

Establecimiento *in vitro* de *Erythroxylum echinodendron*

Elisa Quijala^{1*}, Grecia Montalvo², Jesús Matos², Manuel de Feria¹, Reynaldo Mederos², Maité Chávez¹. * Autor para correspondencia.

¹Instituto 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: equiala05@yahoo.es

²Empresa Nacional para la Protección de la Flora y Fauna. Villa Clara. Cuba.

RESUMEN

En las áreas de serpentinitas viven especies silvestres cuya propagación por vías tradicionales es poco factible, porque presentan problemas en la germinación de las semillas en condiciones de vivero. El objetivo principal de este trabajo fue lograr el establecimiento *in vitro* de *Erythroxylum echinodendron*, para contribuir a incrementar el número de posturas disponibles para la restauración en la unidad administrativa "El Recreo" perteneciente al área protegida Cubanacán, en Santa Clara, Cuba. Para el establecimiento de las semillas se estudió el efecto de una solución de Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.0% durante diferentes tiempos de desinfección (15, 20, 25 min.). Se sembraron semillas enteras y semillas a las cuales se les retiró el pericarpio y el endospermo y se sembró solamente el embrión cigótico con el saco embrionario en el medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales MS complementado con 2.0% de sacarosa. El mayor porcentaje de semillas libres de contaminantes microbianos visibles (60%) se obtuvo cuando se utilizó el tratamiento con 2.0% de NaOCl durante 25 minutos. El menor tiempo de germinación, así como el mayor porcentaje de semillas germinadas (80.7%) se logró cuando se sembró el saco embrionario con el embrión cigótico en el medio de cultivo.

Palabras clave: cultivo de tejidos, especie amenazada, conservación de biodiversidad, cuabal, especie endémica

ABSTRACT

In the areas of serpentines live wild species whose propagation for traditional roads is not possible because they present problems in the germination of the seeds under nursery conditions. The main objective of this work was to achieve the establishment *in vitro* of *Erythroxylum echinodendron*, in order to increase the number of available postures for the restoration in the administrative unit "El Recreo" located in the protected area Cubanacán. For the *in vitro* establishment of the seeds the effect of a Sodium Hypochlorite solution (2.0% NaOCl) during different times of disinfection (15, 20, 25 min.) was studied. Whole seeds and seeds which the embryonic sack with embryo inside (the pericarp and the endosperm were moved away) were sowed in the culture medium composed by 50% of the MS salts and 2.0% of sucrose. The bigger percentage of seeds free of microbial pollutants (60%) was achieved when the treatment with 2.0% of NaOCL during 25 minutes was used. The biggest percentage of germinated seeds (80.7%) was achieved when the embryonic sack with the embryo inside was sowed in the culture medium.

Key words: Tissue culture, threatened species, biodiversity conservation, cuabal, endemic species

INTRODUCCIÓN

Erythroxylum echinodendron es un endémico local de Santa Clara, Villa Clara, esta especie es familia de la coca (*Erythroxylum coca*), planta de conocida importancia farmacológica y de la especie *Erythroxylum dumosa* a partir de la cual se han detectado y extraído compuestos químicos con actividad antiviral. *Erythroxylum echinodendron* se encuentra en peligro de extinción producto a la fragmentación de su hábitat natural provocada por la acción del hombre durante la urbanización. El restringido hábitat natural de la especie sumado a la baja o casi nula (2.0%) germinación de las semillas en condiciones de vivero ha dificultado los programas de restauración y conservación de la especie.

Las técnicas de cultivo de tejidos resultan atractivas para la propagación de esta especie, debido a las altas tasas de multiplicación que se pueden obtener y al reducido material vegetal de partida requerido. Las mismas han sido utilizadas de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos en la agricultura. De igual manera han sido adaptadas para su utilización en un amplio número de especies silvestres con problemas de propagación por métodos convencionales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Fay, 1999; Iriondo, 2001).

Teniendo en cuenta que se disponía de un número reducido de semillas de *Erythroxylum echinodendron* fue que se decidió utilizar el cultivo de tejidos para propagar esta especie. El objetivo principal de este

trabajo fue lograr el establecimiento *in vitro* de esta especie, para contribuir a incrementar el número de posturas disponibles para la restauración ecológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron semillas de frutos maduros de plantas adultas cultivadas en el cuabal de la zona turística "Los Caneyes" de Santa Clara.

