

**Germinación in vitro de Dendrocereusnudiflorus (Wright) Britton & Rosey aclimatización de plantas.**

**In vitro germination of Dendrocereusnudiflorus (Wright) Britton & Rosey plant acclimatization.**

**Autores:** MSc. Ibian Leyva-Miguel, MSc. Yulien Miguelez-Sierra, MSc. Adileida Mengana-Fresco, Ing. Livan Rivero-Martínez, Ing. Grabiél Céspedes-Correa

**Organismo:** Facultad Agroforestal, Universidad. Jamaica. Guantánamo. Cuba.

**E-mail:** [ibian@cug.co.cu](mailto:ibian@cug.co.cu), [yulien@cug.co.cu](mailto:yulien@cug.co.cu)

**Resumen.**

Se establece una metodología para la propagación *in vitro* de *Dendrocereusnudiflorus*, especie cactácea endémica de Cuba en peligro de extinción. Se evaluó la desinfección de semillas con hipoclorito de sodio 20 % y 40 % (v/v) y el medio de cultivo MS (25 % y 50 % de sales). En la fase de aclimatización se evaluaron diferentes proporciones de suelo y estiércol ovino (3:1, 5:1 y 7:1) combinado o no con micorriza *Rhizophagusintraradices*. Se obtuvo porcentajes de germinación de 98 % a los 45 días de la siembra. El medio MS con sales al 25 % favoreció el índice de valor germinativo. En la aclimatización se obtuvo un porcentaje de supervivencia promedio de 76 % a los 30 días sin diferencias entre tratamientos. Estos resultados indican que el método de cultivo in vitro desarrollado puede ser una vía para la recuperación de la especie.

**Palabras clave:** *Dendrocereusnudiflorus*; germinación in vitro; cultivo in vitro

**Abstract.**

A methodology is established for the in vitro propagation of *Dendrocereusnudiflorus*, endemic cactus species of Cuba in danger of extinction. The disinfection of seeds with 20% and 40% sodium hypochlorite (v / v) and the MS culture medium (25% and 50% salts) were evaluated. In the acclimatization phase, different proportions of soil and sheep manure (3: 1, 5: 1 and 7: 1) were evaluated, combined or not with *Rhizophagusintraradic* mycorrhiza. Germination percentages of 98% were obtained 45 days after sowing. The MS medium with 25% salts favored the germination value index. In acclimatization an average survival percentage of 76% was obtained at 30 days without differences between treatments. These results indicate that the in vitro culture method developed may be a route for the recovery of the species.

**Keywords:** *Dendrocereusnudiflorus*; in vitro germination; in vitro culture

## **Introducción.**

En Cuba se encuentra la mayor diversidad de cactus del Caribe con aproximadamente 50 especies, de las cuales 33 son endémicas (Barrios *et al.*, 2015). Sin embargo, de acuerdo con la Lista Roja de Plantas Vasculares Cubanas, existen 10 especies de cactus en Peligro Crítico, cuatro Amenazadas y tres Vulnerables (Berzaín *et al.* 2005). Entre las especies en peligro se encuentra *Dendrocereusnudiflorus*, considerado un elemento único de la flora cubana al ser el mayor cactus arborescente del mundo. Es un cactus longevo que puede vivir más de 500 años y posee los frutos más grandes de todas las cactáceas (González-Oliva, 2016). Casi todos los individuos de esta especie son maduros y no se observan ejemplares juveniles (Areces, 1997) lo cual indica que la regeneración natural es baja. La reproducción de la especie es a partir de la germinación de semillas, lo cual es de gran importancia en el mantenimiento de la diversidad genética de las especies (Amador *et al.*, 2013).

Una alternativa eficaz para solventar los problemas de germinación es el cultivo *in vitro* de semillas que permite obtener plantas bajo condiciones físicas y químicas controladas (Cedrét *et al.*, 2015). Esta técnica se ha empleado con éxito en la propagación de numerosas especies de cactus endémicos cubanos. Por ejemplo, en *Pilosocereusrobinii* y *Melocactusactinacanthus*, se logró 91,4 % y 81,4 % de germinación, respectivamente, Quiala *et al.*, (2003); Quiala *et al.*, (2004). En *Hylocereusmonacanthus* el porcentaje de germinación de las semillas fue del 70 %, Belem *et al.*,(2016) y en especies del género *Turbincarpus* se logró hasta el 85 % de germinación *in vitro*, De la Rosa *et al.*, (2012).

