

CONTRIBUCION A LA CONSERVACION "EX SITU" DE ESPECIES CANARIAS EN PELIGRO: PROPAGACION "IN VITRO" DE *SENECIO HERMOSAE* PITARD.

CLARA ORTEGA GONZALEZ
CAROLINA GONZALEZ ALEMAN

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

RECIBIDO: 20 Octubre 1986

RESUMEN

En el presente trabajo se describen los medios más efectivos para la micropropagación de la especie canaria en peligro de extinción *Senecio hermosae* Pitard, con técnicas de cultivos "in vitro" de tejidos, tomando como material de partida ápices caulinares de su hábitat natural. Tras varias experiencias se consiguieron plántulas independientes, que después de un período de adaptación en el vivero, forman actualmente una población estable en el Jardín Botánico.

SUMMARY

The present work describes the most effective culture media for the micropropagation of the canarian endangered species *Senecio hermosae* Pitard using "in vitro" tissue techniques, taking as initial material, stem apex from their natural habitat. After several experiments independent plantlets succeeded, and after an adaptation period in the nursery they actually form a stable population in the Botanic Garden.

INTRODUCCION

La especie *Senecio hermosae* Pitard es un endemismo local y extremadamente raro de la isla de La Gomera, (Fig. 1) una de las islas más pequeñas del archipiélago canario. La Gomera es bien conocida por la abundancia de raros endemismos locales, muchos de los cuales se encuentran en grave peligro de extinción, (por ejemplo *Aeonium saundersii*, *Euphorbia lambii*, *Limonium dendroides*, *Ceropegia ceratophora*, *Echium acanthocarpum*, *Cheirolopus sataratensis*, *Parolinia schizogynoides*, etc.) necesitándose medidas específicas que aseguren su supervivencia.

En el caso de *Senecio hermosae*, la especie es conocida sólo a través de unos cuantos individuos encontrados en el *locus classicus* entre rocas alrededor de Roque Cano de Vallehermoso (Pitard & Proust, 1908; Ceballos & Ortuño, 1976; Bramwell & Bramwell, 1983) y recientemente en Roque Agando. Un estudio reciente sobre endemismos canarios cultivados en los principales jardines botánicos del mundo (IUCN Threatened Plants Committee 1981) nos muestra que *S. hermosae* es virtualmente desconocido en las colecciones vivas de los jardines botánicos.

Taxonómicamente, *S. hermosae* está estrechamente emparentado con *S. palmensis*, un endemismo canario encontrado en áreas montañosas de La Palma, especialmente en la Caldera de Taburiente y las proximidades de las Cañadas del Teide, en Tenerife, ocupando una posición muy aislada como únicos miembros de la sección *Bethencourtia*, sección diploide con un número cromosómico $2n = 20$ (Febles, sin publicar) que en algunas ocasiones ha sido considerado como género aparte (Kunkel, 1975) aunque estudios recientes (Nordenstam, 1978) lo mantiene como sección de *Senecio*.

Tales taxones, aislados taxonómicamente, y que se encuentran en peligro en toda su extensión, siendo virtualmente los únicos miembros de su género o sección, tienen una prioridad de conservación extremadamente alta (nivel 3) en las directrices marcadas por la Estrategia Mundial para la Conservación de la IUCN (IUCN, 1980) ya que su extinción implica una pérdida considerable de diversidad genética, siendo considerada la especie *S. hermosae* como de alta prioridad para su conservación en el estudio de Endemismos Canarios llevado a cabo por Bramwell & Rodrigo (1982).

La escasez de *S. hermosae* en el campo hace que la obtención de material adecuado para la propagación sea extremadamente difícil (esquejes, semillas, etc.) por lo que resulta muy justificado el aplicar a esta especie técnicas de propagación "in vitro" que requieren un mínimo de tejido meristemático para comenzar un cultivo.