Condiciones 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 $125 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$. El pH del medio de cultivo siempre se ajustó a 5.6 previo a la esterilización. Los medios de cultivo semisólidos fueron gelificados con $2.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 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 tubos de ensayos de vidrio con 10 ml de medio de cultivo.

Desinfección

La desinfección de semillas se realizó con una solución de hipoclorito de sodio al 2.0% durante 15, 20 y 25 minutos, a esta solución se añadieron dos gotas de Tween 20. Transcurrido el tiempo de desinfección las semillas fueron sembradas en un medio de cultivo de germinación que contenía el 50% de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y 3.0% de sacarosa.

Se utilizaron 10 semillas por tratamiento y a los siete días se evaluó el número de semillas libres de contaminantes microbianos visibles y se calculó el porcentaje.

Germinación

Se colocaron en un tratamiento las semillas enteras sobre el medio de cultivo y otro tratamiento donde con la ayuda de un microscopio estereoscópico se le quitó el pericarpio y el endospermo a la semilla y se sembró el saco embrionario con el embrión en un medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales MS complementado con 3.0% de sacarosa. Se utilizaron 12 semillas, de ellas seis para cada tratamiento. Se evaluó el número de semillas germinadas en días alternos a partir del tercer día de cultivo y se calculó el porcentaje de germinación.

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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección

La efectividad del NaOCl en la desinfección de las semillas aumentó a medida que se incrementó el tiempo de desinfección, el mayor porcentaje de semillas desinfectadas se alcanzó cuando se utilizó el 2.0% de NaOCl durante 25 minutos (Fig. 1).

Estos resultados concuerdan con Pérez (1998) quién planteó que el hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes superficiales más utilizados en el cultivo *in vitro* y se emplea en concentraciones de 1.0 a 3.0% en tiempos de 10 a 20 minutos. Su efectividad aumenta si se adiciona algún agente humectante como Tween 20 (Thompson, 1980).

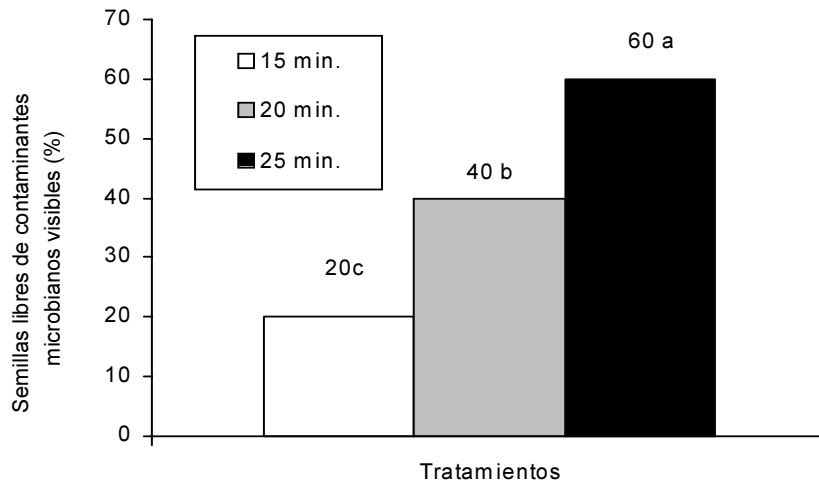
Germinación

Las semillas en el tratamiento donde se retiró el pericarpio y se sembró el saco embrionario con el embrión cigótico, lograron germinar a los 12 días de cultivo y en un mayor porcentaje de germinación, que las semillas que fueron sembradas enteras en el medio de cultivo, las cuales comenzaron a germinar a los cuatro meses y el porcentaje alcanzado fue muy bajo (Fig. 2).

Quiala *et al.* (2004) señalaron que durante el establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa*, una especie endémica de Santa Clara en peligro de extinción y que crece sobre serpentina, un mayor porcentaje de germinación *in vitro* cuando les fue retirada la cubierta de la semilla.

