

EL CULTIVO IN VITRO, UN MÉTODO PARA MEJORAR LA GERMINACIÓN DE PLANTAS CON INTERÉS FORESTAL EN ANDALUCÍA.

M. CANTOS¹, J. LIÑÁN¹, J. TRONCOSO¹, A. APARICIO², A. TRONCOSO¹.

(1) Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla. CSIC. Apartado 1052. 41080. Sevilla.

(2) Dpto. Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Farmacia. Univ. de Sevilla.

RESUMEN

Se compara la germinación obtenida por métodos convencionales (siembra de semillas en bandejas), con la lograda por el cultivo in vitro de semillas con cubierta, con cubierta escarificada, sin cubierta o embriones aislados, de especies vegetales elegidas por su carácter endémico, su interés como plantas forestales en Andalucía, su dificultad de germinación y su situación de en peligro de extinción o clara regresión.

Los resultados obtenidos con semillas por métodos tradicionales, fueron muy pobres tanto en el porcentaje de germinación, como en el tiempo prolongado, necesario para ello. Por el contrario, los procedimientos de germinación in vitro, que se utilizaron siempre de mas sencillo (semilla completa) a mas complicado (embrión), dieron tantos por ciento elevados de germinación en tiempos reducidos, como se especifica para cada especie: *Atropa baetica* Willk., 100% de germinación en 30 días con semilla completa sin escarificar; *Echinospartum algibicum* Talavera & Aparicio, 100% de germinación en 30 días, con semilla completa escarificada; *Juniperus oxycedrus*, L. subsp. *oxycedrus*, y *Juniperus oxycedrus*, L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Reuter) Ball., 50% de germinación en 45 días con embriones aislados; *Lavatera maritima* Gouan, 76% de germinación a los 21 días, con semillas completas sin escarificar; *Olea europaea* L. var. *sativa*, *Olea europaea* L. var. *sylvestris* Brot., 100% de germinación en 10 días con embriones aislados; *Phillyrea latifolia* L., 55% de germinación a los 7 días en embriones aislados y *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* (Boiss. & Reuter) Hand-Mazz. 90 % en 30 días con semillas completas. En todas las especies consideradas, se obtuvieron porcentajes elevados de supervivencia (>85%) al trasplantar las plántulas desde in vitro a condiciones externas.

P.C.: semilla, embrión, propagación, conservación, plantas leñosas

SUMMARY

IN VITRO CULTURE, A METHOD TO IMPROVE GERMINATION OF PLANTS WITH FORESTAL INTEREST IN ANDALUSIA.

Seed germination by traditional methods and in vitro culture of normal, scarified or naked seeds, or isolated embryos of Andalusian forestal plants, were compared. The plants were chosen by their endemic character, difficulty of germination and endangered situation.

In general, traditional methods gave bad results, in terms of low percentage and long time of germination. On the contrary, by in vitro culture, the following results were obtained: *Atropa baetica* Willk., 100% of germination in 30 days with normal seeds; *Echinospartum algibicum* Talavera & Aparicio, 100% of germination in 30 days, with scarified seeds; *Juniperus oxycedrus*, L. subsp. *oxycedrus* and *macrocarpa*, (Sibth. & Reuter) Ball., 50% of germination in 45 days with isolated embryos; *Lavatera maritima* Gouan, 76% of germination in 21 days, with normal seeds; *Olea europaea* L. vars. *sativa* and *sylvestris*, Brot. 100% of germination in 10 days with isolated embryos; *Phillyrea latifolia* L., 55% of germination in 7 days with isolated embryos and *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* (Boiss. & Reuter) Hand-Mazz. 90 % of germination in 30 days with normal seeds. All the species considered gave high percentage of surviving plants (> 85%) when transplanted from in vitro to outside conditions.

