



## **Establecimiento *in vitro* de *Echeveria calycosa* Moran (*Crassulaceae*)**

María de Jesús Salgado Gutiérrez<sup>a</sup> y Eva Noemí Obledo Vázquez<sup>a</sup>,

<sup>a</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño de estado de Jalisco. Av. Normalistas # 800. Colinas de la Normal, Guadalajara Jalisco/ [salgado\\_g\\_maria@hotmail.com](mailto:salgado_g_maria@hotmail.com); [nobledo@ciatej.mx](mailto:nobledo@ciatej.mx) /Teléfono: (+52)-(33)-33455200.

### **1. INTRODUCCIÓN**

*Echeveria calycosa* Moran. Pertenece a la familia *Crassulaceae*. Son plantas que poseen hojas, tallos y raíces suculentas. El género *Echeveria* se caracteriza por tener sus hojas dispuestas en forma de roseta, haciéndolas muy apreciadas como plantas ornamentales, tanto en México como en el extranjero.

Se han reportado poblaciones en el cañón del río Cupatitzio en la localidad de Tinaja verde en el municipio de Uruapan, Edo de Michoacán. Al igual que otras especies del género presenta un lento crecimiento. Esto, aunado a la dificultad de su propagación y la pérdida de su hábitat natural debido al incremento en las actividades agrícolas en la región, la convierte en una especie cuya prevalencia está en riesgo.

Cuando se presentan problemas en la propagación normal de una planta se puede recurrir al cultivo *in vitro*, el cual consiste en producir pequeñas plantas completas sobre un medio de cultivo nutritivo, en condiciones estériles, partiendo de diferentes partes de la planta denominados "explantes".

El cultivo *in vitro* se compone de 4 etapas: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

En este trabajo se ha recurrido al cultivo *in vitro* con la finalidad de aumentar la tasa de propagación y prevalencia de *Echeveria calycosa*, utilizando explantes de hojas y tallos de plantas obtenidas de su hábitat natural. Se desarrolló un proceso de desinfección y se establecieron en condiciones de asepsia en medio de cultivo Murashige y Skoog, (MS) [1962], manteniéndolos en cámaras de incubación a temperatura e iluminación adecuada.

Al ser la contaminación microbiana el principal problema de pérdida de explantes durante la primera etapa del cultivo *in vitro*, que es la de establecimiento, y con la finalidad de incrementar el éxito en el establecimiento *in vitro* de explantes de *E. calycosa*, en este trabajo se evaluó el tratamiento fungicida de la planta donadora, el tipo de explante y su proceso de desinfección, sobre su porcentaje de contaminación y tiempo de sobrevivencia bajo condiciones de cultivo *in vitro*. El tratamiento de la planta donadora fue el factor que mayor influencia tuvo en la disminución de contaminación microbiana pasando de un 99 a un 15%. El tipo de explante que mostró mayor sobrevivencia, fueron las inflorescencias. Por lo tanto, se logró el establecimiento *in vitro* de *E. calycosa* utilizando como explantes rosetas e inflorescencias procedentes de una planta donadora con tratamiento fungicida y desinfectados con 1.5 % de cloro activo por 20 minutos. Con el establecimiento *in vitro*, se sientan las bases para inducir la proliferación de nuevas plantas de *E. calycosa* con métodos biotecnológicos y de esta forma contribuir a preservar esta especie endémica.



## 2. TEORÍA

Todas las especies que existen en nuestro planeta son esenciales para el buen funcionamiento de los ecosistemas, la desaparición de alguna de ellas es una pérdida irreparable, lo que nos lleva a proteger y conservar la biodiversidad.

Lamentablemente a pesar de que reconocemos el gran valor e importancia de la biodiversidad, la pérdida de esta es una realidad debido principalmente a actividades del ser humano, como son agricultura ganadería, urbanismo, sector industrial entre otros, siendo tan rápida que en la mayoría de los casos no se llega a conocer su importancia.

*E. calycosa* de la cual se han reportado poblaciones en el cañón del río Cupatitzio en la localidad de Tinaja verde en el municipio de Uruapan apreciada como planta de ornato de la cual se extraen ejemplares obtenidos directamente de su hábitat natural no es ajena al riesgo que llevan estas actividades por lo que es importante protegerla desarrollando protocolos de propagación asexual de *Echeveria calycosa* con fines comerciales y de conservación

### FAMILIA CRASSULACEAE

Del latín “*crassus*”= hoja gruesa; integrada por cerca de 1 400 especies repartidas en 35 géneros (Reyes y col., 2011), cultivadas ampliamente como ornamentales. México es el primer centro de diversidad a nivel mundial con aproximadamente 330 especies. En general, crecen mejor en zonas áridas y semiáridas y ambientes rocosos montañosos con climas templados (Reyes y col., 2011; Oviedo, 2003). Muchas están en peligro de extinción y la gran mayoría de los casos están pobremente documentados.

