

## Germinación establecimiento y propagación *in vitro* de *Escobaria roseana* (Boed) Backbg

### *In Vitro* germination establishment and propagation of *Escobaria roseana* (Boed) Backbg

Leticia Escobedo Bocardo<sup>1</sup> Hermila Trinidad García Osuna<sup>2</sup> y Ana Guadalupe Bertaud de León<sup>3</sup>

#### Resumen

Los miembros de la familia Cactaceae enfrentan condiciones climáticas adversas, características de las zonas áridas y semiáridas donde se desarrollan, además han sido explotados de forma irracional al ser utilizados como recurso hortícola, frutícola medicinal y ornamental, lo que ha ocasionado que muchas de sus poblaciones se encuentren en riesgo de extinción, a pesar de que han desarrollado mecanismos adaptativos que permiten la permanencia de sus poblaciones. Dentro de su ciclo de vida, la etapa de mayor vulnerabilidad es la germinación que en condiciones naturales es baja como consecuencia de la depredación de sus frutos y de los factores climáticos fluctuantes, induciendo a la semilla a entrar en un estado de quiescencia o de letargo.

Por lo anterior los objetivos del presente trabajo fueron incrementar el por ciento de germinación y llevar a cabo el establecimiento del cultivo aséptico y la micropropagación de *Escobaria roseana*, especie ubicada en la categoría de Protección Especial **NOM-059-ECOL-2001**. Se partió de semillas colectadas en campo y los tratamientos utilizados para la germinación fueron: T1 = testigo; T2 = Hidratación; T3 = KNO<sub>3</sub> al 0.2%; T4 = ácido giberélico a 10ppm; T5 = ácido giberélico a 50 ppm. Se encontró que el mejor tratamiento fue T3 (KNO<sub>3</sub> al 0.2%), con un promedio de 68% de germinación y con la mayor velocidad de germinación. El tratamiento con menor germinación fue el testigo con un 3% de germinación. El establecimiento del cultivo aséptico se llevó a cabo satisfactoriamente colocando las plántulas procedentes de la germinación en el medio nutritivo de Murashige y Skoog adicionado con 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 250 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 1 mg l<sup>-1</sup> de Tiamina-HCL, 1 mg l<sup>-1</sup> de Piridoxina-HCl, 8 g l<sup>-1</sup> de agar y 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP.

En la micropropagación se utilizaron reguladores de crecimiento en las siguientes concentraciones: T1: 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP mas 0.5mg l<sup>-1</sup> de KIN; T2: 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP mas 1mg l<sup>-1</sup> de KIN; T3: 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP mas 2 mg l<sup>-1</sup> de KIN. El mejor tratamiento fue T3 con un promedio de 7.2 explantes por brote.

**Palabras Clave:** *Escobaria roseana*, Cactaceae, ácido giberélico, nitrato de potasio, letargo, micropropagación.

---

1 Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coah.

2 Calli Productores del Desierto SPR de RL. Saltillo, Coah.,

3 Museo del Desierto. Prol. Pérez Treviño # 3745, Saltillo, Coah.

## Abstract

The members of the Cactaceae family face climatic adversities, characteristics of the desertic and semidesertic regions where they develop, besides they had been exploited in an irrational way when they are used in horticulture, fruticulture, medicine, and as ornaments, which has produced that many of their populations are now in danger of extinction, even though they have developed adaptive mechanisms of defense, which allow the permanence of their populations. In their life cycle, the most vulnerable phase is germination which in natural conditions is low as a consequence of fruit predators and fluctuating weather factors, inducing seeds to enter in a lethargy phase.

Because of this, the objectives of this work, were to enlarge the germination percentage, and to produce the aseptic culture establishment and micro propagation of *Escobaria roseana*, species located in the Special Protection category **NOM-059-ECOL-2001**. It started from collected seeds and the germination methods used were: T1= control; T2=hydration; T3=  $\text{KNO}_3$  at 0.2%; T4= gibberellic acid at 10ppm; T5=gibberellic acid at 50 ppm. The best results were from T3 ( $\text{KNO}_3$  at 0.2%), with a 68% germination and with the largest germination speed. The treatment with the smaller germination was control with a 3% germination. The aseptic culture establishment was carried out satisfactorily putting germination plants in the nutritive media of Murashige and Skoog plus  $30 \text{ g l}^{-1}$  sacrose,  $250 \text{ mg l}^{-1}$  myo-inositol,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  Thiamine-HCL,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  Piridoxine-HCl,  $8 \text{ g l}^{-1}$  agar and  $3 \text{ mg l}^{-1}$  BAP.

