

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL PASTO VETIVER (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) UTILIZANDO DIFERENTES EXPLANTES Y MEDIOS DE CULTIVOS.

A. Gámez * y Páez de Cásares**

RESUMEN

Con la finalidad de propagar *in vitro* al pasto vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) utilizando dos tipos de explantes (yemas extraídas de las cepas y secciones de nudos provenientes de los tallos de consistencia dura) y dos medios de cultivos (M1: MS; 5 μ mol BAP; 0,1 μ mol de AIB y M2: MS; 10 μ mol BAP; 0,1 μ mol de AIB) se llevó a cabo un experimento en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la UCV- Maracay, Venezuela. El diseño de experimento fue de completamente aleatorizado con un arreglo factorial 2² (dos factores, uno cualitativo y otro cuantitativo; a dos niveles cada factor), utilizando 4 explantes por unidad experimental y 7 repeticiones. Los explantes fueron extraídos de plantas madres ubicadas en el campo del Instituto de Agronomía- UCV, después se limpiaron con abundante agua y luego se desinfectaron con etanol al 70% por 15 min. y Oxochem ® al 0,5 % durante 15 min. Posteriormente, los explantes fueron implantados en frasco que contenían 35 ml de los medio de cultivo correspondiente. Se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura 26 ± 2 °C, H.R. 70% y 25 μ E/m²s de luminosidad. A los 7, 21, 28 y 42 días después de implantado el material vegetal, se evaluó el comportamiento de los explantes. A los 7 días el mayor porcentaje de explantes contaminados tendió a observarse en las secciones de tallos con nudos; a los 9 días se contaminaron por completo estos explantes. Sólo algunas yemas cultivadas en ambos medios de cultivo tendieron a no contaminarse y la mayoría de ellas que permanecieron vivas fue en el medio de cultivo 2 (M2). Se observa la tendencia a un mejor comportamiento de las yemas extraídas de las cepas para propagar “*in vitro*” al vetiver en el M2, por lo que sería conveniente considerar este último tratamiento para futuras investigaciones en la propagación *in vitro* de esta planta.

Palabras clave: propagación *in vitro*, secciones de nudos, yemas, medios de cultivo, BAP.

*Ing. Agr. Postgrado en Agronomía, Facultad de Agronomía - UCV, ajgamezlopez@yahoo.com.

**Prof^a. Laboratorio de Cultivo de tejidos, Instituto de Agronomía, Facultad de Agronomía - UCV, paezj@agr.ucv.ve

***IN VITRO* PROPAGATION OF VETIVER GRASS (*Vetiveria zizanioides* L. NASH) USING DIFFERENT EXPLANTS AND SUSTRATE MEDIA.**

A. Gámez * y Páez de Cásares J.**

SUMMARY

To propagate *in vitro* the vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) using two explant types (extracted buds from the culms and sections of nodes coming from hard-consistency stems) and two substrate media (M1: MS; 5 μ mol BAP; 0,1 μ mol of AIB and M2: MS; 10 μ mol BAP; 0,1 μ mol of AIB) it was carried out an experiment at the Laboratory of Tissue Culture of the Agronomy Faculty, UCV, Maracay, Venezuela. The experiment design was totally randomized with a factorial of 2x2 (2 factors, one qualitative and another quantitative, both at two levels), four explants for experimental unit and seven replications. The explants were taken from mother plants located in the field of the Institute of Agronomy, UCV, later they were cleaned with abundant water and then disinfected with ethanol at 70% for 15 min. and Oxochem® at 0,5% during 15 min. Later on explants were implanted in flasks containing 35 ml of a given substrate medium, then flasks were placed in the growing room at 26 ± 2 °C, 70% relative humidity and 25 μ E/m²s of luminosity. After 7, 21, 28 and 42 days of implanting, the plant material was evaluated. At 7 days the biggest percentage of contaminated explants tended to be observed in the stem sections with buds, at 9 days these explants were totally contaminated. Only some cultivated buds in both media showed a tendency of not being contaminated and most of them remained alive in the substrate media two (M2). The tendency was to observe a better behavior of the extracted buds from the culms in M2, then it would be convenient to consider this last treatment for future researches in the *in vitro* propagation of this plant.

