

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

**Multiplicación *in vitro* de las especies *Rhodophiala montana*
(Phil.) Traub., *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub. y
Rhodophiala splendens (Rengifo) Traub.**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Agronomía.

María Gabriela Ferrando Kyling

Valdivia Chile 2002

PROFESOR PATROCINANTE

Sra. M. Ximena Henzi G.

Ing. Agr., Ph. D.

PROFESORES INFORMANTES

Sr. Peter Seemann F.

Ing. Agr., Dr. rer. hort.

Sra. Flavia Schiappacasse C.

Ing. Agr., M. Sc

Sr. Juan Fuentealba A.

Prof. de Biol. y Quím., M. Sc.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por haberme enseñado el amor al campo.

Agradezco a mis hermanos por compartir conmigo este gran amor

Agradezco a Gonzalo por ese apoyo incondicional que me ha dado siempre.

Agradezco sinceramente al profesor Peter Seemann por haberme “adoptado” como alumna tesista , por todos los consejos recibidos, por todo el tiempo dedicada a este trabajo y por haberme motivado a terminar y defender esta tesis.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Importancia de las geófitas	3
2.1.1	Definición de geófitas	3
2.1.2	Realidad de las geófitas ornamentales a nivel mundial	3
2.1.3	Realidad de las geófitas ornamentales a nivel nacional	5
2.2	<i>Rhodophiala</i>	7
2.2.1	Caracterización botánica de la Familia <i>Amaryllidaceae</i>	7
2.2.1.1	Problemática en la clasificación taxonómica de los géneros de la Familia <i>Amaryllidaceae</i>	8
2.2.2	Clasificación taxonómica del género <i>Rhodophiala</i>	8
2.2.3	Descripción de especies	9
2.2.3.1	Descripción de <i>Rhodophiala montana</i>	9
2.2.3.2	Descripción de <i>Rhodophiala rhodolirion</i>	10
2.2.3.3	Descripción de <i>Rhodophiala splendens</i>	12
2.2.4	Estado de conservación de las diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> presentes en Chile	13
2.2.5	Caracterización citogenética de <i>Rhodophiala</i> Presl. (<i>Amaryllidaceae</i>)	15
2.3	Propagación de geófitas a través de cultivo <i>in vitro</i>	16
2.3.1	Cultivo <i>in vitro</i> de especies pertenecientes a la familia <i>Amaryllidaceae</i>	17
2.3.2	Principios del cultivo de tejidos vegetales	19
3	MATERIAL Y METODO	22
3.1	Material	22

Capítulo	Página	
3.1.1	Ubicación del ensayo	22
3.1.2	Material biológico	22
3.1.2.1	Lugar de recolección del material biológico	22
3.1.3	Material de laboratorio	23
3.1.4	Reactivos	23
3.2	Método	23
3.2.1	Producción de explantes	24
3.2.2	Preparación de medios de cultivo	25
3.2.3	Incubación	25
3.2.4	Ensayo I: Determinación de un método de ingreso <i>in vitro</i> para <i>Rhodophiala montana</i> y <i>Rhodophiala rhodolirion</i> utilizando desinfección individual	26
3.2.4.1	Producción de explantes	26
3.2.4.2	Desinfección de los explantes	26
3.2.5	Ensayo II: Determinación de un método de ingreso <i>in vitro</i> para <i>Rhodophiala montana</i> y <i>Rhodophiala splendens</i> utilizando desinfección del bulbo completo	26
3.2.5.1	Desinfección del material	26
3.2.5.2	Producción de explantes	27
3.2.6	Ensayo III: Determinación de un método de ingreso <i>in vitro</i> para <i>Rhodophiala splendens</i> aplicando un procedimiento utilizado para <i>Nerine</i>	27
3.2.6.1	Desinfección del material	27
3.2.6.2	Producción de explantes	28
3.2.6.3	Medios de cultivo	28
3.2.7	Ensayo IV: Determinación de un método de ingreso <i>in vitro</i> para <i>Rhodophiala rhodolirion</i> y <i>Rhodophiala splendens</i> aplicando el procedimiento utilizado para <i>Nerine</i>	28
3.2.7.1	Producción de explantes	28

Capítulo	Página
3.2.7.2 Medios de cultivo	28
3.2.7.3 Baño antioxidante	29
3.2.7.4 Repique	29
3.2.8 Ensayo V: Evaluación del crecimiento de las plántulas desarrolladas en los ensayos anteriores	30
3.2.8.1 Preparación de las plántulas	30
3.2.8.2 Medio de cultivo	30
3.2.8.3 Incubación	30
3.2.9 Evaluación	30
3.2.9.1 Factores evaluados	31
3.2.9.2 Período de evaluación	31
3.2.9.3 Evaluaciones realizadas	32
3.2.9.4 Análisis de datos	33
4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
4.1 Causas de eliminación	34
4.1.1 Explante eliminado por contaminación	35
4.1.2 Explante eliminado por necrosis de tejido	36
4.1.3 Explante eliminado por no presentar desarrollo	36
4.1.4 Comportamiento de los ensayos	37
4.1.4.1 Ensayo I	37
4.1.4.2 Ensayo II	38
4.1.4.3 Ensayo III	40
4.1.4.4 Ensayo IV	41
4.1.5 Propuesta de desinfección para el material vegetal	46
4.2 Descripción del desarrollo organogénico de <i>Rhodophiala</i>	47
4.2.1 Sobrevivencia de los explantes en relación al medio de incubación	50
4.2.2 Evaluación del desarrollo organogénico de los ensayos I, II y III	51
4.2.2.1 Desarrollo de callo	51

Capítulo		Página
4.2.2.2	Desarrollo de brotes y hojas	52
4.2.3	Evaluación del crecimiento de los explantes	55
5	CONCLUSIONES	56
6	RESUMEN	58
	SUMMARY	59
7	BIBLIOGRAFÍA	60
	ANEXOS	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Áreas de distribución y estado de conservación de las diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> en Chile.	14
2	Lugar de recolección de <i>Rhodophiala montana</i> , <i>Rhodophiala rhodolirion</i> y <i>Rhodophiala splendens</i> .	23
3	Composición fitohormonal de los medios de cultivo.	25
4	Período de evaluaciones.	32
5	Niveles de oxidación.	32
6	Eliminación (%) y causa de eliminación de las especies <i>Rhodophiala splendens</i> y <i>Rhodophiala rhodolirion</i> pertenecientes al Ensayo IV (12 días después del inicio).	42
7	Ensayo IV. Eliminación (%) promedio en base al total y eliminación de acuerdo a la composición del medio de cultivo (12 días después de inicio).	44
8	Sobrevivencia (%) de los explantes de acuerdo al medio de cultivo.	50
9	Ensayo V. Variación del crecimiento de los explantes en el tiempo.	55

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Rhodophiala montana</i> (Phil.) Traub.	9
2	<i>Rhodophiala rhodolirion</i> (Baker) Traub.	10
3	<i>Rhodophiala splendens</i> (Rengifo) Traub.	12
4	Cromosomas metafásicos de <i>Rhodophiala rhodolirion</i> .	16
5	Corte de bulbo y producción de explantes.	24
6	Explante que presentó ataque de bacterias (<i>Rhodophiala splendens</i>).	35
7	Explante que presentó ataque de hongos (<i>Rhodophiala rhodolirion</i>).	35
8	Explante que presentó tejido necrosado (<i>Rhodophiala splendens</i>).	36
9	Explante que no presentó desarrollo (<i>Rhodophiala montana</i>).	36
10	Ensayo I. Eliminación de explantes (%) por contaminación (CONT), tejido necrótico (TEJ. NEC.) y sin desarrollo (S/DES) de <i>Rhodophiala montana</i> (Rm) y <i>R. rhodolirion</i> (Rr).	38
11	Ensayo II. Eliminación de explantes (%) por contaminación (CONT) y sin desarrollo (S/DES) de <i>Rhodophiala montana</i> (Rm) y <i>R. splendens</i> (Rs).	39
12	Ensayo III. Eliminación de explantes (%) por contaminación (CONT) y sin desarrollo (S/DES) de <i>Rhodophiala splendens</i> (Rs).	41
13	Niveles de oxidación (<i>Rhodophiala rhodolirion</i> y <i>R. splendens</i>).	42
14	Ensayo IV. Nivel de oxidación (%) alcanzado por los explantes de <i>Rhodophiala rhodolirion</i> y <i>R. splendens</i> .	43
15	Escamas desarrollaron tonalidad verdosa y comienzan a separarse (<i>Rhodophiala montana</i>).	48
16	Escamas desarrollaron apertura en 180°. Entre las escamas se observó el crecimiento vegetativo (<i>Rhodophiala splendens</i>).	48
17	Desarrollo de raíces (<i>Rhodophiala splendens</i>).	49

Figura		Página
18	Formación de callo (%) correspondiente a los Ensayos I, II y III en <i>Rhodophiala montana</i> (Rm), <i>R. rhodolirion</i> (Rr) y <i>R. splendens</i> (Rs).	52
19	Desarrollo de hojas y brotes (%) correspondientes al Ensayo I en <i>Rhodophiala montana</i> (Rm) y <i>R. rhodolirion</i> (Rr).	53
20	Desarrollo de hojas y brotes (%) correspondientes al Ensayo II en <i>Rhodophiala montana</i> (Rm) y <i>R. splendens</i> (Rs).	53
21	Desarrollo de hojas y brotes (%) correspondientes al Ensayo III en <i>Rhodophiala splendens</i> (Rs).	53
22	Número de hojas promedio por explante, correspondiente a los Ensayos I, II y III en <i>Rhodophiala montana</i> (Rm), <i>R. rhodolirion</i> (Rr) y <i>R. splendens</i> (Rs).	54

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Programa de evaluación en el tiempo.	65
2	Eliminación de explantes (%) por repetición, correspondientes a los ensayos I, II, III y IV.	66
3	Organogénesis <i>in vitro</i> en <i>Rhodophiala montana</i> (Rm), <i>Rhodophiala rhodolirion</i> (Rr) y <i>Rhodophiala splendens</i> (Rs) (Ensayos I, II y III).	67
4	Escamas presentaron apertura de 180° y desarrollo de callo en la unión escama-disco basal (<i>Rhodophiala rhodolirion</i>).	68
5	Desarrollo de hojas a partir de unión escama-disco basal (<i>Rhodophiala splendens</i>).	68
6	Crecimiento de microbulbillo en unión escama-disco basal (<i>Rhodophiala montana</i>).	69
7	Desarrollo de raíz (<i>Rhodophiala splendens</i>).	69
8	Bulbos de las especies de <i>Rhodophiala</i> investigadas.	70
9	Material vegetal contaminado (<i>Rhodophiala rhodolirion</i>).	71

1 INTRODUCCION

A nivel mundial la floricultura presenta un potencial de desarrollo interesante, marcado por las necesidades de un mercado cada día más exigente. Es por ello que todos los esfuerzos se concentran en una intensa búsqueda de nuevas especies con potencial florícola, para su posterior producción a nivel comercial.

El mejoramiento o la creación de nuevos cultivares lentamente está emergiendo en países sudamericanos, constituyéndose éstos en potenciales proveedores de diversidad genética para el demandante mercado. Es así como al patrimonio nacional pertenecen entre otras, una enorme diversidad de especies bulbosas nativas, constituyendo éstas un pool genético interesante de ser estudiado y analizado con el objetivo de crear y mejorar nuevas variedades. El estudio de material nativo busca analizar un material genético único, evitándose la extinción de especies endémicas.

La demanda de especies nativas a nivel nacional, hoy en día, se encuentra en aumento, no encontrándose productores dedicados al rubro. Muy por el contrario, se observan a menudo extracciones desmesuradas, las cuales de continuar, sólo aportaran nuevas especies en extinción al patrimonio botánico nacional. Con el mejoramiento y la creación de nuevos cultivares se busca dar mayor valor al material genético nativo para el uso paisajístico, el desarrollo de la producción de bulbos para uso en maceta o para flor de corta, el desarrollo potencial como producto de exportación y la posibilidad de patentar los cultivares obtenidos producto de tal mejoramiento genético. Todo ello además podría constituir una alternativa innovadora para la agricultura chilena.

Por lo general a nivel nacional las especies nativas han sido poco valoradas y aún menos estudiadas. Han sido países extranjeros los que han extraído material, lo han estudiado, mejorado y finalmente han creado nuevas variedades, las cuales se comercializan a nivel mundial, con el consiguiente pago de “royalties” a esos países y no a los de origen del material genético.

El género *Rhodophiala* es endémico de Chile, las diversas especies que constituyen este género se desarrollan en forma silvestre entre la III y la X Región. Las especies *Rhodophiala montana* (Phil) Traub., *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub. y *Rhodophiala splendens* (Rengifo) Traub., objeto de trabajo de la presente tesis, presentan atractivas características ornamentales como tipo y color de floración, altura de tallo y hábito de crecimiento, características que dan al género un potencial como flor de corta.

Para estudiar en detalle estas especies, es necesario, sin embargo, desarrollar sistemas de propagación vegetativa que hagan posible disponer de material genético homogéneo. Una de estas técnicas de propagación, que se vislumbra como posible de usar, es el cultivo *in vitro*. Por ello se ha planteado como hipótesis del presente trabajo que es posible multiplicar especies de *Rhodophiala*, mediante técnicas de multiplicación *in vitro*.

El objetivo general que persigue esta tesis es determinar un método de cultivo *in vitro* para multiplicar las especies *Rhodophiala montana*, *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens* (*Amaryllidaceae*), endémicas de Chile.

Dentro de los objetivos específicos de esta tesis se encuentran:

- determinar un sistema de desinfección del material para establecer el cultivo
- determinar la cantidad de explantes producidos a partir de cada sección de bulbo, que permite un mejor desarrollo organogénico
- determinar el efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas sobre el desarrollo organogénico *in vitro* de las especies
- describir el crecimiento *in vitro* de las especies en estudio

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Importancia de las geófitas

Actualmente las geófitas ornamentales constituyen cultivos de importancia para la floricultura, con más de 60 géneros que se comercializan a través del mundo (DE HERTOUGH y LE NARD, 1993).

2.1.1 Definición de geófitas. Plantas geófitas son aquellas que producen bulbos, cormos, tubérculos, raíces y tallos tuberosos, rizomas y pseudobulbos, o en general estructuras vegetativas especializadas, cuya función principal es el almacenamiento de nutrientes. La estructura subterránea da a estas plantas la capacidad de soportar condiciones adversas de crecimiento. Por lo general corresponden a plantas herbáceas, perennes cuyo tallo muere al final de la estación de crecimiento y la planta sobrevive en el terreno como un órgano carnosos que presenta yemas, las cuáles se constituirán en tallos en la estación siguiente (HARTMANN y KESTER, 1988).

En su hábitat nativo las bulbosas están sometidas a un amplio rango de condiciones climáticas, las cuales explican los diversos requerimientos que estas plantas tienen para crecer y desarrollarse. El crecimiento y desarrollo de estas especies es controlado por factores ambientales tales como temperatura, humedad y fotoperíodo (DE HERTOUGH y LE NARD, 1993).

2.1.2 Realidad de las geófitas ornamentales a nivel mundial. Los grandes protagonistas en el mercado mundial son Europa occidental, USA y Japón como importadores; Holanda y otros países de Europa occidental, Colombia, Norte América como exportadores. Otros países que han logrado posicionarse más recientemente como exportadores de flores cortadas son Ecuador, Kenya, Israel y Zimbawe; y en bulbos Israel, Nueva Zelanda y Chile (FUNDACIÓN CHILE, 2001).

Las estadísticas basadas en los 17 principales países productores, permiten estimar que la superficie mundial destinada a flores cortadas es de 60.000 hectáreas. La

tasa anual de crecimiento del consumo mundial de flores frescas cortadas es de 6-9 % lo que significa que su demanda per-cápita va aumentando en el tiempo, especialmente como resultado del aumento en los ingresos y de los gustos y preferencias. El comercio mundial de flores también está creciendo en forma importante, debido a la preferencia por consumir una mayor variedad de especies y colores, y debido a que las ofertas locales son usualmente estacionales pudiendo ser complementadas desde otras regiones durante el resto del año (FUNDACIÓN CHILE, 2001).

Un aspecto importante en este mercado es la protección a las variedades desarrolladas por las grandes empresas mediante el cobro de patentes, licencias y restricciones a su multiplicación. Estas variedades involucran inversiones importantes en recursos y tiempo, siendo el respeto a la propiedad intelectual, lo que permite mantener el flujo continuo de nuevo material genético de mayor diversidad y calidad. Son pocos los países y empresas que participan en la actividad del desarrollo genético de flores, destacándose Holanda y a un nivel menor, países como Israel, Nueva Zelanda, Sudáfrica, USA y Japón (FUNDACIÓN CHILE, 2001).

Hoy en día, la búsqueda de nuevos cultivares, de variados colores, diseños y fragancias que se ajusten a las exigencias del mercado internacional es una tarea ardua y continua, e involucra tanto investigación básica, como aplicada (PEÑAILILLO, 2000).

Las flores producidas a partir de bulbos son de menor importancia relativa, pero su demanda se encuentra en expansión, al igual que el comercio internacional de bulbos para la producción de flores (FUNDACIÓN CHILE, 2001).

Las especies florícolas presentes en el mercado de Japón son bastante conocidas a nivel de los consumidores y existe en este momento un deseo por la presencia de nuevas especies. Para la búsqueda de una nueva especie primero se deben recopilar documentos y referencias ya existentes, para luego adquirir el material vegetal desde el extranjero e investigarlo. En una nueva especie florícola se busca: un largo de tallo comercial, una larga vida de postcosecha de la flor, resistencia a enfermedades y un conveniente hábito de floración. Actualmente se están investigando en Japón nuevas plantas florícolas, tales como, especies de *Zephyra*, *Leucocoryne* y *Rhodophiala* (OHKAWA, 2000).

