

Universidad de La Habana
Facultad de Biología

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Tesis en opción al grado de Master en Biología Vegetal

Mención Biotecnología Vegetal

Título:

*Micropropagación de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.)*

con el empleo de Biobrás-16



Autora: Lic. Yanelis Castilla Valdés

Tutora: Dra. María Esther González Vega

La Habana, 2008

Quisiera agradecer a todos los que contribuyeron a la materialización de esta Tesis de Maestría:

A mi tutora (Chiqui) por sus valiosos consejos, desvelos y por estar siempre a mi lado, muchas veces a través de largas distancias.

A mis compañeros de trabajo por compartir juntos las dificultades de cada día y por intentar superarlas con creces. Entre ellos, agradecer especialmente a Mecha por la valiosa ayuda con las isoenzimas.

A los profesores del departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología, a los de antes y los de ahora, por ser los de siempre y guiarme en el difícil camino de la carrera y de la vida.

A mi oponente Marlyn por sus valiosas sugerencias y por su tiempo dedicado a la revisión del presente documento.

A mi familia por inculcarme el valor del trabajo y la superación como forma de lograr los objetivos en la vida.

A mis amigos por comprenderme y ayudarme a superar los malos momentos.

En fin, a todos...

¡Muchas Gracias!

RESUMEN

Los claveles constituyen una de las flores más cotizadas a nivel internacional debido a su belleza, su duración después de cortados y su posibilidad de florecer todo el año. De aquí que el presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar la efectividad del Biobrás-16, biorregulador de producción nacional con propiedades estimuladoras del crecimiento vegetal, como posible sustituto de la Kinetina en la propagación *in vitro* del clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). Se indujo la germinación de las semillas de este cultivo para evaluar el efecto de diferentes tratamientos desinfectantes; a partir de las plantas obtenidas se extrajeron los meristemos que fueron sembrados en varios medios de cultivo con diferentes concentraciones del análogo de brasinoesteroide Biobrás-16, en sustitución de la citoquinina. Las plantas obtenidas fueron propagadas en medio MS a partir de esquejes, conservando los tratamientos de que provenían del cultivo de meristemos. Durante la aclimatación de las plantas se realizó el montaje de dos ensayos: uno consistió en la siembra de las plantas obtenidas en la segunda propagación, manteniendo los tratamientos del cultivo *in vitro*, y en el otro se realizó la aspersión foliar con soluciones de Biobrás-16 con concentraciones idénticas a las empleadas en el cultivo de meristemos. Con el objetivo de determinar la estabilidad genética en el material vegetal cultivado *in vitro* con el uso del análogo de brasinoesteroide, se efectuaron análisis citogenéticos e isoenzimáticos. Se observó que ambos tratamientos de desinfección utilizados resultaron efectivos, eliminándose la contaminación y sin provocar daños a las plantas. En el cultivo de meristemos de manera general se determinó que el Biobrás-16 tuvo un efecto de citoquinina en la inducción de brotes y una acción sinérgica con la auxina en la inducción de raíz. En las propagaciones por esquejes el efecto positivo de este análogo de brasinoesteroide estuvo en dependencia de la dosis utilizada. En los ensayos de aclimatación el Biobrás-16 tuvo un efecto favorable sobre la supervivencia de las plantas. Se estableció un método de conteo de cromosomas para el clavel español, comprobándose el número cromosómico $2n=2x=30$, y determinándose su constancia durante la propagación, lo que indica que el Biobrás-16 en las concentraciones utilizadas y en las condiciones de cultivo no provocó variación en el número cromosómico. De manera general se considera que se mantuvo la estabilidad genética de las vitroplantas regeneradas.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la floricultura ha devenido mundialmente en un negocio de grandes proporciones, con tendencia a seguir expandiéndose entre un 6 y un 9 % cada año. Estadísticas basadas en los 17 principales países productores, permiten estimar que la superficie mundial destinada a la producción de flores es de aproximadamente 60 000 hectáreas (Proexport, 2007). En los últimos años, la exportación internacional de flores frescas ha ascendido a 3 769 millones de dólares (Fundación Chile, 2005), de los cuales los claveles representan aproximadamente el 12 %, por lo que constituyen una de 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. En países como Gran Bretaña e Italia ocupan el primer lugar en el mercado, seguidos por Suiza, Francia y Alemania. Además, en las prestigiosas subastas holandesas ocupan uno de los 5 primeros puestos (Moreno, 2004).

Cuba no participa en la exportación internacional de claveles, sino que los importa principalmente de Colombia y luego cada flor de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) de la variedad Chabaud Red se comercializa a un precio de 0.80 dólares. En Cuba esta especie tiene la dificultad de que sólo se reproduce por esquejes, ya que en nuestras condiciones climáticas no produce semillas. Los claveles que se cultivan en nuestro país se destinan principalmente al mercado en moneda nacional.

El cultivo de meristemos constituye uno de los métodos de propagación *in vitro*, que presenta determinadas ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, como: incremento del coeficiente de multiplicación de plantas genéticamente idénticas, obtenidas a partir de una sola planta; se desarrolla en áreas relativamente pequeñas, lo que facilita la manipulación de las plantas en un tiempo breve; permite optimizar las condiciones ambientales; facilita el intercambio de material genético, evita la erosión genética y permite obtener plantas libres de virus (Ramírez, 1995; Alvarenga, 2007). Si el cultivo de meristemos se utiliza en combinación con otro método de propagación *in vitro* como la micropropagación de esquejes de clavel, entonces es posible obtener numerosas plantas sanas, en un corto período de tiempo.

Los medios de cultivo constituyen un elemento indispensable para llevar a cabo los diferentes métodos de propagación *in vitro*. La presencia y concentración de sus componentes varían en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Están constituidos por un soporte sólido o líquido, sustancias inorgánicas como los minerales y

sustancias orgánicas como los carbohidratos, las vitaminas, los aminoácidos y los reguladores del crecimiento (González, 2003).

Los reguladores del crecimiento representan uno de los componentes más importantes de los medios de cultivo, ya que según se usen en combinación o no y en determinadas concentraciones, se puede definir el tipo de morfogénesis que se necesite (Jiménez, 1998). Generalmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico (ABA), etileno. En la actualidad se emplean también como reguladores otras sustancias que al incluirse en los medios de cultivo producen efectos positivos sobre el desarrollo de los callos, la morfogénesis y la organogénesis, entre ellas se puede mencionar los biopreparados bacterianos, las oligosacarinas y los brasinoesteroides (González, 2003; Suárez, 2008).

Los brasinoesteroides tienen la particularidad de estimular el crecimiento vegetal, aun en condiciones de estrés, además, no causan deformaciones en las plantas y tienen baja toxicidad (Núñez y Robaina, 2000). Se ha demostrado que en varios sistemas estos compuestos interactúan de forma sinérgica con las auxinas y que las respuestas de los brasinoesteroides y las giberelinas parecen ser ambas independientes y aditivas. En sistemas diseñados como característicos para citoquininas, actúan de varias formas (Marguardt y Adam, 1991; citados por Núñez y Robaina, 2000). De acuerdo con esto los brasinoesteroides pueden funcionar como auxinas en un momento y como giberelinas o citoquininas en otro, de aquí que un aspecto importante es el empleo de los brasinoesteroides como sustitutos de los reguladores del crecimiento comerciales, debido a su costo.

En Cuba, en la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, se producen análogos de brasinoesteroides, entre ellos los conocidos como Biobrás, que por su actividad biológica y su tentadora relación costo / beneficio, resultan muy atractivos para las entidades agrícolas (Hidrobo, 2001).

De manera general, estos análogos de brasinoesteroides han sido empleados tanto *in vivo* como *in vitro* en diversos cultivos como caña de azúcar (De la Fe, Ortiz y Jiménez, 1998), papa (Hernández, Moré y Nuñez, 1999), pepino (Cue, Ferro y Estévez, 2003), tomate (Fernández *et. al.*, 2003), tabaco (Mariña *et al.*, 2004), banano (González *et. al.*, 2005) y otros, obteniéndose buenos resultados. En cambio, no han sido muy utilizados para la propagación de especies ornamentales.

En este sentido pueden citarse los trabajos de Montes *et al.* (1997, b), que estudiaron el efecto de 0.5 y 1 mg·L⁻¹ de Biobrás-6 sobre el crecimiento y desarrollo de tres variedades de clavel reproducidas *in vitro*, entre ellas Chabaud Red, y analizaron la posible sustitución de la auxina AIA en el medio de cultivo establecido anteriormente para esta especie (Montes *et al.*, 1997 a). El tratamiento con la menor concentración del análogo fue el más efectivo para esta variedad, considerándose factible sustituir la auxina por el Biobrás-6 para disminuir los costos en el proceso de propagación.

Sin embargo, es conocido que además de los beneficios que reporta la aplicación del cultivo de tejidos *in vitro* y de nuevos biorreguladores en los medios de cultivo, estos pueden introducir alteraciones en el material hereditario, como microlesiones y macrolesiones (Hughes, 1980), por lo cual es necesario verificar la estabilidad genética de las plantas regeneradas. Los estudios citogenéticos e isoenzimáticos entre otros, permiten detectar algunas de estas alteraciones, por lo que su aplicación es de gran importancia (Lacadena, 1996).

Por todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo nos hemos planteado la siguiente hipótesis:

Es posible realizar la sustitución de la Kinetina en el medio de cultivo para la propagación *in vitro* del clavel español (*Dianthus caryophyllus* L), por el análogo de brasinoesteroide Biobrás-16, con el fin de obtener vitroplantas con un adecuado desarrollo vegetativo y disminuir los costos del proceso de micropropagación.

El objetivo general fue:

- Evaluar la efectividad del Biobrás-16 como posible sustituto de la Kinetina en la propagación *in vitro* del clavel español.

Los objetivos específicos consistieron en:

- Establecer un tratamiento eficiente de desinfección de las semillas de clavel español.
- Evaluar el efecto del Biobrás-16 en el cultivo de meristemas y en dos propagaciones sucesivas por esquejes de clavel.
- Evaluar el comportamiento durante la etapa de aclimatización, de las plantas de clavel micropropagadas.
- Estudiar la estabilidad y/o variabilidad genética con el empleo de marcadores citogenéticos e isoenzimáticos, de las plantas de clavel micropropagadas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Caracterización de la especie *Dianthus caryophyllus* L.

2.1.1. Descripción botánica y clasificación sistemática

El clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) es una planta herbácea, vivaz, de tallos articulados y nudosos, sus hojas son lineales, opuestas, rígidas, paralelinervias y de color verde, revestidas de una ligera capa cerosa. Las flores son terminales, persistentes y hermafroditas, con cáliz gamosépalo, verde coriáceo, pétalos fuertemente sujetos por el cáliz, de colores muy diversos, estambres en número de 10 y ovario unilocular. El fruto en forma de caja, puede contener de 60 a 90 semillas de color negro a marrón y de forma irregular, un tanto achatadas, siendo su diámetro de 2 a 3 mm (García y Azurmendi, 1976).

Esta planta pertenece a la familia Caryophyllaceae, que cuenta con 2200 especies distribuidas en 70 géneros, con una mayor representación en: *Silene* (700 spp), *Dianthus* (300 spp), *Arenarias* (200 spp), *Gypsophyla* (150 spp) y *Stellaria* (150 spp) (Judd *et al.*, 2007). El género más conocido es *Dianthus*, que representa a los claveles. De sus 300 especies, aproximadamente 30 tienen valor ornamental, y entre las más comercializadas se destacan *Dianthus chinensis* L. (clavel chino), *Dianthus plumarius* L. (clavel del poeta), *Dianthus barbatus* L. (clavel japonés) y *Dianthus caryophyllus* L. (clavel español) (Grupo Océano, 2003).

Su nombre genérico (*Dianthus*) proviene del vocablo griego que significa flor de Dios y el específico también proviene de los griegos *karya* (nogal) y *phylon* (hoja), en referencia al aroma de las hojas del nogal, semejante al del clavel (Ramírez, 1995; Carreres, 2008).

2.1.2. Origen y distribución

En la obra *Las Causas de la Vegetación*, escrita por el filósofo griego Teofrasto, ya se menciona a los claveles, lo que sugiere pensar que eran cultivados en esa época, hace aproximadamente 2000 años (Ramírez, 1995).

Los primeros claveles adaptados a la producción de flor cortada fueron seleccionados en la ciudad francesa de Lyon, alrededor del año 1845. Posteriormente, en 1852, algunas variedades conocidas fueron importadas a Estados Unidos por Charles Marc, florista francés residente en New York, lo que dio lugar al llamado American Tree Carnation, del que surgió cierto número de variedades. Luego fueron introducidas en otros países, como es el caso de Inglaterra, en 1856 (Infoagro, 2008).

En 1942, William Sim obtuvo por hibridación y selección, una serie de claveles que llevan su nombre (clavel Sim o americano) y han dado origen a un espectacular desarrollo de la producción actual (Carreres, 2008).

Su forma primitiva presenta flores rojas y hojas de color verde oscuro. Algunos autores señalan que las variedades cultivadas en Europa se han derivado fundamentalmente de cruces y variantes de *Dianthus caryophyllus* L. con *Dianthus plumarius* L. y que pueden definirse tres sitios de origen: Italia, Francia y España (Ramírez, 1995). Su hábitat natural se encuentra entre los 30° y 40° de latitud. Otras regiones naturales donde habita, además de la mediterránea son: Sur de California, Valparaíso y sus alrededores en Chile, Sudáfrica, la zona de Perth en Australia, la sabana de Bogotá y las montañas de México y Kenya (Infoagro, 2008).

2.2. Importancia del cultivo del clavel

Desde la introducción de los claveles en Inglaterra en el año 1856, los cultivadores y productores de flores se percataron de sus posibilidades comerciales y durante mucho tiempo se utilizaron para hacer guirnaldas y para aromatizar los vinos. Además, por su gran belleza, su duración una vez cortados, su resistencia al embalaje y al transporte, así como su posibilidad de florecer todo el año, se concentraron en la creación de variedades adecuadas para los requerimientos de los mercados respecto a la forma y color de sus flores (Afanador, 2005). Actualmente se trabaja en la obtención de plantas con un mayor número de botones florales, con pedúnculos no muy largos para evitar la pérdida de la flor y que el tamaño de esta sea proporcional a la longitud de la vara, que debe ser paralela respecto al tallo (Infoagro, 2008).

En el mercado mundial se comercializan especies con flores de diferentes colores: amarillas, rosadas, matizadas, blancas, rojas, naranjas. Sin embargo, las rojas son las más cotizadas con más de un 50% de aceptación. Dentro de las variedades comerciales con flores rojas se encuentran: Legión d'Honneur, Scania 3C, New Elsy, Amapola y Chabaud Red. Esta última variedad se caracteriza por presentar un delicado aroma y sus flores de pétalos dobles y dentados, tienen una larga duración como flores de corte (Afanador, 2005).

A nivel mundial actualmente se destacan Estados Unidos como el mayor mercado de clavel y Colombia como el país mayor exportador, con más de 4000 ha dedicadas a su cultivo. En la comercialización de estas flores también se destacan otros países como Marruecos, España y Costa Rica (Proexport, 2007).

En Cuba, aunque las flores son muy cotizadas por la población, su producción ha estado deprimida por factores económicos, por lo que actualmente se realizan acciones para rescatar la tradición de su cultivo. Los claveles de que se dispone son el chino (*D. chinensis* L.) y el español (*D. caryophyllus* L.), ambos como flor cortada, pero sus áreas de cultivo son muy limitadas (Montes *et al.*, 1997, a; Artiles, 2008, com. per.); no obstante en el mercado nacional se cotiza a un precio de 0.80 dólares.

2.3. Plagas y enfermedades que afectan el cultivo

El clavel español es atacado e infectado por diferentes insectos, hongos, bacterias y virus que perjudican su crecimiento y desarrollo. Actualmente los investigadores realizan la detección mediante modernas técnicas de laboratorio y aplican diversos tratamientos para su control.

Entre los agentes más difíciles de erradicar una vez que aparecen en la planta, se encuentran los virus. En el cultivo del clavel los virus más frecuentes, según Ramírez (1995); Afanador (2005); Infoagro (2008), son:

- Virus del moteado del clavel o *Carnation Mottle Carmovirus* (CarMV). Es el más común en la mayoría de las variedades de clavel. Afecta las hojas y las flores, sobre todo de las variedades rosadas y rojas. Se transmite por contacto radicular o por herramientas de trabajo y generalmente solo afecta a la familia Caryophyllaceae.
- Virus del mosaico de las nerviaciones del clavel o *Carnation Vein Mottle Potyvirus* (CVMV). Provoca un jaspeado foliar difuso localizado cerca de las nerviaciones. Es transmisible mecánicamente y por pulgones, siendo una enfermedad rara en el invernadero.
- Virus del jaspeado del clavel o *Carnation Etched Ring Virus* (CERV). Este virus infecta solamente a las plantas de la familia Caryophyllaceae, ocasionándoles manchas en las hojas. Los síntomas son más severos en el caso de infección doble con el CarMV. Esta enfermedad se propaga por los esquejes cosechados de plantas infectadas y también por pulgones.
- Debilitamiento o Stunt del clavel. El causante de esta enfermedad es un viroide llamado *Carnation Stunt Associated Viroid* (CarSAVd) que provoca debilitamiento mediante alteraciones importantes en el crecimiento de los claveles atacados. En plantas infectadas se recomiendan tratamientos con termoterapia y cultivo de meristemos.