Figura 1: *Senecio hermosae* Pitard

MATERIAL Y METODOS

Material Vegetal y procedimiento de esterilización

Ramas terminales de *Senecio hermosae* Pitard, fueron recolectadas en su Locus original en julio de 1984. Una vez en el laboratorio, fueron lavadas al chorro y mantenidas a $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Pasado este intervalo de tiempo, se cortaron los extremos inferiores, quedando dichas ramas reducidas a unos 5 cms. aproximadamente. El proceso de esterilización superficial se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 1) Inmersión en alcohol 70% durante 30 segundos.
- 2) Inmersión en lejía comercial al 15% con 3 gotas de Tween 20/100 ml., durante 30 minutos en agitación continua.
- 3) Inmersión en lejía comercial al 5% con 3 gotas de Tween 20/100 ml., durante 20 minutos en agitación continua.
- 4) Lavado 4 veces consecutivas en agua destilada y autoclavada.

Al finalizar la esterilización, fueron aislados los ápices caulinares, quedando el explant reducido entre 5-8 mm. y asépticamente se introducen en los medios de cultivos.

Establecimiento del explant

La siembra de los ápices caulinares se lleva a cabo en tubos de 25 mm. de diámetro, conteniendo 20 ml. de medio de cultivo. El medio utilizado en esta fase contiene sales minerales de Murashige & Skoog, 1962 (Dodds & Roberts, 1982), vitaminas de Nitsch et Nitsch, 1965 (Cornejo, 1984) que se relacionan en el cuadro 1, con 3% (p/v) de sacarosa, suplementado con Kinetina 2 mg/L y Acido Indol Acético 0.1 mg/L, acompañado de carbón activado 2 g./L. Los medios fueron ajustados a 5,6 usando NaOH y ClH 1 Normal respectivamente y solidificado con agar (Difco Bacto-agar) al 0.8% (p/v).

Todos los medios fueron esterilizados a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Realizando 12 repeticiones para cada tratamiento, y manteniendo la siembra en cámaras a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un período de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, siendo el período de incubación entre 30 y 45 días.

A. Macronutrientes	mg/l
NH ₄ NO ₃	1,650
KNO ₃	1,900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
B. Hierro	mg/l
Na ₂ EDTA	37.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
C. Micronutrientes	mg/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
D. Vitaminas	mg/l
Glycina	2
Acido Nicotinico	0.5
Piridoxina.HCL	0.5
Tiamina.HCL	0.1
Mio-inositol	100

Figura 2: Medio de cultivo básico.

Fase de multiplicación

Después de 45 días de incubación, las yemas adventicias obtenidas en la fase anterior, fueron aisladas y repicadas en diferentes medios de cultivos llevando una pequeña parte proporcional de callo. El medio básico utilizado de sales minerales y vitaminas es el utilizado en la fase anterior, variando las concentraciones hormonales de Kinetina y Acido Indol Acético y añadiendo o no Acido Giberélico, tomando en mg/l las siguientes cantidades Kinetina: 1; 2; 3; 5, Acido Indol Acético: 0.1; 0.5; 1 y Acido Giberélico: 1.

El tiempo de incubación y las condiciones que la envuelven son constantes para las distintas fases por las que pasa el material vegetal.

Todas las yemas independientemente del tratamiento anterior recibido, fueron repicadas a un nuevo medio básico suplementado con 0.5 mg/l. de Kinetina para estimular la elongación.

Fase de enraizamiento

Los medios utilizados para la iniciación de raíces, contenían macronutrientes y micronutrientes de Mudashige & Skoog (1962) reducidos a la mitad y la concentración de hierro y vitaminas en concentraciones normales, estando ausente los reguladores del crecimiento, y paralelamente a este medio, se realizaron otros conteniendo como regulador del crecimiento Acido Indol Acético en concentraciones de mg/l: 2; 4; 10.

Las medidas de los tallos repicados para llevar a cabo la estimulación de las raíces eran por arriba de los 20 mm.

Transferencias a viveros

A) El trasplante se llevó a cabo en macetas con distintos sustratos:

1. — Sustrato 100 × 100 vermiculita esterilizado en autoclave. No dió buen resultado en la fijación y endurecimiento de las plántulas con raíces, así como en el enraizamiento de las que carecían de ellas. Por otro lado la esterilización total del sustrato aumentó el riesgo de contaminaciones criptogámicas. Favoreciendo la dependencia del aporte externo de agua de riego enriquecida con nutrientes, en detrimento del desarrollo de la raíz.
2. — Sustrato 2:1:1 (turba: vermiculita: tierra de lombriz) esterilizado con Fibenzol (10%) o Benlate que permitió una buena aireación a la vez que presentó un buen soporte para el enraizamiento y disminución de infecciones por hongos.