K.W.: seed, embryo, propagation, conservation, woody plants

INTRODUCCIÓN

La germinación de la semilla es el procedimiento mas frecuente para propagar las plantas superiores, y el que mejor asegura el mantenimiento (Khan, 1982) o incluso el aumento de la biodiversidad (Palmer et al., 1998). No obstante, en algunas especies con interés medioambiental, la germinación es muy escasa y lenta con lo que se dificulta el proceso de regeneración del bosque. La

baja respuesta a la germinación se asocia a fenómenos de dormición seminal (Upadhyaya, y Nigam,-S.N., 1999) relacionados con: (i) la presencia de una cubierta (testa o endocarpo) lignificada, que actúa como una barrera mecánica en la salida del embrión o en el intercambio hídrico y gaseoso (López-Granados y García-Torres, 1996; Barnett, 1997; Cardina y Sparrow, 1997; Bandyopadhyay y al., 1999) (ii) equilibrios hormonales en el endospermo no favorables para el desarrollo del embrión (Pinfield y Gwarazimba, 1992; Jinks,-R.L. and Ciccarese,-L., 1997; Benech-Arnold,-R.L.; et al., 1999) y (iii) desfases entre el proceso de maduración del fruto y del embrión (Cheplick 1992).

Para disminuir la dormancia seminal y con ello favorecer la germinación, algunos autores (Broschat, 1998) han utilizado la semilla sin cubierta tanto en semillero como en cultivo in vitro. Otros autores como Acebedo et al., 1997; Matthys-Rochon et al., 1998; Cantos et al., 1998), obtuvieron aun mejores resultados por germinación in vitro del embrión aislado, aunque obligándose a utilizar una técnica mas compleja.

El presente trabajo pretende poner a punto técnicas de cultivo in vitro de semillas o embriones aislados que mejoren la germinación de plantas con elevado interés ecológico en Andalucía, muchas de ellas en peligro de extinción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal.- Para el estudio de germinación, se utilizaron semillas de las especies vegetales: *Atropa baetica* (Wilk), *Echinospartum algibicum* (Talavera-Aparicio), *Juniperus oxycedrus* (L) subespecies *oxycedrus* y *macrocarpa*, *Lavatera maritima* (Gouan), *Olea europaea* variedades *sativa* y *sylvestris* Brot., *Phillyrea latifolia* (L) y *Rhododendron ponticum* (L), subespecie *baeticum*. La elección de las especies a propagar se hizo basándose en las siguientes circunstancias: Su carácter endémico y con ello su interés como planta forestal en Andalucía; su dificultad de germinación en campo o por procedimientos convencionales y su situación de especies en peligro de extinción o en clara regresión.

Métodos de germinación: Para los ensayos de germinación de cada especie, se utilizaron semillas maduras recolectadas en los siguientes lugares: *A. baetica*, *E. algibicum* y *L. maritima* en el Parque Natural de Grazalema (Cádiz-Málaga); *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* en la Garganta del Rio Viar en Cazalla de la Sierra y *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* en Cabo Roche, Conil de la Frontera (Cádiz); *O. europaea sativa*, de plantas no cultivadas existentes en el Parque Nacional de Doñana y *O. europaea sylvestris* de plantas que crecen en el Parque Nacional de Doñana y en los Parques Naturales Marismas del Odiel (Huelva) y Bahía de Cádiz (Cádiz); *P. latifolia* y *R. ponticum* subsp. *baeticum* del Parque Natural de los Alcornocales (Cádiz-Málaga). Las semillas, limpias de restos de pulpa, se conservaron durante 3-4 meses a 4°C, salvo en el caso de obtención de embriones que se utilizaron directamente. En el conjunto de las especies consideradas, aunque no en cada una de ellas (tabla 1), se utilizaron los procedimientos de germinación que a continuación se indican:

i) germinación en semilleros.- Se sembraron semillas completas y con *P. latifolia* semillas sin cubierta en bandejas de PVC (\cong 7 cm de profundidad) con substrato húmedo de suelo (normalmente del lugar de procedencia de la semilla) y turba, en proporción 4:1 v/v, en cámara de cultivo a 25°C de temperatura, $111 \mu\text{E}/\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de iluminación y 16 h. de fotoperíodo.

ii) Germinación in vitro.- En relación con la especie, se utilizaron semillas completas, escarificadas, sin cubierta o embriones aislados (tabla 1).