2.1.3 Realidad de las geófitas ornamentales a nivel nacional. Basándose en las tendencias observadas en la estadística, la producción y exportación de bulbos florícolas está representando una alternativa atractiva para Chile desde el punto de vista comercial. Su demanda mundial se encuentra en aumento, siendo directamente proporcional con la de flores, debido al creciente interés del mercado hacia las flores provenientes de bulbos como liliium y tulipán. Por otro lado los grandes exportadores y productores, cuentan con un producto, el bulbo, que es fácil de manipular y transar (FUNDACIÓN CHILE, 2001).

Los datos censales muestran que en 1976 la superficie destinada al cultivo de flores era de 621.9 ha la que se duplicó durante el período intercensal alcanzando una superficie de 1.472 ha en 1997 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA, INE. 1976, 1997).

La mayor novedad del sector floricultor nacional es la producción de bulbos iniciada hace pocos años y con destino a la exportación. En 1999 la superficie estimada fue de 183.5 ha, es decir, un 12 % de la superficie de flores del país, cifra que no deja de ser interesante e incluso este valor podría ser aún mayor, pues existe un gran número de pequeños agricultores que trabajan a menor escala y que por lo tanto es muy difícil de cuantificar (VERA y ACOSTA, 1999).

Chile posee excelentes condiciones agroclimáticas para el cultivo de flores y puede obtener su producción en contraestación con los mercados más importantes del Hemisferio Norte; es decir, cuando ellos disminuyen su oferta, Chile está en pleno proceso de producción (FUNDACIÓN CHILE, 2001).

El país cuenta con localidades aptas para la floricultura en una amplia extensión del territorio nacional. Se encuentran planteles comerciales desde la I a la X Región y se han incorporado las regiones del extremo sur para la producción de bulbos, principalmente con producciones al aire libre (FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA, FIA. 1999).

El desarrollo de la floricultura y de la industria de bulbos, requiere considerar la investigación de nuevas variedades en nuestro país, ya sea en el aprovechamiento de material nativo o en la creación de nuevas variedades florícolas de las especies introducidas. Tal escenario evitaría en muchos casos el pago excesivo de patentes o

licencias por el uso de variedades extranjeras, y las restricciones impuestas sobre el volumen de producción, permitiría expandir y diversificar la oferta nacional para la exportación y el mercado interno. Igualmente haría posible el desarrollo del sector productor de flores de bulbo con destino a la exportación (FUNDACIÓN CHILE, 2001).

Chile es un país privilegiado, pues existen 44 géneros de geófitas que pueden ser utilizadas como ornamentales, siendo superado tan sólo por Sudáfrica (DE HERTOIGH y LE NARD, 1993; PEÑAILILLO, 2000).

La mayor riqueza de especies de geófitas se ubica entre la IV y la VIII Región. Algunas geófitas son parte del estrato herbáceo de las formaciones vegetales áridas, semiáridas y esclerófilas de Chile Central; en cambio, otras pertenecen a la vegetación herbácea subandina y andina de la Cordillera de Los Andes (PEÑAILILLO, 2000).

El grado de adaptabilidad de algunas de las geófitas chilenas a diferentes condiciones ambientales es algo asombroso. Por ejemplo, en Atacama, uno de los desiertos más áridos del mundo, con un promedio de precipitación anual de 25 mm, en períodos de años lluviosos aparecen poblaciones relativamente extensas y densas de varias especies de bulbosas, tales como: *Rhodophiala*, *Leucocoryne*, *Zephyra*, *Camassia*, *Alstroemeria*, etc. (HOFFFMANN, 2000).

Desde el punto de vista de la mantención de la biodiversidad, muchas de estas geófitas presentan problemas de conservación. Algunas de ellas constituyen poblaciones pequeñas, muy locales, por lo cual cualquier alteración de sus hábitats podría llevar a su extinción; además estas geófitas crecen donde hay una fuerte destrucción de los hábitats por tala de bosques, incendios y plantaciones de monocultivos como aquellos de pino insigne (*Pinus radiata* D. Don). Esto hace que los estudios de propagación por vía asexual o sexual sean un aporte al conocimiento de la biología de estas especies que a veces es escasa o insuficientemente conocida y un mecanismo para rescatar las especies en peligro conservándolas ya sea *in situ* o *ex situ* (PEÑAILILLO, 2000).

En Chile el estudio químico de las plantas está solo comenzando, y aún no sabemos que compuestos importantes pueden contener las geófitas. Lo que es obvio, es su potencial como plantas ornamentales. Muchas de ellas han sido cultivadas por

décadas en Europa y los Estados Unidos, como las diferentes variedades de *Alstroemeria*, *Placea*, *Rhodophiala*, *Leucocoryne*, etc. (HOFFMANN, 1989).

2.2 **Rhodophiala.**

El género *Rhodophiala*, perteneciente a la familia *Amaryllidaceae*, posee especies chilenas que se distribuyen mayoritariamente desde la III a la X Región (SCHIAPPACASSE y PEÑAILILLO, 2001).

2.2.1 Caracterización botánica de la Familia Amaryllidaceae. Son hierbas con un sistema radicular bulboso tunicado o muy raramente un rizoma; hojas escasas desde la base del tallo o bulbo; más o menos lineares, de nerviación paralela y nervios secundarios transversales; flores generalmente vistosas, de color amarillo, rosado, rojo o púrpura, flores solitarias, hermafroditas y umbeladas en el extremo del escapo, sustentadas por un involucro de dos o más (raramente uno solo) brácteas generalmente membranosas; perianto insertado debajo o generalmente sobre el ovario, petaloídeo, a menudo marchito y persistente, con o sin un tubo; segmentos o lóbulos 6, en dos series, todos iguales y semejantes, el más interior más pequeño o más grande que el exterior; corona a menudo presente; estambres 6 (raramente más), opuestos a los segmentos o lóbulos del perianto, hipóginos o insertados en el tubo o hacia la base de los segmentos; filamentos libres o expandidos en la base y conados y formando una corona falsa; anteras 2-celdas, introsas, basificadas o versátiles, abriéndose por suturas longitudinales; ovario súpero o ínfero, de tres celdas (o raramente por aborto de una celda), con placentas axilares (raramente parietales); estilo delgado, con un estigma capitado a 3-lobulado; óvulos generalmente numerosos en cada celda y superpuesto en 2 series, anátropos; fruto una cápsula carnosa e indehisciente; semillas generalmente numerosas, de color negro y brillantes, con endosperma carnoso, rodeando el pequeño embrión, algunas veces angulares o comprimidas y aladas (MUÑOZ, 1966; PEÑAILILLO, 2000).

Dentro de las especies más comunes de la Familia *Amaryllidaceae* presentes en Chile se encuentran *Brodiaea violacea* (Kth) Engl., Mapolita azul, amapolita; *Hippeastrum advenum* Herb., ñañañuca; *Hippeastrum bicolor* (R et Pav.) Baker, amancay, ñañañuca, azucena del diablo, corral del cerro, chupapoto; *Hippeastrum*

phycelloides (Herb.) Baker, revienta ojos; *Leucocoryne alliaceae* Lindl., huilli de San Francisco; *Leucocoryne purpurea* Gay, cebollín; *Leucocoryne ixioides* Lindl., huille, huilli; *Nothoscordum inodorum* (Ait.) Aschers et Graebn., lágrima; *Nothoscordum striatum* (Jacq.) Kunth., huilli de perro, cebolleta; *Placea ornata* Miers, lagañosa; *Placea arzae* Phil., macaya, macalla (MUÑOZ, 1966).

2.2.1.1 Problemática en la clasificación taxonómica de los géneros de la Familia *Amaryllidaceae*. Según lo citado por PALMA-ROJAS (2000), la nomenclatura de los géneros de la Familia *Amaryllidaceae*, en Chile ha sido, desde sus primeras descripciones, muy confusa. Ravenna (1979) citado por PALMA-ROJAS (2000), reconoce para Chile nueve géneros de *Amaryllidaceae* señalando que las especies adscritas a *Hippeastrum* por Baker (1888), corresponden a los géneros *Rhodophiala*, *Phycella* y *Rhodolirium*. Esta situación concuerda con lo propuesto por Philippi(1895), citado por PALMA-ROJAS (2000), quién además de *Rhodophiala* y *Phycella* reconoce a *Hippeastrum* para la flora chilena. Traub y Moldenke (1949), (PALMA-ROJAS, 2000), sinonimizaron a *Hippeastrum* bajo *Amaryllis*, pero reconocen como subgéneros a *Rhodophiala* y *Phycella*. Posteriormente Marticorena y Quezada (1985), citados por PALMA-ROJAS (2000), no reconocen para Chile a *Phycella*, pero sí a *Rhodophiala* e *Hippeastrum*. Sin embargo, y utilizando material colectado en Chile de cinco especies supuestamente de *Hippeastrum*, Hunziker (1984;1991), confirma para Chile a *Rhodophiala* y *Phycella*, excluyendo a este último de la flora argentina (PALMA-ROJAS, 2000).

2.2.2 Clasificación taxonómica del género *Rhodophiala*. El género *Rhodophiala* corresponde a una Monocotiledónea endémica de Chile, perteneciente al Superorden *Liliiflorae*, Orden: *Asparagales*, Familia: *Amaryllidaceae*. La familia *Amaryllidaceae* se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de Chile y también en varios otros países de Sudamérica (HOFFMANN, 1989).

2.2.3 Descripción de especies.

El género *Rhodophiala* se caracteriza por producir hermosas flores de destacados colores (SCHIAPPACASSE y PEÑAILILLO, 2001), a continuación se describen las especies con las que se trabajó en la presente investigación.

2.2.3.1 Descripción de *Rhodophiala montana*:



FIGURA 1. *Rhodophiala montana* (Phil.) Traub.

FUENTE: cortesía de SCHIAPPACASSE (2001).

Nombre científico: *Rhodophiala montana* (Phil.) Traub. (= *Hippeastrum bakeri*).

Nombre vernacular: “Añañuca de las montañas”.

Familia: *Amaryllidaceae*.

Descripción: Hierba de 22,5-40 cm de alto, provista de un bulbo tunicado, pardo brillante, de 1,9-5,4 cm de diámetro. Hojas 3-8, lineares, de 11-21 cm de largo por 0,4-0,8 cm de ancho. Flores, amarillas, de 2-7 (11) dispuestas en una umbela. Perigonio en forma de embudo, formado por 6 tépalos oblanceolado-angostos, 3-4,2 cm de largo por 3-5,5 cm de ancho. Paraperigonio presente de 0,05 cm de largo, escamoso y fimbriado.

Estambres 6 algo desiguales, ocupando 2/3 del largo de los tépalos. Gineceo tricarpelar, de ovario ínfero, estilo monoliforme rematando en un estigma trífido. Fruto: una cápsula tricoca, de dehiscencia valvívida, con numerosas semillas de color negro brillante, aplanadas y portando un ala papirácea. Endémica de la Cordillera de los Andes de la VII Región. Florece en verano, fructifica en marzo y entra en receso en otoño.

Las características ornamentales de esta planta son las siguientes:

Largo de la vara	: 21-43 cm
Follaje	: Verde glauco
Tipo de inflorescencia	: Umbela
Nº inflorescencia por vara	: 1 (2)
Nº de flores por vara	: 3-7 (11)
Tamaño de la flor	: Mediano
Color de las flores	: 1ario : amarillo, 2dario : -
Posición de las flores	: Hacia afuera

2.2.3.2 Descripción de *Rhodophiala rhodolirion*:



FIGURA 2. *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub.

FUENTE: cortesía de SCHIAPPACASSE (2001).

Nombre científico: *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub. (=Hippeastrum rhodolirion).

Nombre vernacular: “Añañuca de la cordillera”.

Familia: *Amaryllidaceae*

Descripción: Hierba de 9-18 cm de altura, de bulbo tunicado, pardo brillante, de 1-4,1 cm de diámetro. Hojas lineares de 10-18 cm de largo por 0,25-0,35 cm de ancho. Flor cigomorfa, solitaria. Perigonio ampliamente acampanado de 4-6 cm de largo, formado por 6 tépalos rosados con líneas de color carmín y un tubo corto verde amarillento. Fruto: una cápsula tricoca, de 2,3-3,0 cm de diámetro, dehiscente, conteniendo 9-49 semillas negras, planas aladas. Habita las laderas secas y soleadas de la Cordillera de los Andes y de la Costa en las provincias centrales (V-VII Región). También presente en Argentina. Florece en la época de verano, la fructificación ocurre en marzo, para luego entrar en receso.

Las características ornamentales de esta planta son las siguientes:

Largo de la vara	: 9-18 cm
Follaje	: Verde
Tipo de inflorescencia	: Flor solitaria
N° inflorescencia por vara	: 1
N° de flores por vara	: 1
Tamaño de la flor	: Grande
Color de las flores	: 1ario : rosado, 2dario : carmín
Posición de las flores	: Hacia afuera

2.2.3.3 Descripción de *Rhodophiala splendens*:



FIGURA 3. *Rhodophiala splendens* (Rengifo) Traub.

FUENTE: cortesía de SCHIAPPACASSE (2001).

Nombre científico: *Rhodophiala splendens* (Rengifo) Traub. (= *Hippeastrum splendens*).

Nombre vernacular: “Añañuca esplendorosa”.

Familia: *Amaryllidaceae*.

Descripción: Hierba de 27-48 cm de alto, con un bulbo tunicado, pardo oscuro, de 1,4-3,3 cm de diámetro. Hojas lineares, de 15-90 cm de largo por 0,7-1,3 cm de ancho. Flores de color rojo intenso, dispuestas en una umbela. Perigonio formado por 6 tépalos, de 8 cm de largo; tubo del perigonio corto. Paraperigonio presente formado por escamas fimbriadas de 0,05-0,07 cm de largo. Estambres 6, de filamento rojo brillante y anteras dorsifijas, amarillas. Gineceo tricarpelar, ovario ínfero estilo monoliforme y estigma trifido. Tanto los estambres como el estilo se curvan hacia arriba. Fruto una cápsula tricoca, pardo rojiza, de 1,1-2,3 cm de diámetro, conteniendo 16-42 semillas, de color negro brillante, aplanadas y aladas. Habita la Precordillera de los Andes de San Fernando a Talca (VI y VII Región). Florece en verano, fructifica en marzo y entra en receso en otoño.

Las características ornamentales de esta planta son las siguientes:

Largo de la vara	: 27-48 cm
Follaje	: Verde
Tipo de inflorescencia	: Umbela
N° inflorescencia por vara	: 1
N° de flores por vara	: 2-4(7)
Tamaño de la flor	: Mediano a Grande
Color de las flores	: 1ario : rojo intenso, 2dario : -
Posición de las flores	: Hacia afuera

Los datos para cada una de las especies caracterizadas son originales y corresponden a los resultados del proyecto FIA: Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial (SCHIAPPACASSE y PEÑAILILLO, 2001).

De estudios morfológicos en *Hippeastrum hybridum* se sabe que el volumen del bulbo está compuesto en su totalidad por el engrosamiento de bases de hojas, y no por escamas verdaderas, como ocurre en muchas otras especies (OKUBO, 1993). Lo mismo ocurre en *Rhodophiala*.¹

2.2.4 Estado de conservación de las diferentes especies de *Rhodophiala* presentes en Chile. Muchas especies, aunque abundantes en hábitat, están peligrosamente amenazadas por el hombre. El crecimiento de áreas agrícolas y urbanas, el sobrepastoreo, la erosión, el fuego provocado, son factores que perturban profundamente las comunidades biológicas (HOFFMANN, 1989).

También son importantes las acciones directas sobre las poblaciones, tales como la extracción de bulbos y el corte de flores con fines comerciales, situación que también ocurre con otras especies como: *Leucocoryne spp.*, *Placea spp.*, *Alstroemeria spp.*, *Pasithea coerulea*, *Phycella bicolor*, etc., que llegan por millones a los mercados de flores de las ciudades (HOFFMANN, 1989).

En el Cuadro 1 HOFFMANN (1989), presenta la ubicación geográfica de las diferentes especies de *Rhodophiala*, además de la categoría de conservación

¹ PEÑAILILLO, P. 2001. Biólogo, Dr. Biología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Comunicación personal.

correspondiente, de acuerdo a la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y sus Recursos):

CUADRO 1. Areas de distribución y estado de conservación de las diferentes especies de *Rhodophiala* en Chile.

Especie	Distribución	Conservación
<i>Rhodophiala advena</i>	Regiones Metropolitana y V	FP
<i>R. ananuca</i>	Prov. Atacama (Caldera, Copiapó)	FP
<i>R. andicola</i>	Antuco, Linares, Cordillera de Chillán	R
<i>R. angustifolia</i>	Santiago, Valle del Maipo	IC
<i>R. araucana</i>	Andes de la Araucanía, Cupulhue	R
<i>R. bagnoldii</i>	Sur de la II a IV Regiones	FP
<i>R. bakeri</i>	Cordillera de Talca	R
<i>R. berteroana</i>	Rancagua	IC
<i>R. biflora</i>	Valdivia, cerca de San José	IC
<i>R. chilense</i>	Sur, lugares arenosos	IC
<i>R. colona</i>	Araucanía, de Renaico a Temuco	R
<i>R. consobrina</i>	Cordillera de Santiago	IC
<i>R. fulgens</i>	Cordillera de Santiago	R
<i>R. gayana=phycelloides?</i>	Cordillera de Santiago	IC
<i>R. laeta</i>	Costa de la Provincia de Antofagasta	V
<i>R. lineata</i>	Región Metropolitana	EP
<i>R. moelleri</i>	Araucanía	IC
<i>R. montana</i>	Talca, Cordillera de San Francisco	IC
<i>R. ovalleana</i>	Ovalle	IC
<i>R. phycelloides</i>	Andes de Chile	IC
<i>R. pratense=laeta?</i>	Costa del desierto de Atacama	V
<i>R. purpurata</i>	Cordillera de Linares	IC
<i>R. rhodolirion</i>	Cordillera de San Francisco	IC
<i>R. roseum</i>	Islas de Chiloé	IC
<i>R. solsii</i>	Región del Maule, Chillán	IC
<i>R. splendens</i>	Curicó	IC
<i>R. tenuiflora</i>	Provincia de Santiago, Valle Largo	IC
<i>R. tilitensis</i>	Región Metropolitana, Til-Til	R
<i>R. uniflora</i>	Cachinal de la Costa	IC

Extinta (EX), En Peligro (EP), Vulnerable (V), Rara (R), Fuera de Peligro (FP), Insuficientemente Conocida (IC)

FUENTE: HOFFMANN (1989).