Distribuidas en 6 subfamilias colocadas en dos linajes, linaje *Crassula*, que incluye tres subfamilias (*Crassuloideae*, *Cotyledonoideae* y *Kalanchoideae*) y linaje *Sedum* – que incluye tres subfamilias (*Echeverioideae*, *Sedoideae*, y *Sempervivoideae*) (Hart, 1995; Carrillo y colaboradores 2009).

Las plantas *crasuláceas* se multiplican por dos vías distintas, principalmente por reproducción sexual mediante semillas y en menor proporción por vía vegetativa: esquejes, vástagos y hojas; ahorrándose el periodo de semilla hasta planta adulta, En esta forma de propagación la descendencia tiene los mismos genes que la planta madre. Muchas veces es la única forma de conservar la planta, sobre todo cuando no se cuenta con semillas (Uhl, 2008).

### GENERO ECHEVERIA

Grupo exclusivo de América. La Mayoría de las especies crecen mejor en las zonas templadas del Hemisferio Norte. Está conformado por 127 especies conocidas y registradas de las cuales el 83% se restringen exclusivamente al territorio Mexicano (Reyes y carrillo, 2011).

Las especies de este género muestran preferencia por sitios con afloramientos rocosos tales como riscos, laderas escarpadas, paredes más o menos verticales de cañadas y cañones.

Tienen la capacidad de almacenar agua en sus hojas en forma de jugos mucilaginosos, principalmente durante los periodos de humedad de ahí que sean llamadas plantas suculentas. Su forma más común es la de una roseta.

### *Echeveria calycosa*

Descubierta por el profesor Charles H. Uhl y su equipo de la Universidad de Cornell, al sur de Uruapan, Michoacán, en 1965, dándole el nombre de *calycosa* debido a su prominente cáliz (Moran 1967). Es una planta en forma de roseta, sin presencia de tallo. Debido a su aspecto, es una especie vegetal atractiva como planta de ornato, como puede observarse en la Figura 1.



Figura 1. Planta de *Echeveria calycosa* floreciendo.  
Fotografía tomada por MC I. García



Florece de julio a agosto, los tallos florales de color verde a rosa en la parte superior, de 0.5 a 2 dm de altura, de 1.5 a 5 mm de espesor en la base, los tallos florales senescentes suelen permanecer unidos a la planta por varias temporadas.

Existe muy poca información publicada sobre *E. calycosa*.- La que existe se centra en su descripción y el hábitat donde se localizó (Moran 1967). Se considera una planta delicada y difícil de propagar, de acuerdo a la experiencia que se tiene en nuestro laboratorio al trabajar con su propagación.

Cuando una especie presenta algún problema para su propagación o conservación se puede recurrir a la biotecnología vegetal.

Una de las ramas de la biotecnología vegetal que más se ha desarrollado es la propagación de especies vegetales conocida como micropropagación, que tiene como base principal el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, se aplica a la producción masiva de plantas comestibles, medicinales y ornamentales las cuales presentan un interés económico o biológico, resultando también una excelente alternativa para el rescate de especies vegetales en peligro de extinción.

El cultivo *in vitro* se divide en 4 etapas generales, Debergh y Maene (1981), sugirieron una etapa adicional conocida como etapa 0.

Las etapas consisten en lo siguiente:

**Etapas 0.-** Es el paso inicial de la micropropagación en que las plantas utilizadas para iniciar la propagación se cultivan bajo condiciones controladas. Esta etapa de pre-acondicionamiento de la planta donadora incluye establecer medidas para la reducción de contaminantes tanto superficiales como endógenos.

**1) Establecimiento.-** Consiste en mantener explantes en condiciones de cultivo *in vitro*, libres de microorganismos y de oxidación, desarrollándose en un medio de cultivo sintético. La razón por la que los explantes deben encontrarse libres de microorganismos, aun cuando en la naturaleza, éstos no sean patógenos e incluso puedan ser benéficos, es debido a que en el cultivo *in vitro* la planta cambia su metabolismo de autótrofo a mixotótrofo, es decir su actividad fotosintética se disminuye de manera significativa y la mayor parte de fuente de carbono lo constituye la sacarosa que es el componente mayoritario del medio de cultivo. Esta fuente de carbono es también una fuente de carbono para los microorganismos, los cuales independientemente de su nicho ecológico, tienen una tasa de propagación mucho mayor que las células vegetales y en consecuencia, pueden causar daño a los explantes como saprófitos. Por esta razón, los explantes deben pasar por un proceso de desinfección antes de sembrarse en el medio de cultivo previamente esterilizado.

