



Comparación de la tasa de propagación *in vitro* y *ex vitro* de la especie endémica de Michoacán, *Echeveria purhepecha*

C. Ayala-González^a, E. N. Obledo-Vázquez^b,

^aEstudiante de Posgrado, Doctorado en Ciencia y Tecnología Programa Interinstitucional en Ciencia y Tecnología, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, cynthiaayala@hotmail.com

^bUnidad de Biotecnología Vegetal Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., nobleto@ciatej.mx

RESUMEN

Echeveria purhepecha es una especie vegetal endémica del estado de Michoacán, México. Fue descrita en el año 2011 y no se ha determinado, hasta la fecha, el estado de conservación de sus poblaciones silvestres. Por observaciones hechas en campo, se ha considerado como una especie en posible situación de vulnerabilidad ocasionada, principalmente, por el cambio de uso de suelo en su hábitat natural. Ante esta situación, es apremiante buscar herramientas que faciliten su conservación. El cultivo *in vitro* de especies vegetales es una herramienta que se ha utilizado en la conservación de especies en alguna categoría de riesgo. Esto ocurre sobre todo en especies cuya propagación sexual se torna difícil o cuya tasa de propagación vegetativa es baja. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue propagar *in vitro* y *ex vitro* la especie y comparar la cantidad de individuos propagados. Para ello, se propagó *E. purhepecha in vitro* y *ex vitro* a partir de tallos y de hojas. Para el cultivo *in vitro* se utilizaron sales MS, vitaminas MS, 30g/l de sacarosa, 4 mg/l de 6-Bencilamino purina, 0.2 mg/l de Ácido Indolacético y 8g/l de agar. Los cultivos se mantuvieron a 23°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz. Para el cultivo *ex vitro* se utilizó como sustrato musgo canadiense y tepojal 1:1. Los esquejes fueron tratados con el enraizador Clonex® y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero. La tasa de propagación de las plantas bajo condiciones de cultivo *in vitro* fue mayor respecto a las propagadas *ex vitro*. Por lo tanto, se concluye que para la propagación de *E. purhepecha* a partir de hoja y tallo, la herramienta de cultivo *in vitro* es más eficiente que la propagación *ex vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* de especies vegetales consiste en el establecimiento de material vegetal (tejido, semillas, células, embriones, meristemos, etc.) en medios de cultivos sintéticos dentro de contenedores estériles y aislados de elementos contaminantes creciendo bajo condiciones ambientales controladas. Entre las ventajas de este tipo de cultivo, encontramos que los ejemplares pueden permanecer libres de patógenos y que en el medio de cultivo se pueden incorporar reguladores de crecimiento que promueven la propagación vegetativa los cuales pueden acelerar la tasa de propagación en comparación con las condiciones bajo los cultivos tradicionales *ex vitro*. Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron: desarrollar un protocolo de propagación vegetativa *in vitro* por organogénesis directa mediante el empleo de los reguladores de crecimiento 6-Bencilamino purina y Ácido Indolacético y determinar si la propagación vegetativa *in vitro* presenta ventajas sobre la propagación vegetativa *ex vitro*.



2. TEORÍA

La familia Crassulaceae presenta una distribución cosmopolita, presentando una mayor diversidad de especies en Asia Central, Sudáfrica, la región del Mediterráneo y México (Reyes-Santiago, 2009). A esta familia pertenecen plantas suculentas ampliamente cultivadas como ornamentales debido a su arreglo foliar en forma de rosetas coloridas (Carrillo-Reyes *et al.*, 2009). Está integrada por unos 30 géneros y cerca de 1,400 especies (Carrillo-Reyes *et al.*, 2009; Reyes-Santiago, 2009) las cuales distribuyen en condiciones de clima semiárido y presentan adaptaciones a crecimiento en superficies rocosas (Byalt, 2011). Además de su uso ornamental, algunas especies de la familia han sido empleadas en la medicina tradicional. Entre las propiedades de las especies de esta familia se ha reportado que presentan propiedades antivirales (Berezin *et al.*, 2002), antihiperlipidémicas (Kamgang *et al.*, 2008) y espermicidas (Delgado *et al.*, 1999).

