

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Gypsophila paniculata* L.¹

In vitro propagation of *Gypsophila paniculata* L.

Mónica Castro V.², Christine Dardel H.² y Gabriela Verdugo R.²

S U M M A R Y

A series of experiments were carried out in order to establish optimal nutrient levels for *Gypsophila paniculata* propagated *in vitro* from meristem tips. Basal medium was 1/2 of Murashige y Skoog (1962) (MS) plus different combinations of IAA and kinetin. The same media were tested for phase I (establishment) and phase II (proliferation). No differences were observed for phase I and for number of shoots in phase II. However shoots were longest at highest level of auxin (V5 medium). Maximum vitrification rate (69%) was obtained when used 10 mg/L of IAA and 2 mg/L of kinetin.

Rooting was done *in vivo*. Two rooting media were tested, sand and sand peatmoss (3:1 v/v). No differences were observed in rooting percentage, but greater number of roots per plants were observed with the peat enriched medium. From one single explant, 7 plantlets were obtained during five months of culture.

Key words: tissue culture, micropropagation, *Gypsophila paniculata*.

INTRODUCCIÓN

Gypsophila paniculata es una planta ornamental subtropical de la familia de las Caryophyllaceas, la especie es originaria de Asia y Europa. Las flores miden 0,25 a 0,50 cm de diámetro, se ubican en paniculas y son usualmente blancas, existiendo también rosadas y rojas (Larson, 1980).

Esta especie presenta características interesantes, pues resulta importante su empleo en ramos o buqué, acompañando a otras flores de alto valor unitario, lo que hace que se requiera en grandes cantidades.

Gypsophila florece en día largo y presenta una vida de postcosecha bastante difícil y reducida; sin embargo, puede ser secada con procesos relativamente simples, a pesar de lo cual no está muy difundido su uso, principalmente por dificultades en la propagación.

El problema en la propagación de *Gypsophila paniculata* se debe a la dificultad de enraizamiento de los esquejes (Kusey y Weiler, 1980). Este problema se debe a que el proceso de emisión radical es muy lento, tardando 3 a 4 veces más que el clavel, especie de la misma familia. Por otra parte, necesita el uso de neblina artificial intermitente (mist), pero

no necesariamente de calor basal. Este factor acompañado además por la escasa cantidad de plantas existentes en Chile, hace de la micropropagación *in vitro* una excelente alternativa.

Esta técnica permite lograr una multiplicación rápida a partir de poco material vegetal obteniéndose resultados del orden de 80% de enraizamiento *in vitro* al usar el medio de cultivo adecuado. Además permite la obtención de plantas libres de enfermedades como bacteriosis, fungosis y virosis, las cuales estarían posiblemente afectando la floración (Kusey, Hammer y Weiler, 1980).

Los objetivos de esta investigación fueron determinar, para las etapas de establecimiento y proliferación, el mejor medio de cultivo y la influencia de dos tipos de sustratos sobre el enraizamiento *in vivo* de plantas micropropagadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso.

El material vegetal utilizado fueron ápices meristémicos obtenidos a partir de esquejes de plantas madres aparentemente sanas y que fueron mantenidas bajo condiciones de fotoperíodo de día corto, de manera de que no emitieran tallos florales. Estos esquejes se recolectaron en la localidad de Pachacama (V Región) y, una vez en el laboratorio, se

¹Recepción de originales: 13 de febrero de 1995.

²Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4-D, Quillota, Chile.

sometieron a un lavado con agua corriente y luego se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio (5 g/L) más Tween-20 (0,1%) por 10 minutos. De este material se obtuvieron ápices de 2 mm de longitud con 1 a 2 primordios foliares, con el objeto de implementar la técnica de saneamiento de la especie a futuro. Durante el período de cultivo los explantes fueron mantenidos en una cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 1.400 lux.

Como medio de cultivo base se utilizaron los macro y microelementos del medio de Murashige y Skoog (1962) diluidos a la mitad de su concentración, adicionando 100 mg/L de myo inositol y 30 g/L de sacarosa. Los medios se gelificaron con agar gelrite (3 g/L). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,7. La esterilización de los medios se realizó en un autoclave de control manual, a 121 °C y 1,1 bar de presión por 15 minutos.

