

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Uso de biorreguladores de crecimiento para conservación *in vitro*
a mediano plazo de dos especies vegetales nativas de Chile.**

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

CLAUDIA ELENA REYES LARENAS

VALDIVIA – CHILE
2008

PROFESOR PATROCINANTE

Peter Seemann Fahrenkrog
Ing. Agr., Dr. rer. hort.

PROFESORES INFORMANTES

Laura Böhm Stoffel
Ing. Agr.

Magaly Rivero Gutiérrez
Prof. Biol. y Quim., Dr. Cs.

**A Dios, por cuidar a mi
Padre en el cielo y a mi
Hijo en la tierra.**

AGRADECIMIENTOS

“No se puede enseñar nada a un tesista; Solo se le debe guiar y ayudar a encontrar la respuesta en si mismo”palabras como estas, dan el verdadero apoyo y valor que se necesita en esta etapa. Gracias Profesor Peter Seemann.

Al profesor Ricardo Fuentes, a quien muchas veces le pedí: “un minuto de su tiempo”, y que gracias a su disposición y amabilidad se convertían en más de cinco minutos de respuestas a mis dudas.

A mis padres, que me entregaron un lindo regalo, que fue mi educación y su amor incondicional, fueron los agentes principales en la transmisión de valores morales y el sentido espiritual de mi vida. A mi hijo José Augusto, que es mi fiel compañero y a mis hermanas Jimena y Loreto.

A todas las personas que me han acompañado y colaborado en la más linda tarea de criar a mi hijito y ser estudiante, nos las menciono porque son muchas, pero sus nombres los guardaré en mi corazón.

El fracaso es la prueba que antecede al éxito.....Ya puedes descansar en Paz Papito Lindo.

1 INTRODUCCIÓN

La conservación de la flora nativa chilena se ha convertido en un tema de importancia creciente en la última década. Procesos amenazantes que afectan el estado de conservación de la flora y su biodiversidad han derivado a una disminución significativa de los bosques nativos y un aumento del número de especies amenazadas.

Las técnicas de regeneración a partir de cultivo de tejidos *in vitro*, constituyen una alternativa de gran impacto, que debe y puede desarrollarse en Chile, para la conservación de especies y se ha transformado también en una excelente vía que sirve de soporte en la conservación de material vegetal escaso, por largo tiempo en un área relativamente pequeña.

Mediante el cultivo de tejidos *in vitro* las plantas pueden ser mantenidas por más tiempo a través de subcultivos, que dependen del desarrollo del tejido y del medio en que está expuesta la planta. Sin embargo, el almacenaje de germoplasma mediante una serie de subcultivos, corre el riesgo de pérdida de material vegetal por contaminación microbiana y errores humanos. Por lo tanto es un requerimiento importante en la práctica de cultivo de tejidos vegetales reducir la frecuencia de los subcultivos al mínimo. Esto se puede lograr a través de procedimientos de retardación del crecimiento.

Por ello, es conveniente desarrollar un método de conservación a mediano plazo de especies amenazadas, con el fin de minimizar su crecimiento sin que disminuya su viabilidad.

La hipótesis de esta investigación es que frente a determinadas concentraciones de biorreguladores de crecimiento y distintas condiciones ambientales las especies vegetales pueden tener una respuesta distinta, siendo posible encontrar dentro de algún tratamiento un crecimiento reducido de la planta, para su conservación a mediano plazo.

El objetivo general del presente trabajo es buscar condiciones de cultivo *in vitro* que permitan conservar a mediano plazo el germoplasma de dos especies nativas: *Lobelia bridgesii* Hook. et Arn. y *Valdivia gayana* J. Rémy, cuya conservación *in vivo* se encuentra amenazada.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar el efecto de la aplicación de cuatro dosis de biorreguladores de crecimiento en dos especies nativas, sometidas a dos condiciones ambientales de conservación *in vitro*.
- Determinar combinaciones óptimas de biorreguladores y condiciones ambientales, que permitan una disminución del crecimiento para la conservación a mediano plazo de germoplasma *in vitro*
- Evaluar el porcentaje de sobrevivencia de las combinaciones de biorreguladores y condiciones ambientales determinadas, a los 60, 120 y 180 días.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estado de conservación de la flora chilena.

En Chile, según MARTICORENA (1990), se ha identificado una flora de 5.105 especies nativas, de las cuales el 51% (2.630 especies) son endémicas y el 60% de la flora total se concentra en Chile Central.

El área de Chile Central fue identificada como una de las 25 áreas prioritarias de la biodiversidad en el mundo, ya que contiene al menos 1.500 especies de plantas vasculares endémicas (>0.5% del total mundial); se estima que esta área posee 3.892 especies de plantas vasculares, de las cuáles 1.957 son endémicas (Gil et al. citados por HECHENLEITNER et al, 2005).

La flora nativa chilena se expandió y desarrolló en refugios de la Cordillera de la Costa y de los Andes, creados durante la última glaciación, hace más de 10.000 años. Se estima que la influencia humana ha provocado cambios desde la llegada de los españoles sobre la extensión de la cubierta vegetal. Originalmente la cubierta vegetal histórica de los bosques templados desde la Región del Maule a la Región de Aysén correspondía a 18,4 millones de hectáreas (LARA *et al.*, 1999). Estudios recientes sobre la cubierta vegetal actual para la zona centro-sur de Chile estiman que los bosques nativos cubren un área total de 13,4 millones de hectáreas, lo cual implica una disminución de un 40%; también se ha estimado que más del 84% de los bosques nativos remanentes están concentrados desde la Región de Los Lagos a la Región de Magallanes (CONAF *et al.*, 1999).

2.2 Especies amenazadas.

La explotación, conversión y disminución de las especies nativas, junto a otros factores como cambios climáticos aumentan el riesgo de extinción para muchas especies de plantas (HECHENLEITNER *et al.*, 2005).

La situación en que se encuentran estas plantas tiene por origen, en algunos casos, cambios en las condiciones ecológicas, pero en la mayoría de las situaciones una influencia antrópica manifestada en una sobreexplotación de los recursos naturales renovables, ha puesto en peligro la supervivencia de estas especies (SEEMANN, 1985). Los cambios ambientales causados por el ser humano desfavorecen especies que poseen tamaño grande, baja fecundidad, distribución limitada y dispersión lenta, características particularmente favorables a la extinción (LUGO, 2007).

Según ZURITA (1993), la distribución restringida y los tamaños sub-poblacionales pequeños de las especies endémicas tales como *Nothofagus alessandri* y *Nothofagus glauca*, las hacen susceptibles a la deforestación y degradación del bosque.

Existen especies amenazadas como *Valdivia gayana*, que se encuentra en un hábitat específico y una distribución muy restringida, y en la medida en que estos habitats disminuyen en número, las especies se aíslan más como resultado directo de la fragmentación (HECHENLEITNER *et al.*, 2005).

Algunos grupos que habitan en sectores inhóspitos e inaccesibles, como los bosques templados lluviosos del sur del país, conforman un medio de características únicas en el mundo, en el cual se desarrollan varias especies endémicas que sufren extinciones proporcionalmente más severas, lo que pone en peligro que se pierdan grupos de organismos ó hábitat funcionalmente importantes a los ecosistemas (Ramírez 1982, citado por ZURITA, 1993).

Según RODRIGUEZ (1997), para la continuación de los procesos ecológicos esenciales en el equilibrio del ecosistema, estas plantas desempeñan un papel insustituible. Se han realizado escasos trabajos sobre multiplicación de plantas nativas mediante semillas, técnicas de estaquillado, acodado y micropropagación. Por otra parte, HECHENLEITNER *et al.* (2005) señala que la conservación de la flora nativa chilena es un tema de importancia creciente en la última década y se han incluido programas para el manejo y uso sustentable de productos forestales y especies específicas, iniciativas que han sido acompañadas por un aumento en la cantidad de investigaciones. Sin embargo, en Chile esta creciente actividad no está siendo coordinada por ninguna política a nivel gubernamental para la protección o uso sustentable de los bosques nativos del país.

Para las especies amenazadas la micropropagación es una técnica muy valiosa y deseable de establecer en países en desarrollo como Chile, que además cuenta con material vegetal exótico, muchas veces escaso y de alto valor nutricional. Por otra parte, el lograr mantener material vegetal seleccionado y escaso, limpiarlo de enfermedades y poder reproducirlo en forma masiva y homogénea, es una alternativa que se debe tener presente (Botti 1989, citado por RODRIGUEZ, 1997).

2.3 Aspectos generales de las especies en estudio.

Las especies que se incorporan al presente estudio pertenecen a la flora nativa chilena, habitan principalmente la zona de la Cordillera de Costa que se encuentra en gran medida restringida a profundas quebradas que nacen en las cimas, recorriendo un corto trecho hasta la costa. Estas quebradas, en muchos casos de difícil acceso, se caracterizan por una alta humedad debido a la influencia de nieblas y alta precipitación. La vegetación presente se conserva replegada a lugares inhóspitos e inaccesibles de los bosques templados

lluviosos con características únicas en el mundo, en los cuales se desarrollan varias especies endémicas (RODRIGUEZ, 1997).

Lobelia bridgesii está clasificada en la categoría de “raras” por BENOIT (1989) y HOFFMANN (2005), que corresponde a especies que aparentemente siempre han sido escasas, que están en su último estado de extinción natural, o especies de distribución muy restringida, con pocas defensas o escaso poder de adaptación.

En relación a *Valdivia gayana*, la Corporación Nacional Forestal (CONAF, 1999) señala que se encuentra entre las 11 especies de la flora nativa chilena, arbórea y arbustiva, en estado de conservación crítico, que merece clasificarse en la categoría “en peligro”. HOFFMANN (2005), señala que es una especie en peligro, con problemas de conservación cuya población se ha reducido a un nivel crítico o cuyo hábitat se ha reducido drásticamente y se encuentra en riesgo inminente de extinción.

Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN), en sus criterios utilizados para las categorías de las listas rojas adoptadas en Noviembre de 1994, se pueden evaluar las especies en ocho categorías. Analizando el área de ocupación y las localidades en que se encuentran las especies en estudio se pueden clasificar en la categoría “En Peligro (EN)”; debido a que la presencia de *Lobelia bridgesii* y *Valdivia gayana*, se estima menor a 5.000 km² y el área de ocupación menor a 500 km² y solo existen en no más de cinco localidades. Estas especies al ser clasificadas en esta categoría afrontan un riesgo alto de extinción en estado silvestre en un futuro cercano (HECHENLEITNER *et al.*, 2005).

A continuación se describirán ambas especies, distribución geográfica y hábitat.

2.3.1 *Lobelia bridgesii*. Llamada comúnmente tupa rosada o Tabaco del diablo; es una planta muy evolucionada ubicada en la subclase Asteridae, uno de los grupos más desarrollados de Reino Vegetal, Orden Campanulales y Familia Lobeliaceae. Entre los caracteres avanzados que posee figuran un cormo herbáceo, androceo aplostémono y oligómero con sinandria en las anteras (HECHENLEITNER *et al.*, 2005); presenta inflorescencia vistosa y zoofilia, que la convierten en una especie muy evolucionada dentro de las dicotiledóneas (KRAUSE, 1988).

HOFFMANN (1980), señala que es una planta leñosa en la base, de tallos gruesos, cuadrangulares y rojizos. Hojas grandes de 15 a 40 cm de largo, ápice agudo y el borde aserrado. Por otra parte HECHENLEITNER *et al.*, (2005) la describen como: “Planta erecta, muy ramificada de 1,5 m de altura, tallos alados, huecos con látex blanco en su interior. Hojas sésiles, lanceoladas que abrazan las caras del tallo hacia abajo, el ápice presenta una punta larga con márgenes finamente dentados. Las flores nacen de un racimo terminal con muchas flores; pétalos color rosado claro; anteras azul plumizas.”

La morfología y anatomía de la planta fue descrita por KRAUSE (1988), en un estudio autoecológico con ejemplares frescos y fijados, describiendo a la planta y sus diferentes partes constituyentes. El sistema radicular esta formado por una raíz napiforme de 40 cm de largo y 4 cm de diámetro, color café claro y al ser cortada exuda un liquido blanco y espeso, semejante al látex, el cual le confiere toxicidad a la planta; en el extremo superior se pueden observar los restos de vástagos aéreos que florecieron los años anteriores. Esta característica hace suponer que la edad máxima de una planta adulta supera los 10 años. El fruto es una capsula dehiscente seca, bicarpelar, bilocular, polisperma, posee semillas de 0,5 mm de diámetro de testa color café, dura y lisa.

2.3.1.1 Distribución geográfica. Es una especie que se encuentra en un área muy restringida, se puede considerar endémica del litoral de la cordillera de la costa de la provincia de Valdivia (KRAUSE, 1988).

