

Propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp.

Grecia Montalvo^{1*}, Elisa Quiala², Reinaldo Mederos¹, Jesús Matos¹, Manuel de Feria², Maité Chávez², Orestes Placencia², Miladys León². *Autor para correspondencia.

¹ Área protegida "Sabana de Santa Clara". Empresa Nacional para la protección de Flora y Fauna. Santa Clara. Cuba. e-mail: grecia_montalvo@yahoo.es.

² Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba.

RESUMEN

Este trabajo se realizó con el objetivo de establecer las condiciones de cultivo necesarias para la propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp. Se utilizaron como material vegetal de partida semillas de frutos maduros colectados en condiciones de campo. Se estudió el efecto de tres concentraciones de Hipoclorito de sodio (NaOCl) (1.5, 2.0, 2.5%) en la desinfección de las semillas, así como la influencia de tres concentraciones de las sales Murashige-Skoog, (MS) (25, 50, 75%) sobre la germinación de las mismas. Durante la fase de multiplicación se evaluó el efecto de tres concentraciones de 6 Bencilaminopurina (6 BAP) (1.0, 2.0 y 3.0 mg l⁻¹), las plantas fueron enraizadas en un medio de cultivo MS, complementado con 1.0 mg.l⁻¹ y 2% de sacarosa. Se aclimatizaron las plantas obtenidas *in vitro*. Se logró el 100% de semillas libres de contaminantes microbianos visibles cuando se utilizó el NaOCl al 1.5% durante 10 minutos. El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en un medio de cultivo con 25% de sales MS (88.5%). En la multiplicación de los explantes el mejor resultado se alcanzó con 1.0 mg l⁻¹ de 6 BAP, con un coeficiente de multiplicación de 2.28 unidades. El 100% de los cactus emitieron raíces en un medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. En la fase de aclimatización el porcentaje de supervivencia fue de 88.7%.

Palabras clave: biodiversidad, cactus, especie amenazada, micropropagación

ABSTRACT

This work was carried out with the objective to establish the necessary cultivation conditions for the multiplication *in vitro* of *Pilosocereus* sp. Seeds from mature fruits collected under field conditions were used. The effect of three concentration of NaOCl (1.5, 2.0, 2.5%) in the disinfection of the seeds was studied, as well as the influence of three salts concentration Murashige-Skoog, (MS) (25, 50, 75%) on the germination of the same ones. During the multiplication phase the influence of three concentration of bencilaminopurine (1.0, 2.0 y 3.0 mg l⁻¹) in the culture medium was evaluated. The 100% of seeds free of microbial pollutants was achieved when the 1.5% NaOCl during 10 minutes was used. The biggest germination percentage was achieved in a culture medium with 25% of salts MS (88.5%). For the multiplication of plants the best results were reached when 1.0 mg l⁻¹ of 6-BAP was used and a multiplication coefficient of 2.28 units was obtained. The 100% of plants develop root in a simple culture medium Murashige-Skoog (MS) without regulators of growth. During the acclimatization phase the 88.7% of survival was reached.

Key words: biodiversity, cactus, micropropagation, threatened species

INTRODUCCIÓN

Cuba posee una de las floras insulares más ricas del mundo, pero al igual que la gran mayoría de los países del trópico presenta problemas con la destrucción de sus ecosistemas naturales y unas 950 especies corren determinados riesgos a corto o mediano plazo (Primack *et al.*, 2001).

La extinción de las especies se considera un fenómeno natural siempre y cuando ocurra por causas naturales como pueden ser los cataclismos, evento este mediante el cual se extingue una especie cada 40 años. Sin embargo, las mayores tasas de extinción han sido provocadas por acciones antrópicas (Primack, 2000).

El *Pilosocereus* sp, es un cactus endémico local de Santa Clara, Cuba y se encuentra en peligro crítico de extinción. La reproducción por vías tradicionales

se realiza a partir de estacas. Este método tiene como desventaja fundamental que implica la mutilación de los individuos que están en condiciones naturales para poderlos reproducir. El lento crecimiento de las plantas de *Pilosocereus* sp obtenidas por vías tradicionales es otra de las problemáticas de la especie, lo que dificulta la obtención de grandes cantidades de individuos.