En México se han reportado entre 330 (Carrillo-Reyes *et al.*, 2009) y 350 especies (Reyes-Santiago, 2009) de crasuláceas, entre las que destacan los géneros *Echeveria*, *Pachyphytum*, *Graptopetalum* y *Sedum* (Carrillo-Reyes, 2009; Reyes-Santiago, 2009). 18 especies de crasuláceas presentes en México se encuentran en categoría de protección de acuerdo a la legislación ambiental mexicana en la NOM-059-SEMARNAT (SEMARNAT, 2011). De estas 18 especies, 12 son representantes del Género *Echeveria* del cual México es considerado como su centro de diversificación y endemismo. De las 140 especies del género *Echeveria* que se han descrito a nivel mundial, 95% se encuentran en México (Vázquez-García *et al.*, 2013) y constantemente se están describiendo nuevas especies cuyas poblaciones se encuentran en riesgo aun cuando no han sido incorporadas a la legislación ambiental mexicana. Ejemplo de ello son las especies *Echeveria cerrograndensis* (Nieves-Hernández, *et al.*, 2014) *Echeveria yalmanatlanensis* (Vázquez-García *et al.*, 2013), *Echeveria novogaliciana* (Reyes-Santiago *et al.*, 2011) y *Echeveria purhepecha* (García-Ruíz, 2011).

Echeveria purhepecha (Crassulaceae) fue descubierta para la ciencia en el año 2011 (García-Ruíz, 2011) y colectada en el Parque Nacional Pico de Tancitaro al norte del poblado de Nuevo San Juan Parangaricutiro a una altitud de 1900 msnm y dentro de un bosque de encino-pino, creciendo sobre rocas de origen volcánico y ocasionalmente como epífita sobre individuos de *Quercus* spp. (García-Ruíz, 2011). Debido a que *E. purhepecha* es una especie recientemente descrita, se desconoce la situación de sus poblaciones silvestres, pero, por observaciones hechas en campo por su descriptor (García-Ruiz, comunicación personal), probablemente se encuentre en alguna situación de riesgo ya que su distribución parece ser limitada.

La biotecnología vegetal constituye una herramienta para complementar las acciones enfocadas a la conservación *ex situ* de especies vegetales, sobre todo de aquellas que están en peligro de extinción (Fay, 1992; Sarasan *et al.*, 2006; Barnicoat *et al.*, 2010). Estas técnicas resultan de mayor importancia sobre todo cuando el material vegetal disponible bajo condiciones ambientales es escaso o las tasas de propagación vegetativa o sexual son bajas (Kitamura *et al.*, 2002). Es por esto, que en jardines botánicos se cuenta con laboratorios de biotecnología vegetal para la propagación y conservación de especies vegetales (Fay, 1992). En el laboratorio de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, se ha trabajado en los últimos años con la especie *Echeveria purhepecha* realizando estudios enfocados en la propagación de esta especie. De estudios previos realizados, en este laboratorio, con distintos reguladores de crecimiento, se logró determinar los tipos de reguladores de crecimiento potenciales para la promoción de la organogénesis directa en la especie.



Sin embargo, se requería determinar si el establecimiento *in vitro* presentaba ventajas sobre el establecimiento *ex vitro*.

Al ser *Echeveria purhepecha* una especie endémica descubierta recientemente y cuyo hábitat natural está expuesto a amenazas por cambio de uso de suelo, su propagación y conservación es apremiante desarrollar un método de propagación vegetativa *in vitro* que promueva su propagación por organogénesis directa.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron explantes de hoja y tallo de ejemplares adultos de *E. purhepecha*, procedentes de semillas bajo condiciones de cultivo *in vitro* y *ex vitro*.

El establecimiento de hojas y tallos bajo condiciones *in vitro* se realizó mediante la desinfección del material vegetal de acuerdo al método descrito por Verastegui (2009) y Ramírez-Portilla (2012). Se utilizaron rosetas de *E. purhepecha* las cuales se lavaron con jabón líquido (AXION®) y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente, en condiciones de asepsia, dentro de una campana de flujo laminar, las rosetas fueron sumergidas (sin raíces) en etanol al 80% durante 90 segundos en agitación constante utilizando un agitador magnético, en seguida el material fue enjuagado con agua estéril durante 5 minutos para retirar el exceso de alcohol y las rosetas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 25% (Cloralex®) con dos gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución y 8 gotas de Microdyn® por cada litro de agua. Los explantes se mantuvieron en agitación constante durante 25 minutos, y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (2 minutos por enjuague) para eliminar el hipoclorito de sodio. Los explantes desinfectados se sembraron en medio de cultivo con sales MS (SIGMA), vitaminas MS (SIGMA), 30g/l de sacarosa, 4 mg/l de 6-Bencilamino purina, 0.2 mg/l de Ácido Indolacético y 8g/l de agar. Los cultivos se mantuvieron a 23°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz. El tratamiento fue realizado presentando 8 réplicas.