**2) Propagación o multiplicación.-** En esta etapa, el explante establecido, entra en contacto con reguladores de crecimiento que inducen su multiplicación. Con medios de cultivo optimizados es posible lograr la propagación exponencial de las plantas.

**3) Enraizamiento.-** En esta etapa, las partes aéreas de las plantas se transfieren a medio de cultivo inductor de raíces y de esta forma lograr la obtención de plantas completas.

**4) Aclimatación.-** Durante ésta etapa las plántulas procedentes de cultivo *in vitro*, se adaptan a condiciones *ex vitro*. Deben recuperar su metabolismo autótrofo y dejar el mixotrofo.

Es por ello, que en este trabajo se tuvo el objetivo de establecer *in vitro* explantes de *E. calycosa*,



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

El tejido vegetal o explante utilizado consistió en hojas, tallos, raíces e inflorescencias de plantas de *E. calycosa* procedentes de su hábitat natural.

Los explantes se desinfectaron de acuerdo al protocolo publicado por Ramírez (2012) para la especie vegetal *graptopetalum amethystinum*. Para ello se utilizaron como explantes hojas, tallos, raíces e inflorescencias, las cuales al ser separadas de la planta primero se lavan con solución jabonosa; se enjuagan con agua destilada estéril para eliminar el exceso de jabón; se sumergen en etanol al 80 % durante un minuto y medio; se pasan a hipoclorito de sodio al 25% (cloro comercial) con dos gotas de tween 20 durante 25 min. Continuar en campana de flujo laminar: enjuagar tres veces en agua destilada estéril (2 min por enjuague) para eliminar el hipoclorito de sodio. ((Verategui, V. 2009))

Para obtener explantes con el menor número posible de microorganismos se diseñó un experimento bifactorial donde los factores fueron el tratamiento de la planta donadora y el tipo de explante. El tratamiento de la planta donadora tuvo dos niveles; con tratamiento antimicrobiano por X días previos a la obtención de los explantes y sin tratamiento antimicrobiano previo. El tipo de explante tuvo cuatro niveles; hoja, inflorescencia, tallo y raíz.

Los explantes que fueron sembrados en cajas Petri conteniendo medio de cultivo MS (Murashi y co. 1962) estéril libre de reguladores de crecimiento e incubados en una cámara de crecimiento con temperatura e iluminación controladas. La temperatura se mantuvo constante a 20°C y la iluminación con lámparas fluorescentes de luz de día se mantuvo un fotoperiodo de 16:8 luz/oscuridad diario. Las variables de respuesta fueron el número de explantes libres de contaminación y la calidad del explante. La calidad del explante se determinó utilizando una escala ordinal de 0 a 100 donde el explante con calidad inicial es un valor de 100 hasta 0 donde representa explante completamente blanco o contaminado.

Los resultados se analizaron utilizando ANOVA y la prueba de rangos múltiples de diferencia mínima significativa con apoyo del programa estadístico Statgraphics centurión XV.I, comparando plantas con tratamiento y sin tratamiento antimicrobiano y contaminación y calidad del explante con respecto al tipo de explante.

**Resultados.-** Los tres factores evaluados tuvieron influencia sobre el establecimiento *in vitro* de *E. calycosa*. El tratamiento de la planta donadora fue el factor de mayor influencia sobre su establecimiento *in vitro*. Al establecer el tejido vegetal de plantas obtenidas directamente de su hábitat natural sin un tratamiento para disminuir la cantidad de microorganismos, se perdió cerca del 99 % de los explantes por contaminación bacteriana y fúngica. Al aplicar el tratamiento antimicrobiano, la contaminación se redujo a 32.3% de los explantes (Figura 2), lo que demuestra la importancia de la etapa 0 en la propagación *in vitro* (Razdan, 2003).