El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología para la propagación *in vitro* de *Dendrocereusnudiflorus*(Wright) Britton& Rose a partir de la germinación de semillas, de forma que se obtengan plantas para la recuperación y conservación de la especie.

## **Desarrollo.**

Materiales y métodos

### **Recolección de los frutos**

Los frutos se seleccionaron en bosque siempre verde micrófilo en la Reserva Ecológica de Baitiquirí, perteneciente al municipio San Antonio del Sur, provincia Guantánamo, en enero de 2016. El suelo donde se desarrolla la especie es Pardo SialíticoÓcrico según, Hernández *et al.*, (2015). El clima es seco, la temperatura promedio anual es de 25,45 °C y las precipitaciones promedio son de 756,3 mm<sup>3</sup> anuales, CITMA, (2016).

### **Germinación *in vitro* y establecimiento**

El experimentito se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Guantánamo entre los meses de enero del 2016 a junio de 2017. Los frutos se lavaron con abundante agua y se extrajeron las semillas. Se realizaron cuatro lavados a las semillas con agua corriente para eliminar los tejidos del fruto. Para la desinfección de las semillas se lavaron con solución de detergente comercial al 1 % (p/v) y se introdujeron en etanol al 70 % (v/v) por 2 min. En la desinfección final se utilizó el hipoclorito de sodio (NaOCl) a dos concentraciones 20

% v/v y 40 % v/v por 20 minutos en ambos casos. Las semillas se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril en la cabina de flujo laminar.

Se empleó el medio de cultivo Murashige y Skoog, (1962) (MS) suplementado con sacarosa 30 g/L, mioinositol 0,1 g/L y gelificado con Agar Planta (Duchefa, Biochimie) 8 g/L. Se evaluaron dos concentraciones de sales del medio de cultivo MS, 25 % y 50 % para el cultivo de semillas provenientes de los dos métodos de desinfección aplicados de forma que se combinó la concentración de sales del medio de cultivo y los métodos de desinfección (tabla1). Las semillas se colocaron en frascos de vidrio de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo. Se sembraron 10 semillas en cada frasco con 5 réplicas por tratamiento.

**Tabla 1** Tratamientos para el establecimiento y germinación *in vitro* de la especie.

Trat.	% de MS	Desinfección	Trat.	% de MS	Desinfección
<b>IA</b>	50 %	NaOCl 20 % v/v	<b>IIA</b>	25 %	NaOCl 20 % v/v
<b>IB</b>	50 %	NaOCl 40 % v/v	<b>IIB</b>	25 %	NaOCl 40 % v/v

Las plantas se mantuvieron 60 días en cámara de crecimiento a temperatura de  $26 \pm 1$  °C, fotoperiodo 16 h/8 h (luz/oscuridad) y  $23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de flujo de fotones fotosintéticos.

Se evaluaron el porcentaje de germinación y el índice de valor germinativo (VG). El porcentaje de germinación se evaluó semanalmente hasta los 45 días. Para el índice de valor germinativo se obtuvo un solo valor numérico, de acuerdo a las sumas acumuladas de los cocientes obtenidos de dividir el porcentaje de germinación sencillo alcanzado en cada conteo cada 7 días, entre los 45 días transcurridos desde la siembra. Se determinó a los 45 días de la siguiente forma:

$$VG = C \cdot CI/dl,$$

Donde: C: Constante de transformación porcentual (100/número de semillas utilizadas como tamaño de la muestra), CI: Semillas germinadas en la evaluación el día que indica el subíndice i, dl: Días transcurridos desde la siembra hasta el día evaluado que indica el subíndice i.

A los 60 días de germinadas las semillas, se evaluó el crecimiento y desarrollo en las plantas del tratamiento con mejores resultados para conocer las características de las plantas obtenidas. Las variables seleccionadas fueron número de areolas y la longitud de cada brote.

### **Aclimatización**

Las plantas germinadas de 60 días de edad se extrajeron de los recipientes de cultivo y sus raíces se lavaron con abundante agua para eliminar el exceso de medio de cultivo. Luego se transfirieron a la casa verde y se sembraron en bolsas de polietileno de 20x10 cm con sustrato compuesto por diferentes proporciones de suelo y de materia orgánica con un 5 % de arena para evitar el encharcamiento. La composición de los sustratos fue de las proporciones 3:1, 5:1 y 7:1 (suelo: materia orgánica) y se combinaron con la aplicación de micorriza *Rhizophagus intraradices* Schübler y Walker a una concentración de 35 esporas por gramos de suelo para conformar los diferentes tratamientos (tabla 2). La aplicación del inóculo se realizó en

las raíces de cada planta antes de la siembra en el sustrato según correspondía a los tratamientos. El riego se realizó con una frecuencia de una vez cada tres días.