Una vez extraída del fruto la semilla completa, se desinfectó por una primera inmersión en etanol 70-80%, durante 5-10 segundos, seguida de otra mas prolongada (\cong 20 min.) en solución al 20% de NaOCl, del 3.5 % de cloro activo, a temperatura de 40°C y agitación. A continuación, las semillas se lavaron cuidadosamente con agua destilada estéril.

La escarificación de las semillas se realizó por rozamiento con papel de lija fino, tras lo cual

se sometieron a la desinfección indicada mas arriba. La semilla sin cubierta (desnuda) se obtuvo seccionando ésta con un cortatubos en las mas duras, o por presión en las mas frágiles. Para el aislamiento del embrión, la semilla sin cubierta, preparada como se indicó antes, se puso en placa Petri con agua destilada estéril, y así se incubó a 25°C durante 48h. Esto produjo hinchazón y reblandecimiento de los tejidos del endospermo, lo que facilitó la realización de cortes laterales en el mismo, que dejaron visible el embrión, que se extrajo fácilmente con la punta del bisturí.

Para su cultivo in vitro, tanto las semillas como los embriones, se cultivaron en tubos de ensayo estériles de 21x150 mm con 8 ml de medio nutritivo en agar 0.7% y pH 5.7. Como medio nutritivo se utilizó el MS (Murashige y Skoog, 1962). Las condiciones de la cámara de cultivo fueron temperatura de 25±1°C, iluminación 30µE/m²·s⁻¹ y fotoperíodo de 16 horas de luz. El trasplante desde in vitro a condiciones externas se realizó según el método propuesto por Cantos et al. (1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se indicó antes, en las pruebas realizadas, en general, se aplicó el criterio de ir desde el método mas sencillo al mas sofisticado hasta obtener resultados satisfactorios (tabla 1). Con *A. baetica*, de acuerdo con Aparicio (1993), la germinación obtenida con semillas completas en semillero fue baja (30%), lo que puede contribuir a su situación de especie en peligro de extinción (Hernández y Clemente, 1994). Por el contrario, cuando la semilla se cultivó in vitro en presencia de citoquinina, se alcanzó un 100% de germinación en 30 días. Es decir, esas condiciones fueron suficientes para romper totalmente la dormancia seminal.

Según Aparicio (1993) y Aparicio y Guisande (1995) la semilla de *E. algibicum* tiene problemas de germinación en campo, lo que unido a la fuerte presión de los rumiantes provoca su precaria situación. Por ello, por el bajo número de semillas disponibles y su pequeño tamaño, sólo se realizaron pruebas con semillas normales y escarificadas in vitro. En ambos casos, se obtuvieron resultados positivos (tabla 1) pero notablemente mejores cuando se escarificó la corteza, lo que ratificó la acción positiva de las condiciones del cultivo in vitro sobre la germinación y significó la importancia del intercambio semilla-medio.

Ninguna de las dos subespecies de enebro germinó cuando se utilizaron semillas con cubierta, tanto en bandejas de germinación como en condiciones de cultivo in vitro, incluso a

Tabla 1
Tantos por ciento de germinación obtenidos en las especies consideradas.

Planta	Germinación en semillero		Germinación in vitro							
	Semilla con cubierta		Semilla con cubierta		Semilla con cubierta		Semilla sin cubierta		Embrión aislado	
	%	Días	%	Días	%	Días	%	Días	%	Días
<i>A. baetica</i>	30	40	100	30	-	-	-	-	-	-
<i>E. algibicum</i>	-	-	40	30	100	30	-	-	-	-
<i>J. oxycedrus oxycedrus</i>	0	365	0	365	-	-	10	45	49	45
<i>J. oxycedrus macrocarpa</i>	0	365	0	365	-	-	15	45	50	45
<i>L. maritima</i>	60	20	76	21	-	-	-	-	-	-
<i>O. europea sativa</i>	37	300	-	-	-	-	60	40	100	10
<i>O. europea sylvestris</i>	40	300	-	-	-	-	60	40	100	10
<i>P. latifolia</i>	0 (21)	365 (195)	-	-	-	-			55	7

<i>R. ponticum</i>	15	90	90	30	-	-	-	-	-	-
<i>baeticum</i>										

un año desde la siembra. Cuando se eliminó la cubierta, se obtuvieron algunos, tantos por ciento de germinación (tabla 1), lo que denotó la muy fuerte influencia de la testa en la dormancia seminal. Los porcentajes de germinación aumentaron significativamente, alcanzándose en ambos casos prácticamente el 50%, cuando se utilizó el embrión aislado, lo que indicó a este procedimiento, como mas adecuado para reducir la dormancia de la semilla.

