y cada flor de clavel español de la variedad Chabaud Red se comercializa a un precio de 0,80 dólares. En Cuba esta especie tiene la dificultad de que solo se reproduce por esquejes, ya que por las condiciones climáticas no produce semillas.

La conservación *in vitro* es una alternativa valiosa para preservar germoplasma de especies de propagación vegetativa, siendo muy útil y eficiente para la distribución de material vegetal clonal; además evita la transferencia y los patógenos, y posibilita la erradicación de virus a través del cultivo de meristemas. Esta vía de conservación puede efectuarse a través de dos métodos: el crecimiento mínimo y la crioconservación. La conservación *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar o suprimir totalmente el crecimiento de las células y tejidos: el objetivo es aumentar al máximo el periodo de transferencia del cultivo o extenderlo infinitamente (García et al., 2007).

La reducción en la concentración de elementos minerales y/o carbohidratos metabolizables (por ejemplo, sacarosa) en el medio de cultivo, puede ser una estrategia importante para la reducción del crecimiento del explante. Además, se puede aumentar el potencial osmótico del medio (especialmente mediante el uso de carbohidratos no metabolizables, como el manitol), el uso de concentraciones mayores de gelificantes, la adición de ciertos reguladores de crecimiento (como el ácido abscísico [ABA]), o de otras sustancias (como el cloruro de magnesio) para reducir daños. Como consecuencia de las medidas anteriores, el explante absorbe los nutrientes más lentamente y ocurre una reducción en el crecimiento (Engelmann, 2011).

Para la conservación *in vitro* a mediano plazo, lo ideal es que el explante se mantenga con un solo brote, tenga poco incremento en longitud, sin raíces o poco desarrolladas, y con aspecto saludable (Cruz et al., 2011).

Se ha empleado con éxito la disminución de la concentración de los nutrientes del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de especies vegetales (Scocchi y Mroginski, 2004), donde al conservar meristemas de paraíso (*Melia azedarach*), se observó

que la reducción de la concentración de las sales hasta un 25% controlaba el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por otro lado, la conservación de microbulbos de ajo pudo realizarse, registrándose en el medio, ¼ MS, los mayores promedios para las variables de sobrevivencia, vigor, peso y diámetro a los 210 días de evaluación (Pardo et al., 2014).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la concentración de sales descritas por Murashine y Skoog (MS) en la conservación *in vitro* a corto plazo de segmentos nodales de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue desarrollada en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBV) de la Facultad de Ciencias Agrícolas en la Universidad de Granma, Bayamo, Cuba, en el período comprendido de febrero 2012 a septiembre de 2013.

En los experimentos se utilizaron plantas *in vitro* en fase de multiplicación. El medio de cultivo de multiplicación contenía los elementos minerales propuestos por Murashige y Skoog (MS) (1962), complementados con ácido giberélico (10,0 mg/l), ácido indolacético (AIA) (0,05 mg/l), tiamina (1,0 mg/l), mioinositol (100,0 mg/l) y sacarosa (30 g/l). Las condiciones de cultivo se desarrollaron a una temperatura de $26 \pm 2,0$ °C en cámaras de crecimiento con iluminación solar e intensidad luminosa que oscilaba entre 100 y 125 $\mu\text{mol}/2\text{s}$.

Conservación *in vitro*

Se utilizó el medio de cultivo MS con distintas concentraciones de sales minerales (%). Se realizaron cinco tratamientos, los cuales consistieron en un control que contenía sales MS al 100% y reguladores de crecimiento, los otros cuatro contenían diferentes proporciones de sales de MS, a saber, 100, 75, 50 y 25% con el objetivo de disminuir la absorción de nutrientes por las plantas. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8; luego se fundió durante diez minutos en horno microondas, se enfrió hasta 50 °C y luego se distribuyó en tubos de ensayos de 24 x 150 mm, a razón de 15 ml por tubo. Finalmente, se esterilizó en autoclave durante 25 min a 1,2 kgf/cm² atmósfera de presión y 121 °C de temperatura. Los medios se

mantuvieron tres días, como mínimo, antes de su uso para descartar cualquier contaminación de los mismos. Los experimentos de laboratorio se desarrollaron bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar horizontal (IKEM).

Para la regeneración *in vitro*, el medio estuvo constituido de la misma forma que el medio de cultivo de multiplicación descrito previamente. La preparación del medio se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para el medio de cultivo de los tratamientos.

Evaluación de la conservación *in vitro*

A los tres meses de cultivo se realizaron las siguientes evaluaciones:

- Supervivencia (número de explantes vivos/número total).
- Senescencia foliar (%) (número de hojas muertas/número total).
- Número de explantes enraizados.
- Coloración de las hojas.
- Longitud de la planta (se midió en centímetros con una regla milimetrada, desde la base del explante hasta el último nudo).
- Número de yemas por explante.

