

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Guettarda clarensis*, especie endémica de Cuba en peligro de extinción

Elisa Quiala^{1*}, Grecia Montalvo², Jesús Matos², Maité Chávez¹, Manuel de Feria¹, Reinaldo Mederos². *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: elisa05@ibp.co.cu, equiala05@yahoo.es

²Área protegida "Sabana de Santa Clara". Empresa Nacional para la protección de Flora y Fauna. Santa Clara. Cuba.

RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de establecer y multiplicar *in vitro* la especie *Guettarda clarensis*, la cual es endémica local de Santa Clara y está considerada en peligro de extinción. Se utilizaron semillas de frutos maduros colectados a partir de plantas cultivadas en condiciones de hábitat natural. Se estudió el efecto de una concentración de NaOCl (2%) durante 15, 20 y 25 minutos en la desinfección de las semillas. Las mismas fueron sembradas en un medio de cultivo de germinación compuesto por el 50% de las sales MS. Durante la fase de multiplicación de los explantes se estudió el efecto de tres concentraciones de 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg. l⁻¹). El medio de cultivo estuvo compuesto, además, por las sales MS, 1.0 mg. l⁻¹ de tiamina y 3% de sacarosa. El mayor número de semillas libres de contaminantes microbianos visibles (50%) se obtuvo cuando se utilizó el tratamiento con 2.0% de NaOCl durante 25 minutos. El 85% de las semillas germinaron en un medio de cultivo con el 50% de las sales MS sin reguladores del crecimiento. Durante la fase de multiplicación de los explantes, el coeficiente de multiplicación y la longitud de las plantas se incrementaron en la misma medida en que aumentó la concentración de 6-BAP, los valores más altos se obtuvieron (6.1 explantes y 6.7 cm respectivamente) en el tratamiento con 0.6 mg. l⁻¹.

Palabras clave: cuabal, cultivo *in vitro*, especie amenazada, micropropagación

ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of achieving the *in vitro* establishment and multiplication of *Guettarda clarensis* which is an endemic local of Santa Clara city and it is considered in extinction danger. Seeds of mature fruits collected under field conditions were used. The effect of a concentration of NaOCl (2%) during 15, 20 and 25 minutes in the disinfection of the seeds was studied. The seeds were sowed in a culture medium of germination compound by 50% of MS salts. During the multiplication phase of the explants, the effect of three concentrations of 6-BAP (0.2, 0.4 and 0.6 mg. l⁻¹) was studied. The culture medium was compound by the MS salts, 1.0 mg. l⁻¹ of thiamine and 3% of sucrose. The bigger number of seeds free of visible microbial pollutants (50%) was obtained when the treatment with 2.0% of NaOCl during 25 minutes was used. The 85% of the seeds germinated in the culture medium compound by the 50% of the MS salts without growth regulators. During the multiplication phase of the explants, the multiplication coefficient and the longitude of the plants were increased in the same proportion as the concentration of 6-BAP was increased. The highest values were obtained (6.1 explants and 6.7 cm respectively) in the treatment with 0.6 mg. l⁻¹.

Key words: cuabal, *in vitro* culture, micropropagation, threatened species

INTRODUCCIÓN

Guettarda clarensis es un arbusto silvestre endémico de los cuabales de Santa Clara, Villa Clara, Cuba, que pertenece a la familia de las Rubiáceas. Morfológicamente se distingue por presentar hojas coriáceas y pequeñas, lo cual le permite vivir en los suelos del cuabal que son secos y pobres. El hábitat natural de esta especie ha sido fuertemente fragmentado debido a la urbanización (UCIN, 2004) y el porcentaje de germinación de las semillas en condiciones de vivero es menor del 3%. Por otro lado, las semillas que logran germinar lo hacen entre 12 y 18 meses después de la siembra (Berzaín, 1986). Todo esto atenta contra la posibilidad de disponer rápidamente de individuos para la restauración ecológica.