2.2.5 Caracterización citogenética de *Rhodophiala* Presl. (*Amaryllidaceae*).

Rhodophiala phycelloides posee un cariotipo $2n=18$ con dos pares metacéntricos que son los más pequeños del cariotipo, un par submetacéntrico y seis subtelocéntricos. El par número 7 presenta una constricción secundaria subtelomérica en el brazo largo y que, de acuerdo a los resultados recientemente obtenidos, corresponde a la zona organizadora de nucléolo activa (NOR). En un estudio realizado por PALMA-ROJAS (2000), encontró que en un 5% de las células en metafase examinadas se presenta un pequeño cromosoma B submetacéntrico. *Rhodophiala bagnoldii* y *Rhodophiala advena* presentan el mismo cariotipo que *Rhodophiala phycelloides* y también en ambas, el par 7 presenta una constricción secundaria subtelomérica en el brazo largo que probablemente corresponde a las zonas organizadoras del nucléolo. En un 11% de las células estudiadas de estas especies también se encontraron cromosomas B, de morfología similar a los encontrados en *Rhodophiala phycelloides*. La comparación cuantitativa de los cariotipos promedio muestra que estas tres especies comparten una misma morfometría cariótica (Palma-Rojas (1982), citado por PALMA-ROJAS, 2000).

Rhodophiala laeta posee un cariotipo $2n=16$ con cuatro pares metacéntricos, un par submetacéntrico y tres subtelocéntricos. El par siete presenta una constricción secundaria subtelomérica en el brazo corto, que probablemente corresponde a la zona organizadora de nucléolo. Este cariotipo es cualitativo y cuantitativamente distinto a aquel compartido por las otras tres especies de *Rhodophiala* estudiadas (Palma-Rojas (1982), citado por PALMA-ROJAS, 2000).

Se han realizado conteos cromosómicos en dos poblaciones de *Rhodophiala montana* de la VII Región (Laguna de la Invernada y Laguna del Maule, Cuesta Los Cóndores) encontrando un cariotipo $2n=18$.²

En *Rhodophiala rhodolirion* la técnica citológica empleada por MUÑOZ (2001) dio excelentes resultados en la visualización de los cromosomas. Los bulbos de *Rhodophiala rhodolirion* presentaron escaso número de raíces en las condiciones en que se enraizaron, aunque los meristemos radicales obtenidos de este material presentaron

² PEÑAILILLO, P. 2001. Biólogo Dr. Biología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Comunicación personal.

mitosis abundante. Los mayores obstáculos que se presentaron en la realización de los recuentos y caracterización morfológica de los cromosomas de esta especie se debieron a la pobre frecuencia del estado de metafase y a la deficiente contracción y dispersión de los cromosomas en la mayoría de las células. Para *Rhodophilala rhodolirion* se propone un cariotipo de $2n=16$ con 3 pares de cromosomas metacéntricos, 3 pares de cromosomas submetacéntricos y 2 pares de cromosomas subtelocéntricos (Figura 4).



FIGURA 4. Cromosomas metafásicos de *Rhodophilala rhodolirion*.

FUENTE: MUÑOZ (2001).

2.3 Propagación de geófitas a través de cultivo *in vitro*

La producción de bulbosas no hubiese podido alcanzar su potencial sin los avances biotecnológicos de las últimas dos décadas. El estudio de la fisiología *in vitro*, la micropropagación y la eliminación de patógenos, el rescate de embriones y los avances genéticos en relación a la biodiversidad, han contribuido a la producción comercial de geófitas y continuarán haciéndolo en el futuro. Sistemas de propagación a través del desarrollo de ramillas axilares, organogénesis y embriogénesis somática han sido utilizadas aún para las especies más resistentes (ZIV, 1997).

La multiplicación clonal es la aplicación comercial más utilizada de la biotecnología. Las técnicas del cultivo de tejido han sido usadas extensivamente para micropropagación de la mayoría de las geófitas que se desarrollan comercialmente. La

micropropagación es factible, alcanzando desarrollo axilar, organogénesis y formación de raicillas adventicias o por embriogénesis somática. La regeneración *in vitro* se basa en la totipotencia de la planta: la habilidad de aislar células vegetales en cultivo para desdiferenciarlas y regenerar una nueva planta. La organogénesis envuelve la regeneración de meristemas unipolares sobre los cuales se puede inducir la formación de raicillas y brotes. La embriogénesis somática envuelve el desarrollo de meristemas bipolares, los cuales se pueden desarrollar en una planta completa, o en geófitas, directamente de órganos perennes (ZIV, 1997).

2.3.1 Cultivo *in vitro* de especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae. Según OKUBO (1993), en *Hippeastrum*, la forma de propagación que permite la más rápida multiplicación de las plantas es el cultivo *in vitro*, utilizando principalmente “escamas” (más bien bases de hojas). El método de las “escamas gemelas”, consiste en la división del bulbo en secciones verticales, con la posterior subdivisión en trozos de dos escamas. Huang *et al.* (1990), citados por OKUBO (1993), descubrieron que la necesidad de utilizar dos escamas está en la existencia de conexiones vasculares entre ambas, que permiten el desarrollo de bulbillos en el punto de unión de las escamas.

Amaryllis puede ser multiplicada a través de técnicas asépticas de cultivo de tejido usando medios especiales. El típico material de micropropagación incluye escamas dobles y tejido de tallos florales desarrollados, para este caso los escapos son cosechados al momento de emergencia desde el bulbo, donde una pequeña sección de tejido de la base del pedicelo se coloca bajo condiciones estériles. Por razones desconocidas este tejido presenta el potencial de desarrollar bulbillos, pero se ha visto más propicio a mutaciones espontáneas, en comparación con explantes del tipo escama doble (MEEROW, 2000).

Los bulbos de narciso que dan origen a explantes para su posterior ingreso *in vitro*, por lo general, son mantenidos a bajas temperaturas. Cuando es requerido el desarrollo radicular posterior, se recomienda mantener el material por 2 a 3 semanas a temperatura ambiente, antes de ingresar el material *in vitro*. Para la posterior obtención de explantes del tipo escama gemela, debe primeramente ser eliminada la túnica externa, las raicillas y el tercio superior del bulbo. El resto del bulbo debe ser esterilizado

superficialmente, dividido en segmentos y separado en escamas gemelas. Cada escama debe encontrarse unida a un trozo de disco basal. Las escamas externas del bulbo producen la mayor cantidad de raíces adventicias, pero como también se consideran las mayormente contaminadas, algunos investigadores recomiendan usar solo las internas, restringiendo el número de raicillas resultantes durante la fase de inducción inicial (GEORGE y SHERRINGTON, 1993).

Dependiendo del tamaño del bulbo, es posible obtener entre 50 y 60 explantes (5 mm de ancho por 10 mm de largo) a partir de cada uno (GEORGE y SHERRINGTON, 1993).

El desarrollo de bulbillos adventicios, en diferentes especies de narciso, es factible en medio de cultivo MS, bajo oscuridad y sin la adición de reguladores de crecimiento, pero usualmente se cultivan los explantes en un medio que contenga ANA (1mg/L) y BAP (ej 2 mg/L). Squires y Langton (1992), citados por GEORGE y SHERRINGTON (1993), transfirieron los explantes con desarrollo radicular para su posterior crecimiento, a un medio MS con 1 mg/L AIB o ANA. Las hojas desarrolladas a partir de los explantes fueron eliminadas, y los bulbillos fueron trozados longitudinalmente para un posterior desarrollo de raicillas y nuevos bulbillos. Procedimiento que se repitió cada 4 a 6 semanas. En algunos experimentos la proliferación y el desarrollo de bulbillos se vio disminuida después de 2 a 3 cultivos, pero en medio MS con 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP, Chow *et al.* (1992), citados por GEORGE y SHERRINGTON (1993), descubrieron que la proliferación radicular posterior se ve favorecida, desarrollándose raicillas de mayor tamaño, debido a la poda de las hojas hasta los 20 mm. Utilizando una rutina más severa en los subcultivos, en que todo el material vegetal es removido y los bulbillos son trozados, se observó que la producción de raicillas se ve incrementada considerablemente en cantidad (GEORGE y SHERRINGTON, 1993).

Los explantes que han desarrollado raicillas son finalmente transferidos a un medio que contenga entre 5 y 10 g/L de sacarosa, pero carente de reguladores de crecimiento, después de un tiempo de cultivo, se observa el desarrollo de bulbillos (GEORGE y SHERRINGTON, 1993).

Los bulbos de *Paramongaia weberbaueri* (Valverde) especie miembro de la familia *Amaryllidaceae* son extremadamente raros. Esta planta endémica del Perú, presenta un hábitat restringido de 500 ha, y produce flores similares a las de narciso. La multiplicación de esta especie se realiza por bulbillos o semillas, los bulbos producen dos bulbillos por temporada normalmente, con un período de maduración de 2-3 años. DINKELMAN *et al.* (1989), desarrollaron la multiplicación *in vitro* de esta especie. Los bulbos fueron preesterilizados en etanol de 95° por 10 minutos, luego sumergidos en un baño de hipoclorito de sodio (3.5%) y Tween 20 por 30 minutos, seguidos por tres lavados en agua destilada estéril. Los explantes alcanzaron los 0.5 cm² constituidos por la escama del bulbo y un trozo del disco basal. El cultivo se realizó en un medio en MS con pH 5.8, suplementado con 0.8% Difco Bacto-agar, y diferentes dosis de ANA (1,2 o 3 mg/L) y cinetina (0.5, 1 o 2 mg/L). El cultivo fue mantenido a 25+/- 2°C bajo un fotoperíodo de 18 horas luz, bajo luz blanca fluorescente. El tejido cultivado en el medio que contenía 1 o 2 mg/L ANA y 0.5 mg/L cinetina presentó la mejor respuesta en términos de formación axilar de bulbos y producción de callo.

El método de propagación por escamas gemelas de *Rhodophiala montana*, desarrollado por BASOALTO (2001), utilizó bulbos de 10 a 11 cm de circunferencia y se obtuvo el mayor número de bulbillos por bulbo madre al dividir el bulbo en 8 secciones verticales y posterior separación de escamas gemelas o dobles, que fueron cultivadas en medio MS sin hormonas, con evaluaciones realizadas a los tres meses. Se logró obtener 57 bulbillos por cada bulbo madre, en comparación a 8 bulbillos obtenidos en propagación *ex-vitro* por medio del método de dividir bulbos en 4 secciones, que fue el tratamiento de mejor resultado en diferentes temporadas de evaluaciones.

2.3.2 Principios del cultivo de tejidos vegetales. Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro* se siguen una serie de principios básicos. Primeramente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último, se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación

adecuadas. Tanto la asepsia como la incubación del material vegetal se lleva a cabo en ambiente estéril (OCHOA, 1990).

El cultivo *in vitro* puede iniciarse a partir de cualquier parte de la planta, sin embargo, la fuente inicial de material vegetal puede ser determinante para el éxito en el establecimiento del cultivo. Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas, vigorosas y jóvenes como fuente de explante. Comúnmente se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas (OCHOA, 1990).

Por otro lado, es conveniente mencionar que el tamaño del explante es un factor a considerarse, pues la dificultad para iniciar un cultivo aumenta con la disminución del tamaño (OCHOA, 1990).

La respuesta regenerativa de los explantes cultivados *in vitro* puede resultar en una embriogénesis somática, u organogénesis (formación de raíces y brotes a partir de cultivo de tejido). Existen dos tipos de organogenesis, la principal de ellas la organogenesis directa, en que los explantes presentan la capacidad de dar origen a raíces, brotes o estructuras florales, cuando son cultivados en un medio suplementado con sales minerales, vitaminas y una fuente proteica, pero carente de hormonas vegetales, proceso conocido como: organogenesis adventicia. Las fitohormonas suplementadas exógenamente a menudo pueden facilitar estos procesos, pero no son requeridas fundamentalmente para la ocurrencia de la organogenesis, en este caso el precursor del nuevo órgano son las células del mismo explante. El otro tipo: la organogenesis indirecta, no es adventicia y envuelve un proceso de desdiferenciación del explante, es decir, desarrollo de tejido calloso a lo largo de los bordes del corte del explante e inducción de nuevos órganos a partir de este tejido calloso recientemente formado. Las fitohormonas suplementadas exógenamente no solo controlan el proceso, sino que también son requeridas para la ocurrencia de la organogenesis (CHRISTIANSON y WARNICK, 1988).

A gran escala, la organogenesis de brotes a partir de explantes de hojas es precedido por la formación de una pequeña cantidad de callo en los bordes de corte del explante. Efectivamente la investigación histológica demuestra que este callo es el tejido

de donde nacen los brotes. La elaboración de tejido calloso se refiere comúnmente a la dediferenciación del explante (CHRISTIANSON y WARNICK, 1988).

Observaciones cuidadosas revelan que la epidermis de los nuevos brotes apicales se encuentra en forma continua, como una capa celular externa de la masa callosa; efectivamente las observaciones preliminares revelaron la presencia de brotes no solo a lo largo de la nueva epidermis, sino también a lo largo de la superficie externa del callo. Green y Brooks (1978), citados por CHRISTIANSON y WARNICK (1988) argumentan un primer rol organizativo de la epidermis en la formación de nuevos ápices e indirectamente sugieren que la formación del ápice es un fenómeno superficial.

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Material

A continuación se describe el material vegetal y de laboratorio con el que se trabajó en la presente investigación.

3.1.1 Ubicación del ensayo: el desarrollo de la parte experimental de la tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile, ubicado en el Campus Isla Teja en la ciudad de Valdivia.

3.1.2 Material biológico: se utilizó tejido meristemático (trozos de escama con parte del disco basal de bulbo) de las especies: *Rhodophiala montana*, *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens*.

3.1.2.1 Lugar de recolección del material biológico: los bulbos pertenecientes a las especies *Rhodophiala montana* y *Rhodophiala rhodolirion* fueron colectados en comunas cordilleranas de la Provincia de Talca, VII Región, y pertenecen al germoplasma resultante del proyecto: “Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial” (SCHIAPPACASSE y PEÑAILILLO, 2001). Además se trabajó con bulbos pertenecientes a la especie *Rhodophiala splendens*, que corresponden a un generoso aporte del Vivero Pumahuida, propiedad de la Sra Mónica Musalem, ubicado en Carretera General San Martín 7021 (Región Metropolitana). Los lugares de procedencia de las distintas especies se especifican en el Cuadro 2:

CUADRO 2. Lugar de recolección de *Rhodophiala montana*, *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens*.

Especie	Lugar de colecta
<i>Rhodophiala montana</i>	Comuna Laguna del Maule (VII Región)
<i>Rhodophiala rhodolirion</i>	Comuna Enladrillado (VII Región)
<i>Rhodophiala splendens</i>	Sector Vilches (VII Región)

3.1.3 Material de laboratorio: para los ensayos se utilizó autoclave, balanza electrónica, balanza analítica, pH-metro, placa de agitación magnética, horno microondas, dispensador de medio de cultivo, cámara de flujo laminar horizontal, cámara de crecimiento, mechero, bisturí, lupa, pinza, pipeta, matraz, vaso precipitado, embudo, toalla nova, agua destilada, tubos de cultivo de tejido, papel aluminio laminado, lápiz marcador, placas Petri, jeringa estéril.

3.1.4 Reactivos: en las diferentes fases de la investigación se utilizaron los fungicidas: Captan (i.a: Captan) y Benlate (i.a: Benomilo), agua desionizada estéril, etanol 70%, etanol 96%, hipoclorito de sodio al 10%, Timentin, solución de sales MURASHIGE SKOOG (1962), benzilamino purina (BAP), ácido naftalen acético (ANA), KOH 0.5 N, agar, sacarosa.

3.2 Método

Se realizaron cinco ensayos, producto de los resultados que fueron observándose a medida de transcurridos éstos. Los primeros cuatro ensayos buscaron determinar un método de ingreso *in vitro* de las diferentes especies de *Rhodophiala* en estudio, manteniéndose constante la forma de producción de los explantes, el medio de cultivo utilizado y la incubación a la que fueron sometidas las unidades experimentales. Las variables de éstos ensayos fueron los diferentes métodos de desinfección del material vegetal, la cantidad de explantes producidos a partir de cada octavo de bulbo y las diferentes dosis de reguladores de crecimiento agregadas a cada uno de los medios de cultivo. El quinto ensayo permitió estudiar la tasa de crecimiento, de las plántulas sobrevivientes de los cuatro ensayos anteriores.

3.2.1 Producción de explantes. Con ayuda de un bisturí esterilizado, se eliminaron las raíces, además del tejido reseco y corchoso, que se había desarrollado en la superficie exterior del disco basal del bulbo.

Se sumergió el bulbo completo en una solución fungicida en base a Captan (i.a: Captan) y Benlate (i.a: Benomilo), y se mantuvo en agitación durante una hora. La solución presentó las siguientes concentraciones: 2,7 g/L de Captan y 1,8 g/L de Benlate, además de agua destilada. Posteriormente fueron eliminadas las capas externas (túnicas) del bulbo.

El corte del bulbo se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, bajo estrictas normas de sanidad, evitando la contaminación externa. Los explantes se produjeron de la siguiente forma: con ayuda de un bisturí y una pinza desinfectados en alcohol de 96° y luego flameados, cada bulbo se separó en ocho partes iguales, cortadas desde el ápice al plato basal. Cada octavo de bulbo a su vez se dividió en un determinado número de escamas dobles (como se observa en la Figura 5), dependiendo del ensayo, las cuales se diferenciaron de acuerdo a si se habían desarrollado en forma más interna o externa del mismo bulbo. Los explantes correspondieron a escamas dobles o escamas gemelas (“twin scales”), las cuales son dos escamas unidas por parte del plato basal del bulbo.

