

## PROPAGACION *in vitro* DE NUBE (*Gypsophila paniculata* L.) cv. "PERFECTA".

Zamorano Mendoza, J. J.<sup>1</sup>; Mejía Muñoz, J. M.<sup>2</sup>

**RESUMEN.** La nube o gypsophila (*Gypsophila paniculata* L.) es una planta que se usa como flor de corte, fresca o seca en el relleno de arreglos florales. La producción de esquejes debe provenir de plantas madre sanas y vigorosas, por lo que el cultivo *in vitro* de ápices vegetativos resulta una herramienta muy útil. El objetivo de este trabajo es el de determinar un medio de multiplicación de plantas a partir de ápices de tallo, así como un medio de cultivo para la formación de cáullos indiferenciados a partir de segmentos de hoja.

Para tal propósito, se usaron las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) suplementadas con diferentes concentraciones de AIA + BAP, AIB, ANA o 2,4-D. Las variables evaluadas fueron: número de ápices formados, número y longitud de raíces, formación de callos y aspecto de tallos.

En todos los medios probados hubo formación de brotes, siendo la combinación 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIA más 3.0 mg l<sup>-1</sup> de BAP la que produjo el valor más alto, de 5 brotes por ápice en cinco semanas. La formación de raíces fue favorable en todos los medios, incluso, sin reguladores de crecimiento, aunque 0.75 mg l<sup>-1</sup> de AIB presentó el mejor desarrollo de raíces. En el proceso de formación de callos se observó capacidad de la hoja para formar raíces, la cual no fue revertida en las condiciones de cultivo probadas.

**PALABRAS CLAVE:** Micropropagación, callos, reguladores de crecimiento.

### *In vitro* PROPAGATION OF GYPSOPHILA (*Gypsophila paniculata* L.) CV. PERFECTA

**SUMMARY.** The gypsophila (*Gypsophila paniculata* L.) or 'nube' is used as cut flower both as fresh or dry flower in bouquets. The propagation plant material for commercial production should be of high quality, shoot tip culture results in an invaluable tool in the production of healthy plant material.

Shoot tip and leaf segments were cultured in a Murashige and Skoog Medium (MS) with the aim to determine the conditions for plant multiplication and callus production. Different growth regulators; 2,4-D, NAA, IBA, IAA, BAP alone or in combinations, were used in concentrations ranging from 0 to 3 mg l<sup>-1</sup>. Shoot multiplication, rooting and callus production were evaluated. All combinations NAA + BAP regenerated shoots, but 0.5 mg l<sup>-1</sup> NAA + 3.0 mg l<sup>-1</sup> BAP produced the highest shoot number, 5 shoots per shoot tip within five weeks. Root production was obtained in all tested auxins, even without growth regulators, although IBA 0.75 mg l<sup>-1</sup> produced better root development. Callus were obtained from leaves in all tested media but it was evident that leaves have a high rooting capacity that could not be reverted by growth regulators.

**KEY WORDS:** Micropropagation, callus, growth regulators.

### INTRODUCCION.

La *Gypsophila paniculata* L. o nube, es una planta que pertenece a la familia de las Caryophyllaceas y es de gran importancia en la floricultura comercial, por su uso como flor fresca o seca en el relleno de arreglos florales.

La mayoría de las especies de gypsophila son originarias de Euroasia. Estas plantas son anuales, bianua-

les o perennes siendo las especies más importantes la *Gypsophila elegans* L., que es una planta anual usada tanto en jardines, como de corte y la *Gypsophila paniculata* L. que se utiliza más en la producción comercial de flor cortada; ésta, es una planta perenne, pero algunas veces es cultivada comercialmente como planta anual, los cultivares más comunes son 'Bristol Fairy' y 'Hanigra' que producen flores blancas sencillas, 'Perfecta' y 'Snow White' producen flores blancas y dobles, y 'Flamingo' que produce flores rosas dobles.

1 Profesor-Investigador Esc. Fitotecnía. UPAEP, Puebla, Pue.

2 Profesor-Investigador Depto. Fitotecnía. UACH. Chapingo, Méx. C.P. 56230

Una de las técnicas para propagar plantas ornamentales que es muy utilizada en la actualidad es la micropropagación, siendo la nube una especie que se propaga mediante esta técnica, por lo que éste trabajo tiene los siguientes objetivos:

Determinar el mejor medio de multiplicación mediante la combinación de ácido indol-3-acético (AIA) y 6-bencilaminopurina (BAP).