El establecimiento *ex vitro* se realizó mediante el corte de esquejes de tallo con hojas de *E. purhepecha* y hojas obtenidas de ejemplares adultos originalmente provenientes de semilla. Tanto los tallos como las hojas fueron retirados de la planta adulta e inmediatamente después del corte, la herida de los esquejes fue tratada con enraizador Clonex® y los esquejes fueron sembrados en sustrato previamente esterilizado y constituido por musgo canadiense y tepojal (1:1), los esquejes fueron mantenidos bajo condiciones de invernadero aplicando durante las dos primeras semanas dos riegos semanales.

Tanto para el cultivo *in vitro* como para el cultivo *ex vitro* se hicieron mediciones semanales durante 30 días después de haber realizado la siembra. Se registró la presencia de raíz, la longitud de la raíz más larga, la presencia de brotes y la cantidad de brotes.

Propagación *in vitro* hojas

Se desarrolló un protocolo de propagación *in vitro* eficiente para la especie *E. purhepecha*. Los explantes de hoja desarrollaron explantes a partir de los 27 días de cultivo. Las hojas presentaron zonas de crecimiento múltiple en donde varias yemas foliares pudieron ser observadas en cada zona. El método de desinfección resultó agresivo para los tejidos. Al respecto podemos mencionar que las hojas soportan mejor la manipulación a diferencia que los tallos, ya que en todos los tallos se observó oxidación de tejidos a diferencia de las hojas, además se observa un menor porcentaje



de contaminación en las hojas *in vitro* (ver Tabla 1) en comparación con los tallos. El método de desinfección resultó agresivo para hojas pequeñas y delgadas las cuales se oxidaron y no sobrevivieron, en su mayoría, al tratamiento de desinfección. Para el caso específico de esta especie, y a diferencia de lo reportado para la especie *Echeveria laui* (Verastegui *et al.*, 2009), las mejores hojas resultaron las hojas más grandes, las cuales comúnmente pueden ser las hojas de ubicación más basal en el tallo de la planta. En ninguno de los casos, se pudo apreciar el desarrollo de callo. La ausencia de callo es una condición considerada como favorable para la conservación de especies silvestres ya que se evita la variación somaclonal. Al comparar los datos con la propagación *ex vitro* de hojas se observó que la propagación *in vitro* es más eficiente que la *ex vitro*. La respuesta *in vitro* resultó más rápida que la respuesta *ex vitro* ya que se observaron la aparición de yemas foliares a partir de los 17 días en caso de los tallos y 27 en caso de las hojas establecidas *in vitro* a diferencia de los 30 días que se requirieron en los tallos *ex vitro*. Con base al ANOVA, se encontró que el tratamiento *in vitro* en esquejes de hojas presentó una influencia altamente significativa sobre los puntos múltiples de crecimiento a diferencia del cultivo *ex vitro*. Presentando un valor de $P=0.000$. La prueba de rangos múltiples mostró que el tratamiento esquejes de hoja *in vitro* fue distinto al *ex vitro* con una media de 2 puntos de crecimiento múltiple a diferencia de 0 puntos de crecimiento múltiple en el cultivo *ex vitro* a los 17 días de cultivo (ver Fig. 1).

Propagación *ex vitro* hojas

Durante el periodo de observación de 30 días, las explantes de hoja *ex vitro*, no presentaron ningún tipo de respuesta, no se logró observar desarrollo de hojas o raíces a lo largo del experimento (ver Fig. 1).

Propagación *in vitro* tallos

Los tallos *in vitro* respondieron rápidamente al tratamiento presentando desarrollo de yemas a partir de los 17 días. Sin embargo, la totalidad de los tallos presentaron oxidación y presentaron un mayor porcentaje de contaminación que los explantes de hojas *in vitro* (ver Tabla 1). En caso de que los tallos sobrevivan al proceso de oxidación seguramente producirán una mayor cantidad de yemas foliares. Sin embargo, la manipulación resulta más complicada que la de hojas, ya que el 21% de los tallos presentaron contaminación a diferencia de las hojas, al igual el 100% de los tallos presentaron oxidación a diferencia de un 18% de oxidación en las hojas.

