

## PROPAGACION "IN VITRO" DE ENDEMISMOS CANARIOS EN PELIGRO DE EXTINCION: *EUPHORBIA HANDIENSIS*. Burchd.

CAROLINA GONZALEZ ALEMAN, CLARA I. ORTEGA GONZALEZ y ANA M.<sup>a</sup> RUBIO HERNANDEZ

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

RECIBIDO: 16 Noviembre 1987

Palabras Clave: *Euphorbia*, *Euphorbiaceae*, Cultivos *in vitro*, Islas Canarias.

### RESUMEN

En el presente trabajo se describen las primeras experiencias llevadas a cabo mediante las técnicas de cultivo "in vitro" con la especie *Euphorbia handiensis* Burch. (Euphorbiaceae). Esta planta suculenta de aspecto cactiforme es un endemismo canario que se encuentra en peligro de extinción.

El material utilizado para estas pruebas se consiguió a partir de semillas germinadas "in vitro" y posteriormente seccionadas para obtener ápices caulinares, cotiledones y porciones de hipocotilo como explantos iniciales. Tras varios meses de cultivo debido a la lentitud de desarrollo de esta planta, hemos conseguido plántulas enraizadas que serán trasplantadas a vivero en breve.

### SUMMARY

The present work describes the first experiments using "in vitro" tissue culture technique on the species *Euphorbia handiensis* Burchd. (Euphorbiaceae). This plant of cactiform appearance is a Canarian endemic in danger of extinction.

The plant material used for these experiments was obtained from seeds germinated "in vitro" and cut into apical buds, cotyledons and portions of hypocotyl as initial explants. After several months of culture, due to the slowness of growth typical in these plants, we have obtained rooted plantlets which will be transferred to the nursery.

## INTRODUCCION

La especie endémica *Euphorbia handiensis* Burchd. (Euphorbiaceae) es una planta suculenta cactiforme conocida solo en 3 pequeños valles de la isla de Fuerteventura. Crece en zonas rocosas y de arenas volcánicas de la Península de Jandía, entre Morro Jable y Faro de Jandía, en la zona costera hasta los 150 m. de altitud (Bramwell & Bramwell, 1983). (Lams. 1 y 2).

Esta especie de crecimiento muy lento, tarda alrededor de 5 años en alcanzar la altura de 10 cms., no llegando a superar los 50-100 cms. las plantas adultas.

En 1924 era abundante en 2 valles, formando una alfombra continua de millones de pequeños arbustos. Hoy en día la planta es rara en estas localidades, principalmente porque ha sido parasitada por un coleóptero, pero también porque ha sido recogida con fines horticulturales (IUCN Special Report, 1987).

Actualmente está considerada por la IUCN (Internacional Union for Conservation of Nature) dentro de la categoría de "en peligro de extinción" (Bramwell y Rodrigo, 1982), ocupando el primer lugar de la lista de especies a proteger para 1987 (IUCN Special Report, 1987).

Por todos estos motivos se considera necesario el recurrir a técnicas que permitan una rápida y eficiente propagación de esta especie, siendo actualmente las técnicas de cultivo "in vitro" de tejidos vegetales una vía a nuestro alcance para cumplir estos objetivos.

Las características anatómicas y fisiológicas de esta especie confieren especial dificultad para llevar a cabo su propagación a través de estas técnicas:

- La producción de latex favorece la intoxicación de los medios de cultivo, y por ello el riesgo de muerte para el material vegetal.
- La carencia de hojas propiamente dichas que protejan las zonas meristemáticas y yemas dificulta la esterilización, aumentando el grado de contaminación, o por el contrario, el riesgo de quemar el tejido meristemático por exceso de esterilización.
- El carácter suculento de estos tejidos favorece en gran medida la necrosis y pudrición de este material en los medios de cultivo.
- La lentitud de desarrollo de esta especie impide la evaluación a corto plazo del resultado de los distintos tratamientos a los que se somete el material

con vistas a alcanzar la técnica mas apropiada.