- B) Se aplicaron pulverizaciones preventivas para el control de infecciones por hongos.
1. — Pulverizaciones preventivas con fungicidas a base de Fíbenzol. Se observó un debilitamiento general de la planta y quemaduras en las hojas.
 2. — Pulverizaciones con infusión macerada de Cola de Caballo (*Equisetum sp.*) para el fortalecimiento y prevención de enfermedades con buenos resultados.
- C) El envasado de las plántulas en una primera fase de adaptación se efectuó en distintos recipientes.
1. — Embolsado de cada maceta e introducción bajo invernadero. Procedimiento que exige un riguroso control manual de la humedad condensada dentro de la bolsa, además, de una inadecuada ventilación que favorece el desarrollo de hongos y pudriciones.
 2. — Urnas de metacrilato de 100 × 60 cms. y cajas 60 × 220 cms. de polixpan, selladas con plásticos y situadas en sitios frescos. Lo que permitió una mayor manipulación en la aireación y control de la humedad introduciendo bandejas de agua saturadas.
- D) El repicado de las plantas a macetas mayores fuera del invernadero, se efectúa a los 3-4 meses, sobre sustrato de 2:1 tierra de jardín: turba, situándolas bajo cañizo con distintas condiciones de humedad y luz según las necesidades de las plantas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Establecimiento del Explant

Con el método de esterilización superficial descrito, el índice de contaminación fue mínimo, la utilización de lejía comercial como agente desinfectante, ha sido muy efectiva dada su baja toxicidad. Teniendo en cuenta que el material vegetal de estudio era procedente de su hábitat natural, silvestre, y por tanto con mayor cantidad de restos contaminantes, los resultados obtenidos de la esterilización han sido eficaces.

El medio de cultivo descrito en esta fase para la estimulación de yemas a partir de la yema apical, ha dado respuestas en la totalidad de los tubos.

Hay que destacar la presencia de compuestos fenólicos segregados por el material vegetal a estudio y con este fin después de 24 horas de siembra,

fueron pasados a un nuevo medio, con el mismo contenido, pero añadiendo carbón activado para la absorción de dichos compuestos y evitar la intoxicación de los medios.

La presencia de fenoles sólo fue detectada en el primer corte del material, procedente del campo, posteriormente en las diferentes fases consecutivas, no se observó ningún tipo de segregación a los medios de cultivos.

Fase de multiplicación:

De todas las combinaciones hormonales: Kinetina-Acido Indol Acético, el mayor número de yemas obtenidas fue con Kinetina 2 mg/l. y Acido Indol Acético 0.1 mg/l. cuando los niveles de citoquinina eran por debajo de los 2 mg/l., disminuía la formación de números de yemas adventicias y por arriba del nivel señalado anteriormente hay un mayor número de yemas, con respecto al nivel más bajo, pero estas presentan en la mayoría de los casos malformaciones tales como: hojas más anchas, tallos deformados, alteraciones en el color de las hojas, etc.

Todos los medios eran mejorados respecto al número de yemas, añadiendo 1 mg/l. de Acido Giberélico. Por tanto, con las concentraciones de Kinetina 2 mg/l., Acido Indol Acético 0.1 mg/l. y Acido Giberélico 1 mg/l., la obtención en número y calidad de yemas adventicias fue la óptima, siendo tal la cantidad de yemas nuevas en algunos tubos que hacía imposible su conteo.

A los 45 días de incubación, fueron repicadas todas las yemas a un medio diferente, bajando la concentración de Citoquinina a 0.5 mg/l. Kinetina, con el fin de estimular la elongación (Lams. 1, 2 y 3). Tal propósito se consiguió ya que elongaron la mayoría de las yemas iniciadas.