ZURITA (1993), señala que se han localizado ejemplares a orillas del camino entre San Juan y Corral, donde crece de forma abundante en la base del cerro La Marina. Además se encuentra a orillas del río Cruces camino al fundo y bosque experimental “San Martín” de la Universidad Austral de Chile. Basándose principalmente en observaciones personales en terreno, KRAUSE (1988) pudo asegurar la presencia de esta especie a orillas del río Tornagaleones, en la ensenada de San Juan, en la Bahía de Corral, en San Carlos y a orillas del río Cruces. Según HECHENLEITNER et al., (2005) tiene una distribución restringida en la Región de los Lagos, actualmente Región de los Ríos, 39° 44'S a 39° 53'S, donde crece en un área de alrededor de 50 km de radio alrededor de la Bahía de Corral, desde el nivel del mar hasta los 450 m.

2.3.1.2 Caracterización del habitat. Se encuentra en bordes de caminos alterados y a lo largo de cursos de agua, asociada con bosques siempre verdes de segundo crecimiento. Crece en sectores con marcada intervención antrópica y en compañía de malezas alóctonas, su presencia exige la cercanía de grandes masas de agua y por lo general la protección de matorrales, bajo cuyo dosel se desarrolla. (KRAUSE 1988).

Es común encontrarla cercana a: *Aextoxicum punctatum*, *Amomyrtus meli*, *Drimys winteri*, *Fuchsia magellanica*, *Laureliopsis philippiana*, *Leptocarpha rivularis*, *Myrceugenia parvifolia* (HECHENLEITNER et al., 2005).

2.3.2 *Valdivia gayana*. Llamada comúnmente planta del león o valdivia; pertenece a la subclase Rosidae, orden Rosales y familia Saxifragaceae, a esta familia pertenecen principalmente arbustos, hierbas perennes y anuales (Heywood 1985, citado por RODRIGUEZ, 1997).

Planta perenne, de hábito variable, generalmente con roseta de hojas abovado-espátuladas, ásperas o hispídas por el envés. Del centro de las hojas se levanta un tallo corto que termina en un racimo de flores rosadas. Los frutos son cápsulas globosas, coronadas por los sépalos, con numerosas semillas ovadas (MUÑOZ y MOREIRA, 2002).

Esta especie es una hierba o pequeño subarbusto en estado adulto, con pocos tallos leñosos, de forma sinuosa y colgante de hasta 2 cm de diámetro. La mayoría de las veces crece como planta perenne frondosa de 20-30 cm de altura. Hojas alternas y sub-opuestas, obovadas-lanceoladas, agudamente dentadas. Flores en racimos cortos, axilares poco floridos, lila-rosáceas, cáliz con 5 lóbulos, 5-7 pétalos, 5-7 estambres, floración entre agosto y noviembre. (HECHENLEITNER *et al.*, 2005).

El fruto es una cápsula geocárpica, membranosa glandular, que depositan pequeñas semillas en el sustrato, cerca de la planta madre; maduración entre febrero y marzo (RODRIGUEZ, 1997).

2.3.2.1 Distribución geográfica. El genero *Valdivia* es monotípico y endémico de la actual Región de Los Ríos (Provincia de Valdivia, 39°53' S- 40°15' S), en donde crece desde el nivel del mar hasta los 600 m (HECHENLEITNER *et al.*, 2005).

Se han encontrado ejemplares en: La Aguada, Punta Rama, Río Santo Domingo, Estero Romerillo y Rincón de Piedra, todos sectores cercanos entre

sí, donde la distancia norte-sur se estima en alrededor de 41 km. entre las localidades extremas. Si se calcula la extensión de 17 minutos en aproximadamente 1,85 Km , equivale a 42,5 km y se estima un ancho máximo de 10 km en sentido este-oeste, se puede inferir que la extensión de la presencia sería de alrededor de 425 km² (ZURITA,1993).

El rango de distribución completo para la especie es poco conocido, como para inferir el tamaño de las subpoblaciones. Las únicas localidades conocidas son cercanas a Corral, Río Santo Domingo y Barra del Río Bueno (SERRA y GAJARDO, 1988), y en áreas forestadas al sur de Valdivia y recientemente fue ubicada en la Reserva Nacional Valdivia. (HECHENLEITNER *et al.*, 2005).

2.3.2.2 Caracterización del habitat. Esta especie presenta un hábitat muy específico, asociado a lugares húmedos muy sombreados, a menudo sobre laderas verticales bajo grandes afloramientos de rocas metamórficas (HECHENLEITNER *et al.*, 2005). En los lugares donde crece, se comporta como una especie rupícola, higrófila y umbrófila, es decir crece en sustratos rocosos con suelos insipientes, en lugares húmedos y sombríos (Ramírez 1982, citado por RODRIGUEZ, 1997). Sin embargo, en algunas localidades altamente alteradas se le ha encontrado creciendo en exposiciones más abiertas sobre laderas de tierra escarpadas, parcialmente sombreadas por *Ulex europaeus*. Algunas subpoblaciones están limitadas a hábitats del litoral costero, pero muchas se presentan hacia el interior de áreas boscosas, la mayoría asociadas con plantaciones forestales de especies exóticas. Quizás el hábitat mas natural se encuentra en la Reserva Nacional de Valdivia, en donde habita lugares profundamente sombreados del tipo forestal siempreverde (HECHENLEITNER *et al.*, 2005).

Es común encontrarla cercana a *Drimys winteri*, *Eucryphia cordifolia*, *Laureliopsis philippiana*; las hierbas y helechos acompañantes incluyen *Pilea elegans*, *Blechnum corralense*, *Pteris semiadnata* (HECHENLEITNER *et al.*, 2005).

2.4 Conservación *in vitro* de recursos genéticos.

La conservación de recursos fitogenéticos, al crear un banco de germoplasma, es muy útil para la conservación; esto permite mantener la integridad genética del material donde el éxito del sistema dependerá de factores fisiológicos, morfológicos y sanitarios de las técnicas empleadas (Giacometti 1987, citado por CANIGGIA, 1997). Una de las técnicas que se utiliza para restaurar y multiplicar las especies nativas con problemas de conservación, es el cultivo de tejido *in vitro*. Esta técnica consiste en utilizar pequeños trozos de diversos tejidos, previamente esterilizados externamente y cultivarlos en un medio de asepsia total (SEEMANN, 1985); es decir, una parte de la planta (órgano, tejido, célula o protoplasto) se cultiva asépticamente en un medio nutritivo bajo condiciones de luz y temperatura controlada (ELIAS, 1998).

La conservación de los recursos fitogenéticos mediante métodos de cultivo *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar o suprimir el crecimiento de las células y de los tejidos; el objetivo es aumentar al máximo el período de transferencia del cultivo o extenderlo indefinidamente (SEEMANN, 1985), este proceso puede realizarse a corto, mediano y largo plazo, la alternativa a utilizar dependerá de la capacidad tecnológica, infraestructura disponible, objetivos de conservación y la naturaleza de las especies a conservar (ELIAS, 1998).

En el ambiente de cultivo intervienen distintos factores que controlan la tasa de crecimiento de los cultivos *in vitro*, como: retardantes e inhibidores de crecimiento, la concentración osmótica del medio y factores ambientales (ELIAS, 1998).

Han sido numerosas las sustancias empleadas en los medios de cultivo para reducir el ritmo de crecimiento de las plantas, entre las que pueden citarse el manitol, ácido abscísico, ácido salicílico y otras (LOPEZ y SCOTT, 1998); sin embargo, tanto la sustancia como su concentración, dependerán de la especie y dentro de éstas, los genotipos a conservar, así como las condiciones de temperatura, intensidad luminosa, fotoperíodo y otros factores a los cuales son conservadas las plantas, por lo que resulta de gran importancia probar, en cada laboratorio cuál es la sustancia idónea y qué dosis emplear para lograr los mejores resultados. KOSAK (2006), señala que para obtener un crecimiento lento *in vitro* es necesario disminuir la temperatura, usar retardantes de crecimiento o elevar la concentración osmótica del medio; otros factores como disminuir el tamaño del frasco, restringir los nutrientes y los gases pueden afectar el crecimiento de los tejidos, causando daño a la planta.

ROCA y MROGINSKI (1991) sugiere, realizar una evaluación científica cuidadosa de las ventajas y desventajas de una estrategia *in vitro* de la conservación de recursos genéticos para cada caso específico.

Entre las ventajas que presenta la conservación *in vitro* de germoplasma destacan: conservación de un gran número de plantas en espacios pequeños; mayor control sobre el estado fitosanitario de las plantas; reducción en los tiempos de multiplicación; facilidad de intercambio de material genético debido a su sanidad e incremento de la tasa de multiplicación de algún germoplasma valioso, en peligro de extinción o de valor comercial (ELIAS, 1998). Por otro lado, tienen la ventaja de ofrecer un control directo sobre el material a conservar (BHOJWANI y RAZDAN, 1983)

Si bien este método ofrece la posibilidad de conservar germoplasma a corto y mediano plazo en un espacio más reducido, existe el riesgo de pérdida de las entradas por contaminación accidental, error humano y /o por variación somaclonal, además que, los costos de las labores por mantenimiento son altos

(LOPEZ y SCOTT, 1998). Sin embargo Lundergan y Janick 1979, citado por LEAL (1990), señala que la inestabilidad citogenética y la alta frecuencia de subcultivos pueden ser evitados por medio de la reducción de la tasa de crecimiento de los explantes, a través de factores ambientales y/o composición del medio de cultivo, que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a medios frescos.

2.5 Inhibidores del crecimiento.

Por lo general las plantas dentro de su naturaleza química contienen diversas sustancias inhibidoras de procesos fisiológicos y bioquímicos que contribuyen a la regulación y periodicidad del crecimiento, la acción de este grupo de inhibidores es en forma opuesta y no competitiva a la acción de hormonas vegetales como auxinas, giberelinas y citocininas (WEAVER,1976).

La acción de los inhibidores según SIVORI (1980), puede tener lugar en varios momentos o etapas, y en la mayoría de los casos, se requiere concentraciones relativamente altas para contrarrestar por completo la acción hormonal; algunos de ellos, tales como el ácido abscísico, tiene caracteres como de un verdadera hormona ya que puede actuar a distancia y ejercer su acción en dosis relativamente bajas.

Entre las sustancias de este grupo el mismo autor menciona:

- 1) Compuestos de naturaleza fenólica, como ácidos salicílico, benzoico, p-hidroxibenzoico, gálico, ciscinámico, p-cumárico, ferúlico y cafeico; flavonoides como naringerina y quercetina; lactosas no saturadas como cumarina y escopolitina.
- 2) Sustancias tipo abscisinas: ácidos abscísico, faseico, lunularico y xantosina.
- 3) Complejos inhibidores: Complejo inhibidor B.

2.5.1 Ácido abscísico Es un inhibidor del crecimiento natural presente en plantas (WEAVER, 1976). Ha sido propuesto para jugar un papel regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas y frutos y estrés hídrico. Típicamente la concentración en las plantas es entre 0.01 y 1 ppm, sin embargo, en plantas marchitas la concentración puede incrementarse hasta 40 veces. El ácido abscísico se encuentra en todas las partes de la planta, sin embargo, las concentraciones más elevadas están localizadas en semillas y frutos jóvenes (ELIAS, 1998).

El ABA según WEAVER (1976) corresponde a un sesquiterpenoide de 15 átomos de carbono. De acuerdo a SIVORI (1980) es un ácido 3-metil-5-(1'-hidroxi-4'-oxo-2',6',6'-trimetil-2'ciclohexenil-1')cis,trans-2,4-pentadienoico (Figura 1).

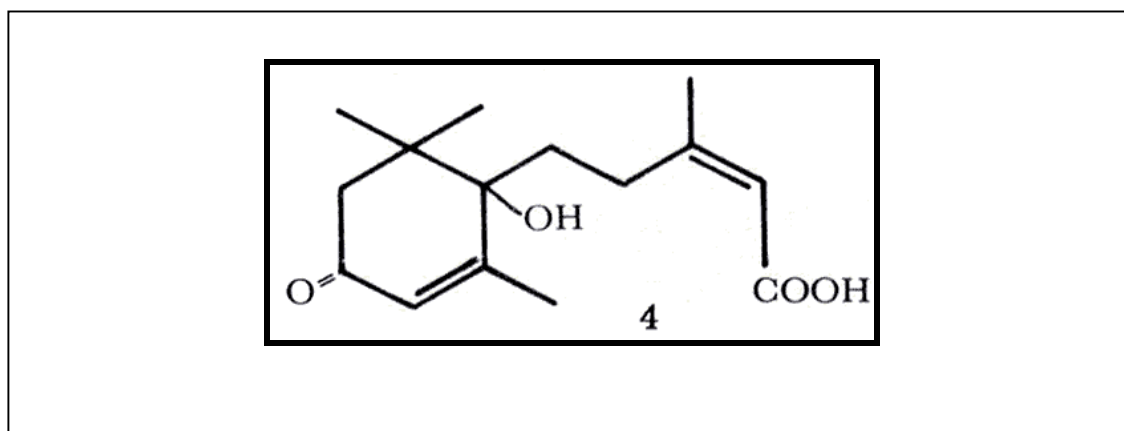


FIGURA 1 Estructura del ácido abscísico.
FUENTE SALISBURY y ROSS (1994).