Observar el efecto de diferentes concentraciones de BAP, AIA y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre la formación de callo en segmentos de hoja, mediante la prueba de diferentes concentraciones de ácido indol-3-butírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA) establecer las condiciones adecuadas de enraizamiento de los brotes multiplicados.

## REVISIÓN DE LITERATURA.

**Formas de propagación.** La *gypsophila* es una especie que se puede propagar por esquejes, injertos, semilla y cultivo de tejidos.

**Esquejes.** La *gypsophila* requiere de días largos para que se induzca la floración, por tal motivo, las plantas madre deben ser cultivadas bajo días cortos, para obtener material vegetativo para su propagación. Los tallos de *gypsophila* se parecen mucho a los de el clavel (*Dianthus carophyllus*) por lo que son manejados de la misma forma. Cuando los brotes de la planta madre empiezan a elongarse y se hacen delgados, indica que se ha iniciado la floración, por lo tanto, éstos no deben ser utilizados para propagación. El enraizamiento usando el sistema de nebulización es bueno, pero debe cuidarse que el sustrato esté libre de patógenos y tenga buen drenaje, porque los esquejes son muy sensibles al exceso de humedad, los esquejes enraizan satisfactoriamente en tres semanas (Raulston *et al*, 1973).

**Injertos.** La propagación comercial de *G. paniculata* L. cv. 'Bristol Fairy' fue tradicionalmente realizado por medio de injerto. Un vástago vegetativo de 'Bristol Fairy' es injertado a un portainjerto de *G. paniculata* L. de flor de semilla, este injerto produce una planta vigorosa, la cual produce bien y es preferida por los productores comerciales. Sin embargo, se incrementan los costos de mano de obra por el uso de técnicas especializadas y actualmente, es difícil encontrar productores que tengan disponible la cantidad de semilla suficiente de patrones para establecer una plantación (Raulston *et al*, 1973).

**Semilla.** Existe disponibilidad de una gran variedad de semillas de *gypsophila* para su propagación, sin embargo, son raramente utilizadas en la producción comercial. El tipo blanco perenne *G. paniculata* L. el cual comprende cerca del 100% de la producción en Florida,

puede ser cultivado por semilla, pero la calidad varía, así como la cantidad de flores dobles y sencillas y generalmente no son buenas para la producción comercial. Las semillas de *gypsophila* emergen entre los 10 y 12 días después de sembradas y se necesitan de cuatro a seis meses para que la mayoría de las plantas lleguen a la floración (Raulston *et al*, 1973).

**Cultivo de Tejidos.** Al utilizar un medio de cultivo sólido con las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), los ápices de *gypsophila* desarrollaron varios brotes, los cuales pueden ser enraizados y establecidos en el invernadero. El ANA a una concentración de 0.5 mg l<sup>-1</sup> en combinación con BAP a una concentración de 2 mg l<sup>-1</sup>, promovieron la mayor formación de brotes (Weiler *et al*, 1983).

Al igual que en clavel, altas concentraciones de ANA estimulan en *gypsophila* la formación de callo, pero inhiben la multiplicación de brotes. La BAP fue superior a la cinetina para la proliferación de brotes. El máximo peso fresco de los brotes y del tamaño del callo así como la máxima longitud fue a 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP (Kusey *et al*, 1980).

Fue más difícil desarrollar la técnica para enraizar uniformemente los brotes, sin embargo, los brotes obtenidos del cultivo de ápices con una longitud promedio de 2 cm fueron sumergidos (las bases) por 5 seg en una solución de etanol al 20% con diferentes concentraciones de ANA y subsecuentemente cultivados con las sales minerales de White, resultando el mejor tratamiento el de 25 mg l<sup>-1</sup>. Al comparar 25 mg l<sup>-1</sup> de ANA con 25 mg l<sup>-1</sup> de AIB disueltos en una solución de etanol al 20%, se encontró que el enraizamiento se incrementó al utilizar AIB (Kusey *et al*, 1980).

