

## PROPAGACION IN VITRO DE ENDEMISMOS CANARIOS EN PELIGRO DE EXTINCION: *ATRACTYLIS ARBUSCULA* SVENT. ET *MICHAELIS*.

CAROLINA GONZÁLEZ ALEMÁN, ANA MARIA RUBIO HERNÁNDEZ Y CLARA I. ORTEGA GONZÁLEZ.

Jardín Botánico " Viera y Clavijo " del Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria.

Palabras claves : *Atractylis*, Compositae, Cultivos " in vitro ", Islas Canarias.

### RESUMEN

En este trabajo se aportan los resultados de las primeras experiencias llevadas a cabo con la especie *Atractylis arbuscula*, a través de las técnicas de cultivos in vitro. La variedad *schizogynophylla*, presente en la Isla de Gran Canaria, se encuentra en peligro de extinción.

El material utilizado en estas experiencias consistió en yemas apicales de ramas terminales recogidas en la población natural de San Felipe. Los medios de cultivo fueron suplementados con combinaciones de kinetina y IAA.

### SUMMARY

This work presents the results of the first experiments with the species *Atractylis arbuscula* Svent. et *Michaelis* using tissue culture techniques. The variety *schizogynophylla*, which is endemic to Gran Canaria, is actually in danger of extinction.

The plant material used in these experiments consisted in apical buds of terminal branches collected from the natural population. The culture media were supplemented with combinations of kinetine and Indole acetic Acid.

## INTRODUCCION

La especie *Atractylis arbuscula* pertenece a la familia Compositae. " Son arbustillos pequeños y compactos, de brácteas involucrales exteriores parecidas a las hojas, pinnatisectas y con espinas, las internas enteras, con la punta oscura y espinosa, cipselas con pelos plateados y vilano formado por cerdas plumosas unidas por la base ". ( Bramwell & Bramwell, 1983).

Fue descrita por primera vez por Sventenius y Michaelis (Sventenius, 1968 ). Posteriormente se consideró la planta que nos ocupa como la variedad *schizogynophylla* de la especie *Atractylis arbuscula*, diferenciándose de la variedad *arbuscula* de la misma especie. La variedad *schizogynophylla* fue descrita por Sventenius y Kahne, siendo éste último el que recogió el pliego testigo en floración, en Julio de 1968.

Actualmente está considerada por la IUCN ( Union Internacional para la Conservación de la Naturaleza ) dentro de la categoría "E" ( especie endémica amenazada, en peligro de extinción ). (IUCN, 1980; Bramwell y Rodrigo, 1984).

Por este motivo se considera necesario el recurrir a técnicas que permitan una rápida y eficiente propagación de esta especie. Dado que el Jardín Botánico " Viera y Clavijo " cuenta con instalaciones de tecnología punta en el campo de los cultivos in vitro, se ha estimado oportuno el trabajar in vitro con esta especie para intentar obtener la técnica apropiada que permita una rápida multiplicación a partir de poco material inicial. Con ello se podría obtener un stock de plantas susceptibles de ser reintroducidas en su habitat natural.

## MATERIAL Y METODO

El material empleado en estas pruebas fueron yemas apicales de ramas terminales procedentes de la población natural de San Felipe, recogidas en Mayo de 1988.

### 1.- Esterilización.

El material traído del campo permaneció 48 horas en la nevera. Tras este choque de temperatura se procedió a seccionar la zona terminal de las ramas que contenía la yema apical. Las yemas apicales acompañadas de varios primordios foliares fueron entonces lavados bajo el chorro con jabón para retirar la tierra y los contaminantes externos más superficiales.

Posteriormente se procedió a la esterilización con agentes químicos. Se llevaron a cabo dos tratamientos diferentes:

A.- 1. Inmersión en alcohol al 70% durante 30 segundos para romper la tensión superficial.

2. Inmersión en lejía comercial (40 gr/l de cloro activo) al 5% en H<sub>2</sub>O bidestilada y autoclavada, con Tween 20 (3 gotas/100 ml de solución) como agente mojante, durante 30 minutos en agitación continua.