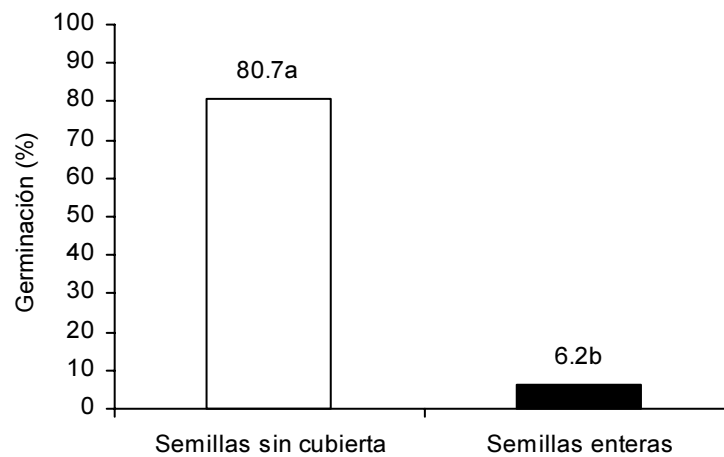
Teniendo en cuenta que el porcentaje de germinación de las semillas a las cuales se les retiró la cubierta externa fue muy alto y que se puede disponer de gran cantidad de semillas en la época de fructificación de esta especie se consideró innecesario multiplicar masivamente el material vegetal, por lo que las plantas obtenidas de las semillas germinadas después de 30 días (Fig. 3) pueden ser transferidas a la fase de aclimatización para su adaptación a las condiciones *in vivo*.

Las semillas botánicas contienen un pericarpio por lo general duro, que protege al mesocarpo, al endocarpo y al embrión pero en algunas semillas esta cubierta llega a ser tan dura que constituye una barrera mecánica e impide al embrión cigótico germinar fácilmente, es por ello que resulta beneficioso para el establecimiento *in vitro* de estas semillas retirar esta cubierta (Iriondo, 2001).



*Medias con letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey.

Figura 1 Efecto del tiempo de desinfección con 2.0% de hipoclorito de sodio durante el establecimiento *in vitro* de *E. echinodendron*.



*Medias con letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey.

Figura 2 Efecto de la eliminación del pericarpio de las semillas de *E. echinodendron* sobre el porcentaje de germinación *in vitro*.

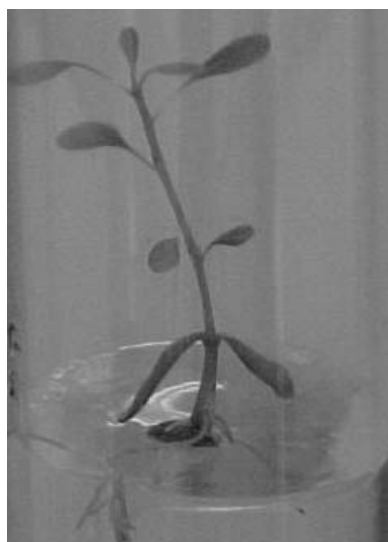


Figura 3. Planta de *E. echinodendron* obtenida en el tratamiento donde se sembró el saco embrionario con el embrión en el medio de cultivo después de 30 días de cultivo posterior a la germinación.

CONCLUSIONES

Es posible germinar *in vitro* semillas de *Erythroxylum echinodendron*, lo que acorta el tiempo en que ocurre este proceso con respecto a la germinación en condiciones de vivero. La germinación bajo condiciones *in vitro* tiene lugar a partir de los 12 días de cultivo, mientras que bajo condiciones de vivero este evento puede durar años. Por otro lado a través de la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos es posible retirar la cubierta de la semilla y con ello aumentar por encima del 80% el porcentaje de germinación de las mismas.

REFERENCIAS

- Fay, M F, Bunn E, Ramsay M (1999) *In vitro* Propagation. En: Bowes, BG (ed.) A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation, pp. 97-107. Manson Publishing, London
- Iriondo, J M (2001) Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Israel Journal of Plant Sciences 44: 115-123
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497
- Pérez, J (1998) Variación somaclonal. En: Pérez Ponce, J (Eds) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. IBP, pp 179-191, Santa Clara
- Quijala, E, Montalvo G, Matos J, Mederos R, De Fera M, Chávez M, Capote A, Pérez N (2004) Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa*: una especie endémica de Santa Clara (Cuba) en peligro de extinción. Biotecnología vegetal 4 (1): 49-53