Se han desarrollado diversidad de métodos para la propagación de plantas de interés agrícola, por lo que

la baja germinación de la semilla de estas especies no constituye un factor importante para la supervivencia de las mismas. Sin embargo, en las especies silvestres esto puede constituir una grave limitación para su supervivencia (Iriondo y Pérez, 1999).

Si la germinación de las semillas es baja cuando se utilizan métodos convencionales, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorarla. Además, cuando la disponibilidad de semillas es escasa, situación común en muchas especies silvestres amenazadas, a la germinación *in vitro* le sucede una etapa de multiplicación para producir un mayor número de plantas (Feijóo *et al.*, 2000).

El objetivo de este trabajo fue establecer y multiplicar *in vitro* la especie *Guettarda clarensis*, para contribuir a incrementar el número de posturas disponibles para la restauración ecológica en los cuabales del Área Protegida "El Recreo" en Villa Clara.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron semillas de *Guettarda clarensis* procedentes de plantas en condiciones de hábitat natural. Se procedió al raspado de las semillas y se dejó al descubierto la zona de los arilos. Se realizó un lavado con agua y detergente previo a la desinfección con NaOCl.

Condiciones generales

Las semillas se mantuvieron en cámara de crecimiento con luz solar a una temperatura de $26 \pm 2.0^\circ\text{C}$ y una intensidad luminosa de aproximadamente 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 etapa. El pH 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 frascos de vidrio de 250 ml con 25 ml de medio de cultivo.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó con el programa STATGRAPHIC PLUS 4.1. Se realizó un análisis de varianza simple para cada experimento, se empleó 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.

Establecimiento *in vitro*

Efecto del Hipoclorito de sodio (NaOCl) en la desinfección de las semillas

Se estudió el efecto del NaOCl al 2.0% durante 15, 20 y 25 minutos sobre el número de semillas desinfectadas. Se utilizaron 22 semillas por tratamiento, las cuales fueron sembradas en un medio de cultivo de germinación compuesto por el 50% de las sales MS (Murashigie y Skoog, 1969) y 2.0% de sacarosa.

Se evaluó el número de semillas libres de contaminantes microbianos visibles a los 10 días de cultivo y a los 20 días el número de semillas germinadas. Se calculó el porcentaje para cada parámetro evaluado.

Multiplicación

Efecto del 6-BAP en la multiplicación de los brotes

Se utilizó un medio de cultivo compuesto por el 100% de las sales MS, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de tiamina y $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de sacarosa complementado con tres concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (0.2 , 0.4 y $0.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). El subcultivo de los explantes se realizó cada 28 días durante ocho semanas. Se procedió a separar los nuevos brotes del explante madre cuando estos tenían

un tamaño menor de 2 cm aproximadamente. Los tallos de los explantes mayores de 2 cm, incluido el explante madre, fueron seccionados verticalmente en explantes con dos pares de hojas y sembrados, al igual que los ápices en un medio de cultivo de multiplicación.

Se utilizaron cinco explantes por frasco con seis réplicas por tratamientos. Se cuantificó el número de brotes y se determinó el coeficiente de multiplicación a través de la suma del número de explantes finales con dos pares de hojas y los ápices que se dividió entre el número de explantes iniciales. Se midió la altura de las plantas, la cual fue expresada en cm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro*

Efecto del Hipoclorito de sodio (NaOCl) en la desinfección de las semillas

Los resultados obtenidos mostraron que hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. El mayor número de semillas libres de contaminantes microbianos visibles se obtuvo cuando se utilizó el tratamiento con 2.0% de NaOCl durante 25 minutos (Fig. 1).

Autores como Quiala *et al.* (2004a) destacaron que durante el establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa*, otra especie endémica local de los cuabales de Santa Clara en peligro de extinción, el empleo de una solución de NaOCl al 2.0% durante 20 minutos fue suficiente para el establecimiento del 100% de las semillas.