Aun así, el hecho de que otras *Euphorbia* hayan sido cultivadas, con estas técnicas (Zhang et al., 1987; Kimberlip et al., 1986; de Langhe et al., 1974; Tiedeman & Hawker, 1982) sugiere que sus parientes suculentos puedan potencialmente adaptarse al cultivo "in vitro" (Starlig & Dodds, 1983) como de hecho ha ocurrido con la "Candelilla" *Euphorbia antisiphilitica* (Jakobek et al., 1986).

Debido a los condicionamientos implícitos de la especie, se han tomado semillas como material de partida. De esta forma, se eliminan muchos problemas de esterilización y secreción de latex.

#### MATERIAL Y METODO

Las semillas fueron recogidas en el Valle de los Mosquitos (Jandía). Debido a que éstas se ven parasitadas por un coleóptero, algunas partidas nos fueron enviadas desparasitadas con una solución de Dipterex. Por ello las pruebas de germinación se llevaron a cabo distinguiendo la procedencia de las semillas, para establecer hasta que punto se ve afectada la respuesta del material.

##### 1.— Esterilización.

Todos los tratamientos fueron precedidos por una inmersión en alcohol 70% durante 30". Las pruebas llevadas a cabo fueron las siguientes:

- A.— Inmersión en lejía comercial al 2% + 0.1% de Tween 20 durante 10 minutos, en agitación continua.  
Inmersión en lejía comercial al 1% + 0.1% de Tween 20 durante 10 minutos, en agitación continua.
- B.— La inmersión en lejía comercial y Tween 20 fue en iguales condiciones que las descritas en el apartado A, permaneciendo en inmersión durante 15 minutos, en agitación continua.
- C.— Inmersión en lejía comercial al 1% + 0.1% de Tween 20 durante 10 minutos y en agitación continua.  
Inmersión en lejía comercial al 0.5% + 0.1% de Tween 20 durante 10 minutos y en agitación continua.
- D.— Las mismas condiciones de inmersión en lejía comercial y Tween 20 que en el apartado C, pero durante 15 minutos en inmersión y agita-

ción continúa:

Cada tratamiento fue seguido por tres lavados consecutivos en H<sub>2</sub>O destilada y autoclavada 20 minutos a 1 Atmósfera de presión.

Las semillas esterilizadas fueron sembradas en placas de Petri estériles conteniendo 30 ml. de una solución de agar 0.8 g/100 ml H<sub>2</sub>ODD y autoclavada 20 minutos a 1 Atmósfera de presión. Cada placa conteniendo 20 semillas fue sellada con papel Parafilm y puesta en condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, a una temperatura de 25° C  $\pm$  2.

## 2.— Germinación.

Para comprobar en que medida podía afectar el Dipterex a las semillas así como el paso del tiempo, se hicieron estudios de germinación. Para ello se hicieron siembras consecutivas durante 2 meses, paralelamente con semillas tratadas con y sin Dipterex. Previamente todas fueron tratadas 24 horas con una solución de ácido giberélico GA3 10 mg/100 ml H<sub>2</sub>ODD.

## 3.— Establecimiento del Cultivo.

Las semillas germinadas "in vitro" se fueron pasando a tubos independientes para que se desarrollaran durante 30 días (Lam. 3). Los tubos, de 25 mm. de diámetro, contenían 20 ml. de un medio de cultivo compuesto por: sales minerales y hierro EDTA de Murashige & Skoog, 1962 (Dodds & Roberts, 1982), vitaminas de Nitsch et Nitsch, 1965 (Cornejo, 1984), medio básico según la relación de la figura 1,3% (P/V) sacarosa y 8 g/l de Difco Bacto-agar, sin añadir ningún tipo de reguladores de crecimiento.

Todos los medios utilizados fueron ajustados a un Ph=5.6 utilizando NaOH y CIH 1 Normal y autoclavados a 1 Atmósfera de presión durante 20 minutos.

Las condiciones de mantenimiento del material fueron siempre de fotoperiodo de 16 h. luz y 8 h. oscuridad y temperatura de 25°C  $\pm$  2.