3. Inmersión en lejía comercial al 2.5% con Tween 20, durante 30 minutos en agitación continua.

4. Inmersión en lejía comercial al 1% con Tween 20, durante 30 minutos en agitación continua.

5. Lavado 3 veces consecutivas en H<sub>2</sub>O DD y autoclavada.

B.- 1. Inmersión en alcohol al 70% durante 30 segundos.

2. Inmersión en lejía comercial al 10% con Tween 20, durante 30 minutos en agitación continua.

3. Inmersión en lejía comercial al 5% con Tween 20, durante 30 minutos en agitación continua.

4. Inmersión en lejía comercial al 2.5% con Tween 20, durante 30 minutos en agitación continua.

5. Lavado 3 veces consecutivas en H<sub>2</sub>O DD y autoclavada.

## 2.- Establecimiento del cultivo.

Tras haber trabajado anteriormente con otras especies de la familia Compositae, se consideró oportuno, como primera aproximación, reducir la gama hormonal inicial, ajustándola al rango de concentraciones más efectivas empleadas con anterioridad.

El medio básico estaba compuesto por:

-Sales minerales de Murashige & Skoog, 1962, (Dodds & Roberts, 1982):

Macronutrientes.	mg/l
NH <sub>4</sub>	1.650
KNO <sub>3</sub>	1.900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

Micronutrientes.	mg/l
------------------	------

MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
Hierro - EDTA	mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	37.25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.85
Vitaminas	mg/l
Glycina	2
Acido Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1

- Vitaminas de Nitsch et. Nitsch, 1965, (Cornejo,1984).
- Myoinositol 100mg/l.
- Sacarosa 30g/l.
- Agar 8g/l.

Este medio se suplementó con dos combinaciones hormonales de kinetina y ácido indolacético:

kinetina / IAA : 3 / 0.1 mg/l y 3 / 0.5 mg/l

Todos los medios utilizados fueron ajustados a un pH = 5.8, usando NaOH y ClH 1 Normal y autoclavados a 1 Atmosfera de presión durante 20 minutos. En cada tratamiento se sembraron 12 tubos con 1 yema apical cada uno, y fueron mantenidos en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 25° C + 2.

### 3.- Fase de multiplicación.

Tras un periodo inicial de 45 días de incubación, se llevó a cabo el primer repicaje, en el que se aislaron las yemas adventicias producidas. Las yemas obtenidas fueron traspasadas a medios frescos con las mismas combinaciones hormonales empleadas en la primera fase de establecimiento.

En cada nuevo tubo se sembró una porción formada por 2-4 yemas adventicias sobre una pequeña porción de callo.

En esta fase de multiplicación se llevaron a cabo un total de 4 repicajes a medios frescos, en intervalos de tiempo de 45 días. Las condiciones de fotoperíodo y temperatura fueron constantes para todas las fases del cultivo. Posteriormente se llevó a cabo un último repicaje a medio básico + kinetina 3 mg/l sin auxina.

#### 4.- Fase de enraizamiento.

En esta fase se trabajó con los tallos elongados espontáneamente durante la fase de multiplicación.

Para estimular la producción de raíces se emplearon diversos medios: unos estimulados con hormonas, y otros con reducción de la concentración de nutrientes para forzar a los tallos a producir un sistema radicular especializado en la captación de nutrientes. Concretamente los medios empleados fueron:

1. Medio básico = PATRON.
2. Medio básico con la concentración de los macronutrientes, micronutrientes y Fe EDTA reducidos a la mitad.
3. Medio básico con los nutrientes a media concentración + 0.5 mg/l de ácido indolacético.
4. Medio básico + 0.5 mg/l de ácido indolacético.
5. Medio básico + 1 mg/l de ácido indolacético.

Las condiciones de incubación fueron las mismas que las empleadas en las fases anteriores.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1.- Esterilización.

Los tratamientos de esterilización dieron ambos buenos resultados. De los tubos sembrados, sólo 2 fueron contaminados en ambos tratamientos por igual. La contaminación consistía en una segregación blanquecina alrededor de la base de los explantos que se prolongaba formando un halo bajo el agar.