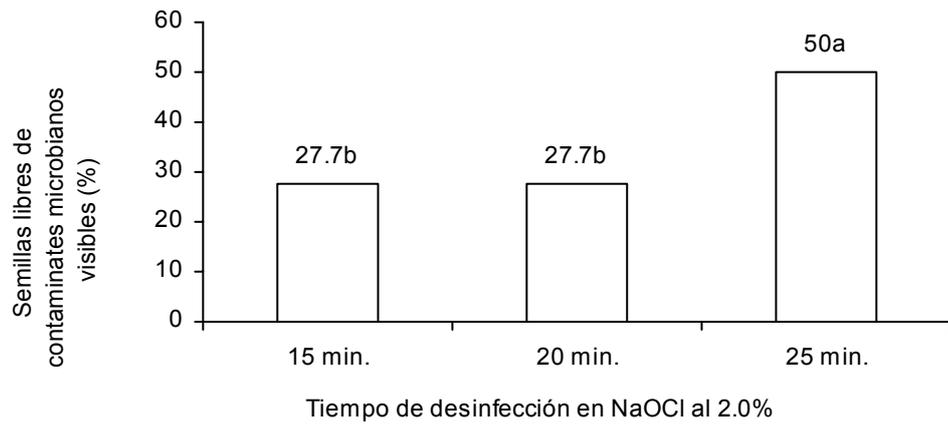
El 85% de las semillas de *Guettarda clarensis* establecidas *in vitro* fueron capaces de germinar a los siete días de cultivo y las plantas obtenidas *in vitro* a partir de estas, desarrollaron una planta completa en 21 días de cultivo (Fig. 2).

Multiplicación

Efecto del 6-BAP en la multiplicación de los brotes

La multiplicación de los explantes se favoreció con el empleo del 6-BAP. En la misma medida en que se aumentó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo el coeficiente de multiplicación también se incrementó (Fig. 3), el mayor valor se alcanzó cuando se emplearon $0.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 6-BAP (Tabla 1).

Autores como Rodríguez *et al.* (2003), refirieron que durante la multiplicación y elongación de brotes de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahagani* procedentes de semillas germinadas *in vitro*, el empleo de bajas concentraciones de 6-BAP fue más efectivo que cuando se utilizaron concentraciones por encima de $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de este regulador del crecimiento.



*Medias con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Tukey.

Figura 1. Efecto del tiempo de desinfección en NaOCl al 2.0% durante el establecimiento *in vitro* de las semillas de *Guettarda clarensis* (10 días de cultivo).

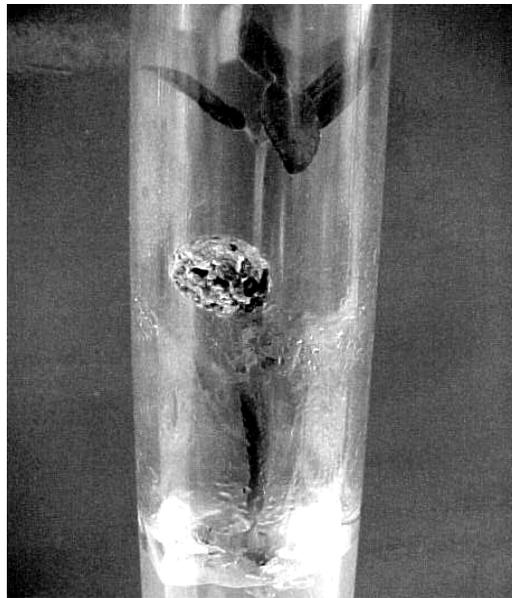


Figura 2. Planta obtenida *in vitro* a partir de semilla germinada de *Guettarda clarensis* después de 21 días de cultivo.



Figura 3. Explante de *Guettarda clarensis* en fase de multiplicación (tratamiento con 0.6 mg. l^{-1} de 6-BAP) después de 21 días de cultivo.

Tabla 1. Efecto de la concentración de 6-BAP en la multiplicación de brotes de *Guettarda clarense*.