Tras 30 días de siembra, las plántulas obtenidas fueron seccionadas para obtener ápices caulinares, cotiledones y porciones de hipocotilo como explantos iniciales para la experiencias.

Las yemas apicales fueron utilizadas para intentar establecer un cultivo de proliferación de yemas, mientras que los cotiledones y porciones de hipocotilo se utilizaron para intentar establecer un cultivo de callo.

### 3.1.— *Cultivo de yemas.*

En el cultivo de ápices caulinares se utilizaron 2 medios de cultivo seleccionados de entre diversas combinaciones probadas entre las citoquininas Kinetina y Benzilamino purina (BAP) y la auxina ácido naftalenacético (NAA).

- 1.— Medio básico de la figura 1 suplementado con BAP 0.5 mg/l y NAA 1 mg/l como reguladores de crecimiento (Sajeve, 1982, Mauserth, 1977), 3% (P/V) sacarosa y 8 gr/l de Difco Bacto-agar.
- 2.— Medio básico de la figura 1 suplementado con Kinetina 4 mg/l y NAA 2 mg/l, 3% (P/V) de sacarosa y 8 g/l Difco Bacto-agar.

### 3.2.— *Cultivo de callo.*

Los cotiledones y porciones de hipocotilo fueron sembrados en una serie de medios compuestos por: medio básico, kinetina 4 mg/l y NAA 2 mg/l, suplementado con una tercera hormona del grupo de las auxinas; 2,4, Diclorofenoxiacético (2,4-D) en las siguientes concentraciones: 0.1 mg/l, 0.3 mg/l, 0.5 mg/l, 0.7 mg/l y 1 mg/l.

Además, se hizo otra experiencia utilizando ápices caulinares en estos mismos medios pero con 2,4-D en las concentraciones más bajas hasta 0.5 mg/l, para comprobar el efecto sobre las yemas (Holder & Kirkham, 1974).

Cada experiencia se llevó a cabo con 18 tubos mantenidos en las condiciones de fotoperiodo y temperatura ya expuestas anteriormente.

## 4.— *Fase de multiplicación.*

### 4.1.— *Cultivo de yemas.*

Tras un periodo de 45 días se llevó a cabo el primer repicaje de todos los explantos obtenidos en la fase anterior a los mismos medios utilizados. Pasados 60 días (debido a la lentitud de desarrollo de esta especie) todo el material obtenido a partir de ápices caulinares se pasó a medios conteniendo la misma base de la figura 1, pero retirando las auxinas y manteniendo sólo las citoquininas: Kinetina 4 mg/l y BAP 0.5 mg/l respectivamente. Se repicó el material dos veces a estos mismos medios.

### 4.2.— *Cultivo de callo.*

En cuanto a los cotiledones, porciones de hipocotilo y ápices caulinares, se repicaron igual número de veces pero siempre al mismo tratamiento inicial.

### 5.— Fase de enraizamiento.

Para la estimulación de raíces se emplearon medios de cultivo diferentes combinando la presencia y ausencia de fuente de carbono (sacarosa), con la hormona ácido indolbutírico (IBA).

A los 30 días se repicaron los explantos enraizados a un medio conteniendo las sales minerales de Murashige & Skoog (1962) y el Fe-EDTA a media concentración y las vitaminas según Nitsch et Nitsch (1965) sin añadir ningún regulador de crecimiento, volviendo a subir la concentración de sacarosa a 3% (P/V).

<b>A.— Macronutrientes</b>	<b>mg/l</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</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
<b>B.— Hierro - EDTA</b>	<b>mg/l</b>
Na <sub>2</sub> EDTA	37.25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.85
<b>C.— Micronutrientes</b>	<b>mg/l</b>
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
<b>D.— Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
Glycina	2
Acido Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Mio-inositol	100

Figura 1: Medio de cultivo básico.

## RESULTADOS Y DISCUSION

1.— *Esterilización y germinación.*

De los métodos de esterilización superficial probados, resultó ser más efectivo el A, en el que se obtuvo una contaminación inferior al 5%, y un índice de germinación elevado con semillas tratadas con Dipterex.