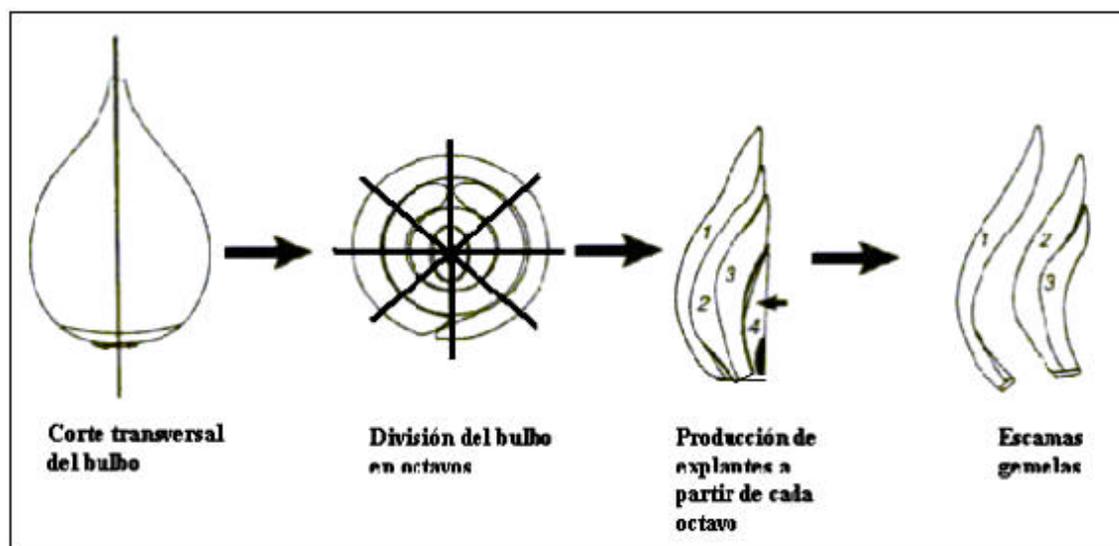


FIGURA 5. Corte de bulbo y producción de explantes.

FUENTE: adaptado de Van der Linde (1988), citado por GEORGE y SHERRINGTON (1993).

3.2.2 Preparación de medios de cultivo. Los medios de cultivo fueron preparados mediante soluciones madres, a las cuales se les agregó agua destilada. La formulación base de los medios de cultivo para todos los ensayos correspondió a la descrita por MURASHIGE y SKOOG (1962).

Además al medio se le agregó 20 g/L de sacarosa.

El pH de los medios se ajustó a 5.7 con alícuotas de KOH 0.5 N, previo a la adición de 8 g/L de Agar Merck.

Se adicionó cuatro combinaciones fitohormonales a los medios de cultivo, en base a ácido naftalen acético (ANA) y benzil amino purina (BAP), como lo muestra el siguiente Cuadro:

CUADRO 3. Composición fitohormonal de los medios de cultivo

Medio de cultivo	Ácido naftalen acético	Benzil amino purina
Medio MSO	0.0 mg/L	0.0 mg/L
Medio MSZ	0.0 mg/L	3.0 mg/L
Medio MSA	0.5 mg/L	0.0 mg/L
Medio MSB	0.5 mg/L	3.0 mg/L

Se emplearon tubos de crecimiento, de vidrio, de 60 mL de capacidad, disponiendo 9 mL de medio por unidad. Los tubos posteriormente se cubrieron con un cuadrado de Aluminio laminado de 25 cm², el cual permitió cerrarlos.

La esterilización de los medios se realizó en un autoclave a 121°C y 1.2 atm por 20 minutos.

3.2.3 Incubación. Los explantes producidos a partir de los bulbos, luego de haber sido desinfectados en diversas formas, dependiendo del ensayo, fueron ingresados con ayuda de una pinza esterilizada en los respectivos medios de cultivo, después de lo cual los tubos fueron cerrados.

Una vez producidas las respectivas unidades experimentales, el ensayo fue incubado en una cámara de crecimiento, bajo las siguientes condiciones: temperatura de

21°C, un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 3500 lux aproximadamente.

3.2.4 Ensayo I: Determinación de un método de ingreso *in vitro* para *Rhodophiala montana* y *Rhodophiala rhodolirion* utilizando desinfección individual.

3.2.4.1 Producción de explantes. Cada bulbo desinfectado se separó en 8 partes iguales, cortadas desde el ápice al plato basal. El tercio superior de cada bulbo fue eliminado. Cada octavo de bulbo a su vez se dividió entre 7 a 12 escamas dobles, las cuales se diferenciaron de acuerdo a si se habían desarrollado en forma más interna o externa del bulbo, se obtuvo así a partir de cada bulbo (dependiendo del calibre que este presentó) entre 40 a 78 escamas dobles. Se debe considerar que en este ensayo se trabajó con bulbos pertenecientes a las especies: *Rhodophiala montana* y *Rhodophiala rhodolirion* y con 4 bulbos por especie.

3.2.4.2 Desinfección de los explantes. La desinfección de los explantes se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar. Los explantes producidos fueron sumergidos durante 5 segundos en una solución de etanol 70%, posteriormente se aplicaron 3 lavados consecutivos de agua desionizada estéril, los explantes luego se mantuvieron por 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% de producto comercial. Fueron lavados nuevamente en agua desionizada estéril, 3 veces consecutivas; los explantes fueron posteriormente sumergidos durante 20 minutos en una solución antibiótico, en base a timentin, a una concentración de 250 mg/L, finalmente los explantes fueron nuevamente lavados con agua desionizada estéril. Se utilizó el antibiótico timentin, ya que éste presenta un amplio espectro de acción. El objetivo de los lavados consecutivos, fue eliminar posibles residuos de las soluciones aplicadas a los explantes, evitando así acciones tóxicas por parte de ellas. Dos octavos de cada bulbo fueron ingresados por medio de cultivo.

3.2.5 Ensayo II: Determinación de un método de ingreso *in vitro* para *Rhodophiala montana* y *Rhodophiala splendens* utilizando desinfección del bulbo completo.

3.2.5.1 Desinfección del material. La desinfección del material vegetal se realizó de acuerdo a lo propuesto por BASOALTO (2001), donde se propone un protocolo de desinfección, tendiente a eliminar todos los posibles contaminantes presentes en los

bulbos. Para ello cada bulbo fue lavado en agua corriente durante 15 minutos, luego de lo cual fueron eliminadas las escamas externas. Posteriormente el bulbo fue sumergido en una solución de hipoclorito de sodio al 3% producto comercial por 15 minutos. Fueron aplicados 3 lavados sucesivos en agua desionizada estéril, luego de lo cual fueron nuevamente eliminadas las escamas externas del bulbo. Los bulbos posteriormente fueron nuevamente sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 3% producto comercial por 15 minutos. Se realizaron 3 enjuagues consecutivos en agua desionizada estéril, manteniéndose posteriormente los bulbos en agua desionizada estéril hasta el momento de ser cortados los explantes.

3.2.5.2 Producción de explantes. Se produjeron los explantes, a partir de cada bulbo desinfectado, separando cada unidad en 8 partes iguales, se eliminó además el tercio superior. Cada octavo de bulbo a su vez se dividió en 4 a 5 escamas dobles, a diferencia del Ensayo I (ver 3.2.4.1). Es así como cada bulbo dio origen a entre 37 y 39 escamas dobles.

En este ensayo se trabajó con 3 bulbos pertenecientes a la especie *Rhodophiala montana* y 1 bulbo correspondiente a *Rhodophiala splendens*.

3.2.6 Ensayo III: Determinación de un método de ingreso *in vitro* para *Rhodophiala splendens* aplicando un procedimiento utilizado para *Nerine*.

3.2.6.1 Desinfección del material. La desinfección del material vegetal se adaptó de acuerdo a lo propuesto por Pierik e Ippel (1977), citados por GEORGE y SHERRINGTON (1993), en relación a micropropagación de *Nerine bowdenii*, *N. sarniensis* e híbridos de *Nerine* (Amaryllidaceae).

El bulbo fue introducido en la cámara de flujo laminar y lavado en agua destilada estéril, para eliminar posibles residuos de la solución fungicida, previo a ser sumergido en etanol 70°, por 2 minutos. Posteriormente fue cortado en dos mitades iguales, con ayuda de un bisturí esterilizado. Una de las mitades fue sumergida durante 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% de producto comercial, mientras que la otra mitad fue sumergida durante 30 minutos en la solución de hipoclorito de sodio (10% de producto comercial). Posteriormente fueron lavadas las mitades en agua

destilada estéril y permanecieron sumergidas, hasta ser cortados los explantes e incubados en el medio de cultivo.

3.2.6.2 Producción de explantes. En este ensayo se trabajó con un solo bulbo perteneciente a la especie *Rhodophiala splendens*, produciéndose los explantes de la misma forma que en los ensayos anteriores, cortándose 4 a 5 escamas dobles, por cada octavo de bulbo, es así como el bulbo dio origen a 32 explantes.

3.2.6.3 Medios de cultivo. Los explantes producidos fueron ingresados en un medio de cultivo que se preparó en base a la formulación descrita en el punto 3.2.2 y careció de fitohormonas.

3.2.7 Ensayo IV: Determinación de un método de ingreso *in vitro* para *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens* aplicando el procedimiento utilizado para *Nerine*.

3.2.7.1 Producción de explantes. Se trabajó con 4 bulbos por especie. Se cortaron los explantes de la misma forma que en los ensayos anteriores (ver 3.2.1), cortándose 4 a 5 escamas dobles, por cada octavo de bulbo, es así como cada bulbo dio origen a entre 32 y 40 explantes.

3.2.7.2 Medios de cultivo. El medio de cultivo se preparó de acuerdo a lo descrito (ver 3.2.2) y se formularon 3 medios diferentes:

1. Medio MSZ1: al cual se agregó 3 mg/L de benzil amino purina (BAP).
2. Medio MSZ2: al cual se agregó 3 mg/L de benzil amino purina (BAP), además de 10 ml de solución fungicida en base a Benlate. Se preparó una solución madre de fungicida disolviendo 0.15 g de Benlate (i.a. Benomilo) en 100 ml de agua desionizada estéril, desde donde se tomó 10 ml.
3. Medio MSZ3: al cual se agregó 3 mg/L de benzil amino purina (BAP), 10 ml de solución fungicida en base a Benlate (idem medio anterior), además de 10 ml de solución bactericida en base a streptomycin. Se preparó una solución madre de bactericida disolviendo 0.02 g de streptomycin en 100 ml de agua desionizada estéril, desde donde se tomó 10 ml.

Para combatir una posible acción de fitopatógenos en el cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum*, se recomienda el uso del fungicida Benlate y un bactericida:

Streptomycin, ambos agregados al medio de cultivo. Se produce una solución madre diluyendo 0.15 g de Benlate en 100 ml de agua estéril, solución de la cual se agrega 10 ml por litro de medio, paralelamente se produce una solución madre agregando 0.02 g de Streptomycin en 100 ml de agua estéril, solución de la cual también se agrega 10 ml por litro de medio de cultivo.³

Los explantes de cada bulbo, fueron divididos en tres grupos iguales. En cada uno de los medios de cultivo: MSZ1, MSZ2, MSZ3, fue ingresado un grupo. Es así como finalmente quedaron explantes desarrollados en las diferentes ubicaciones del bulbo, en cada uno de los medios preparados.

3.2.7.3 Baño antioxidante. Los explantes sobrevivientes de la etapa anterior fueron llevados a la cámara de flujo laminar y sometidos a un baño antioxidante.

Se preparó para ello una solución antioxidante agregando 100 g/L de ácido ascórbico, 100 g/L de ácido cítrico y agua destilada estéril, solución que posteriormente fue esterilizada en el autoclave por 20 minutos. Además se produjo una solución antioxidante en base a dietilditiocarbamato de sodio (DIECA), la cual se formuló a partir de 200 mg/L de DIECA disueltos en agua destilada estéril, solución que posteriormente también fue esterilizada bajo las condiciones anteriores.

Los explantes fueron primeramente sumergidos en un baño antioxidante en base a ácido ascórbico y ácido cítrico, para luego ser ingresados en medio de cultivo nuevo. Una vez colocados en el medio nuevo, sobre cada uno de los explantes, fue colocada una gota de solución de DIECA, con ayuda de una jeringa esterilizada. Los explantes fueron ingresados en los medios MSZ1, MSZ2, MSZ3, correspondientes al presente ensayo y posteriormente incubados bajo las condiciones antes descritas (ver 3.2.3).

3.2.7.4 Repique. Se aplicó un nuevo lavado antioxidante a los explantes sobrevivientes de la etapa anterior, en base a ácido ascórbico y ácido cítrico (ver 3.2.7.3). Posterior al baño antioxidante, los explantes fueron cultivados en un medio líquido, el cual se formuló de acuerdo a lo propuesto en el punto 3.2.2, pero sin la adición de agar Merck.

³ ACUÑA, I. (2001). Ingeniero Agrónomo. Ph.D. Producción Vegetal. Centro Regional de Investigación Agropecuaria. Instituto de Investigación Agropecuaria. Comunicación personal.

3.2.8 Ensayo V: Evaluación del crecimiento de las plántulas desarrolladas en los

ensayos anteriores Se tomaron todas las plántulas desarrolladas en los cuatro ensayos anteriores y se sometieron a un período de crecimiento, luego del cual éstas fueron evaluadas.

3.2.8.1 Preparación de las plántulas. Las plántulas desarrolladas en los cuatro ensayos anteriores, fueron primeramente podadas, con ayuda de un bisturí esterilizado, a una altura promedio de 2.5 cm sobre la base de las mismas, para luego ser repicadas en un medio de cultivo nuevo. Las plántulas que presentaron varios brotes con hojas desarrolladas, microbulbillos, raíces o callo fueron separadas en varias plántulas nuevas. Todo esta etapa se realizó al interior de la cámara de flujo laminar y bajo estrictas normas de sanidad, evitando contaminar las plántulas, que se encontraban sanas.

3.2.8.2 Medio de cultivo. El medio de cultivo correspondió a un medio semi-sólido a sólido y fue preparado de acuerdo a lo propuesto en el punto 3.2.2. Se le agregó además una dosis de regulador de crecimiento de 3 mg/L de benzil amino purina. Se eligió esta dosis fitohormonal, debido a los buenos resultados observados en los ensayos anteriores.

3.2.8.3 Incubación. Cada plántula separada, fue tomada con una pinza estéril, e ingresada en un frasco de crecimiento que contenía medio de cultivo nuevo.

El ensayo fue incubado en una cámara de crecimiento, bajo una temperatura de 21°C, un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 3500 lux aproximadamente.

3.2.9 Evaluación. Una vez que los explantes de las especies en estudio presentaron un desarrollo vegetativo considerable, se procedió a la evaluación, para así determinar finalmente cual de las desinfecciones aplicadas permitió un mayor ingreso de material, que cantidad de explantes por sección de bulbo y cual de las combinaciones fitohormonales presenta el mejor efecto sobre el desarrollo organogénico de los explantes, además de describir el crecimiento *in vitro* de los explantes. Para el caso del Ensayo V se evaluó la tasa de crecimiento de las plántulas, la cual se midió como crecimiento de las hojas.

3.2.9.1 Factores evaluados. Los factores evaluados corresponden a: los tipos de desinfección aplicada, la cantidad de explantes producida por sección de bulbo, la dosis fitohormonal agregada al medio de cultivo y el crecimiento del tejido vegetal.

El diseño experimental del Ensayo I presentó como tratamientos las dos especies en estudio: *Rhodophiala montana* y *Rhodophiala rhodolirion*, además de las cuatro composiciones fitohormonales de los medios de cultivo. Consideró 80 repeticiones para cada uno de los tratamientos y un diseño completamente al azar, ordenado como factorial.

El diseño experimental del Ensayo II presentó como tratamientos las dos especies en estudio: *Rhodophiala montana* y *Rhodophiala splendens*, además de las cuatro composiciones fitohormonales de los medios de cultivo. Consideró 40 repeticiones para cada uno de los tratamientos de la especie *Rhodophiala montana* y 10 repeticiones para cada uno de los tratamientos correspondientes *Rhodophiala splendens*. El análisis correspondió a un diseño completamente al azar, ordenado como factorial.

El diseño experimental del Ensayo III presentó como tratamientos los dos tiempos de desinfección aplicados a los explantes. Considera 16 repeticiones para cada uno de los tratamientos y un diseño completamente al azar, ordenado como factorial.

El diseño experimental del Ensayo IV presentó como tratamientos las dos especies en estudio: *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens*, además de tres diferentes composiciones de los medios de cultivo. Consideró 53 repeticiones para cada uno de los tratamientos y un diseño completamente al azar, ordenado como factorial.

3.2.9.2 Período de evaluación: el Ensayo I presentó un período de desarrollo inicial de 100 días, mientras que los Ensayos II y III se desarrollaron durante 60 días (ver Anexo1). Luego de este período inicial de crecimiento, se realizaron diferentes evaluaciones a los 100, 130 y 160 días de desarrollo para el caso del Ensayo I; y a los 60, 90 y 120 días de desarrollo para el caso de los Ensayos II y III. El Ensayo IV fue evaluado en forma separada, debido a la respuesta que este desarrolló frente a la metodología aplicada. El Ensayo V presentó un período de desarrollo de 30 días, luego de lo cual fue evaluado. La evaluación se puede resumir en el siguiente Cuadro:

CUADRO 4. Período de evaluaciones.

	Tiempo de desarrollo inicial (días)	1º Evaluación (días)	2º Evaluación (días)	3º Evaluación (días)
Ensayo I	100 días	100 días	130 días	160 días
Ensayo II	60 días	60 días	90 días	120 días
Ensayo III	60 días	60 días	90 días	120 días
Ensayo IV	12 días	12 días	22 días	29 días
Ensayo V	30 días	30 días		

3.2.9.3 Evaluaciones realizadas. La respuesta organogénica de los Ensayos I, II y III a los factores evaluados, se midió concretamente como: la formación de callo, el porcentaje de explantes que desarrollaron brote, el promedio de brotes desarrollado por explante, la altura promedio alcanzada por los brotes, el porcentaje de explantes que desarrollaron hoja, el promedio de hojas desarrollado por los explantes, la altura promedio alcanzada por las hojas, además del desarrollo de raíces y/o microbulbillos. Además se evaluaron los tipos de desinfección aplicada según la eliminación de explantes producto de contaminación, tejido necrótico y carencia de desarrollo. Se midió el desarrollo según las diferentes composiciones fitohormonales. En el Ensayo IV se evaluó el porcentaje de explantes que presentaron oxidación luego de los primeros 12 días de desarrollo. Se definió el color que alcanzó cada uno de los medios de cultivo de acuerdo al siguiente Cuadro:

CUADRO 5. Niveles de oxidación.