In micropropagation growth regulators were used in the following concentrations: T1:  $1 \text{ mg l}^{-1}$  of BAP, and  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  of KIN; T2:  $2 \text{ mg l}^{-1}$  of BAP, and one  $\text{mg l}^{-1}$  of KIN; T3:  $3 \text{ mg l}^{-1}$  of BAP and  $2 \text{ mg l}^{-1}$  of KIN. The best treatment was T3 with an average of 7.2 explants per bud.

**Key Words:** *Escobaria roseana*, Cactaceae, gibberellic acid, potassium nitrate, lethargy, micropropagation.

## Introducción

El aprovechamiento de los recursos naturales de forma racional exige la aplicación de técnicas que permitan aumentar la productividad sin afectar la fuente. Dentro de la flora fanerogámica que ha sido explotada de forma irracional se encuentran los miembros de la familia Cactácea. Algunas de sus especies se utilizan como recurso hortícola, frutícola medicinal y/u ornamental, lo que ha ocasionado que muchas de sus poblaciones se encuentren en riesgo de extinción. Las semillas de las cactáceas presentan características morfológicas y fisiológicas que permiten la permanencia de sus poblaciones ante condiciones climáticas variadas. Algunas presentan requerimientos lumínicos para germinar como el género *Mammillaria*, *Echinocactus* y *Ferocactus*, otras cactáceas columnares del género *Neobuxbaumia*, *Cephalocereus*, *Pachycereus* por ejemplo, no requieren luz para su germinación. Además de los requerimientos lumínicos algunas semillas son afectadas por regímenes de temperaturas, eliminación de inhibidores presentes en la testa y ácido giberélico (Rojas-Aréchiga et. al. 1997). Las semillas en condiciones naturales presentan letargo, como mecanismo adaptativo a las condiciones climáticas fluctuantes. Esto genera un por ciento de germinación relativamente bajo. Ante esta perspectiva se hace necesario

el establecimiento de técnicas que promuevan la germinación con el uso de agentes que aumentan la tasa respiratoria por diferentes vías metabólicas en semillas con requerimientos de horas frío o luz. Con ello se garantiza la posibilidad de reposición de los individuos en su medio o el aprovechamiento del recurso al desarrollar sistemas de propagación masiva sin afectar las poblaciones naturales.

La técnica de cultivo de tejidos *in vitro* es de gran valor en la preservación y propagación de especies de cactáceas en vías de extirpación (Malda et al., 1999), asegura las especies en estudio, ya que primero permite romper el letargo que presentan sus semillas para luego acelerar el proceso de propagación, tanto en tiempo como en número de plántulas generadas, además de que a partir de una semilla se pueden propagar todas las plántulas deseadas.

*Escobaria roseana* es una especie endémica, cuya localidad tipo se encuentra en los alrededores de Saltillo, Coah., se encuentra registrada como Protección especial (PR) dentro de la Norma Oficial Mexicana(NOM-059-ECOL-2001).

## Metodología Y Experimental

El trabajo experimental se llevó al cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. El protocolo para obtener la asepsia consistió en sumergir las semillas en etanol al 70% por un minuto, enjuagarlas con agua destilada estéril por un minuto y colocarlas en hipoclorito de sodio al 10% (v/v) por 20 minutos y se enjuagaron por tres ocasiones en agua destilada estéril. Enseguida las semillas se colocaron en imbibición por 24 horas en diferentes soluciones que constituyeron los tratamientos: 1) testigo; 2) agua destilada estéril; 3) nitrato de potasio a 0.2%; 4) ácido giberélico a 10ppm; 5) ácido giberélico a 50ppm. Las semillas se sembraron en frascos gerber con 20 ml de medio MS al 50%, adicionado con 20 g/l de sacarosa, 250 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 1 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCL y 8 g/l de agar; el pH del medio se ajustó a 5.7 y se esterilizó a 120°C durante 15 minutos. La unidad experimental la constituyó un frasco con 10 semillas por tratamiento, con 10 repeticiones, incubándose en fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y a temperatura de 24±1°C. Se registró el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación por medio del índice de Maguire de cada tratamiento diariamente durante 30 días. (Maguire, 1962).