En cuanto a las pruebas de germinación, los recuentos se llevaron a cabo dentro de los 10 primeros días después de cada siembra, ya que en fechas posteriores las germinaciones eran ocasionales.

Se comprobó que las semillas no tratadas inicialmente con Dipterex daban una respuesta más homogénea (33.1-79.1% a lo largo del tiempo) frente a una variación entre 4.16-66.6% de las tratadas con Dipterex.

A la semana de las siembras, muchas de las semillas germinadas presentaban alrededor una secreción cremosa similar a la observada en otras experiencias no relatadas en este trabajo, y llevadas a cabo con material adulto. Para intentar evitar esta secreción sin perder las semillas germinadas, éstas fueron esterilizadas de nuevo con una solución al 0.075% de Cloruro de Mercurio durante 8 minutos y lavadas tres veces consecutivas en H<sub>2</sub>ODD y autoclavada (Subhash et al., 1974).

Fue entonces cuando se observaron mayores diferencias entre las semillas tratadas con y sin Dipterex, evolucionando favorablemente las últimas, mientras las primeras fracasaban en más de un 80%, llegando a fracasar en su totalidad en las últimas siembras. Las pequeñas plántulas perdían totalmente la clorofila y se paraba su desarrollo.

Las semillas sin tratar con Dipterex en ningún caso fracasaron en más de un 70%, siendo lo normal alrededor del 50%.

2.— *Establecimiento del cultivo.*2.1.— *Cultivo de yemas.*

Las experiencias llevadas a cabo con ápices caulinares sembrados en medios conteniendo:

1.— Medio básico + BAP 0.5 mg/l + NAA 1 mg/l dieron una respuesta más rápida que los sembrados en medio 2.

## 2.— Básico + Kinetina 4 mg/l + NAA 2 mg/l.

En ambos casos se observó una desorganización del material para dar pequeñas masas de callo rugoso y compacto, de color blanquecino (Lam. 4). En el caso del medio 1 se observó que la desorganización no llevaba consigo la pérdida de clorofila en un 50% más que en el medio 2 y se obtuvieron algunas masas verdes duras con protuberancias que diferenciaban pequeñas areolas con principios de espinas incipientes.

### 2.2.— *Cultivo de callo.*

En cuanto a los ápices caulinares sembrados en medio: Base + Kinetina 4 mg/l + NAA 2 mg/l + 2.4-D en diversas proporciones, se observó un desarrollo lento, con producción de pequeñas masas blancas de callo. Algunos tubos no acusaban pérdida de clorofila, no observándose formación de yemas adventicias (Lam. 5).

Tanto en los cotiledones como en las porciones de hipocotilo se observa una total pérdida de clorofila, así como una nula respuesta en cuanto a producción de callo. El material no se necrosa pero tampoco evoluciona.

## 3.— *Fase de multiplicación.*

De todas las experiencias anteriores, el callo obtenido no siguió evolucionando. Se mantuvo en pequeñas masas, compactas y blanquecinas tras varios repicajes al mismo medio.

Sólo los tubos que contenían material con clorofila evolucionaron. Tras repicajes a los medios iniciales y posteriormente a otros conteniendo sólo las citoquininas, se obtuvieron grandes masas verdes-compactas y numerosas yemas adventicias con espinas incipientes. (Lams. 6, 7 y 8).

## 4.— *Fase de enraizamiento.*

Todas las yemas obtenidas anteriormente fueron sometidas a pruebas de enraizamiento. Los medios en los que la fuente de carbono (sacarosa) había sido suprimida (Sajeva, 1982) no dieron resultado y a los 30 días las yemas evolucionadas habían necrosado. El medio conteniendo 5 mg/l IBA y 20 g/l sacarosa dió, sin embargo, un resultado excelente observándose a los 15 días la aparición de una pequeña raíz por tubo (Lams. 9, 10 y 11).