Al comparar la producción de yemas foliares entre los tallos *in vitro* sobre los tallos *ex vitro*, obtuvimos resultados similares a los encontrados en las hojas. Con base al ANOVA se encontró que el tratamiento *in vitro* en esquejes de tallo presentó una influencia altamente significativa sobre los puntos múltiples de crecimiento a diferencia del cultivo *ex vitro*; presentando un valor de $P=0.00$. ($P=0.0503$) La prueba de rangos múltiple mostró que el tratamiento esquejes de tallo *in vitro* fue distinto al *ex vitro* con una media de 1.6 puntos de crecimiento múltiple a diferencia de 0 puntos de crecimiento múltiple para el tratamiento de esquejes de tallo *ex vitro* (ver Fig. 1).

Propagación *ex vitro* tallo

Para el caso de los esquejes de tallo *ex vitro* se observó la aparición de raíces a partir de los 15 días y se pudieron observar pequeñas yemas foliares a partir de los 30 días, a diferencia del cultivo *in vitro*, cuyos brotes pudieron observarse a partir de los 17 días en el caso de los tallos. Los esquejes de tallo *ex vitro*, presentaron a los 30 días zonas de crecimiento único en donde se observó una yema por zona de crecimiento.



La velocidad de propagación *in vitro* de *E. purhepecha* fue mayor que la reportada para otras crasuláceas como *Echeveria laui* (Verastegui et al., 2009) y *Graptopetalum amethystinum* (Ramírez-Portilla, 2012) y menor que la reportada para *Kalanchoe tomentosa* (Khan et al., 2006).

Tabla1. Porcentajes de contaminación y oxidación presentadas *in vitro*

Tipo de explante y tratamiento	Porcentaje oxidación	Porcentaje contaminación
Hojas <i>in vitro</i>	18%	8%
Tallos <i>in vitro</i>	100%	21%

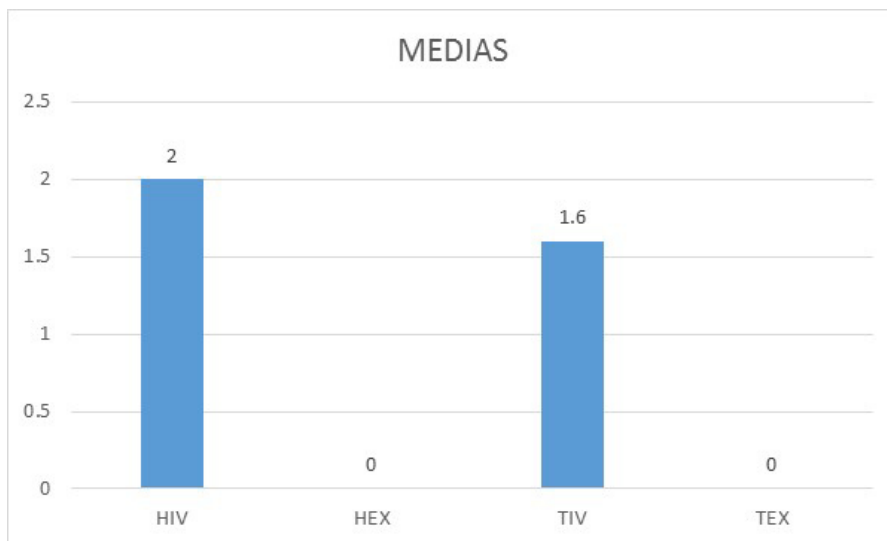


Fig.1 Comparación de las medias con respecto a las zonas de crecimiento múltiple. HIV=Hojas *in vitro*, HEX =Hojas ex vitro, TIV= Tallos *in vitro*, TEX= Tallos ex vitro

El método de propagación *in vitro* desarrollado en el presente trabajo es idóneo para la conservación de la especie ya que no presenta la formación de callo lo cual evita la variación somaclonal y es un requisito deseado en los proyectos de conservación de especies silvestres.



4. CONCLUSIONES

De este trabajo, se concluye que el cultivo *in vitro* para *E. purhepecha* es más eficiente que el cultivo *ex vitro*

A diferencia de otras especies del género, para esta especie es mejor emplear las hojas más grandes para su establecimiento *in vitro* ya que resisten mejor a la manipulación por desinfección. Los mejores explantes para el establecimiento *in vitro* resultaron las hojas.

El empleo de los reguladores de crecimiento: 6-Bencilaminopurina y Ácido Indolacético (concentraciones 4 mg/l y 0.2 mg/l respectivamente) indujo organogénesis directa de *E. purhepecha*.

