
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *ESCOBARIA CUBENSIS* (BRITTON & ROSE) HUNTS

Propagation *in vitro* of *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Luis Enrique Rodríguez de Francisco
Marcos A. Daquinta
Elena Fornet Hernández
Rayma Cantillo Ardeból
Josefina Vásquez

Resumen: *Escobaria cubensis*, comúnmente denominado “cactus enano de Holguín” es un cactus endémico de la provincia de Holguín, que se encuentra amenazado por la actividad antrópica. Este es el objeto de la presente investigación y se hace con el fin de establecer la metodología para la propagación *in vitro* de *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts, a través de la inducción de brotes vía organogénesis a partir de plántulas germinadas *in vitro* y de areolas, provenientes de mamilas. Se emplearon semillas colectadas en la localidad de Purnio, en el municipio de Holguín. Se logró una desinfección de las semillas botánicas con hipoclorito de sodio (2%) en inmersión doble durante cinco minutos, y de las areolas durante cinco minutos en bicloruro de mercurio (0.2%). Así como su posterior siembra en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa (30 g.L⁻¹). Se obtuvo un 95.64% de germinación en medio de cultivo MS (25%), se logró además un 66.67% de supervivencia en las mamilas. En la multiplicación se evaluó diferentes concentraciones de Benzilaminopurina y se determinó que el mejor resultado, con 5.1 brotes por explante, fue el medio que contenía

13.3 μM Benzilaminopurina + 5.4 μM ácido naftalenacético. A partir del cuarto subcultivo, el número de brotes por explante disminuye. En la fase de enrizamiento se empleó el medio basal MS con 8.1 μM ácido naftalenacético + 2.5 μM ácido indolbutírico, obteniendo como promedio 2.5 raíces por planta de cultivo; en la aclimatización se empleó el sustrato Zeolita + Lecho de Bambú + Suelo y se obtuvo un 93.5% de supervivencia.

Palabras claves: antrópica, mamilas, areolas, cactus enano.

Abstract: *Escobaria cubensis*, commonly called “dwarf cactus Holguín” is a cactus native to the province of Holguín, which is threatened by human activity. This research was developed in order to establish the methodology for in vitro propagation of *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts, through induction of shoots via organogenesis from in vitro germinated seedlings and areolas, from nipples. Seeds collected were used in the town of Purnio, in the municipality of Holguín, and achieved botanical seed disinfection with sodium hypochlorite (2%) in double dipping for five minutes, and five minutes areolas dichloride mercury (0.2%). And subsequent seeding MS medium supplemented with sucrose (30 g L⁻¹). Was obtained in 95.64% germination MS culture medium (25%) was obtained also a 66.67% survival in the nipples. In multiplication was evaluated different concentrations of benzylaminopurine and determined that the best result, with 5.1 shoots per explant was the medium that contained 13.3 + 5.4 μM μM benzylaminopurine and naphthaleneacetic acid. From the fourth subculture, the number of shoots per explant decreased. In rooting phase was used MS basal medium with 8.1 mM naphthaleneacetic acid + 2.5 mM indole butyric acid obtained, on average 2.5 roots per plant cultivation and acclimatization substrate was used Zeolite + Soil + Bedding Bamboo Flooring and obtained a 93.5% survival.

Keywords: anthropogenic, nipples, areolas, dwarf cactus.

Introducción

La diversidad vegetal de Cuba es impresionante. Por un lado, el número de plantas vasculares alcanza unas 7,020 especies, de estas aproximadamente 6,000 son plantas con flores, con un 50% de endemismo. La vegetación exhibe cerca de 30 tipos distintos de formaciones vegetales (Vales, *et al.*, 1998). Por lo que hace que el archipiélago cubano se incluya en una de las zonas claves (*hot spot* o manchas calientes) de biodiversidad en el planeta (Mitterermeier *et al.*, 1999).

Escobaria cubensis (Britton & Rose) Hunts, comúnmente llamado “el cactus enano de Holguín”, es una cactácea endémica local, se encuentra localizado en las Cejas, municipio Rafael Freyre y en Matamoros (Purnio), municipio de Holguín.

El hábitat natural de esta especie ha sido alterado principalmente por factores antrópicos, como la acción depredadora de coleccionistas, incendios, reforestación inadecuada, construcción de trincheras y túneles, además de disminuir la cantidad de ejemplares en la naturaleza, lo que conlleva una rápida pérdida de la variabilidad genética de la especie.

La propagación por semillas se dificulta dado que esta especie presenta una baja tasa de germinación y las poblaciones con individuos adultos es muy baja, lo que trae consigo una pobre propagación por métodos tradicionales. Se hace necesario recurrir a métodos más adecuados, como la micropropagación, para lograr un mayor número de individuos.

La micropropagación es una técnica viable en varias cactáceas (Johnson y Emino, 1979; Ault y Blackmon, 1987; Chávez *et al.*, 2001), por lo que esta podría ser una técnica útil para disminuir los problemas de repropagación y conservación de *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts.

Es por ello que esta investigación ha estado encaminada a obtener un protocolo de propagación *in vitro* de *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts.

Materiales y métodos

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Se emplearon semillas y plantas colectadas en la localidad de Matamoros (Purnio), municipio de Holguín, las semillas se lavaron con abundante agua y detergente y luego se secaron al aire y a la sombra; se mantuvieron a 4°C, hasta el momento de su siembra en el laboratorio y las plantas se sembraron en casa de vegetación, cubierta con zaram (50% sombra).

El instrumental utilizado en el manejo del material vegetal se esterilizó en estufa a 180°C durante 150 minutos, las operaciones de inoculación y transferencia se realizaron en una cabina de flujo laminar horizontal, donde se trabajó con una solución de Hipoclorito de Sodio al 0.1% para el tratamiento de las pinzas y bisturís.

Como medio basal empleado en todos los experimentos fue el planteado por Murashige y Skoog en 1962, suplementado con 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ Agar. Todos fueron ajustados con NaOH (m/v) y HCl (v/v) a una concentración de 1.0 N, a pH = 5.8, previa esterilización en autoclave a 1.2 Kg.cm⁻², durante 15 minutos a 121°C. El volumen de medio empleado fue de 25 mL en frasco de 250 mL. Los medios de cultivo se mantuvieron en reposo durante 72 hrs. antes de la inoculación del material.

El material vegetal se incubó en una cámara de luz artificial con lámparas fluorescentes reguladas automáticamente para el control del fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de 3000 lux (37.5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y una temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete SPSS, versión 11.0 para Windows (Copyright© SPSS Inc., 1998), y para la graficación de los resultados el Microsoft Excel 2000. De cumplirse estos supuestos, se utilizaron las pruebas paramétricas de Análisis de Varianza (ANOVA) y Tukey HSD. En el caso en que lo datos los requirieron se empleó el ANOVA Factorial.