Key words: *in vitro*, propagation, node sections, substrate media, BAP

INTRODUCCIÓN

El pasto vetiver o simplemente vetiver como comúnmente se le conoce (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) es una hierba perenne, originaria del sur de Asia. Se caracteriza por ser una planta que crece hasta una altura de 2 - 3 m, con un sistema radical fuerte que crece verticalmente (en su mayoría) a profundidades de hasta 5 m (Smyle, 1999), no produce semillas viables, por lo que se reproduce asexualmente (por medio de hijos, vástagos y renuevos). Es cultivada en diferentes áreas tropicales y subtropicales para diversos usos, entre los cuales se pueden mencionar: barrera para la protección de suelos contra la erosión, producción de aceites (utilizados por las industrias cosméticas para la producción de perfumes), fitoremediación de áreas contaminadas (altamente tolerante a la toxicidad por algunos metales pesados como: Cadmio, Cromo y Niquel), aplicaciones medicinales, elaboración de artesanías, abono orgánico, sustrato para el cultivo de hongos comestibles y control de plagas (Chomchalow, 2004; Leupin, 2001; Hernandez, 1996). Por todas estas propiedades es considerada en Tailandia como una planta milagrosa (Prasertsongskun, 2003).

Para mejorar la eficiencia de la propagación masiva del vetiver, muchas nuevas técnicas han sido utilizadas en años recientes. La más importante y significativa es la utilización de la técnica del cultivo de tejidos para la propagación masiva (Prasertsongskun, 2003), ya que se pueden obtener una gran cantidad de plantas en poco tiempo y a un costo razonable; además, al compararla con la propagación convencional se pueden transportar grandes cantidades de plantas a otras áreas (Chomchalow, 2000). Cruz (1997) menciona que utilizando este método se pueden producir rápidamente millones de tallitos de vetiver que muestran el mismo comportamiento y vigor que las plantas madres. Estos tallitos tienen la ventaja de que las nuevas cepas y su producción es mucho más rápida. En un año, una cepa de vetiver puede propagarse en alrededor de 6500 a 7000 cepas utilizando el método '*in vitro*'. También es un método útil para el mejoramiento genético de esta planta. Hai (sin fecha) seleccionó plantas de vetiver tolerantes a la salinidad utilizando el método "*in vitro*". Igualmente Haping (2004) realizó un trabajo en donde obtuvo cultivares de vetiver tolerantes al frío mediante la técnica "*in vitro*".

Por otra parte, cualquier tejido meristemático de la planta puede ser utilizado para la propagación *in vitro* de esta especie. Sin embargo, las yemas laterales o terminales provenientes de brotes jóvenes y los tejidos meristemáticos de inflorescencias son las más utilizadas (Chomchalow, 2000). Nanakorn (sin fecha), señala que para la inducción de brotes en vetiver se pueden cultivar inflorescencias jóvenes y segmentos de nudos de 3 - 4 cm de longitud. Así mismo, indica que para la inducción de brotes a partir de estos segmentos de nudos, deben ser colocados en medio MS suplementado con 10 μ mol BA durante 60 días. En el caso de utilizar explantes provenientes de las inflorescencias; en primer lugar se debe inducir callos y luego inducir la formación de brotes. De acuerdo con Cruz (1997) para propagar el vetiver por el método "*in vitro*" se deben utilizar secciones de cepas de 1,5 a 2,5 cm dejando una yema lateral y cultivándolas en medio MS que contenga 10 μ mol/l de BAP para inducir el desarrollo de las yemas.

La primera etapa durará de 2 a 6 semanas aproximadamente, dependiendo de la cepa. Primeramente, la yema terminal crecerá y posteriormente lo hará la yema lateral seguida de un brote lateral. Luego se trasladan las cepas a un nuevo medio, en donde la concentración del BAP es de 5 μ mol/l y la concentración de AIB es de 0,4 μ mol/l, con la finalidad de acelerar el crecimiento de las yemas. Los brotes que se obtienen serán pequeños pero en grandes cantidades. Cuando se tienen varios brotes, las raíces se inducen en un medio que contiene 0,5 μ mol/l de AIA. El brote seguirá creciendo y desarrollándose; y entre la 2 y 4 semanas se desarrollarán las raíces.