2.4. Cultivo *in vitro*.

2.4.1. Características y aplicaciones del cultivo *in vitro*

Las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* consisten esencialmente en aislar un fragmento vivo de la planta (explante) y proporcionarle, de manera artificial, las condiciones físicas y químicas apropiadas para lograr la desdiferenciación de sus células y la obtención de células meristemáticas secundarias que originen una nueva planta mediante su rediferenciación (Thorpe, 1990).

En la actualidad, la mayoría de los investigadores coinciden en afirmar que se pueden diferenciar cinco fases o etapas del cultivo *in vitro*, para lograr una exitosa multiplicación (Orellana, 1998; Jiménez, 1998; Agramonte, Jiménez y Dita, 1998).

Fase 0 o Preparativa: Consiste en la selección de la planta donadora y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas con el objetivo de mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos en condiciones *in vitro*.

Fase I o de Establecimiento: Su propósito general es lograr un cultivo axénico y viable. A su vez consta de varios pasos, como son la selección del explante, la desinfección, la elección de los medios de cultivo y las hormonas del crecimiento a emplear en estos.

Fase II o de Multiplicación: Se realiza con el objetivo de lograr la proliferación de los explantes, sin perder de vista la conservación de la estabilidad genética.

Fase III o de Enraizamiento: Fase de inducción, elongación y desarrollo de raíces de cada uno de los propágulos que se han formado durante la fase anterior.

Fase IV o de Aclimatización: Las condiciones del cultivo *in vitro* provocan determinados cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas, por lo que se hace necesario garantizar un retorno gradual de estas a sus características normales para que sobrevivan el trasplante a las condiciones ambientales.

La multiplicación *in vitro* de plantas presenta algunas ventajas sobre los métodos convencionales de propagación vegetal. El número de plantas genéticamente idénticas obtenidas a partir de una sola planta se incrementa considerablemente, en dependencia de la capacidad del sistema de cultivo. Las plantas propagadas por técnicas de cultivo de tejidos están libres de hongos y bacterias superficiales, aunque sí se pueden propagar patógenos internos como virus y viroides y algunos endosimbiontes. Sin embargo, mediante el cultivo de meristemas pueden obtenerse plantas libres de virus. Las técnicas del cultivo de tejidos pueden usarse para obtener híbridos de especies incompatibles mediante el cultivo de embriones y óvulos. Además, en algunas especies mediante el cultivo de anteras se han

obtenido plantas haploides, que tienen algunas ventajas sobre las diploides, porque al inducir la duplicación del material genético, se obtiene una planta $2n$ pero homocigótica, lo que es de gran utilidad para los genetistas (Hughes, 1980; Jiménez, 1998).

Algunos autores han planteado que las aplicaciones del cultivo de tejidos se pueden resumir en: la mejora por mutagénesis y selección *in vitro*, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, la conservación de germoplasma, la propagación masiva y la ingeniería genética (Montes, 1994; Jiménez, 1998). El cultivo de tejidos ofrece otras ventajas al desarrollarse en áreas relativamente pequeñas, lo que facilita la manipulación de las plantas en un tiempo breve; permite optimizar las condiciones ambientales; facilita el intercambio de material genético y evita la erosión genética (Ramírez, 1995).

Las especies ornamentales de más de 40 familias distintas han sido propagadas usando las técnicas del cultivo de tejidos y en algunos casos la propagación ha sido aplicada a escala comercial. Entre las familias más cultivadas *in vitro* se encuentran: Orchidaceae, Araceae, Begoniaceae, Cactaceae, Gesneriaceae y Caryophyllaceae (Alvarenga, 2007).

2.4.2. Técnicas del cultivo *in vitro*. Cultivo de meristemos y cultivo de yemas

El desarrollo alcanzado en la propagación *in vitro* de plantas ha sido sorprendente en las últimas décadas. Las principales formas de cultivo *in vitro*, según Ramírez (1995) son: el cultivo de callos, el cultivo de anteras, granos de polen y óvulos, el cultivo de células en suspensión, el cultivo de protoplastos, las transformaciones de plantas, la micropropagación o cultivo de meristemos y el cultivo de yemas.

Muchas de las plantas ornamentales cultivadas están expuestas a enfermedades que reducen su vigor, calidad y rendimiento (Reed *et al.*, 2004). Los hongos, bacterias e insectos se pueden controlar con pesticidas o de manera biológica utilizando variedades precoces, labores culturales y otros procedimientos, pero con los virus no se ha tenido éxito, pues su transmisión se ve favorecida por la propagación asexual cuando el material original o planta madre ya se encuentra infectada. En el intento de controlarlos se han aplicado distintos métodos, como la quimioterapia, la termoterapia y el cultivo de meristemos, aunque este último constituye el más eficiente (Ramírez, 1995; Reed *et al.*, 2004).

Los meristemos son tejidos embrionarios que persisten durante toda la vida de la planta y se relacionan con el crecimiento. Son el lugar de formación de tejidos y órganos y están constituidos por células que se dividen activamente confiriendo a la planta una organogénesis permanente. Cuando los meristemos son separados de la planta madre y

puestos en condiciones favorables, son capaces de reconstituir una nueva planta (González, 2003).

El cultivo de meristemos es una técnica del cultivo de tejidos que se caracteriza por propiciar la propagación de plantas libres de virus. Aunque existen evidencias de que algunos virus pueden invadir los tejidos meristemáticos primarios, en muchas plantas puede existir una zona de longitud variable próxima a la punta de la raíz o de la yema, que esté libre de estos o que contenga muy poca cantidad (Alvarenga, 2007). Varias causas han sido atribuidas al hecho de que muchos virus no se encuentran en los tejidos meristemáticos de las plantas. Es posible que el punto de crecimiento se mueva con mayor rapidez que la capacidad de traslocación viral dentro de él, o que exista un bloqueo de la invasión viral debido al pequeño tamaño de los plasmodesmos. También puede que resulte imposible para los virus replicarse debido al estado bioquímico de las células en proceso de división (Montes, 1994). Otros autores plantean que esta técnica se fundamenta en el hecho de que la distribución de los virus en los tejidos de la planta infectada no es uniforme y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el ápice del tallo, por tanto son mayores las posibilidades de que en las células del meristemo se encuentre menor número de partículas o estén libres de estas (Jiménez, 1998).

Según Ramírez (1995), ha sido expresado que el cultivo *in vitro* de meristemos es uno de los métodos más satisfactorios para obtener material que mantenga las características del progenitor. El término "meristemo" ha sido utilizado para designar a fragmentos de tejidos en un rango desde 0,1 mm hasta 1 cm o más. Sin embargo, para el cultivo aséptico y el saneamiento este término implica el aislamiento del domo meristemático mas el primer primordio foliar en un rango de 0,1 a 0,5 mm y a partir de este tamaño se considera cultivo de ápices (Jiménez, 1998). Mientras mayor sea el tamaño del meristemo, mayor es el número de plantas que regeneran, pero por otra parte, el número de plántulas libres de virus que se obtienen es inversamente proporcional al tamaño de los explantes. Por tanto, sus dimensiones deben satisfacer ambas necesidades: el desarrollo en una planta completa y la eliminación de virus.

En un experimento en clavel español, en el cultivar G.B. Red Shy, el porcentaje de meristemos que se desarrollaron varió de 8 a 21 % en dimensiones del meristemo que variaron de 0.4 a 1 mm de longitud (Faccioli y Marani, 1999). Stone (1968), citado por Ramírez (1995), obtuvo plantas de clavel libres de virus mediante ápices de tallo de 0.2-0.4 mm de longitud.

El potencial regenerativo de los meristemos no solo se relaciona con la especie de planta, sino también con el cultivar. Por ejemplo, en un estudio con clavel español, el rango de plantas que se desarrollaron a partir de meristemos de 0.2 mm de longitud, varió de 68 a 83 % en cuatro cultivares, mientras fue solo del 8 % para meristemos de 0.4 mm de un quinto cultivar (Faccioli y Marani, 1999).

Aunque todos los meristemos de la planta en principio son un 'material de partida', el potencial morfogénico y el contenido de virus también dependen de su posición en el tallo y de que sea apical o axilar (Faccioli y Marani, 1999). No obstante, Montes *et al.* (1997, a), al realizar el cultivo de meristemos de diferentes variedades de clavel, no obtuvieron diferencias entre los meristemos apicales y laterales, ni en cuanto a la posición del esqueje en la planta.

La obtención de plantas a partir del cultivo aséptico de ápices y meristemos y posteriormente la multiplicación de yemas de estas plantas, constituye la base de la mayoría de los métodos de propagación *in vitro* vía organogénesis (Jiménez, 1998).

La proliferación de yemas axilares se encuentra entre los métodos que facilitan lograr una elevada tasa de multiplicación vegetativa *in vitro* y garantizar una elevada estabilidad genética (Orellana, 1998). Este método consiste en el aislamiento de una yema junto a un segmento de tallo, con el propósito de formar brotes a partir del desarrollo de las yemas, tanto las que se encuentran en las axilas de las hojas (axilares) como las que están en el extremo de los tallos (apicales). A su vez, las yemas en las axilas de las nuevas hojas formadas pueden ser subcultivadas y cuando se han obtenido suficientes brotes, estos pueden ser enraizados y después transferidos al suelo. Debe tenerse en cuenta que la tasa de multiplicación depende del número de yemas útiles, por tanto, si el número es pequeño, la propagación es baja (García, 1999).

De manera general, el clavel ha sido propagado mediante la regeneración de brotes adventicios partiendo de yemas axilares, yemas florales, hojas, entrenudos, pétalos y receptáculos. El medio más utilizado ha sido el MS (Murashige-Skoog, 1962) con la adición de benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y Kinetina (KIN) (Miller *et al.*, 1991; Salehi, 2006). En el caso de los explantes de hojas, generalmente la segunda hoja en ser removida del tallo y las hojas más jóvenes bajo el meristemo apical, muestran los mayores porcentajes de regeneración (Alvorst *et al.*, 1994).

2.4.3. Reguladores del crecimiento en los medios de cultivo.

Los medios de cultivo constituyen un elemento indispensable para llevar a cabo los diferentes métodos de propagación *in vitro*. La presencia y concentración de sus componentes varían en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Están constituidos por un soporte sólido o líquido, sustancias inorgánicas como los minerales y sustancias orgánicas como los carbohidratos, las vitaminas, los aminoácidos y los reguladores del crecimiento (González, 2003).

Los reguladores del crecimiento son uno de los componentes más importantes de los medios de cultivo, ya que según se usen en combinación o no y en determinadas concentraciones, se puede definir el tipo de morfogénesis que se necesite. Actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico (ABA), etileno (González, 2003).

Para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas es necesario un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Algunas especies son cultivadas sin adición de ningún regulador externo, probablemente debido a que existe suficiente cantidad endógena de hormonas (Jiménez, 1998).

Usualmente en los meristemas y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis es la raíz, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada (Jiménez, 1998). Algo contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemas que son empleados como material inicial para el cultivo *in vitro*, son áreas de síntesis de auxinas, por lo que la concentración endógena de las mismas es alta en ellos (Hu y Wang, 1983; citados por Jiménez, 1998).

Normalmente cuando se emplean ápices no se adicionan auxinas al medio aunque estas pueden estimular el crecimiento, pero en los meristemas de 0,5 mm o menos y en yemas en reposo es frecuente que no exista suficiente auxina endógena, siendo necesaria su adición exógena en estos casos (Jiménez, 1998).

En los últimos años se han descubierto otros grupos de reguladores que al ser empleados en los medios de cultivo producen efectos positivos sobre la morfogénesis y la organogénesis. Entre estos reguladores se encuentran los biopreparados bacterianos, las

oligosacarinas y los brasinoesteroides (González, 2003; Suárez, 2008). Estos últimos son considerados actualmente como la sexta clase de hormonas vegetales (Núñez y Robaina, 2000).

2.4.4. Descubrimiento y distribución de los brasinoesteroides en el reino vegetal

En 1968 fue reportada por primera vez la posible existencia de un nuevo tipo de hormonas vegetales, pero no fue hasta 1970 que se propuso que el polen del nabo (*Brassica napus* L.) contenía un nuevo grupo de hormonas de origen lipídico denominadas brasinas, pues los componentes de este polen ejercían una fuerte influencia sobre el crecimiento de las plantas. Posteriormente se demostró que las brasinas podían estimular el vigor de las semillas, así como el rendimiento y la eficiencia en los cultivos (Núñez y Robaina, 2000). Finalmente, en 1979 fueron aislados a partir de 40 kg de polen del nabo, 4 mg de un compuesto cristalino al que se denominó brasinólido; dos años después se obtuvo la castasterona, de agallas provocadas por insectos en el castaño (*Castanea crenata*). Desde entonces han sido aislados de fuentes naturales más de 40 nuevos compuestos con estructura química y actividad biológica semejantes al brasinólido, conformando una nueva familia de biorreguladores denominados brasinoesteroides (Kripach, Zhabinskii y de Groot, 2000).

Los brasinoesteroides, al igual que el resto de las fitohormonas, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Hasta la fecha se reportan en 32 angiospermas, incluyendo 9 monocotiledóneas y 23 dicotiledóneas. También se han encontrado en 4 gimnospermas, un alga verde y una pteridófita (Núñez y Robaina, 2000).

En cuanto a la distribución de los brasinoesteroides en la planta, algunos investigadores han destacado que el polen es la fuente más rica de estos compuestos, con cantidades que oscilan entre 10-100 mg·kg⁻¹; las semillas inmaduras también tienen altos contenidos (1-100 mg·kg⁻¹), mientras que las hojas y los tallos poseen niveles inferiores (10-100 ng·kg⁻¹). Estas fitohormonas también se hallan, aunque en menor cantidad, en brotes, flores, frutos y agallas (Núñez y Robaina, 2000). La biosíntesis de los brasinoesteroides ocurre en todos los órganos de la planta, sin embargo, estos compuestos se sintetizan más activamente en los tejidos jóvenes, mientras sus niveles son reducidos en los órganos maduros; hecho consistente con las observaciones de que los brasinoesteroides tienen efectos marcados en los tejidos durante su crecimiento activo (Mazorra y Núñez, 2008). Además, se conoce que los plastidios son organelos importantes para la localización de estos compuestos, por tanto se propone como posible lugar de síntesis el estroma de los mismos y los gránulos de

almidón como sitio de almacenaje (Gross y Parthier, 1994; citados por Núñez y Robaina, 2000).

2.4.5. Aplicaciones de los brasinoesteroides

La aplicación de brasinoesteroides en la agricultura y en la horticultura se basa en la posibilidad de incrementar las cosechas, estimular los procesos fisiológicos en las plantas y permitir el crecimiento de cultivos bajo condiciones desfavorables como: alta salinidad, sequía o insuficientes nutrientes, por lo que pueden ser llamadas hormonas del estrés. Además, no causan deformaciones en las plantas y tienen baja toxicidad (Núñez y Robaina, 2000).

Los brasinoesteroides son activos a concentraciones extremadamente bajas, generalmente soluciones de 0,001 a 0,1 ppm, rango cien veces inferior al de los otros reguladores (Núñez y Robaina, 2000). Las plantas responden a muy bajas dosis exógenas de brasinoesteroides ($5-10 \text{ mg}\cdot\text{ha}^{-1}$), comparables con su contenido natural (Khripach *et al.*, 1999).

Estudios fisiológicos en diversos laboratorios han demostrado que los brasinoesteroides pueden inducir una amplia variedad de respuestas celulares tales como: estimulación del crecimiento y la división celular; cambios en el potencial de membrana; elongación de los estambres; crecimiento del tubo polínico; diferenciación del xilema; promoción del crecimiento de tejidos jóvenes, particularmente los meristemos; curvatura de las hojas en los nudos y crecimiento de la raíz (Li y Chory, 1999; Núñez y Robaina, 2000).

También están involucrados en múltiples actividades fisiológicas como son la inducción de la biosíntesis del etileno, la producción de enzimas y la aceleración de la fotosíntesis. A nivel molecular producen cambios en el metabolismo de los ácidos nucleicos y las proteínas y contribuyen a la regulación de la expresión genética (Li y Chory, 1999; Mazorra y Núñez, 2008). Según estudios moleculares de otros autores, los brasinoesteroides constituyen uno de los componentes en una compleja serie de eventos señales que influyen sobre la fotomorfogénesis y el desarrollo (Hooley, 1996; citado por Prede, 1999).

Los brasinoesteroides pueden acelerar el crecimiento y la maduración de las plantas. Los efectos producidos por estos reguladores no pueden ser considerados de forma aislada ya que interactúan con otras hormonas vegetales endógenas y con señales ambientales, particularmente con la calidad de la luz (Mazorra y Nuñez, 2008). En los bioensayos frecuentemente inducen respuestas similares a las provocadas por muchas clases de promotores del crecimiento como las auxinas, giberelinas y citoquininas.

Se ha demostrado que en varios sistemas, estos compuestos interactúan de forma sinérgica con las auxinas. Por otra parte, las respuestas de los brasinoesteroides y las giberelinas parecen ser ambas independientes y aditivas. En sistemas diseñados como característicos para citoquininas, actúan de varias formas (Marguardt y Adam, 1991; citados por Núñez y Robaina, 2000). De acuerdo con esto los brasinoesteroides pueden funcionar como auxinas en un momento y como giberelinas o citoquininas en otro.