Para el establecimiento del cultivo aséptico se utilizaron plántulas obtenidas de la germinación *in vitro*, las cuales se colocaron en medio nutritivo de Murashige and Skoog adicionado con 30 g/l de sacarosa, 250 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 1 mg l<sup>-1</sup> de Tiamina-HCL, 1 mg l<sup>-1</sup> de Piridoxina-HCL, 8 g/l de agar y 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP; el pH se ajustó a 5.8 y se esterilizó a 120°C durante 15 minutos. El medio se cambió cada cuatro semanas por cuatro veces consecutivas. Con la finalidad de establecer la micropropagación y evaluar la respuesta morfogénica se seleccionaron brotes con 0.5 cm de diámetro y 0.7 cm de longitud que se colocaron en medio MS suplementado con 250 mg l<sup>-1</sup> myo-inositol, 1 mg l<sup>-1</sup> de Tiamina-HCL, 1 mg l<sup>-1</sup> de Piridoxina-HCL, 0.5mg/l de ANA, 30 g/l de sacarosa, ajustando el pH a 5.8 a los cuales se adicionaron las siguientes concentraciones de reguladores de crecimiento: T1: 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP mas 0.5 mg l<sup>-1</sup> de KIN; T2: 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP mas 1 mg l<sup>-1</sup> de KIN; T3: 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP mas 2 mg l<sup>-1</sup> de KIN; el pH se ajustó a 5.8 y

se esterilizó a 120°C durante 15 minutos. En cada tratamiento se consideraron cinco repeticiones; cada repetición constó de cuatro explantes por frasco con 25 ml de medio

## Resultados Y Discusión

En cuanto a los tratamientos probados para la germinación *in vitro* de *Escobaria roseana*, el nitrato de potasio al 0.2% fue el que indujo mayor porcentaje y velocidad de germinación de semillas, seguido del ácido giberélico a 50 ppm. Estos compuestos sustituyen a la luz en semillas fotoblásticas positivas y a la estratificación en semillas con requerimientos termoperiódicos (Malda et. al., 1999). La hidratación y el ácido giberélico a 10ppm presentaron porcentajes similares con un 58 y 56% de germinación respectivamente. Como se esperaba, el peor tratamiento fue el testigo, en él solo un tres por ciento logró germinar a los 30 días, razón por la cual es de suma importancia la utilización de compuestos que sustituyen la luz, los requerimientos termoperiódicos, la post-maduración en semillas con letargo y que aceleran la germinación (Figuras 1 y 2).

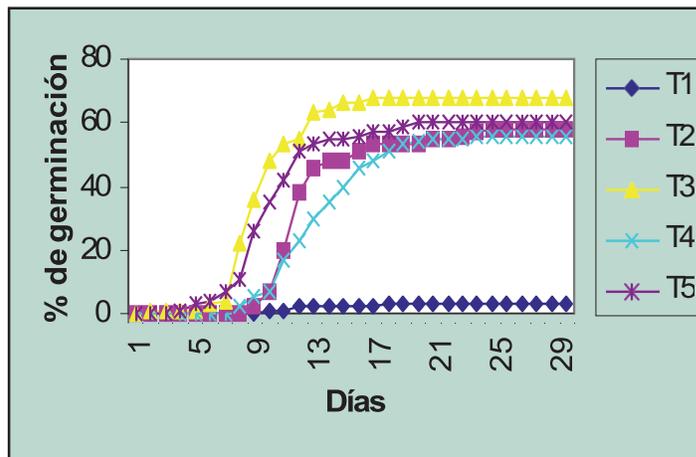


Fig. 1. Porcentaje de germinación de *Escobaria roseana* con diferentes tratamientos. T1= testigo; T2= hidratación, T3= KNO<sub>3</sub> T4= ac. giberélico 10ppm. T5= ac. giberélico a 50ppm