Color que alcanzó el medio de cultivo	Blanco	Amarillo	Naranja	Café
Nivel	1	2	3	4

Además se evaluó la eliminación de explantes producto de las diferentes causas patológicas en las tres etapas de desarrollo.

En el Ensayo V se evaluó la tasa de crecimiento de las hojas, la cual se midió como: altura de hojas y número total de hojas por explante. Además se determinó el porcentaje de eliminación de explantes por presentar tejido necrótico e inhibición de desarrollo.

3.2.9.4 Análisis de datos: debido a la pérdida de explantes producto de contaminación, tejido necrótico e inhibición de desarrollo no fue posible realizar un análisis estadístico de los datos resultantes, por lo cual se presentan los datos porcentuales y/o promedios de los parámetros determinados.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente trabajo se realizaron cuatro Ensayos de cultivo *in vitro*, para ingresar material vegetal perteneciente a las especies *Rhodophiala montana*, *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens*. Un porcentaje de los explantes presentó un crecimiento normal, desarrollando diversos órganos como callo, brotes, hojas, raíces y/o microbulbillos, resultados que serán analizados más adelante. Parte importante del material ingresado presentó altos niveles de contaminación, por lo que fue eliminado. En el transcurso de los Ensayos fueron probados diferentes procedimientos de desinfección.

4.1 Causas de eliminación.

Las causas que provocaron la eliminación de los explantes que conformaban las repeticiones del presente trabajo son: contaminación provocada por hongos, bacterias, levaduras o ambiental; necrosis del tejido que conformó los explantes; y tejido vegetal que no presentó desarrollo alguno. Los resultados serán evaluados, luego de definir los conceptos de eliminación.

4.1.1 Explante eliminado por contaminación. Fueron definidos como explantes donde se observó el desarrollo de micelio algodonoso, de color blanco, rosado, verdoso o pardo, producto del ataque de hongos (Figuras 6 y 7). Además, se observó el ataque de bacterias, el cual se presentó como una masa mucilaginosa de individuos que formaron colonias, además desarrollaron un fuerte olor a fermentación. Se observaron también levaduras, las cuales se caracterizaron por formar sobre el tejido vegetal y el medio de cultivo una masa endurecida de color amarillo-crema, alcanzando incluso el gris oscuro.



FIGURA 6. Explante que presentó ataque de bacterias (*Rhodophiala splendens*).



FIGURA 7. Explante que presentó ataque de hongos (*Rhodophiala rhodolirion*).

4.1.2 Explante eliminado por necrosis de tejido. El tejido vegetal se oxidó, tomó tonalidad marrón, textura gelatinosa, descompuesta y blanda, rápidamente se observó la muerte de este (Figura 8).



FIGURA 8. Explante que presentó tejido necrosado (*Rhodophiala splendens*).

4.1.3 Explante eliminado por no presentar desarrollo. Las escamas producidas presentaron excelente estado sanitario, hasta transcurrido bastante tiempo (incluso 3 meses) después de haber sido incubadas en el medio de cultivo. Al no observarse desarrollo alguno, las escamas fueron eliminadas (Figura 9). Los explantes fueron repicados en sucesivas ocasiones, sin respuesta positiva. Se observó siempre un estado sanitario óptimo, sin la presencia de patógenos.

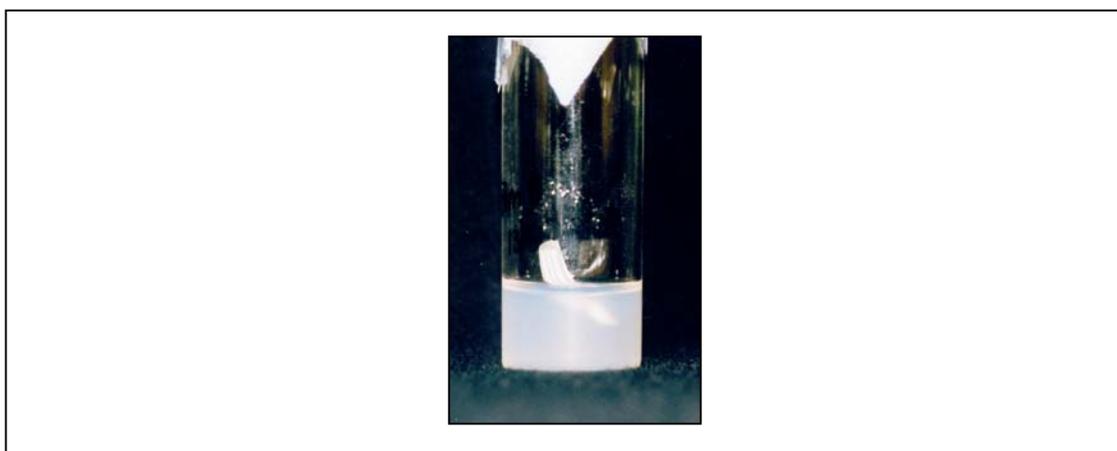


FIGURA 9. Explante que no presentó desarrollo (*Rhodophiala montana*).

4.1.4 Comportamiento de los Ensayos. Como se observa en los siguientes gráficos (Figuras 10, 11 y 12) las tres especies de *Rhodophiala* en estudio presentaron valores de eliminación diferentes. A continuación se analizarán las causas de eliminación en las diferentes repeticiones, los resultados obtenidos en los Ensayos realizados se pueden observar además en el Cuadro del Anexo 2.

En general se observa un alto porcentaje de eliminación de individuos, independiente de la especie y el Ensayo. De acuerdo a lo observado, ningún método alcanzó resultados que pudiesen ser considerados favorables en relación a la multiplicación de las especies.

Respecto al ingreso de material *in vitro* GEORGE y SHERRINGTON (1993), proponen que el cultivo de plantas *in vitro*, para crecer y sobrevivir apropiadamente, debe encontrarse ampliamente libre de plagas e infecciones fúngicas y bacterianas. Los contaminantes pueden causar grandes pérdidas durante la micropropagación, y su control es el problema más frecuente y dificultoso, enfrentado por los laboratorios de micropropagación.

4.1.4.1 Ensayo I. Los porcentajes de eliminación correspondientes al Ensayo I (Figura 10) alcanzaron valores homogéneos y altos, superando en todas las repeticiones el 85.0%. Los valores de eliminación producto de la contaminación oscilan entre 15.3 % y 50.8%, lo cual en comparación con los valores totales de eliminación son bastante menores. Los valores de eliminación producto del no desarrollo del tejido se observan bastante altos oscilando entre 33.3 % y un 70.00 %, esto se puede explicar producto de la intensa desinfección que se aplicó a los explantes individualmente. Por un lado los explantes presentaron toda la superficie en contacto con el desinfectante y por otro lado el desinfectante presenta un gran poder germicida. El antibiótico utilizado: Timentin, pudo además haber afectado el tejido inhibiendo su desarrollo. La necrosis de tejido se observa homogénea y pudo deberse también a la fuerte desinfección y a la superficie de contacto; la desinfección no solo eliminó a los patógenos sino que también impidió el desarrollo normal del tejido. Al respecto en los Ensayos siguientes no se observó tejido necrótico, lo cual también es indicador que la solución desinfectante para este caso era demasiado fuerte. Además en los Ensayos siguientes fue aplicada la desinfección

al bulbo completo o al bulbo separado en dos mitades, es decir, la superficie de contacto de la escama con el producto químico era mucho menor.

Paralelo al Ensayo I fueron incubados trozos de escama de bulbo que no presentaba disco basal bajo las mismas condiciones del Ensayo. Se observó que aquellas no presentaron desarrollo alguno, muy por el contrario estas al poco tiempo desarrollaron necrosis y hubo que eliminarlas.

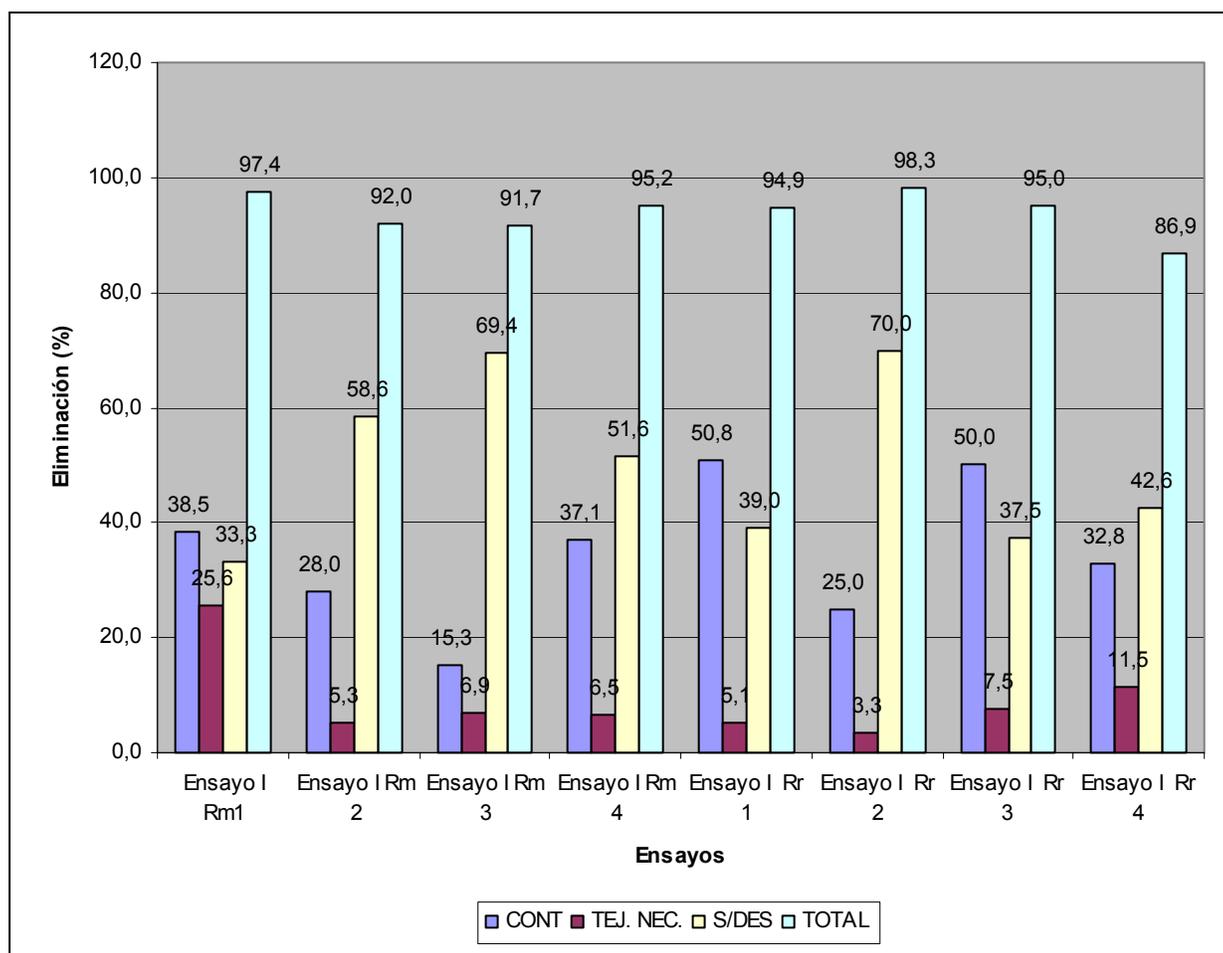


FIGURA 10. Ensayo I. Eliminación de explantes (%) por contaminación (CONT), tejido necrótico (TEJ. NEC.) y sin desarrollo (S/DES) de *Rhodophiala montana* (Rm) y *R. rhodolirion* (Rr).

4.1.4.2 Ensayo II. Se cortaron los explantes de mayor tamaño, ya que se consideró ésta, una variable que pudo influir sobre el resultado del Ensayo I. El tejido nuevo se

desarrolla a partir de la unión entre la escama y el disco basal, por ello se procedió a cortar entre 4 a 5 explantes por cada octavo de bulbo (en el Ensayo I se cortaron hasta 12 explantes por cada octavo de bulbo). Los explantes quedaron finalmente conformados por 3 a 4 escamas, así teniendo explantes de mayor tamaño se esperó también mejores resultados.

Los valores totales de eliminación en el Ensayo II (Figura 11) oscilan entre 67.6% y 100.0%. Llama la atención dentro del Ensayo II los valores de eliminación producto de contaminación, los cuales para el caso de *Rhodophiala montana* entregan un claro indicio del estado sanitario de cada uno de los bulbos. Presentando los tres bulbos igual procedencia y manejo, llama la atención el comportamiento diferente de cada uno de ellos. Con respecto a la inhibición del desarrollo del tejido vegetal, este oscila entre 0.0 % y 35.9 % en el Ensayo II. La segunda repetición alcanza un 29.7 % de inhibición de desarrollo, mientras que los otros dos no presentan eliminación de explantes producto del no desarrollo.

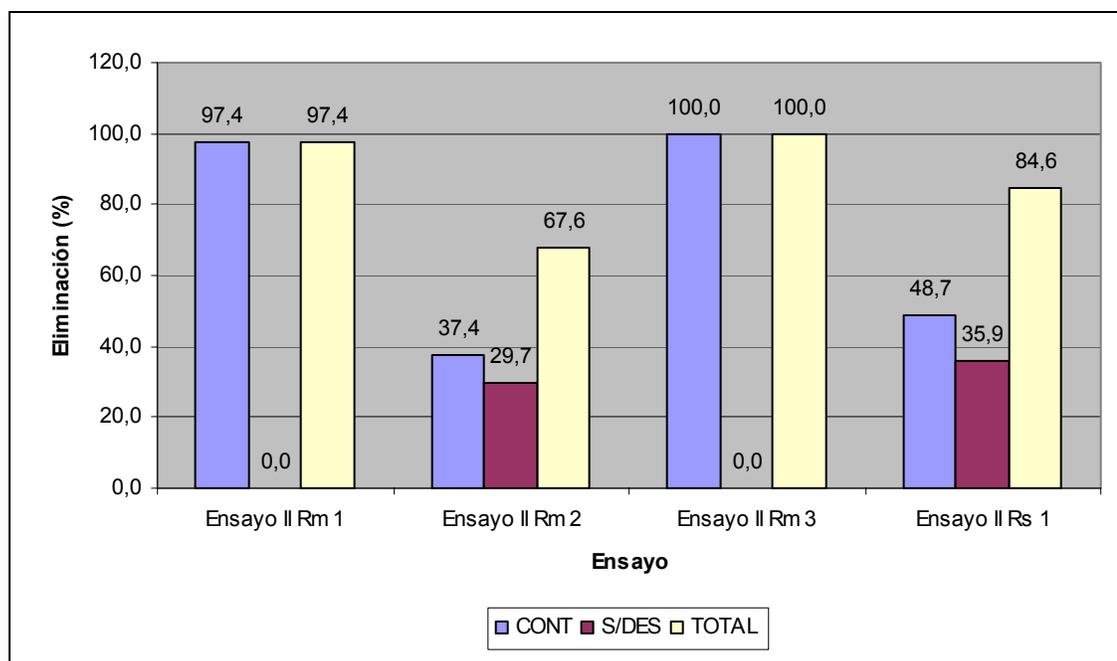


FIGURA 11. Ensayo II. Eliminación de explantes (%) por contaminación (CONT) y sin desarrollo (S/DES) de *Rhodophiala montana* (Rm) y *R. splendens* (Rs).

4.1.4.3 Ensayo III. Permite un acercamiento a un método de desinfección más adecuado para el género *Rhodophiala*. Fue aplicado un método de desinfección que permitió 73.4% y 52.9 % de eliminación por contaminación (Figura 12), donde la segunda cifra es la menor dentro de la presente investigación. En ambas repeticiones se aplicaron tiempos diferentes de desinfección del material vegetal. Claramente 15 minutos de baño de hipoclorito de sodio se acerca a la desinfección más adecuada. No fueron eliminados explantes por necrosis y se observó además bajos porcentajes de eliminación de explantes producto de la inhibición del desarrollo.

Al considerar el material vegetal, se puede concluir que tiene gran influencia el estado sanitario inicial, partiendo de material sano es más fácil encontrar un procedimiento que pueda alcanzar resultados favorables en la desinfección.

Tanto en el Ensayo II, como en el Ensayo III, se trabajó con bulbos de *Rhodophiala splendens* de igual procedencia. Esto permite, al comparar los porcentajes eliminados, contrastar directamente el método de desinfección aplicado en ambos Ensayos. Claramente la desinfección aplicada en el Ensayo III con 15 minutos de baño de hipoclorito de sodio permitió resultados más favorables. Los bulbos se encontraban en un estado de latencia absoluta, estaban secos y habían sido mantenidos en arena, luego de comenzar el receso vegetativo. No presentaba síntomas de contaminación alguna y el estado sanitario era óptimo.

Para realizar cultivo *in vitro* es necesario remover previamente los microorganismos externos con desinfectantes químicos o esterilizantes específicos. Esto debido a que tanto hongos como bacterias, son capaces de desarrollarse velozmente en los medios de cultivo *in vitro* que contienen componentes orgánicos como carbohidratos, aminoácidos y vitaminas. Para la gran mayoría de plantas cultivadas la contaminación superficial debe ser controlada antes que los explantes sean introducidos en el medio. La facilidad con que ello puede realizarse depende de la especie y el ambiente en que la planta madre se haya desarrollado (GEORGE y SHERRINGTON, 1993).