Además, incrementan la resistencia a fitopatógenos y pueden ser usados como sustitutos parciales o totales para algunos pesticidas originales. En este sentido, puede disminuirse la desfavorable interacción de los pesticidas con el ambiente (Khripach *et al.*, 1999).

2.4.6. Brasinoesteroides sintéticos y su utilidad en los cultivos

Desde el descubrimiento de la amplia actividad reguladora de los brasinoesteroides, la necesidad de aplicarlos ha ido en ascenso. Sin embargo, el proceso de extracción desde su fuente natural es costoso, pues se encuentran en muy bajas concentraciones endógenas, que oscilan entre 0.1 y 100 ng por kilogramo de material vegetal, por lo que se han establecido vías alternativas semisintéticas empleando esteroides naturales, que son menos complejas y más económicas (Khripach, Zhabinskii y de Groot, 2000).

Los brasinoesteroides sintéticos aunque no cuentan exactamente con todas las características estructurales de los compuestos naturales, mantienen una acción biológica similar a la de estos, que ha sido demostrada en bioensayos de laboratorio y en el campo, donde estos análogos sostienen su efecto varios días después de haber sido aplicados, a diferencia de los naturales cuya acción decrece con el tiempo (Núñez y Robaina, 2000).

Gracias a las amplias posibilidades de aplicación de los brasinoesteroides en la agricultura, desde hace más de 20 años se desarrolla una intensa actividad científica sobre este tema en numerosas universidades y centros de investigación de diferentes países. En Cuba, el Laboratorio ProNat de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, trabaja desde 1987 a partir de fuentes naturales en la síntesis de compuestos semejantes en estructura y acción a los brasinoesteroides (Pronat, 2008). Hasta el presente se ha logrado obtener una serie de productos, entre ellos los denominados Biobrás, que por la actividad biológica que presentan y con una tentadora relación costo / beneficio, son sumamente atractivos para las entidades agrícolas (Hidrobo *et al.*, 2001).

La utilización del Biobrás-16 en condiciones de campo con resultados satisfactorios ha sido informada por varios autores. En una variedad de tabaco negro (*Nicotiana tabacum* L.) se

incrementó significativamente el largo de la hoja, la superficie foliar y la biomasa al asperjarlo con una dosis de 20 mg·ha⁻¹ a los 25 y 35 días del trasplante (Mariña *et. al.*, 2004). Al estudiar el efecto de la aspersion de Biobrás-16 sobre la acumulación de materia seca y el rendimiento de grano del ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), Vargas e Irizar (2005) determinaron que el incremento de biomasa total se triplicó a determinadas densidades de plantación y se produjo un aumento del rendimiento en un 68 %.

En hortalizas como el pepino (*Cucumis sativus*) ha sido estudiado el efecto que ejerce el Biobrás-16 sobre la germinación de las semillas y la morfología de las plántulas a diferentes tiempos de inmersión en determinadas dosis, detectándose un incremento en la velocidad de germinación en el tratamiento de 16 horas con 0,01 mg·L⁻¹, mientras que el diámetro del hipocótilo y el porcentaje de germinación no obtuvieron resultados de significación (Cue, Ferro y Estévez, 2003). En la variedad Campbell, de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) han sido reportados incrementos en el rendimiento mediante la aspersion foliar de 50 mg·ha⁻¹ de Biobrás-16 (Fernández *et. al.*, 2003).

Durante la fase de aclimatización de las plantas cultivadas *in vitro* también resulta importante el empleo de estos biorreguladores, ya que son apreciables sus propiedades antiestrés (Núñez y Robaina, 2000). Por ejemplo, en una investigación realizada en banano (FHIA-18) mediante la aspersion de una solución con una concentración de 0,1 mg·L⁻¹ de un análogo espiroestano trihidroxilado de brasinoesteroide, se logró disminuir significativamente los efectos del estrés térmico e incrementar la supervivencia de las plántulas aclimatizadas, luego de su multiplicación en biorreactores de inmersión temporal (González *et. al.*, 2005).

Entre los trabajos referidos a plantas ornamentales, pueden citarse los de Fernández y Sotomayor (2000) y Blanco *et al.* (2004), que de manera general han evaluado el efecto de la inmersión de varios materiales de propagación de gladiolo en diferentes concentraciones de Biobrás-16 y han encontrado efectos positivos del mismo sobre la emisión de espigas, el rendimiento y la producción de bulbos, en dependencia de las dosis aplicadas. Asimismo, Suárez (2007) al realizar la aspersion foliar directa con Biobrás-16 y Pectimorf de plantas de dos especies de orquídeas, obtuvo un aumento significativo del número de pseudobulbos y raíces formadas, así como una mejora en la coloración de las plantas y en la calidad de las flores.

La efectividad de los Biobrás también ha sido demostrada al aplicarlo por aspersion en otras hortalizas y en papa, maíz, soya, uva, cítricos, café, caña (Núñez y Robaina, 2000); en

cambio, en condiciones *in vitro* los experimentos son más escasos, sobre todo en lo referido a las plantas ornamentales.

De la Fe, Ortiz y Jiménez (1998), evaluaron la eficacia de los análogos de brasinoesteroides Biobrás-6 y Biobrás-16 en la composición de los medios de cultivo empleados para la multiplicación y el enraizamiento de vitroplantas de caña de azúcar, donde ambas formulaciones fueron evaluadas en combinación y en sustitución de las hormonas utilizadas en ambos medios de cultivo.

En 1999, Hernández, Moré y Núñez realizaron un análisis sobre el efecto del Biobrás-6 y el Biobrás-16 en la micropropagación e inducción de callos en papa (*Solanum tuberosum* L.), utilizándose en el primer caso como suplemento del medio y en el segundo como sustituto de la kinetina. En ambos casos se puso de manifiesto una acción favorable sobre el crecimiento y el vigor de las plantas *in vitro*, así como un mayor crecimiento y calidad de los callos.

Montes *et al.* (1997, b) estudiaron el efecto de 0.5 y 1 mg·L⁻¹ de Biobrás-6 sobre el crecimiento y desarrollo de tres variedades de clavel reproducidas *in vitro*, entre ellas Chabaud Red, y analizaron la posible sustitución de la auxina Acido Indol Acético (AIA) en el medio de cultivo establecido anteriormente para esta especie (Montes *et al.*, 1997, a). El tratamiento con la menor concentración de este análogo fue el más efectivo para esta variedad, considerándose factible sustituir la auxina por el Biobrás-6 para disminuir los costos en el proceso de propagación. El efecto del Biobrás-6 también ha sido probado en plantas de clavel chino (*Dianthus chinensis* L.) propagadas *in vitro*, con buenos resultados (Domínguez, 2005).

2.4.7. Variabilidad genética en el cultivo *in vitro*

Aunque el cultivo de tejidos o células vegetales *in vitro* ofrece numerosas ventajas, en ocasiones cuando se usa para la propagación masiva de plantas, existe el riesgo de que se produzcan mutaciones o variaciones genéticas entre las plantas regeneradas. El término somaclon es empleado para las plantas regeneradas a partir de cualquier método de cultivo *in vitro* y que muestran variación genética entre ellas; a ese cambio se le denomina variación somaclonal y fue definida en 1981 por Larkin y Scowcroft (González, 2002). Además de la variación somaclonal se puede presentar también una variación epigenética, que es reversible y se debe a cambios fenotípicos que son generados por genes que son estimulados y se expresan por los efectos del cultivo *in vitro per se*, pero estos genes no

presentan cambios en el material hereditario (Pérez, 1998). Estas variaciones son indeseables cuando se producen bajo un sistema de propagación vegetativa *in vitro*, ya que la aparición de plantas fuera de tipo reduce la calidad del material de plantación (Plana, 2000).

Las mutaciones que se originan de la variación somaclonal pueden ser consecuencia directa del cultivo *in vitro* o pueden estar ya presentes en las células puestas en cultivo, por tanto se puede decir que el material inicial tiene un efecto importante sobre la producción de mutaciones (Pérez, 1998).

La frecuencia y rango de duración de las mutaciones se ven afectados, como se discute por algunos autores, por la duración y las condiciones del cultivo *in vitro* (Plana, 2000). Esto fue mostrado a nivel citológico en los inicios de la investigación en cultivo de tejidos y más frecuentemente, por medio de la comparación de las frecuencias de mutaciones y análisis molecular. En términos generales, se piensa que cuanto más se rompe la estructura organizativa de una planta, mayor es la posibilidad de que se produzcan mutaciones (González, 1993, citado por Plana, 2000).

En muchos casos, esta variabilidad es producida por factores externos, como resultado del uso de reguladores del crecimiento, que incrementan las posibilidades de que se produzcan mutantes. Se ha planteado que algunos reguladores como 2,4-D, ANA y citoquininas sintéticas, inducen inestabilidad cromosómica en el cultivo y en la posterior regeneración de plantas (Montes, 1994).

En la propagación de plantas a partir de brotes axilares jóvenes, generalmente no se presentan mutaciones espontáneas, mientras que la regeneración a partir de callos y suspensiones celulares incluye una gran variación por cambios estructurales o numéricos y con cada subcultivo las alteraciones genéticas y epigenéticas pueden acumularse, incrementarse y transferirse a los brotes regenerados. Por el contrario, los brotes axilares derivan directamente de meristemas organizados y están sujetos a bajos niveles de variación (Phillips y Hubstenberger, 1995; citados por García, 1999).

Ningún sistema de cultivo *in vitro* puede ser aceptado para la propagación masiva si introduce un alto grado de inestabilidad genética. El monitoreo de la estabilidad genética de los cultivos *in vitro*, utilizando marcadores morfológicos, bioquímicos, citogenéticos y moleculares, ha tomado gran auge desde la década de los años 80'. Para ello se requiere de métodos apropiados que permitan determinar y monitorear la variabilidad de forma masiva y eficiente (Cornide *et al.*, 2002). El estudio electroforético de diferentes sistemas

isoenzimáticos y de proteínas totales, así como los análisis citogenéticos, son técnicas válidas y rápidas para la detección de esta variabilidad (Diosdado *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2007).

2.4.8. Métodos para el estudio de la estabilidad y/o variabilidad genética en material micropropagado

2.4.8.1. Análisis citogenético

Los estudios citogenéticos en las plantas superiores comprenden la determinación del número de cromosomas, el análisis de la ploidía, así como el conocimiento de la forma y estructura de los cromosomas. Mediante el análisis citogenético, es posible estudiar el cariotipo (número estable de cromosomas que caracteriza a cada especie) y determinar la estructura y comportamiento de los cromosomas durante la división celular, lo que permite la caracterización y diferenciación de los genotipos (Lacadena, 1996).

Las técnicas citogenéticas han demostrado ser de gran utilidad en los trabajos de mejoramiento genético y de caracterización de cultivares. Una de sus aplicaciones más importantes es la detección de la variabilidad genética a partir de cambios ocurridos en los cromosomas durante el cultivo *in vitro* y la micropropagación (Portieles *et al.*, 2002). De manera general son considerados como más ventajosos que los morfoagronómicos ya que no están sujetos a una marcada influencia ambiental (Dueñas *et al.*, 2004), por lo que su aplicación es de gran importancia. Es común encontrar que los estudios citogenéticos estén acompañados por estudios isoenzimáticos, de hecho generalmente se complementan los unos a los otros. El conocimiento de la estructura del cromosoma, de los mapas cromosómicos y de los genes es muy importante, pues en ocasiones puede facilitar la preservación de la variabilidad (Majourhat *et al.*, 2007).

El género *Dianthus* ha sido objeto de algunos estudios acerca de su citología, principalmente referidos al número cromosómico de especies como *Dianthus chinensis* L. ($2n=2x=30$), *Dianthus barbatus* L. ($2n=2x=30$) y *Dianthus caryophyllus* L. ($2n=2x=30$), en el cual se señalan numerosos casos de poliploidía, donde $2n=6x=90$ (Bornas, 1961, citado por Ramírez, 1995). En cambio, no se ha encontrado información referida a la descripción de un método práctico que permita la observación y conteo de los cromosomas de *Dianthus caryophyllus* L.

2.4.8.2. Análisis genético-bioquímico

El término de 'isoenzimas', se refiere a las formas moleculares múltiples de enzimas que se derivan de un mismo tejido u órgano, con orígenes genéticos similares y que poseen actividades catalíticas muy semejantes, no exactamente superpuestas y que difieren considerablemente en sus cargas eléctricas y pesos moleculares (Brewer y Singh, 1971; Madriz, 2007).

Las proteínas e isoenzimas pueden ser separadas en su movimiento relativo a través de un medio polarizado. Colocando extractos de tejido en un medio y aplicando un campo eléctrico, las moléculas de proteínas migrarán a una velocidad determinada sobre la base de su carga neta, su peso molecular y el pH del medio. Las enzimas activas pueden ser separadas entonces en bandas discretas y su posición se hace visible por el uso de tinciones enzimáticas específicas (tinciones histoquímicas) (Brewer y Singh, 1971; Iglesias, 1986). La técnica de electroforesis consiste precisamente en la aplicación de estos principios, y para la transmisión de la corriente eléctrica, los medios electroforéticos emplean soluciones buffer, las cuales variarán de acuerdo al sistema que se estudie (Brewer y Singh, 1971).

Para la caracterización y detección de isoenzimas se utilizan distintas técnicas electroforéticas, destacándose: la electroforesis en gel de almidón (SGE), la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y el enfoque isoelectrico (IEF) (González, 2002; Madriz, 2007).

El patrón de bandas de una enzima o zimograma, depende del número de loci implicados, el número de alelos por locus y de la estructura cuaternaria de la enzima; las enzimas multilocus pueden presentar, además, bandas intergénicas, por combinación de las unidades polipeptídicas sintetizadas en los distintos loci (Ortiz, 1998, citado por Pinares, 2000)

El poder de los estudios isoenzimáticos va más allá de una identificación de los genotipos, pues proporciona un estimado de la variación genética entre individuos y poblaciones basándose en la proporción de genes comunes. La técnica isoenzimática ha sido descrita por algunos autores como “el mejor método corriente para medir variaciones genéticas cercanas al nivel del ADN, relativamente libre de efectos ambientales y sobre un número de muestras manipulables” (Pinares, 2000).

Es necesario tener en cuenta que la electroforesis de proteínas e isoenzimas puede no detectar todas las posibles diferencias al nivel de ADN, debido a la redundancia del código

genético y parcialmente debido al hecho también de que no todas las sustituciones de aminoácidos, provocan alteración en las movilidades electroforéticas (Brown y Clegg, 1983; citados por Pinares, 2000).

No obstante, se considera que las isoenzimas son herramientas poderosas en el estudio y monitoreo de la variabilidad genética entre individuos obtenidos por las técnicas de cultivo de plantas *in vitro* (González, 2002; Madriz, 2007).

En *Dianthus caryophyllus* L. los estudios realizados acerca de la electroforesis de isoenzimas son muy escasos y se refieren principalmente a la identificación de cultivares mediante esta técnica y a la detección de polimorfismo entre los parentales y la progenie de cruzamientos entre diferentes genotipos de esta especie (Messeguer y Arús, 1985, 1996).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre la germinación de las semillas de clavel español

En los ensayos de germinación se emplearon semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.), variedad Chabaud Red, de procedencia española y debidamente certificadas como libres de patógenos internos.

➤ Germinación en cámara húmeda

Este tratamiento fue considerado como el control de la germinación. Para ello se utilizaron 40 semillas, colocando 10 en cada una de las Placas Petri con papel de filtro humedecido. Las mismas se sometieron a condiciones de temperatura ambiente y luz artificial de 1000 lux durante 8 horas diarias. Se realizaron 3 repeticiones de este ensayo en el tiempo.

Se evaluaron cada 7 días durante dos semanas las siguientes variables: primer día de la germinación, porcentaje de germinación, porcentaje de plántulas con raíces, porcentaje de plántulas con hojas y porcentaje de semillas contaminadas.

➤ Germinación *in vitro*

-Desinfección del material:

Para este estudio se evaluaron dos desinfectantes: hipoclorito de sodio y cloramina-T, por haberse obtenido con ellos buenos resultados en estudios precedentes. La desinfección se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar, bajo condiciones de asepsia.

- Tratamiento con hipoclorito de sodio

Las semillas de clavel español fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl, 6 % de cloro activo) al 5 % durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una placa Petri con papel de filtro humedecido para facilitar su manipulación y siembra.

- Tratamiento con cloramina-T

Las semillas se sumergieron en una solución de cloramina-T al 1 % durante 20 minutos. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una placa Petri con papel de filtro humedecido.

-Siembra de las semillas en condiciones *in vitro*

Luego de desinfectadas las semillas de clavel español, estas fueron colocadas en tubos que contenían 12 mL de medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), sacarosa 30 g·L⁻¹ y Gelrite 2 g·L⁻¹. Se sembraron 40 semillas por cada tratamiento y se realizaron 3 repeticiones del ensayo. Las semillas se mantuvieron en el

cuarto de crecimiento en condiciones de temperatura de 25 ± 2 °C, luz artificial de 1000 lux de intensidad y humedad relativa del 85 %.

Se evaluaron cada 7 días durante dos semanas las siguientes variables: primer día de germinación, porcentaje de germinación, porcentaje de plantas con raíces, porcentaje de plantas con hojas y porcentaje de semillas contaminadas.