FASE DE ESTABLECIMIENTO

Empleo del agente desinfectante y tipo de desinfección en semillas botánicas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Las semillas se lavaron con detergente comercial y abundante agua. Posteriormente se les realizó la desinfección (tabla N.º 1) y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril bajo condiciones asépticas y se implantaron en medio de cultivo basal MS (1962). Se estableció un tratamiento testigo sin tratar bajo las mismas condiciones.

Tabla N.º 1

Tratamientos con Hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones, evaluados para la desinfección de semillas botánicas de cactus enano

| Tratamientos a las semillas | Tipo de Desinfección | Concentración (%) | Tiempo de Exposición |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| 1 | Simple | 0 | 5 min (agua estéril) |
| 2 | | 1 | 5 min |
| 3 | | 2 | 5 min |
| 4 | Doble | 0 | 5 min (agua estéril) |
| 5 | | 1 | 5 min |
| 6 | | 2 | 5 min |

Se utilizaron 30 repeticiones por tratamientos y a los 21 días, se evaluaron variables tales como contaminación: para los hongos se evaluó a través de la presencia de micelio, en el caso de las bacterias a través de los exudados presentes en el explante o en la base de este; en la germinación se evaluó el porcentaje de semillas no contaminadas que germinaron.

Empleo del agente desinfectante y tipo de desinfección en las mamilas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Se emplearon mamilas de cactus enano, que fueron colectadas en la localidad de Matamoros (Purnio), municipio de Holguín, y luego sembradas en casa de vegetación 30 días antes de cortar los explantes.

Previo a los tratamientos de esterilización superficial se tomaron las plantas completas y se lavaron con abundante agua y detergente, se cepillaron ligeramente para eliminar restos del sustrato y algún otro elemento que pudiera entorpecer los tratamientos de desinfección. A continuación se les extrajeron las mamilas y se colocaron en una solución antioxidante que contiene 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico.

Tabla N.º 2

Tratamientos con Hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones, empleados para la desinfección de mamilas de cactus enano

| Tratamientos a las mamilas | Tipo de Desinfección | Concentración (% v/v) | Tiempo de Exposición |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1 | Simple | 0 | 15 min (agua estéril) |
| 2 | | 1 | 15 min |
| 3 | | 2 | 15 min |
| 4 | Doble | 0 | 15 min (agua estéril) |
| 5 | | 1 | 15 min |
| 6 | | 2 | 15 min |

Efecto de los tratamientos de desinfección con Biclورو de mercurio (% m/v), empleada en la desinfección de mamilas de cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Previo a los tratamientos de esterilización superficial se tomaron las plantas completas y se lavaron con abundante agua y detergente, se cepillaron ligeramente para eliminar restos del sustrato y algún otro elemento que pudiera entorpecer los tratamientos de desinfección. A continuación se les extrajeron las mamilas y se colocaron en una solución antioxidante que contiene 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, luego se siguió un procedimiento con bicloruro de mercurio (tabla N.º 3). Luego se extrajeron las areolas, donde fue necesario recortar las espinas en la zona donde se encontraban.

Tabla N.º 3
Tratamientos de desinfección con Biclورو de mercurio a diferentes concentraciones, comparados con el mejor tratamiento del experimento 3.1.2, utilizados para las mamilas de cactus enano

| Tratamientos a las mamilas | Concentración (% m/v) | Tiempo de Exposición |
|----------------------------|--|----------------------|
| 1 | 0.1% | 5 minutos |
| 2 | 0.2% | 5 minutos |
| 3 | Desinfección doble con Hipoclorito de sodio 2.0% | 15 minutos |

Se realizaron 30 repeticiones y a los 21 días se evaluaron variables tales como contaminación: en el caso de los hongos se evaluó a través de la presencia de micelio, en el caso de las bacterias a través de los exudados presentes en el explante o en la base de este y en el caso de la supervivencia, se evaluó contaminación y supervivencia.

Efecto del medio de cultivo en la germinación de semillas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Se utilizaron cinco sustratos para evaluar la germinación de las semillas del cactus enano: **In vivo** (suelo ferralítico, proveniente del cuabal original donde habita esta especie, fue esterilizado por autoclave y colocado en frascos de cultivo de 250 mL de capacidad). **Cámara húmeda** (papel de filtro colocado en frascos de 250 mL de capacidad, humedecidos diariamente con agua destilada estéril). **Agar-Agua** (medio de cultivo elaborado con agua destilada, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7.0 g.L⁻¹ Agar). **MS (25%)** (en este caso se empleó el medio de cultivo que contenía las sales MS (1962) al 25% del total de sus sales con 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ Agar). **MS (100%)** (que es el medio de cultivo que contenía las sales MS (1962) al 100% del total de sus sales con 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ Agar). Para el tratamiento de sustrato **In vivo** se colocó en casa de vegetación con zaram (50% de sombra), el resto de los tratamientos se mantuvieron en las condiciones de laboratorio descritas en el epígrafe 3.0 de procedimientos generales. Se evaluó diariamente el Inicio de la germinación, el Final de la germinación y el porcentaje de germinación. Fase de multiplicación.

FASE DE MULTIPLICACIÓN

Efecto de las concentraciones de 6-BAP en la multiplicación de areolas y plantas germinadas *in vitro* de cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Con el objetivo de inducir la formación de brotes se colocaron los explantes de areolas provenientes de mamilas y semillas germinadas *in vitro* en medio de cultivo basal MS (1962) suplementado con diferentes concentraciones de 6-BAP (4.43, 8.87, 13.31 y 17.75 μM). Un tratamiento testigo sin 6-BAP (0.00 μM) también fue establecido. Todos los tratamientos mantuvieron un fondo fijo de ANA 5.4 μM . Brotes de cactus enano proveniente de la fase de establecimiento, se individualizaron y transfirieron a frascos de cultivo que contenía

25 mL de medio de multiplicación. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días (después de sembradas) y se analizó el número de brotes y altura de los mismos, en cada subcultivo.

Influencia del número de subcultivos en la multiplicación de cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Para determinar cómo influyó el número de subcultivos en la propagación *in vitro* de cactus enano, se utilizó el medio de cultivo de mejores resultados, empleado en el experimento (3.2.1) y se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo. Se evaluó cada 21 días, durante seis subcultivos y se calculó el coeficiente de multiplicación a partir de la ecuación:

$$CM = NEF / NEI$$

donde: CM: coeficiente multiplicación
 NEF: número de explante final
 NEI: número de explante inicial

FASE DE ENRAIZAMIENTO

Efecto de concentraciones de ANA en el enraizamiento *in vitro* del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Con el objetivo de inducir el enraizamiento *in vitro* se colocaron los brotes provenientes del sexto subcultivo de multiplicación en un medio de cultivo basal MS (1962) suplementado con diferentes concentraciones de ANA (2.7, 5.4 y 8.1 μ M) se empleó un testigo sin reguladores del crecimiento, manteniendo constante el AIB para todos los tratamientos. Las evaluaciones se realizaron a los 28 días y las variables evaluadas fueron: altura de la planta, número de raíces y longitud de las raíces.