Según MILBORROW (1974), la biosíntesis de ácido abscísico ocurre parcialmente en cloroplastos de hojas, tallos y frutos verdes. ELIAS (1998) señala que se han descrito dos posibles vías de síntesis: una ruta directa, donde su precursor sería el ácido mevalónico (AMV) o isopentenil pirofosfato (IPP), que tiene lugar en cloroplastos y otros plastos. La otra es una ruta

indirecta, a partir de la degradación de ciertos carotenoides derivados del ácido mevalónico, que son sintetizados en plastidios. Su degradación ocurre a través de dos mecanismos: conjugación con carbohidratos y otros tipos de compuestos como proteínas o lípidos, y metabolizado por la planta (ELIAS, 1998).

2.5.1.1 Modo de acción. El ácido abscísico es considerado un inhibidor de crecimiento, pero además posee múltiples roles durante el ciclo de vida de una planta que se determinan de acuerdo a la etapa de desarrollo y a las condiciones medio ambientales (SALISBURY y ROSS, 1994); además, la acción de este inhibidor depende de la concentración endógena en la planta y de la sensibilidad de las células ante niveles diferenciales del mismo (ELIAS, 1998).

El rol fisiológico de mayor importancia es la regulación del mecanismo estomático, que se manifiesta sobre la membrana plasmática en un cambio en el potencial bioeléctrico que influye en el cierre de los estómas; de esta forma, se previene la pérdida de agua a través de las hojas y las necesidades hídricas de la planta (TEILLIER, 2005). Otro efecto es la activación y desactivación específica de ciertos genes que producen la inhibición de la síntesis de proteína (SALISBURY y ROSS, 1994).

2.5.2 Ácido maleico Es un ácido cis-butenodioico que se relaciona con el metabolismo celular, en el que interviene en varios lugares, siendo destacada su participación en el ciclo de Krebs (CALDIZ *et al.*, 1999).

Es un inhibidor de la brotación que aplicado sobre el follaje se absorbe y traslada rápidamente en la planta, inhibiendo el crecimiento de los brotes; es ampliamente utilizado desde la década del '50, particularmente en USA y Canadá (CALDIZ, 1999).

Su efecto es inhibitorio de la respiración celular en tejidos finos de la planta, principalmente por su naturaleza carboxílica, en el ciclo de Krebs compite con el ácido succínico, donde sus efectos inhibitorios son reversibles (JAMES, 1953).

En la Figura 2 se muestra la fórmula estructural de este compuesto.

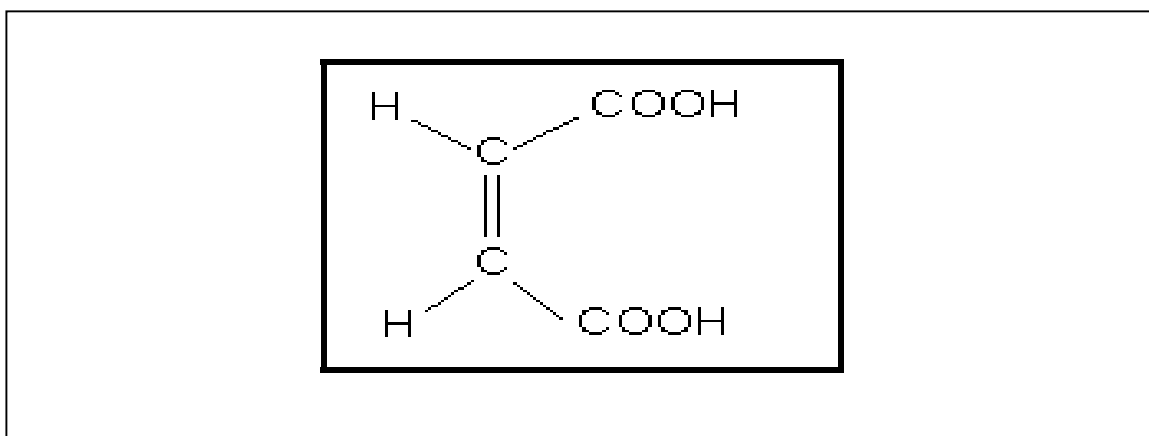


FIGURA 2 Estructura del ácido maleico.
FUENTE SALISBURY y ROSS (1994).

El ácido maleico es un producto de acción sistémica, que se aplica sobre las plantas en estado vegetativo; la planta lo asimila por las hojas y se trasloca posteriormente al bulbo donde se acumula y el efecto bioquímico consiste en frenar la germinación, a partir de la inhibición de las citoquininas (PEREZ *et al.*, 2001). La inhibición de citoquininas impide la división celular y el desarrollo de brotes; este compuesto orgánico es una fitohormona de importancia en los medios de cultivos (SEEMANN, 1985)

PEREZ *et al.* (2001) realizaron un estudio aplicando ácido maleico en ajo, para inhibir posibles brotaciones en postcosecha, donde la utilización de este compuesto fue determinante en la inhibición de la brotación ya que el 90% de los ajos no presentó brotes externos.

2.6 Retardantes del crecimiento.

ELIAS (1998), define como retardantes sintéticos a los derivados de carbamatos de amonio, que son los responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y además determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta.

Según WEAVER (1976), los retardantes de crecimiento constituyen un grupo importante de reguladores que se descubrieron en las décadas de 1950 y 1960; corresponde a sustancias que generalmente retrasan la actividad meristemática subapical que es la responsable de la elongación del tallo sin afectar el meristema apical.

Según SIVORI (1980), los reguladores sintéticos no están emparentados químicamente con las fitohormonas e inhibidores naturales y, además no se relacionan químicamente entre sí, aunque ejercen su acción reguladora de forma similar en las plantas.

2.6.1 Paclobutrazol. Es un triazol, su nombre genérico es ([2Rs, 3Rs]-1-[4-clorfenil]-4,4-dimetil-2-[1H-1,2,4-triazol-1-y1] pentan-3-ol), producto comercial para uso en ornamentales, árboles, frutales y en semillas de gramíneas (BLANCO,2006). Su fórmula estructural se indica en la Figura 3.

Es un retardador de crecimiento, que inhibe la biosíntesis de las giberelinas, reduciendo de forma apreciable, tanto la división celular como, el alargamiento de las células (MARINO, 2004). Es absorbido por el follaje, tallos y raíces, siendo transportado vía xilema, y a nivel de crecimiento meristemático sub-apical inhibe la biosíntesis de giberelinas y la tasa de división celular, por lo tanto esto produce plantas más compactas y mejora la producción de yemas, flores y frutos (BECERRA, 1999).

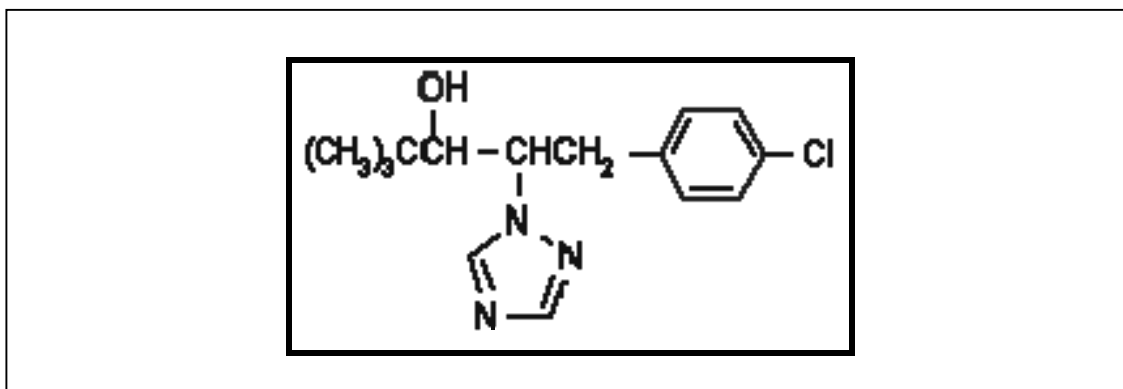


FIGURA 3 Estructura del paclobutrazol.

FUENTE SALISBURY y ROSS (1994).

2.6.1.1 Modo de acción. Se conoce como un regulador del crecimiento vegetal que actúa a través del xilema pasando por las hojas, tallos o raíces, para ser trasladadas a meristemas apicales; produce compactación de tallos y aumenta la floración y la fructificación, puesto que al inhibir la síntesis de las giberelinas, reduce en forma apreciable tanto la división celular, como el alargamiento de las células. Sus efectos están en relación directa con las dosis aplicadas (MARINO, 2004).

Se ha observado que este tipo de retardante promueve la formación de raíces adventicias de diferentes tipos de plantas, es decir, que la inhibición del efecto normal sobre el enraizamiento de las giberelinas endógenas es sustituido por la actividad de promoción radicular de las antigiberelinas retardantes (BLANCO, 2006).

2.7 Modificadores de la concentración osmótica

La limitación del crecimiento del cultivo por efecto de las características osmóticas del medio, posiblemente se debe a la reducción de la absorción de agua y de nutrientes. El cambio de la disponibilidad de fuentes de carbono

puede tener un marcado efecto sobre la tasa de crecimiento; si este cambio se realiza como un factor nutricional o como un factor osmótico (ROCA, 1985).

La sacarosa, es altamente metabolizable y actúa osmóticamente en concentraciones altas. Al utilizar agentes osmóticos más difícil de metabolizar, como el manitol y el sorbitol, se pueden tener resultados más efectivos que la sacarosa en la limitación del crecimiento de cultivos, tomando en cuenta que estas sustancias interactúan con el contenido de sacarosa y con la temperatura de conservación (ROCA y MROGINSKI , 1991).

2.7.1 Manitol. Es un edulcorante obtenido de la hidrogenación del azúcar manosa. Pertenece al grupo de edulcorantes denominado polioles o polialcoholes, es obtenido inicialmente a partir del fresno de maná (*Fraxinus ornus L., oleaceae*) y de algunas algas pardas, pero hoy día se obtiene por hidrólisis y reducción catalítica del almidón (ROSALES *et al.*, 2006). Su formula estructural se indica en la Figura 4.

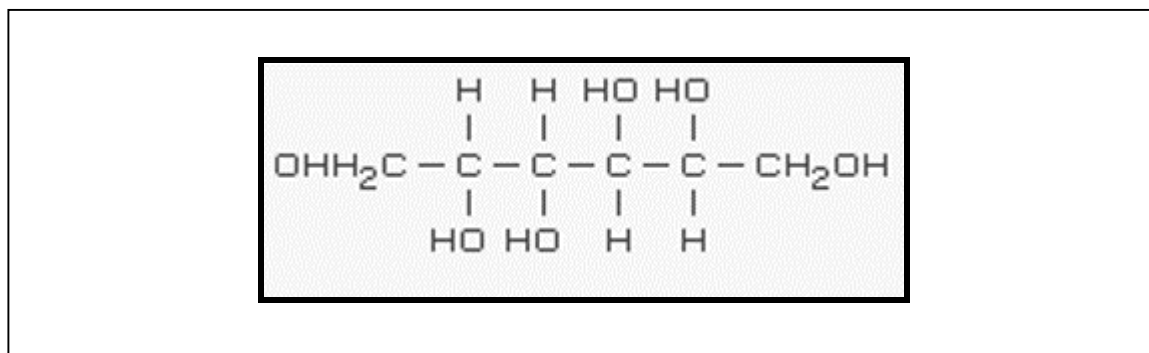


FIGURA 4 Estructura del manitol.
FUENTE SALISBURY y ROSS (1994).

2.7.1.1 Modo de Acción. El manitol es un azúcar no metabolizable, por lo tanto el mecanismo mediante el cual actúa es incrementando la presión osmótica del medio, reduciendo el crecimiento (Devlin 1986, citado por LEAL, 1990).

La concentración osmótica de un medio de cultivo influye sobre la tasa de división celular por ende en la morfogénesis de las células o tejidos. La presencia de manitol en el medio *in vitro* reduce la tasa de crecimiento (MARINO, 2004).