3.2. Efecto del Biobrás-16 como sustituto de la Kinetina en el cultivo de meristemos de clavel español

Para este estudio fueron tomadas como donantes de explantes, las plantas de 35 días de edad, obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de las semillas de clavel español.

Se seccionaron las plantas en esquejes de 1cm de longitud y se les desprendieron las hojas cuidadosamente. La extracción de los meristemos se realizó en la cabina de flujo laminar, con la ayuda de un estereo-microscopio marca MBC-1 con un aumento de 50 X. Se aislaron indistintamente meristemos apicales y laterales de 0.2 a 0.5 mm de longitud, con un par de primordios foliares.

Los meristemos se sembraron en tubos de ensayo con 10 mL de medio MS (Murashige-Skoog, 1962), siguiendo un Diseño Completamente Aleatorizado. Como medio control se utilizó el establecido por Montes *et al.* (1997 a) para la propagación de clavel español (Tabla 1). En el resto de los tratamientos se utilizó el análogo de brasinoesteroide Biobrás-16 en tres concentraciones distintas como sustituto de la Kinetina (KIN), manteniendo el resto de los reguladores del crecimiento presentes en el medio control (Tabla 1). Se realizaron 15 réplicas por tratamiento y tres repeticiones de cada tratamiento.

A los 45 días se evaluó el porcentaje de meristemos regenerados (meristemos que dieron lugar a plántulas), el número de nudos, el número de brotes, el porcentaje de plantas con raíces y el porcentaje de explantes con formación de callo.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de meristemos en clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

Componente	1 (Control)	2	3	4
Macroelementos, microelementos y vitaminas de MS	+	+	+	+
AIA 1.5 mg·L ⁻¹	+	+	+	+
AG ₃ 1 mg·L ⁻¹	+	+	+	+
KIN 0.8 mg·L ⁻¹	+			
BB-16 0.1mg·L ⁻¹		+		
BB-16 0.01mg·L ⁻¹			+	
BB-16 0.001mg·L ⁻¹				+
Sacarosa 30 g·L ⁻¹	+	+	+	+
Gelrite 2 g·L ⁻¹	+	+	+	+
pH=5.7	+	+	+	+

3.3. Propagación por esquejes de clavel español a partir de plantas obtenidas por cultivo de meristemos con el Biobrás-16

Para la primera propagación fueron utilizadas plántulas de clavel español de aproximadamente 35 días de edad obtenidas a partir del cultivo de meristemos, respetando 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 g·L⁻¹ de sacarosa y 2 g·L⁻¹ de Gelrite.

Para la segunda propagación se tomaron las plántulas provenientes de la primera propagación y los esquejes fueron sembrados en condiciones idénticas a las de estas, 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.

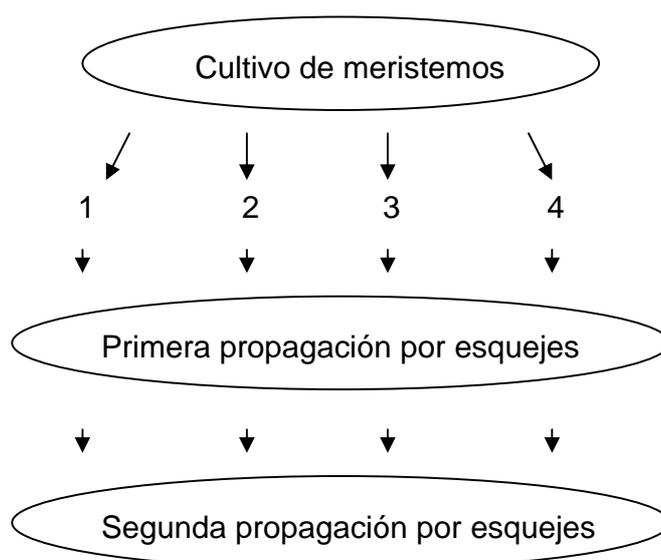


Fig. 1. Esquema del cultivo de meristemos y la propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

3.4. Efecto del Biobrás-16 en la aclimatización de las vitroplantas de clavel español

Para este estudio se tomaron plantas provenientes de la segunda propagación, cuando presentaban aproximadamente cinco nudos, y se les sometió a un lavado de las raíces con agua destilada para eliminar los restos del medio de cultivo. Las plantas fueron sembradas en bolsas de polietileno con una mezcla de materia orgánica (cachaza) y suelo Ferralítico Rojo compactado (Hernández et al., 1999) en una relación 1: 2 v/v, y se les colocó un frasco por encima durante los 7 primeros días para disminuir la transpiración, ya que el estudio se realizó durante los meses de verano (julio y agosto). Además, las plantas fueron colocadas en un umbráculo, con una temperatura ambiental promedio de 28 ± 2 °C.

Durante esta etapa fueron realizados dos ensayos:

Ensayo No. 1 Se tomaron 15 plantas de cada tratamiento y fueron sembradas en las condiciones anteriormente mencionadas, respetando los tratamientos de los que provenían y sin realizar aspersión foliar sobre ellas con ningún tipo de solución con biorregulador.

Ensayo No. 2 Se tomaron 15 plantas de cada tratamiento y fueron sembradas respetando los tratamientos de los que provenían, de manera que las plantas provenientes del tratamiento control fueron asperjadas con agua; las plantas provenientes del tratamiento 2 fueron asperjadas con una solución de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16, las del tratamiento 3 con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16 y las del tratamiento 4 con $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16, a los 10 días de comenzada la aclimatización.

Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo, siguiendo un Diseño Completamente Aleatorizado. A los 40 días de cultivo se determinó el porcentaje de supervivencia de las plantas en cada tratamiento de los ensayos realizados.

3.5. Estudio citogenético en las plantas obtenidas en la germinación, el cultivo de meristemos y las propagaciones sucesivas de clavel español

Para realizar el estudio citogenético con el objetivo de determinar un método de conteo de cromosomas para el clavel español, fueron tomadas al azar 20 raíces de 1cm de longitud de las semillas germinadas en cámara húmeda y de las germinadas *in vitro* y fueron sometidas a tres métodos de conteo de cromosomas, como se muestra en la tabla 2, para seleccionar el que permitiera la mejor visualización de los mismos. Este método se utilizó posteriormente para comprobar el número cromosómico de las plántulas obtenidas a partir del cultivo de meristemos y las propagaciones sucesivas.

En la observación, conteo y fotografiado de los cromosomas se analizaron 20 células por tratamiento, con el empleo de un microscopio óptico Motic con aumento máximo de 100 X, acoplado a una cámara fotográfica con visualización en la computadora mediante el programa Motic Imagen.

Tabla 2. Métodos empleados para el conteo de cromosomas en el clavel español.

	Método C1	Método C2	Método C3
Pretratamiento	8 hidroxiquinolina (0.02%) durante 2h	8 hidroxiquinolina (0.02%) durante 2h	8 hidroxiquinolina (0.02%) durante 3h
Fijación del material	Ácido acético-alcohol absoluto 3:1 durante 7 días	Ácido acético-alcohol absoluto 3:1 durante 7 días	Ácido acético-alcohol absoluto 3:1 durante 7 días
Lavado	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada
Hidrólisis	HCl 1N a 60°C durante 5 minutos	HCl 1N a 60°C durante 10 minutos	HCl 1N a 60°C durante 15 minutos
Lavado	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada
Tinción	Hematoxilina de Gomory a 60 °C durante 1h	Hematoxilina de Gomory a 60 °C durante 1:30h	Hematoxilina de Gomory a 60 °C durante 2h
"Squash"	+	+	+
Conteo de los cromosomas	+	+	+

3.6. Estudio isoenzimático de las plantas obtenidas en el cultivo de meristemos y las propagaciones sucesivas de clavel español

Con el objetivo de comprobar la estabilidad y/o variabilidad genética de las plantas obtenidas a partir del cultivo de meristemos en los diferentes tratamientos y las respectivas propagaciones, se realizó un estudio isoenzimático para los sistemas peroxidasa, fosfatasa ácida, malato deshidrogenasa y esterasa.

Para la preparación de las muestras, fueron seleccionadas al azar hojas de las plántulas obtenidas a partir del cultivo de meristemos en los tratamientos 1, 2, 3, 4 y sus correspondientes propagaciones (Tabla 3).

Los extractos crudos se obtuvieron macerando 1 gramo de hojas frescas y sanas en un mortero frío, a las cuales se les añadió 5 gotas de solución de sacarosa al 20 %. Posteriormente fueron envasados en viales y mantenidos a -15°C hasta su utilización.

Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE) al 8,5 %, a una intensidad de corriente constante de 25 mA, en una cámara de electroforesis en lámina vertical Mighty Small II de Pharmacia Biotech y utilizando un buffer de corrida de Tris-glicina 0.025 M y pH=8.3 (Laemmli, 1970).

El tiempo de corrida se estableció según el desplazamiento de la banda de Kohlrausch hasta aproximadamente 8,5 cm del inicio.

Se aplicaron tinciones específicas (Tabla 4), con el objetivo de visualizar las bandas de cada sistema estudiado.

Tabla 3. Muestras foliares de clavel español (*D. caryophyllus* L.) para el estudio isoenzimático.

Nº 1	Tratamiento 1 (control)
Nº 2	Tratamiento 2
Nº 3	Tratamiento 3
Nº 4	Tratamiento 4
Nº 5	1 ^{ra} propagación del tratamiento 1
Nº 6	1 ^{ra} propagación del tratamiento 2
Nº 7	1 ^{ra} propagación del tratamiento 3
Nº 8	1 ^{ra} propagación del tratamiento 4
Nº 9	2 ^{da} propagación del tratamiento 1
Nº 10	2 ^{da} propagación del tratamiento 2
Nº 11	2 ^{da} propagación del tratamiento 3
Nº 12	2 ^{da} propagación del tratamiento 4

Tabla 4. Sistemas isoenzimáticos estudiados y tinciones empleadas en muestras de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

Sistema enzimático	Método de tinción	Método de conservación
Esterasas	Iglesias (1986)	Ac. Acético 7 %
Fosfatasas Ácidas		Ac. Acético 7 %
Peroxidasas		Ac. Acético 7 %
Malato Deshidrogenasa	Wendel y Weeden (1989)	Ac. Acético 7 %

Después de las tinciones, los geles fueron lavados con agua destilada y mantenidos en una solución de ácido acético glacial al 10 %, hasta el momento de confeccionar los electroforetogramas.

Las movilidades electroforéticas fueron medidas en centímetros, tomando como punto cero u origen el comienzo del gel de separación y utilizando una regla dividida en centímetros para ubicar las bandas en el papel milimetrado. La posición relativa de cada banda (Rf) fue establecida sobre la base de la distancia media de migración obtenida, dividida entre la distancia de migración del frente de corrida. Se realizaron tres repeticiones de cada corrida.

3.7. Análisis estadístico

Para los experimentos de la germinación *in vitro*, el cultivo de meristemas, las propagaciones y la aclimatización, 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) utilizando el programa Comparpro, desarrollado en el INCA.

3.8. Valoración económica

Con la finalidad de determinar la factibilidad del empleo del Biobrás-16 como posible sustituto de la KIN en los medios de cultivo para la propagación *in vitro* del clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.), se realizó una breve valoración económica atendiendo a las condiciones de estudio en el presente trabajo. Para ello se tuvo en cuenta que el costo de producción de 1L de Biobrás-16, con una concentración de 1 mg·mL⁻¹, es de \$200 MN (listado oficial de la UH).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre la germinación de las semillas de clavel español

Para todos los tratamientos, la germinación de las semillas comenzó al cuarto día de sembradas, lo cual evidencia que los tratamientos de desinfección utilizados, no afectaron la fecha de germinación de las mismas. Estos resultados coinciden con los señalados por Pinares (2002) durante un estudio realizado para el establecimiento de las condiciones necesarias para la propagación de claveles chinos (*Dianthus chinensis* L.), en los cuales la germinación de las semillas comenzó al cuarto día.

El porcentaje de germinación obtenido en la primera evaluación (a los 7 días), en el tratamiento control, fue del 87,5 % de las semillas (Fig. 2).



Fig. 2. Germinación en cámara húmeda de las semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

En el tratamiento con la solución de hipoclorito de sodio, para este período de evaluación germinó el 85 % de las semillas (Fig. 3), cifra superior a la obtenida por Montes *et al.* (1997 a) en un estudio realizado para la propagación de cuatro variedades de claveles españoles, entre ellas la analizada en este trabajo, para la cual se obtuvo un 62 % de germinación. Esta diferencia probablemente se debió a que estos investigadores informan la presencia de daños en la cubierta de las semillas y los embriones, producto de la desinfección efectuada.

En el tratamiento con la solución de cloramina-T en la primera evaluación se obtuvo un porcentaje de germinación del 87,5 %, coincidiendo con el obtenido durante la germinación en cámara húmeda (control), lo cual evidencia que el empleo de este desinfectante, empleado por primera vez en el cultivo del clavel, no ocasionó daños a las semillas.

En la segunda evaluación, a los 14 días, se observó que los porcentajes de germinación en todos los tratamientos se mantuvieron con los mismos valores obtenidos en la primera

evaluación, sin diferencias estadísticas entre ellos. Estos resultados coinciden con los de Montes *et al.* (1997 a) quienes señalaron que el mayor porcentaje de germinación de las semillas de clavel español se obtuvo durante los primeros siete días a partir del momento de efectuada la siembra *in vitro*. Sin embargo, Domínguez (2005), informó la obtención de una creciente germinación de semillas de clavel chino en evaluaciones sucesivas, hasta alcanzar el valor de 93,1 % a los 35 días, lo cual evidencia las diferencias que existen entre la germinación *in vitro* de las distintas especies de clavel.

En cuanto a los porcentajes de plántulas con raíz y plántulas con hojas (Fig.3), para el tratamiento control en la primera evaluación se observó la emergencia de la radícula en un 55 % de las plántulas y la emergencia de las primeras hojas en un 52,5 % de las plántulas.

En el tratamiento de desinfección con la solución de hipoclorito de sodio, en la primera evaluación el 62,5 % de las plantas poseía raíces, la mayoría de estas con una longitud de 1 cm aproximadamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Domínguez (2005), que obtuvo un 63,6 % de plántulas con raíces a los 7 días de sembradas en iguales condiciones. En esta primera evaluación se observaron plántulas con el primer y segundo par de hojas verdaderas, representando en total el 57,5 % de las semillas sembradas con estas características (Fig. 3). Estos resultados evidencian la calidad de las semillas y el efecto positivo del medio de cultivo utilizado, el cual favorece la germinación de las mismas y el rápido crecimiento y desarrollo de las plántulas.

En el tratamiento de desinfección con Cloramina-T, el porcentaje de plantas con raíces obtenido en la primera evaluación fue del 57,5 % y el porcentaje de plantas con hojas fue del 60 %.

En la segunda evaluación, a los 14 días, aumentó a 85 % en el tratamiento control el porcentaje de plántulas con raíz (Fig. 3) y la mayoría de estas tenían entre 1 y 1.5 cm de longitud. Con respecto a la emergencia de las hojas, en la segunda evaluación el 82,5 % de las plántulas presentaban hojas, superando el 52,5 % obtenido a los siete días.

En el tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio, la cantidad de plántulas de clavel español con raíces y con más de dos pares de hojas aumentó a un 80,0 % en la segunda evaluación (Fig. 3). En esta fecha se comenzó a observar el tercer y cuarto par de hojas, resultados que coinciden con los obtenidos por Pinares (2002) en claveles chinos, donde se observaron como promedio 4 y 6 pares de hojas a los 10 y 30 días de sembradas las semillas, respectivamente, en un medio de igual composición al utilizado en este estudio. Por otra parte, Domínguez (2005) obtuvo un porcentaje de plantas con raíces del 87,9 %;

ligeramente superior al obtenido en este estudio en los claveles españoles, lo cual pudiera deberse al hecho de las diferencias genotípicas existentes entre ambas especies de clavel.

En el tratamiento de desinfección con cloramina-T, en la segunda evaluación aumentó el porcentaje de plantas con raíces a un 82,5 % y el porcentaje de plantas con hojas a un 85 %

Con respecto al porcentaje de contaminación, en la primera evaluación en el tratamiento en cámara húmeda se detectó la presencia de contaminación en el 75 % de las semillas, resultados que coinciden con los obtenidos por Hernández *et al.* (2002) al realizar la germinación de semillas de clavel en condiciones similares. Sin embargo, en el resto de los tratamientos no se observó contaminación en este período.

En la segunda evaluación, en el tratamiento en cámara húmeda se observó un 100 % de contaminación y en el resto de los tratamientos no se observó contaminación, lo que evidencia la factibilidad de incluir ambas alternativas de desinfección en el cultivo evaluado. A diferencia del tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio, el tratamiento de desinfección con cloramina-T se utiliza por primera vez en semillas de esta especie y presenta determinadas ventajas sobre el anterior, como por ejemplo: la cloramina-T no es irritante ni corrosiva, es biodegradable y proporciona actividad y protección por períodos más prolongados que los desinfectantes a base de hipoclorito (Farquímica, 2008).