El primer ensayo consistió en determinar el efecto de tres medios de cultivo con combinaciones diferentes de dos reguladores de crecimiento sobre el establecimiento *in vitro* de los explantes (Cuadro 1). Estos medios de cultivo se establecieron en base a los antecedentes reportados por Kusey, Hammer y Weiler (1980) y a preensayos de esta investigación. Los ápices fueron inoculados en frascos de 20 ml de capacidad que contenían 6 ml de medio de cultivo y tapados con papel de aluminio. Se utilizaron veinte réplicas por tratamiento. Para comparar los porcentajes de establecimiento a los 25 días de la siembra se utilizó un test de comparaciones de proporciones para dos poblaciones.

CUADRO 1. Composición de los medios de cultivo (mg/L) utilizados para el establecimiento de ápices y proliferación de brotes *in vitro* de *Gypsophila paniculata* L.

TABLE 1. Composition of the culture media (mg/L) used for establishing and proliferation *in vitro* of *Gypsophila paniculata* L.

Componentes	Tratamientos		
	V	V2	V5
Macroelementos	MS/2	MS/2	MS/2
Microelementos	MS/2	MS/2	MS/2
Myo inositol	100,0	100,0	100,0
Sacarosa	30.000,0	30.000,0	30.000,0
Agar gelrite	3.000,0	3.000,0	3.000,0
AIA	10,0	2,0	0,5
Kinetina	2,0	2,0	1,0
pH	5,7	5,7	5,7

MS: Murashige y Skoog (1962).

En el segundo ensayo se determinó el efecto de los mismos medios anteriores (Cuadro 1) sobre la proliferación de los explantes *in vitro*. Para esto, se subcultivaron los brotes formados en el ensayo 1 a los mismos medios frescos de los cuales provenían. Se utilizaron 16 réplicas por tratamiento. Las variables medidas fueron número, color y longitud de brotes, y el porcentaje de plantas vitrificadas. El diseño estadístico usado fue un completo al azar no balanceado.

En el tercer ensayo se determinó el efecto de dos sustratos (arena y arena más turba 3:1 v/v) sobre el enraizamiento *in vivo* de las plantas micropropagadas *in vitro*. Estos sustratos son los mismos que se han utilizado en otros ensayos para el enraizamiento de clavei *Dianthus caryophyllus* cultivados *in vitro* obteniendo buenos resultados con ellos (Zumaeta, 1990). Para esto se sumergió la base de los brotes, durante cinco segundos, en una solución de ácido indol butírico (AIB) (25 mg/L) y luego se plantaron en vasos plásticos de 40 ml de capacidad que contenían el respectivo sustrato estéril. Las plantas se ubicaron en un invernadero y permanecieron cubiertas con una bolsa de polietileno las que se fueron perforando paulatinamente, para ser retiradas a los 60 días. En este ensayo se utilizó un diseño anidado jerarquizado, evaluándose el número de raíces para cada una de las combinaciones de medio inicial, medio de proliferación y tipo de sustrato. De este modo se pudo establecer cuál de los factores tuvo mayor incidencia en el enraizamiento *in vivo* de las plantas de *Gypsophila* micropropagadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos

En los distintos medios nutritivos evaluados (V, V2 y V5), se lograron porcentajes de sobrevivencia adecuados (100, 90 y 80% respectivamente) sin observarse diferencias entre ellos a los 25 días post-siembra. El uso de concentraciones elevadas de los dos reguladores de crecimiento (ácido indol acético y Kinetina) excedieron el umbral de concentración adecuado, lo que provocó un estímulo de la organogénesis que se refleja en el buen establecimiento de los explantes, a pesar de las diferencias en las proporciones de auxina y citocinina entre ambos medios (Cuadro 1).

Proliferación *in vitro* de los brotes

La proliferación lateral no presentó diferencias estadísticamente significativas en los tres medios de cultivo evaluados después de 60 días de cultivo,

obteniéndose 4,2; 4,7 y 4,8 brotes por explante en los medios V, V2 y V5 respectivamente. Este número similar de brotes logrados en los tres medios nutritivos, implica que los reguladores de crecimiento presentes en cada medio fueron adecuados para permitir la inducción de brotes. Estos resultados hacen pensar que la producción de brotes es independiente de la relación que exista entre la auxina y la citocinina. Una vez alcanzado el umbral mínimo para desencadenar la inducción de formación de brotes, la producción de ellos sería igual dentro del rango de las concentraciones utilizadas en este ensayo.