Concentración de 6-BAP (mg. l ⁻¹)	Coefficiente de multiplicación	Altura de las plantas (cm)
0	-	-
0.2	2.9 b	3.4 c
0.4	3.4 b	4.8 b
0.6	6.1a	6.7 a
CV±EE	18±0.71	21±0.27

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

Vásquez y Torres (1995) destacaron que para que ocurra la formación de brotes debe existir un adecuado balance endógeno de reguladores del crecimiento, el cual es alcanzado de forma natural en la planta. Sin embargo, cuando se aíslan tejidos para multiplicarlos en condiciones artificiales, como ocurre en el cultivo *in vitro*, la acción exógena de reguladores del crecimiento y preferentemente citoquininas es imprescindible.

Se pudo apreciar que la altura de las plantas mostró un comportamiento similar a la variable número de brotes. El crecimiento de las mismas se observó en todas las concentraciones empleadas y el mismo se favoreció a medida que aumentó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo, el mayor valor se obtuvo en el tratamiento con 0.6 mg. l⁻¹ (Tabla 1).

El lograr la multiplicación de esta especie con el uso de bajas concentraciones de reguladores del crecimiento es uno de los resultados más importante de este trabajo, ya que para las especies amenazadas se debe garantizar al máximo la estabilidad genética en las plantas que se obtengan mediante la micropropagación. El empleo de medios de cultivos simples puede ayudar a disminuir las probabilidades de variabilidad genética.

En trabajos anteriores Quiala *et al.* (2004b) destacaron que cuando se trabaja con especies amenazadas se debe lograr una manipulación adecuada del material vegetal, emplear reguladores del crecimiento específicos que no sean propensos a provocar mutagénesis, así como el uso de los mismos en la cantidad adecuada unido a la reducción, al mínimo posible, del número de subcultivo del material vegetal *in vitro*, entre otros factores.

CONCLUSIONES

Las técnicas de cultivo de tejidos pudieron ser aplicadas satisfactoriamente para el establecimiento y multiplicación de *Guettarda clarense*. Se utilizó el 6-BAP, aunque en bajas concentraciones durante dos subcultivos, para la multiplicación de los brotes. El cultivo de tejidos aplicado de forma sabia y adecuada

facilita los programas de producción de posturas de especies amenazadas, lo cual se revierte en una aceleración de los programas de restauración ecológica.

AGRADECIMIENTOS

A la Unión Internacional de Universidades de América Latina (UDUAL) por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

- Berazaín, R (1986) Algunos aspectos fitogeográficos de plantas serpentinícolas cubanas. Feddes. Repert. 97(1-2): 49-58
- Feijóo, M C, Iglesias I, Rodríguez-Oubiña, J (2000) Contribution to the conservation studies of *Leucanthemum Gallaecicum*. Portugaleae Acta Biol. 19: 113-119
- Iriondo, J M, Pérez C (1999) Propagation from Seeds and Seed Preservation En: Bowes B G (Ed) A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation. pp. 46-57. Manson Publishing, London
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497
- Quiala, E, Montalvo G, Matos J, Mederos R, De Fera M, Chávez M, Capote A, Pérez N (2004a) Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa*: una especie endémica de Santa Clara (Cuba) en peligro de extinción. Biotecnología Vegetal 4 (1) 49-53
- Quiala, E, Montalvo G, Matos J (2004b) Empleo de la Biotecnología Vegetal para la propagación de especies cactáceas amenazadas. Biotecnología Vegetal 44 (4) 195-199
- Pérez, J, Jiménez, E, Agramonte, D (1998a) Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Pérez Ponce, J (Eds). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp 179-191. IBP, Santa Clara
- Rodríguez, R, Daquinta M, Capote I, Pina D, Lescano Y, González-Olmedo J (2003) Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahagani* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). Cultivos Tropicales 24: 23-27
- UICN (1994) Categoría de las Listas Rojas de la UICN. Preparada por la Comisión de Supervivencia de especies de la UICN. Gland, Suiza
- Vásquez, E, Torres, S (1995) Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. Segunda edición. Ciudad de la Habana