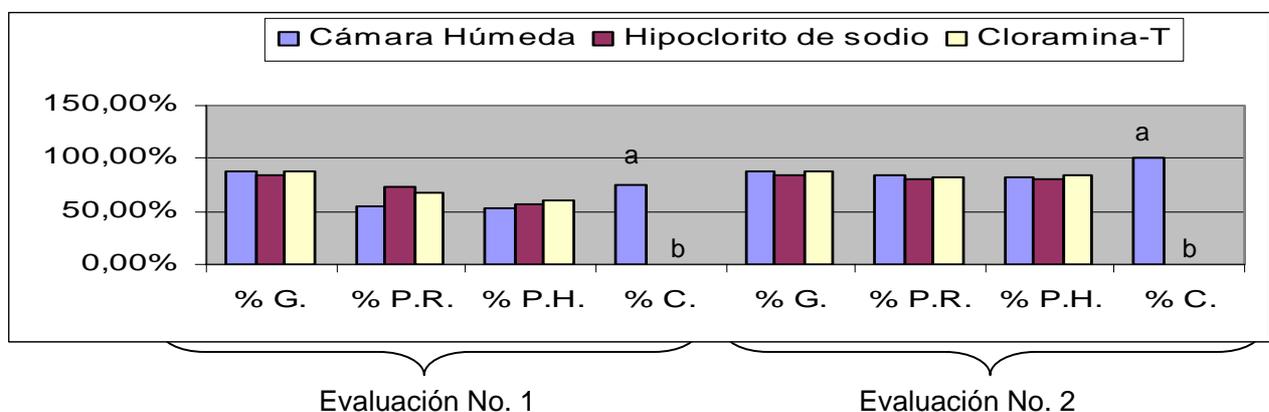


Fig. 3. Porcentajes de germinación, plantas con raíces, plantas con hojas y contaminación obtenidos en las dos evaluaciones de cada ensayo de germinación de las semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

Leyenda: % G.=Porcentaje de Germinación; % P.R.: Porcentaje de Plantas con Raíces; % P.H.: Porcentaje de Plantas con Hojas; % C.: Porcentaje de Contaminación $S_{\bar{x}}$: 0,05.

De manera general, se puede considerar que ambos tratamientos de desinfección son efectivos para el establecimiento *in vitro* de semillas de clavel español, ya que se alcanzó la desinfección del 100 % de las semillas y se logró la eficiente germinación y el posterior desarrollo de las plántulas, aspectos que se demuestran al no existir diferencias

significativas entre las diferentes variables evaluadas durante la germinación en cámara húmeda y la germinación *in vitro* con el empleo de ambos tratamientos de desinfección.

4.2. Efecto del Biobrás-16 como sustituto de la Kinetina en el cultivo de meristemos de clavel español

En la fig. 4 se observa la exitosa regeneración de uno de los explantes meristemáticos. Durante el cultivo de meristemos, en el medio control se obtuvo una regeneración del 85 % de los mismos (Fig. 5), cifra similar a la señalada por Montes *et al.* (1997, a), que fue de un 83,3 % utilizando similar de cultivo, y superior al 73 % obtenido por Villalobos y García, 1977 (citados por Montes *et al.*, 1997, a) en medio MS con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA y $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de KIN. Otros autores, trabajando con diferentes variedades de clavel español, han determinado que la capacidad de regeneración al realizar el establecimiento de meristemos en el cultivo *in vitro*, depende no solo del medio de cultivo sino también del genotipo de la variedad. Por ejemplo, en resultados informados por Afanador (2005) los porcentajes de regeneración variaron entre 43,8 y 91, 2 % para la variedad Marfil y la White Sim, respectivamente

En este estudio, en los medios donde se empleó el Biobrás-16 como sustituto de la KIN en el cultivo de los meristemos, los porcentajes de regeneración variaron de 65 % a 85 % (Fig. 5), aumentando gradualmente a medida que disminuyó la concentración de Biobrás-16 en el medio de cultivo. En el tratamiento 2 ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16) se obtuvo un porcentaje de regeneración que fue significativamente menor al resto de los tratamientos, por lo que se considera que esta concentración no favorece la regeneración de los meristemos, resultados que coinciden con los obtenidos por Castilla (2004) quien señaló un 25 % de regeneración al emplear el Biobrás-16 como sustituto de la auxina AIA. De manera general, los valores de regeneración obtenidos con el empleo del Biobrás-16 como sustituto de la KIN, fueron mayores que los obtenidos como sustituto del AIA (Castilla, 2004), lo que demuestra un mayor efecto de este análogo como sustituto de la citoquinina para este cultivo.

En un experimento para el establecimiento de ápices caulinares menores de 5 mm de dos clones de ajo (*Allium sativum* L.), utilizando Biobrás-6 y Biobrás-16 como sustitutos del 6-BAP, se detectó que los mayores porcentajes de regeneración (83,3 % y 60,0 %) se obtuvieron con $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-6 combinados con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA, en comparación con la dosis de $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16 combinados con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA, donde la regeneración fue del 60,0 % y el 43,3 %, sin diferencias con el control, por lo que

se consideró que en este cultivo la citoquinina puede ser sustituida por el Biobrás-6 (Núñez *et al.*, 2000).



Fig. 4. Regeneración de los meristemos de clavel español (*D. caryophyllus* L.).

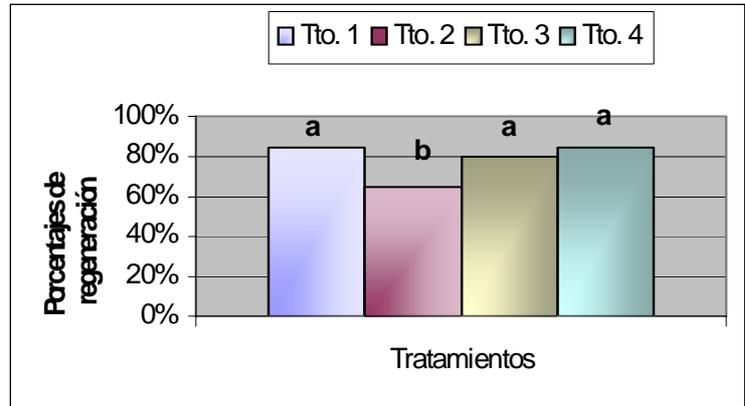


Fig. 5. Porcentajes de regeneración de las plantas en el cultivo de meristemos de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $S_{\bar{x}} : 0,417^*$

Para el número de nudos por planta no se encontraron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos en los que se empleó el Biobrás-16 y el tratamiento control, por lo que se considera que el empleo de este biorregulador en el medio de cultivo no incrementó la formación de nudos en las plantas obtenidas a partir del cultivo de meristemos (Fig. 6). Similares resultados informaron Hernández, Moré y Nuñez (1999) al realizar la micropropagación de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con el empleo de Biobrás-6 y Biobrás-16. En este caso no se obtuvieron diferencias significativas en el número de nudos entre el tratamiento en el cual se utilizó el Biobrás-16 y el medio control, sin embargo con el Biobrás-6 sí se obtuvo un número de nudos superior al control.

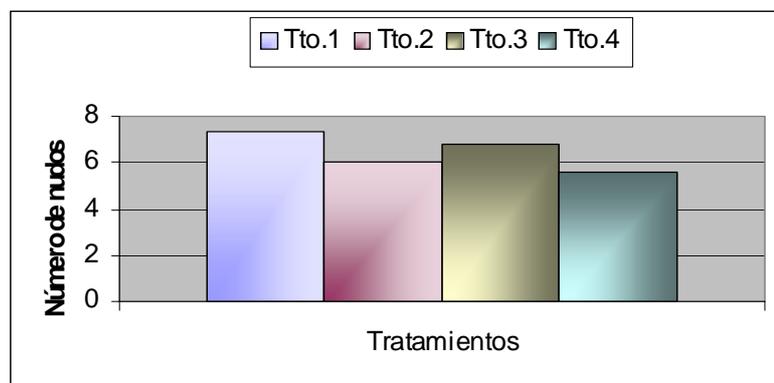
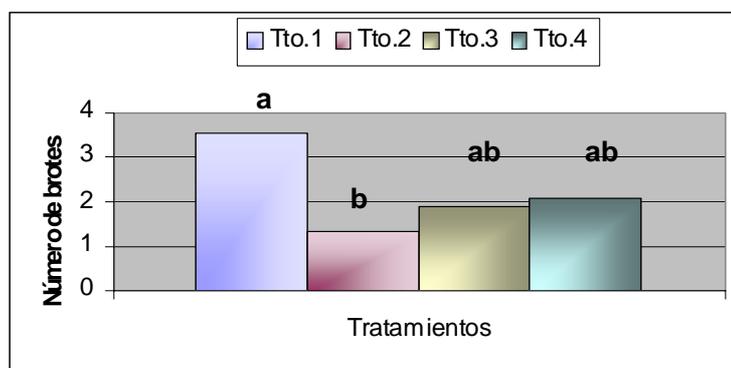


Fig. 6. Número de nudos de las plantas en los distintos tratamientos evaluados del cultivo de meristemos de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

Con respecto al número de brotes, en los tratamientos 1, 3 y 4 se obtuvieron resultados estadísticamente similares, que superaron al tratamiento 2 ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16) donde se obtuvo una media de 1,33 brotes por planta (Fig. 7). Teniendo en cuenta que la inducción de la formación de brotes y la ruptura de la dominancia apical mediante la estimulación del desarrollo de los brotes laterales, son funciones tradicionalmente adjudicadas a las citoquininas (Chang y Chang, 2003; citados por Suárez, 2008), se considera que en este caso el empleo del Biobrás-16 en la mayoría de los tratamientos como sustituto de la kinetina, fue capaz de provocar un efecto similar al de esta citoquinina. Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada (Jiménez, 1998).



Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según la prueba de Tukey con $p < 0.05$

Fig. 7. Número de brotes formados en las plantas de los distintos tratamientos del cultivo de meristemos de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $S_{\bar{x}}: 0,29^*$

Estos resultados difieren de los obtenidos por De la Fe, Ortiz y Jiménez (1998) al realizar la sustitución parcial o total del BAP por diferentes concentraciones de Biobrás-6 y Biobrás-16 en la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), donde si bien las vitroplantas ahijaron, los valores del coeficiente de multiplicación se redujeron en casi un 50 % y se demostró la poca actividad citoquinínica de estos compuestos en la multiplicación de esta especie. A pesar de este comportamiento, el Biobrás-6 se manifestó con un mayor efecto en este sentido, resultando significativamente superior al Biobrás-16, excepto con la concentración de este último de $0,03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

La presencia de raíz fue una variable favorecida con el uso del Biobrás-16, ya que en los tratamientos donde este fue empleado se observó una estimulación de la formación de raíz, obteniéndose diferencias significativas, con valores que fueron desde el 100 % de plantas

con raíz en el tratamiento 2 (Fig. 8), hasta el 88 % en el tratamiento 4 (Fig. 9). En el medio control se obtuvo el menor número de plantas con raíces entre los diferentes tratamientos estudiados. Es conocido el papel que juegan las auxinas como fitohormonas inductoras de la rizogénesis (González, 2003), por lo que al parecer en este caso el Biobrás-16 tuvo un efecto sinérgico con los niveles de auxina presentes en los explantes meristemáticos, lo cual coincide con Núñez *et. al.* (2004) que plantean que el sinergismo de los brasinoesteroides con las auxinas ha sido observado en varios sistemas biológicos y se ha argumentado que los brasinoesteroides pueden incrementar la sensibilidad del tejido a la auxina o estimular su actividad biológica a través de la auxina endógena (AIA) o estimular la biosíntesis de AIA.

Estos resultados coinciden con los de De la Fe, Ortiz y Jiménez (1998), al realizar la sustitución parcial o total del AIA por diferentes concentraciones de Biobrás-6 y Biobrás-16 en la micropropagación de la caña de azúcar, donde se obtuvo el desarrollo de raíces normales en menor tiempo y una mayor proporción de plantas con raíces (95 %) en los medios suplementados con estos análogos de brasinoesteroides en combinación con el AIA, con respecto a los explantes colocados en el medio con AIA como único suplemento hormonal.



Fig. 8. Formación de raíces en las plantas del tratamiento 2 del cultivo de meristemos de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*).

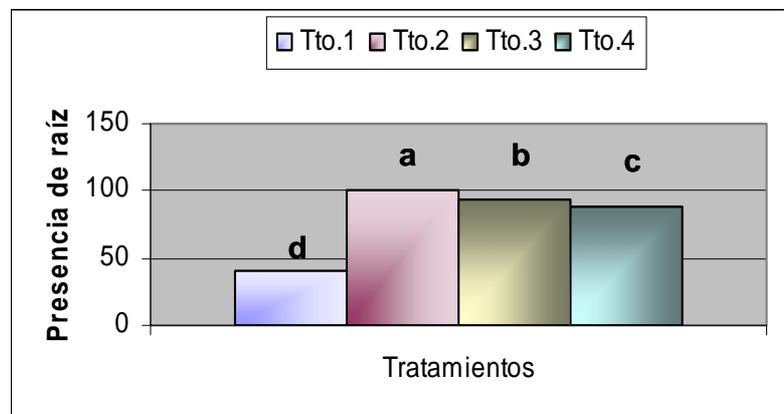


Fig. 9. Formación de raíz de las plantas en los distintos tratamientos del cultivo de meristemos de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*). $S_{\bar{x}}: 0,112^{***}$

En relación con la presencia de callo, resulta interesante destacar que en todos los tratamientos se obtuvo una pequeña porción de callo de color verde que no interfirió en el desarrollo de las plántulas, y que apareció unas tres semanas luego de haber sembrado los meristemos. La aparición de callos en algunos meristemos regenerados fue previamente señalada por Montes *et. al.* (1997, a). Se considera que estos resultados resultan

promisorios para futuros estudios si se pretende realizar la micropropagación de esta especie a partir de la embriogénesis somática.

El porcentaje de explantes con formación de callo fue estadísticamente diferente para todos los tratamientos y su mayor valor (70 %) se obtuvo en el tratamiento 1 (Fig. 10). En los tratamientos donde se utilizó Biobrás-16 se obtuvo una menor presencia de callos, que varió desde el 46 % en el tratamiento 2 hasta el 12 % en el tratamiento 3 (Fig. 11). Como es conocido, la formación de callo depende del balance existente entre las citoquininas y las auxinas (Jiménez, 1998), por tanto es muy probable que la adición exógena de Biobrás-16 a las dosis empleadas no fuera suficiente para inducir la presencia de callo en la mayor parte de los meristemos evaluados, teniendo en cuenta además que las concentraciones endógenas de citoquininas presentes en los meristemos son bajas, pues el principal sitio de síntesis son las raíces (Jiménez, 1998). En trabajos anteriores, Castilla (2004) también obtuvo la presencia de callo al realizar el cultivo de meristemos de clavel español con Biobrás-16 como único suplemento hormonal.

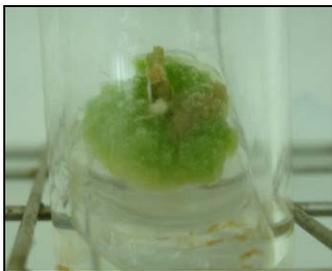


Fig. 10. Formación de callo en el tratamiento 1 del cultivo de meristemos de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

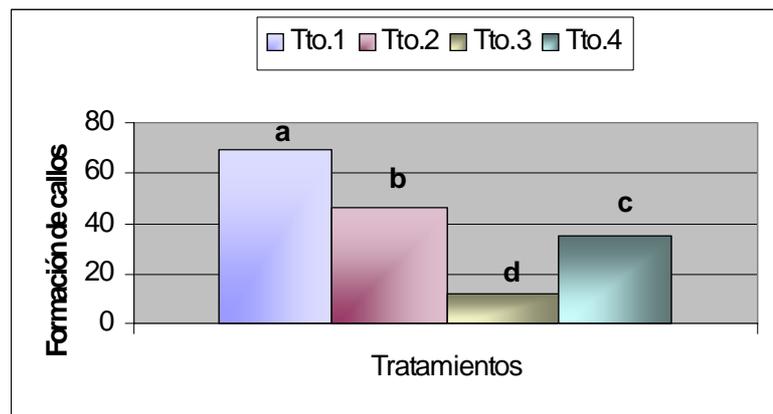


Fig. 11. Formación de callos en las plantas de los distintos tratamientos del cultivo de meristemos de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $\bar{S}_x : 0,123^{**}$

Hidrobo *et al.* (2001), al probar diferentes concentraciones de Biobrás-16 como sustituto de la KIN en la embriogénesis somática de la papa, obtuvieron los mejores promedios de masa fresca a una concentración de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pues al parecer ocurrió un balance favorable entre este biorregulador y la auxina presente en el medio de cultivo, en detrimento de la concentración de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ donde se obtuvieron valores bajos de formación de callos. Takematsu *et. al.* (1991), citados por García *et. al.* (1997), señalaron que los brasinoesteroides en combinación con auxinas estimulan el crecimiento de callos más

eficientemente que las auxinas y el BAP en un gran número de plantas. Por otra parte, Echemendía (1996), al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Biobrás-16 sobre callos de soya (*Glicine max* (L.) Merr), no obtuvo diferencias significativas en cuanto al desarrollo de los callos crecidos en el medio control y los cultivados en medio MS con $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de este análogo de brasinoesteroide.

4.3. Propagación por esquejes de clavel español a partir de plantas obtenidas por cultivo de meristemos con el Biobrás-16

En la primera propagación por esquejes se obtuvieron diferencias significativas entre los porcentajes de regeneración de los diferentes tratamientos. El mayor porcentaje de regeneración (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. 12).

De manera general, 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).