2.8 Factores ambientales que influyen en la conservación *in vitro*.

Los factores ambientales más importantes que influyen en los cultivos mantenidos *in vitro* son la luz y la temperatura. Con respecto a la humedad relativa, no es considerada de gran importancia (MURASHIGE, 1974), sin embargo SEEMANN (1993), señala que la humedad relativa debe fluctuar entre valores de un 70 - 80% ya que valores más bajos producen una desecación del medio de cultivo.

2.8.1 Influencia de la temperatura. La temperatura afecta la organogénesis, la mayoría de las especies necesitan entre 24 y 28°C, para su propagación (HARTMAN y KESTER, 1994). La reducción de la temperatura ha sido el recurso más utilizado para disminuir el crecimiento de los cultivos. La mayoría de los cultivos *in vitro* son mantenidos a temperaturas entre 20° C y 30° C; a temperaturas más bajas la tasa de crecimiento disminuye, pero esta reducción depende de la especie en cuestión (Whiters 1980, citado por ROCA y MROGINSKI, 1991). Por esta razón la reducción de temperatura ha sido un recurso comúnmente utilizado para disminuir el crecimiento de los cultivos mantenidos *in vitro* a largo plazo (CANIGGIA, 1997).

2.8.2 Efecto de la luz. En cultivos de tejidos *in vitro*, la luz es un factor importante en el desarrollo de brotes y raíces, por ello se debe considerar la intensidad lumínica, longitud del período de iluminación y calidad de la luz (MURASHIGE, 1974).

El espectro luminoso fotosintéticamente activo, corresponde a los máximos de emisión de luz entre los 440 y los 660 nanómetros, lo que equivale aproximadamente a la luz del día, por lo tanto una sala de incubación, debe proporcionar esta intensidad a través de tubos fluorescentes adecuados (SEEMANN, 1993). Bajas intensidades lumínicas dan origen a plántulas débiles con tallos delgados y un pequeño desarrollo foliar, debido a que la intensidad de la luz es la principal variable que afecta la fotosíntesis (Pennazio y Redolfi, citados por CANIGGIA, 1997).

2.9 Regulación del crecimiento en conservación de germoplasma.

KOSAK (2006) investigó el efecto de diversos reguladores de crecimiento *in vitro* de *Tibouchina urvilleana*, en el medio de Murashige y de Skoog (MS) suplidos con paclobutrazol, flurprimidol y CCC en distintas dosis. El resultado obtenido fue que los tres reguladores suprimieron perceptiblemente el crecimiento y promovieron la rizogénesis, con respecto al testigo. El tratamiento con paclobutrazol presentó la mayor reducción de la longitud, hinchazón de raíces e inhibición de alargamiento de raíz. Según (ROBERT *et al.*, 1991) con la utilización de paclobutrazol en el medio de cultivo, se obtiene como resultado una reducción en la vitrificación, un mejor funcionamiento de los estomas, un aumento en el espesor de las raíces y en el contenido de clorofila por hoja.

Con el objetivo de evaluar el efecto de tres retardantes de crecimiento sobre la regeneración *in vitro* de tres genotipos de ajo, ROSALES *et al.* (2006) utilizaron como agentes retardadores de crecimiento; ácido abscísico, manitol y frío no congelante 5° C; los resultados determinaron que los tratamientos con ácido abscísico y con frío, en general inducen valores bajos de crecimiento y presentan un bajo porcentaje de sobrevivencia que limita el desarrollo de la regeneración *in vitro*. Por otro lado, el manitol posee buenas características para retardar el crecimiento y en general ofreció un nivel de regeneración, comparable al testigo. Sin embargo, esta similitud con el testigo deriva que el

uso de retardantes no es necesario en plantas provenientes de un proceso de micropropagación, puesto que sin la adición de compuesto alguno, se puede realizar la conservación del material genético, al menos por un período de cuatro meses sin sufrir demasiados problemas en la regeneración.

Trabajos realizados por CONTRERAS *et al.* (1990), en mantención de germoplasma de *Solanum tuberosum in vitro*, en una sala con ambiente controlado a 25° C, fotoperíodo de 16 horas, y una temperatura de 12° C en el periodo oscuro (8 horas), con intensidad lumínica de 4000 lux, permitieron mantener el material en buenas condiciones hasta por tres meses en el mismo medio, antes de ser repicado a un medio fresco. LEAL (1990), realizó ensayos en la misma especie usando manitol en concentraciones de 30 y 60 mg/L, obteniendo una reducción notable en la altura de las plantas con respecto al testigo, dosis superiores a las mencionadas resultaron ser tóxicas para las plantas.

CANIGGIA (1997), mediante el uso de reguladores de crecimiento, determinó que es factible retardar en una gran cantidad los cultivares comerciales de papa cultivados *in vitro*, permitiendo reducir la frecuencia de los sub-cultivos a intervalos semestrales, asegurando un alto porcentaje de plántulas sobrevivientes después de 180 días.

ROBERT *et al.* (1991) utilizaron paclobutrazol en el medio de cultivo, obteniendo como resultado una reducción en la vitrificación, un mejor funcionamiento de los estomas, un aumento en el espesor de las raíces y en el contenido de clorofila por hoja.

3 MATERIAL Y MÉTODO

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile, con las especies *Lobelia bridgesii* y *Valdivia gayana*. Los ensayos se realizaron con cuatro biorreguladores de crecimiento, cada uno en diferentes concentraciones y ambientes.

3.1 Material vegetal.

Se obtuvieron plántulas desde el Banco de Germoplasma *in vitro* que mantiene la Universidad Austral de Chile, propagadas en un medio de crecimiento rápido, que demostraron tener buen crecimiento *in vitro*, con aproximadamente ocho semanas de cultivo.

3.2 Esterilización.

Los explantes se prepararon en una cámara de flujo laminar, dónde se manipularon con instrumentos de disección (bisturí, pinzas y tijeras) en un ambiente esterilizado con luz ultravioleta; la desinfección de los instrumentos utilizados fue mediante el uso de etanol 96% y posterior flameo.

La esterilización de los medios de cultivo fue realizada mediante calor húmedo en un autoclave con una presión de 1.2 atmósfera, donde la temperatura alcanza 121° C, durante un período de 15 minutos.

El material vegetal no fue sometido a ningún tipo de esterilización, ya que provenía de cultivo *in vitro*.

3.3 Medio de cultivo y biorreguladores.

El medio de cultivo base, se preparó en base a la formulación propuesta por MURASHIGE SKOOG (1962), conocido como medio MS, cuya composición nutritiva corresponde a las indicadas en el Anexo 1, suplementado con un determinado biorregulador y dosis (Cuadro 1)

Para cada biorregulador se aplicó una determinada dosis (mg/L) en el medio base, señalada en el Cuadro 1. Como gelificante se utilizó Gelrite (2g/L).

CUADRO 1 Dosis de biorreguladores de crecimiento utilizadas en el ensayo.

Biorregulador	Dosis (mg/L)			
	Testigo	1	2	3
Ácido abscísico (ABA)	0	10	20	30
Acido maleico (MAA)	0	1	2	2,5
Manitol * (MAN)	0	20	40	60
Paclobutrazol (PAC)	0	1	1,5	2

(*) Medio basal (MS) sin adición de sacarosa.

3.3.1 Siembra. La siembra se realizó en una cámara de flujo laminar, utilizando como explante, para *L. bridgesii* segmentos mononodales sin hoja, de aproximadamente 5 mm de longitud con una yema axilar, y para *V. gayana*, explantes multinodales Figura 5.

Cada explante se dispuso en frascos conteniendo 10 cc, los cuales se taparon con una lámina de aluminio y se rotularon con fecha de siembra, tratamiento y nombre de la especie.

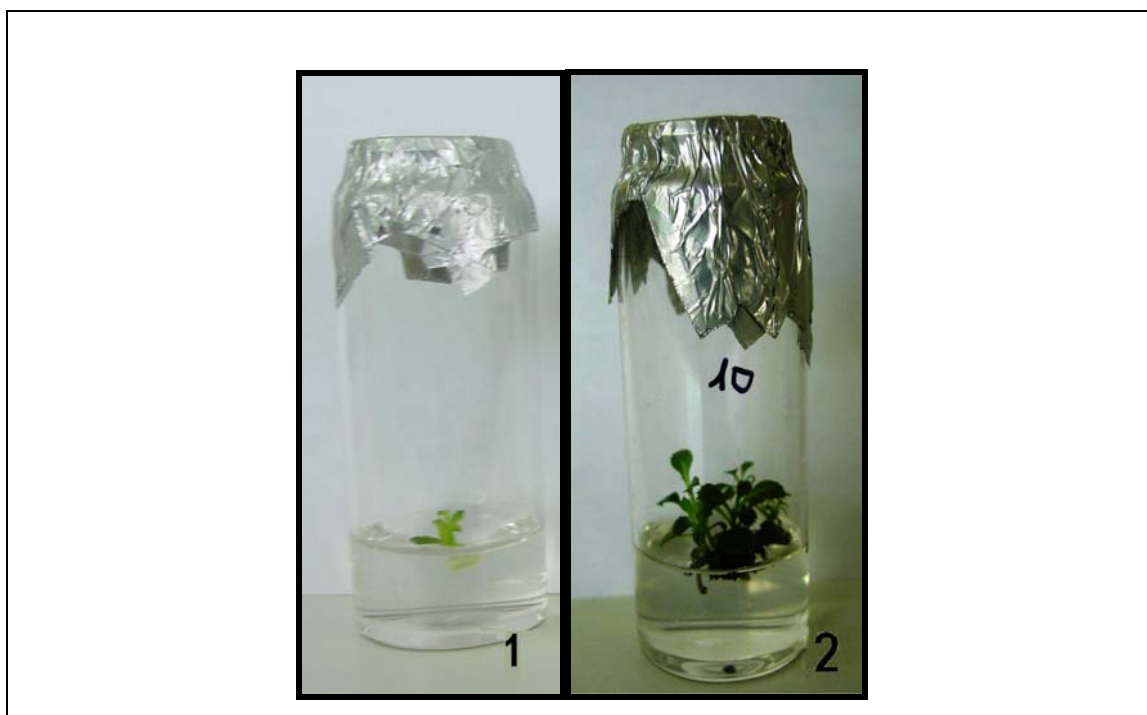


FIGURA 5 Segmento de explante, según especie. 1 “*Lobelia bridgesii*”,
2 “*Valdivia gayana*”.

3.4 Condiciones ambientales.

Los cultivos se mantuvieron en dos condiciones ambientales distintas.

- Ambiente A: en cámara de crecimiento con temperatura ambiente constante de 25° C, bajo un flujo luminoso entre 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos de fluorescentes, que corresponden a una intensidad luminosa de 4000 lux y un fotoperíodo controlado de 16 horas luz.
- Ambiente B: en cámara bioclimática con una temperatura ambiente de 8° C, bajo una intensidad luminosa entre 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo semi- controlado de 16 horas luz.

3.5 Evaluación. La evaluación se realizó a los 60, 120 y 180 días del inicio del ensayo, las variables evaluadas fueron las siguientes:

Para *Lobelia bridgesii*:

- Número de brotes,
- Longitud de brotes (cm),
- Número de raíces,
- Longitud de raíces (cm),
- Color, se elaboró una escala de apreciación (1-5) indicada en la Figura 6.
- Supervivencia (%).

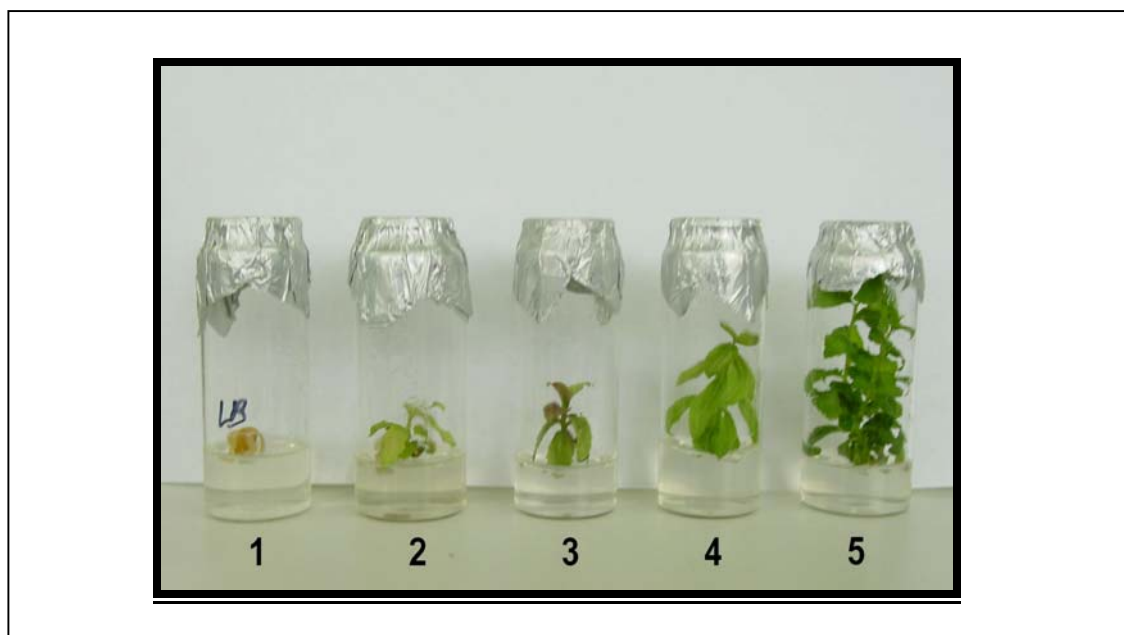


FIGURA 6 Escala de apreciación de color, para *L. bridgesii*, 1 Café; 2: Amarillo; 3: Verde amarillento; 4: Verde claro; 5: Verde Oscuro.