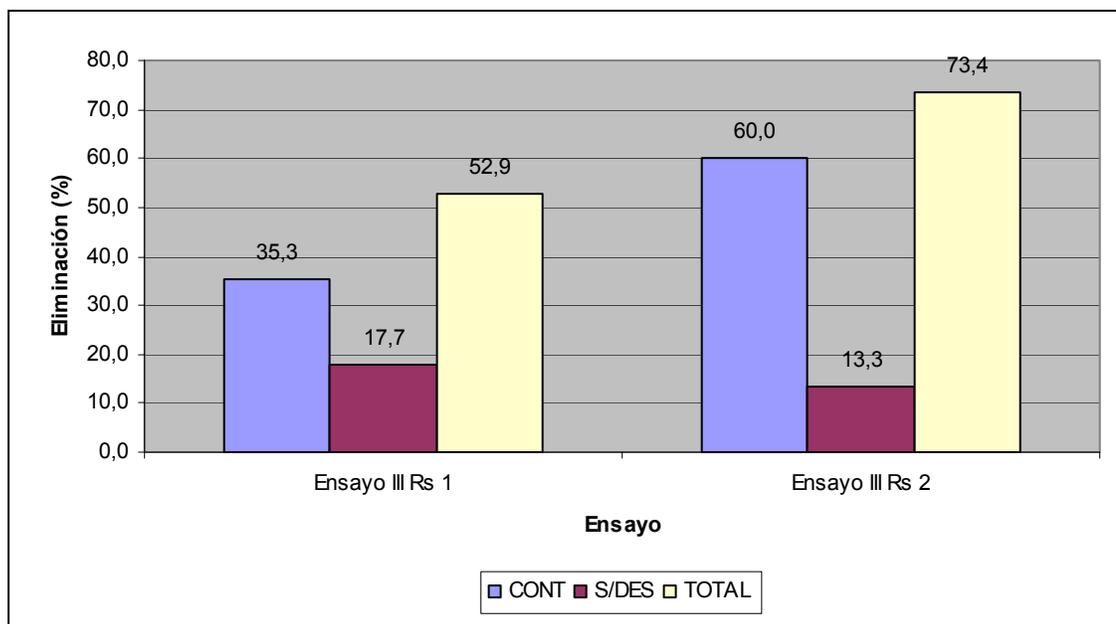


FIGURA 12. Ensayo III. Eliminación de explantes (%) por contaminación (CONT) y sin desarrollo (S/DES) de *Rhodophiala splendens* (Rs).

4.1.4.4 Ensayo IV. Los resultados obtenidos en el Ensayo IV serán analizados por separado, ya que presentaron respuestas muy diferentes. La limitante observada en los Ensayos I, II y III correspondió a la contaminación de los explantes en cultivo, es por esto que en el Ensayo IV se agregó al medio de cultivo un fungicida; y al otro medio de cultivo un bactericida, además de un fungicida. Contrariamente a lo esperado, los explantes reaccionaron negativamente frente a estos compuestos químicos desarrollando oxidación del medio primeramente y luego contaminación a niveles extremos. Lo que llevó a que el total de los explantes fuera eliminado finalmente. Los explantes se vieron dañados estructuralmente, las escamas se observaron con tonalidad parda-rojiza y luego perdieron su estructura original. Los medios de cultivo presentaron oxidación en tonalidades desde el blanco-amarillento al café oscuro y negro pasando por diferentes tonalidades de naranjos y rojos. Por lo observado en el Ensayo IV pareciera que el tejido vegetal se vio desfavorecido producto de la acción de los compuestos químicos.

Los resultados de los siguientes cuadros corresponden a evaluaciones realizadas transcurridos 12 días de la incubación del Ensayo, ya que finalmente el 100 % del material fue eliminado.

CUADRO 6. Eliminación (%) y causa de eliminación de las especies *Rhodophiala splendens* y *Rhodophiala rhodolirion* pertenecientes al Ensayo IV (12 días después del inicio).

Ensayo	Especie	Eliminación (%)	Causa de eliminación			
			Hongos (%)	Bacterias (%)	Levaduras (%)	Tejido necrótico (%)
Ensayo IV	<i>Rhodophiala splendens</i>	52.7	23.7	18.3	7.5	3.2
Ensayo IV	<i>Rhodophiala rhodolirion</i>	59.1	36.5	14.8	7.8	0.0

Como puede observarse en el Cuadro 6 el material presentaba diferentes patógenos dentro de los cuales se destacan: hongos, bacterias y levaduras, patógenos que no fueron eliminados por la desinfección aplicada. *Rhodophiala splendens* alcanzó un 52.7 % de eliminación total, destacándose la eliminación producto del ataque de hongos y bacterias. *Rhodophiala rhodolirion* alcanzó un 59.1 % de eliminación total, destacándose un 36.5 % de eliminación producto de la presencia de hongos.

Se consideró para la evaluación de la oxidación todo el material ingresado en el Ensayo IV, se determinaron diferentes niveles de 1 a 4, donde cada uno de los niveles representó el color que alcanzó el medio producto de la oxidación, como lo indica la Figura 13:



FIGURA 13. Niveles de oxidación (*Rhodophiala rhodolirion* y *R. splendens*).

Los resultados observados producto de la oxidación del Ensayo IV quedan de manifiesto en la Figura 14:

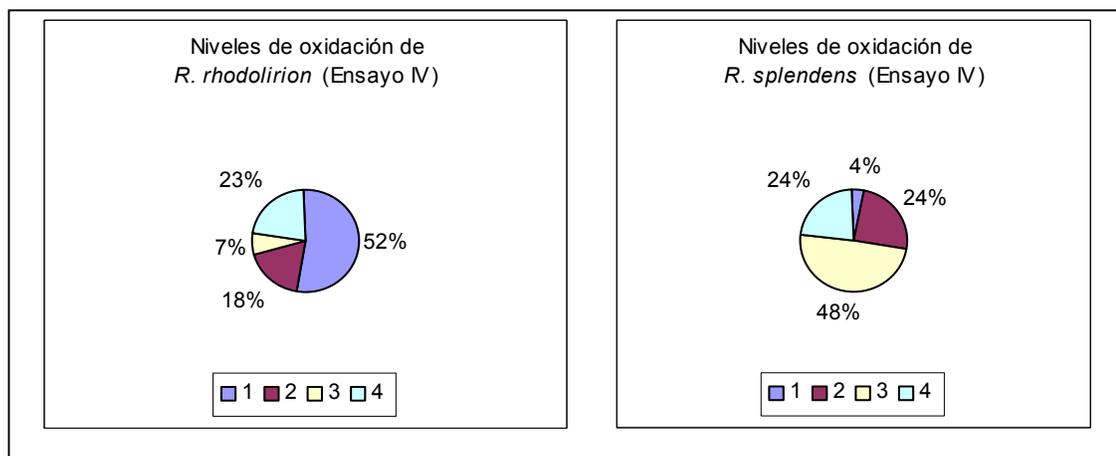


FIGURA 14. Ensayo IV. Nivel de oxidación (%) alcanzado por los explantes de *Rhodophiala rhodolirion* y *R. splendens*.

Para el caso de *Rhodophiala splendens* el color blanco normal solo lo alcanzó un 4% de los individuos, cifra bastante baja. Tanto el color amarillo, como la tonalidad café se presentó en 24 % de los individuos, mientras que el mayor porcentaje de los individuos presentó el medio de cultivo de color naranja, claramente el mayor porcentaje de los individuos alcanzó un nivel de oxidación medio-alto.

Rhodophiala rhodolirion, en cambio, presentó un menor porcentaje de oxidación total, y más de la mitad de los individuos mantuvieron la tonalidad normal del medio de cultivo, sin observarse oxidación. La tonalidad café se presentó en 23 % de los individuos, mientras que 18 % de los individuos desarrollaron el color amarillo.

Producto del corte realizado para producir el explante es que el tejido reacciona oxidando el medio, como lo explica SEEMANN (1993), el pardeamiento de los explantes es un problema que se relaciona con liberación al medio y oxidación de polifenoles, que dan como resultado productos tóxicos para el explante.

CUADRO 7. Ensayo IV. Eliminación promedio (%) en base al total y eliminación de acuerdo a la composición del medio de cultivo (12 días después del inicio).

Ensayo	Especie	Eliminación promedio (%)	Medio de cultivo		
			Medio MSZ1*	Medio MSZ2**	Medio MSZ3***
Ensayo IV	<i>Rhodophiala splendens</i>	52.7	46.6 %	48.4 %	62.5 %
Ensayo IV	<i>Rhodophiala rhodolirion</i>	59.1	65.5 %	60.0 %	51.7 %

MSZ1*: sin germicidas

MSZ2**: solo fungicida

MSZ3***: fungicida y bactericida

El cálculo de eliminación (%) de acuerdo al medio de cultivo, se realizó considerando como 100 % todos los frascos de crecimiento que contenían el medio de cultivo correspondiente. Tanto el 52.7 % de eliminación de explantes de *Rhodophiala splendens*, como el 59.1 % de eliminación correspondiente a *Rhodophiala rhodolirion*, son la cantidad de individuos que fueron eliminados una vez transcurridos 12 días desde el ingreso del material en forma *in vitro*. El Cuadro 7 indica que el mayor porcentaje de explantes eliminados: 62.5 %, lo alcanzó *Rhodophiala splendens* en el medio de cultivo que contenía bactericida y fungicida, presentando cifras similares (46.6 % y 48.4 %) los explantes incubados en el medio MSZ1 (sin germicida) y en el medio MSZ2 (solo con fungicida). Al compararlo con *Rhodophiala rhodolirion* esta especie alcanzó un 65.5 % de eliminación en medio sin adición de germicida. El medio que presentó fungicida alcanzó un 60.0 % de eliminación, mientras que el medio que presentó fungicida y bactericida alcanzó el menor porcentaje de eliminación: 51.7 %. Independiente de la composición del medio, los valores de eliminación fueron altos, esto se debió al estado sanitario que presentó el material original. La presencia de producto germicida seguramente influyó sobre los resultados observados.

Las geófitas al desarrollarse en forma natural en el suelo, se ven enfrentadas a diversos patógenos, lo cual trae consigo problemas fitopatológicos, cuando se practica el cultivo *in vitro* de las mismas. Cuando un bulbo presenta bacterias en alguno de sus tejidos, al momento de hacer el corte y producir los explantes para una posterior incubación *in vitro*, la bacteria se distribuirá a través del resto del tejido sano entrando a través de la superficie cortada. Es recomendable hacer uso de antibióticos para combatir dichos patógenos, en general para inhibir la acción bacteriana pudiese utilizarse ácido láctico al 2% el cual es agregado al medio y controla el ataque de bacterias eficientemente, pero con la desventaja que el pH del medio alcanza valores ácidos entre 4 y 5, lo que puede afectar el desarrollo normal del explante y la gelificación de los medios. Otra alternativa es el uso de una sustancia antibiótica como por ejemplo Streptomina o Cloramfenicol. La Streptomina ha sido ampliamente utilizada como antibiótico en el cultivo *in vitro*, ya que inhibe la síntesis de proteína a nivel ribosomal.⁴

En una segunda etapa del Ensayo se aplicó a los explantes sobrevivientes un baño antioxidante en base a: ácido cítrico y ácido ascórbico, además de gotas de dietilditiocarbamato de sodio (DIECA), luego de lo cual los explantes fueron ingresados en un medio de cultivo nuevo. Lamentablemente este intento tampoco alcanzó los resultados esperados y muchos explantes debieron ser eliminados. Se observó oxidación en los medios, pero en menor grado, además de contaminación producto de la acción de hongos, bacterias y levaduras. En una tercera etapa se aplicó un baño de antioxidante, y posteriormente los explantes fueron cultivados en medio líquido. Se observó desarrollo de masas bacterianas creciendo sobre los explantes, emitiendo un fuerte olor a fermentación. La oxidación continuó desarrollándose y finalmente fue eliminado el 100% de los individuos.

Con respecto a los porcentajes de eliminación, cabe destacar el estado sanitario en que se encontraban los bulbos a partir de los cuales se produjeron los explantes. Los bulbos en general presentaban síntomas como: manchas brillantes de coloración rojo

⁴CIAMPI, L. 2001. Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph. D. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Comunicación personal.

intenso, algunas de las cuales alcanzaron tonos café, algunos bulbos incluso presentaron pudrición blanda y húmeda.

Producto de un análisis fitopatológico, realizado en el Laboratorio de Fitopatología, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile, se determinó la presencia de ácaros en el tallo o parte superior del bulbo, probablemente pertenecientes al género *Rhizoglyphus*, además del ataque de hongos y bacterias, como agentes secundarios. Los ácaros, con su aparato bucal masticador-chupador característico, causan heridas en la base del tallo del bulbo, superficie que se encuentra en contacto con el suelo, el cual corresponde al hábitat de miles de microorganismos saprofitos. Las heridas causadas por los ácaros, constituyen la puerta de entrada a los diferentes organismos causantes de patologías. Al respecto SEEMANN (1993), agrega que hay muchos microorganismos de la superficie o de la rizósfera que pueden colonizar la planta a través de aberturas naturales o heridas; adicionalmente hay patógenos facultativos y obligados que pueden colonizarla vía vectores o mediante plantas hospederas. Así las plantas presentan diversos organismos endofíticos, como virus y viroides, u organismos procariontes como: bacterias y hongos. En el establecimiento del cultivo *in vitro*, dependiendo de la fuente del explante usada, pueden ser transferidos tanto los organismos de la superficie como los endofíticos, provocando problemas de contaminación muchas veces difíciles de solucionar.

4.1.5 Propuesta de desinfección para el material vegetal. *Rhodophiala* es un género endémico de Chile, del que no se cuenta con gran cantidad de material vegetal, por el peligro que significa hacer una extracción desmesurada desde los hábitat propios de las especies. La falta de material para trabajar explica que no se hayan hecho más ensayos, ni mayor cantidad de repeticiones, en esta investigación.

A pesar de los resultados observados la importancia de este trabajo radica en que es un aporte real al estudio de un género, sobre el cual existe muy poca información, como sucede en general con las especies autóctonas. Debe considerarse este trabajo dentro de los primeros realizados acerca del tema, permitiendo una primera aproximación al manejo del cultivo *in vitro* de este género, considerándose un aporte interesante para trabajos futuros.

Considerando que para un estudio hubiese sido óptimo trabajar con bulbos de igual procedencia, que hubiesen presentado el mismo manejo y un estado sanitario similar, debe tenerse en cuenta que este trabajo en ese sentido, abarca condiciones a las cuales futuros investigadores o productores, fácilmente se verán enfrentados. Al respecto se debe recordar que *Rhodophiala* es un género silvestre y aún no ha sido manejado ampliamente bajo condiciones artificiales, careciendo de un comportamiento homogéneo.

Los resultados observados consideran que el primer requisito para comenzar un trabajo de multiplicación *in vitro*, cualquiera sea la especie, es contar con material en cantidad suficiente, y más importante aún, que presente un estado sanitario adecuado. De acuerdo a lo observado se considera el tratamiento de desinfección propuesto para el Ensayo III, el más recomendado para las especies en estudio, considerando que pudiesen lograrse avances en investigaciones futuras. Se propone investigar, la utilización de concentraciones más bajas de hipoclorito de sodio por tiempos más prolongados, causando menos daño al tejido vegetal y obteniendo así resultados más promisorios. En trabajos posteriores se pudiese tener en cuenta lo propuesto por Hol y Van der Linde, citados por GEORGE y SHERRINGTON (1993), quienes redujeron en un gran porcentaje la contaminación causada por *Fusarium*, tratando los bulbos en agua caliente a 54° C por una a tres horas, previo a la disección de los explantes y al tratamiento con hipoclorito de sodio (1% ingrediente activo por 30 minutos).

La esterilización superficial puede llevarse a cabo con diferentes reactivos germicidas. Claramente los mejores productos son aquellos baratos, no tóxicos a la planta como al hombre y efectivos en un amplio rango de material vegetal, los más comúnmente utilizados son el ion hipoclorito y alcoholes simples (GEORGE y SHERRINGTON, 1993).

4.2 Descripción del desarrollo organogénico de *Rhodophiala*.

Las escamas que conformaron el explante, se observaron hinchadas, presentando engrosamiento externo, tomando en muchos casos color verde. Los bordes donde se

realizó el corte desarrollaron color pardo-rojizo, indicando cicatrización del lugar de corte (Figura 15).

Las escamas que se desarrollaron en forma óptima fueron separándose de sus gemelas, alcanzando incluso en algunos casos una apertura de 180° (Figura 16), quedando sólo unidas por el disco basal. Algunas escamas, al hacer observaciones microscópicas, presentaron pilosidades en su superficie, como desarrollo organogénico.



FIGURA 15. Escamas desarrollaron tonalidad verdosa y comienzan a separarse (*Rhodophiala montana*).



FIGURA 16. Escamas desarrollaron apertura en 180°. Entre las escamas se observó el crecimiento vegetativo (*Rhodophiala splendens*).

Se observó desarrollo organogénico, cuantificable como: callo, brote, hoja, microbulbillo y/o raíz. En explantes que presentaron tres o más escamas, se observó el desarrollo de estructuras organogénicas a partir del punto de unión entre dos escamas gemelas y el disco basal, no así en el borde externo del explante.

El tejido calloso se observa en la base de las escamas unido al disco basal, de color blanco y muchas veces transparente y brillante. Se observa como una acumulación de tejido en multiplicación vegetativa desarrollándose en todos los sentidos, con pequeños puntos en toda la superficie.

Los brotes que se desarrollan se observan al inicio del desarrollo de color blanco y como pequeños puntos, en general nacen a partir de tejido calloso.

Las hojas nacen como pequeños brotes, pero a medida que crecen, toman coloración verde clara, para luego adquirir una tonalidad verde oscura. Las hojas (Figura 16) se desarrollan en forma de lámina, la cual en un comienzo se encuentra enrollada sobre sí misma, para luego abrirse a medida que aumenta en altura.

Los microbulbillos se observan como engrosamiento de la base de un tallo, desde donde nacen varias hojas, protuberancia que se observa en general de color blanco.

La raíz (Figura 17) se desarrolla en forma alargada y de color blanco. Muchas veces se distingue el punto de crecimiento de la raíz, el cuál corresponde al extremo distal, que se observa más delgado. Además se observa pilosidad radicular desarrollándose a partir del entorno de la raíz.