Regeneración *in vitro* de los explantes conservados

Se emplearon tres explantes por tratamiento procedentes de vitroplantas conservadas durante tres y seis meses.

Evaluación de la regeneración *in vitro*

A las cuatro semanas de la regeneración de plantas completas se contabilizó el número de explantes que regeneraron a plantas completas y se dividió entre el número total para obtener la proporción.

Diseño y análisis estadístico

Los experimentos de conservación y regeneración *in vitro* se montaron bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo bifactorial, formado por cinco tratamientos con tres repeticiones (150 explantes por cada repetición para determinar los porcentajes de senescencia foliar y regeneración; y longitud de la

planta y número de yemas/explante). Se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey para el 5% de probabilidad del error. Los análisis estadísticos se procesaron con el paquete Statistica para Windows, versión 8 (StatSoft, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Conservación *in vitro*

La supervivencia del material vegetal fue alta en los tratamientos 100, 75, 50% y el control, los cuales difirieron del tratamiento al 25% de sales MS (Cuadro 1). Esto evidenció que a medida que disminuyó la concentración de sales minerales, a partir de 25%, se afectó de manera significativa la supervivencia del material vegetal.

Al evaluar el efecto de la concentración de sales inorgánicas del medio de cultivo en relación con la longitud de la planta no se observaron diferencias entre los tratamientos, excepto con el testigo, por lo que es posible que tuviera los nutrientes necesarios para el crecimiento de la misma. Sin embargo, se apreció una reducción del crecimiento con la disminución de la concentración de sales minerales, siendo menor en el tratamiento donde se utilizó al 25%. Estos resultados demuestran que la disminución del contenido mineral en los medios de cultivo favoreció el retardo del crecimiento, debido a alteraciones que ocurren en el metabolismo celular. El número de yemas fue menor en el tratamiento con la menor proporción de sales, el cual tuvo diferencias significativas con los tratamientos al 100%, 75% y control, no así con el de 50%. Este comportamiento pudo estar relacionado con el contenido de nutrientes presente en cada uno de ellos. Además, se observó el desarrollo de un gran número de raíces adventicias, acompañado de una coloración verde pálido de las hojas; lo cual pudo deberse a que las plantas fueron afectadas por la insuficiencia de alguno de los nutrientes agregados en una menor concentración, posiblemente el potasio, ya que los síntomas presentados en las plantas coinciden con los citados en la literatura cuando se da la deficiencia de este elemento (Cruz et al., 2011).

La influencia de las distintas concentraciones de sales MS en el medio de cultivo sobre el porcentaje de senescencia foliar arrojaron valores significativamente

Cuadro 1. Conservación *in vitro* de *D. caryophyllus*, durante tres meses de cultivo en condiciones de crecimiento reducido. Granma, Cuba. 2012-2013.

Table 1. *In vitro* conservation of *D. caryophyllus*, during three months of culture under conditions of reduce growth. Granma, Cuba. 2012-2013.

Tratamiento ¹	Supervivencia (%)	Longitud de la planta (cm)	Número de yemas/explante	Número de explantes enraizados	Coloración hojas	Senescencia foliar (%)
1 (100%)	96a	2,9 b	4,42 bc	25 a	Verdes	15 b
2 (75%)	96a	2,3 b	4,71 b	25 a	Verdes	14 b
3 (50%)	96a	2,11 b	3,88 cd	25 a	Verde pálido	25 a
4 (25%)	86b	2,05 b	3,41 d	22 a	Verde pálido	26 a
5 (100% + RC)	96a	3,73 a	5,36 a	25 a	Verdes	17 b
EE	0.36					

¹ Tratamientos: 1(sales MS al 100 %); 2 (sales MS al 75 %); 3 (sales MS al 50 %); 4 (sales MS al 25 %); 5 (sales MS al 100% + reguladores de crecimiento) / Treatments: 1 (100% MS salts); 2 (MS salts 75%); 3 (MS salts 50%); 4 (MS salts 25%); 5 (MS salts 100%+ growth regulators).

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey / Means with different letters in columns are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey test.

superiores en los tratamientos al 50 y 25%. Esto indica que a medida que se disminuyó la concentración de sales minerales en el medio de cultivo se incrementó de forma significativa el deterioro y necrosis del tejido foliar. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Borges et al. (2009), al plantear que los medios de cultivo compuestos por las sales MS al 75%, permiten de manera efectiva la conservación de vitroplantas, a partir de segmentos uninodales de ñame, clon caraqueño, durante nueve y doce meses con altos porcentajes de supervivencia y menores de senescencia foliar.