FASE DE ACLIMATIZACIÓN

Efecto de los diferentes sustratos en la aclimatización de cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Para evaluar el efecto de diferentes sustratos en la aclimatización de cactus enano, se utilizaron brotes provenientes del cultivo *in vitro* y los mismos se plantaron en bandejas de polieturano que contenían los sustratos siguientes: Lecho de Bambú (50%)+Suelo Rojo (25%)+Zeolita (25%); Lecho de Bambú (50%)+Suelo Rojo (50%); Lecho de Bambú (50%) + Zeolita (50%). Las vitroplantas se mantuvieron en caseta de adaptación, con un flujo de fotones fotosintéticos de $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, humedad relativa de 80-90% los primeros 15 días, luego se disminuyó a un rango entre 70-80%, la temperatura osciló entre 24 y 27°C. Para evaluar la supervivencia se realizaron muestreos a los 0, 7, 21 y 35 días después de sembrados, además se evaluó: la altura de las plantas, número de raíces y longitud de las raíces a los 35 días.

Resultados y discusión

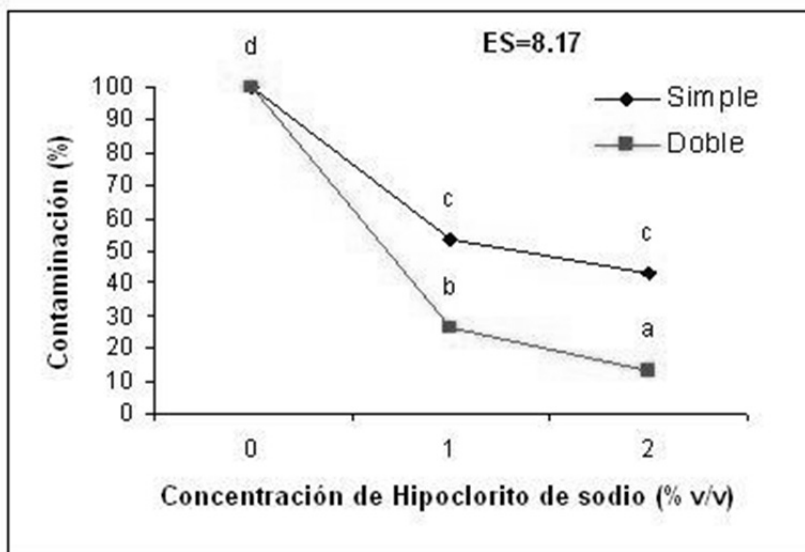
FASE DE ESTABLECIMIENTO

Empleo del agente desinfectante y tipo de desinfección en semillas botánicas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Se puede apreciar que existieron diferencias significativas entre los tipos de desinfección y los diferentes niveles de concentración empleados sobre la contaminación de las semillas de *cactus enano* (figura N.º 1).

Figura N.º 1

Efecto de la concentración de Hipoclorito de sodio y el tipo de desinfección sobre la contaminación de semillas botánicas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. Letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA factorial y Tukey, para $p < 0.05$



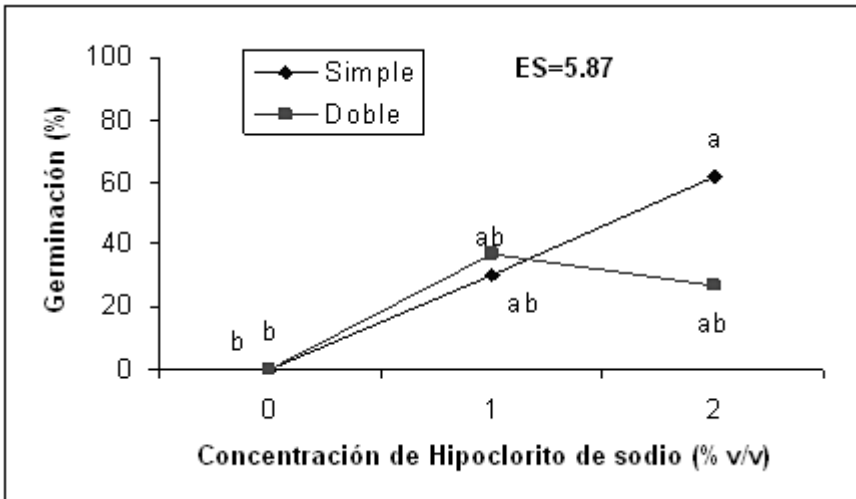
En el caso de la contaminación, se lograron los menores niveles en el tratamiento donde se aplicó Hipoclorito de sodio al 2% y desinfección doble, el que muestra diferencias significativas con el resto de los tratamientos, lográndose valores de 87.67% de semillas aptas para continuar en el proceso. En el caso de los tratamientos control (0% de Hipoclorito de sodio) la contaminación fue de un 100%. De igual forma observamos que en este tratamiento se obtuvieron los más bajos valores de germinación, difiriendo estadísticamente del resto de los tratamientos. Al analizar estos resultados se puede plantear que no necesariamente la eficiencia en la desinfección trae consigo una buena calidad del material restante, pues al emplear la mayor concentración pudiera dañarse la corteza seminal y por consiguiente dañar el embrión, afectando la germinación de las semillas.

Generalmente las semillas de cactáceas se desinfectan relativamente fácil, pero se debe tener en cuenta que esta especie es muy pequeña y todo el material proveniente de la planta madre ha estado en contacto con el suelo.

En este caso las semillas estuvieron en contacto directo con el agente desinfectante, durante un tiempo y condiciones óptimos (doble desinfección con hipoclorito de sodio al 2%), por lo que se lograron niveles de asepsia adecuados. A medida que fue aumentando la concentración del producto y variando el tipo de desinfección de simple a doble, la contaminación fue disminuyendo.

Figura N.º 2

Efecto de la concentración de Hipoclorito de sodio y el tipo de desinfección en la germinación de semillas botánicas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. Letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA factorial y Tukey, para $p < 0.05$



Garcés (2003), obtuvo en dos tratamientos de esterilización superficial de semillas un 20% de contaminación, luego de cuatro semanas de cultivo al emplear Hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y sumergiendo las semillas en alcohol al 70% durante 1 minuto.