Teniendo en cuenta la problemática antes planteada es que se propone como objetivo desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* del *Pilosocereus* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron semillas botánicas maduras colectadas de plantas adultas en su hábitat natural, las cuales tenían un tamaño promedio de 2 mm.

Condiciones generales de cultivo

Los explantes se mantuvieron en cámara de luz solar a una temperatura de $26 \pm 2.0^\circ\text{C}$ y una intensidad luminosa de 100 y $125 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$. La composición específica de los medios de cultivo se define en cada experimento. El pH siempre se ajustó a 5.6 previo a la esterilización. Los medios de cultivo semisólidos fueron gelificados con 2.0 g de Phytigel y se esterilizaron en autoclave a 121°C de temperatura, $1.2 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ de presión durante 20 minutos. Se utilizaron frascos de vidrio de 250 ml con 35 ml de medio de cultivo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó con el programa STATGRAPHIC PLUS 4.1. Se hizo un análisis de varianza simple para todos los experimentos, la prueba de Tukey para detectar las diferencias entre los porcentajes y la prueba de rangos múltiples de Duncan para el análisis de las diferencias entre las medias estadísticas.

Desinfección del material vegetal

Las semillas fueron lavadas con agua común y posteriormente desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5, 2 y 2.5% p/v durante un tiempo de 10 minutos. Se utilizó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) en estado semisólido con el 100% de las sales complementado con 1.0 mg l^{-1} de Tiamina y 30 g l^{-1} de sacarosa. Se colocaron tres semillas por frascos con seis réplicas por tratamiento y se evaluó a partir del segundo día de manera alterna hasta los 17 días de cultivo, el número de semillas libres de contaminantes microbianos visibles por frascos y se calculó el porcentaje de desinfección.

Germinación *in vitro* de las semillas

Se estudió la influencia de las sales MS en el medio de cultivo sobre la germinación de las semillas. Se utilizaron tres concentraciones 25, 50 y 75% de sales MS que fueron complementados con $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Tiamina y $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de sacarosa y se colocaron cinco semillas por frasco con siete réplicas por tratamiento. Se evaluó en días alternos hasta los 30 días de cultivo el número de semillas germinadas por frasco y se calculó el porcentaje de germinación.

Multiplicación y enraizamiento de los explantes

Se realizaron tres subcultivos con una frecuencia de siete semanas. Se utilizó un medio de cultivo compuesto por el 100% de las sales MS, vitaminas MS, y $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de sacarosa y se estudió el efecto

de tres concentraciones de 6-BAP (0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg l^{-1}).

Para el manejo del material vegetal se procedió de la siguiente forma: durante el primer subcultivo se realizó un corte basal del explante para eliminar la raíz. En el segundo y tercer subcultivo se procedió a la disección transversal del explante madre y a la separación de los nuevos brotes.

Se utilizaron dos explantes por frascos con seis, siete y ocho réplicas por tratamientos durante el primero, segundo y tercer sub-cultivo respectivamente. Se cuantificó el número de brotes y se calculó el coeficiente de multiplicación, se evaluó el número de explantes no aptos para multiplicar y el número de explantes con raíces.

El criterio que se tuvo en cuenta para considerar un explante como no apto para la multiplicación fueron brotes pequeños con un tamaño entre 2 y 4 mm y muy unidos entre sí, pero que se desprendían con facilidad del explante madre. Estos brotes le daban al explante una apariencia de racimo muy diferente al explante tipo que es cilíndrico y alargado.

Teniendo en cuenta que en todos los experimentos realizados los explantes que se encontraban en un medio de cultivo MS sin ningún regulador del crecimiento fueron los que presentaron un mejor desarrollo del sistema radical se decidió utilizar este medio de cultivo para lograr el enraizamiento de los explantes.

Aclimatización de las plantas cultivadas *in vitro*

Se sembraron 35 plantas en un sustrato compuesto por 85% de compost y 15% de zeolita, además se le adicionó una capa de zeolita en la superficie del sustrato. La frecuencia de riego fue de dos veces por semana. La altura promedio de las plantas era de 2 cm. A partir de los siete días hasta los cuatro meses se determinó la supervivencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de las semillas

Desarrollar con éxito la desinfección de los materiales vegetales para su posterior establecimiento *in vitro*, es uno de los pasos más importantes dentro de cualquier protocolo de propagación (Pérez, 1998). Los resultados obtenidos en este experimento mostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados y se obtuvieron 94.4, 100 y 100% de semillas libres de contaminantes microbianos visibles cuando se utilizaron concentraciones de NaOCl al 1.5, 2.0 y 2.5% respectivamente.