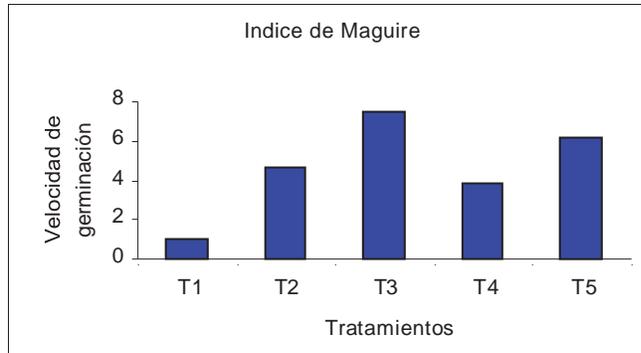


Fig.2. Velocidad de germinación de *Escobaria roseana* bajo diferentes tratamientos. T1= testigo; T2= hidratación, T3=  $\text{KNO}_3$  T4= ac. giberélico 10ppm. T5= ac. giberélico a 50ppm

El establecimiento del cultivo aséptico se obtuvo eficientemente colocando las plántulas procedentes de la germinación *in vitro* en medio MS adicionado con 30 g/l de sacarosa, 250  $\text{mg l}^{-1}$  de myo-inositol, 1  $\text{mg l}^{-1}$  de Tiamina-HCL, 1  $\text{mg l}^{-1}$  de Piridoxina-HCL, 8 g/l de agar y 3  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP. Durante la fase de micropropagación los mejores resultados se lograron con el tratamiento T3 que produjo un promedio de 7.2 brotes por explante. Seguido de T2 y T1 con 6.4 y 5.6 brotes por explante.

La utilización de citocininas para la propagación de cactáceas ha sido ampliamente manejada a diferentes rangos de concentración así como también en varias combinaciones. Mientras que la respuesta morfogénica dependió de factores biológicos (especie, tipo y tamaño de explante, edad del explante, nivel de concentración endógena de hormonas, formas de vida) y de factores ambientales (composición del medio de cultivo, número de subcultivos, tipo y concentración de reguladores de crecimiento, duración del contacto y condiciones de incubación (Clayton et. al. 1990 y Singh, 1999).

## Conclusiones

- El mayor porcentaje y velocidad de germinación de semillas de *E. roseana in vitro* se obtuvo al agregar nitrato de potasio al 0.2%.
- El establecimiento del cultivo aséptico de *E. roseana* se obtuvo colocando las plántulas procedentes de la germinación *in vitro* en medio MS adicionado con 30  $\text{gl}^{-1}$  de sacarosa, 250  $\text{mg l}^{-1}$  de myo-inositol, 1  $\text{mg l}^{-1}$  de Tiamina-HCL, 1  $\text{mg l}^{-1}$  de Piridoxina-HCL, 8  $\text{gl}^{-1}$  de agar y 3  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP.
- En el proceso de micropropagación de *E. roseana* fue eficiente al adicionar al medio MS 3 $\text{mg l}^{-1}$  de BAP + 2  $\text{mg l}^{-1}$  de KIN, con un factor de multiplicación de 7.2 brotes por planta.

## Literatura Citada

- Clayton, P. W., J.F. Hustenberg, G.C. Phillips and S. Ann Butler-Nance 1990. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactine. Soc. Hort. Sci. 115(2); 337-343.
- Malda, G. H. Suzán and R. Backhaus. 1999. In vitro culture as a potencial method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientist Horticulture 81: 71-87.
- Maquire, J. 1962. Crop. Science 2: 176-177. Speed of germination and in selection and evaluation for seed ling emergence and vigor.
- Rojas. Aréchiga, M., A. Orozco-Segovia, and C. Vazquez Yanes. 1997. Effect of light on the germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México. Journal of Arid Environments 36:571-578.
- Singh, B.B. 1999. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem). Lem. (Cactácea) from root explants. Scientia Horticulture 81: 337-344.