BIBLIOGRAFÍA

1. H. Barnicoat, R. Cripps, J. Kendon, V. Sarasan, "Conservation in vitro of rare and threatened ferns –case studies of biodiversity hotspot and island species", *In Vitro Cell.Dev.Biol. –Plant*, Vol. 47, 2011, 37-45.
2. V.E. Berezin, A. P. Bogoyavlenskii, V. P. Tolmacheva, D. Y. Korul'KIN D. Y., S. S. Khudyakova, S. V. Levandovskaya, "Antiviral activity of preparations from herbs of the Crassulaceae family", *Pharm. Chem. J.*, Vol 36, 10, 2002, 546-547. 2002.
3. P. Carrillo-Reyes, V. Sosa, M. E. Mort, "Molecular phylogeny of the Acre clade (Crassulaceae): Dealing with the lack of definitions for *Echeveria* and *Sedum*", *Molecul. Phylogenet. Evol.*, Vol 53, 2009, 267-276.
4. N. M. Delgado, J. Taboada, A. Ortega A., H. Merchant-Larios, M. L. Sánchez Vázquez G. Ramírez, R. Reyes, "Effects of a purified fraction from *Echeveria gibbiflora* aqueous crude extract on guinea-pig spermatozoa", *Phytother. Res.*, Vol. 12, 1999, 46-49.
5. M. F. Fay, "Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods", *In Vitro Cell. Dev. B-Pl.*, Vol. 28, 1, 1992, 1-4.
6. I. García-Ruiz, "Nueva especie de *Echeveria* (Crassulaceae) del centro-occidente de Michoacán, México", *Rev. Mex. Biodivers.*, Vol. 82, 2001, 63-67.
7. R. Kamgang, R. Y. Mboumi, A. F. Fondjo, M. A. F. Tagne, G. P. R. N'dillé, J. N. Yonkeu, "Antihyperglycaemic potential of the water-ethanol extract of *Kalanchoe crenata* (Crassulaceae)", *J. Nat. Med.*, Vol 63, 2008, 34-40.
8. S. Khan, S. Naz, K. Alli, S. Zaidi, "Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot-tips", *Pak. J. Bot.*, 38, 4, 2006, 977-981.
9. Y. Kitamura, K. Kubo, L. u. Rahman, T. Ikenaga, "Reproduction of *Sedum drymarioides*, an Endangered Rare Species, by Micropropagation", *Plant Biotechnol.*, 19, 5, 2002, 303-309



10. J. Reyes-Santiago, C. Gomez-Lozano, E. Sanchez-Martinez, A. E. Molina-Marquez, R. Romero-Aparicio, S. Sarabia-Hernandez, M. P. Contreras-Garcia, D. E. Perez-Torres, S. Galvan, J. A. Mendoza-Gutierrez, "Conservación y restauración de cactáceas y otras plantas suculentas mexicanas". Manual Práctico; 2009.
11. J. Reyes-Santiago, I.C. Brachet, O. González-Solorzano, "*Echeveria novogaliciana*, una nueva especie de la familia Crassulaceae para los estados de Aguascalientes y Jalisco, México", *Cact. Suc. Mex.*, Vol.56, 3, 2011, 82-95.
12. G. Nieves-Hernández, J. A. Vázquez-García, M. A. Muñoz-Castro, M. Cházaro-Basáñez, "*Echeveria cerrograndensis* (Crassulaceae) a new species from Eastern calcareous Sierra de Manantlán, Colima, Mexico", *Phytotaxa*, Vol. 172, 3, 2014, 247-255.
13. M. S. Ramírez-Portilla, "Protocolo de propagación *in vitro* para *Graptopetalum amethystinum* (Rose) E. Walther (CRASSULACEAE)", Tesis en Licenciatura en Biología, Universidad Veracruzana, México, 2012, 32 p.
14. W. Sarasan, R. Cripps, M. M. Ramsay, C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast, J. K. Rowntree, "Conservation in vitro of threatened plants –progress in the past decade", *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant*, Vol. 42, 2006, 206-214.
15. J. A. Vázquez-García, D. Jimeno-S., R. Cuevas-G, M. Cházaro-B., M. A. Muñoz-Castro, "*Echeveria yalmanantlanensis* (Crassulaceae): A new species from Cerro Grande, Sierra de Manantlán, western Mexico", *Brittonia* Vol. 65, 3, 2013, 273-279.
16. M. A. Verastegui, "Establecimiento de métodos de propagación vegetativa in vivo E in vitro de *Echeveria laui* (CRASSULACEAE)", Tesis en licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, 2009, 65 p.