



## Propagación *in vitro* de *Corryocactus pulquinensis* Cárdenas, *Cleistocactus candelilla* Cárdenas y *Echinopsis huottii* (F. Cels) Labour. subsp. *huottii*

Limber Guevara Salcedo<sup>1</sup>, Giorjan Arnulfo Arancibia Padilla<sup>1</sup> y Edil Osinaga Rico<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología “Bolivian Cactus”, Área Protegida “Jardín de Cactáceas de Bolivia”, Green Cross Bolivia

<sup>2</sup>Programa “Manejo y Aprovechamiento Sostenible de Plantas Nativas y Endémicas (*Cactaceae*, *Bromeliaceae* y *Crassulaceae*)”, Green Cross Bolivia

### Resumen

Se determinó los métodos de desinfección y de cultivo *in vitro* para 3 especies de cactáceas del Área Protegida “Jardín de Cactáceas de Bolivia (AP-JCB)”: *Corryocactus pulquinensis* Cárdenas, *Cleistocactus candelilla* Cárdenas y *Echinopsis huottii* (F. Cels) Labour subsp. *huottii*. La desinfección se logró aplicando soluciones de formol al 40% por 30 minutos, etanol al 80% por 1 minuto, benomyl por 30 minutos, lavandina al 2% por 15 minutos y enjuagando con agua destilada estéril. El desarrollo de brotes se logró con BAP (3 ml·L<sup>-1</sup>) y carbón activado (1 g·L<sup>-1</sup>) en una solución de medio MS (4.43 g·L<sup>-1</sup>), ácido cítrico (300 mg·L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g·L<sup>-1</sup>) y agar (7 g·L<sup>-1</sup>) a un pH de 5.8 a 5.5.

### Abstract

The methods for disinfection and *in vitro* culture were determined for 3 species of Cactaceae from the protected area “Jardín de Cactáceas de Bolivia (AP-JCB)”: *Corryocactus pulquinensis* Cárdenas, *Cleistocactus candelilla* Cárdenas y *Echinopsis huottii* (F. Cels) Labour subsp. *huottii*. The disinfection was achieved applying solutions of 40% formaldehyde for 30 minutes, 80% ethanol for 1 minute, benomyl for 30 minutes, 2% bleach for 15 minutes and rinsing with sterile distilled water. The development of shoots was achieved with BAP (3 ml·L<sup>-1</sup>) and activated charcoal (1 g·L<sup>-1</sup>) in a solution of MS medium (4.43 g·L<sup>-1</sup>), citric acid (300 mg·L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g·L<sup>-1</sup>), and agar (7 g·L<sup>-1</sup>) at a pH between 5.5 and 5.8.



## Introducción

En el marco del Programa “Manejo y Aprovechamiento Sostenible de Plantas Nativas y Endémicas (*Cactaceae*, *Bromeliaceae* y *Crasulaceae*)”, cuyo objetivo es la producción de dichas especies nativas, con énfasis en el rescate de especies endémicas, utilizando las técnicas de micropropagación se realizó el presente trabajo de investigación. En este se reportan los resultados alcanzados en estudios sobre 3 especies que se describen a continuación. Dichos resultados son preliminares puesto que se continuará similar investigación con otras 6 especies nativas que se encuentran priorizadas en el Plan de Manejo.

La especie *Corryocactus pulquinensis* Cárdenas es una especie endémica de los valles cruceños y se encuentra mayormente alrededor de la población de Pulquina en el Municipio de Comarapa. Es un cactus con potencial ornamental por sus vistosas flores anaranjadas. Es una planta de hábito terrestre que alcanza los 3 a 4 m de largo, de ramas escandentes aunque poco ramificadas, tallos de 3 a 4 cm de diámetro, 4 a 5 costillas, areolas con 3 a 4 cm de distancia entre sí, 3 a 7 espinas no diferenciadas entre radiales y centrales de 0.5 a 2 cm de largo. La inflorescencia tiene a menudo de 3 a 6 flores agregadas cerca del ápice de las ramas, infundibuliformes acampanuladas, de color amarillo a anaranjado intenso y de 7 a 7.5 cm × 5 cm. El fruto es una baya, con espinas duras y escasos pelos blancos (Nee, 2004; Wood, 2005; Hunt, 2006). Esta

especie se desarrolla en laderas con vegetación semidensa, ya que requiere de semisombra para su establecimiento y desarrollo, así como humedad y suelos con materia orgánica.