Por tal razón, se decidió utilizar la menor concentración de NaOCl para la desinfección de las semillas de *Pilosocereus* sp, es decir, una solución de NaOCl al 1.5% durante 10 minutos.

Estos resultados concuerdan con Pérez (1998) quién plantea que el hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes superficiales más utilizados en el cultivo *in vitro* y se emplea en concentraciones de 1 a 3% en tiempos de 10 a 20 minutos. Su efectividad aumenta si se adiciona algún agente humectante como Tween 20 (Thompson, 1980).

Resultados similares fueron obtenidos por Quiala *et al.* (2003) al desinfectar semillas de *Pilosocereus robinii*, los cuales lograron los mejores resultados al emplear una solución de NaOCl al 2.0% durante 10 minutos con lo cual el 100% de las semillas quedaron libres de contaminantes microbianos visibles.

Germinación *in vitro* de las semillas

La germinación de las semillas comenzó a los ocho días. Como se observa en la tabla 1 a medida que se aumentó la concentración de sales MS en el medio de cultivo disminuyó el porcentaje de germinación, no hubo diferencias estadísticamente

significativas cuando se utilizó un medio de cultivo con 25 y 50% de las sales MS, por lo que se decidió utilizar para la germinación de las semillas de *Pilosocereus* sp. un medio de cultivo con el 25% de sales MS. Según Quiala *et al.* (2003) para la germinación de las semillas de *Pilosocereus robinii* los mejores resultados se obtuvieron cuando se trabajó con un medio de cultivo compuesto por el 50% de sales MS, con el cual se logró un 94.6% de germinación.

Aunque el medio de cultivo MS (1962) fue desarrollado inicialmente para el cultivo de tejidos de tabaco, el mismo ha sido muy efectivo para muchas otras especies. Se plantea que el nitrato de amonio es la mejor fuente de nitrógeno para garantizar el crecimiento y desarrollo de un gran número de especies y que las sales de amonio promueven el crecimiento de los embriones durante la germinación (Pérez, 1998).

Multiplicación de los explantes

En el primer subcultivo no hubo emisión de brotes en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, ya en el segundo y tercer subcultivo se logró una mejor respuesta y se observó la formación de nuevos brotes (tablas 2 y 3 respectivamente) sobre todo en los tratamientos con 2.0 y 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP.

Tabla 1. Porcentaje de semillas germinadas de *Pilosocereus* sp a los 30 días de cultivo.

% de Sales MS	% de Germinación
25	88.5 a
50	85.7 a
75	42.8 b
CV ± EE	20.49± 0.39

*Medias con letras distintas difieren estadísticamente para p<0.05 según Tukey

Tabla 2. Efecto del 6-BAP en la multiplicación de *Pilosocereus* sp (segundo subcultivo).

Concentración de 6-BAP (mg. l ⁻¹)	Número promedio de brotes por frasco	Coefficiente de multiplicación	Explantes no aptos para la multiplicación	Número promedio de explantes con raíces por frasco
Control	1.71d	1.71	---	1.00a
1.0	2.28c	2.28	---	0.71b
2.0	8.71b	6.57	2.14b	0.14c
3.0	11.85a	8.57	3.28a	---
CV±EE	16.0 ± 0.22	---	8.03 ± 0.55	9.04 ± 0.12

*Medias con letras distintas en una columna difieren estadísticamente para p<0.05 según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tabla 3. Efecto del 6-BAP en la multiplicación de *Pilosocereus* sp (tercer subcultivo).

Concentración de 6-BAP (mg. l ⁻¹)	Número promedio de brotes por frasco	Coefficiente de multiplicación	Explantos no aptos para la multiplicación	Número promedio de explantes con raíces por frasco
Control	1.87d	1.56	0.31c	2.00a
1.0	2.87c	1.94	0.93b	0.25b
2.0	3.62b	2.62	1.00b	---
3.0	8.93a	5.68	3.25a	---
CV±EE	15.03 ± 0.29	---	11.1 ± 0.71	13.01 ± 0.71

*Medias con letras distintas en una columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tanto en el segundo como tercer subcultivo a medida que aumentó la concentración de 6-BAP, se incrementó el coeficiente de multiplicación, siendo mayor en el tratamiento con 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP (11.85 y 8.93 unidades respectivamente). Sin embargo, es también en este tratamiento donde se obtuvo el mayor número de explantes no aptos para la multiplicación, ya que los cactus emitieron muchos brotes pero de tamaño muy pequeño entre 2 y 4 mm y muy unidos entre sí, los cuáles fueron clasificados como explantes no aptos para multiplicar. Esto ocurrió también en el tratamiento con 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP pero en menor medida.