Aunque ambos tratamientos produzcan el mismo resultado en cuanto a contaminación, la respuesta en el desarrollo de los explantos es la que nos indica la eficacia real de las pruebas, ya que se aprecia entonces si estos

tratamientos han afectado a la supervivencia y capacidad de desarrollo de los explantos. Podemos así decir que el tratamiento A resultó ser el más eficaz, ya que prosperaron un mayor número de tubos que en B, en que se apreció un elevado número de explantos necróticos que no llegaron a desarrollarse antes de morir. Esto hace suponer que el tratamiento B (de concentraciones de lejía más altas) resultaba igual de eficaz que el A (menor concentración de lejía) en cuanto a contaminación, pero excesivo para la supervivencia de los explantos ya que éstos quedan en su mayoría quemados y sin desarrollar.

## 2.- Establecimiento del cultivo.

De la primera siembra se obtuvieron los siguientes resultados:

Tratamiento A: de los 12 explantos sembrados, 5 necrosan aunque abren los primordios foliares antes de morir. Los otros 7 explantos prosperan, apreciándose una iniciación al desarrollo de yemas adventicias.

Tratamiento B: el número de explantos necróticos es similar, sin embargo se aprecia un gran desarrollo de yemas adventicias.

## 3.- Fase de multiplicación.

Los resultados obtenidos en los diferentes repicajes se muestran en la siguiente tabla.

repicajes	3/0.1	3/0.5	yemas	tallos	callo
1	"	11/25	---		poco/poco
2	"	25/62	1/14		abund/poco
3	"	90/150	4/1		abund/poco
4	"	278/250	---		abund/poco
5	K3mg/l	575/600	67/17		poco/poco

En general, no se aprecian grandes diferencias entre ambos tratamientos en cuanto a producción de yemas, aunque se observa una recuperación progresiva del tratamiento A frente al B al paso de los repicajes. La producción de tallos es desordenada y espontánea, aunque se aprecia un aumento considerable en el último repicaje, cuando se retira el aporte de auxina.

## 4.- Enraizamiento.

Estas pruebas no dieron resultado en el primer repicaje. La respuesta fue pues lenta y desigual. En general, los tratamientos hormonales dieron respuesta favorable, mientras que los que se basaban en una reducción de la concentración de nutrientes no produjeron enraizamientos generalizados.

El medio básico a media concentración de nutrientes + IAA 0.5mg/l no produjo enraizamiento y tras el segundo repicaje el material comenzó a necrosar.

El medio básico = PATRON y el básico con 1/2 concentración de nutrientes produjeron algunos enraizamientos aislados, pero no resultaron en definitiva favorables aunque el material siguió vivo.

El medio básico + IAA 1mg/l produjo tras el segundo repicaje un 25% de enraizamiento. El medio más efectivo fue el básico + IAA 0.5mg/l en el que se contabilizó más de un 60% de enraizamiento.

## CONCLUSIONES

Las experiencias llevadas a cabo en este trabajo demuestran que la especie *Atractylis arbuscula* puede ser reproducida in vitro con éxito, aumentando de esta forma las posibilidades de supervivencia para esta especie que actualmente se encuentra en grave peligro de extinción.

Contribuimos así a los estudios que se llevan a cabo en este Jardín Botánico con carácter prioritario en la conservación y protección de los endemismos canarios amenazados.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la IUCN y la WWF por su interés y aportación económica, así como al Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria, sin cuyo apoyo estos trabajos no podrían ser llevados a cabo. Por último agradecemos a Antonio Goncalves por su estímulo y apoyo, así como por la realización del material fotográfico.

## BIBLIOGRAFIA

BRAMWELL, D. & BRAMWELL, Z., 1983. *Flores silvestres de las Islas Canarias*. 2a Ed. corregida: Ed. Rueda. Madrid. pg 230.

BRAMWELL, D. Y RODRIGO, J., 1984. Prioridades para la conservación en Canarias. *Bot. Macar.* 10 pg 15.