A los 30 días, estas plántulas enraizadas fueron pasadas a un medio básico pero con media concentración de sales minerales y Fe-EDTA sin reguladores de crecimiento, para el desarrollo de las raíces. Actualmente, las raíces cuentan con un tamaño aproximado de entre 6-15 mm. y presentan un engrosamiento notable.

## CONCLUSIONES

Muchas especies del género *Euphorbia* resultan muy lentas o imposibles de reproducir por esquejes (Krulik). Concretamente la especie que nos ocupa *Euphorbia handiensis* se ha comprobado en vivero que tarda más de seis meses en enraizar de esquejes, aún siendo tratadas con hormonas de enraizamiento. De ahí que se considere ventajoso el poner a punto una técnica que facilite una producción rápida, masiva y libre de patógenos.

Nuestras pruebas en cultivo "in vitro" con esta especie, demuestran que existe la posibilidad de producir múltiples yemas a partir de un sólo ápice caulinar y que éstas pueden posteriormente ser enraizadas en el periodo de un mes.

Hay pues, una vía abierta que permite una producción masiva de yemas adventicias a través de ápices caulinares. Queda también para futuros estudios el lograr mantener las producciones de callo y el inducir en este organogénesis que de lugar a nuevas plántulas.

Dado que la *Euphorbia handiensis* es un endemismo canario en peligro de extinción, consideramos de gran importancia haber podido dar un primer paso en la línea que permita mantener una rápida producción de plantas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Carlos Suárez y Stephan Scholz por la recogida de semillas en Jandía, así como a Maurizio Sajeva por sus consejos y aportaciones bibliográficas. Agradecemos también a la Fundación "Los Palmitos" por su aportación económica a esta labor y por último, destacamos que este trabajo ha sido realizado como parte de nuestro compromiso con el Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria, sin cuya ayuda no se hubiese podido llevar a cabo.

## BIBLIOGRAFIA

- BRAMWELL, D. & BRAMWELL, Z. 1983: *Flores silvestres de las Islas Canarias*, 2<sup>a</sup>. Ed. corregida: Ed. Rueda. Madrid. 284 pp.
- BRAMWELL, D. & RODRIGO, J. 1982: Prioridades para la conservación de la diversidad genética en la flora de las Islas Canarias. *Bot. Macar.* 10: 3-37.
- BURCHARD, O. 1929: *Beitrag zur Okologie und Biologie der Kanarenpflanzen*. pág. 108-109. Stuttgart.
- CORNEJO, M.J. 1984: Organogénesis en cultivos celulares diploides y haploides de arroz. *MAPA, INIA*.
- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. 1982: *Experiments in plant tissue culture*, Cambridge.
- HOLDER, P.L. & KIRKHAM, M.B. 1974: Tissue-culture of the Cactus *Echinopsis turbinata* L. *Annals of Arid Zone* 23 (2) 95-97.
- IUCN Special Report. 1987: Plants in danger. Vol. 18. 1-3: *SRI2*.
- JAKOBEK, J.L., BACKHAUS, R.A. & HERMAN, K. 1986: Micropropagation of Candelilla, *Euphorbia antisiphilitica* Succ. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7: 145-148.
- JOHNSON, J.L. & EMINO, E.R. 1979: Tissue Culture propagation in the Cactaceae. *Cact. Succ. J. (US)* vol. 51: 275-277.
- KIMBERLIP, RIPLEY & PREECE, J.E. 1986: Micropropagation of *Euphorbia lathiris* L. *Plant Cell, tissue and organ culture* 5: 213-218.
- KRULIK, G. Tissue Culture of succulent Plants. *Nat. Cact. & Succ. J.* vol. 35/1.
- DE LANGHE, E., DEBERGH, P. & VAN RIJK, R. 1974: In vitro culture as a method for vegetative propagation of *Euphorbia pulcherrima* L. *Pflanzenphysiol.* Bd. 71: 271-274.
- MAUSETH, J.D. 1977: Cactus tissue culture: a potential method of propagation. *Cact. & Succ. J. (US)* vol. XLIX: 80-81.
- SAJEVA, M. 1982: Colture in vitro: applicazioni e primi risultati su due Cactaceae, *Obregonia denegrii* Frick., ed. *Aztekium ritteri* Bod. *Pianta Grasse* n° 3. 59-62.
- STARLING, R.J. & DODDS, J.H. 1983: Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1 (1983): 84-90.
- SUBHASH, C., MINOCHA & MEHRA, P.N. 1974: Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller. *Amer. J. Bot.* 61 (2): 168-173.
- TIDEMAN, J. & HAWKER, J.S. 1982: In vitro propagation of latex producing plants. *Ann. Bot.* 49: 273-279.
- ZHANG, B., STOLTZ, L.P. & SNYDER, J.C. 1987: In vitro propagation of *Euphorbia fulgens* Karw ex Klotsch. *Hortscience* 22 (3): 486-488.