La especie *Cleistocactus candelilla* Cárdenas es un cactus columnar de hábito arbustivo que se ramifica desde la base, con tallos que pueden medir desde 70 cm a 3 m y 2.5 a 5 cm de diámetro. Posee entre 10 a 17 costillas con 1 a 4 espinas centrales de 2 a 3 cm de largo y entre 8 a 18 espinas radiales de entre 50 mm y 2 cm en cada areola. Las flores son tubulares de unos 4 cm de largo, de color rojo púrpura y producen frutos también rojos o rosáceos. Crece en laderas con escasa vegetación y mayormente en sitios abiertos con elevada insolación.

La especie *Echinopsis huottii* (F. Cels) Labour. subsp. *huottii* es de amplia distribución ecológica y abundancia tanto en el Área Protegida “Jardín de Cactáceas de Bolivia” como en los valles cruceños, encontrándose desde los 1350 msnm hasta los 1900 msnm, en laderas y valles con vegetación abierta y semiabierta. Es frecuente encontrarla formada colonias o grupos de plantas casi amontonadas, debido a que su principal medio de propagación es a través de numerosos brotes que se desprenden continuamente, sumado a la producción de semillas.

Es un cactus terrestre, cespitoso, formando cojines de 30 a 40 cm de diámetro, tallo corto cilíndrico de 10 a 15 cm de alto aunque en un censo se registraron alturas de hasta 48 cm, con





numerosos hijuelos de 5 a 8 cm de diámetro, de 10 a 12 costillas, separadas en tubérculos y no agudas, areolas de 5 a 10 mm de distancia entre sí, circulares hasta elípticas de 4 mm de diámetro, espinas radiales de 5 a 11 mm de largo con una espina central de 15 a 20 mm de largo. La inflorescencia posee flores casi terminales color blanco, infundibuliformes, de 13 a 15 cm de largo. El fruto es una baya globosa verdosa, cubierta de pelos y 3 cm de diámetro (Nee, 2004; Wood, 2005; Hunt, 2006).

## Materiales y Métodos

La investigación de las especies mencionadas fue realizada en el laboratorio de biotecnología “Bolivian Cactus”, que pertenece a la Asociación Comunitaria del mismo nombre en la localidad de Pulquina, Municipio de Comarapa del Departamento de Santa Cruz.

### Etapa 1: Introducción y desinfección de material

Los materiales vegetales utilizados en esta fase fueron yemas apicales (areolas donde se inserta cada juego de espinas). Las plantas fueron colectadas de su hábitat natural, dentro del Área Protegida “Jardín de Cactáceas de Bolivia”. Tanto la investigación que corresponde a la propagación *in vitro* de las especies mencionadas como la producción futura cuentan con autorización de la Dirección General de Biodiversidad y Áreas Protegidas, en base a un Plan de Manejo aprobado, condicionado a resultados de los protocolos de producción *in vitro* para cada especie.

Para cada especie, se ensayaron 2 métodos de desinfección. El Método 1 consistió en el lavado de las plantas con agua de grifo, retirando todas las espinas de la misma. Seguidamente se sumergieron en Benomyl durante 30 minutos, para luego enjuagar con agua destilada. Como paso siguiente se desinfectaron las muestras con etanol durante 30 segundos, se enjuagaron con agua destilada, se introdujeron en lavandina al 2.2% por 15 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril por lo menos tres veces. El

Método 2 consistió en lavar la planta con agua de grifo, retirar todas las espinas, desinfectar con formol al 40% por 30 minutos, enjuagar con agua destilada, desinfectar con etanol al 80% por 1 minuto, enjuagar con agua destilada, desinfectar con Benomyl por 30 minutos, enjuagar con agua estéril, desinfectar con lavandina al 2% por 15 minutos, y enjuagar con agua estéril por lo menos tres veces.

### Etapa 2: Fase de cultivo *in vitro*

Las areolas desinfectadas, fueron separadas de las plantas con ayuda de un bisturí, obteniendo entre 20 a 40 yemas por planta, hasta obtener la cantidad requerida para el ensayo.

Se diseñó un modelo experimental con 10 tratamientos. Cada tratamiento se formuló con el mismo medio basal (medio basal MS 4.43 g·L<sup>-1</sup>, ácido cítrico 300 mg·L<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g·L<sup>-1</sup>, agar 7 g·L<sup>-1</sup> y con un pH de 5.8 a 5.5). El detalle de los tratamientos en cuanto a la concentración de reguladores de crecimiento se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Detalle del contenido de reguladores de crecimiento utilizados en la formulación de los tratamientos para la introducción *in vitro* de las tres especies estudiadas.