FIGURA 17. Desarrollo de raíces (*Rhodophiala splendens*).

4.2.1 Sobrevivencia de los explantes en relación al medio de incubación. La sobrevivencia observada en los Ensayos realizados es baja y no permite determinar una clara tendencia. La composición fitohormonal del medio no fue directamente evaluada, ya que existe la limitante de la eliminación de gran parte de los explantes producto de la desfavorable desinfección del material previo al ingreso *in vitro*. En el siguiente Cuadro se observan los resultados alcanzados por los Ensayos:

CUADRO 8. Sobrevivencia (%) de los explantes de acuerdo al medio de cultivo.

Ensayo	Especie	Medio MSO	Medio MSZ	Medio MSA	Medio MSB	Sobrevivencia promedio (%)
Ensayo I	<i>Rhodophiala montana</i>	5.9	6.8	4.29	6.6	5.9
Ensayo II	<i>Rhodophiala rhodolirion</i>	7.8	9.0	7.3	1.7	6.4
Ensayo II	<i>Rhodophiala montana</i>	21.4	20.0	0.0	3.6	11.3
Ensayo II	<i>Rhodophiala splendens</i>	22.2	20.0	10.0	10.0	15.4
Ensayo III	<i>Rhodophiala splendens</i>	47.1	---	---	---	47.1
Ensayo III	<i>Rhodophiala splendens</i>	26.1	---	---	---	26.1

El comportamiento de *Rhodophiala montana* y *Rhodophiala rhodolirion* en el Ensayo I se observa similar en cada uno de los medios de cultivo, salvo la respuesta de *Rhodophiala rhodolirion* en el medio MSB que se observa muchísimo más baja. El Ensayo II presenta una sobrevivencia total mayor. No se destacan grandes diferencias entre los ensayos cultivados en medio MSO y MSZ, presentando éstos mejores resultados que los medios MSA y MSB.

Luego de observar los bajos porcentajes de sobrevivencia resultantes en los Ensayos I y II se determinó para el Ensayo III, utilizar para todos los explantes, sólo un medio de cultivo sin adición de fitohormonas. Esto debido a que se consideró que se

debía solucionar primero la limitante que significaba la desinfección previa al ingreso *in vitro*, para luego evaluar diferentes combinaciones fitohormonales. Además la cantidad de material vegetal con el que se contó para trabajar, se consideró insuficiente para evaluar mayor cantidad de combinaciones fitohormonales.

A pesar de no haberse determinado claras conclusiones respecto a la composición fitohormonal del medio de cultivo, se observó un mejor desarrollo vegetativo de los explantes en el medio MSZ que contiene 0 mg/L de ANA y 3.0 mg/L de BAP. Los explantes desarrollaron tejido calloso abundantemente, hojas en mayor cantidad y con un intenso color verde, en general los explantes presentaron mejor estado, y se observaban más vigorosos. Es por lo anterior que se decidió utilizar esta composición fitohormonal en los períodos de crecimiento secundarios de los Ensayos I, II y III., así como también en el Ensayo V.

4.2.2 Evaluación del desarrollo organogénico de los Ensayos I, II y III. En el presente trabajo se dio un tiempo inicial de desarrollo a los explantes ingresados *in vitro*, de 100 días para el caso del Ensayo I, y 60 días para el caso de los Ensayos II y III. Luego de transcurrido este período de desarrollo, las plántulas fueron cambiadas a un medio de cultivo que contenía 3mg/L de benzil amino purina, donde continuaron creciendo. Se realizaron 3 evaluaciones posteriores: el día inicial, a los 30 días de desarrollo y al completar los 60 días, donde se evaluó la tasa de crecimiento de las plántulas. El desarrollo organogénico de los explantes se presentó primeramente como callo, tejido que a medida que transcurrió el tiempo del Ensayo, se transformó en brote y posteriormente en hoja. Además algunas plántulas desarrollaron bulbillos y otras raíz. Las plántulas, a pesar de haber presentado diferente origen, fueron mantenidas bajo las mismas condiciones y presentaron un comportamiento homogéneo, lo que permitió una posterior evaluación bajo parámetros definidos.

4.2.2.1 Desarrollo de callo. El crecimiento inicial del tejido vegetal corresponde al callo. Se observó en los Ensayos realizados que a medida que transcurrió el tiempo, el desarrollo de callo disminuyó, como se observa en la Figura 18. Algunos Ensayos no presentaron tejido calloso al momento de las evaluaciones, esto indica claramente que

las plántulas del Ensayo se encontraban en un estado de mayor desarrollo y por ello sólo presentaban hojas y/o brotes.

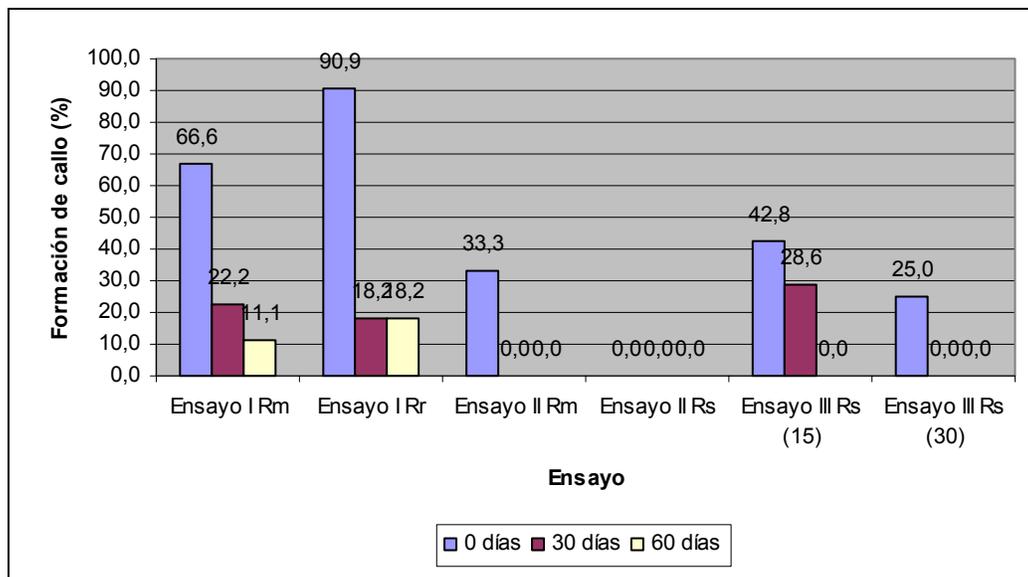


FIGURA 18: Formación de callo (%) correspondiente a los Ensayos I, II y III en *Rhodophiala montana* (Rm), *R. rhodolirion* (Rr) y *R. splendens* (Rs).

4.2.2.2 Desarrollo de brotes y hojas. Al observar los datos se observa una clara relación entre el desarrollo de brote y hoja (ver Anexo 3). Las siguientes Figuras (19, 20, 21) indican la relación existente entre el desarrollo de brote y el posterior crecimiento de las hojas. A medida que transcurre el tiempo disminuye el porcentaje de brotes desarrollados, a la vez que aumenta el porcentaje de hojas. Los brotes iniciales luego de transcurridos 30 días de crecimiento se han transformado en hojas. Esta tendencia se observa claramente en el desarrollo de todos los Ensayos.

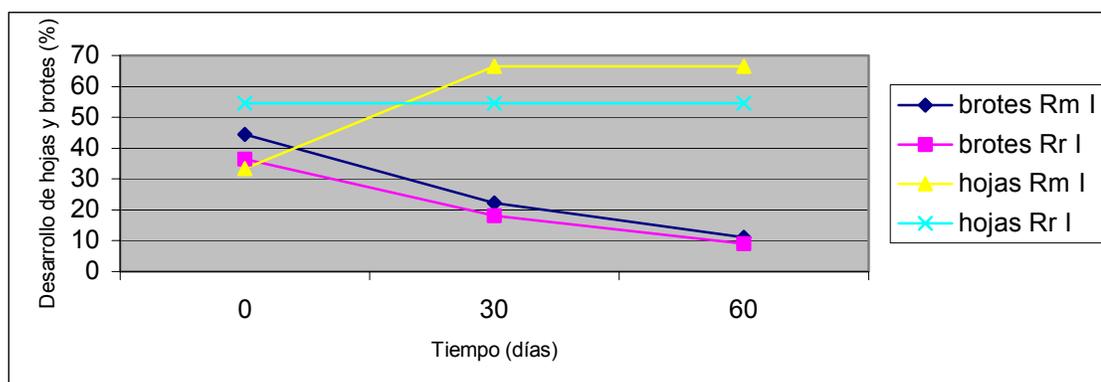


FIGURA 19. Desarrollo de hojas y brotes (%) correspondientes al Ensayo I en *Rhodophiala montana* (Rm) y *R. rhodolirion* (Rr).

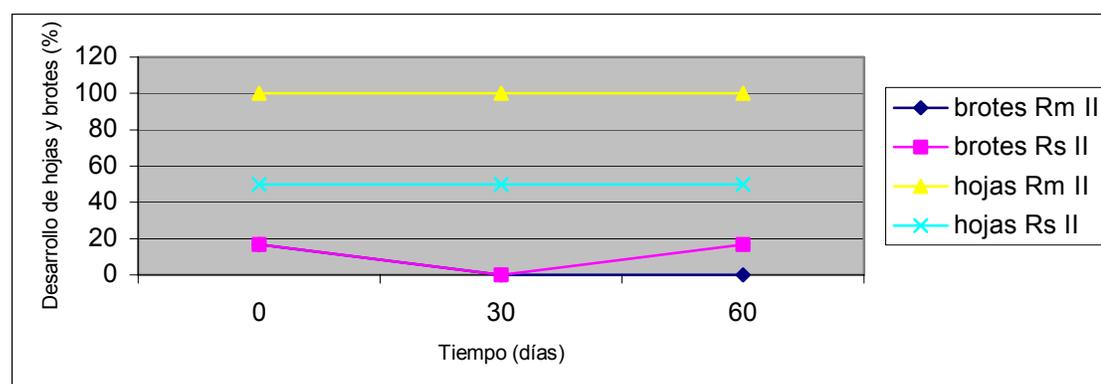


FIGURA 20. Desarrollo de hojas y brotes (%) correspondientes al Ensayo II en *Rhodophiala montana* (Rm) y *R. splendens* (Rs).

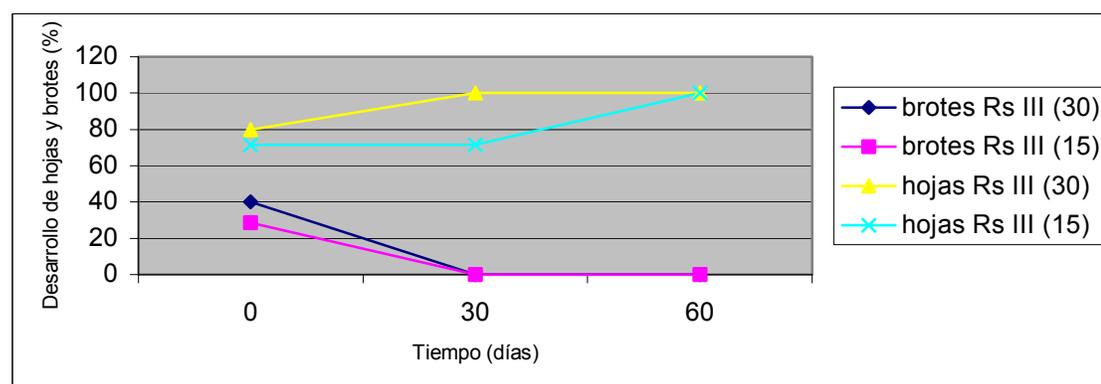


FIGURA 21. Desarrollo de hojas y brotes (%) correspondientes al Ensayo III en *Rhodophiala splendens* (Rs).

En general se observó que cada uno de los explantes desarrolló entre 0 y 9 brotes promedio. La altura promedio que alcanzaron los brotes desarrollados presentaron un rango de 0 a 8.5 mm.

El desarrollo de hojas en las diferentes especies de *Rhodophiala* evaluadas presentó un rango de 2 a 11.6 hojas promedio desarrolladas por cada uno de los explantes. Las hojas alcanzaron una altura entre 1.7 y 5.9 cm promedio. Se observó una clara tendencia al aumento del promedio de hojas por explante en el tiempo, lo cual se observa en la Figura 22.

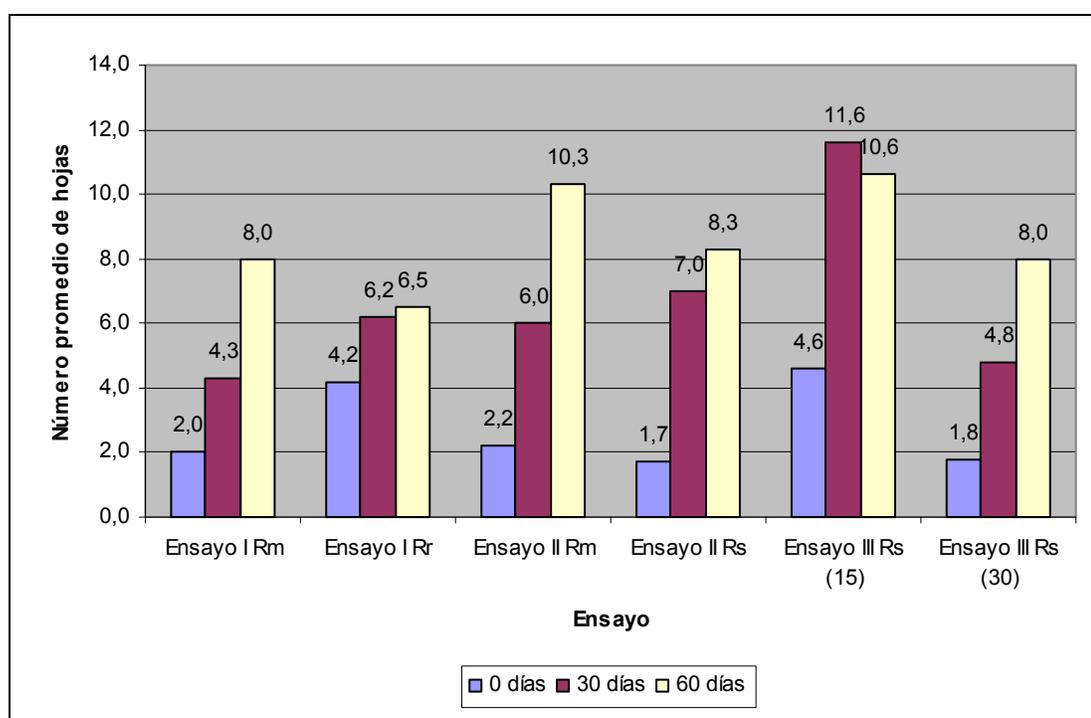


FIGURA 22. Número de hojas promedio por explante, correspondiente a los Ensayos I, II y III en *Rhodophiala montana* (Rm), *R. rhodolirion* (Rr) y *R. splendens* (Rs).

Algunas plántulas además desarrollaron microbulbillos y/o raíces, las cuales fueron descritas en el capítulo 4.2.

4.2.3 Evaluación del crecimiento de los explantes.

Las plántulas desarrolladas en los Ensayos anteriores (I, II y III) fueron tomadas y constituyeron el material con el que se trabajó en el V Ensayo. El material vegetal fue primeramente homogeneizado para facilitar la posterior evaluación. Las hojas de las plántulas fueron podadas a una altura de 2.5 cm y los explantes que presentaban varios brotes fueron separados. La evaluación se realizó a los 30 días y se midió la tasa de crecimiento, como la variación en altura de las hojas y la variación en el número de hojas por explante. Los resultados obtenidos se observan en el siguiente Cuadro:

CUADRO 9: Ensayo V. Variación del crecimiento de los explantes en el tiempo.

Ensayo	Especie	0 días	0 días	30 días	30 días
		Nº de hojas promedio por explante	Altura promedio de hojas (cm)	Nº de hojas promedio por explante	Altura promedio de hojas (cm)
Ensayo V	<i>Rhodophiala rhodolirion</i>	4.0	2.5	5.6	3.4
Ensayo V	<i>Rhodophiala montana</i>	3.6	2.5	5.0	4.7
Ensayo V	<i>Rhodophiala splendens</i>	4.4	2.5	6.5	4.0

De los resultados anteriores queda de manifiesto que tanto el número de hojas promedio por explante, como la altura promedio de las hojas aumenta en el tiempo.

Además se determinó que un 7.2 % de los explantes fue eliminado por presentar tejido necrótico o no presentar desarrollo alguno.

5 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente investigación y bajo las condiciones experimentales aplicadas, se puede concluir lo siguiente:

- Se desarrolló una primera aproximación a un sistema de desinfección favorable para el ingreso *in vitro* de las especies *Rhodophiala montana*, *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens*. Es necesario efectuar lavados del bulbo completo en soluciones fungicidas primeramente y posteriormente sumergir el material vegetal en Etanol por un tiempo muy breve, además del uso de Hipoclorito de sodio, como agente desinfectante. Se consideró adecuado desinfectar el bulbo separado en dos mitades.
- El estado sanitario que presenta el material vegetal fue de vital importancia al enfrentar el cultivo *in vitro* de una determinada especie. Al respecto resultó difícil combatir los agentes patógenos presentes en los bulbos que dieron origen a los explantes.
- Fue posible describir el crecimiento y desarrollo de órganos producto del ingreso *in vitro* de material vegetal. Los explantes desarrollaron en la unión entre las escamas y el disco basal, tejido organogénico, que dio origen a tejido calloso primeramente, el cual a medida que transcurrió el tiempo se transformó en brote y posteriormente en hoja. Algunos explantes desarrollaron microbulbillos y/o raíces.
- La presencia de tejido calloso disminuyó en el tiempo, en favor del desarrollo de órganos.
- Existió una relación inversamente proporcional entre el desarrollo de brotes y hojas, es decir, a medida que transcurre el tiempo de crecimiento disminuye el desarrollo de brotes en favor del crecimiento de las hojas.