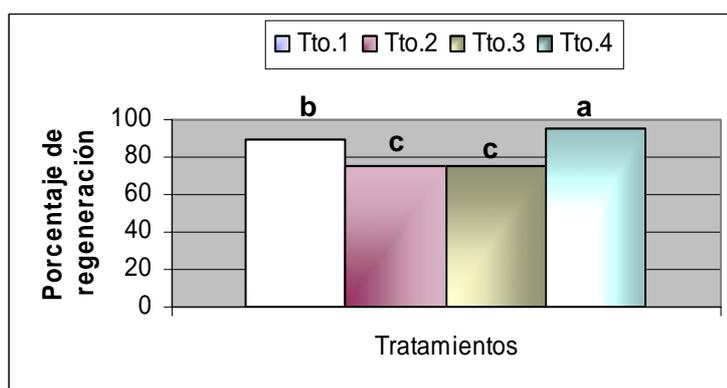
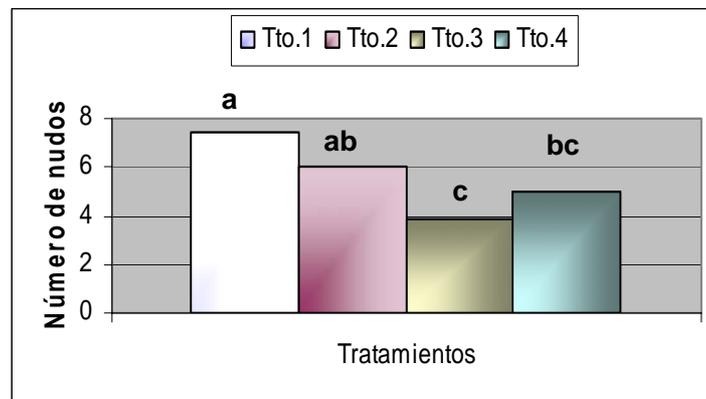


Fig. 12. Porcentaje de regeneración de las plantas obtenidas en la primera propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $S_{\bar{x}} 0,058^*$

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. 13).

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 $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, hasta 4,76 nudos en el tratamiento de $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 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.



Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según la prueba de Tukey con $p < 0.05$

Fig. 13. Formación de nudos en las plantas obtenidas en la primera propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $S_{\bar{x}} 0,513^*$.

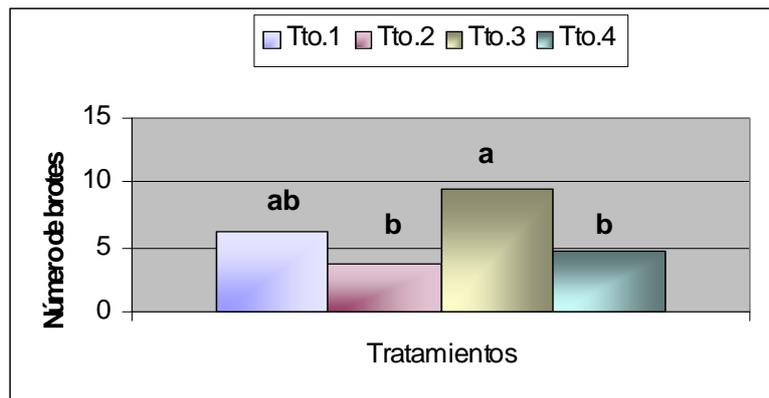
Para la variable número de brotes el mayor valor se obtuvo en el tratamiento 3 (Fig. 14), con una media de 9,55 brotes por cada plántula obtenida. En el resto de los tratamientos se obtuvieron valores que variaron desde 6,1 en el control hasta 3,65 en el tratamiento 2 (Fig. 15), no difiriendo estadísticamente. 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 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, donde la mayoría de los tratamientos manifestaron un comportamiento estadísticamente similar al control (Rodríguez, 2008). Sin embargo, en el caso del clavel español al emplear la concentración de 0,01 mg·L⁻¹ (tratamiento 3) se encontró una respuesta semejante a la del control y superior al resto de los tratamientos con Biobrás-16. Estos resultados coinciden con los señalados por Núñez *et al.*, 2004 en otros cultivos, con respecto a la importancia no solo del tipo de análogo sino también de la concentración añadida al medio de cultivo, en función del proceso fisiológico a estudiar.



Fig. 14. Formación de brotes en las plantas del tratamiento 3 de la primera propagación de clavel español (*D.caryophyllus* L.).



Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según la prueba de Tukey con $p < 0.05$

Fig. 15. Formación de brotes en las plantas obtenidas en la primera propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $S_x 0.204^*$

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. 16). Solo 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 Khripach *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. Rodick (1994), citado por Rodríguez (2008) plantea que se

ha encontrado que los brasinoesteroides inhiben la formación de raíces en posturas de trigo, frijol, maíz y tomate; así como también existen algunas evidencias que demuestran lo contrario, las cuales plantean que sí estimulan el crecimiento de raíces intactas.

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, 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.

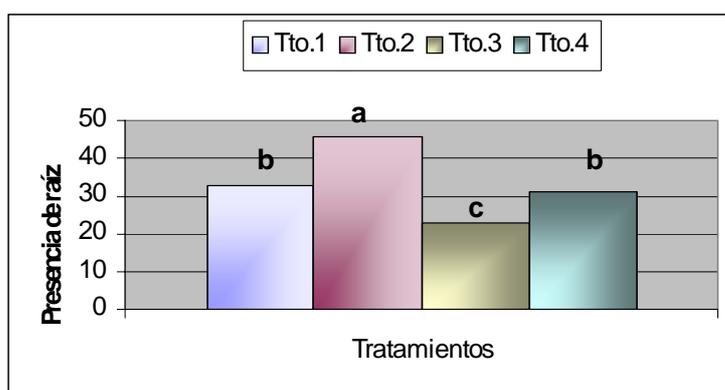


Fig. 16. Formación de raíz en las plantas obtenidas en la primera propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $S\bar{x} : 0,262^{**}$

La regeneración obtenida en la segunda propagación de las plantas de clavel español se considera que mantuvo valores aceptables para esta etapa (Figs. 17 y 18). 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 (Khripach *et al.*, 2000; Núñez y Robaina, 2000).



Fig.17. Plantas obtenidas a partir de la segunda propagación por esquejes de clavel español (*D. caryophyllus* L.).

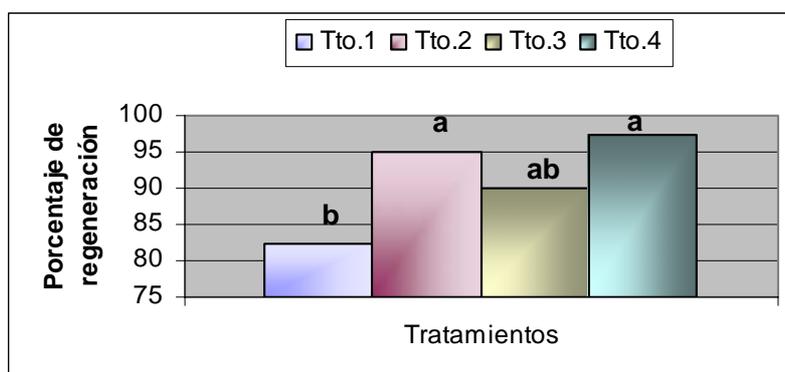
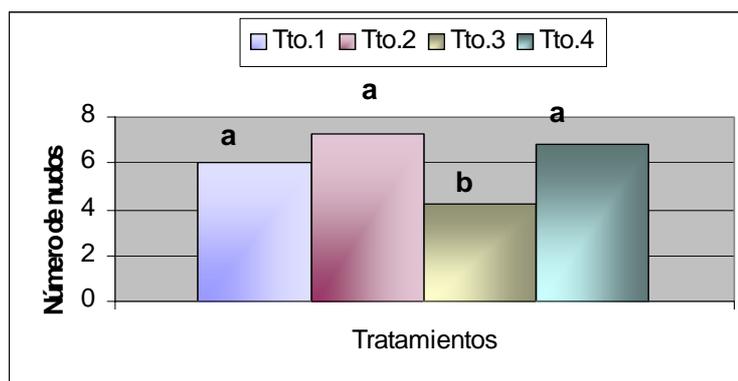


Fig. 18. Porcentajes de regeneración de las plantas obtenidas en los distintos tratamientos de la segunda propagación de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $S_{\bar{x}} : 0,445^{**}$

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. 19). 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).

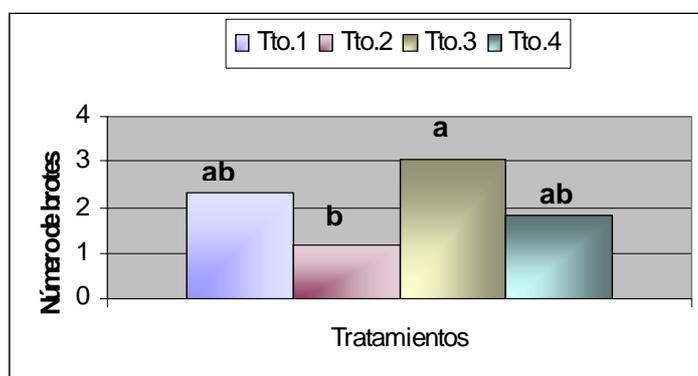


Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según la prueba de Tukey con $p < 0.05$

Fig. 19. Número de nudos de las plantas obtenidas en los distintos tratamientos de la segunda propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus carvophyllus* L.). $S_{\bar{x}} 0.392^*$

Aunque en la segunda propagación de manera general se obtuvo un número menor de brotes con respecto a la primera propagación, coincide 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. 20). El tratamiento 2 coincide como el que menor número de brotes se obtiene, semejante a lo ocurrido en el cultivo de meristemos y en la primera propagación, por lo que al parecer la concentración de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 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).



Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según la prueba de Tukey con $p < 0.05$

Fig. 20. Formación de brotes de las plantas obtenidas en los distintos tratamientos de la segunda propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).
 $S_{\bar{x}} 0,172^*$

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 alto número de plantas con raíces (Fig. 21) y solo 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 Ronsch *et al.* (1993) 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.

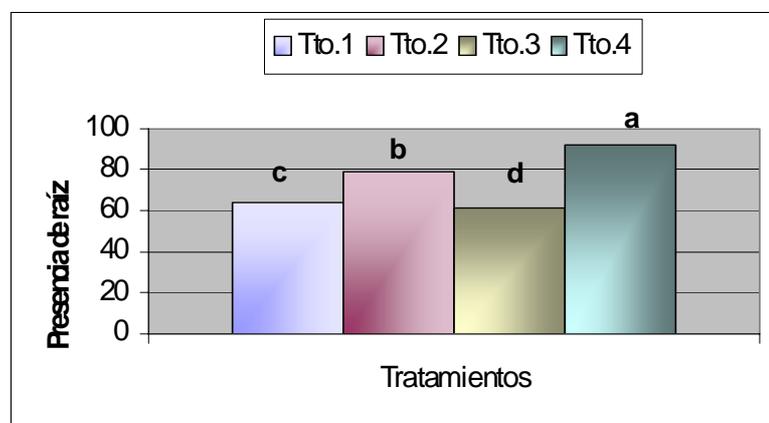


Fig. 21. Formación de raíz de las plantas obtenidas en los distintos tratamientos de la segunda propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). $S_{\bar{x}}$: 0,075**

La aplicación de análogos de brasinoesteroides como el Biobrás-16 en los medios de cultivo, para la propagación de plantas ornamentales, constituye un tema de investigación novedoso que posibilita planificar la propagación masiva de plantas al acelerar su desarrollo vegetativo (mayor número de nudos, mayor número de brotes, aumento del número de plantas con raíces, entre otros), lo que permite obtener numerosos explantes y por tanto una mayor cantidad de plantas, incrementándose el coeficiente de multiplicación.

4.4. Efecto del Biobrás-16 en la aclimatización de las vitroplantas de clavel español

De manera general, durante la fase de aclimatización no se obtuvo una elevada supervivencia de las plantas de clavel, ratificándose que esta es una etapa limitante y trascendental para la culminación exitosa del proceso de micropropagación (Agramonte, 1998). Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos; estas condiciones ocasionan cambios en la morfología y la fisiología de las plantas, que provocan que una parte de ellas no sobrevivan al trasplante a las condiciones ambientales (Agramonte, 1998).

En el ensayo 1 los porcentajes de supervivencia variaron desde el 35 % en el tratamiento 1 hasta el 47,5 % en el tratamiento 4 (Fig. 22). Los mayores valores fueron alcanzados en los tratamientos 4 y 2, donde se emplearon $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16,

respectivamente, durante el cultivo *in vitro*, detectándose diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos, por lo que se puede inferir que el Biobrás-16 ejerció una influencia significativa en la supervivencia de las plantas con el empleo de estos tratamientos durante la etapa de aclimatización, lo que pudiera atribuirse a las propiedades antiestrés que caracteriza a estos análogos de brasinoesteroides (Núñez *et. al.*, 2004).

En el tratamiento control y el tratamiento 3 se obtuvieron valores de supervivencia estadísticamente menores que los obtenidos en los demás tratamientos. El tratamiento 3 representa las plantas obtenidas a partir de la segunda propagación del cultivo de meristemos, en el medio en el que se empleó la menor concentración de Biobrás-16 ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), por lo que es posible que esta concentración empleada durante el cultivo *in vitro* no le haya conferido a las plantas un efecto antiestrés que se manifieste en la etapa de aclimatización. Resultados similares han sido reportados por Suárez (2008) durante la aclimatización de vitroplantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) obtenidas a partir de la propagación *in vitro* de ápices meristemáticos con el empleo de Pectimorf como sustituto total o parcial de la citoquinina BAP. Este autor plantea que es posible que la utilización de estos bioproductos a determinadas concentraciones durante las primeras etapas del cultivo *in vitro* no sea suficiente para conferirle a las vitroplantas cierto efecto antiestrés que las proteja durante la etapa de aclimatización.

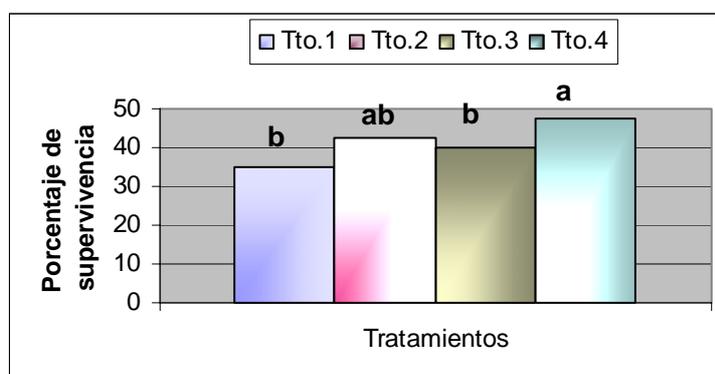


Fig. 22. Porcentajes de supervivencia de las vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) del ensayo 1. $S_{\bar{x}}: 0,493^*$

Leyenda: Tto. 1: Plantas provenientes de la segunda propagación por esquejes del cultivo de meristemos en medio control; Tto. 2: Plantas provenientes de la segunda propagación por esquejes del cultivo de meristemos en medio con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16; Tto. 3: Plantas provenientes de la segunda propagación por esquejes del cultivo de meristemos en medio con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16; Tto. 4: Plantas provenientes de la segunda propagación por esquejes del cultivo de meristemos en medio con $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16.

En el ensayo 2 (Figs. 23 y 24) se considera que aunque no se obtuvo una elevada supervivencia de las plantas, de manera general esta fue mayor que la manifestada en el ensayo 1. La mayor supervivencia (52,5 %) se alcanzó en el tratamiento 4, que consistió en las plantas obtenidas de la segunda propagación y asperjadas con una concentración de Biobrás-16 igual a la utilizada en este tratamiento para el cultivo de meristemas ($0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Este comportamiento sugiere la activación de procesos metabólicos vinculados al crecimiento y desarrollo debido a la aplicación del bioestimulante y reafirma además que estos compuestos actúan a bajísimas concentraciones, generalmente entre $0,001$ - $0,1 \text{ ppm}$ (Shneider, 2002; citado por Mariña *et. al.*, 2004).

También se alcanzó una supervivencia media (50%) en el tratamiento 2 (aspersión con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16), destacándose que González *et.al.* (2005) encontraron efectos antiestresantes dados por la disminución significativa en los contenidos de prolina libre, en aspersiones con esta misma dosis de Biobrás-16 sobre plántulas de banano previamente propagadas *in vitro* y sometidas a un estrés térmico. Estos resultados coinciden con otro experimento en banano, en el cual durante la aclimatización los mayores incrementos en el porcentaje de supervivencia de las plantas se produjeron luego de la aspersión con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16, en detrimento de la dosis de $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con la cual solo se produjeron incrementos discretos de esta variable (Nuñez, 2003). Este aspecto también coincide con los resultados obtenidos en el Ensayo 2 con respecto a que las plantas asperjadas con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ no fueron favorecidas con el efecto del Biobrás-16, ya que los valores de supervivencia no difirieron significativamente de los obtenidos en el control.

Por otra parte, en un experimento con cafeto, la aspersión foliar de las plántulas con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16, incrementó significativamente el crecimiento, favoreció el estado hídrico y aumentó la concentración de pigmentos y se comprobó que realizar la aspersión foliar una sola vez, resultó más efectivo que asperjar varias veces y que la inmersión de las plantas por diferentes períodos de tiempo (Nuñez, 2003).