Fase de enraizamiento

Después de un período de incubación entre 30-45 días, la proliferación de raíces que se conseguía en medios carentes de hormona fue masiva (Lams. 4 y 5). Por el contrario, cuando los medios estaban complementados con Acido Indol Acético, la ausencia de formación de raíces era patente, pudiendo afirmarse que las distintas concentraciones tomadas de esta auxina actúan como inhibidores de la iniciación de raíces.

Transferencias a vivero

Se establece en los viveros del Jardín Botánico, una población definitiva de plantas de cultivos "in vitro" para su seguimiento.

- El éxito de la plantación en maceta, depende en gran medida del número y tamaño de las raíces, así como del porte de los tallos. Estableciéndose la idoneidad para el plantado, en un desarrollo proporcional del tallo y raíz con una diferencia media de 10 a 20 mm. y el número de raíces es abundante (más de 5 raíces) y de 60 mm. de longitud. Igualmente tienen mayor probabilidad de éxito las plantas que no presentan callo.
 - En cuanto a sus preferencias ambientales *Senecio hermosae* se desarrolla mejor en sitios de sombra, sobre repisas de piedras. A pleno sol presentan un retraso en su crecimiento, disminución y transformación de sus hojas.
 - El primer rasgo adaptativo denota un acortamiento de la longitud foliar y robustecimiento general.
 - La floración en el primer verano (1985) fue bastante irregular. Sin embargo, en el presente año (1986) la floración ocurre durante el mes de junio prácticamente en masa.
 - La floración continúa durante los meses de julio, agosto y septiembre de forma uniforme, escalonadamente junto a la fructificación por lo que se ha podido obtener semilla suficiente para los semilleros.
- Aún en octubre continúa de forma decreciente la floración y fructificación.
- Se han efectuado semilleros con fecha de 4 de agosto de 1986 sin obtenerse respuesta germinativa alguna.

Por la observación con lupa de distintas selecciones de semillas para su muestreo, se ha comprobado la inviabilidad de las semillas.

Finalmente se han traspasado estas plantas a las laderas del Jardín, encontrándose dicha población en la actualidad en condiciones de adaptación total. (Lams. 6 y 7).

CONCLUSIONES

Mientras que los cultivos de tejidos son establecidos como una fuente de propagación en masa para muchas especies ornamentales, solo unas pocas Asteraceae han sido propagadas exitosamente con esta técnica (Cockrel, MacDaniel & Graham, 1986). De ahí la importancia de trabajar en cultivos "in vitro" con esta familia y ampliar los conocimientos necesarios para contribuir a la propagación de especies de interés ornamental.

Esta especie endémica presenta escasez de semillas y el porcentaje de viabilidad es muy bajo. Estos resultados pudieran ser por una autoincompatibilidad de la semilla siendo por tanto necesario tener diferentes clones propagados "in vitro" y ampliar de esta manera la base de material genético. Otro punto a tener en cuenta sería la degradación natural de la viabilidad, lo que conlleva a algunas poblaciones pequeñas, contribuyendo a la rareza de la especie y siendo por tanto eficaz la propagación a través de los cultivos de tejidos "in vitro".

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a David Bramwell su orientación para la Introducción de este trabajo, así como a Ana Fernández por sus notas sobre la adaptación de la especie estudiada en el vivero del Jardín Botánico "Viera y Clavijo". Y resaltar por último, que el presente trabajo es parte de nuestro compromiso como becario del Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria, gracias a cuya ayuda ha sido posible llevarlo a cabo.