Diferentes investigaciones han sido señaladas por diferentes autores, así se tiene que: Mucciarelli *et al* (1993) describieron una investigación utilizando el cultivo “*in vitro*” para inducir callos y regenerar plantas de vetiver a partir de explantes de hojas jóvenes basales. Hai (sin fecha) regeneró plantas de vetiver vía “*in vitro*”, utilizando tejidos de inflorescencia. Prasertsongskun (2003) llevó a cabo una investigación para establecer un cultivo de suspensiones celulares y regenerar plantas de vetiver a partir de callos embriogénicos derivados de las mismas. Hanping (2004) estableció un sistema efectivo de regeneración de vetiver cultivando “*in vitro*” nudos con yemas axilares.

El objetivo de este estudio fue propagar *in vitro* al pasto vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) utilizando diferentes explantes y medios de cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la UCV - Maracay. El material vegetal utilizado fue extraído de plantas madres ubicadas en el área de propagación controlada del Instituto de Agronomía- UCV. Una vez seleccionado el material vegetal (Fig 1), se procedió a limpiarlo con suficiente agua y jabón líquido (lavaplatos). De este material se extrajeron los explantes a utilizar: yemas extraídas de las cepas y secciones de nudos provenientes de los tallos de consistencia dura (Fig 2), después se desinfectaron con etanol al 70% por 15 min. y Oxochem® (ácido peracético 6%; H₂O₂, inertes y agua desmineralizada c.s.p 94%) al 0,6 %, con 3 gotas de adherente 'Tween 20' durante 15 min; luego, los explantes se implantaron en frasco con 35 ml de los medios de cultivos correspondientes. Los medios de cultivos contenían las sales de Murashige y Skoog (1962), 30 g/l de sacarosa, 10 g/l de Agar, 0,1 μ mol de AIB; variando solo las cantidades de BAP: 5 μ mol BAP y 10 μ mol BAP, respectivamente. Posteriormente, se colocaron en el cuarto de crecimiento a temperatura 26 ± 2 °C, H.R. 70% y 25 μ E/m²s de luminosidad (Fig. 3).



Figura 1. Material vegetal consistente en cepas seleccionadas de plantas madres de vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) de 8 años.

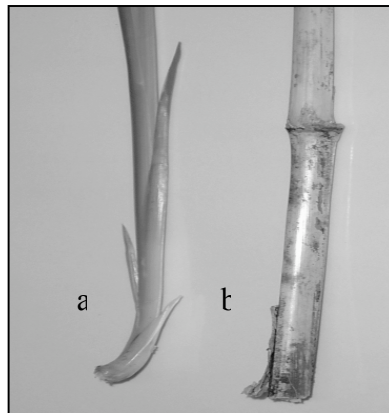


Figura 2. Explantes extraídos del vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash): a) yemas extraídas de las cepas; b) secciones de nudos provenientes de los tallos de consistencia dura, seleccionados de plantas madres de 8 años.



Figura 3. Envases con explantes de vetiver (*Vetiveria zizanioides L. Nas*) bajo condiciones controladas en un cuarto de crecimiento.

El diseño de experimento utilizado fue completamente al azar, con un arreglo factorial 2^2 (dos factores, uno cualitativo y otro cuantitativo; a dos niveles cada factor), el factor cualitativo (A) representado por el tipo de explante y el factor cuantitativo (B) por las concentraciones de BAP. Se utilizaron 7 repeticiones y 4 explantes por unidad experimental por tratamiento. Los tratamientos fueron:

Tratamiento 1: Explante yemas extraídas de las cepas y Medio 1 (MS; 5 μ mol BAP; 0,1 μ mol de AIB).

Tratamiento 2: Explante yemas extraídas de las cepas y Medio 2 (MS; 10 μ mol BAP; 0,1 μ mol de AIB).

Tratamiento 3: Explante secciones de nudos provenientes de los tallos de consistencia dura y Medio 1 (MS; 5 μ mol BAP; 0,1 μ mol de AIB).

Tratamiento 4: Explante secciones de nudos provenientes de los tallos de consistencia dura y Medio 2 (MS; 10 μ mol BAP; 0,1 μ mol de AIB).