Fig. 23. Vitroplantas de clavel español (*D. caryophyllus* L.) aclimatizadas en el ensayo 2.

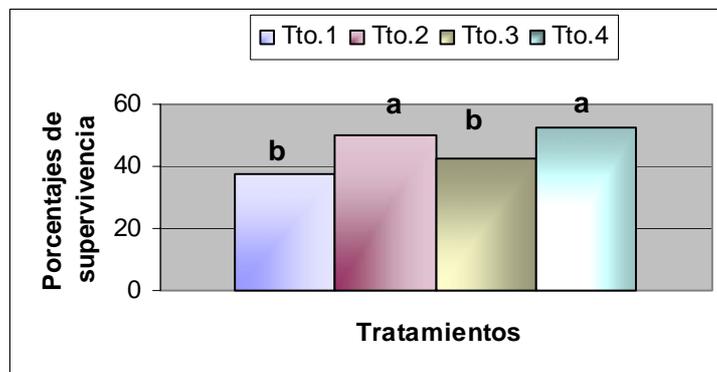


Fig. 24. Porcentajes de supervivencia de las vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) del ensayo 2. $\bar{S}_x: 0,514^*$

Leyenda: Tto. 1: Plantas provenientes de la segunda propagación por esquejes del cultivo de meristemas en medio control y asperjadas con agua; Tto. 2: Plantas provenientes de la segunda propagación por esquejes del cultivo de meristemas en medio con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16 y asperjadas con solución de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16; Tto. 3: Plantas provenientes de la segunda propagación por esquejes del cultivo de meristemas en medio con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16 y asperjadas con solución de $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16; Tto. 4: Plantas provenientes de la segunda propagación por esquejes del cultivo de meristemas en medio con $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16 y asperjadas con solución de $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16.

De manera general, se apreció la factibilidad del empleo del Biobrás-16 durante la fase de aclimatización de las vitroplantas de clavel español, ya que tanto empleado durante el cultivo *in vitro* como asperjado en esta etapa, es capaz de producir un incremento en el porcentaje de supervivencia de las plantas, lo cual incrementa la eficiencia del proceso de micropropagación.

4.5. Estudio citogenético en las plantas obtenidas en la germinación, el cultivo de meristemas y las propagaciones sucesivas de clavel español

Al efectuar la etapa de pretratamiento del material vegetal durante dos horas en 8-hidroxiquinolina, se observaron dificultades para realizar el conteo de los cromosomas, lo que pudo deberse a que la dispersión y contracción de los cromosomas no eran suficientes para lograr una buena observación de los mismos, lo cual se logró al incrementar el tiempo de pretratamiento a tres horas, apreciándose una mayor proporción de divisiones metafásicas. Al realizar este tipo de estudio en otras especies ornamentales como la rosa (*Rosa* sp), otros investigadores no alcanzaron resultados satisfactorios ya que no obtuvieron una máxima dispersión y contracción de los cromosomas, hubo pocas divisiones metafásicas y en cambio, las profases resultaron más abundantes (Ma *et al.*, 1996).

En el presente estudio la mayor dificultad para la observación de los cromosomas de los claveles estuvo determinada por el tiempo de hidrólisis, ya que a los 5 minutos el tejido permaneció duro, e igual comportamiento se observó al aumentar el tiempo de hidrólisis a 10 minutos. Sin embargo, a los 15 minutos se obtuvo una consistencia adecuada de las células y fue posible observar los cromosomas de forma satisfactoria. Algunos autores plantean que para los cromosomas de rosas (*Rosa* sp), los mejores resultados con este tipo de procedimiento se obtienen al realizar la hidrólisis en un rango comprendido desde 15 y hasta 20 minutos, ya que un tiempo superior a este es capaz de ocasionar la degradación de los cromosomas (Martínez, 2005), al igual que las concentraciones de HCl superiores a 1N (Ma *et al.*, 1996; Majourhat, 2007).

Otro aspecto a destacar es la influencia del tiempo de tinción, observándose que al realizar la misma durante una hora y una hora y media (métodos C1 y C2), se obtuvo una tinción pobre y no se tiñeron todas las células de manera homogénea, a diferencia del método C3, en el cual con dos horas en hematoxilina se logró una tinción apropiada, lo que pudiera atribuirse al hecho de que en los métodos C1 y C2 el tejido permaneció duro y no se propició la penetración adecuada del colorante. Resultados similares han obtenido otros autores trabajando con células de anteras inmaduras de rosa, al realizar la tinción con acetocarmín (Fernández *et al.*, 2001).



Fig. 25. Células de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) en metafase mitótica (100X) ($2n=2x=30$ cromosomas).

A. Obtenidas en cámara húmeda. B. Obtenidas a partir de la germinación *in vitro*.

Al analizar los resultados en conjunto, se determinó que el método que permitió una mejor visualización y conteo de los cromosomas fue el método C3.

Se observó que todas las muestras seleccionadas presentaron un número cromosómico de $2n=2x=30$ (Fig. 25), tanto las muestras provenientes de las plantas germinadas en cámara húmeda, como las obtenidas a partir de la germinación *in vitro*, el cultivo de meristemas y las propagaciones por esquejes, lo cual coincide con lo informado por Bornas (1961) (citado por Ramírez, 1995), al estudiar cuatro especies del género *Dianthus*. Este también plantea la posibilidad de encontrar casos de poliploidía para la especie *Dianthus caryophyllus* L., apareciendo un número cromosómico de $2n=6x=90$, lo cual no observamos en los estudios realizados.

La principal desventaja del cultivo *in vitro* cuando se usa para la propagación masiva de plantas, consiste en el riesgo de que se produzcan mutaciones o variaciones genéticas entre las plantas regeneradas (Plana, 2000). En muchos casos, la variabilidad es producida por factores externos, como resultado del uso de reguladores del crecimiento, que incrementan las posibilidades de que se produzcan mutantes (Singh, 1993, citado por Plana, 2000). Sin embargo, al analizar mediante este método citogenético las muestras provenientes del cultivo de meristemas y de las propagaciones, fue posible comprobar que tanto el Biobrás-16 como el método de propagación utilizado, no originaron cambios en el número cromosómico, lo cual resulta importante pues significa que se mantuvo la estabilidad genética de las plántulas propagadas.

4.6. Estudio isoenzimático de las plantas obtenidas en el cultivo de meristemos y las propagaciones sucesivas de clavel español

Durante este estudio para el sistema Peroxidasas se presentaron 7 bandas en total, las cuales son comunes en posición e intensidad a todas las muestras (Fig. 26).

Las peroxidasas son un grupo de isoenzimas con participación activa en la lignificación de la pared celular y la regulación de los niveles de auxina, además, pueden estar relacionadas con el desarrollo de otros estados fisiológicos en las plantas (González, 2002). Las peroxidasas son consideradas marcadores bioquímicos importantes de la morfogénesis y han sido empleadas para estudiar el efecto de oligosacarinas y brasinoesteroides en otros cultivos (Valdés, 1997).

En estudios precedentes, Castilla (2004) informó la existencia de 7 bandas de Peroxidasa en el cultivo de meristemos y las propagaciones por esquejes de clavel español, con el empleo del Biobrás-16 como sustituto de la auxina. En este caso, aunque algunas de las bandas polimórficas estuvieron asociadas a la presencia de este análogo de brasinoesteroide en el medio de cultivo, de manera general fue determinado que la estabilidad genética no estuvo afectada por el número de propagaciones realizadas ni por el empleo del Biobrás-16 en el cultivo de meristemos.

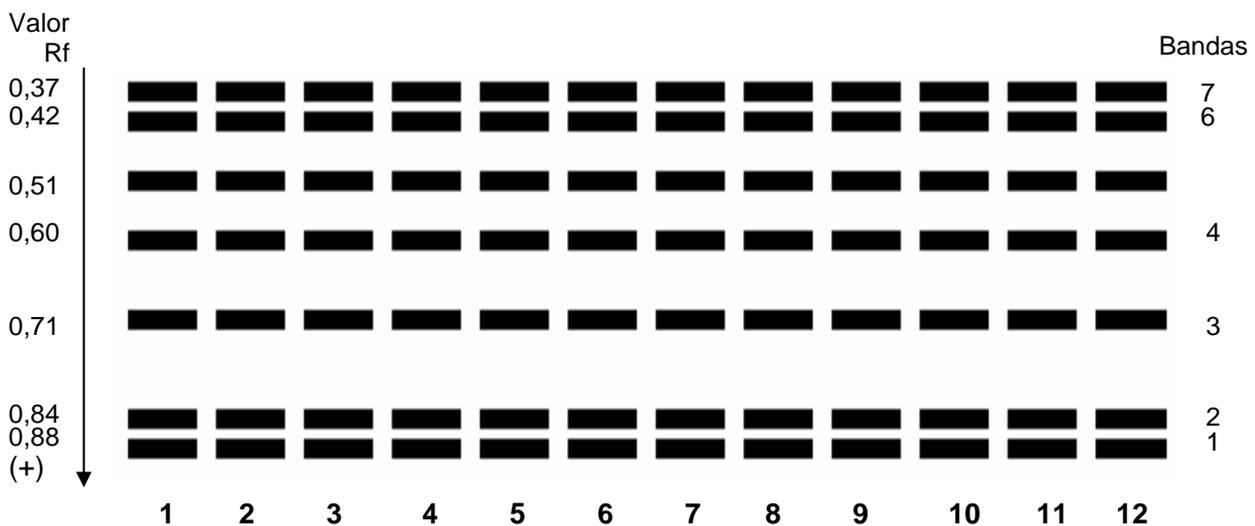


Fig. 26. Zimograma del sistema Peroxidasa para muestras de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

Leyenda: CM= Cultivo de Meristemos. **1)** CM en medio sin Biobrás; **2)** CM en medio con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **3)** CM en medio con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **4)** CM en medio con $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **5)** 1^{ra} propagación de 1; **6)** 1^{ra} propagación de 2; **7)** 1^{ra} propagación de 3; **8)** 1^{ra} propagación de 4; **9)** 2^{da} propagación de 1; **10)** 2^{da} propagación de 2; **11)** 2^{da} propagación de 3; **12)** 2^{da} propagación de 4.

Como se aprecia en la Fig. 27, en el zimograma del sistema Esterasa se observaron 7 bandas y se presentó un marcado monomorfismo ya que se aprecia en todos los tratamientos igual posición, número e intensidad de bandas.

Semejantes resultados obtuvo Suárez (2008) al realizar el estudio isoenzimático de diferentes variantes de medios de cultivo con el empleo de una mezcla de oligogalacturónidos como sustituto total y parcial de la auxina en la micropropagación de la yuca, donde fueron observadas 6 bandas comunes a todos los tratamientos.

Por otra parte, Domínguez (2005) encontró cierto grado de polimorfismo al comparar plántulas de clavel chino obtenidas a partir de la germinación *in vitro* y las propagaciones con el empleo de diferentes dosis de Biobrás-16, sin embargo, de manera general no se presentó variabilidad genética significativa en los tratamientos analizados.

Las esterases juegan un importante papel en los procesos fotosintéticos de las plantas y su estabilidad en la expresión enzimática las hace muy importantes en estudios genéticos, por lo que son muy utilizadas para estudiar los diferentes estadios de desarrollo (Kephart, 1990; citado por Domínguez, 2005).

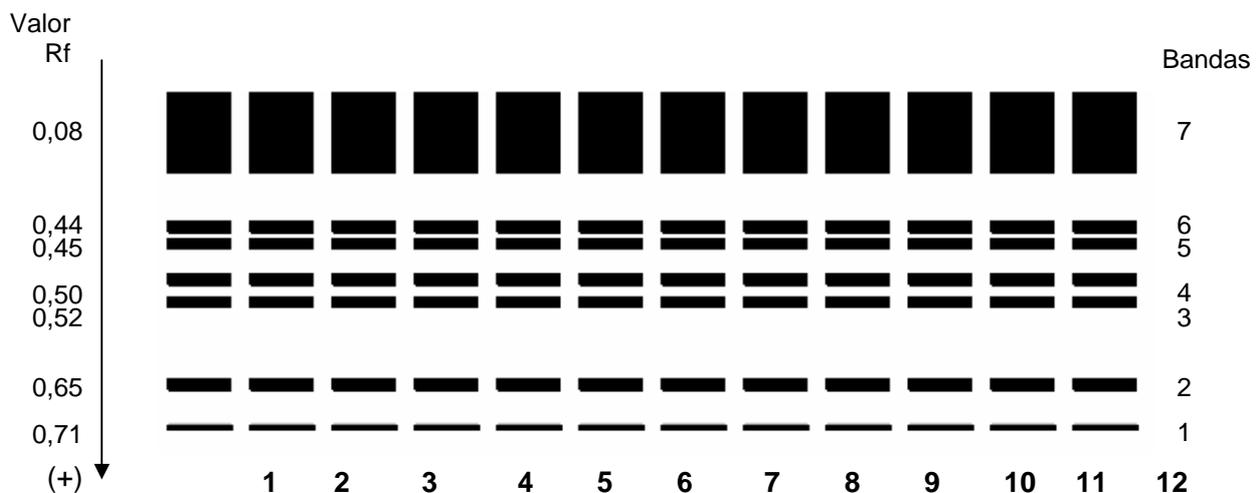


Fig. 27. Zimograma del sistema Esterasa para muestras de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.)..

Leyenda: CM= Cultivo de Meristemos. **1)** CM en medio sin Biobrás; **2)** CM en medio con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **3)** CM en medio con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **4)** CM en medio con $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **5)** 1^{ra} propagación de 1; **6)** 1^{ra} propagación de 2; **7)** 1^{ra} propagación de 3; **8)** 1^{ra} propagación de 4; **9)** 2^{da} propagación de 1; **10)** 2^{da} propagación de 2; **11)** 2^{da} propagación de 3; **12)** 2^{da} propagación de 4.

De igual manera, se observó un marcado monomorfismo en el sistema Malato deshidrogenasas, con la presencia de una sola banda común a todas las muestras estudiadas (Fig. 28).

Otros autores también han encontrado similitud electroforética para este sistema isoenzimático. Lara *et. al.* (2003) al monitorear la estabilidad genética de plantas de tomate obtenidas *in vitro*, determinaron que el material evaluado presentó similaridad electroforética para este sistema y para los demás evaluados. Por otra parte, en vitroplantas de yuca obtenidas a partir del cultivo *in vitro* con el empleo de un análogo de oligogalacturónido, también fue hallado un patrón común de MDH en todos los tratamientos (Suárez 2008).

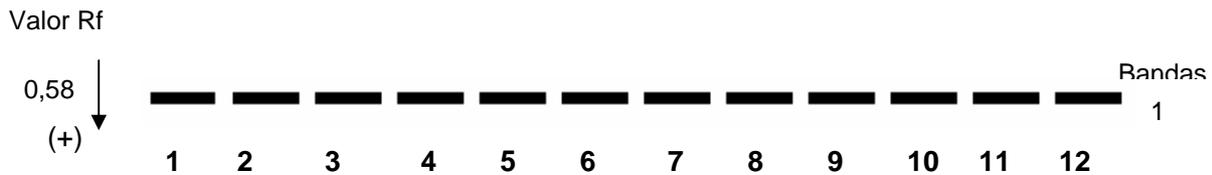


Fig. 28. Zimograma del sistema Malato deshidrogenasa para muestras de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

Leyenda: CM= Cultivo de Meristemos. **1)** CM en medio sin Biobrás; **2)** CM en medio con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **3)** CM en medio con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **4)** CM en medio con $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; **5)** 1^{ra} propagación de 1; **6)** 1^{ra} propagación de 2; **7)** 1^{ra} propagación de 3; **8)** 1^{ra} propagación de 4; **9)** 2^{da} propagación de 1; **10)** 2^{da} propagación de 2; **11)** 2^{da} propagación de 3; **12)** 2^{da} propagación de 4.

En el zimograma del sistema Fosfatasas Ácidas (Fig. 29) se observaron 5 bandas, 4 de ellas comunes en posición e intensidad en todos los tratamientos. En la muestra número 10, correspondiente a la segunda propagación de las plantas provenientes del cultivo de meristemos en el medio con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Biobrás-16, se apreció una banda que no aparece en el resto de las muestras. Esto puede estar asociado con cierta tendencia observada en estas plantas con respecto a un incremento en las variables morfológicas evaluadas, lo cual pudo haber ocasionado un aumento en la demanda de las sales y el agua, que causara un agotamiento de estas sustancias en el medio de cultivo. Es posible que este agotamiento haya provocado el surgimiento de estrés en las plantas, el cual haya inducido la expresión de esta banda de Aps ya que según Pan (1987) (citado por Domínguez, 2005), las Fosfatasas ácidas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas y se han informado incrementos de las mismas frente al estrés de sales, osmóticos e hídrico.

Otros autores han reportado la aparición de bandas polimórficas de Aps durante la evaluación de la variabilidad y/o estabilidad genética de plántulas de clavel chino micropropagadas *in vitro* con el empleo de diferentes dosis de Biobrás-16. En este caso la variabilidad estuvo asociada con la desaparición de bandas en algunos de los tratamientos en los que se utilizó el Biobrás-16 (Domínguez, 2005). Autores como Hernández *et al.* (2007)

han encontrado polimorfismo para el sistema APS al evaluar la actividad del Pectimorf en la embriogénesis somática de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan) y plantean que estas isoenzimas juegan un papel importante en el ciclo biogeoquímico del fósforo orgánico y en la nutrición de las plantas.