L. maritima, fue la única especie entre las ensayadas que alcanzó un porcentaje elevado de germinación por métodos convencionales (tabla 1). No obstante, mejoró algo dicho porcentaje por cultivo de la semilla in vitro, aunque la mejora no justificó el uso de una técnica mas sofisticada.

Como se observa en la tabla 1, las dos subespecies de *O. europaea* mostraron germinaciones muy parecidas: Con la semilla con endocarpo en bandejas, se obtuvieron valores próximos al 40% de plántulas y para ello se necesitó prácticamente un año. Cuando se cultivaron in vitro semillas carentes de endocarpo, mejoró algo el tanto por ciento de germinación y, especialmente, se acortó mucho el tiempo necesario para ello (tabla 1). Estos resultados pusieron claramente de manifiesto el efecto negativo de la cubierta leñosa de la semilla (endocarpo) en el proceso reproductor del olivo. No obstante, los resultados mas espectaculares se obtuvieron con el cultivo in vitro del embrión aislado. Es decir, cuando el embrión perdió la influencia del endocarpo y del endospermo, desapareció prácticamente cualquier efecto de dormancia.

Con *P. latifolia* al no obtenerse germinación en bandejas con la semilla completa, se ensayó la semilla sin testa alcanzándose un 21% de plántulas a los 195 días (números entre paréntesis en tabla 1). El cultivo in vitro de embriones mejoró algo el porcentaje de germinación y, en especial, redujo muy claramente el tiempo necesario para ello.

Debido al pequeño tamaño (1.5 x 0.5 mm) y peso (~ 0.05 mg) de la semilla de rododendro, que hacía muy difícil su manipulación, solamente se realizaron pruebas con semillas completas. Cuando la siembra se hizo a nivel de semillero tradicional en bandeja sólo se logró un 15% de germinación a lo 90 días. Por el contrario, cuando las semillas se cultivaron in vitro, la germinación aumentó hasta el 90% en un tiempo de tan sólo 30 días.

Siguiendo el método de Cantos et al. 1993, con todas las especies consideradas se obtuvieron porcentajes elevados de supervivencia (>85%) al trasplantar las plántulas desde in vitro a condiciones externas

CONCLUSIONES

- Excepto *L. maritima*, las semillas completas de todas las especies estudiadas presentaron grandes dificultades para germinar cuando se usaron procedimientos convencionales.
- En todos los casos, el cultivo in vitro se mostró como un método muy eficaz para mejorar la respuesta a la germinación, tanto por aumento del porcentaje de plántulas obtenidas como por la disminución del tiempo necesario para ello.
- La combinación entre el cultivo in vitro y el uso, según los casos, de semillas escarificadas, sin cubierta o embriones, demostró ser un sistema muy eficaz para la obtención de plántulas de especies amenazadas con interés forestal en Andalucía. Este hecho es de gran importancia para la mejor conservación de las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada mediante los proyectos: CICYT AMB94-1372 y FEDER 1FD97-0743-CO3-03.