Es importante a la hora de tomar una decisión, tener en cuenta que se está trabajando con una especie amenazada y que el objetivo principal es conservarla, por lo tanto, no se puede correr el riesgo de utilizar elevadas concentraciones de reguladores del crecimiento para obtener altos coeficientes de multiplicación sin pensar en la posible aparición de variaciones somaclonales.

Por lo antes expuesto se decidió tomar como mejor tratamiento para la multiplicación de los explantes de cactus, el de 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Debido a que este fue el único tratamiento donde no hubo explantes no aptos para multiplicar y hubo un coeficiente de multiplicación superior al control (Fig.1).



Figura 1 Planta cultivada *in vitro* de *Pilosocereus* sp. durante la fase de multiplicación (tratamiento con 1.0 mg. l⁻¹ de 6-BAP).

En cuanto al número de subcultivos se decidió someter los explantes solo a un subcultivo ya que a partir del segundo comenzaron a aparecer los explantes no aptos para multiplicar incluso en el tratamiento sin reguladores del crecimiento en el medio de cultivo.

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación de especies en peligro

de extinción cobra mayor o menor importancia en dependencia del grado de conservación de la especie y de la disponibilidad de material vegetal de partida, ya que se debe tener en cuenta la posible variabilidad que puede introducir la multiplicación sucesiva de los explantes *in vitro*, es por ello que la estrategia consiste en reducir al mínimo posible el número de subcultivos.

Generalmente se tiende a pensar que en la etapa de multiplicación los explantes deben ser subcultivados indefinidamente sin que disminuya el coeficiente de multiplicación. Sin embargo, el comportamiento de los explantes durante los subcultivos *in vitro* en el proceso de multiplicación depende de la especie incluso del genotipo o variedad (Pérez, 1998).

Autores como Arenas *et al.* (2003) plantearon que para la micropropagación de *Turbinicarpus pseudopectinatus* una cactácea que se encuentra amenazada en México la mejor respuesta de organogénesis directa se encontró asociada a la inducción con Benciladenina (BA) en una concentración de 2.0 mg.l⁻¹ y en ausencia ácido naftaleacético (ANA).

Sotomayor *et al.* (2003) en la micropropagación de *Coryphantha elephantidens* (cactácea amenazada y endémica del estado de Morelos, México), plantearon que el mayor número de brotes (7.4 brotes) se obtuvo cuando se utilizaron 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo durante 48 días.

Quiala *et al.* (2003) destacaron durante la propagación *in vitro* de *Pilosocereus robinii*, una cactácea endémica cubana en peligro de extinción, que los mejores resultados en cuanto a multiplicación (2.0-2.3 brotes por explante) se obtuvieron cuando se utilizaron 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo.

En cuanto al número de explantes con raíces se observó que este disminuyó al aumentar la concentración de 6-BAP en los dos subcultivos (Tablas 2 y 3), incluso se inhibió la presencia de raíces en el tratamiento con 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Sin embargo, el mayor número de explantes con raíces se obtuvo en el tratamiento control a pesar de no haber presencia de auxina en el medio de cultivo. Las raíces eran largas con muchas ramificaciones secundarias mientras que las raíces de los explantes procedentes del medio de cultivo con 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP eran cortas y sin ramificaciones.

En el enraizamiento se logró el 100% de explantes con raíces en el medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. Los cactus desarrollaron un sistema radical bien definido con una raíz principal y abundantes raíces secundarias. Esto puede estar provocado porque en ausencia de citoquinina exógena la relación auxina/citoquinina endógena favorece a las auxinas y por tanto se estimula la formación de raíces.