Para *V. gayana* las variables evaluadas fueron:

- Desarrollo del explante (Figura 7),
- Longitud de brotes (cm)
- Número de raíces,

- Longitud de raíces (cm),
- Color (Escala 1-5),
- Supervivencia (%).

Para registrar el desarrollo de explante y la coloración del follaje se elaboraron escalas de apreciación de acuerdo a la Figura 7 y 8, respectivamente. Las correspondientes escalas de apreciación son las siguientes:

Desarrollo de explante:

Escala	Número de brotes
1= explante inicial	>5 y ≤ de 10
2= pequeño desarrollo de explante	>10 y ≤ de 15
3= normal desarrollo de explante	>15 y ≤ de 20
4= Abundante desarrollo de explante	>20

Coloración de follaje:

1= Café;
2=Amarillo;
3=Verde amarillento;
4=Verde claro;
5= Verde oscuro.

La evaluación de estas variables, constituyó los resultados, que posteriormente fueron analizados estadísticamente y discutidos dentro del desarrollo de esta investigación.

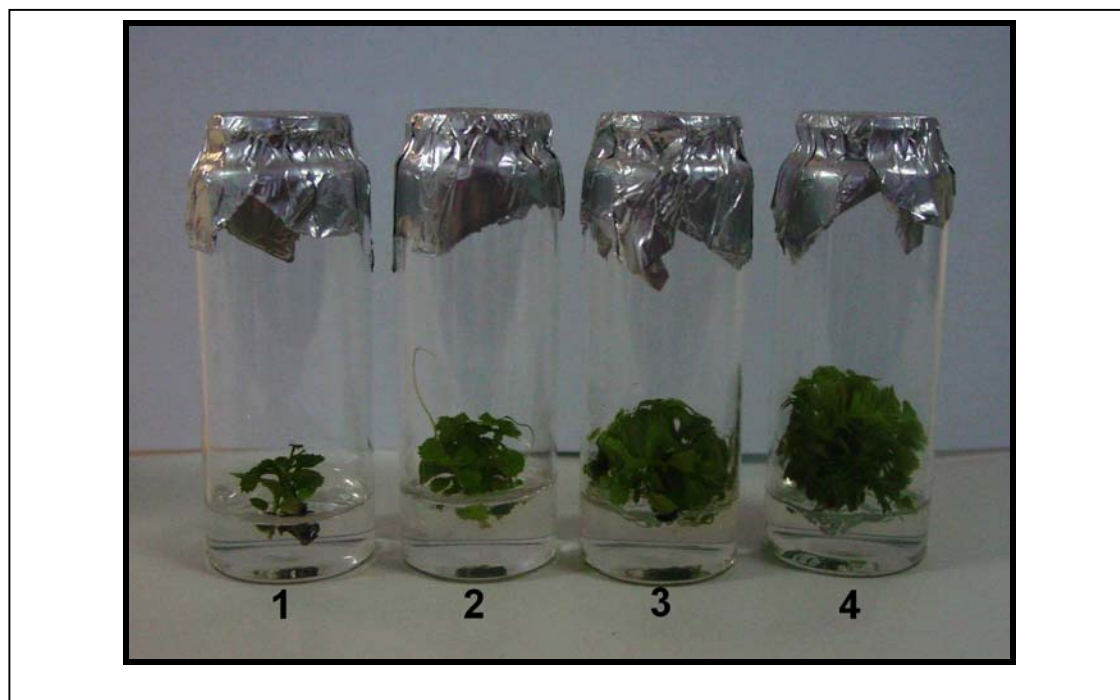


FIGURA 7 Escala de apreciación de desarrollo del explante (1- 4), para *Valdivia gayana*.

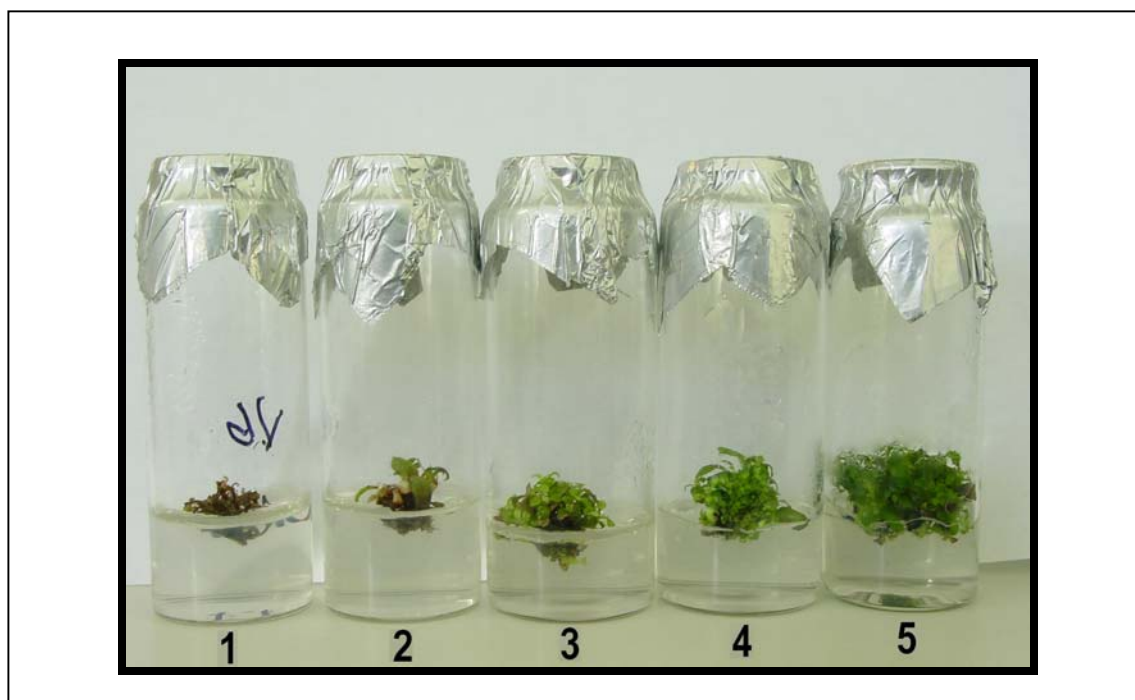


FIGURA 8 Escala de apreciación de color (1 – 5), para *Valdivia gayana*.

3.6 Duración de la investigación

La investigación tuvo una duración de 180 días, desde la siembra de explantes el día 7 de julio de 2007, a la última evaluación de variables el día 7 de enero 2008.

3.7 Diseño experimental y análisis estadístico.

El diseño experimental utilizado para evaluar los efectos observados por la aplicación de cuatro dosis de biorreguladores de crecimiento en distintos ambientes *in vitro*, fue un diseño factorial de dos factores, donde el primer factor fue la dosis (con cuatro niveles: 0, 1, 2 y 4) y el segundo factor el ambiente (con dos niveles: A y B), con 12 repeticiones por tratamiento.

La evaluación de la sobrevivencia en las especies se estableció en base a un diseño completamente al azar, con seis tratamientos, variables según la especie y 12 repeticiones.

CUADRO 2 Composición de los tratamientos según la especie, para la evaluación de sobrevivencia.

Tratamiento	Especies	
	<i>L. bridgesii</i>	<i>V. gayana</i>
T1	MS, completo	MS, completo
T2	MS, sin sacarosa	MS, sin sacarosa
T3	MS, 20 mg/L ácido abscísico	MS, 10 mg/L ácido abscísico
T4	MS, 2,5 mg/L ácido maleico	MS, 2 mg/L ácido maleico
T5	MS, 60 mg/L manitol	MS, 60 mg/L manitol
T6	MS, 1,5 mg/L paclobutrazol	MS, 1,5 mg/L paclobutrazol

Una vez obtenidos los datos, se procedió a comprobar si estos cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, luego las variables evaluadas fueron sometidas a un análisis de varianza ANDEVA (95% de confianza) para las variables continuas como, longitud tallo, longitud raíz, sobrevivencia.

La significación de las diferencias entre promedios de los tratamientos se estimó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, con un nivel de probabilidad del 5%.

Para las variables discretas como de color de follaje, desarrollo de explante y número de tallos y raíces, que no cumplen con los supuestos para realizar un análisis de varianza, se procedió a utilizar una estadística no paramétrica usando la prueba de Kruskal–Wallis, y las comparaciones múltiples de Dunn, con un nivel de probabilidad del 5%.

Las variables de sobrevivencia se evaluaron en porcentaje (%) y se transformaron de acuerdo a la fórmula de Bliss ($\text{Arcoseno}\sqrt{\%}$), para normalizarla. Se utilizaron para el análisis de datos los programas estadísticos: STATGRAPHICS 2.0 y GRAPHPAD PRISM 5.01.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de esta investigación son presentados en forma individual para cada especie, ya que cada una difiere de la otra en su fisiología.

Las variables de crecimiento evaluadas en las dos especies fueron distintas debido a que en *Lobelia bridgesii* se utilizó explantes mononodales, donde se evaluó número y longitud de tallos y en la especie *Valdivia gayana* se utilizó explantes multinodales, donde se evaluó a través de rangos de desarrollo y longitud del explante.

Cabe destacar que en ambas especies, las plántulas no manifestaron formación de callo y vitrificación. Según bibliografía revisada existen factores que pueden predisponer al material cultivado *in vitro* a estos fenómenos como: alta humedad relativa, factores del medio de cultivo (minerales, carbohidratos y reguladores de crecimiento) y bajas intensidades luminosas; estas condiciones producen un desorden anatómico y fisiológico en los explantes, de modo que las plántulas presentan un aspecto traslucido y succulento en sus hojas (Ziv 1980, citado por CANIGGIA, 1997), situaciones que en esta investigación no se presentaron. Existió una morfogénesis directa, ya que la formación de tallos y raíces se produjo directamente del explante.

4.1 Efectos de biorreguladores de crecimiento y ambientes de cultivo *in vitro*, en las especies *L. bridgesii* y *V. gayana*.

Se analizó el efecto de la aplicación de cuatro dosis de biorreguladores de crecimiento en ambientes distintos y la interacción de estos, con el fin de determinar combinaciones óptimas que permitan una disminución del crecimiento para la conservación a mediano plazo de germoplasma *in vitro*.

4.1.1 Ácido abscísico. Los resultados obtenidos en *Lobelia bridgesii*, son presentados en el Cuadro 3.

CUADRO 3 Efecto de cuatro dosis de ácido abscísico en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Lobelia bridgesii*.

Niveles	Nº de tallos	Long. de tallos (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
Dosis ácido abscísico (ABA) (mg/L)					
0	1,3	3,1 b*	1,1 **	1,4 a *	4,5 **
10	0,9	0,5 a	0,0	0,0 b	2,3
20	0,7	0,3 a	0,0	0,0 b	2,1
30	0,8	0,2 a	0,0	0,0 b	2,3
Significancia	n.s	0,2		0,1	
Condiciones Ambientales					
Ambiente A	0,7	1,4 b	0,6 **	0,1 b	2,8
Ambiente B	1,1	0,6 a	0,0	0,0 a	2,8
Significancia	n.s	0,1		0,07	n.s

(*) Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**) En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

De los resultados obtenidos (Cuadro 3), se puede apreciar que se presentan diferencias significativas con la aplicación de distintas dosis ácido abscísico, las que arrojaron valores inferiores al testigo, en longitud de tallo y en la inhibición de rizogénesis. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por LEAL (1990), quien usó biorreguladores de crecimiento en la conservación de germoplasma chileno de papa (*Solanum tuberosum spp. tuberosum*), donde la altura de las plántulas se vio afectada por el uso de ácido abscísico y la formación radical se inhibió en todas las dosis. Por otra parte CANIGGIA (1997), estudió la conservación *in vitro* de cultivares de la misma especie, obteniendo resultados similares.