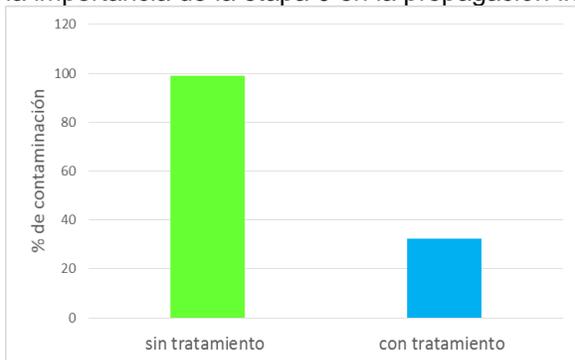
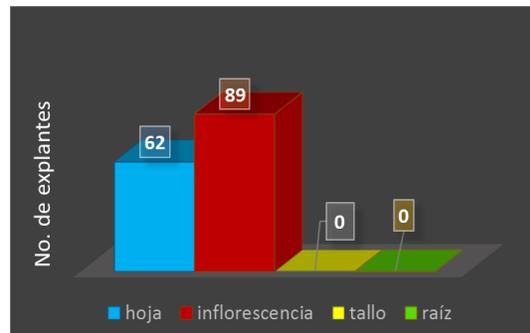


Figura 2.- Porcentaje de contaminación de explantes en plantas donadoras con y sin tratamiento antimicrobiano



Los explantes que presentaron la mayor sobrevivencia fueron la hoja y la inflorescencia con un 73.8 % y un 71.2%, respectivamente. Los explantes de raíz y tallo, no sobrevivieron, debido a que la disminución de la cuenta microbiana no fue suficiente para desinfectar los explantes (Figura 3).

Figura 3. – Sobrevivencia de *Echeveria calycosa* de acuerdo al tipo de explantes en la etapa de establecimiento.



Respecto a la calidad de los explantes establecidos *in vitro* se encontró que las inflorescencias mostraron los mayores niveles de calidad, seguidos de las hojas, como puede verse en la Figura 4.

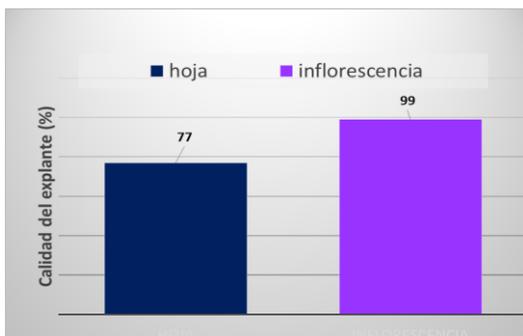


Figura 4 Calidad del explante.- medido de 0 a 100 donde 0 equivale a color blanco y 100 a verde como su condición inicial al ser retirado de la planta donadora.

#### 4. CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento *in vitro* de explantes de *E calycosa*

El tratamiento de la planta donadora fue el factor determinante que hizo posible realizar el establecimiento de explantes *in vitro*.

Las hojas fueron los explantes que mostraron el menor porcentaje de contaminación.

Las inflorescencias mostraron la mayor calidad del tejido de *E. calycosa* establecido *in vitro*.

El tratamiento de desinfección evaluado no eliminó la totalidad de los microorganismos presentes en tallos y raíces de *E. calycosa*.

Con los resultados de este trabajo se demostró que es posible mantener explantes de *E.calycosa* bajo condiciones de cultivo *in vitro* y de esta manera se completó la primera etapa de su propagación *in vitro*.

#### Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Fondo mixto CONACYT-Gobierno del estado de Michoacán, proyecto 193612.

Los autores agradecen al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a la estudiante de Maestría en Ciencias, María de Jesús Salgado Gutiérrez.



## BIBLIOGRAFÍA

1. H. Heart, Intrafamilial and generic classification of the *Crassulaceae*, Backhuys Publishers, Leiden (1995), páginas. 159 – 171.
2. R. P. Carrillo, Sosa, V., Mont, M. E., Molecular pylogeny of the Acre Clade (crassulaceae): Dealing with the lack of definitions for *Echeveria* and *Sedum Mol.*, *Phylogenet. Evol.* 53, (2009), 267-276.
3. P. M. Ramírez (2012), Protocolo de propagación in vitro para graptopetalum amethystinum (rose) E. Walther (crassulaceae), Universidad veracruzana; facultad de biología, (tesis de licenciatura en Biología).
4. V. M. Verastegui, Establecimiento de métodos de propagación vegetativa *in vivo* e *in vitro* de *Echeveria laui* (Crassulaceae), Tesis de licenciatura. Facultad de estudios superiores Iztacala, UNAM, (2009)
5. M. K. Razdan, Introduction to Plant Tissue Culture, Science Publishers, (2003), páginas 234- 235