Escobar *et al.* (1986) destacaron que el enraizamiento de explantes de *Opuntia amyclaea* y *Agave atrovirens* sin la adición de auxinas exógena fue posible en un medio de cultivo simple con el 50% de las sales MS y sin reguladores del crecimiento, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación.

Según Gómez *et al.* (2003) en la propagación *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus*, una especie de cactus amenazada, el porcentaje de enraizamiento de los explantes fue cercano al 25% cuando utilizaron un medio de cultivo MS con ácido indolbutírico (AIB) (0-2.0 mg.l⁻¹) y ANA (0-1.0 mg.l⁻¹), a diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación donde se obtuvo un mayor porcentaje de enraizamiento (100%) sin la adición de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo.

Resultados similares fueron obtenidos durante la micropropagación de *Astrophytum myriostigma* por Jiménez *et al.* (2003) cuando probaron tres tratamientos para el enraizamiento de brotes adventicios con diferentes concentraciones de ANA (0.0, 0.1, y 0.5 mg.l⁻¹). Sin embargo, el más efectivo fue un medio de cultivo con las sales MS sin reguladores del crecimiento.

Aclimatización de las plantas obtenidas *in vitro*

Se logró un 88.7% de supervivencia a los cuatro meses de aclimatizadas, los cactus alcanzaron una altura promedio de 6.82 cm (Fig. 2).



Figura 2 Planta cultivada *in vitro* de *Pilosocereus* sp. durante la fase de aclimatización.

Los resultados se le atribuyen al efecto favorable del sustrato en la adaptación de las plantas obtenidas *in vitro* y por otra parte a que las condiciones ambientales en la casa de cultivo fueron propicias para el buen mantenimiento de las plantas.

El uso de un protocolo de propagación *in vitro* en esta especie permite obtener un mayor número de individuos en un periodo de tiempo mucho menor que por vías tradicionales, además, el crecimiento de las plantas es mucho más rápido y con esto se acelera la entrega de las mismas a su hábitat natural con lo que se contribuye a mejorar el estatus poblacional de esta especie que se encuentra en peligro crítico de extinción.

CONCLUSIONES

Las técnicas de cultivo de tejidos son una herramienta alternativa y eficaz de gran importancia para la recuperación de *Pilosocereus* sp amenazada, con lo que se contribuye a enfrentar los crecientes problemas de la pérdida de la biodiversidad que afronta la flora cubana.

REFERENCIAS

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497

Primack, R (2000) A primer of conservation Biology. En: Andrew D Sinauer (Ed) Conservation of the diversity. pp 245-252. Sinauer associates, Inc. Publishers. Massachussets

Primack, R, Rozzi R, Feinsinger P, Dinzo R, Massando F (2001) Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas

latinoamericanas. En: Andrew D Sinauer (ed) Destrucción y degradación del hábitat pp 315-321. Sinauer associates, Inc. Publishers Massachussets

Quiala, E, Montalvo G, De Feria M, Matos J, Mederos R, Chávez M, Capote A, Pérez N (2003) Propagación *in vitro* de dos especies endémicas de Cuba en categoría de amenaza. V Taller Internacional sobre recursos fitogenéticos. FITOGEN'2003. CD ROM. ISBN 959-246-089-2

Escobar, HA, Villalobos A y Villegas MA (1986) *Opuntia amyclaea* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell tissue & Organ Culture.* 7(3): 269-277

Arenas T, Tonatiuh A, Monroy E, Mata R, Martín B, Jiménez A y Chávez G (2003) Regeneración *in vitro* de *Turbincarpus pseudopectinatus*. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.socbot.org.mx/disco/Resumen/temcos1.htm>

Jiménez R, Mata R, Martín C y Chávez A (2003) Regeneración *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.socbot.org.mx/disco/Resumen/re46m>

Sotomayor M y Arredondo, G (2003) Regeneración *in vitro* de *Coryphantha elephantidens*. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.colpos.mx/IRENAT/bot/botind.htm>

Pérez, J (1998) Variación somaclonal. En: Pérez Ponce J (Eds). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. pp 179-191. IBP, Santa Clara

Gómez J, Romero R, Jiménez B y Monroy A (2003) Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus* Hernández & Anderson, especie endémica mexicana en peligro de extinción. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.socbot.org.mx/disco/Resumen/re680m>

Thompson, P A (1980) Orchids from Seed. Royal Botanic Gardens New Wakehurst place. 30 p.