

## Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa*: una especie endémica de Santa Clara (Cuba) en peligro de extinción

Elisa Quiala<sup>1\*</sup>, Grecia Montalvo<sup>2</sup>, Jesús Matos<sup>2</sup>, Reynaldo Mederos<sup>2</sup>, Yelenys Alvarado<sup>1</sup>, Manuel de Feria<sup>1</sup>, Maité Chávez<sup>1</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e-mail: elisa@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Empresa Nacional para la Protección de la Flora y Fauna. Villa Clara. Cuba.

### RESUMEN

Las técnicas de cultivo de tejidos pueden complementarse con otras que se realizan en el cultivo *in situ* y ser aplicadas de forma combinada para dar solución a la extinción de diferentes especies de plantas. *Eugenia squarrosa* (Ekman & Urban) es una especie endémica de Cuba en peligro de extinción, debido a la urbanización que han sufrido sus hábitat naturales, los cuales han sido reducidos a pocas hectáreas. Este trabajo tuvo como objetivo lograr el establecimiento *in vitro* de esta especie, para lo cual se utilizaron semillas y ramas jóvenes colectadas a partir de plantas en su hábitat natural. Se estudió el efecto de tres concentraciones de NaOCl (2.0, 2.5, 3.0%) durante 20 minutos en la desinfección de las semillas. Para este mismo propósito, en el caso de los esquejes, se utilizó un tratamiento previo con alcohol al 70% y se evaluó el efecto de tres concentraciones de NaOCl (1.0, 2.0, 3.0%) durante un tiempo de desinfección de 10 minutos. Se caracterizó además, la microbiota presente en los esquejes contaminados. Se logró el 100% de desinfección de las semillas en todos los tratamientos estudiados. El mayor porcentaje de esquejes libres de contaminantes visibles (88.6%) se obtuvo en el tratamiento donde se utilizó 3% de NaOCl, sin embargo el mayor porcentaje de supervivencia (45.7%) se obtuvo cuando se utilizó 2% de NaOCl. Se logró el establecimiento *in vitro* de la especie a partir de semillas y de brotes colectados de plantas de campo.

Palabras clave: biodiversidad, especie amenazada, micropropagación

### ABSTRACT

The tissue culture techniques can be supplemented with others that are carried out in the cultivation *in situ* and being applied in combined way to give solution to the extinction of different species. *Eugenia squarrosa* (Ekman & Urban) it is an endemic species of Cuba in extinction danger due to the urbanization of their natural habitat, which have been reduced to a few hectares. The aim of this work was to achieve the establishment *in vitro* of this species. Seeds and young branches were collected starting from plants in its natural habitat. The effect of three concentrations of NaOCl (2.0, 2.5, 3.0%) during 20 minutes in the disinfection of the seeds was studied. For the disinfection of the buds a treatment with alcohol to 70% was used during two minutes previously to the disinfection with NaOCl. The effect of three concentrations of this NaOCl was studied (1.0, 2.0, 3.0%) during 10 minutes. The present microbiota was characterized in the contaminated branch. The 100% of disinfection of the seeds was achieved in all the treatments studied. The bigger explants percentage free of contaminant (88.6%) was obtained in the treatment with 3% of NaOCl. However the biggest percentage of survival (45.7%) was obtained when 2.0% of NaOCl was used. The establishment *in vitro* of the species was achieved starting from seeds and buds collected of field plants.

Key Words: biodiversity, micropropagation, threatened species

### INTRODUCCIÓN

La causa más frecuente de la extinción de las especies es la destrucción de sus hábitat naturales (Primack, 2001) seguida por la sobreexplotación de las poblaciones naturales, fundamentalmente en especies ornamentales.

El endemismo de la flora fanerógama cubana (50%) es uno de los más elevados del mundo y en las áreas de serpentinitas (7% del territorio nacional) es donde se concentra el mayor porcentaje de especies

endémicas. Según Borhidi (1983) el 31.2% de los endemismos habitan en estas áreas, conocidas como cuabales. Este tipo de formación vegetal ha sido fuertemente fragmentado en Santa Clara, provincia de Villa Clara, como resultado de la urbanización que ha tenido lugar en diferentes zonas (Ej. Loma de Belén, Los Caneyes y Reparto José Martí).

Existen especies silvestres que viven en este tipo de suelos y cuya propagación por vías tradicionales no es posible, porque la germinación de las semillas en condiciones de naturales es difícil, estas necesitan

suelos específicos y un microclima adecuado, además de que una vez que caen al suelo muchas de ellas son comidas por los insectos y reptiles antes de germinar (Bravo y Scheinvar, 1995). Por otro lado similar situación ocurre en condiciones de vivero donde la germinación de estas semillas es casi nula y en el caso específico de la *Eugenia squarrosa* apenas alcanza el 0.5% según las experiencias de la Empresa Nacional para la protección de la flora y la fauna de Villa Clara.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales pueden ser utilizadas en la conservación de la biodiversidad. Estas pueden complementarse con otras de conservación y ser aplicadas de forma combinada para dar solución a la extinción de diferentes especies, lo cual permite obtener un mayor número de individuos en un período de tiempo relativamente corto.