BIBLIOGRAFIA

- CEBALLOS, L. y ORTUÑO, F. 1976: Estudio sobre la Vegetación y Flora Forestal de las Canarias Occidentales. Excmo. Cabildo Insular de Santa Cruz de Tenerife.
- COCKREL, A.D., McDANIEL, G.L. & GRAHAM, E.T., 1986: "In vitro" propagation of florists". *Cineraria. Hortscience* 21 (1): 139-140.
- CORNEJO, M.J. 1984: Organogénesis en cultivos celulares Diploides y Haploides de Arroz. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.
- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. 1982. Experiments in Plant Tissue culture. Cambridge.
- BRAMWELL D. & BRAMWELL, Z. 1983. Flores silvestres de las Islas Canarias. 2ª Edición corregida y aumentada. Madrid.
- BRAMWELL, D. & RODRIGO, J. 1982: Prioridades para la conservación de la diversidad genética en la Flora de las Islas Canarias. *Botánica Macaronésica*, 10: 3-17.
- I.U.CN., 1980: Estrategia Mundial para la Conservación. Gland.
- KUNKEL, G. 1975: Novedades y taxones críticos en la Flora de La Gomera. *Cuadernos de Botánica Canaria*. XXV: 17-49.
- NORDENSTAM, B. 1978: Taxonomic studies in the tribe Senecioneae (Compositae). *Opera Botanica* 44: 1-84.
- PITARD, J. & PROUST, J. 1908: Les Iles Canaries. Flora de l'Archipel. *Klincksieck*. Paris, 503 pp. 10 pl.

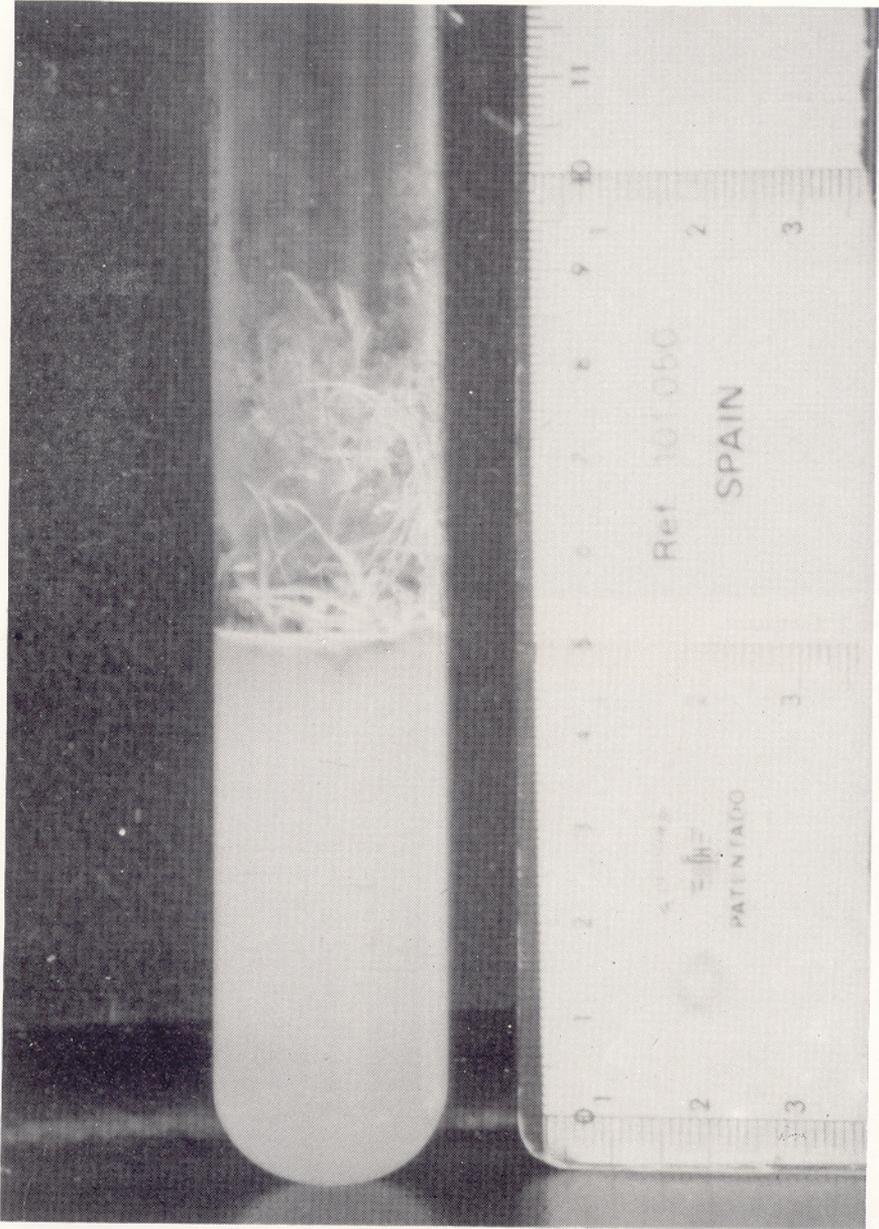


Lámina 1: Elongación.