BIBLIOGRAFÍA

- ACEBEDO, M.M.; LIÑÁN, J.; LAVEE, S. & TRONCOSO, A.; (1997). In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae* 69. 207-215.
- APARICIO, A. (1993). Planes de Recuperación de especies vegetales amenazadas en el Parque Natural de la Sierra de Grazalema (Cádiz-Málaga). *Acta Bot. Malacitana* 18: 199-221.
- APARICIO, A. & GUISANDE, R. (1995). Ecología y conservación de *Echinospartum albicum* Talavera & Aparicio (Genisteae, Fabaceae). *Acta Bot. Malacitana* 20: 298-301.
- BANDYOPADHYAY, -A.; NAUTIYAL, -P.C.; RADHAKRISHNAN, -T.; & GOR, -H.K.; (1999). Role of testa, cotyledons and embryonic axis in seed dormancy of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *J-agron-crop-sci.* v. 182 (1) p. 37-41.
- BARNETT, -J.P.; (1997). Relating pine seed coat characteristics to speed of germination, geographic variation, and seedling development. *Tree-plant-notes.* Washington, D.C. : U.S. Department of Agriculture, Forest Service. Winter/Spring 1997. v. 48 (1/2) p. 38-42.
- BENECH-ARNOLD, -R.L.; GIALLORENZI, -M.C.; FRANK, -J.; & RODRIGUEZ, -V.; (1999). Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. *Seed-sci-res.* Wallingford, Oxon, UK : C.A.B. International, c1991-. v. 9 (1) p. 39-47.
- BROSCHAT, -T.K.; (1998) Endocarp removal enhances *Butia capitata* (Mart.) Becc. (pindo palm) seed germination. *HortTechnology.* American Society for Horticultural Science, v. 8 (4) p. 586-587.
- CANTOS, M.; LIÑÁN, J.; PEREZ-CAMACHO, F. & TRONCOSO, A. (1993). Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de la virosis entrenudo corto. *Actas de Horticultura.* 1993. Vol. II, 705-709.
- CANTOS, M.; CUERVAS, J.; ZARATE, R & TRONCOSO, A. (1998). Embryo rescue and development of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* and *macrocarpa*. *Seed Science and Technology*, 26, 193-198.
- CARDINA, -J. & SPARROW, -D.H.; (1997). Temporal changes in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) seed dormancy. *Weed-sci.* Lawrence, KS : Weed Science Society of America. v. 45 (1) p. 61-66.
- CHEPLICK, -G.P.; (1992). Sibling competition in plants. *J-Ecol.* Oxford : Blackwell Scientific. 1992. v. 80 (3) p. 567-575.
- HERNÁNDEZ, J.E. & CLEMENTE, M.; (1994). Protección de la Flora en Andalucía. A.M.A. Consejería de Cultura y Medio Ambiente. Junta de Andalucía. 217 pp.
- JINKS, -R.L.; & CICCARESE, -L.; (1997). Effects of soaking, washing, and warm pretreatment on the germination of Russian-olive and autumn-olive seeds. *Tree-plant-notes.* Washington, D.C. : U.S. Department of Agriculture, Forest Service.. v. 48 (1/2) p. 18-23.
- KHAN, A.A.; (1982) *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination.* Ed. Elsevier Biomedical. USA. pp. 547.
- LOPEZ-GRANADOS, -F. & GARCIA-TORRES, -L.; (1996). Effects of environmental factors on dormancy and germination of crenate broomrape (*Orobanche crenata*). *Weed-sci.* v. 44 (2) p. 284-289.
- MATTHYS-ROCHON, -E.; PIOLA, -F.; LE-DEUNFF, -E.; MOL, -R.; & DUMAS, -C.; (1998). In vitro development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. *J-exp-bot.* Oxford : Oxford University Press. v. 49 (322) p. 839-845.
- MURASHIGE T. & SKOOG F.; (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15: 473-497.
- PALMER, -H.E.; NEWTON, -A.C.; DOYLE, -C.J.; THOMSON, -S.; & STEWART, -L.E.D. (1998) An

- economic evaluation of alternative genetic improvement strategies for farm woodland trees. *Forestry*.
Oxford : Oxford University Press. v. 71 (4) p. 333-347.
- PINFIELD,-N.J. & GWARAZIMBA,-V.E.E.; (1992). Seed dormancy in Acer: The role of abscisic acid in the regulation of seed development in *Acer platanoides* L. *Plant-Grow-Regul.*
Dordrecht : Kluwer Academic Publishers. Aug 1992. v. 11 (3) p. 293-299.
- UPADHYAYA,-H.D.; & NIGAM,-S.N.; (1999). Inheritance of fresh seed dormancy in peanut..
Crop-sci. Madison, Wis. : Crop Science Society of America, 1961-. v. 39 (1) p. 98-101.