*Eugenia squarrosa* (Ekman & Urban) puede considerarse potencialmente como productora de metabolitos secundarios de interés farmacológico, ya que a partir de otras especies de *Eugenia*, más conocidas, se extrae el Eugenol, un tipo de alcohol utilizado como componente de la amalgama para los empastes bucales. Por otro lado las especies del género *Eugenia* son familia de la guayaba (*Mirtaceae*) y sus frutos aunque pequeños, son muy dulces y pueden ser utilizados como alimento y materia prima para la confección de vinos. Sin embargo, esta especie endémica de Cuba, se encuentra en peligro de extinción, debido a la urbanización que ha sufrido su hábitat natural que ha sido reducido a pocas hectáreas. El uso de las técnicas de cultivo de tejidos para su propagación pudiera contribuir a que esta problemática pueda revertirse.

Este trabajo tuvo como objetivo establecer *in vitro* la especie *Eugenia squarrosa* a partir de semillas y de esquejes de plantas de campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron semillas y ramas jóvenes colectadas a partir de plantas en su hábitat natural.

### Condiciones generales de cultivo

En todos los experimentos el cultivo se desarrolló en cámaras de luz solar a  $28 \pm 2$  °C de temperatura. Se utilizaron frascos de cristal de 250 ml de capacidad en los cuales se distribuyeron 25 ml de medio de cultivo.

### Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa* a partir de semillas

#### - Desinfección

Se procedió al lavado de las semillas de *Eugenia squarrosa* con agua y detergente comercial. Posteriormente se les eliminó la testa y fueron desinfectadas con tres concentraciones de NaOCl (2.0, 2.5, y 3.0%) y Tween 20. Para la germinación se utilizó un medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales Murashige y Skoog (1962) (MS), 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.l<sup>-1</sup> mioinositol y 10 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa.

Se sembraron cinco semillas por tratamiento. Se evaluó el porcentaje de semillas libres de contaminantes microbianos visibles y el porcentaje de germinación en días alternos hasta los 30 días.



Figura 1. a)- Semillas de *Eugenia squarrosa*, b)- Planta de campo a partir de la cual se tomaron los explantes iniciales.

## **Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa* a partir de esquejes**

### **- Determinación de la micobiota presente en esquejes de campo**

Para la determinación de la micobiota se colocaron explantes (2-3 pares de hojas) sin desinfectar en cámara húmeda a 28°C, así como explantes sin desinfectar y desinfectados con NaOCl al 3% durante 10 minutos en un medio de cultivo con las sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.l<sup>-1</sup> mioinositol, 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y pH=5.8. Las cámaras húmedas se incubaron a 28°C y oscuridad durante 72h y los recipientes de cultivo se colocaron en cámara de crecimiento con luz solar y temperatura de 28 ± 2°C. Aquellos donde se observó la presencia de contaminantes fúngicos fueron examinados.

En ambos casos se realizaron preparaciones microscópicas con lactofenol del crecimiento fúngico presente sobre los esquejes o en el medio de cultivo alrededor de estos y se observaron al microscopio óptico con un aumento de 400x. A partir de sus caracteres culturales y morfológicos, con el auxilio de manuales tradicionales de clasificación se determinaron los géneros presentes.

### **- Desinfección**

Se seleccionaron plantas que fueron podadas y asperjadas con una solución compuesta por 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP. Semanalmente se realizaron dos aspersiones durante cuatro semanas. Transcurrido este tiempo se tomaron brotes jóvenes con dos o tres pares de hojas los cuales fueron lavados con agua y detergente y desinfectados según las variantes siguientes:

1. Alcohol al 70% durante 2 minutos.
2. Alcohol al 70% durante 2 minutos y 10 minutos en NaOCl al 1%.
3. Alcohol al 70% durante 2 minutos, 10 minutos en NaOCl al 2%.
4. Alcohol al 70% durante 2 minutos, 10 minutos en NaOCl al 3%.

Se sembraron cinco explantes por frasco, en un medio de cultivo de establecimiento semisólido compuesto por las sales MS, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.l<sup>-1</sup> mioinositol y 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa 0.6 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP y pH=5.8. Se utilizaron siete réplicas por tratamiento. Se evaluó el porcentaje de explantes libres de contaminantes visibles y el porcentaje de supervivencia a los 15 días.

### **Procesamiento estadístico de los datos experimentales**

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en cada experimento, se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows, aplicándose la prueba de ANOVA simple. Las diferencias entre las

medias estadísticas se determinaron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa* a partir de semillas**

#### **- Desinfección**

Se logró el 100% de semillas libres de contaminantes visibles en todas las variantes estudiadas y no se observaron síntomas de daños en ninguno de ellos, por lo que se consideró utilizar el tratamiento con 2% de NaOCl como el más adecuado para la desinfección de las semillas. Estas comenzaron a germinar a los 14 días y a los 30 días se observó la formación de brotes con hojas opuestas y alternas. Las pequeñas plántulas fueron capaces de desarrollar un sistema radical caracterizado por una raíz principal pivotante larga, sin raíces secundarias (Figura 2). Esta característica es típica de las especies que viven en los cuabales, donde la escasez de agua y el origen serpentinícola del suelo han obligado a estas especies, para poder sobrevivir, a desarrollar un profundo sistema radical que les permita tomar agua desde las profundidades del suelo.