Fig. 29. Zimograma del sistema Fosfatasa ácida para muestras de clavel español (*Dianthus carvophyllus* L.).

Leyenda: CM= Cultivo de Meristemas. 1) CM en medio sin Biobrás; 2) CM en medio con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; 3) CM en medio con $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; 4) CM en medio con $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-16; 5) 1^{ra} propagación de 1; 6) 1^{ra} propagación de 2; 7) 1^{ra} propagación de 3; 8) 1^{ra} propagación de 4; 9) 2^{da} propagación de 1; 10) 2^{da} propagación de 2; 11) 2^{da} propagación de 3; 12) 2^{da} propagación de 4.

De manera general, el análisis de los sistemas isoenzimáticos estudiados, permitió corroborar que no se produjo variabilidad genética en las plantas de los diferentes tratamientos del cultivo de meristemas y sus correspondientes propagaciones, en comparación con el control, por lo que se considera que tanto el empleo del Biobrás-16 como los ciclos multiplicativos evaluados, no fueron causa de variaciones en las plantas de clavel español.

Además, al comprobar la estabilidad genética de las plantas de clavel español obtenidas en este estudio, bajo las condiciones señaladas y mediante los análisis citogenéticos e isoenzimáticos evaluados, es posible proponer su propagación a gran escala, ya que un requisito indispensable para que un sistema de cultivo *in vitro* sea aceptado para la propagación masiva de plantas, lo constituye la garantía de su estabilidad genética.

4.7. Valoración económica

En la Tabla 5 se presenta la valoración económica del empleo del Biobrás-16 como sustituto de la KIN en la micropropagación del clavel español. En el presente estudio se ha observado el efecto favorable de este biorregulador como sustituto de la citoquinina sobre las variables morfológicas evaluadas en las diferentes etapas de este proceso, lo que

permite incrementar la eficiencia de la micropropagación de esta especie ornamental. Además, se ha demostrado que la utilización del análogo de brasinoesteroide no ocasiona variabilidad genética en las vitroplantas obtenidas, lo cual posibilita mantener la uniformidad genética de las plantas micropropagadas.

Tabla 5. Valoración económica del empleo del Biobrás-16 en el medio de cultivo como sustituto de la KIN en la micropropagación del clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.).

Biorregulador	Concentración (mg·L ⁻¹)	Costo de producción de un litro de medio de cultivo	Costo de producción de 1000 plantas
KIN	0,8	\$ 0,15 USD	\$ 3,75 USD
Biobrás-16	0,1	\$ 0,02 M.N.	\$ 0,50 M.N.
	0,01	\$ 0,002 M.N.	\$ 0,05 M.N.
	0,001	\$ 0,0002 M.N.	\$ 0,005 M.N.

Al realizar el cálculo de los costos de fabricación de los medios de cultivo empleados en este estudio para el cultivo de meristemos, teniendo en cuenta solamente los precios de la KIN y el Biobrás-16, es posible determinar que independientemente de la concentración a que sea empleado el análogo de brasinoesteroide (0,1 mg·L⁻¹; 0,01 mg·L⁻¹ o 0,001 mg·L⁻¹), el costo de estos medios resulta muy inferior a los costos de elaboración del medio de cultivo con KIN, por lo que se considera que es factible emplear cualquiera de los medios de cultivo con Biobrás-16, en dependencia del objetivo del proceso de micropropagación (Tabla 5).

V. CONCLUSIONES

1. Se establecieron dos tratamientos efectivos de desinfección de semillas de clavel español, con el empleo de hipoclorito de sodio y cloramina-T.
2. El efecto del Biobrás-16 en el cultivo de meristemos fue de citoquinina, al incrementar la formación de brotes, y de sinergismo con la auxina, al producir un incremento de la formación de raíces; el efecto del Biobrás-16 en la propagación por esquejes estuvo en dependencia de la dosis utilizada.
3. Al evaluar el efecto del Biobrás-16 en la aclimatización de las plántulas, se evidenció un incremento en la supervivencia de las mismas.
4. Se obtuvo un método de conteo de los cromosomas de clavel español y se corroboró que el número cromosómico de *Dianthus caryophyllus* L. es $2n=30$, determinándose su constancia durante la micropropagación. Asimismo, los sistemas enzimáticos estudiados no sugirieron la presencia de cambios genéticos en las vitroplantas obtenidas a partir del cultivo de meristemos y las propagaciones por esquejes.

VI. RECOMENDACIONES

1. Ampliar el rango de concentraciones de Biobrás-16 a utilizar en el cultivo de meristemos de clavel español.
2. Realizar ensayos de aclimatización que involucren otras dosis de Biobrás-16 y diferentes momentos de aplicación.
3. Aplicar las electroforesis a otros sistemas isoenzimáticos con el fin de detectar variabilidad y/o estabilidad genética.
4. Extender la aplicación del Biobrás-16 a otras especies ornamentales, incluyendo las del género *Dianthus*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Agramonte, D., F. Jiménez y M. A. Dita. 1998. Aclimatización. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología/ J.N. Pérez Ponce. —Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las plantas. 400 p.
3. Alvarenga, S. 2007. Laboratorio Cultivo de Tejidos I. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 76 p.
4. Alvorst, A. C. *et al.* 1994. Improvement of adventitious shoot formation from carnation leaf explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 37: 87-90.
5. Blanco, A. *et al.* 2004. Uso del Biobrás-16 para la multiplicación vegetativa en el cultivo del gladiolo. Revista Técnica de Fitopatología y Entomología. 21 (82): 127-130.
6. Brewer, G.J. y C.F. Singh. 1971. Introduction to isozyme techniques. Acad. Press. New York. p. 186.
7. Carreres, H. 2008. Flores de Corte: el Clavel. [Consultado el 8/febrero/2008]. Disponible en: <http://agronomia.uchile.cl/webcursos/cmd/12007/mramirez/index.html>.
8. Castilla, Y. 2004. Efecto del Biobrás-16 en la propagación *in vitro* del clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.). Tesis de Diploma. Universidad de La Habana.
9. Cornide, M.T. *et al.* 2002. Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la Genética y la selección de plantas. Ed. Félix Varela, La Habana.
10. Cue, J.L.; N. Ferro y Estévez, M. 2003. Efecto del Biobrás-16 sobre la germinación de las semillas y la morfología de las plántulas en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*, var. SS-5). Centro Agrícola. 30 (4): 50-53.
11. 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.
12. Diosdado, E.; X. Xiqués; C. González y M. I. Román. 1997. Estudio de la variabilidad genética en cultivo de tejidos *in vitro*. Actas Etnobotánica, 92: 125-127.

13. 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. Universidad de La Habana.
14. Dueñas, F. *et al.* 2004. Empleo de marcadores en la detección de la variabilidad genética en somaclones de *Musa* spp. Programa y resúmenes del XIV Congreso Científico del INCA, 9 al 12 de noviembre de 2004, San José de las Lajas.
15. Echemendía, D. 1996. Optimización del cultivo *in vitro* y evaluación de brasinoesteroides sintéticos en callos de *Glycine max* (L.) Merr. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana.
16. Faccioli, G. y F. Marani, 1999. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. p. 346-360.
17. Farquímica, 2008. Desinfectantes. [Consultado el 22/febrero/2008]. Disponible en: www.farquimica.com.
18. Fernández, A. y Sotomayor, E. 2000. Influencia del análogo de brasinoesteroide BB-16 en el gladiolo. En: Seminario Científico del INCA (12: 2000, noviembre 14-17: San José de las Lajas). Libro de Resúmenes. La Habana: INCA, 2000. 500 p.
19. Fernández, M.D., A.M. Torres, T. Millán, J.I. Cubero y A. Cabrera. 2001. Physical mapping of ribosomal DNA on several species of the subgenus *Rosa*. Theoretic Applied Genetics. 103:835-838.
20. Fundación Chile, 2005. Análisis del mercado mundial de flores. [Consultado el: 30/marzo/2005]. Disponible en: www.fundacionchile.cl/fc/flores/analisis.cfm.
21. García, A. y D. Azurmendi. 1976. Hojas divulgadoras. Madrid.
22. García, D. *et al.* 1997. Efecto cualitativo de análogos de brasinoesteroides como sustitutos hormonales en la callogénesis de café (*Coffea canephora* var. Robusta). Cultivos Tropicales. 18 (2): 44-46.
23. García, M. 1999. Metodología para la propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana.
24. González, C. 2002. Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas/ Ma. Teresa Cornide *et al.*, 366 p.
25. González, J.L. *et al.* 2005. Efecto de un análogo de brasinoesteroide sobre plántulas de FHIA-18 expuestas a un estrés térmico. InfoMusa. 14 (1):18-20.

26. González, S., 2003. Medios de cultivo. [Consultado el 30/abril/2008]. Disponible en: <http://fbio.uh.cu/webfv/docencia/tema%205.doc>.
27. Grupo Océano. 2003. Enciclopedia Práctica de la Agricultura y la Ganadería. Barcelona, 1032 pp.
28. Hernández, A. *et al.* 1999. Nueva versión de clasificación de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGRINFOR, Ministerio de la Agricultura, Ciudad de La Habana, Cuba. 64 p.
29. 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.
30. Hernández, M.; M. Ramírez y G. Rodríguez. 2002. Efecto de la aplicación de quitosana en la germinación y crecimiento del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Avances. 4(2).
31. Hernández, R.M. *et al.* 2007. Evaluación de la efectividad del Pectimorf en la embriogénesis somática de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan). Cultivos Tropicales. 28 (4): 25-31.
32. Hidrobo, J.R. *et al.* 2001. Efectividad de biopreparados cubanos de producción comercial en la embriogénesis somática de la papa (*Solanum tuberosum* L.). [Consultado el 28/febrero/2008]. Disponible en: www.nutrar.com.
33. Hughes, K. 1980. Ornamental species. En: Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. B.V. Conger. CRC Press.
34. Iglesias, L. 1986. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en Soya (*Glycine max* (L.) Merrill). Tesis de Candidatura.
35. Infoagro, 2008. El cultivo del clavel. [Consultado el: 8/febrero/2008]. Disponible en: www.infoagro.com/flores/flores/clavel.asp.
36. Jiménez, E. A. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología/ J.N. Pérez Ponce. —Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 400 p.
37. Judd W. *et al.*, 2007. Plants Systematics: A Phylogenetic Approach. Ed. Palgrave-Freeman, 565 p.
38. Khripach, V.A.; V.N. Zhabinskii y A.E. de Groot. 1999. Brassinosteroids: A new class of plant hormones. San Diego: Academic Press.
39. 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.
40. Lacadena, J. R. 1996. Citogenética. Ed. Complutense, S. A.

41. Laemli, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
42. Lara, R.M. *et al.* 2003. Isoenzymatic analysis for detecting *in vitro* variability and/or stability of economically important crops. Cultivos Tropicales. 24 (3): 39-47.
43. Li, J. y J. Chory. 1999. Brassinoesteroids actions in plants. Journal of Experimental Botany. 50 (332): 275-282.
44. Ma, Y., M. Nurul, C.F. Crane, D. Stella, H. James y D. Byrne. 1996. A new procedure to prepare slides of metaphase chromosomes of roses. *HortScience*. 31 (5): 855-857.
45. Madriz, K. 2007. Manual de Laboratorio Biología Molecular. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 49 p.
46. Majourhat, K. *et al.* 2007. Karyotipe characterization of *Argania spinosa* (L.) Skeel (Sapotaceae). *South African Journal of Botany* 73: 661-663.
47. Mariña, C. *et al.* 2004. Efecto del análogo de brasinoesteroides Biobrás-16 sobre algunos indicadores del crecimiento en la variedad de tabaco negro Habana 92. Revista Electrónica Granma Ciencia. 8 (1).
48. Martínez, P. 2005. Improved technique for counting chromosomes in almond. Scientia Horticulturae. 105: 139-143.
49. Mazorra, L.M. y Núñez, M. 2008. Estado actual sobre el conocimiento de la biosíntesis y los mecanismos moleculares de acción de los brasinoesteroides en las plantas. Cultivos Tropicales. 29 (1): 91-105.
50. Messeguer, R. y P. Arús. 1985. Electrophoretic identification of carnation cultivars. Hort Science 20 (3): 372-373.
51. Messeguer, R. y P. Arús. 1996. Genetics of isozyme polymorphisms in carnation. Journal of Heredity. 87: 112-118.
52. Miller, R. *et al.* 1991, a. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus*) from axillary bud explants. Annals of Botany. 67: 35-42.
53. Montes, S. 1994. Cultivo de tejidos: sus aplicaciones. Revisión bibliográfica. INCA. p. 2-10.
54. Montes, S. *et al.* 1997 a. Micropropagación de variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus* L. y *Dianthus plumarius* L.) mediante el cultivo *in vitro* de meristemas. Cultivos Tropicales. 18 (2): 75-81.
55. Montes, S. *et al.* 1997 b. Uso del análogo de brasinoesteroides BB-6 en la micropropagación del clavel. Cultivos Tropicales. 18 (2): 51-55.

56. Moreno, L.C. 2004. Floricultura en el mundo. [Consultado el: 11/abril/2008]. Disponible en: www.chubut.gov.ar/corfo/archives/002202.php.
57. Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum. 15: 473-497.
58. Norberto, C. et. al. 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.
59. Núñez, M. y C. Robaina. 2000. Brasinoesteroides: Nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas en la agricultura. Documentos IAC, 68.
60. Núñez, M. et. al. 2000. Aplicación de diferentes análogos de brasinoesteroides cubanos en distintos cultivos de importancia económica. Informe Final Proyecto de Investigación. INCA.
61. Núñez, M. 2003. Actividad biológica *in vitro* y potencialidades antiestrés de análogos de brasinoesteroides cubanos. Informe Final Proyecto MES. INCA.
62. Núñez, M. et. al. 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.
63. Orellana, P. A. 1998. Introducción a la propagación masiva. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología/ J.N. Pérez Ponce. —Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 400 p.
64. Pérez, 1998. Variación somaclonal. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología/ J.N. Pérez Ponce. —Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 400 p.
65. Pinares, A. 2000. Caracterización morfoagronómica, citogenética y genético-bioquímica de accesiones de Conchita azul (*Clitoria ternatea* L.). Tesis de Diploma. Universidad de la Habana.
66. Pinares, A. 2002. Efecto del medio de cultivo en la germinación *in vitro* de semillas de claveles chinos (*Dianthus chinensis* L.) y en el desarrollo de las plántulas obtenidas. Libro Resumen del VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, Santa Clara: IBP. p 75.
67. Plana, D. 2000. Métodos de cultivo y acción de nuevos reguladores del crecimiento en la morfogénesis *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivar Amalia. Tesis de Maestría. La Habana.
68. Portieles, R., Rodríguez R., Hernández I., Canales E., y M. T. Cornide 2002. Determinación del número cromosómico de un grupo de clones silvestres de origen

- desconocido y clones de fundación del complejo Saccharum. Cultivos Tropicales 23 (2): 69-72.
69. Prede, M. 1999. Morfogénesis *in vitro* en variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa* L.): evidencia histológica y efecto biorregulador de fitohormonas tradicionales y análogos de brasinosteroides. Tesis de Maestría. Universidad de La Habana.
70. Proexport, 2007. Exportación de flores colombianas ¿más de lo mismo? [Consultado el: 8/febrero/2008]. Disponible en: <http://www.proexport.com.co>.
71. ProNat, 2008. Biobrás 16, un nuevo producto cubano para la agricultura. Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Química. Universidad de La Habana. [Consultado el: 04/diciembre/2008]. Disponible en: <http://www.fq.uh.cu/investig/lpn/biobrasLPN.htm>
72. Ramírez, L. 1995. Micropropagación de variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus* L. y *Dianthus plumarius* L.) saneado mediante cultivo *in vitro* de meristemos. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana.
73. Reed, B.M., F. Engelmann, M.E. Dulloo y J.M.M. Engels. 2004. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks N° 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
74. 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.
75. Salehi, H. 2006. Can a general shoot proliferation and rooting medium be used for a number of carnation cultivars? African Journal of Biotechnology. 5(1): 25-30.
76. SPSS 11.5 Versión para Windows.
77. Suárez, L. 2007. Efecto que ejercen las aspersiones foliares de una mezcla de oligogalacturónidos (Pectimorf) y la formulación a base de un análogo de brasinoesteroide (Biobrás-16) en dos especies de orquídeas (*Cattleya leuddemanniana* y *Guarithe skinneri*). Cultivos Tropicales. 28 (4): 87-91.
78. Suárez, L. 2008. Efecto de una mezcla de oligogalacturónidos (Pectimorf ®) en la micropropagación de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz var CMC-40). Tesis de Maestría. Universidad de La Habana.
79. Thorpe, T.A. 1990. The current status of plant tissue culture. En: Plant tissue culture: Applications and limitations. S. S. Bhojwani. Vol. 19: 1-33.

80. Valdés, M. 1997. Caracterización citogenética e isoenzimática de haploides y un dihaploide del género *Nicotiana*. Tesis de Maestro en Ciencias. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 46pp.
81. Vargas, P. y G. Irizar. 2005. Efecto del brasinoesteroide y densidad de población en la acumulación de biomasa y rendimiento del ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). Revista Chapingo, Serie Horticultura. 11(2): 269-272.
82. Wendel, J.F. y N.F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. En: *Isozymes in Plant Biology*. New York. Dioscorides Press, p. 5-34.