- Se determinó que 4 a 5 escamas dobles por octavo de bulbo corresponden a la cantidad adecuada de explantes que permiten un buen desarrollo organogénico.
- No se pudo establecer la dosis hormonal más apropiada para el cultivo *in vitro* de las diferentes especies de *Rhodophiala* estudiadas. Quedó de manifiesto sí, que los explantes presentaron un desarrollo inicial más vigoroso en el medio que presentó 3 mg/L de Benzil amino purina
- El presente trabajo constituyó un aporte al escaso conocimiento existente sobre un género endémico de Chile, que presenta potenciales características ornamentales. Correspondió a una de las primeras investigaciones realizadas acerca del género *Rhodophiala*, y como tal, es una herramienta de utilidad para trabajos futuros.

6 RESUMEN

Rhodophiala montana (Phil) Traub., *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub. y *Rhodophiala splendens* (Rengifo) Traub. son plantas bulbosas, endémicas de Chile que pertenecen a la familia *Amaryllidaceae*. Estas especies presentan un potencial ornamental como planta de jardín o para uso en maceta.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema de multiplicación *in vitro* que permita obtener cantidad suficiente de material, evitando la sobreexplotación de estas especies en su hábitat natural. Para ello fue necesario desarrollar un sistema de desinfección del material vegetal, donde fueron evaluadas diferentes soluciones químicas con poder desinfectante. Se realizaron 5 ensayos, de los cuales los primeros 4 evaluaron diferentes procesos de desinfección del material vegetal. En el quinto ensayo se tomaron todas las plántulas desarrolladas y se evaluó la tasa de crecimiento en el tiempo.

Los bulbos fueron cortados en 8 partes iguales y luego cada trozo fue subdividido en escamas gemelas (entre 4-12 escamas gemelas). Las escamas gemelas fueron incubadas en un medio de cultivo Murashige y Skoog con fitohormonas (ANA/BAP: 0/0, 0/3, 0.5/0, 0.5/3 mg/L). Los mejores resultados fueron obtenidos al producir 4-5 escamas gemelas por cada octavo de bulbo. Los explantes se desarrollaron más vigorosos en el medio que presentó 0 mg/L de ANA y 3 mg/L de BAP.

El crecimiento de los explantes permitió realizar una descripción de los diferentes órganos desarrollados. Las escamas presentaron tonalidad verdosa en la superficie externa, luego experimentaron una separación entre ellas, lo que denotó el crecimiento a partir de la base de las mismas y el disco basal. Se observó desarrollo de tejido caloso, el cual se transformó en brote, para dar más tarde origen a las hojas. Las hojas laminadas, presentaron tonalidad verde intenso. Algunos explantes desarrollaron microbulbillos y/o raíces.

6 SUMMARY

Rhodophiala montana (Phil) Traub., *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub. and *Rhodophiala splendens* (Rengifo) Traub. are bulbous plants, native from Chile belonging to the *Amaryllidaceae* family. These species have a potential ornamental use as garden or pot plants.

The aim of this work was to develop an *in vitro* multiplication system, which would allow to have enough plant material without overexploiting the natural habitat. It was necessary to develop a disinfection system and that is why different chemical solutions were evaluated. Five experiments were carried out. The first four of them evaluated different disinfection processes. In the last one all the plantlets grew and the growth rate was evaluated. The bulbs were cut into 8 parts and then every part was subdivided in twin scales (4 to 12 twin scales). The twin scales were cultured on Murashige and Skoog with fitohormones (ANA/BAP: 0/0, 0/3, 0.5/0, 0.5/3 mg/L). The best propagation rates were obtained with 4 or 5 twin scales from every 1/8 of bulb. The explants grew stronger in a medium contained 0 mg/L of ANA and 3 mg/L of BAP.

The growth of the explants allowed a description of the different organs developed. The twin scales showed a green colour in the outer surface. The bulb scales were separated and denoted a growth between the scale and the basal plate. Callus formation was observed. The plantlet developed buds and leaves. The laminated leaves showed a dark green colour. Some explants developed bulblets and/or roots.

7 BIBLIOGRAFIA

- BASOALTO, A.A. 2001. Propagación vegetativa *in vitro* de *Rhodophiala montana* (Phil.) Traub. Tesis Lic. Agr. Talca. Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias. 45p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. 1976. Compendio estadístico 1976. Instituto Nacional de Estadística. Santiago, Chile. 111p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. 1997. VI Censo Agropecuario 1997. Instituto Nacional de Estadística. Santiago, Chile. 443p.
- CHRISTIANSON, M. L. y WARNICK, D. A. 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. Hort Science 23(3): 515-519
- DE HERTOUGH, A. y LE NARD, M. 1993. The physiology of flower bulbs: a comprehensive treatise on the physiology and utilization of ornamental flowering bulbous and tuberosus plants. Elsevier. Amesterdam. 811p.
- DINKELMAN, K., FINNIE, J., DRENNAN, P. y VAN STADEN, J. 1989. *In vitro* multiplication of *Paramongaia weberbaueri*. Hort Science 24(5):860.
- FUNDACIÓN CHILE. 2001. Flores y bulbos de flor. Cadenas Agroalimentarias. El mercado de las flores y bulbos y sus perspectivas en el sur de Chile. Área Agroindustrial de Fundación Chile. Convenio con Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. 83p.

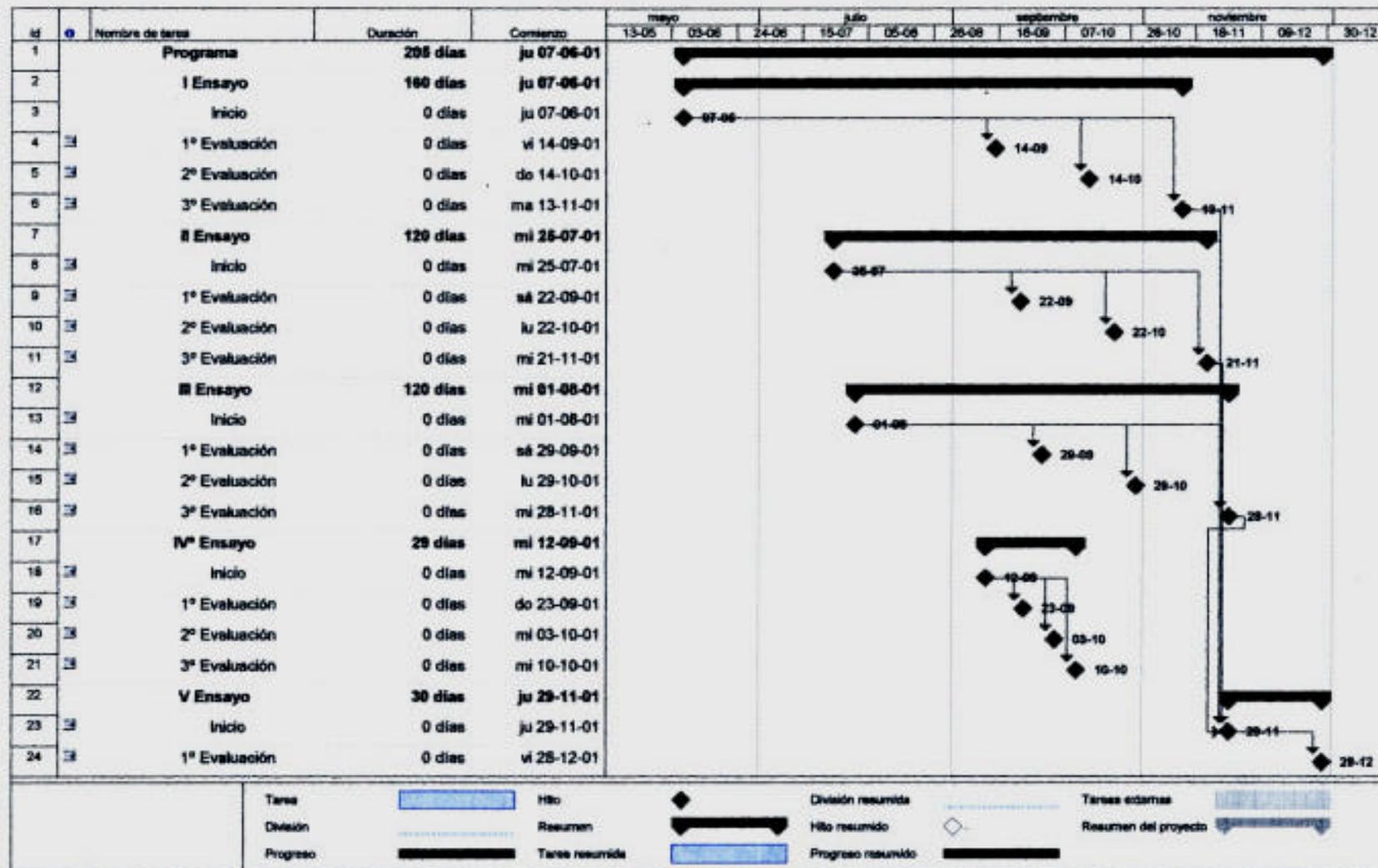
- FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA. 1999. Boletín de flores. Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. 1:2
- GEORGE, E. F. y SHERRINGTON, P. D. 1993. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- HARTMANN, A. y KESTER, D. 1988. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Continental, SA. DECV. México. 760 p.
- HOFFMANN, A. E. 1989. Sinopsis taxonómica de las geófitas monocotiledóneas chilenas y su estado de conservación. **In:** Benoit, I.L. (ed.) El libro rojo de la flora terrestre de Chile (Primera parte). República de Chile. Ministerio de Agricultura. Corporación Nacional Forestal. Santiago de Chile. pp:147-157.
- HOFFMANN, A. E. 2000. Estado de conservación de las geófitas monocotiledóneas chilenas: consideraciones taxonómicas y de conservación. **In:** Peñailillo, P. y Schiappacasse, F. (eds) Seminario Los Geófitos Nativos y Su Importancia en la Floricultura. Fundación para la Innovación Agraria (FIA). Dirección de Investigación Universidad de Talca (DIUT). Chile. pp:64-72.
- MARTICORENA, C. y QUEZADA, M. 1985. Catálogo de la Flora Vasculare de Chile. Gayana Botanica 42(1-2): 1-157.
- MEEROW, A. W. 2000. Breeding Amaryllis. **In:** Callaway, D.J. y M.B. Callaway (eds). Breeding ornamental plants. Timber Press, Inc. Portland, Oregon. pp:174-195.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

- MUÑOZ, C. 1966. Flores silvestres de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, Chile. 245 p.
- MUÑOZ, M. 2001. Recuento cromosómico en especies nativas de Chile con potencial ornamental. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 87 p.
- OCHOA, N. 1990. Establecimiento de cultivos *in vitro*. **In:** Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. pp:25-28.
- OHKAWA, K. 2000. Propagación y control de la floración de *Zephyra* y *Leucocoryne*. **In:** Peñailillo, P y Schiappacasse, F (eds). Seminario Los Geófitos Nativos y su Importancia en la Floricultura. Fundación para la Innovación Agraria (FIA); Dirección de Investigación Universidad de Talca (DIUT). Chile. pp:27- 40.
- OKUBO, H. 1993. Hippeastrum (Amaryllis). **In:** The Physiology of Flower Bulbs. Elsevier Science Publishing Co., Inc. Amsterdam, Holanda. pp: 321-334.
- PALMA-ROJAS, C. 2000. Caracterización citogenética de los géneros *Rhodophiala* Presl. y *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae). **In:** Peñailillo, P y Schiappacasse, F (eds). Seminario “Los Geófitos Nativos y su Importancia en la Floricultura”. Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y Dirección de Investigación, Universidad de Talca (DIUT). Chile. pp:73-79p.
- PEÑAILILLO, P. 2000. Introducción a las geófitas chilenas de valor comercial. **In:** Peñailillo, P. y Schiappacasse, F. (eds). Seminario Los Geófitos Nativos y su Importancia en la Floricultura. Fundación para la Innovación Agraria (FIA). Dirección de Investigación Universidad de Talca (DIUT). Chile. pp:1-10.

- SCHIAPPACASSE, F. y PEÑAILILLO, P. 2001. Informes del proyecto “Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial”. Financiamiento: FIA y Universidad de Talca. Chile.
- SEEMANN, P. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. **In:** Barriga, P. y Neira, M. (eds). Cultivos no tradicionales. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia. pp:87-146.
- VERA, M. y ACOSTA, L. 1999. Comercialización de plantas bulbosas. **In:** Seemann, P. y Andrade, N (eds) Cultivo y manejo de plantas bulbosas ornamentales. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia. pp: 195-218
- ZIV, M. 1997. The contribution of biotechnology to breeding, propagation and disease resistance in geophytes. *Acta Horticulturae* 430: 247-258

ANEXOS

ANEXO I: Programa de evaluaciones en el tiempo.



ANEXO 2. Eliminación de explantes (%) por repetición, correspondientes a los Ensayos I, II, III y IV.

Ensayo	Especie	R	Eliminación total (%)	Causa de eliminación		
				Contami- nación (%)	Tejido necrótico (%)	Sin desarrollo (%)
I Ensayo	<i>R. montana</i>	1	97.4	38.5	25.6	33.3
I Ensayo	<i>R. montana</i>	2	92.0	28.0	5.3	58.6
I Ensayo	<i>R. montana</i>	3	91.7	15.3	6.9	69.4
I Ensayo	<i>R. montana</i>	4	95.2	37.1	6.4	51.6
I Ensayo	<i>R. rhodolirion</i>	1	94.9	50.8	5.1	39.1
I Ensayo	<i>R. rhodolirion</i>	2	98.4	25.0	3.3	70.0
I Ensayo	<i>R. rhodolirion</i>	3	95.0	50.0	7.5	37.5
I Ensayo	<i>R. rhodolirion</i>	4	86.9	32.8	11.5	42.6
II Ensayo	<i>R. montana</i>	1	97.4	97.4	---	0.0
II Ensayo	<i>R. montana</i>	2	67.6	37.8	---	29.7
II Ensayo	<i>R. montana</i>	3	100.0	100.0	---	0.0
II Ensayo	<i>R. splendens</i>	1	84.6	48.7	---	35.9
III Ensayo	<i>R. splendens</i>	1	52.9	35.3	---	17.6
III Ensayo	<i>R. splendens</i>	2	73.4	60.0	---	13.3
IV Ensayo	<i>R. rhodolirion</i>	1	100.0	---	---	---
IV Ensayo	<i>R. rhodolirion</i>	2	100.0	---	---	---
IV Ensayo	<i>R. rhodolirion</i>	3	100.0	---	---	---
IV Ensayo	<i>R. rhodolirion</i>	4	100.0	---	---	---
IV Ensayo	<i>R. splendens</i>	1	100.0	---	---	---
IV Ensayo	<i>R. splendens</i>	2	100.0	---	---	---
IV Ensayo	<i>R. splendens</i>	3	100.0	---	---	---
IV Ensayo	<i>R. splendens</i>	4	100.0	---	---	---

--- : no se presentó

**ANEXO 3. Organogénesis *in vitro* en *Rhodophiala montana* (Rm), *Rhodophiala rhodolirion* (Rr) y *Rhodophiala splendens* (Rs)
(Ensayos I, II y III).**

	Formación callo			% Expl c/brote			Prom brotes /expl			Alt. prom. brotes			% Expl c/ hoja			Prom hoja/expl			Alt. Prom. hojas		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Ensayo I Rm	66.6	22.2	11.1	44.4	22.2	11.1	1.5	2.0	3.0	4.5	6.5	1.0	33.3	66.6	66.6	2.0	4.3	8.0	2.1	3.7	2.7
Ensayo I Rr	90.9	18.2	18.2	36.4	18.2	9.1	2.0	3.5	9.0	4.5	8.5	3.0	54.5	54.5	54.5	4.2	6.2	6.5	2.5	3.1	3.6
Ensayo II Rm	33.3	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	2.2	6.0	10.3	4.1	3.3	3.4
Ensayo II Rs	0.0	0.0	0.0	16.7	0.0	16.6	1.0	0.0	1.0	6.0	0.0	1.0	50.0	50.0	50.0	1.6	7.0	8.3	2.6	4.8	5.9
Ensayo III Rs (15)	42.9	28.6	0.0	28.6	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0	71.4	71.4	100.0	4.6	11.6	10.6	3.3	3.7	3.5
Ensayo III Rs (30)	25.0	0.0	0.0	40.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	7.0	0.0	0.0	80.0	100.0	100.0	1.7	4.8	8.0	1.7	3.2	3.8

ANEXO 4. Escamas presentaron apertura de 180° y desarrollo de callo en la unión escama-disco basal (*Rhodophiala rhodolirion*).



ANEXO 5. Desarrollo de hojas a partir de unión escama-disco basal (*Rhodophiala splendens*).



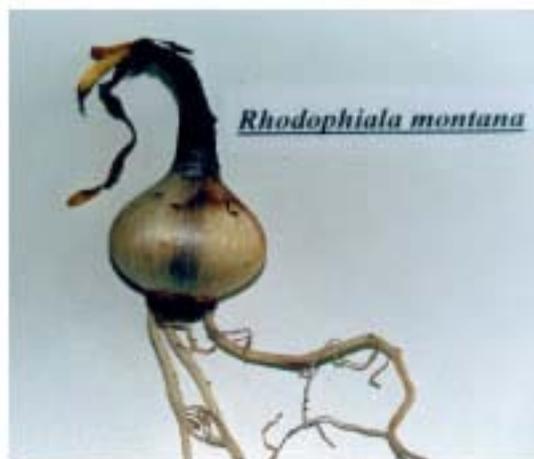
**ANEXO 6. Crecimiento de microbulbillo en unión escama-disco basal
(*Rhodophiala montana*).**



ANEXO 7. Desarrollo de raíz (*Rhodophiala splendens*).



ANEXO 8. Bulbos de las especies de *Rhodophiala* investigadas.



Rhodophiala montana

Rhodophiala montana



Rhodophiala splendens



Rhodophiala splendens



Rhodophiala rhodolirion

ANEXO 9. Material vegetal contaminado (*Rhodophiala rhodolinion*).