En la figura N.º 2 se aprecia el efecto que tuvo la concentración y el tipo de desinfección en la germinación de semillas de *cactus enano*. Se puede notar que a medida que aumento la concentración y el tipo de desinfección los porcentajes de germinación fueron menores. Los mejores resultados de germinación se logran en el tratamiento con 2% de Hipoclorito de sodio (v/v) y desinfección simple, el porcentaje más bajo de germinación se obtuvo en el tratamiento donde se empleó 2% de Hipoclorito de sodio (v/v) y doble desinfección, lo que demuestra que este manejo pudiera estar afectando la germinación de las semillas de *cactus enano*.

Hay que tener en cuenta el efecto negativo del tipo de desinfección sobre la germinación, pues los valores alcanzados así lo indican. Aunque el tratamiento con Hipoclorito de sodio al 1% y desinfección simple no presentó diferencias significativas con los tratamientos de desinfección doble con 1% de Hipoclorito de sodio y el de desinfección doble con 2% de Hipoclorito de sodio. En estos tratamientos pueden haber ocurrido daños en los tejidos seminales, provocando una disminución en la germinación de las semillas de *cactus enano*.

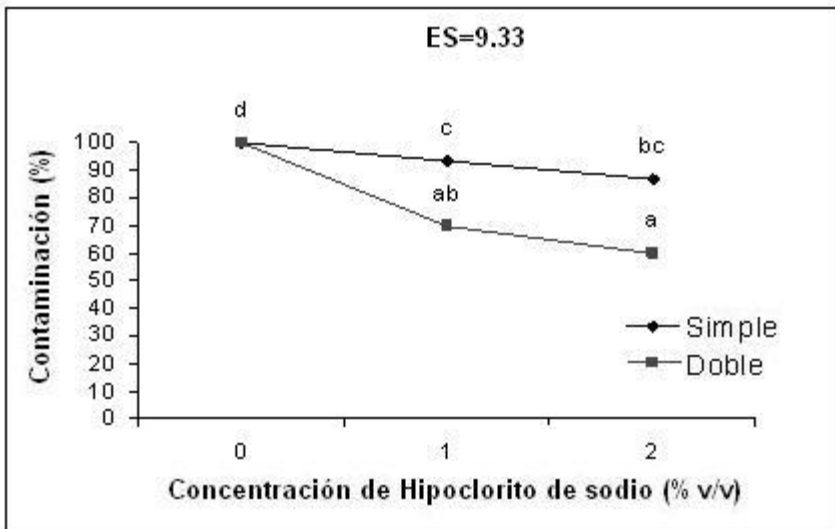
Se puede plantear de forma general que las semillas de *cactus enano* resultaron un material sensible a la concentración de 2% de Hipoclorito de sodio y al tipo de desinfección doble, para las variables contaminación y germinación. A medida que aumenta la concentración del hipoclorito de sodio y el tipo de desinfección, disminuye la contaminación y la germinación de las semillas.

Empleo del agente desinfectante y tipo de desinfección en las mamilas del *cactus enano Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

En la figura N.º 3 puede apreciarse el efecto de las concentraciones y el tipo de desinfección sobre la contaminación de areolas de *cactus enano*, logrando los niveles más bajos de contaminación (60%) en el tratamiento con 2% de Hipoclorito de sodio y desinfección doble, mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

El tratamiento control para los dos tipos de desinfección fue el de mayor índice de contaminación con un 100%. Los resultados obtenidos en los tratamientos de desinfección doble, pudieran estar influenciado por el tratamiento dado a la planta madre en la casa de vegetación, además del lavado y cuidado con las espinas alrededor de las areolas. Esta especie no presenta gran lanosidad, pero su pequeño tamaño dificulta la desinfección adecuada de las mamilas, por lo que se considera que los resultados obtenidos no son los más favorables para comenzar un protocolo de propagación de cualquier especie vegetal.

Figura N.º 3
Efecto de la concentración de Hipoclorito de sodio y el tipo de desinfección la contaminación de areolas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. Letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA factorial y Tukey, para $p < 0.05$

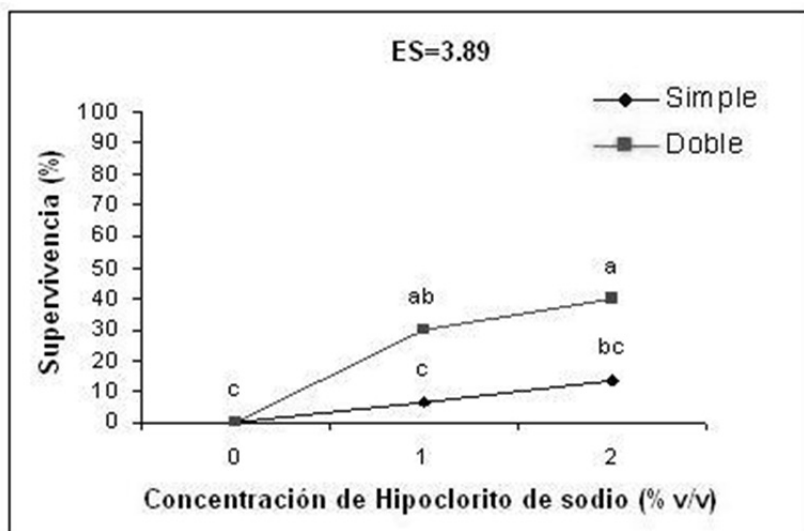


Garcés (2003), obtuvo un 100% de contaminación en los tratamientos utilizados, en este caso la contaminación fue por organismos fúngicos debido a la cantidad de lanosidad compacta existente en la superficie trabajada.

Ault y Blackmon (1987) informan haber obtenido escaso éxito en la obtención de material vegetal estéril cultivado, proveniente de invernaderos, lo que también es señalado por Johnson y Emino (1979). En el caso de *Opuntia*, el cultivo de areolas axilares provenientes de plantas adultas también resultó tener un elevado porcentaje de contaminación (Mondragón *et al.*, 1995).

En la figura N.º 4, se aprecia el comportamiento de las areolas de cactus enano en cuanto a la supervivencia. Luego de trabajar con las concentraciones y el tipo de desinfección, se observó que los niveles de supervivencia son relativamente bajos.

Figura N.º 4
Efecto de la concentración de Hipoclorito de sodio y el tipo de desinfección en la supervivencia de areolas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. Letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA factorial y Tukey, para $p < 0.05$



En este caso, cabe destacar que el tratamiento con 2% de Hipoclorito de sodio y desinfección doble fue el que tuvo mayores niveles de supervivencia, aunque se consideran bajos. Las mamilas respondieron

mejor en cuanto a la supervivencia a las combinaciones mayores de concentración de Hipoclorito de sodio y el tipo de desinfección.

Al ser un material adulto se puede decir que la contaminación fue alta, pero el material no contaminado respondió muy bien y mantuvo su coloración verde, manteniendo su capacidad de crecimiento. No se encontró ningún síntoma de muerte por la desinfección (explantos necrosados, secos).