Posteriormente al investigar el enraizamiento directo en el invernadero, los brotes obtenidos a partir de ápices sin enraizar (de 2 a 3.5 cm de longitud) proliferados por tres semanas en un medio con 0.05 mg l<sup>-1</sup> de ANA y 2 mg l<sup>-1</sup> de cinetina, sin un tratamiento adicional de auxinas y en un invernadero de nebulización, el 60% enraizaron en tres semanas y la mayoría de estas plantas sobrevivieron al quitar la nebulización y el contenedor del sustrato (Kusey *et al*, 1980).

## MATERIALES Y METODOS.

**Material Biológico.** El material biológico utilizado consistió en esquejes de *Gypsophila paniculata* L. cv. 'Perfecta', el cual antes de ser utilizado, estuvo en refrigeración por tres meses a 3°C.

**Desinfección de los Apices.** Los esquejes de aproximadamente 20 cm de longitud fueron enjuagados en agua corriente para eliminar contaminantes superficiales, para posteriormente recibir el siguiente tratamiento:

- A cada esqueje se le eliminaron las hojas maduras desde la base hasta el ápice, quedando únicamente hojas jóvenes de 3 cm de largo aproximadamente.

- Se cortó la base del tallo, para obtener un segmento apical de 4 cm.

- Inmediatamente después se sumergieron en alcohol al 70% por un minuto, para luego decantar el líquido y agregar una solución de cloro comercial (clorox) al 50% (equivalente a 3% de cloro activo) y se mantuvieron así por 10 min, todo esto dentro de la cámara de flujo laminar.

- Una vez completado el tiempo, se procedió a enjuagar los tallos tres veces con agua destilada, para así proceder a aislar los ápices.

**Desinfección de las hojas.** Las hojas jóvenes, casi maduras se tomaron de la parte media de los esquejes, las cuales son de color verde claro a diferencia de las maduras que son verde oscuro. El material se sumergió en cloro comercial al 50% durante 10 min; una vez completado el tiempo, se procedió a enjuagar el material tres veces con agua destilada, todo esto dentro de la cámara de flujo laminar.

**Aislamiento y siembra del explante.** Los tallos bajo el microscopio fueron disectados eliminando las hojas hasta dejar el ápice de un tamaño de 1 mm, constituido por el domo meristemático, más dos a cuatro primordios de hojas, colocando en la parte superior del medio de cultivo.

Se colocaron las hojas en cajas de petri estériles y se fueron cortando transversalmente en segmentos de 1 cm de longitud, para después colocarlas con la polaridad adecuada en el medio de cultivo, sembrándose 5 segmentos de hoja por cada frasco tipo gerber.

**Preparación del medio de cultivo.** El medio de cultivo consistió en las sales minerales de Murashige-Skoog (1962) con la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  al 50%, suplementadas con  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de myo-inositol,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de tiamina HCL,  $30 \text{ mg l}^{-1}$  de azúcar y  $7 \text{ g l}^{-1}$  de agar ajustando la solución a un pH de 5.7; se vaciaron 10 ml de medio de cultivo por tubo de ensaye de 2.4 cm de diámetro por 10 cm de longitud, y 20 ml por frasco tipo gerber sellándolos con papel aluminio. Posteriormente se esterilizaron en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 min. Los frascos y tubos se colocaron en un cuarto de incubación a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con 16 hr de luz a una intensidad de 1000 lux. La razón por la que se utilizó en el medio arriba mencionado, es porque en experimentos anteriores, realizados en el mismo laboratorio de la UPAEP se encontró que tal medio reducía la vitrificación de los brotes hasta en un 60%.

**Tratamientos.** Para establecer las condiciones de multiplicación se hicieron las combinaciones de 0.0, 0.1, 0.5 y  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA con 0.0, 0.5, 1.0 y  $3.0 \text{ mg l}^{-1}$  de

BAP. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar constando cada tratamiento de 10 repeticiones, la evaluación se realizó a las 5 semanas después de haber sido sembrados los ápices, cuantificándose lo siguiente: número de brotes, longitud de los brotes y porcentaje de brotes enraizados.

Para la formación de callo se realizaron las siguientes combinaciones 0.0, 0.5 y  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP con 0.5, 1.0 y  $2.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D, y 0.0, 0.5 y  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP con 0.5, 1.0 y  $2.0 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA.