Longitud de los brotes

Los explantes cultivados en el medio nutritivo V5 presentaron un largo promedio mayor de sus brotes que aquellos desarrollados en los medios V y V2, siendo estos últimos iguales entre sí (Cuadro 2). Al respecto, Das, Patau y Skoog (1956), señalan que cuando uno de los reguladores de crecimiento (auxina o citocinina) se encuentra en una concentración elevada, el otro puede hacerse limitante en alguno de los pasos necesarios para la división celular. De acuerdo con lo propuesto por estos autores, y considerando los resultados obtenidos en esta investigación es posible pensar que en los medios V y V2 la concentración de AIA utilizada haya sido excesiva y que ésta provocara un desbalance. Por otra parte, los brotes en los medios V y V2 presentaron abundante desarrollo de callo en su base, situación que no se observó en las plántulas del medio V5.

CUADRO 2. Efecto de la combinación de dos reguladores de crecimiento adicionados al medio MS sobre el crecimiento de brotes de *Gypsophila paniculata* L. después de 60 días en cultivo *in vitro*

TABLE 2. Effect of combination of two growth regulators added in MS medium, over shoot growth of *Gypsophila paniculata* L. after 60 days in culture

Medio de cultivo (mg/L)			Largo promedio de brotes (cm)
V	AIA	10,0	0,82 b ¹
	Kin	2,0	
V2	AIA	2,0	0,78 b
	Kin	2,0	
V5	AIA	0,5	1,38 a
	Kin	1,0	

MS: Murashige y Skoog (1962).

¹Promedios con igual letra no difieren estadísticamente, según el test de comparaciones múltiples (P > 0,05).

Vitrificación

El porcentaje de vitrificación observado en los explantes desarrollados en el medio nutritivo V fue mayor que el de aquellos desarrollados en los medios V2 y V5, sin presentarse diferencias entre estos dos últimos (Cuadro 3).

CUADRO 3. Efecto de la combinación de dos reguladores de crecimiento adicionados al medio MS sobre la incidencia de vitrificación de explantes de *Gypsophila paniculata* L. después de 60 días en cultivo *in vitro*

TABLE 3. Effect of two growth regulators combinations added to MS medium, over vitrification rate in explants of *Gypsophila paniculata* L. after 60 days in culture

Medio de cultivo (mg/L)			Vitrificación (%)
V	AIA	10,0	69 a ¹
	Kin	2,0	
V2	AIA	2,0	46 b
	Kin	2,0	
V5	AIA	0,5	31 b
	Kin	1,0	

MS: Murashige y Skoog (1962).

¹Promedios con igual letra no difieren estadísticamente, según el test de comparaciones múltiples (P > 0,05).

Al comparar la composición de los medios, se observa que el medio V es el que contiene las más altas concentraciones de reguladores de crecimiento. El uso excesivo de reguladores de crecimiento fue una de las primeras hipótesis para explicar la aparición de vitrificación. Beauchesne (1981) y Paques y Boxus (1987), señalan que al modificar el balance hormonal reduciendo la concentración de auxina y/o de citocinina se redujo la vitrificación. Los resultados obtenidos en este ensayo con *Gypsophila paniculata* L. coinciden con lo informado por estos autores, ya que al reducir la cantidad de auxina se presenta un menor porcentaje de plantas vitrificadas.

Al comparar la composición de los medios V2 y V5 (Cuadro 1), se observa que este último contiene menores cantidades de reguladores de crecimiento y sin embargo, se obtienen similares porcentajes de plantas vitrificadas. Esto se puede explicar, debido a que la incidencia de vitrificación se ve afectada tanto por las cantidades de reguladores de crecimiento presentes, así como por la relación existente entre ellos, entre otros factores.

El color predominante observado en los explantes desarrollados en el medio V2 fue el verde intenso, que es el que más se asemeja al color de una planta

crecida en condiciones normales, observándose una tendencia al desarrollo de colores más rojizos en el medio V5 y verdes más claros en el medio V.