En la variable número de tallos no existieron diferencias significativas según la dosis ni el ambiente. SOLIS (1993), explica que en cultivo *in vitro* el número de tallos adventicios se forman directamente de los explantes, o bien se originan desde un callo, esto explicaría que en *L. bridgesii* no existieron diferencias en número de tallos al no presentar formación de callo.

La variable color del explante, tal como se mencionó en la metodología del trabajo, fue evaluado de acuerdo a una escala de apreciación (Figura 6), donde se refleja característicamente la coloración del follaje. Los resultados en cuanto a las dosis aplicadas advirtieron diferencias significativas entre los tratamientos (Dunn 5%). El tratamiento que obtuvo la mejor coloración en el follaje una vez finalizado el periodo de conservación (180 días) fue el testigo, sin aplicación de ácido abscísico, presentando un color verde intenso, sin embargo los explantes tratados con: 10, 20 y 30 mg/L de ácido abscísico presentaron un color desde el verde amarillento a amarillo. En cambio, al evaluar las condiciones ambientales a las cuales fueron expuestos los explantes presentaron una coloración verde amarillento y no existieron diferencias significativas. Trabajando con papas CANIGGIA (1997), evaluó la coloración del follaje a los 180 días y observó que los cultivares tratados con

ácido abscísico presentaron una clorosis foliar generalizada y algunas completamente senescentes, como así también lo observó LEAL (1990). La coloración del follaje es una variable de evaluación relativa, en cultivos *in vitro* cuando experimentalmente el material vegetal es escaso y existe presencia de tejidos cloróticos, el cambio a un medio de cultivo con presencia de promotores de crecimiento, provoca un crecimiento rápido y estimula una coloración verde en los tejidos SEEMANN (2008).¹

En cuanto al efecto de las condiciones ambientales, sobre las variables evaluadas, se puede observar que los mejores resultados que responden al objetivo de este trabajo, se obtuvieron en el ambiente proporcionado por una cámara bioclimática (ambiente B) con temperaturas de 8°C e intensidad luminosa de 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, donde se produjo menor longitud de brote e inhibición de rizogénesis. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por SALGADO (2006), en cuyo estudio expusieron orquídeas mexicanas a condiciones similares al ambiente B, obteniendo los mejores resultados para la conservación de la especie durante 12 meses. Por lo tanto, estas condiciones ambientales podrían permitir fácilmente conservar las plántulas bajo excelentes condiciones de incubación *in vitro* incluso por un periodo superior a los seis meses.

En una situación general hubo una reducción de crecimiento en los explantes, lo que denota de alguna manera, la acción de este biorregulador que inhibe el crecimiento de todas las partes de la planta e impide los efectos estimulantes de las hormonas de crecimiento (MILBORROW, 1974). Además, al aumentar la dosis de ABA sobre los 10 mg/L, se encontraron los mejores resultados en la inhibición del crecimiento, por lo que su aplicación en dosis superiores a estas se ven justificadas en esta especie. Como SALISBURY y

¹ SEEMANN, P (2008) Ing. Agr., Dr. rer. hort. Universidad Austral de Chile. Comunicación personal.

ROSS (1994), señala que el ácido abscísico es considerado un inhibidor de crecimiento, además ELIAS (2001), agrega que la acción de este inhibidor depende de la concentración endógena en la planta, y de la sensibilidad de las células ante niveles diferenciales del mismo.

A continuación, se presentan los resultados de la interacción de dosis de ácido abscísico por condiciones ambientales obtenidos en *Lobelia bridgesii*.

CUADRO 4 Efecto de cuatro dosis de ácido abscísico en dos tipos de ambientes de cultivo *in vitro* en *Lobelia bridgesii*.

Niveles	Nº de tallos	Long. de tallos (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
0xA	1,3	4,4 c *	2,3 **	2,8 b*	4,2 **
10xA	0,8	0,5 a	0,0	0,0 a	2,5
20xA	0,3	0,2 a	0,0	0,0 a	2,2
30xA	0,6	0,6 a	0,0	0,0 a	2,4
0xB	1,3	1,8 b	0,0	0,0 a	4,9
10xB	1,5	0,2 a	0,0	0,0 a	2,1
20xB	1,1	0,1 a	0,0	0,0 a	2,0
30xB	1,0	0,4 a	0,0	0,0 a	2,1
Significancia	n.s	0,9		0,9	

(*) Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**) En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

De los resultados expuestos en el Cuadro 4 y de su posterior análisis, en las interacciones dosis de ácido abscísico y condiciones ambientales, se aprecian diferencias estadísticamente significativas en longitud de tallos, número de raíces, longitud de raíces y color.

La longitud de tallos, se mostró notablemente afectada con la aplicación de ácido abscísico en el medio. Al respecto WEAVER (1976), menciona que los grados de crecimiento de las plantas son afectados cuando las especies no se encuentran con las condiciones ambientales o nutritivas óptimas para su crecimiento, o bien por la presencia de fitohormonas en los medios de crecimiento, que en ocasiones pueden estar actuando como inhibidores en el crecimiento de las plántulas. Sin embargo, en el Cuadro 4, se destaca que las plántulas tratadas testigo, fueron las que presentaron una mayor altura, respecto a los otros tratamientos, fundamentalmente a que el medio basal de crecimiento en que se encontraban, no incluyó ácido abscísico, presentando de este modo un crecimiento normal dentro de los frascos de cultivo. El efecto inhibitorio del crecimiento de plántulas *in vitro* que posee este biorregulador fue comprobado también por LEAL (1990) y CANNIGIA (1997).

Se observa que el testigo 0, en el ambiente A (0xA), mostró desarrollo de raíces y no los demás tratamientos. Esto se debió a las condiciones ambientales, ya que el testigo 0, en el ambiente B (0xB); y los demás tratamientos con ABA que fueron expuestos en cámara bioclimática con temperatura aproximada de 8° C, bajo una intensidad lumínica de 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, presentaron una inhibición total del desarrollo radicular. Bajas temperaturas y aplicación de ácido abscísico fueron estudiadas para retardar el crecimiento *in vitro* en *Allium sativum*, donde se vió totalmente restringido el desarrollo de raicillas (ROSALES, 2006).

A través de la aplicación combinada de estos tratamientos los resultados obtenidos confirman la acción inhibitoria del crecimiento del ácido abscísico, al presentar menor longitud de tallos, inhibición del desarrollo radicular, con respecto al testigo 0, en las dos condiciones ambientales otorgadas.

Esto señala lo positivo de la aplicación combinada de estos tratamientos, en condiciones ambientales de temperatura 25°C e intensidad luminosa entre 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Ambiente A), se justifica el uso de ácido abscísico en una dosis de 20 mg/L, al igual que en condiciones de temperaturas más bajas de 8 °C e intensidad luminosa entre 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (ambiente B), con esta dosis la longitud de tallo fue menor y no hubo desarrollo de raíces.

En el Cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos en la aplicación de ácido abscísico, en *Valdivia gayana*.

CUADRO 5 Efecto de cuatro dosis de ácido abscísico y de dos tipos de ambientes *in vitro* en *Valdivia gayana*.

Niveles	Desarrollo de explante (1 - 4)	Longitud de tallo (cm)	Color (1-5)
Dosis ácido abscísico (ABA) (mg/L)			
0	1,6	1,1 b*	4,7 **
10	1,2	0,8 a	2,4
20	1,6	1,2 b	3,4
30	1,5	1,1 b	2,4
Significancia	n.s	0,2	
Condiciones Ambientales			
Ambiente A	1,7	1,4 b	3,3
Ambiente B	1,2	0,7 a	2,6
Significancia	n.s	0,6	n.s

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

El desarrollo de explante fue evaluado de acuerdo a escalas de apreciación que reflejan características de vigor y cantidad de brotes desarrollados por el explante inicial, donde los tratamientos no presentaron diferencias significativas según la dosis y las condiciones ambientales

suministradas. Todos los explantes presentaron un pequeño desarrollo de brotes, aunque en algunos niveles se observan diferencias numéricas, estas no fueron importantes. La respuesta estuvo determinada exclusivamente por la capacidad de los tejidos vegetales de desarrollarse bajo las condiciones ambientales proporcionadas (MURASHIGE, 1974). Si bien las dos especies estudiadas en este ensayo, no son comparables ya que difieren en su fisiología, se obtuvieron similares resultados al evaluar el desarrollo del brote en *Lobelia bridgesii*.

La longitud del tallo con la aplicación de 10 mg/L de ABA, presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo 0 y las dosis 20 y 30 mg/L de ABA. Según las condiciones ambientales de incubación las plántulas conservadas en el ambiente B, presentaron menor altura y el aspecto general de las plántulas fue vigoroso.

Existen diferencias significativas entre la dosis testigo y las demás dosis, en cuanto al color. El testigo se tornó un color verde oscuro y las demás dosis tratadas con ácido abscísico mostraron un verde menos intenso a los 180 días. Al comparar entre ambientes, no se presentaron diferencias significativas, tomando como por general un color verde amarillento.

No hubo desarrollo radical en ningún tratamiento, concordando con RODRIGUEZ (1997), quien también estudió *in vitro* de esta especie nativa en peligro de extinción. Zeevaart y Creelman 1988, citados por CANIGGIA (1997) señalan que los efectos del ácido abscísico en el crecimiento radical son contradictorios, ya que el ABA exógeno puede inhibir su crecimiento, como también promoverlo, lo cual dependerá exclusivamente de los genotipos y las dosis empleadas. Sin embargo, en esta especie tampoco existió desarrollo radical en el testigo 0, sin dosis de ABA, lo que confirma lo observado por

RODRIGUEZ (1997) en relación a la baja capacidad rizogénica de *Valdivia gayana*.

Después de analizados los efectos individuales de los tratamientos es preciso establecer la acción combinada de las dosis aplicadas y las condiciones ambientales que se les proporcionó a los explantes, los que entregan una más amplia posibilidad de respuestas a los tratamientos aplicados (Cuadro 6).

CUADRO 6 Efecto de la interacción de cuatro dosis de ácido abscísico en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Valdivia gayana*.

Niveles	Desarrollo de explante (1 – 4)	Longitud del tallo (cm)	Color (1 - 5)
0xA	1,7 **	1,3 b *	4,3 **
10xA	1,3	0,9 a	3,1
20xA	2,0	1,6 b	2,6
30xA	2,0	1,7 b	3,4
0xB	1,5	0,8 a	4,8
10xB	1,1	0,8 a	2,5
20xB	1,1	0,7 a	2,1
30xB	1,0	0,6 a	3,4
Significancia		0,1	

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

Los resultados obtenidos en la especie *V. gayana*, en la interacción dosis de ácido abscísico por condiciones ambientales presentaron diferencias significativas en todas las variables evaluadas.

Las plántulas incubadas a 8°C y un flujo luminoso entre 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Ambiente B) con la aplicación de ABA presentaron menor desarrollo del explante y longitud de tallo, junto con el tratamiento con aplicación de 10 mg/L de ABA, incubadas a 25° C y 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (ambiente A). Según la escala de desarrollo de explante, bajo estas condiciones el número de brotes superó muy poco al explante inicial que contenía entre 5 y 10 brotes y la longitud de tallo no fue mayor a un centímetro.

El color del explante presentó diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento testigo conservó un color verde oscuro en los dos ambientes; igualmente RODRIGUEZ (1997) obtuvo un color verde intenso, al cultivar *V. gayana* en el medio MS. En cambio, en los tratamientos donde se aplicó ácido abscísico, los explantes se tornaron de color verde amarillento de menor intensidad, esta situación coincide con LEAL (1990) y CANNIGIA (1997), que utilizaron ABA en *Solanum tuberosum*, donde los explantes se tomaron una coloración amarilla casi clorótica.

4.2.2 Ácido Maleico Los resultados obtenidos con este biorregulador, en los distintos tratamientos aplicados a los explantes y posterior evaluación de las variables son presentadas en los Cuadros 7 y 9, para los efectos individuales y en los Cuadros 8 y 10, para las interacciones que se producen entre los tratamientos, para cada especie del ensayo.

CUADRO 7 Efecto de cuatro dosis de ácido maleico en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Lobelia bridgesii*.