La evaluación se realizó a los treinta días y las variables estudiadas fueron las siguientes: porcentaje de contaminación, alargamiento de la hoja, formación de raíz, clorosis, formación de callo y friabilidad, utilizando una escala del cero al cuatro, correspondiendo el cero a nada y el cuatro a mucho.

**Formación de Raíces.** Los brotes obtenidos por la multiplicación de los ápices se sembraron en tubos de ensaye, en el medio de cultivo que se utilizó para la multiplicación excepto la concentración de hormonas que fue la siguiente: cuatro dosis de ANA 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, y  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  y cuatro dosis de AIB 0.0, 0.25, 0.5, 0.75 y  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ . Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones y el diseño experimental utilizado fue completamente al azar, evaluándose a los 30 días lo siguiente: número de raíces por brote, longitud máxima de la raíz, ancho de la base del brote y porcentaje de plantas enraizadas.

## RESULTADOS Y DISCUSION.

**Multiplicación de ápices.** El análisis estadístico demostró que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos. El tratamiento que produjo el mayor número de brotes en promedio fue con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA y  $3.0 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP con 7.35 brotes/ápice. El tratamiento que produjo el menor número de brotes en promedio fue con  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA sin BAP con 1.0 brote/ápice (Cuadro 1).

Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Weiler *et al* (1983) quienes encontraron que el mayor número de brotes se producía al utilizar  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA en combinación con  $2 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP.

Se encontró que el efecto del AIA sobre el número de brotes por ápice no es estadísticamente significativo, por lo que se obtuvo la siguiente ecuación de regresión en la cual sólo se considera la cantidad de BaP:  $Y = 1.862 + 5.3814X - 1.3961X^2$ , con un  $r = 0.8354$  donde X es la cantidad de BAP en  $\text{mg l}^{-1}$  en el medio de cultivo y Y es el número de brotes por ápice; resultando que con  $1.9272 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP se obtiene el máximo número de brotes por ápice.

Resulta evidente que el número de brotes se debe a un efecto del BAP, en donde generalmente conforme se aumenta la dosis de BAP aumenta la tasa de

CUADRO 1. Interacción de las concentraciones de AIA y BAP en la multiplicación de Apices de *Gypsophila*.

AIA ( $\text{mg l}^{-1}$ )	BAP ( $\text{mg l}^{-1}$ )	No. de brotes por ápice	Longitud media de los brotes (cm)	% de brotes enraizados
0.5	3.0	7.85 a*	1.468	0.0
1.0	0.5	6.00 ab	2.126	25.0
0.0	1.0	5.77 ab	2.080	0.0
1.0	1.0	5.37 ab	1.467	0.0
0.1	1.0	5.28 ab	2.042	0.0
0.1	3.0	5.28 ab	3.119	0.0
0.1	0.5	5.12 abc	2.618	0.0
1.0	3.0	5.00 abc	0.982	0.0
0.0	0.5	4.12 bc	1.775	0.0
0.0	3.0	3.71 bce	1.180	0.0
0.5	0.5	3.37 bce	3.012	0.0
0.5	0.0	2.37 ce	1.779	12.5
0.1	0.0	2.00 e	2.307	33.0
0.0	0.0	1.33 e	1.708	33.0
1.0	0.0	1.00 e	1.330	44.0

\* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con una DMS = 2.85  $p < 0.05$ .

CUADRO 2. Efecto de la interacción de las concentraciones de BAP con 2,4-D y BAP con AIA sobre la formación de callo en segmentos de hoja de *Gypsophila*.

Tratamientos		% de contaminación	Alargamiento	% de enraizados	Clorosis	Callo
BAP ( $\text{mg l}^{-1}$ )	2,4-D ( $\text{mg l}^{-1}$ )					
1 0.0	0.5	80	0*	80	0*	1*
2 0.0	1.0	60	1	70	1	1
3 0.0	2.0	60	1	100	1	1
4 0.5	0.5	40	2	86.6	3	0
5 0.5	1.0	80	2	60	0	1
6 0.5	2.0	40	3	100	4	1
7 1.0	0.5	40	3	100	4	
8 1.0	1.0	60	3	100	4	0
9 1.0	2.0	60	4	100	4	0
BAP	AIA					
10 0.0	0.5	20	1	100	3	2
11 0.0	1.0	60	2	100	0	1
12 0.0	2.0	40	1	100	0	1
13 0.5	0.5	60	4	80	4	0
14 0.5	1.0	60	4	90	2	1
15 0.5	2.0	60	3	90	3	0
16 1.0	0.5	0	3	84	2	1
17 1.0	1.0	20	1	100	0	0
18 1.0	2.0	60	1	90	0	0

\* Estos números corresponden a la escala donde 0 = nada, 1 = muy poco, 2 = poco, 3 = regular y 4 = mucho.