Tratamiento	BAP ml·L <sup>-1</sup>	ANA ml·L <sup>-1</sup>	Carbon activado g·L <sup>-1</sup>
T0	0.0	0.0	0.0
T1	1.0	0.0	0.0
T2	1.5	0.0	0.0
T3	0.0	0.5	0.0
T4	1.0	0.5	0.0
T5	1.5	0.5	0.0
T6	0.0	1.0	0.0
T7	1.0	1.0	0.0
T8	1.5	1.0	0.0
Cac	3.0	0.0	1.0

Se evaluó el porcentaje de supervivencia en la primera generación de brotes generados

## Resultados y discusión

De los 10 tratamientos ensayados con *Corryocactus pulquinensis* Cárdenas, el tratamiento Cac resultó en una supervivencia promedio de



25%, en la primera generación de brotes generados.

De igual manera, para *Cleistocactus candelilla* Cárdenas el tratamiento Cac se logró 30% de supervivencia promedio, en la primera generación de brotes generados.

Finalmente, para *Echinopsis huotii* (F. Cels) Labour. subsp. *huotti*, el tratamiento Cac, resultó en un 85% de supervivencia promedio de los brotes, habiéndose además logrado con esta especie 2 fases de multiplicación de brotes. La primera generación de brotes originados del material madre, demoró en promedio 53.5 días para estar en condiciones de realizar el primer corte y generar nuevas plántulas.

Aunque preliminares, de los resultados obtenidos se puede afirmar que el medio recomendado para las tres especies estudiadas consiste en sales MS 4.43 g·L<sup>-1</sup>, ácido cítrico 300 mg·L<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g·L<sup>-1</sup>, agar 7 g·L<sup>-1</sup>, suplementado con BAP y carbón activado y con un pH de 5.8 a 5.5.

De las 3 especies estudiadas, *Echinopsis huotii* (F. Cels) Labour. subsp. *huotti* es la que mejor se adaptó a las condiciones de multiplicación *in vitro*, habiéndose logrado multiplicar brotes en dos ocasiones. En las especies *Corryocactus pulquinensis* Cárdenas y *Cleistocactus candelilla* Cárdenas no se llegó a la etapa de multiplicación de brotes.

Un problema importante para la micropropagación de cactáceas es el alto nivel de contaminación de las plantas silvestres con hongos y otros microorganismos al momento de su introducción al laboratorio, lo cual plantea un reto para lograr una adecuada desinfección. En el presente estudio se logró validar un método de desinfección que permitió la introducción exitosa de las especies a condiciones *in vitro*.

Otra dificultad observada en las especies estudiadas fue el lento desarrollo de los explantes en laboratorio. Por ejemplo, para el caso de

*Corryocactus pulquinensis* Cárdenas, el tiempo transcurrido entre el momento de establecer el material vegetal y el momento de realizar la primera multiplicación o corte de los explantes fue de 469 días.

## Agradecimientos

La presente investigación fue realizada en el marco del Programa “Manejo y Aprovechamiento Sostenible de Plantas Nativas y Endémicas (Cactaceae, Bromeliaceae y Crassulaceae)”, ejecutado por Green Cross Bolivia y financiado por la Fundación PUMA, cuyo apoyo se agradece enormemente.

## Referencias

1. Foster, R. C. 1958. A catalogue of the ferns and flowering plants of Bolivia. Contr. Gray Herb. 184: 1–223.
2. Killeen, T.J., García Estigarribia, E., Beck, S. (eds.) 1993. Guía Arb. Bolivia 1–958. Herbario Nacional de Bolivia & Missouri Botanical Garden, La Paz.
3. Navarro, G. 1996. Catálogo ecológico preliminar de las cactáceas de Bolivia. Lazaroa 17: 33–84.
4. Lazarte, M.C., Linneo, I.F., Osinaga, R.E. 2010. Estudio de Abundancia y Estructura Poblacional de Especies de Interés en el Área Protegida Municipal “Jardín De Cactáceas de Bolivia”, Cantón Pulquina, Santa Cruz – Bolivia. Green Cross Bolivia-MHNNKM
5. Lazarte, M.C., Linneo, I.F., Osinaga, R.E. 2010. Informe Sobre Taxonomía de Especies de Interés en el Área Protegida Municipal “Jardín De Cactáceas de Bolivia”, Cantón Pulquina, Santa Cruz – Bolivia. Green Cross Bolivia-MHNNKM.
6. MHNNKM-KEW. 2009. Vegetación del Jardín de Cactáceas de Bolivia. Santa Cruz, Bolivia.