Niveles	Nº de tallos	Long. de tallos (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
Dosis ácido maleico (mg/L)					
0	1,5 **	3,7 b*	0,5 **	0,5 b*	4,3
1	1,3	1,4 a	0,4	0,5 b	4,1
2	1,0	1,2 a	0,0	0,0 a	3,5
2,5	1,0	0,8 a	0,0	0,0 a	2,9
Significancia		0,2		1,0	n.s
Condiciones Ambientales					
Ambiente A	1,2	2,6 b	0,4 **	0,5 b	3,6 **
Ambiente B	1,1	1,0 a	0,0	0,0 a	3,8
Significancia	n.s	0,1		0,7	

(*) Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**) En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

Los resultados (Cuadro 7), evidencian el efecto de las dosis crecientes de ácido maleico aplicadas en esta especie e indican que en dosis 2 y 2,5 mg/L, produjeron una disminución del crecimiento traducido en el número y longitud de tallos.

El ácido maleico es un retardante de crecimiento derivado de un carbamato NH_4 , paraliza la división y el alargamiento de las células meristemáticas subapicales e intercalares de los eje caulinares, regulando la altura de las plantas (Sivori 1980, citado por CANIGGIA, 1997), lo que explicaría el fenómeno ocurrido. KOSAK (2006), señala que las plantas tratadas con retardantes no son suprimidas en su crecimiento, sino que afectan el grado

de desarrollo y vigor de las plantas, no existiendo una correlación entre la especie y la respuesta de las plantas a un compuesto particular.

La apariencia de las plántulas bajo las dos condiciones ambientales de incubación puede ser observada claramente en la Figura 9. Se observa que las plántulas conservadas dentro de una cámara bioclimática (ambiente B) presentaron menor longitud de tallo, inhibición de rizogénesis y una coloración más verdosa. Estos resultados indican que la aplicación de temperaturas más elevadas (25°C) y una luminosidad entre 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (ambiente A), favorece el crecimiento de los explantes.



FIGURA 9 Aspecto morfológico de plántulas de *Lobelia bridgesii*, con la aplicación de ácido maleico en distintos ambientes de incubación *in vitro*.

El efecto combinado de los tratamientos aplicados en *Lobelia bridgesii*, se presenta en el Cuadro 8.

CUADRO 8 Efecto de la interacción entre cuatro dosis de ácido maleico y dos tipos de ambientes *in vitro* en el desarrollo vegetal y color en *Lobelia bridgesii*.

Niveles	Nº de tallos	Long. de tallos (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
0 x A	1,3	5,2 d *	0,9 **	1,2 b	4,3 **
1 x A	1,5	2,1 c	0,8	1,0 b	4,2
2 x A	1,0	1,5 bc	0,0	0,0 a	3,5
2.5 x A	1,0	1,3 bc	0,0	0,0 a	2,5
0 x B	1,6	1,9 c	0,0	0,0 a	4,3
1 x B	1,0	0,8 ab	0,0	0,0 a	4,1
2 x B	1,0	0,9 ab	0,0	0,0 a	3,4
2.5 x B	1,0	0,3 a	0,0	0,0 a	3,3
Significancia	n.s	0,8		0,04	

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

En primer lugar se puede apreciar, que no existieron diferencias significativas en el número de tallos y en la variable longitud de tallos, la aplicación de ácido maleico en todas las dosis (1, 2 y 2.5 mg/L), en el ambiente B se obtuvo un menor crecimiento de los explantes; como también existió una inhibición total de rizogénesis al exponer los explantes en el ambiente de cámara bioclimática. Esto se contrapone al estudio de BLANCO (2006), donde el tratamiento con temperaturas mas bajas en *Lapageria rosea*, no marcó diferencia en brotación ni en la elongación radicular con respecto al testigo que creció en condiciones normales de temperatura. Cabe señalar que los tratamientos en los que se observó desarrollo radical (testigo 0 y dosis 1mg/L, en el ambiente A), presentaron sus raíces débiles, poco numerosas y cortas.

Los tratamientos que según la escala de evaluación obtuvieron una coloración más cercana al verde fueron los tratamientos testigos y las dosis más bajas de ácido maleico (1mg/L) en los dos ambientes, existiendo diferencias significativas con respecto a las dosis más altas de este compuesto, lo que se contrapone con un mayor crecimiento en longitud de tallo.

Así en *Lobelia bridgesii* se obtuvieron los mejores resultados en la dosis 2,5 mg/L de ácido maleico en el ambiente de temperaturas 8°C y entre 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, donde se produjo una mayor disminución del crecimiento, inhibición de rizogénesis y una coloración verde normal, equivalente a nivel 4 en la escala de evaluación.

CUADRO 9 Efecto de cuatro dosis de ácido maleico y de dos tipos de ambientes en el desarrollo, longitud de tallo y color de los explantes de *Valdivia gayana*.

Niveles	Desarrollo de explante (1 – 4)	Longitud de tallo (cm)	Color (1 – 5)
Dosis ácido maleico (mg/L)			
0	2,0 **	1,4 b *	4,0 **
1	1,8	1,3 b	3,8
2	1,5	1,0 a	3,5
2,5	1,3	0,9 a	2,3
Significancia		0,07	
Condiciones Ambientales			
Ambiente A	2,1 **	1,5 b	4,2 **
Ambiente B	1,1	0,7 a	4,8
Significancia		0,05	

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

En *Valdivia gayana* existieron diferencias significativas en el desarrollo del explante y longitud de tallo entre dosis testigo 0 y 1 mg/L de MAA y las dosis 2 y 2,5 mg/L, que presentaron menor número de brotes y altura (Cuadro 9).

En esta especie la coloración de follaje se vio afectada con la aplicación de 2,5 mg/L de MAA, mostrando clorosis en las plántulas, con diferencias significativas con el testigo 0, que presentó una coloración verde más oscuro. Las condiciones ambientales de incubación de ambiente B, con una cámara bioclimática con temperaturas menores y menor intensidad luminosa, que el ambiente A, mostró diferencias significativas en todas las variables evaluadas (Figura 10).

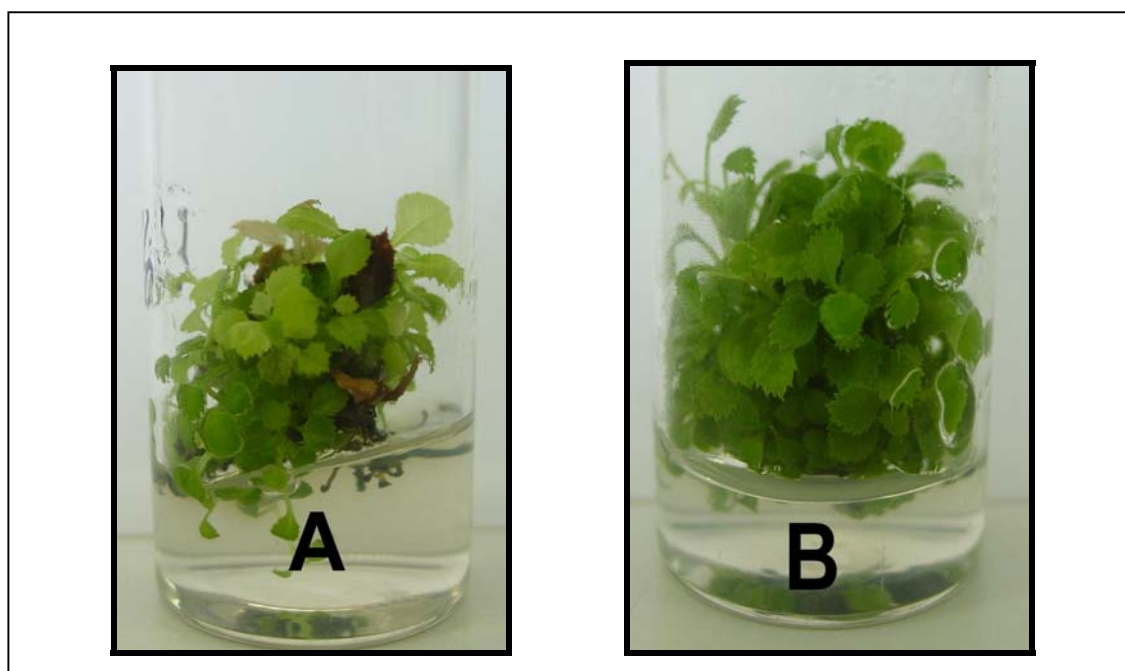


FIGURA 10 Aspecto morfológico de plántulas de *Valdivia gayana*, con la aplicación de ácido maleico en distintos ambientes de incubación *in vitro*.

En ningún tratamiento se observó desarrollo radical; al respecto CANIGGIA (1997), señala que existe una correlación positiva entre la intensidad de luz y la formación del sistema radical en papas, a la vez cuando existen bajas temperaturas se reduce el crecimiento de las plantas sumado a la baja intensidad luminosa daría origen a plántulas débiles. Se observa en la Figura 10, el aspecto morfológico de los explantes de *Valdivia gayana*, conservados *in vitro* en distintos sistemas de incubación, donde en el ambiente B, hubo un menor desarrollo y longitud del explante y una coloración más verdosa. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por CANIGGIA (1997), donde bajas temperaturas (8° C) y una intensidad luminosa de 1600 lux, presentaron menor crecimiento, altura y una coloración verde más intensa del explante. Siendo estas características óptimas para la conservación a mediano plazo de germoplasma *in vitro*.

Para *V.gayana*, los resultados de la interacción dosis de ácido maleico por condiciones ambientales, sobre el desarrollo del explante y color (Cuadro 10), se aprecia que en el ambiente B, se obtiene los mejores resultados para su conservación a mediano plazo, donde la aplicación de distintas dosis de ácido maleico no se justifica, ya que no existen diferencias con respecto al testigo en el ambiente B en el desarrollo del explante. Además, se obtuvo un color verde intenso dentro de la escala de evaluación. ROSALES *et al.* (2006) no encontraron razón para emplear tratamientos de conservación *in vitro* a las plantas de ajo, puesto que la evidencia estadística indicó que el tratamiento testigo (sin agentes retardantes), sometido a frío no congelante (5° C) produce resultados tan buenos o mejores para la conservación que aquellas plantas sujetas a agentes retardantes.

CUADRO 10 Efecto de la interacción entre cuatro dosis de ácido maleico en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Valdivia gayana*.

Niveles	Desarrollo de explante (1 – 4)	Longitud de tallo (cm)	Color (1 - 5)
0 x A	2,8 **	2,0 f *	4,3 **
1 x A	2,2	1,7 e	3,1
2 x A	2,0	1,4 de	2,8
2.5 x A	1,6	1,2 cd	2,8
0 x B	1,2	0,9 b	5,0
1 x B	1,4	1,0 bc	4,0
2 x B	1,0	0,6 a	3,4
2.5 x B	1,0	0,7 ab	2,9
Significancia		0,1	

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

Existe una respuesta distinta a la conservación según el material genético del que se trate (ROSALES *et al.*, 2006) y (HARTMAN y KESTER, 1994). Si bien en *Valdivia gayana*, no se justifica el uso de ácido maleico, al someter las plántulas a las condiciones proporcionadas por una cámara bioclimática (ambiente B), en *Lobelia bridgesii* los resultados estadísticos justifican la aplicación de este compuesto para reducir el crecimiento y conservar material genético *in vitro*.

4.2.3 Manitol. Se debe mencionar, que la composición del medio basal de los tratamientos con manitol, se realizó a través de formulación de MURASHIGE y SKOOG (1962), sin adición de sacarosa.

Los resultados obtenidos con este biorregulador, en los distintos tratamientos aplicados a los explantes y posterior evaluación de las variables son presentados en los Cuadros 11 y 13, para los efectos individuales y en los Cuadros 12 y 14, para las interacciones que se producen entre los tratamientos, para cada especie del ensayo.

CUADRO 11 Efecto de cuatro dosis de manitol en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Lobelia bridgesii*.

Niveles	Nº de tallos	Long. de tallos (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
Dosis manitol (MAN) (mg/L)					
0	0,8 **	2,2 a*	0,0 **	0,0 a *	2,2 **
20	1,3	3,6 b	0,6	0,8 b	4,3
40	1,2	3,4 b	0,3	0,7 b	3,8
60	1,3	2,9 ab	0,1	0,6 b	3,8
Significancia		0,3		0,15	
Condiciones ambientales					
Ambiente A	1,4 **	5,0 b	0,7	1,1	3,4
Ambiente B	0,8	1,0 a	0,0	0,0	3,6
Significancia		0,2	n.s	n.s	n.s

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

En el Cuadro 11, se observa que el testigo presentó diferencias significativas con respecto a las distintas dosis de este compuesto en número de tallos y hubo inhibición de rizogénesis. Estos resultados concuerdan a lo definido por ROCA (1985), quien señala que la ausencia de sacarosa en el medio, produce una inhibición del crecimiento de los tejidos *in vitro*, pero los explantes crecen en un ambiente desequilibrado desde el punto de vista

nutritivo, al no existir una fuente de carbono en el medio. También los resultados obtenidos se pueden respaldar en la información entregada por SEEMANN (1993), quien afirma que para que exista inducción de brotes, la concentración de sacarosa ideal en un medio fluctúa entre 20 y 30 g/L.