Efecto de los tratamientos de desinfección con Bicloruro de mercurio (% m/v), empleada en la desinfección de mamilas de cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

En la figura N.º 5 se observa que el tratamiento con bicloruro de mercurio al 0.2% y desinfección simple fue el que obtuvo los mejores resultados, pues solamente presentó un 20% de contaminación con diferencias significativas con los tratamientos donde se emplearon hipoclorito de sodio al 2% y desinfección doble y el bicloruro de mercurio al 0,1% y desinfección simple. Estos resultados demuestran la efectividad del bicloruro de mercurio en la desinfección de especies recalcitrantes. Al emplearse en el cactus enano a bajas concentraciones y cortos períodos de tiempo, resultó ser efectivo. Aunque el tratamiento con menor concentración de hipoclorito fue el segundo de mejor resultados, su valor de contaminación se encuentra por debajo de 50% (46.67%).

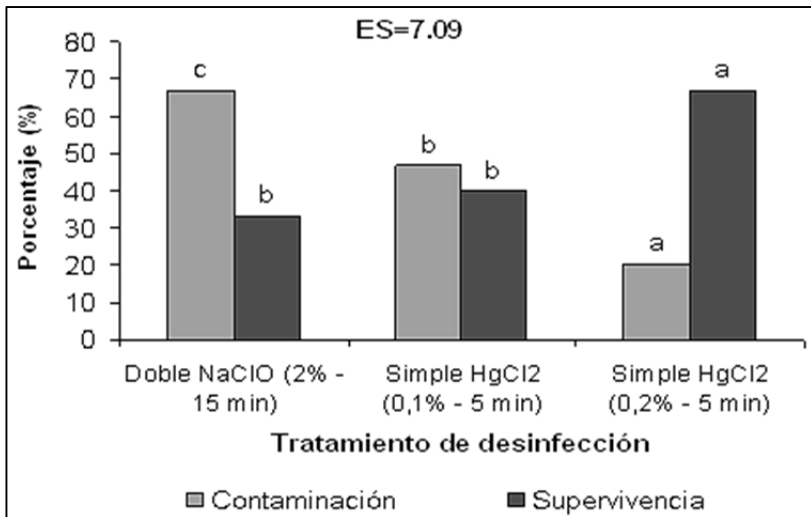
Los resultados demuestran que en el caso de las areolas del cactus enano es más efectivo el bicloruro de mercurio que el hipoclorito de sodio. Este aspecto debe tenerse en cuenta en el protocolo de propagación *in vitro* de esta especie.

Al analizar la supervivencia del material se observa que el tratamiento con bicloruro de mercurio al 0.2% durante 5 minutos fue también muy efectivo para esta variable, pues se alcanzó un 66.67% de supervivencia, logrando mantener el material de partida

las condiciones agromorfológicas adecuadas y características de la especie. Solo se encontró un 13.33% de material que necrosó y murió. Esto pudiera ser por el efecto del bicloruro de mercurio sobre el mismo.

Figura N.º 5

Efecto del tipo de desinfectante en la contaminación y supervivencia de areolas del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey, para $p < 0.05$. ES: error estándar de la media



Kamnoon y Kantamaht (2000), al desinfectar yemas apicales de *Maesa ramentacea*, en una solución acuosa de cloro al 20% durante 20 y 30 minutos y con bicloruro de mercurio al 0.1% durante 10 y 15 minutos, encontraron que en las yemas apicales esterilizadas con el cloro obtuvieron de un 30 a una 45% de asepsia y con el bicloruro de mercurio un 70 a 80% de efectividad en la desinfección del material. Aquí se nota la efectividad del bicloruro de mercurio sobre el hipoclorito de sodio, en cuanto a la eficiencia en el logro de asepsia y supervivencia.

Por los resultados obtenidos puede plantearse que la desinfección de areolas, provenientes de mamilas de cactus enano, es efectiva con el empleo de Bicloruro de mercurio, empleando una concentración de (0.2%), durante 5 minutos.

Efecto del medio de cultivo en la germinación de semillas del cactus enano

En el caso de variable Final de la germinación, el mejor tratamiento correspondió al sustrato de las sales MS al 25%, el que en promedio completó su germinación en 12 días. Los tratamientos Agar-Agua y Cámara Húmeda mostraron una condición intermedia y necesitaron de 13 días para completar su germinación. Los tratamientos *In vivo* y medio MS al 100% de las sales, fueron los que presentaron un tiempo mayor de germinación, entre los 14 y 15 días. El porcentaje de germinación obtenido para *E. cubensis*, también presentó diferencias estadísticas al alcanzar el mayor porcentaje el tratamiento Agar-Agua, con un 96,76% sin diferencias significativas con el medio de cultivo basal de sales MS (25%) con un 95,64%. El tratamiento Cámara Húmeda alcanzó un 91,24% de germinación. El menor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento de las sales MS al 100 %, con solo un 36,56, casi un tercio de lo alcanzado por el mejor tratamiento. De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos decir que en el medio que contenía las sales MS al 25% de concentración, las semillas de *E. cubensis*, encontraron un lecho adecuado para su desarrollo. Se le facilitó una cantidad determinada de nutrientes, y aunque se plantea que en las etapas iniciales la germinación se realiza con las reservas de la propia semilla, puede inferirse que en este caso el medio fue adecuado para su germinación. La germinación de las semillas de cactus enano no es, en estos momentos, una dificultad mayor, pues los resultados obtenidos permiten determinar y establecer semillas de esta especie, para su propagación.

FASE DE MULTIPLICACIÓN

Efecto de las concentraciones de 6-BAP en la multiplicación de areolas y plantas germinadas *in vitro* de cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

En el número de brotes se encontró que el tratamiento con 13.31 μM de 6-BAP fue más efectivo y expresa diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El tratamiento control no mostró brotes, por lo que solamente se le pudo evaluar el crecimiento del explante inicial. Esto se debe a que en la composición del medio de cultivo no se encontraba presente la citocinina. De esta forma se reafirma lo planteado por algunos autores, quienes establecen que en la emisión de brotes de cactus es necesario la presencia de citocinina.