CUADRO 3. Efecto de las concentraciones de AIB sobre la formación de raíces en brotes de *Gypsophila*.

Tratamiento ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Brotes enraizados (%)	No. de raíces por brote	Longitud máxima de las raíces (cm)	Diámetro del callo de la base (cm)
0.75	90	2.2	2.32 a*	0.63 b**
0.00	100	2.5	2.075 ab	0.45 b
0.50	90	2.2	2.03 ab	0.71 ab
0.25	100	2.7	1.966 ab	0.49 b
1.00	90	1.8	1.25 b	0.87 a

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con una \*DMS = 0.9462 y \*\*DMS = 0.3249 para  $p < 0.05$ .

CUADRO 4. Efecto de las concentraciones de ANA sobre la formación de raíces en brotes de *Gypsophila*.

Tratamientos ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Brotes enraizados (%)	No. de raíces por brote	Longitud máxima de raíces (cm)	Diámetro del callo de la base (cm)
0.00	100	2.2	2.09	0.69
0.25	80	1.1	1.64	0.75
0.50	80	1.3	1.58	0.83
0.75	88	3.1	2.03	0.88
1.00	70	2.5	1.78	0.67

multiplicación hasta un límite y no es así para el AIA.

También conforme disminuyen los niveles de BAP la tasa de multiplicación se reduce, sin hormonas o con una dosis mayor de AIA que de BAP los brotes generados enraizan (Cuadro 1).

**Formación de callo.** Los resultados obtenidos muestran que no hubo un tratamiento que proporcionara resultados satisfactorios. Esto es porque existe una respuesta del explante a inducir raíces al estar en contacto con el medio, sin importar la concentración de hormonas ya que en todos los tratamientos hubo formación de raíces (Cuadro 2).

**Formación de raíces.** Al enraizar los brotes con AIB se observó que el porcentaje de brotes enraizados para todos los tratamientos fue bueno estando entre 90 y 100%, así mismo el análisis estadístico demuestra que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos para el número de raíces por brote. Sin embargo, para la longitud máxima de las raíces sí hubo diferencia significativa, resultando la mayor longitud de raíces al utilizar  $0.75 \text{ mg l}^{-1}$  de AIB con 2.32 cm de longitud promedio, lo cual concuerda con lo obtenido por Kusey et

al (1980) ya que éste obtuvo mejores resultados con AIB que con ANA (Cuadro 3).

No hubo diferencia significativa para la longitud de las raíces y para el ancho de la base en los tratamientos con ANA (Cuadro 4).

Para ambos tratamientos (AIB y ANA), el tratamiento sin hormonas produjo buenos resultados por lo que se reduce más económico enraizar los brotes en un medio sin hormonas y con las sales MS con el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a la mitad de su concentración.

## CONCLUSIONES.

El medio de multiplicación óptimo fue utilizando  $2 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP.

De los tratamientos probados, ninguno produjo la calidad de callo adecuada.

Es posible enraizar satisfactoriamente los brotes de *Gypsophila* en un medio sin hormonas.

## LITERATURA CITADA

- KUSEY, W.E. Jr.; T.C. WEILER. 1980. Propagation of *Gypsophila paniculata* from cuttings. HortScience 15:85-86.
- - - -; P.A. HAMMER; T.C. WEILER. 1980. In vitro propagation of *Gypsophila paniculata* L. 'Bristol Fairy'. HortScience. 15:600-601.
- MURASHIGE, T.; F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:437-497.
- RAULSTON, J.C.; S.L. POE; F.J. MAROUSKY; W.T. WITTE. 1973. *Gypsophila* production in Florida. Florida Flowers Growers. 10(1):1-8.
- WEILER, T.C.; G.J. WILFRET; W.E. KUSEY Jr., HAMMER; B.K. HARBAUGH. 1983. Baby's breath under study by researches. Greenhouse manager. Cut Flowers Editor. 1(10):16-18.