Regeneración *in vitro*

A las cuatro semanas reanudaron su crecimiento las yemas de segmentos nodales, procedentes de vitroplantas conservadas durante tres y seis meses en los distintos tratamientos.

Aunque existieron diferencias a los tres meses con respecto al tratamiento con una reducción de la concentración de sales hasta un 25%, la recuperación se mantuvo alta en los tratamientos restantes, observándose plantas saludables después de transcurridos seis meses (Cuadro 2).

Cuadro 2. Regeneración *in vitro* de segmentos nodales de clavel español (*D. caryophyllus*) después de periodos de conservación de tres y seis meses. Granma, Cuba. 2012-2013.

Table 2. *In vitro* regeneration of nodal segments of Spanish carnation (*D. caryophyllus*) after conservation periods of three and six months. Granma, Cuba. 2012-2013.

Tratamiento	Regeneración (%)	
	3 meses	6 meses
1 (100%)	90 a	89,5 b
2 (75%)	89,5 a	82,4 b
3 (50%)	82,4 a	86,9 b
4 (25%)	54,2 b	91,3 b
5 (100% + RC)	94,7 a	100 a
EE	1,24	

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey / Means with different letters in columns are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey test.

Los resultados de regeneración obtenidos en esta investigación demuestran la efectividad de los

distintos tratamientos de conservación evaluados tanto a tres como a seis meses, y en este último tiempo, principalmente para los tratamientos al 100%, 25% y el control, en los cuales se alcanzaron los mayores porcentajes de recuperación, obteniéndose un 91,3% para el tratamiento con una concentración de sales de 25%. Esto corrobora lo señalado por García et al. (2007) quienes propusieron el porcentaje de supervivencia y recuperación del material vegetal conservado, como los criterios a tener en cuenta al decidir la validez de una metodología para la conservación *in vitro* de especies vegetales. Otros autores consideraron el fenómeno de regeneración de órganos o plantas completas como un elemento determinante para establecer un método eficiente de micropropagación acelerada o conservación *in vitro* de variedades y especies (Infante et al., 2012).

Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos por García et al. (2004), quienes conservaron plantas *in vitro* de caña de azúcar con calidad, durante seis meses sin realizar subcultivos, basados en la reducción de las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962), entre 25 y 50% de su concentración normal. De igual manera, Castilla (2012) señaló la factibilidad de la conservación de plantas de *C. arabica* y *C. canephora* por un período de seis meses en medio MS al 50%.

LITERATURA CITADA

- Borges, M., Y. Alarcón, B. Malaurie, Y. Hernández, y J. Silva. 2009. Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (Dioscoreaceae). Rev. Peru. Biol. 16:203-208.
- Castilla, Y. 2012. Conservación de recursos fitogenéticos de café (Coffea spp.) por métodos biotecnológicos: una alternativa para su preservación. Cultivos Trop. 33:29-39.
- Castilla, Y., M. González, y R. Lara. 2014. Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.), micropropagadas con Biobras-16. Cultivos Trop. 35:67-74.
- Cruz, N., M. Brenes, A. Addelhour, y S. Alvarenga. 2011. Establecimiento de un protocolo para la conservación *in vitro* a mediano plazo de uña de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd). D.C.). Tecnol. Marcha 24(4):19-29.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro* Cell. Develop. Biol. Plant 47:5-16.
- García, L., M. De Fera, y K. Acosta. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Biotec. Veg. 7(2):67-79.
- García, L., J. Pérez, M. Rodríguez, B. Pérez, y Y. Martínez. 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. Biotec. Veg. 4(2):101-105.
- Infante, J., N. Rodríguez, L. Lien, J. Velázquez, D. Rivero, D. Sourd, F. Martínez, y J. Rodríguez. 2012. La biotecnología como herramienta para la propagación, conservación y el mejoramiento genético del guayabo. Rev. Colomb. Biotecnol. 14(2):7-19.
- Murashige, T., y F. Skoog. 1962. Un medio para un crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tejidos de tabaco. (En Inglés) *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Pardo, A., S. Rivero, y G. Alvarado. 2014. Conservación *in vitro* de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.). Bioagro 26:115-122.
- Scocchi, A., y L. Mroginski. 2004. La conservación *in vitro* de meristemas apicales de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) en condiciones de crecimiento reducido. (En Inglés) *Phyton* (B. Aires) 73:137-143.
- StatSoft, I. 2008. Estadística para Windows. Version 8.0. (En Inglés). StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA.