Se puede plantear que el tratamiento con 17.75 μM de 6-BAP sí incrementó número de brotes, pero que los mismos no presentan características idóneas para considerarlos como brotes aptos para la micropropagación, pues eran de muy pequeño tamaño y formaba una protuberancia de pequeños brotes. Estos pequeños agregados no poseían una altura que permitiera su manipulación, por lo que no se tuvieron en cuenta en el resto del proceso

Pérez-Bermúdez (2002), plantea la utilización de plántulas germinadas *in vitro* como material vegetal para desarrollar un método de micropropagación, en especies recalcitrantes y en peligro de extinción. Sriskandajarah y Serek (2004), obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este trabajo, a partir de cladodios. En este caso es muy similar al trabajo con las mamilas, pues ambos trabajan con las areolas, donde utilizaron concentraciones de 6-BAP y presentan una tasa de multiplicación de 10. A su vez, obtuvieron una gran hidratación de los tejidos, lo que produjo que no todo el material obtenido fuera apto. Esto demuestra que en las cactáceas, cuando se emplean altas concentraciones de 6-BAP, se elevan los riesgos de una hidratación en los tejidos. Lo que se explica porque, además de la acción de la hormona, las cactáceas presentan una

gran cantidad de agua en los mismos y aunque los miembros de esta familia presenten una cutícula rica en ceras para prevenir la pérdida de agua y resistir cambios ambientales bruscos, se debe tener en cuenta que las condiciones de cultivo *in vitro* no son las mismas que las condiciones ambientales externas. Poljuha *et al.* (2003), plantean que al micropropagar *Mammillaria gracillis* Pfeiff, sin reguladores del crecimiento obtenían brotes hidratados.

Según Pérez *et al.* (2002), investigaron con tres especies de cactus columnares y obtuvieron un promedio de 4.3 brotes por explantes, y con condiciones de crecimiento diferentes, pues los *cactus columnares* presentan un crecimiento individualizado, logrando una altura superior a los cactus de crecimiento globoso.

Sriskandajarah *et al.* (2006) emplearon concentraciones de 3,5 μM de 6-BAP, para la micropropagación de *Schulumbergera* y *Rhipsalidopsis*, y determinaron la capacidad regenerativa de estas especies. Además plantean que la relación auxinas-citocininas favorece la capacidad regenerativa y que en los primeros subcultivos de multiplicación aparecen raíces que luego desaparecen en los subsiguientes subcultivos. Este aspecto pudiera verse influenciado por la acción de la citocinina sobre las auxinas.

En general se señala para diversas especies de cactus, que la mayor tasa de producción de brotes se consigue con la presencia de 0.44-4.44 μM de BAP en combinación con bajas concentraciones de auxinas (Clayton *et al.*, 1990), lo que difiere con los datos obtenidos en *E. cubensis*. Las especies *Ferocactus covillei*, *F. wislizenii* y *Echinocereus pectinatus*, produjeron la mayor tasa de brotes axilares en un medio de cultivo suplementado con 4.44 μM de BAP y 46,47 μM de Kinetina, indicaron Ault y Blackmon (1985). Sin embargo como señalan Chávez *et al.* (2001), los niveles de citocinina y auxina requeridos deben ser estudiados experimentalmente para cada especies.

Medeiros *et al.* (2006), multiplicaron secciones de las costillas del *Notocactus magnificus* que contenían de 2 a 3 areolas, con diferentes concentraciones de 6-BAP, logrando el mayor número de brotes

por explante cuando emplearon la concentración de 22.2 μM de 6-BAP. Brasil *et al.* (2005) multiplicaron areolas de cladodios jóvenes de plantas cultivadas en campo y en condiciones *in vitro*, logrando un elevado número de brotes (20), en el medio de cultivo MS, suplementado con 7.5 μM de 6-BAP y 0.2 μM de AIA. Pérez *et al.* (1998), lograron la formación de brotes a partir de areolas de plantas germinadas *in vitro* de las especies *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Coryphanta*, *Ethinocactus*, *Echinocereus*, *Echinofossulocactus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nylocereus* y *Stenocereus*, empleando 8.7 μM de 6-BAP y 5.37 μM de ANA.

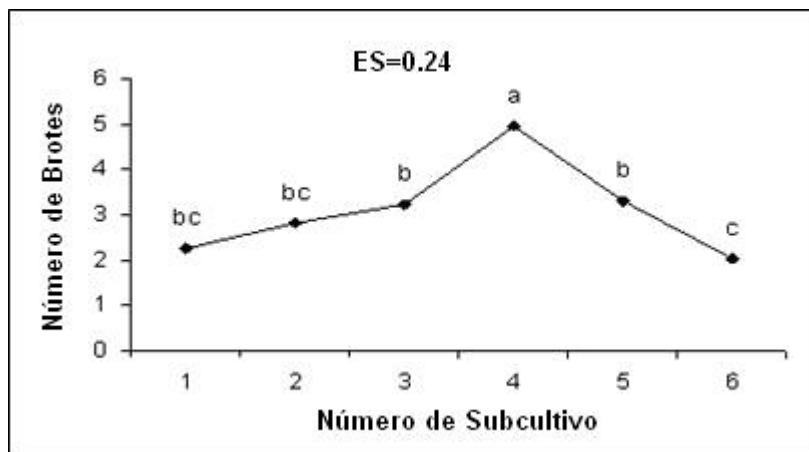
Influencia del número de subcultivos en la multiplicación de cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts)

Se puede apreciar en la figura N.º 6 cómo influye el número de subcultivos en el coeficiente de multiplicación de los explantes. El análisis se realizó desde el subcultivo primero y hasta el sexto subcultivo.

Figura N.º 6

Influencia del número de subcultivos en la emisión de brotes de cactus enano. Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey, para $p < 0.05$.

ES: error estándar de la media



En los tres primeros subcultivos la tasa de multiplicación es significativamente más baja, luego se observó un incremento en el cuarto subcultivo, pero en el quinto subcultivo el coeficiente comenzó a bajar. En el sexto subcultivo alcanzó el menor valor de multiplicación por lo que se determinó, subcultivar este material en cuatro ocasiones, donde se puede obtener un buen número de plantas para los propósitos que se persiguen con del protocolo de propagación *in vitro*. Podemos decir que al comenzar a declinar el coeficiente de multiplicación.

FASE DE ENRAIZAMIENTO

Efecto de concentraciones de ANA en el enraizamiento *in vitro* del cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

El enraizamiento en las cactáceas se produce generalmente espontáneamente desde la misma fase de multiplicación, lo que trae consigo que el proceso de enraizamiento de esta especie no sea tan recalcitrante.

Tabla N.º 4
Efecto de los reguladores del crecimiento en el enraizamiento *in vitro* de cactus enano.

En todos los tratamientos se mantuvo un fondo fijo de 2.5 μM AIB

| Trat. | ANA (μM) | Altura (cm) | Número de Raíces | Longitud de las raíces (cm) |
|-------|-----------------------|-------------|------------------|-----------------------------|
| 0 | 0 | 4.18 c | 1.68 b | 0.53 c |
| 1 | 2.68 | 4.73 b | 1.76 b | 0.56 c |
| 2 | 5.37 | 4.75 b | 1.96 ab | 0.63 b |
| 3 | 8.05 | 5.06 a | 2.50 a | 0.90 a |
| 4 | ES \pm | 0.06 | 0.13 | 0.05 |

En la tabla N.º 4, se puede apreciar que el tratamiento 3 fue efectivo para los parámetros evaluados como altura de la planta, número de raíces y longitud de las raíces, en el número de raíces por plantas no se obtuvo diferencias significativas, esta especie no presenta un gran número de raíces, pues posee una raíz napiforme con muy pocas raíces adventicias y generalmente se encuentra en estado natural expresando hasta 5 raíces por planta. Esto demuestra que es una especie no muy prolífera en la emisión de raíces. Se considera que el medio de cultivo con la combinación de 8.1 μM ANA+ 2.5 μM AIB se debe emplear en la micropropagación de esta especie.