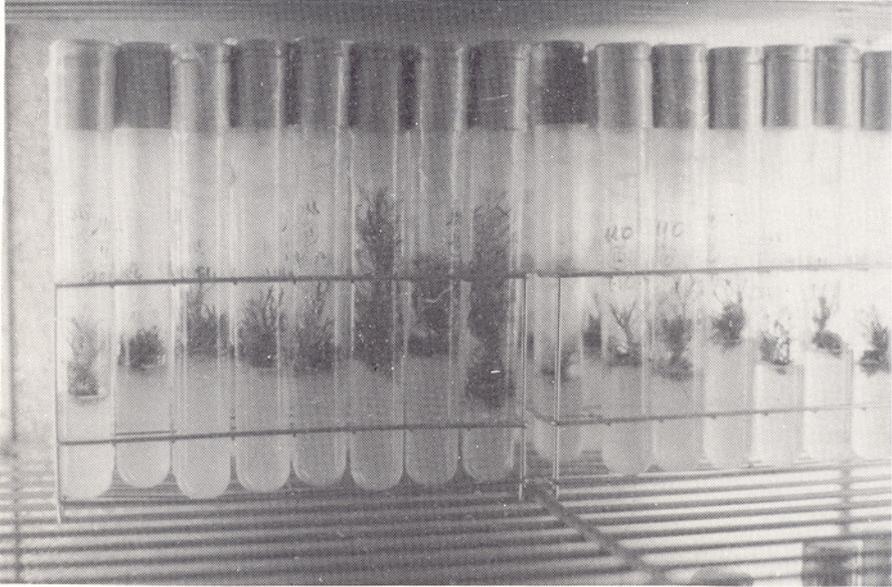


Lámina 2: Elongación.



Lámina 3: Elongación.

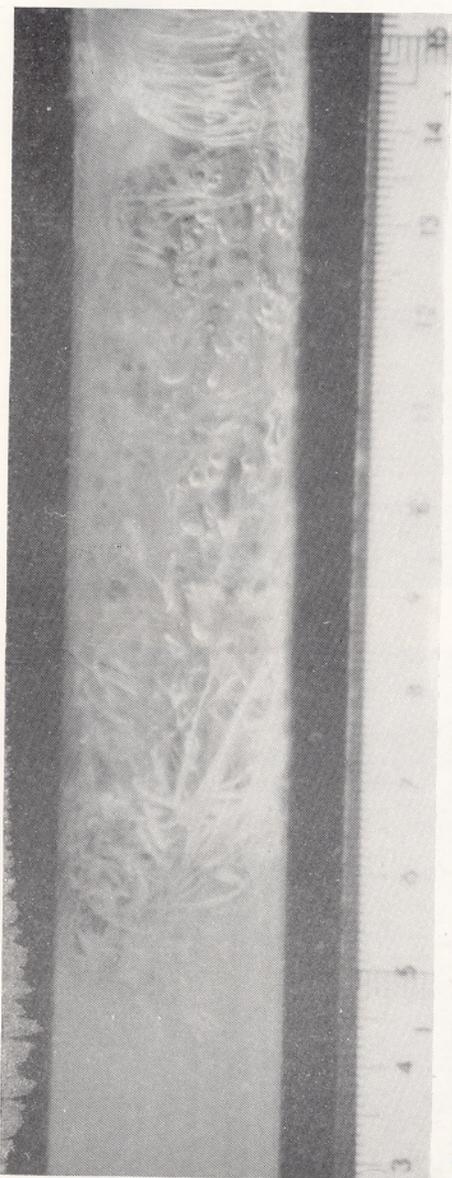


Lámina 4: Enraizamiento.



Lámina 5: Enraizamiento.



Lámina 6: Adaptación a maceta.



Lámina 7: Adaptación en la ladera del Jardín Botánico "Viera y Clavijo".