**Tabla 2** Tratamientos evaluados en la fase de aclimatización

Tratamientos	Sustrato	Micorriza	Tratamientos	Sustrato	Micorriza
<b>IA</b>	7:1	Sí	<b>IB</b>	7:1	No
<b>IIA</b>	5:1	Sí	<b>IIB</b>	5:1	No
<b>IIIA</b>	3:1	Sí	<b>IIIB</b>	3:1	No

### **(Suelo: materia orgánica)**

Se utilizó un suelo Pardo Sialítico según la Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba (Hernández *et al.*, 1999), con un pH: 6,97, % de materia orgánica: 2,80, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:4,926 mg 100 g<sup>-1</sup>, calcio: 39,70 Cmol<sup>+</sup>. kg suelo<sup>-1</sup>, Magnesio: 7,88 Cmol<sup>+</sup>. kg suelo<sup>-1</sup>, sodio: 1,32 Cmol<sup>+</sup>. kg suelo<sup>-1</sup>, potasio: 0,64Cmol<sup>+</sup>. kg suelo<sup>-1</sup>.

Las plantas crecieron en condiciones de casa verde con fotoperíodo 16 h/8 h (luz/oscuridad), 22-29 °C, 50-60 % de humedad relativa y 119,85 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de flujo de fotones fotosintéticos. Se evaluó el porcentaje de supervivencia a los 15 y 30 días.

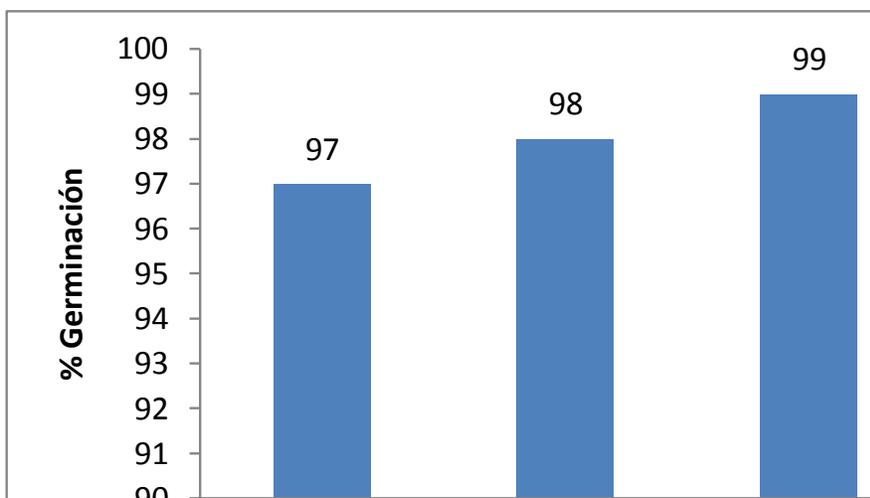
### **Análisis estadístico**

Los datos en porcentajes se analizaron mediante comparación de proporciones en el programa estadístico COMPARPRO 1.0 (Font *et al.*, 2007). El análisis del valor germinativo se efectuó a partir de un diseño factorial en bloques completamente al azar donde el factor A es la concentración de sales del medio de cultivo y el factor B el método de desinfección. Se utilizó el programa SPSS Versión 17.0. Se realizó el ANOVA y la prueba de Tukey para detectar las diferencias entre medias a p<0,05.

### **Resultados y discusión**

#### **Germinación *in vitro* y establecimiento**

La germinación de las semillas ocurrió de forma gradual en todos los tratamientos. Inició a los 17 días en el tratamiento IIA con la menor concentración de sales (25 %) e hipoclorito de sodio al (20 % v/v). Entre los 25 y los 35 días se observó un incremento notable en el número de semillas germinadas. Después de 35 días ocurrió la germinación del resto de las semillas y a los 45 días el porcentaje de germinación estuvo entre 97 y 99 % sin diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (figura 1).



**Figura 1** Porcentaje de germinación de las semillas de *Dendrocereus nudiflorus* en cada tratamiento a los 45 días en cultivo.

Estos resultados expresan que los dos métodos de desinfección y las dos concentraciones de sales empleadas tuvieron un efecto similar en el porcentaje de germinación de las semillas de *Dendrocereus nudiflorus*. De esta forma se evidencia que los procedimientos empleados favorecieron un alto porcentaje de germinación. No hubo contaminación por hongos ni bacterias provenientes de las semillas lo cual permitió una mayor supervivencia y germinación.