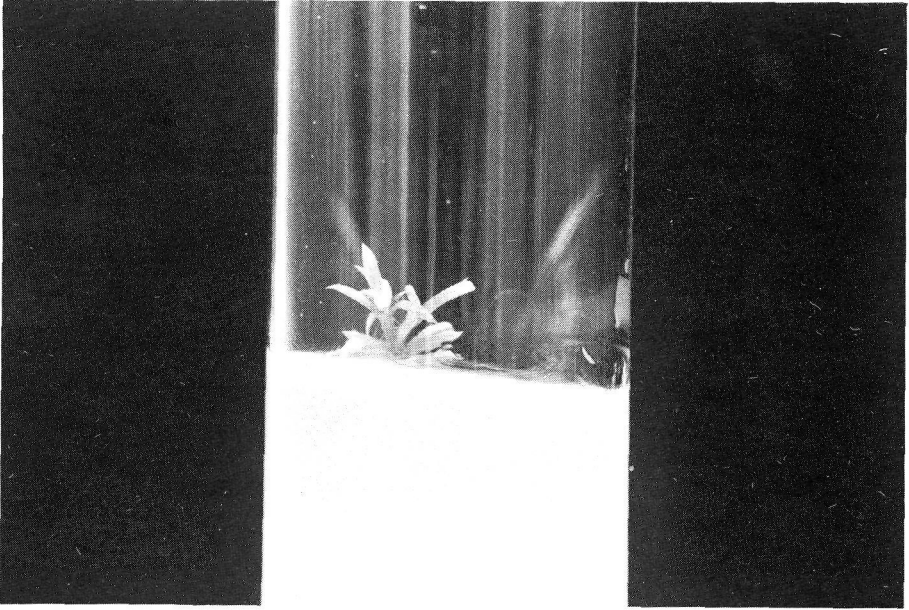
CORNEJO, M.J., 1984. Organogénesis en cultivos celulares diploides y haploides del arroz. MAPA, INIA.

DODDS, H.J. & ROBERTS, L.W., 1982. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge. pg 30-31.

IUCN, 1980. *Estrategia mundial para la conservación*. Gland.

SVENTENIUS, E., 1868. *Plantae macaronesienses novae vel minus cognitae*. 1:9

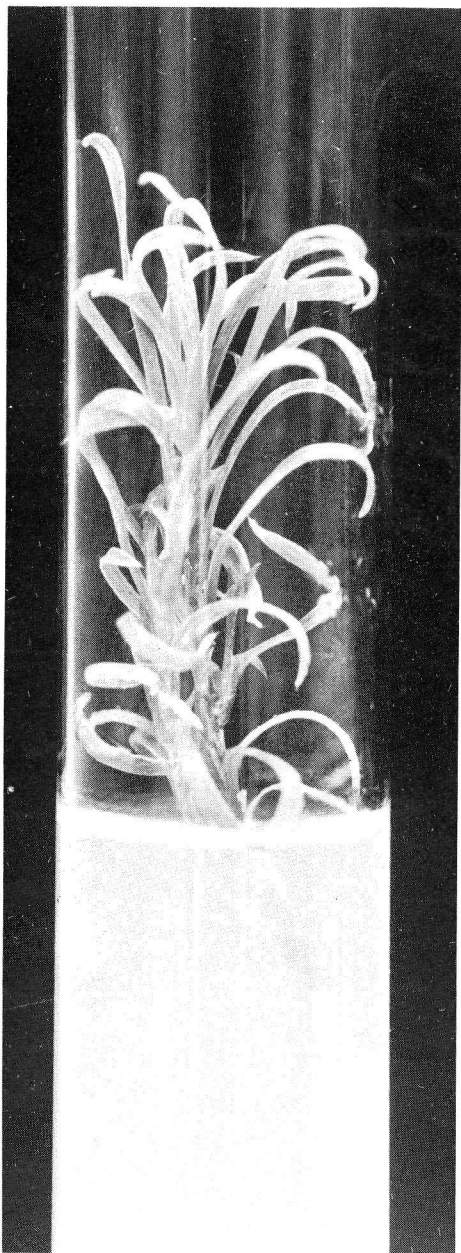




1.- Iniciación de yemas



2.- Multiplicación de yemas



3.- Elongación de tallos



4.- Plantula enraizada