Se realizaron observaciones diarias y evaluaciones cada 7 días sobre el comportamiento de los explantes, en cuanto a viabilidad, contaminación y crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las observaciones realizadas arrojaron los siguientes resultados:

A los 7 días después de implantado el material vegetal se observó una tendencia a presentar un alto porcentaje de contaminación (el 87,5% del material implantado) en los explantes de secciones de nudos colocados en ambos medios de cultivo (Fig. 4), luego a los 2 días el resto del material de este tipo de explante también se contaminó. Del otro tipo de explante sólo unos pocos tendieron a contaminarse. De acuerdo con esto, quizás la desinfección realizada a los explantes de secciones de nudos fue insuficiente para tener un material totalmente aséptico. Es de resaltar que este tipo de explante proviene de un material vegetal que esta mucho más expuesto al compararlo con el otro tipo de explante que esta mas “protegido”. Pierik (1990) señala que en los segmentos de nudos las posibilidades de infección son más altas y para reducir las posibilidades de infección es mejor aislar yemas cerradas.

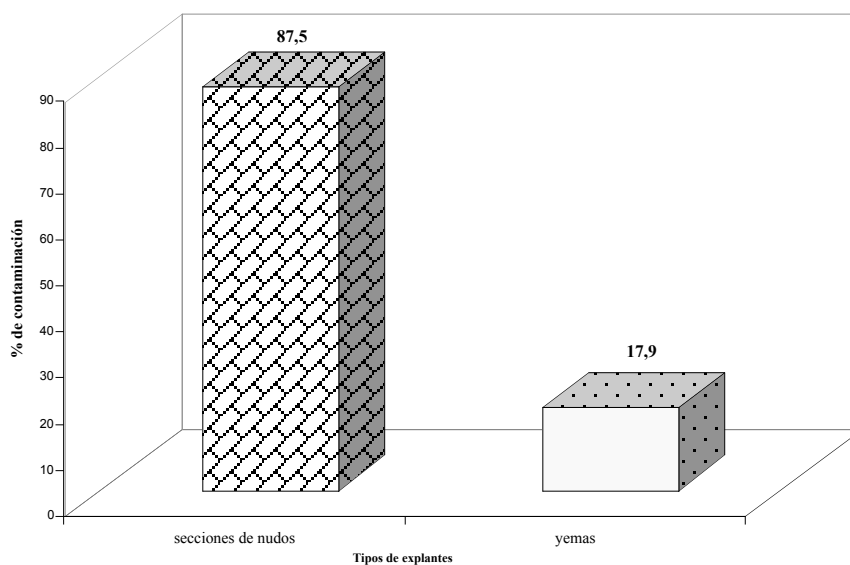


Figura 4. Porcentaje de explantes de vetiver (*Vetiveria zizanioides L. Nas*) contaminados a los 7 días después de implantados.

En observaciones siguientes realizadas a los 21, 28 y 42 días después de realizada la implantación, se tendió a contaminar parte de los explantes de yemas en ambos medios de cultivos, sin embargo, pudo observarse que la mayor proporción de yemas vivas correspondían a la implantadas en el medio 2 (Fig. 5). Pudo evidenciar claramente al final que la mayor parte de los explantes de yemas permanecieron vivos en el medio 2 (Fig. 6).

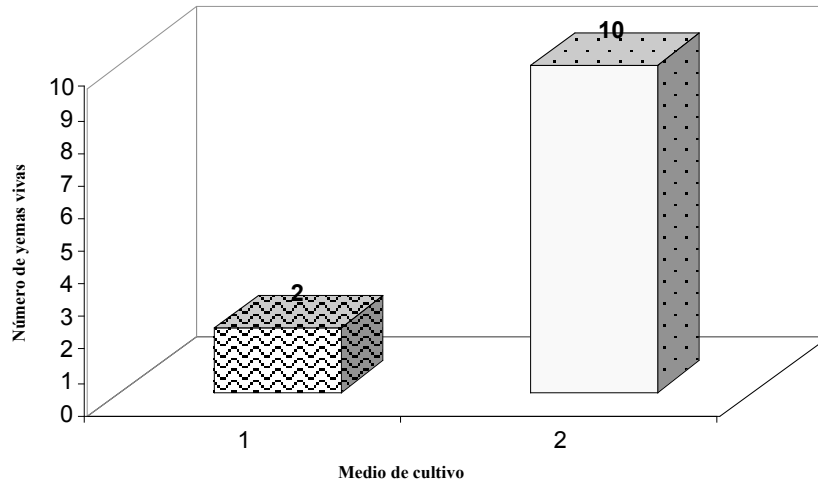


Figura 5. Explantes tipo yema extraídas de las cepas de vetiver (*Vetiveria zizanioides L. Nash*) que permanecieron vivas en los dos medios de cultivo (M1: MS; 5 _mol BAP; 0,1 _mol de AIB y M2: MS; 10 _mol BAP; 0,1 _mol de AIB) a los 42 días después de implantados (final del ensayo).