Medias con letras desiguales difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA de un factor y Tukey, para $p < 0.05$. ES: error estándar de la media.

Pérez *et al.* (1998) lograron el enraizamiento de vitroplantas de 21 especies de cactus mexicanos, cuando le añadieron al medio de cultivo 5.71 μM de AIA y 4.90 μM de AIB. Dávila Figueroa *et al.* (2005) plantearon que el enraizamiento de las vitroplantas fue eficiente cuando se sembraron en un medio de cultivo basal al 100% de concentración de las sales, sin reguladores del crecimiento y la frecuencia de enraizamiento fue de 54.2 a 94.2%.

Frota *et al.* (2004) lograron los mejores resultados en el enraizamiento de las vitroplantas de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., con 26,85 μM de ANA. Por otro lado no hubo diferencias significativas entre los clones testados, cuando se emplearon reguladores de crecimiento.

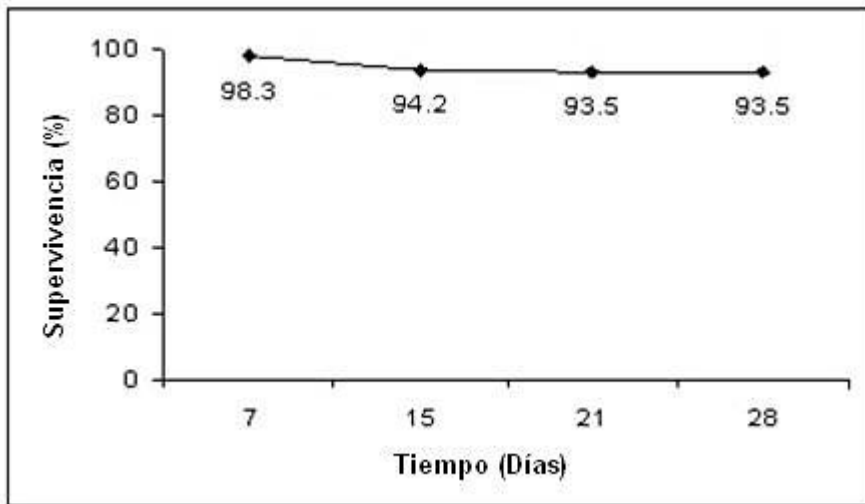
En las cactáceas y dependiendo de la especie, se puede utilizar o no reguladores del crecimiento vegetal. Rubluo *et al.* (1996) plantean que esta familia posee la capacidad de producir una gran cantidad de auxina, lo que le induce a la emisión de raíces desde la fase de multiplicación. En este experimento no ocurrió así, pues hubo que añadirle auxinas para inducir el enraizamiento.

FASE DE ACLIMATIZACIÓN

Efecto de los diferentes sustratos en la aclimatización de cactus enano *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts

Al analizar la supervivencia en condiciones de aclimatización, se puede apreciar y corroborar lo planteado por otros autores como Gárces (2003) y Papafotiu *et al.* (2001), quienes plantean que las cactáceas son plantas que se adaptan fácilmente a diversos cambios. En la figura N.º 7 se pueden apreciar los resultados elevados obtenidos.

Figura N.º 7
Porcentaje de supervivencia de vitroplantas en la fase de aclimatización de cactus enano



En la tabla N.º 5 se muestran los resultados obtenidos en las evaluaciones efectuadas, obsérvese que el tratamiento donde se utilizó la combinación de los tres sustratos, a pesar de no diferir estadísticamente con el tratamiento donde se empleó solo zeolita más lecho de bambú, tuvo una tendencia a incrementar la altura. En cuanto a la longitud de las raíces y el número de raíces, el

tratamiento donde se utilizaron los tres sustratos no difiere estadísticamente del dos, pero se aprecia un efecto positivo con tendencia al incremento que favorece al tratamiento uno, por lo que puede considerarse este tratamiento como el más adecuado para la aclimatización de esta especie. Los resultados expuestos en el gráfico nos permiten afirmar que las cactáceas, muestran una elevada capacidad de adaptabilidad, con capacidad para asimilar cambios bruscos de temperatura, luz y humedad relativa, este resultado permitió contar con plantas que deben ser reintroducidas en sus areales naturales. Estos resultados se deben a la buena estructura, permeabilidad y aireación que le dio al sustrato la fibra de bambú (lecho de bambú), características que permiten un adecuado desarrollo de las raíces trayendo consigo una mejor absorción de nutrientes, mejorando el crecimiento y desarrollo de las plantas. La zeolita posee, además, un efecto positivo sobre la calidad física del sustrato, pues este material es capaz de retener algunos nutrientes y disminuir las pérdidas por el lavado del agua de riego. Esto corrobora lo planteado por Agramonte (1998), donde señala que una buena permeabilidad y aireación de los sustratos permite un buen crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.

Tabla N.º 5
Efecto de los diferentes sustratos en la aclimatización
de vitroplantas de *Cactus enano*. Medias con letras iguales
no difieren entre sí para Duncan $p < 0.05$

| Tratamientos | Talla (cm) | Longitud de raíces (cm) |
|------------------------------|---------------|-------------------------|
| Zeolita+Lecho de Bambú+Suelo | 0.78a ± 0.45 | 1.04a ± 0.40 |
| Zeolita+Lecho de Bambú | 0.80 a ± 0.76 | 0.89a ± 0.47 |
| Lecho de Bambú+Suelo | 0.56 b ± 0.61 | 0.73a ± 0.41 |