Rodríguez *et al.*, (2013) obtuvieron que la especie de cactus *Escobariacubensis* completó su germinación a los 15 días de la siembra en medio de cultivo MS. Sin embargo, para especies amenazadas del género *Turbinicarpus* la germinación estuvo entre los 12 y 60 días según, De la Rosa *et al.*,(2012).

La germinación de semillas *in vitro* se ha empleado para la propagación de varias cactáceas endémicas de Cuba. El medio de cultivo MS ha sido ampliamente usado con este fin. En *Pilosocereus robinii* se logró el 91,4 % de germinación con un 50 % de sales en el MS Quiala *et al.*, (2003), Montalvo *et al.*, (2004) lograron un porcentaje de germinación del 94,4 % en *Pilosocereus sp.*, con el empleo de 25 % de las sales en el MS. En *Melocactus actinacanthus* se obtuvo 81,4 % de germinación con una concentración de 25 % de sales Quiala *et al.*,(2004). En *Hylocereus monacanthus* el porcentaje de germinación de las semillas fue del 70 % con 50 % de las sales en el MS, Belem *et al.*,(2016).

Otras especies de la familia como *Opuntia ficus-indica* y *Peleciphora aselliformis* tuvieron una germinación *in vitro* exitosa con el medio MS completo, Badalament *et al.*, (2016).

Al analizar los resultados del índice de valor germinativo, hubo efecto significativo del factor concentración de sales del medio y de la interacción entre este factor y el método de desinfección (tabla 3). El factor método de desinfección no tuvo efecto significativo. La concentración de sales más baja (25 %) favoreció mayores valores germinativos con un máximo de 4,25 en el tratamiento de 25 % de sales y 20 % de desinfectante. Este resultado indica la calidad de la germinación expresada en un mayor número de semillas germinadas, en menor tiempo y con mayor uniformidad.

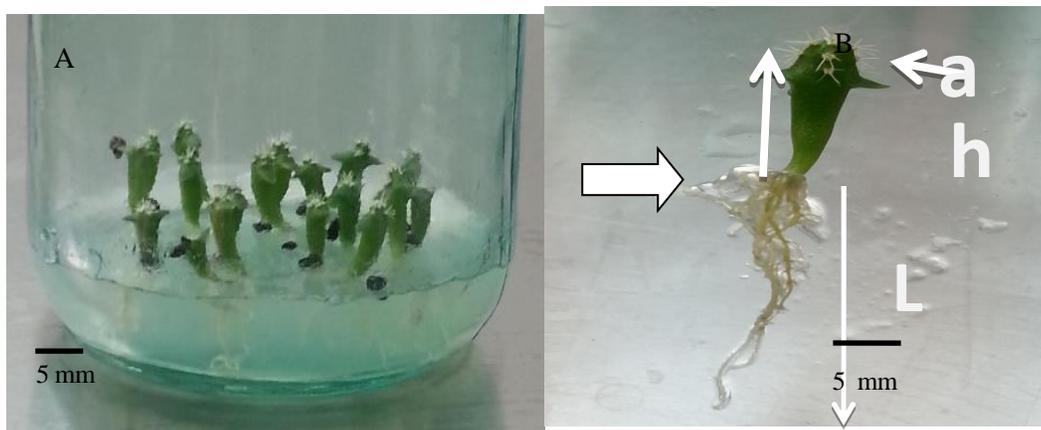
**Tabla 3** Valor germinativo para cada tratamiento a los 45 días de la siembra de las semillas en medio de cultivo.

Tratamiento	Valor germinativo
IA	3,03 b $\pm$ 0,38
IB	3,10 ab $\pm$ 0,34
IIA	4,25 a $\pm$ 0,70
IIB	3,36 ab $\pm$ 0,31
interacción	*
Concentración de sales	*
Método de desinfección	ns

Medias con letras iguales no tienen diferencias significativas, Prueba de Tukey a  $p < 0,05$ .

La disminución de la concentración de sales es favorable para la germinación de semillas en general por su menor efecto osmótico y tóxico. En el caso de las cactáceas se ha reportado una mejor respuesta con la reducción de las sales en el medio. Rodríguez *et al.* (2013) obtuvieron que el porcentaje de germinación de *Escobariacubensis* en un medio MS al 25 % de sales fue de 95,6 % y para el MS al 100 % fue de 36,5 %. Para especies del género *Turbinicarpus* según De la Rosa *et al.* (2012) el porcentaje de germinación varía desde el 85 % hasta el 35 % con un 25 % y 50 % de sales, respectivamente.