Figura 6. Crecimiento de diferentes explantes tipos yemas extraídos de cepas de vetiver (*Vetiveria zizanioides L. Nash*) que permanecieron vivas en el medio de cultivo 2 (M1: MS; 5 _mol BAP; 0,1 _mol de AIB y M2: MS; 10 _mol BAP; 0,1 _mol de AIB) a los 42 días después de implantados (final del ensayo).

CONCLUSIONES

- El mayor porcentaje de explantes contaminados tendió a observarse en los explantes secciones de nudos, por lo que se considera que la desinfección no fue suficientemente fuerte para este tipo de explante y que pudiera contemplar utilizarse en el futuro mayor cantidad de Oxochem ®
- La mayoría de los explantes de yemas tendieron a permanecer vivos en el medio de cultivo 2, por lo que la desinfección utilizada puede ser usada, pero además, podría considerarse una dosis más fuerte sin dañar los explantes que son más frágiles.
- Esta investigación nos suministra algunos indicios preliminares del tipo de material vegetal que debe ser utilizada en la propagación “*in vitro*” de esta planta y la forma adecuada de su desinfección. Nos sirve, además de base para otros ensayos, de tal manera, que se pueda multiplicar esta planta vía “*in vitro*” en mayores cantidades que la tradicional forma de multiplicar esta planta en viveros.

BIBLIOGRAFÍA

Cruz, K. 1997. Propagación del Vetiver por método “*in vitro*”. Boletín Vetiver, Marzo 1997, Número 3. Pag: 18.

Chomchalow, N. 2000. Techniques of vetiver propagation with special referencing to Thailand. Technical Bulletin N° 2. Pacific Rim Vetuver Network. Bangkok, Thailand. Pags: 14-15.

Chomchalow, N. 2004. Why and Why Not Vetiver?. In: VETIVERIM. Chomchalow, N (ed). N° 28, April 2004. pag: 1.

Hai, T. sin fecha. The *in vitro* regeneration of vetiver (*vetiveria zizanioides* (L.) Nash) using thin cell layer culture of inflorescences and selection for salt tolerant callus clones. [Documento en Línea] Disponible en: http://www.vetiver.com/VNN_invitrio_r.pdf

Hanping, X. 2004. Interim Report on New Cold Tolerant Vetiver Cultivar through Biotechnology. In: VETIVERIM. Chomchalow, N (ed). N° 28, April 2004. pags: 2-7.

Hernández, J. 1996. Usos alternativos para el vetiver. Boletín Vetiver, Octubre 1996, Número 2. Pag: 10-11.

Leupin, R. 2001. *Vetiveria zizanioides*: an approach to obtain essential oil variants via tissue culture. A dissertation submitted to the SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH for the degree of Doctor of Natural Sciences. Zürich. Pags: 184. [Documento en Línea] Disponible en: <http://e-collection.ethbib.ethz.ch/ecollection/diss/abstracts/p14182.pdf>

Mucciarelli, M; Gallido, M; Scannerini, S y Maffei, M. 1993. Callus induction and plant regeneration in *Vetiveria zizanioides*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 35: 267-271.

Nanakorn, M. Sin fecha. Mass Propagation of Vetiver Grass. Botany Department- Kasetsart University. Bangkok, Thailand. Pag: 1.

Pierik, R. 1990. Cultivo “*in vitro*” de las plantas superiores. Ediciones Mundi.Prensa. Madrid. Pag: 188.

Prasertsongskun, S. 2003. Plant regeneration from callus culture of vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash). Songklanakarin J. Sci. Technol. Vol. 25. N° 5. [Documento en Línea] Disponible en: <http://www2.psu.ac.th/PresidentOffice/EduService/journal/25-5-pdf/10callus.pdf>

Smyle, J. 1999. Experiencia mundial con el uso del vetiver para infraestructura, cuenca y uso en la finca. En: Memorias del Taller de bioingeniería para la construcción post mitch: Experiencia con el uso de vetiver para la protección y estabilización de infraestructura. San Salvador, El Salvador. Pags: 19-22.