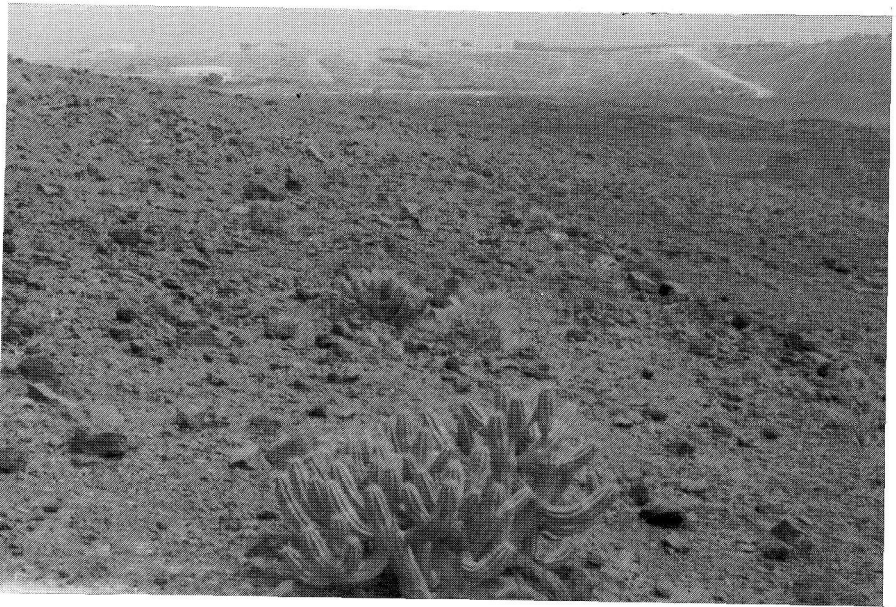


Lámina 1: Jandía, habitat natural de la *Euphorbia handiensis*.

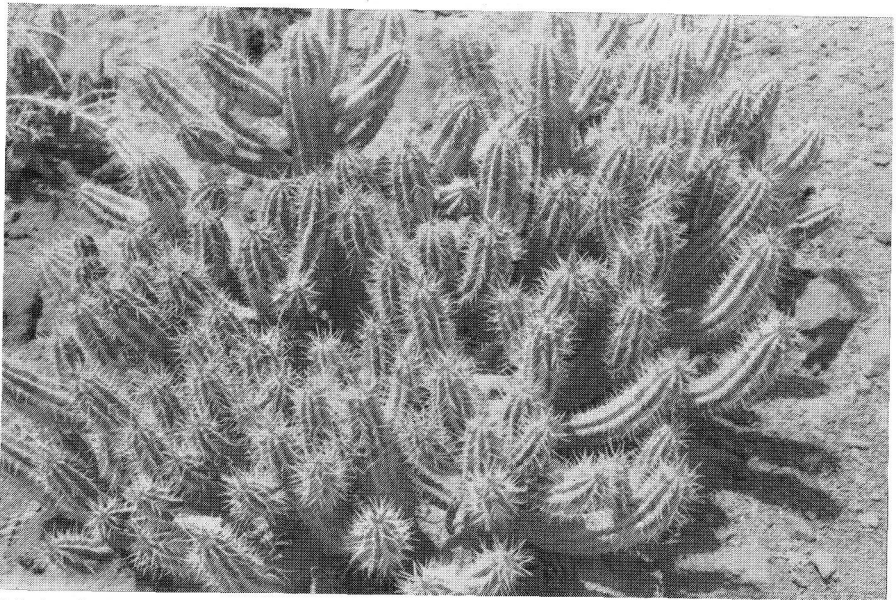


Lámina 2: Planta adulta en su habitat natural.

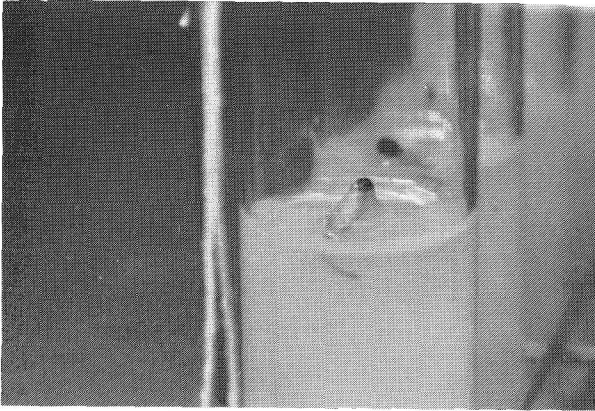


Lámina 3: Semilla germinada en desarrollo.



Lámina 4: Masa de callo blanquecino.

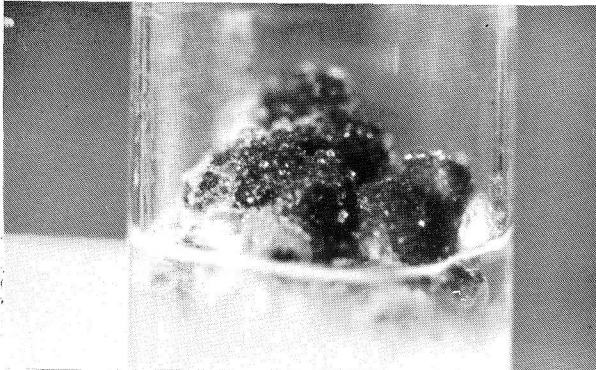
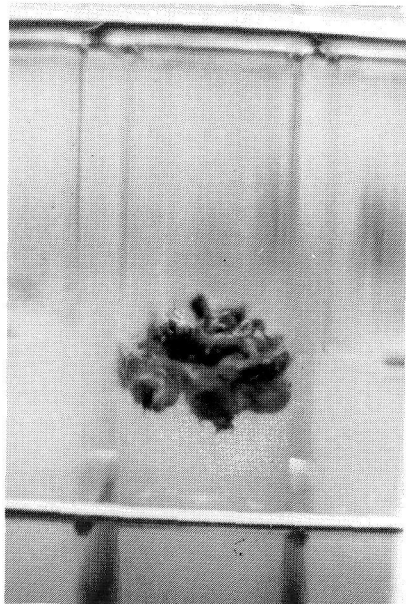
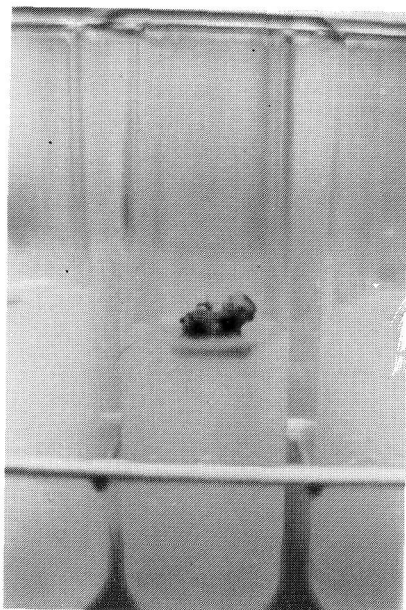


Lámina 5: Masa de callo verde.



Láminas 6 y 7: Masas verdes desarrollando yemas.

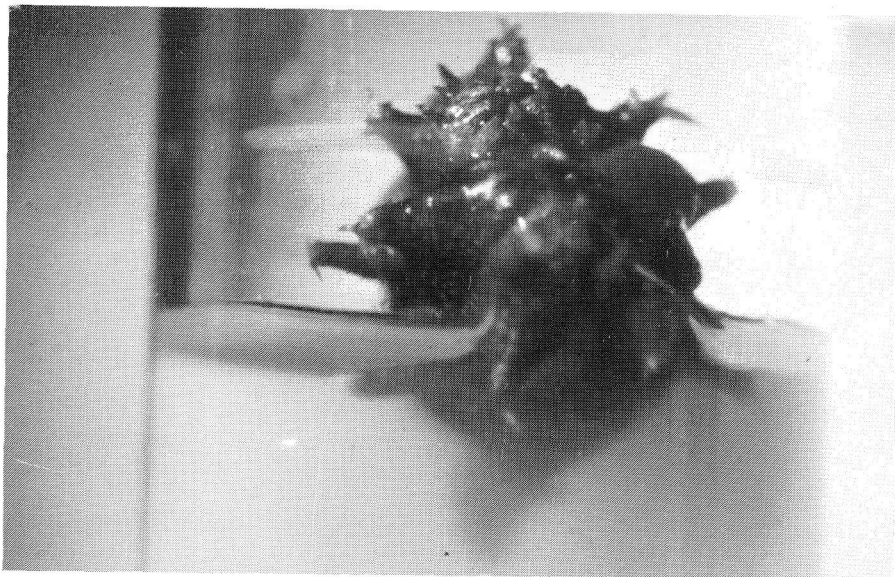
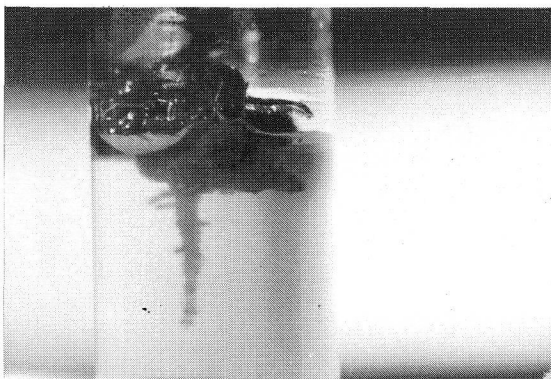
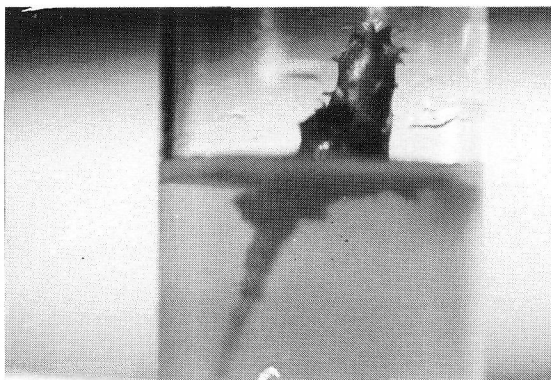
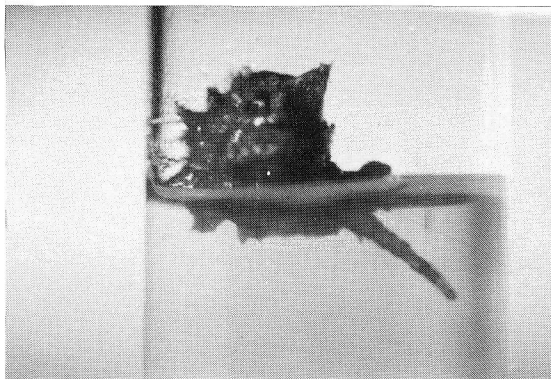


Lámina 8: Yema independizada sin raíz.



Láminas 9, 10 y 11: Plántulas enraizadas.