En cuanto al crecimiento de las plantas germinadas *in vitro*, a los 60 días en cultivo presentaban una zona apical con 8 areolas, 0,8 cm de longitud y un sistema radicular bien desarrollado con 4 raíces y 1,5 cm de longitud de la raíz principal (figura 2).



**Figura 2.** Desarrollo *in vitro* de las plantas de *D. nudiflorus* a los 60 días de la siembra de semillas en el medio de cultivo. A) Germinación de las semillas, B) Características de las plantas obtenidas: a-areolas, l- largo de la raíz, h-altura del brote.

Estos resultados muestran que los tratamientos usados para la germinación de semillas permitieron no sólo el inicio de la germinación sino que se logró el crecimiento continuo de los brotes por lo que la fase de establecimiento a partir de semillas fue exitosa.

## Aclimatización

### Porcentaje de supervivencia

En la fase de aclimatización *ex vitro* de las plantas obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de semillas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Los porcentajes de supervivencia estuvieron entre 73-93 % a los 15 días con una media de 85 %; a los 30 días estuvo entre 63-90 % con una media de 76 % (figura 3).

Los resultados muestran que el uso de diferentes sustratos con proporciones de suelo y materia orgánica y la aplicación de micorrizas no tuvo un efecto significativo en la supervivencia a los 15 y 30 días. Este efecto puede deberse a que la aplicación de micorriza a base de esporas del hongo es muy lenta porque se necesita la germinación de la espora. Además, la plántula viene de un sustrato con alto contenido de nutrientes en la fase *in vitro*, de modo que la colonización micorrícica es más lenta.

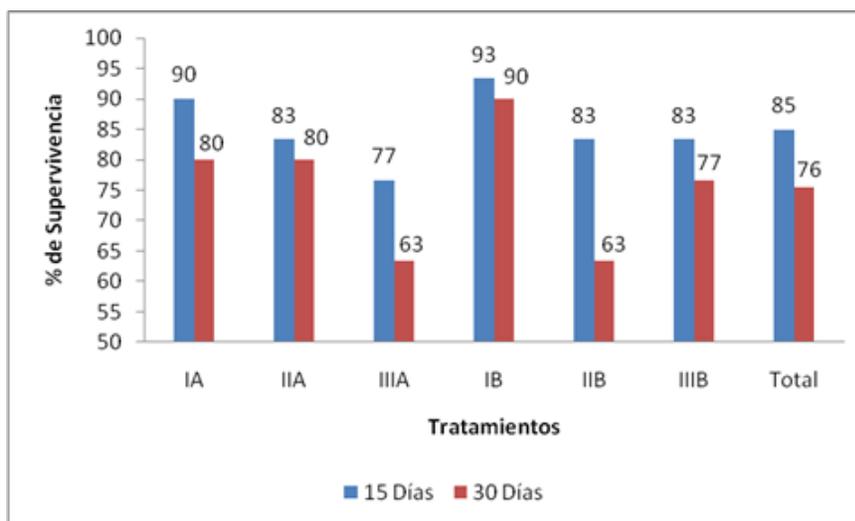


Figura 3. Porcentaje de supervivencia a los 15 y 30 días en la fase de aclimatización de plantas obtenidas a partir la germinación *in vitro* de semillas.

De la Rosa *et al.* (2012) plantean que la supervivencia en plantas generadas *in vitro* del género *Turbnicarpus* osciló entre 40 y 92 %. Según Montiel *et al.*, (2016) la supervivencia promedio de las plantas de *Hylocereus monacanthus* transferidas en sustrato fue de 97,1 %. Las plantas de *Mammillaria mathildae* micorrizadas y no micorrizadas no presentaron problemas de supervivencia ya que tuvieron una mortalidad de 2,4 % según García y Malda, (2009).

Las plántulas de *Dendrocereus nudiflorus* obtenidas *in vitro* en este estudio fueron capaces de sobrevivir a las condiciones *ex vitro* y continuaron su crecimiento lo cual permite utilizar esta vía en la obtención de plantas viables para la recuperación y conservación de la especie.