Enraizamiento *in vivo*

El porcentaje de enraizamiento en los dos sustratos utilizados (arena y arena más turba) fue de 49 y 51% respectivamente, sin observarse diferencias estadísticamente válidas entre ellos, independiente del medio de cultivo del cual provenían los brotes. Sin embargo, al evaluar el número promedio de raíces por brote se observó que éste fue mayor en el sustrato compuesto por arena más turba que en arena sola, lográndose respectivamente 2,6 y 2,1 raíces promedio por planta de *Gypsophila* proveniente de los distintos medios nutritivos.

Las plantas que estaban vitrificadas presentaron un muy bajo porcentaje de enraizamiento en los dos sustratos evaluados. Esto concuerda con lo reportado por diversos investigadores. El principal problema de estas plantas vitrificadas es según Paques y Boxus (1987), la aclimatación *in situ*. Por otra parte, Debergh y Maene (1985), asocian los problemas durante el traspaso de plantas micropropagadas a condiciones de suelo a la incidencia de vitrificación.

CONCLUSIONES

Para la etapa de establecimiento se pueden utilizar indistintamente los tres medios nutritivos probados, ya que se obtienen porcentajes de establecimiento adecuados.

Durante la etapa de proliferación se debiera usar el medio MS diluido a la mitad de su concentración, adicionado con 0,5 mg/L de AIA y 1 mg/L de Kinetina por presentar los explantes cultivados en este medio un mayor crecimiento y menor incidencia de vitrificación.

Las plantas de *Gypsophila* micropropagadas presentan un número promedio de raíces mayor en el sustrato compuesto por arena y turba en una relación 3:1 v/v, que en arena sola.

El cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos de *Gypsophila paniculata* L. permite la obtención de aproximadamente 7 plantas al cabo de 5 meses a partir de un ápice.

RESUMEN

Se realizó un ensayo con el propósito de establecer los medios nutritivos más adecuados para el cultivo *in vitro* de *Gypsophila paniculata* L. a partir de ápices meristemáticos. El medio basal fue $\frac{1}{2}$ del medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) más diferentes combinaciones de AIA y Kinetina, sin observarse diferencias entre ellos en cuanto al establecimiento. Durante la etapa de proliferación y utilizando los mismos medios anteriores, se evaluó el número de brotes que resultó ser igual para todos, el largo de los brotes que resultó ser mayor para los explantes del medio V5, que contenía menor concentración de auxina. La incidencia de vitrificación fue mayor (69%)

en el medio con 10mg/L de AIA y 2 mg/L de kinetina. El enraizamiento *in vivo* en el sustrato arena más turba (3:1 v/v) dio mejores resultados, en cuanto al número promedio de raíces por planta, que la arena sola. Sin embargo, no se observó diferencias en los porcentajes de enraizamiento entre ambos sustratos. Al cabo de cinco meses se obtienen siete plantas enraizadas de *Gypsophila paniculata* L. a partir de un ápice meristemático.

Palabras claves: cultivo de tejidos, micropropagación, *Gypsophila paniculata*.

LITERATURA CITADA

- BEAUCHESNE, G. 1981. Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. C.R. Acad. Agric. 67: 1.389-1.397.
- DAS, N.K. ; PATAU, K. and SKOOG, F. 1956. Initiation of mitosis and cell division by kinitin and indolacetic acid in excised tobacco pith tissue. Physiologia Plantarum 9: 640.
- DEBERGH, P.C. and MAENE, L. 1985. Preparation of tissue cultured plants for rooting and establishment *in vivo*. Proceeding international symposium plant tissue and cell culture. Application to crop improvement Olomouc, Czechoslovakia.
- KUSEY, W.E., HAMMER, A. and WEILER, T.C. 1980. *In vitro* propagation of *Gypsophila paniculata* L. «Bristol Fairy». HortScience 15 (5): 600-601.

- KUSEY, W.E. and WEILER, T.C. 1980. Propagation of *Gypsophila paniculata* from cuttings. HortScience 15(1): 85-86.
- LARSON, R.A. 1980. Introduction to Floriculture. Ed. New York Academic Press. 607p.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- PAQUES, M. and BOXUS, PH. 1987. Vitrification: Review of Literature. Acta Horticulturae Nº 212.
- ZUMAETA, A. 1990. Efecto de algunos constituyentes de los medios de cultivo sobre la vitrificación de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivar Portrait. Tesis Ing. Agr. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 76 p.