Referencias bibliográficas

- Agramonte, D.; Jiménez, F.; Rodríguez, M. (1998). Aclimatización. En: J. N. Pérez Ponce (ed). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. –Villa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, pp. 193-202.
- Ault, J.; Blackmon, W. (1987). *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (cactacea). *Hort. Science*. 22(1): 126-127.
- Brasil, J. N.; Jereissati, E. S.; Santos, M. R. A.; Campos, F. A. P. (2005). Micropropagation of cochenillifera de Nopales (cactaceae). *J.appñ.Bot.alimento*. vol. 79, N.º 3, pp. 160-162.
- Chávez, V.; Mata, M.; Moebius, K.; Monrroe, A. (2001). Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass ex Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 37: 400-404.
- Clayton, P.; Hubstenberger, J.; Phillips, G. (1990). Micropropagation of members of the cactaceas subtribe cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(2): 337-343.
- Dávila-Figueroa, C. A.; Carrillo, M.; Pérez-Molphe, E. (2005). *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *Biocell (Mendoza)*, Enero/marzo, 54(3), 540-545.
- Frota, H. M. C.; Souza, M.; Llamota, R. M.; Paiva, F.; Peixoto, M. (2004). Proliferação e enraizamiento *in vitro* de brotes de palma forrageira *Opuntia Picus-indica* (L.) Mill. *Acta Scientiarum Biological Sciences. Maringá*, 26(2), 235-238.
- Garcés, M. (2003). Desarrollo de las primeras etapas de un protocolo de micropropagación para *Eriosyce aurata* (Pfeiffer) Backeberg (cactacea, una especie en estado de conservación vulnerable, endémica de Chile). [Tesis presentada como requisito

para optar al grado de Magister en Ciencias Agropecuarias. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal].

- Johnson, J. L.; Emino, C. R. (1979). *In vitro* propagation of the cactus *Mammillaria elongata*. *Hort Science*, 14, 805-806.
- Kamnoon, K.; Kantamath, B. (2000). A protocol towards micropropagation of the psidal Plant, *Maesa ramentacea* A.DC. *Science Asia*, 26, 201-205
- Medeiros, L.; de Rivero, R. C.; Gallo, L. A.; de Olivera, E. T.; Payao, M. E. (2006). *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34(2), 147-151.
- Mondragón, C. J.; Pimienta, E. (1995). Opuntia Propagation. Guiseppe, B., P. Inglese and Pimienta. (eds). *Agroecology, Cultivation and uses of cactus pear*. FAO Publications.
- Murashige, T; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Papafotiu, M.; Balotis, G. N.; Louka, P. T.; Chronopoulos, J. (2001). *In vitro* plant regeneration of *Mammillari elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 163-167.
- Pérez-Bermúdez, P; Ulrich, H; Gavidia, I. (2002). A protocol for rapid micropropagation of endangered *Isoplexis*. *In vitro Cell. Dev. Biol. –Plant*, 38, 178-82.
- Pérez, M. B.; Pérez, M. E.; Villalobos, E.; Mezar, A. E.; Morones, L.; Lizalde, H. J. (1998). Micropropagation of 21 species of Mexico cacto by axillary proliferation. *In vitro. cell. dev. bio. Plant*, 34(2), 131-135.

- Poljuha, D.; Balen, B.; Bauer, A.; Tjube, N.; Krsnik-Rasol, M. (2003). Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75(2), 117-123.
- Rubluo, A.; Reyes, J. Rodríguez-Garay, B.; Pimienta-Barríos, E.; Brunner, I. (1996). Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en cactáceas para zonas áridas. Izquierdo, J.; G. Palomino (eds.). *Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas*. Santiago de Chile: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
- Sriskandarajah, S.; Serek, M. (2004). Regeneration from Phylloclade explant and callus culture of *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, 75-81.
- Sriskandarajah, S.; Prensén, E.; Motyka, V.; Ivanov, P.; Serek, M. (2006). Regenerative capacity of cactus *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in relation to endogenous phytohormone, cytokinin oxidase/dehydrogenase, and peroxidase activities. *J. Plant Growth Regul*, 25, 79-88.

Luis Enrique Rodríguez de Francisco

Es profesor del INTEC, República Dominicana. Ingeniero Agrónomo (1993), con maestría en Biotecnología Vegetal: mención Planificación (2007). Posee experiencia como coordinador de proyectos y programas en ciencias ambientales, biotecnología, educación ambiental, gestión y desarrollo comunitario, conservación de especies endémicas, estudios bioecológicos, trabajo comunitario, reforestación, propagación masiva de plantas, caracterización molecular de especies y estudio de impacto ambiental. Coordinador de la Sub Área de Biología y del Laboratorio de Biología del INTEC. Investiga en temas relacionados con las ciencias ambientales, biotecnología, agricultura, la educación ambiental y trabajo comunitario. Ha participado como expositor en más de 50 eventos científicos y ha publicado 10 artículos científicos en diferentes revistas internacionales.

Email: luisrod95@gmail.com

Josefina Vázquez Frías

Es profesora adjunta del INTEC, República Dominicana. Licenciada en Ciencias Bológicas (1981), con maestría en Educación Superior: mención Planificación (2003). Posee 25 años de experiencia como coordinadora de proyectos y programas ambientales, en manejo integrado de cuencas hidrográficas, educación ambiental, calidad y abastecimiento de agua, gestión y desarrollo comunitario, formación de equipo interdisciplinario,

estudio de impacto y producción más limpia. Coordinadora de programa de postgrado y grado. Coordinadora programas de capacitación de maestros. También es asesora de programas y proyectos de Educación Ambiental. Actualmente es coordina la Sub-Área de Medio Ambiente y la Maestría en Ciencias Ambientales del INTEC. Ha participado como expositora en más de 70 eventos científicos y publicados artículos sobre cuantificación de contaminantes de agua y temas de educación ambiental.

Email: josefina.vasquez@intec.edu.do

Elena Fornet Hernández

Graduada de licenciatura en Ciencias Biológicas, con especialidad en Micología, por la Universidad de La Habana, Facultad de Biología. Fue miembro del Comité Editorial de la revista Protección Vegetal de dicha institución. Ha realizado investigaciones y acciones en el campo de la gestión de la ciencia y la innovación en Holguín, en la rama biotecnológica y en su conducción a nivel territorial.

Ha participado en numerosos eventos científicos y publicaciones, es Investigadora y Profesora Titular. Desarrolla numerosas actividades en la docencia en cursos de postgrado, maestrías y doctorados, entre los que se destacan: maestría de Gerencia de la Ciencia y la Innovación, maestría de Gestión Ambiental y doctorado Curricular de Gestión de la Ciencia, la Tecnología y el Medio Ambiente. Actualmente labora en el Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT) de Holguín, Cuba.

Rayma Cantillo Ardeból

Tiene una maestría en “Biotecnología Vegetal” por el Instituto Bioplantas asociado a la Universidad de Ciego de Ávila (UNICA). El pasado año defendió la tesis en opción al grado académico de máster, alcanzando la máxima puntuación. Recibió el curso-entrenamiento “Propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia*” en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de Santa Clara. Recibió el curso “Fundamentos de la redacción científica” en el Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT), perteneciente al CITMA-Holguín. Ha participado en 40 eventos científicos y diversos cursos de superación. Posee 6 publicaciones científicas.

Email: rcantillo@cisat.cu

Recibido: 12/01/2013

Aprobado: 26/04/2013