## Conclusiones.

- Los métodos de desinfección y medios de cultivo empleados permitieron obtener valores de germinación *in vitro* entre 97-99 % a los 45 días de la siembra.
- El medio de cultivo MS con el 25 % de las sales favoreció la calidad germinativa por lo que este medio resultó el más adecuado para la germinación *in vitro* de las semillas de *Dendrocereusnudiflorus*.
- Se logró la aclimatización de las plantas obtenidas *in vitro* bajo las condiciones establecidas con un porcentaje de supervivencia entre 73-93 % a los 30 días, lo cual permitió obtener plantas viables para la transferencia a su hábitat natural.

## Bibliografía.

- AmadorAlfárez, K. A., DíazGonzález,J., LozaCornejo, S. &Bivián Castro,E. Y. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus*(Cactaceae).Polibotánica, 35,109-131.
- Areces, A. (1997). The West Indies.*En: Oldfield S. (comp.) Cactus and Succulents Plants -Status survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Cactus and Succulent Specialist Group.IUCN, land, Switzerland and Cambridge, UK.(pp 99-111).*
- Badalamenti, O., Carra, A., Oddo, E., Carimi, F. &Sajeva, M. (2016). Is *in vitro*micrografting a possible valid alternative to traditional micropropagation in Cactaceae? *Pelecyphoraaselliformis* as a case study. SpringerPlus, 5.
- Barrios, V. D., Palmarola, B. A., & Gonzales, T. L. R. (2015). II Taller de Conservación de Cactus Cubanos. Jardín Botánico Nacional. Disponible en [http://www.opushabana.cu/pdf/sem/taller\\_cactus.pdf](http://www.opushabana.cu/pdf/sem/taller_cactus.pdf).
- Belem, M. F. L., Raymundo, E. V. J. &Cisneros, A. (2016). Propagación *in vitro* de *Hylocereusmonacanthus*(Lem.) Britton y Rose. Biotecnología Vegetal, 2. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/516/pdf>
- Berazaín, I. R., Areces, B. F., Lazcano, L. J. C. & González, T. L. R. (2005). Lista roja de la flora vascular cubana. Documentos del Jardín Botánico Atlántico de Gijón, 4,5-86.
- CedrésGazo, M., Sharry, S., Adema M.&Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. 1a ed. adaptada. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Libro digital.
- De la Rosa Carrillo, Ma. de Lourdes, Domínguez Rosales, M. S., Pérez Reyes, M. E.& Pérez-Molphe-Balch, E. (2012). Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. Interciencia, 2, 114-120.
- Font, P. H., Noda, A. A., Torres, C. V., Herrera, M. V., Lizazo, T.D., Sarduy, G. L. &Rodríguez, S. L. (2007). COMPARPRO 1.0. Instituto de Ciencia Animal. Departamento Biomatemático. Universidad de Granma.
- García, O. R., Malda&Barrera.G. R. X. (2009). Conservación *In Situ* y *Ex Situ* de *Mammillariamathildae*, Cactácea Endémica en Peligro de Extinción de la Ciudad de Querétaro. CIENCIA, 1, 3-16.
- González-Oliva, L. (2016). Las 50 plantas más amenazadas de Cuba, una herramienta a la mano para apoyar la conservación de nuestra biodiversidad. Acta Botánica Cubana. Instituto de Ecología y Sistemática. Disponible en: <http://repositorio.geotech.cu/>.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. (2015). Clasificación de los Suelos de Cuba. Instituto de Suelos, MINAG. La Habana, 93.

- Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.(2016). Centro Meteorológico Provincial. Delegación provincial Guantánamo, conservación.
- Montalvo, G. (2004). Propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp. *Biotechnología Vegetal*, 1, 43-48.
- Montiel, F. L. B., Enrique, V. J. R. & Cisneros, A. (2016). Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (lem.) Britton y Rose. *Biotechnología Vegetal*, 16, 113- 123.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Quiala E. & Montalvo, G. (2004). Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. Reseña Bibliográfica. *Revista Biotechnología Vegetal*, 4, 195-199.
- Quiala, E., Montalvo, G., de Feria, M., Matos, J., Mederos, R., Chávez, et al. (2003). Propagación *in vitro* de dos especies endémicas de Cuba en categoría de amenaza. V Taller Internacional sobre recursos fitogenéticos.
- Rodríguez, F., Enrique, D. L., Marcos, A., Hernández, F., Cantillo, A. & Vásquez, J. (2013). Propagación *in vitro* de *Escobariacubensis* (Britton & Rose) Hunts. *Ciencia y Sociedad*, 38, 345-375.

**Fecha de recibido: 9 abr. 2019**  
**Fecha de aprobado: 10 jun. 2019**