### **Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa* a partir de esquejes**

#### **- Determinación de la micobiota presente en esquejes de campo**

Se observó contaminación fúngica en los esquejes colocados en cámara húmeda (crecimiento micelial blanquecino con hifas finas) sin embargo, no fue posible determinar los géneros presentes por la ausencia de estructuras de reproducción. En aquellos explantes sin desinfectar que se sembraron en medio de cultivo se identificaron los géneros *Fusarium*, *Pestalotia*, *Nigrospora* y *Curvularia*. En los explantes desinfectados con NaOCl se observaron estos mismos géneros de hongos, lo cual evidenció la necesidad de evaluar otros tratamientos para la desinfección de los esquejes ya que el empleado no logró eliminar la micobiota presente.

#### **Desinfección**

En la tabla 1 se puede observar cómo a medida que aumentó la concentración de NaOCl, aumentó significativamente el número de explantes libres de contaminantes visibles, sin embargo no todos los explantes desinfectados fueron capaces de sobrevivir y se afectó significativamente la supervivencia cuando se utilizó NaOCl al 3.0%.

Algunos autores como Leifert *et al.* (1994) destacan que el alcohol ha sido utilizado como pretratamiento

para la desinfección previa con hipoclorito porque se ha demostrado que es capaz de eliminar las ceras de los tejidos y facilita la mejor acción del NaOCl.

Aunque el porcentaje de supervivencia alcanzado fue solo del 45.7%, los explantes establecidos (Figura 3a) fueron capaces de emitir nuevos brotes como se observa en la figura 3b.



Figura 2. Semilla germinada *in vitro* de *Eugenia squarrosa* (30 días de cultivo).

Tabla 1. Porcentaje de explantes desinfectados y de supervivencia durante la fase de establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa* a los 15 días de cultivo.

Tratamiento	Explantes libres de contaminantes/frasco	%	Supervivencia	%
Alcohol al 70% durante 2 minutos	0.14d	2.80	0.14d	2.80
Alcohol al 70% durante 2 minutos y 10 minutos en NaOCl al 1%	0.72c	14.2	0.72c	14.2
Alcohol al 70% durante 2 minutos, 10 minutos en NaOCl al 2%	3.85b	77.4	2.28a	45.7
Alcohol al 70% durante 2 minutos, 10 minutos en NaOCl al 3%	4.42a	88.6	1.43b	28.6
$\pm$ EE	$\pm$ 0.25		$\pm$ 0.32	

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

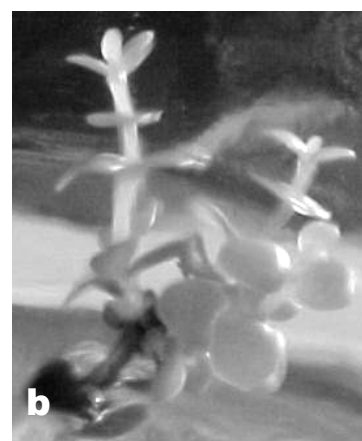


Figura 3. a)-Explante de *Eugenia squarrosa* establecido *in vitro* a partir de esquejes de campo (10 días), b)- Explante a los 30 días.

## CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento *in vitro* de la especie *Eugenia squarrosa* tanto a partir de semillas como de esquejes procedentes de plantas de campo. Estos resultados son alentadores si se tiene en cuenta que la germinación de esta especie en condiciones de vivero es nula, por lo que la inclusión de la misma en los programas de restauración llevados a cabo por la Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna se han visto hasta hoy limitados por la no disponibilidad de nuevos ejemplares para la restauración.

## REFERENCIAS

- Borhidi A, Muñiz O (1983) New name and species in the Flora of Cuba and Antilles III. Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 29(1-4): 181-215
- Bravo H, Scheinvar L (1995) El interesante mundo de las cactáceas. En: Bravo H y Scheinvar L (Eds) Estilo de vida de las cactáceas, pp 30-35. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo de Cultura Económica, México
- Jiménez E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez Ponce, J (Eds) Propagación y mejora de plantas por biotecnología, pp. 45-56. IBP, Santa Clara
- Leifert C, Morris C, Waites E (1994) Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in tissue culture and Field-Grown Plants: Reasons for contamination problem *in vitro*. Critical review. Plant Science 1: 139-183
- 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: Sinauer associates (Eds) Conservation of the diversity. Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts
- Primack R, Rozzi R, Feinsinger P, Dinzo R, Massando F (2001) Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas. En: Sinauer Associates (Eds) Destrucción y degradación del hábitat. Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts