

Obtaining of protocols of micropropagación for two subspecies of *Galvezia leucantha* critically endangered endemic of Galapagos

Obtención de protocolos de micropropagación para dos subespecies de *Galvezia leucantha* endémicas de Galápagos en peligro crítico de extinción

Llumiyinga Pastuzo Ruth Elena

Parque Nacional Galápagos, Av. Charles Darwin s/n, Santa Cruz –Galápagos, Ecuador, Parque Nacional Galápagos, y Universidad Central del Ecuador, email: ruthll@spng.org.ec

February 2006

Download at: <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.463.1>

Obtaining of protocols of micropropagación for two subspecies of *Galvezia leucantha* critically endangered endemic of Galapagos

Resumen

El presente proyecto se desarrolla en vista de la crítica situación en la que se encuentran algunas plantas endémicas de las Islas Galápagos, como es el caso de *Galvezia leucantha*, que esta en Peligro Crítico de Extinción de acuerdo a criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).

La obtención de protocolos de micropropagación se convierte en una herramienta para la conservación de especies en peligro crítico de extinción, ayudando así a mantener la biodiversidad única existente en las Islas Galápagos.

Se ha partido de dos tipos de explantes: yemas y segmentos de hoja sembrados en medio Murashige y Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento. Se aplicó tres tratamientos desinfectantes, después de la aplicación de cada desinfectante se realizaron tres lavados en agua destilada esterilizada. Para los tratamientos desinfectantes no se encontraron diferencias significativas. Hasta el momento se ha encontrado que las yemas son las que mejor responden al cultivo in vitro. El porcentaje de explantes sin contaminación es de 58.33%. Del total de explantes sembrados (36) se encontraron cuatro explantes muertos y tres explantes necrosados. Además, las yemas no necesitan la adición de reguladores de crecimiento en el medio para el desarrollo de brotes y raíces. En el caso de segmentos de hoja, se está induciendo la brotación en un medio MS y MS/4 con una mezcla de reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones.

Palabras Clave: Yema, reguladores de crecimiento, medio MS, desinfección, brotación.

Abstract

The current study arises due to the critical situation of some Galapagos endemic plants, as the case of *Galvezia leucantha*, critically endangered according to the International Union for the Conservation of the Nature (UICN) criteria.

Development of micropropagation protocols will provide a tool for conservation of endangered species, helping in this way to maintain the existent biodiversity in the Galapagos Islands.

The plant material used was: leaf cuttings and axillary buds placed on Murashige and Skoog (MS) medium without plant growth regulators (PGR). Three disinfectant treatments were applied and after each treatment, explants were rinsed three times with sterilized distilled water. Not significantly differences between disinfectant treatments were found. Presently buds have the best response to in vitro culture. The percentage of explants without contamination was 58.33%. From a total of explants 36 placed in culture, four were found dead and 3 with necrotic tissue. Besides, buds do not need the addition of (PGR) to the medium for the development of shoots and roots. With leaf cuttings, shooting is being induced using MS medium and MS/4 with several concentrations of PGR.

Introducción

La biodiversidad de flora y fauna de las Islas Galápagos es un atractivo para el mundo entero lo que las ha convertido en un destino turístico importante. Con el incremento del turismo también aumentaron las esperanzas de hallar plazas de trabajo impulsando así la migración hacia las Islas. Esta realidad ha afectado a las especies endémicas y nativas debido a la susceptibilidad de las mismas a los cambios en su entorno, producto de la presión poblacional, la introducción de nuevas enfermedades y/o animales (Tye, 2002).

Además, la introducción de plantas y animales que con el tiempo se han adaptado a las condiciones climáticas, llegando a ser agresivas, han alterando la vegetación nativa y endémica de las Islas Galápagos (Soria *et al.* 2002).

Entre las especies vegetales del archipiélago 560 especies son nativas; y de este gran total, 175 especies (32%) son endémicas (Tye, 2002).

Actualmente conocemos que de acuerdo a los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), entre las 175 plantas endémicas existentes casi el 60%, es decir alrededor de 105 especies se encuentran en diferentes niveles de amenaza. Entre ellas,

19 taxones se consideran en peligro crítico de extinción y ocho especies poseen datos insuficientes (DD) y posiblemente estén dentro de esta categoría. El futuro de estas plantas depende completamente de los esfuerzos de conservación de las Islas" (Tye, 2002).

Los 19 taxones en peligro crítico se agrupan en doce familias. De estas especies los trabajos de conservación se han focalizado principalmente en el establecimiento de cercados de protección contra animales introducidos que ayudan a mantener a la vegetación nativa y endémica en su estado natural y bancos de semillas vivos, como ocurre en las Islas Santa Cruz, Santiago, San Cristóbal e Isabela (Herbario CDRS, 2004).

En el caso específico de la familia Scrophulariaceae, se observa que el género *Galvezia leucantha* abarca a tres taxones que se encuentra en peligro crítico de extinción.

Estos taxones surgen de los estudios morfológicos entre las poblaciones de *G. leucantha* que han permitido diferenciar tres subespecies: *G. leucantha leucantha*, *G. leucantha porphyrantha*, y *G. leucantha pubescens*, distribuidas en cuatro islas: Isabela y Fernandina, Santiago y Rábida respectivamente (McMullen, 1999).

Entre las estrategias realizadas en el ámbito mundial para la conservación de especies que se encuentran en algún nivel de amenaza está la utilización de técnicas de cultivos de tejidos de plantas y micropropagación que juegan un rol muy importante en programas de conservación y dirección de colecciones botánicas.

Existen muchas ventajas en la aplicación de ésta técnica, por ejemplo: alto coeficiente de multiplicación, demanda menor número de plantas iniciales, demanda menor espacio y multiplicación de plantas a pesar de la época del año (Kováč 1995/cit. por Mikulík, 1999). Su aplicación en las Islas Galápagos, servirá como una herramienta útil para la conservación de las especies en peligro crítico de extinción y otras vulnerables que podrían desaparecer.

El presente estudio plantea el desarrollo de una metodología eficiente de regeneración vegetativa In Vitro de *Galvezia leucantha*, con el fin de aportar a la conservación de esta especie.

Materiales y Métodos

Para la selección del material vegetal se realizó salidas de campo a las islas: Isabela y Santiago en las cuales se encuentran las subespecies de *Galvezia leucantha*, se colectó material vegetal que fue transportado en fundas plásticas ziploc colocadas dentro de un cooler y transportadas en barco hasta la isla Santa Cruz, lugar donde se encuentra el Laboratorio de Epidemiología, Patología y Genética de Galápagos Fabricio Valverde del Parque Nacional Galápagos.

En el laboratorio se procedió a lavar las muestras y separar los diferentes explantes para luego aplicarles los tratamientos desinfectantes.

La selección del material vegetal se realizó básicamente con las mejores plantas presentes en el campo (determinado en forma visual), se tomo muestras de plantas de Bahía James en la Isla Santiago en la salida de campo realizada a mediados del mes de mayo del 2005. No fue posible localizar a la subespecie *Galvezia leucantha ssp leucantha* razón por la cual el trabajo se realizó solamente con *Galvezia leucantha ssp porphyrantha*. Las muestras tomadas fueron ramas jóvenes medianamente lignificadas así de esta manera se redujo la sensibilidad de los explantes a los tratamientos desinfectantes y también que la manipulación al momento de disecar sea fácil previa la siembra (Toro, 2004). Los explantes utilizados durante el presente trabajo fueron porciones de hoja de alrededor de 1cm² y yemas tanto laterales como apicales. Las hojas fueron separadas de los tallos para el lavado inicial.

Los explantes se trataron primero con un lavado que consistía en agua destilada adicionada unas gotas de Tween 20. Inmersión en etanol al 70% por 20 seg. y un minuto. Inmersión en hipoclorito de sodio 1% por 5 y 10 minutos. Inmersión en una mezcla de hipoclorito al 0.3% mas ácido láctico al 1.4% adicionada unas gotas de Tween 20 por 10 y 20 minutos para hojas y yemas respectivamente. Inmersión en peróxido de hidrógeno 10% por un minuto, después de cada tratamiento desinfectante se realizó tres aclarados de un minuto cada uno en agua destilada esterilizada.

Para este ensayo se utilizó el diseño completamente al azar con un factorial 2 x 3 con tres observaciones, con una unidad experimental de cuatro tubos.

Los explantes fueron sembrados y permanecieron por 30 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con sus sales orgánicas e inorgánicas completas, adicionado con tiamina (1mg/l), ácido nicotínico (0.5mg/l) y mio-inositol (100mg/l), se adicionó sacarosa (30g/l) y agar (7g/l), el agar fue

mezclado con el medio de cultivo para obtener la solidificación del mismo mediante la agitación y calentamiento del medio de cultivo.

La siembra se realizó bajo condiciones asépticas utilizando pinzas y bisturís esterilizados mediante mechero. Los cultivos fueron mantenidos en el cuarto de crecimiento con una temperatura de 24 - 25 °C, un fotoperíodo de 16 horas luz y una humedad relativa de 60 - 70%.

Después de los 30 días los explantes provenientes de hojas fueron transferidos a un medio de cultivo con las mismas características al inicial, además de la utilización de medio MS reducido al 25% de los componentes originales, con la adición de una mezcla de reguladores de crecimiento en este caso BAP (0.1, 0.5, 1.0mg/L) y NAA (0.0, 0.1, 0.5 mg/L), existiendo en el medio de cultivo mayores cantidades de BAP y menores de NAA, para la sucesiva formación de brotes.

Para este ensayo se utilizó el diseño experimental de parcela dividida con tres repeticiones para cada proliferador.

Resultados y Discusión

Para el ensayo de desinfección se pudo observar que no existen diferencias significativas entre los tres diferentes tratamientos utilizados.

Cuadro 1. Promedios del porcentaje de contaminación de explantes.

Código	Significado	Promedios
d2	NaOCl 0.3%+Ac. Lác.	29.17 ^a
d1	NaOCl 1%	33.33 ^a
d3	NaOCl 1% y H2O2	37.50 ^a

Cuadro 2. Promedios de número de explantes muertos.

Código	Significado	Promedios
d1	NaOCl 1%	1.17 ^a
d3	NaOCl 1% y H2O2	1.50 ^a
d2	NaOCl 0.3%+Ac. Lác.	1.67 ^a

Cuadro 3. Promedio de número de explantes necrosados.

Código	Significado	Promedios
d1	NaOCl 1%	1.50 ^a
d2	NaOCl 0.3%+Ac. Lác.	1.50 ^a
d3	NaOCl 1% y H2O2	1.67 ^a

Por otro lado se pudo observar diferencias significativas y altamente significativas de los explantes en las diferentes variables tomadas.

Cuadro 4. Respuesta de los explantes frente a la contaminación.

Código	Significado	Promedios
e1	Segmento de hoja	22.22 ^a
e2	Yema	44.44 ^b

Cuadro 5. Promedio del número de explantes muertos.

Código	Significado	Promedios
e2	Yema	0.56 ^a
e1	Segmento de hoja	2.33b

Cuadro 6. Respuesta de los explantes frente al necrosamiento.

Código	Significado	Promedios
e2	Yema	0.78 ^a
e1	Segmento de hoja	2.33b

A pesar que presentan el más alto porcentaje de contaminación (44.44%), las yemas son las que mejor responde al cultivo in vitro, los segmentos de hojas se ven muy afectados por los desinfectantes y el constante movimientos durante la aplicación de los mismos.

Claramente podemos apreciar que para las variables número de explantes necrosados y número de explantes muertos las yemas presentan valores bajos (0.67) y (0.50). Además se pudo observar en yemas el desarrollo de brotes y raíces en MS sin reguladores de crecimiento al final del ensayo de desinfección, razón por la cual solo se procedió a aplicar los tratamientos proliferadores.

En el caso de los segmentos de hoja se procedió sembrar en MS con diferentes tratamientos proliferadores. Hasta el momento se hay visto solo un notable engrosamiento de las hojas pero no un definido desarrollo de brotes.

Conclusiones

La aplicación de la micropropagación es un recurso valioso no solamente para las especies que tienen algún nivel de amenaza, sino también para las plantas nativas que están siendo desplazadas por diferentes factores.

Podría utilizarse a la micropropagación como una herramienta para repoblar la parte urbana con especies tanto endémicas como nativas que actualmente ya no están en la parte urbana.

Los explantes provenientes de yemas son más fáciles de manejar, además que respondieron al cultivo in vitro bien sin necesidad de aplicar reguladores de crecimiento en el medio.

Los segmentos de hojas no responden favorablemente a los proliferadores utilizados, existe formación de callos pero no proliferación de brotes que es lo que se esperaba.

Agradecimientos

Servicio Parque Nacional Galápagos, Msc. Washington Tapia y guardaparques.

Concepto Azul

Ecociencia

Patricia Jaramillo y Pablo Izquierdo.

Referencias

Herbario CDS. 2004. Charles Darwin Research Station. Base de datos de la Flora de las Islas Galápagos (Access 2000).

McMullen, C.K. 1999. *Flowering Plants of the Galápagos*. Cornell University Press. Ithaca. Comstock Publishing Associates. p. 167.

Mikulík, J. 1999. Propagation of Endangered Plant Species by Tissue Cultures. Czech Republic. <http://publib.upol.cz/~obd/fulltext/biolog37/biolog37-03.pdf>

Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15.

Soria, M.; U. Taylor; A. Tye & S.R. Wilkinson. 2002. *Manual de identificación y manejo de malezas en Galápagos*. Charles Darwin Research Station. Puerto Ayora. Galápagos. Ecuador.

Toro Carcamo, M. 2004. *Establecimiento de Protocolos para regeneración In Vitro de Cerezo Dulce (Prunus avium L.) var. Lambert. Temuco-Chile*. Tesis Ing. Agr. Chile: Universidad Católica de Temuco. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Escuela de Agronomía. 35-36p.

Tye, A. 2002. *Revisión del Estado de Amenazas de la flora Endémica de Galápagos*. Fundación Científica Charles Darwin Santa Cruz. Galápagos