En la coloración de follaje se advierten diferencias significativas (DUNN 5%), entre el testigo y los tratamientos con la aplicación de manitol. Los explantes obtuvieron coloración verde en las dosis 20, 40 y 60 mg/L, sin embargo la dosis 0, sin presencia de sacarosa presentaron claros signos de clorosis en el tejido. De acuerdo a esto se puede destacar que la coloración de las hojas más que evidenciar una fotosíntesis activa en las plántulas, indica cierta respuesta del explante al medio de cultivo y a las condiciones ambientales al que se sometió, ya que las plántulas cultivadas *in vitro*, son heterotróficas, y presentan una baja actividad del aparato fotosintético y nula actividad de enzimas fotosintéticas (SEEMANN, 1985). La ausencia de sacarosa en el medio produce un cambio en la concentración osmótica, condición no favorable para la planta. Al cambiar la fuente hidrocarbonada (sacarosa) y adicionar manitol el medio adquiere una concentración osmótica alta y se reduce la tasa de crecimiento de las plantas (ROCA, 1985).

Según las condiciones ambientales los efectos del flujo luminoso y la temperatura más baja provocaron diferencias significativas en el número y longitud de tallo que en el ambiente A, con mayor luminosidad y temperatura mayor. Tendencia similar se observó en un ensayo realizado por ESPINOZA *et al.* (1992), en que expusieron explantes de *Solanum tuberosum*, en un medio de conservación *in vitro* que contenía un polialcohol, a una temperatura de 8°C, donde se redujo significativamente el crecimiento de las plántulas.

Según las condiciones ambientales, el ambiente B, en cámara bioclimática a 8°C, bajo una intensidad luminosa de 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un

fotoperíodo semicontrolado de 16 horas luz, existen diferencias significativas en el número y longitud de tallo con respecto al ambiente, A en cámara de crecimiento con temperatura a 25° C, bajo un flujo luminoso de 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo controlado de 16 horas luz). No se observaron diferencias significativas en el número de raíces, longitud de raíces y color según el ambiente otorgado a las plántulas en el ensayo.

Los resultados de este ensayo fueron contrarias respecto a lo señalado por LEAL (1990), quien evidenció que manitol produjo plántulas de *Solanum tuberosum*, de aspecto aéreo frágil, entrenudos largos y de color verde claro casi clorótico. CANIGGIA (1997) en la misma especie al emplear de manitol en el medio de cultivo MS obtuvo el mejor grado de coloración en el follaje de las plántulas con respecto al testigo que presentó clorosis total, después de un periodo de conservación de 180 días.

Los resultados radican que la presencia de manitol en distintas dosis, en el medio de cultivo MS y en ausencia de sacarosa, no reduce el crecimiento del explante, promueve la formación de raíces y proporciona una coloración más verde, al ser comparada con el tratamiento testigo sin presencia de manitol y sacarosa.

Según las condiciones ambientales otorgadas las plántulas incubadas, presentaron diferencias significativas en las variables número y longitud de tallos, siendo menores en el ambiente B, ya que a temperaturas más bajas, la tasa de crecimiento disminuye, por esta razón la reducción de la temperatura ha sido un recurso comúnmente utilizado para disminuir el crecimiento de los cultivos mantenidos *in vitro* a largo plazo (ROCA, 1985).

En el Cuadro 12 se presentan las respuestas alcanzadas por las plántulas al evaluar la interacción de cuatro dosis de manitol y de dos tipos de ambientes.

CUADRO 12 Efecto de la interacción de cuatro dosis de manitol en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Lobelia bridgesii*

Niveles	Nº de tallos	Long. de tallos (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
0 x A	1,4 **	4,4 c *	0,1 **	0,1	3,3 **
20 x A	1,5	5,9 d	1,2	1,6	3,8
40 x A	1,3	4,9 cd	0,6	1,4	3,2
60 x A	1,4	4,8 cd	1,0	1,2	3,5
0 x B	0,1	0,5 a	0,0	0,0	1,0
20 x B	1,1	1,2 ab	0,0	0,0	4,8
40 x B	1,0	1,9 b	0,0	0,0	4,4
60 x B	1,1	0,9 ab	0,0	0,0	4,0
Significancia		0,4		n.s	

(*) Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**) En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

En el Cuadro 12 se puede ver que los explantes sometidos a dosis de manitol en el medio MS sin adición de sacarosa y en ambiente de baja temperatura y menor luminosidad (ambiente B), presentaron mayor crecimiento y mejor color con respecto al testigo 0, que presentó menor crecimiento y la coloración más baja dentro de la escala de evaluación, de lo cual se puede inferir que la presencia de este compuesto y sus propiedades favorece el crecimiento del explante, en este ambiente.

La ausencia de sacarosa en el medio (testigo 0), sumado a las condiciones ambientales del ambiente B en cámara bioclimática produjo un nulo crecimiento, no presentó desarrollo de tallos y raíces, la coloración de sus tejidos fue café en la mayoría de las plántulas. Por lo demás en este ambiente, con la aplicación de distintas dosis de manitol no existió desarrollo radical y en las variables de número y longitud de tallos, se obtuvo solamente crecimiento de un brote y la longitud promedio fue superior a un centímetro, además de presentó una coloración verde más intensa con respecto a las condiciones ambientales proporcionadas en el ambiente A.

Utilizar dosis de 60 mg/L de manitol es recomendable, aunque sus valores no fueron mejores que el testigo 0 (sin presencia de sacarosa) en número de tallo, los resultados obtenidos en coloración de follaje, color verde oscuro, permite según, los objetivos de esta investigación, el uso de este biorregulador en esta dosis.

Al igual que en *Lobelia bridgesii*, en el Cuadro 13 se puede ver claramente la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos con *Valdivia gayana*.

CUADRO 13 Efecto de cuatro dosis de manitol y de dos tipos de ambientes en *Valdivia gayana*

Niveles	Desarrollo de explante (1 – 4)	Longitud de tallo (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
Dosis manitol (mg/L)					
0	1,4 **	0,9 a*	0,1 **	0,1 a*	2,8 **
20	2,9	2,1 b	0,9	0,3 a	4,4
40	3,3	2,7 c	0,5	0,9 b	4,3
60	2,7	2,5 c	0,2	0,0 a	4,2
Significancia		0,11		0,05	
Condiciones Ambientales					
Ambiente A	3,5	2,8 b	0,9	0,6 b	3,3
Ambiente B	1,6	1,2 a	0,0	0,0 a	4,5
Significancia		0,1		0,2	

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

En el tratamiento testigo 0, sin adición de sacarosa, se vio disminuido en forma significativa el desarrollo de explante, longitud de tallo, número y longitud de raíces y color, resultado similar a lo obtenido en *Lobelia bridgesii*. La dosis de 60 mg/L de este compuesto al igual que el testigo presentó el menor desarrollo de raíces y longitud de raíces. En ensayos realizados por LEAL (1992) y CANIGGIA (1997) en *Solanum tuberosum* utilizaron dosis de 30 mg/L de manitol; para ambos ensayos resultó ser un buen retardante de crecimiento y las plántulas encontraron óptimas condiciones de conservación después de seis meses; en este ensayo los mejores resultados se obtuvieron con una dosis más alta (60mg/L), en *Lobelia bridgesii* y *Valdivia gayana*.

Las condiciones ambientales presentaron diferencias significativas en todas las variables evaluadas entre el ambiente A y B, siendo favorables para la disminución del crecimiento, las condiciones otorgadas por una cámara bioclimática (ambiente B). Igualmente CANNIGIA (1997), determinó que la condición ambiental más efectiva para retardar el crecimiento de cultivares de papa incubados *in vitro* fue a 8° C y 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, debido a que con estas condiciones ambientales de conservación, las plántulas tratadas se apreciaron con una menor altura, vigor y un escaso desarrollo radical, a diferencia de lo ocurrido bajo condiciones de incubación de 25° C y 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Los resultados de la interacción de los tratamientos aplicados en *V. gayana* y su posterior análisis se presentan a continuación:

CUADRO 14 Efecto de la interacción entre cuatro dosis de manitol en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Valdivia gayana*.

Niveles	Desarrollo de explante (1 – 4)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
0 x A	1,8 **	0,4 **	0,2 b*	2,0 **
20 x A	3,8	1,9	0,0 a	3,7
40 x A	5,0	1,0	0,6 b	3,9
60 x A	3,5	0,5	0,0 a	3,5
0 x B	1,0	0,0	0,0 a	3,4
20 x B	2,0	0,0	0,0 a	5,0
40 x B	2,0	0,0	0,0 a	4,6
60 x B	1,8	0,0	0,0 a	5,0
Significancia			0,18	

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

De los resultados entregados en el Cuadro 14, se confirma la tendencia que se ha apreciado con manitol, en el cual la aplicación de 60 mg/L en el ambiente en cámara bioclimática con una temperatura ambiente de 8° C, bajo una intensidad luminosa de 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo semicontrolado de 16 horas luz, se alcanza una mejor respuesta en la disminución de desarrollo de explante y coloración en esta especie.

En relación, a las experiencias de otros autores ROSALES *et al.* (2006), señala que el manitol, posee buenas características para retardar el crecimiento en ajo, pero presenta valores similares al testigo; sin embargo esta similitud obliga a derivar que el uso de retardantes no es necesario en plantas de *Allium sativum*, provenientes de un proceso de micropropagación, puesto que sin la adición de compuesto alguno, se puede realizar la conservación del material genético, al menos por un período de cuatro meses. Aun así una dosis de 20 mg/L de manitol sería la óptima para *V. gayana*. Por otra parte CANIGGIA (1997) y LEAL (1992) utilizaron dosis de 30 mg/L, ESPINOZA *et al* (1992), señalaron que en un medio que contenía sacarosa más manitol en 40 mg/L puede ser usado en la conservación de germoplasma por un largo período. Estos resultados difieren de los obtenidos por JARRET y GAWEL, (2004) donde la adición de manitol en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batata* produce efectos no deseados en brotes y morfología de la planta.

4.2.4 Paclobutrazol. Las respuestas alcanzadas por este biorregulador, en los distintos tratamientos aplicados a los explantes y posterior evaluación de las variables son presentados en los Cuadros 15 y 16, para *L. bridgesii* y en los Cuadros 17 y 18 para *V. gayana*.

CUADRO 15 Efecto de cuatro dosis de paclobutrazol y de dos tipos de ambientes *in vitro* en *Lobelia bridgesii*.

Niveles	Nº de tallos	Long. de tallos (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
Dosis paclobutrazol (mg/L)					
0	1,2	3,0 c *	0,5 **	0,6 b *	3,4**
1	1,0	2,5 bc	1,5	0,7 b	3,8
1,5	0,9	1,7 ab	0,5	0,2 a	2,3
2	1,0	1,4 a	0,0	0,0 a	2,0
Significancia	n.s	0,2		0,18	
Condiciones Ambientales					
Ambiente A	1,1 **	3,7 b	1,2 **	0,7 b	2,8
Ambiente B	0,9	0,7 a	0,0	0,0 a	3,0
Significancia		0,19		0,13	n.s

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

Esta especie, entre las dosis de paclobutrazol y el testigo, no presentó diferencias significativas en número de tallos. Mientras que 1,5 y 2 mg/L, en variables como longitud de brote, número y longitud de raíces obtuvieron menores resultados de crecimiento, reduciendo el crecimiento del explante. BECERRA (1999) utilizó 1,5 mg/L de este compuesto para evaluar la respuesta al enraizamiento *in vitro* en *Asparagus officinalis*, donde obtuvo un menor número y longitud de brotes. La disminución del desarrollo radical en este ensayo resultó contraria a lo señalado por BECERRA (1999) y BLANCO (2006), quienes determinaron que paclobutrazol promueve la formación de raíces. La coloración del explante se presentó de un color cercano al amarillo entro de la

escala de evaluación. SEEMANN (2008),² señala que un explante con esas características de color, al ser expuesto a condiciones de crecimiento rápido, fácilmente recupera un color verde más intenso.

Las condiciones ambientales tratadas para esta especie, entrega diferencias significativas para el ambiente de menor temperatura e intensidad luminosa (Ambiente B), siendo sus valores promedios inferiores a las plántulas conservadas en ambientes de temperaturas más altas y mayor intensidad luminosa (Ambiente A), donde los explantes obtuvieron un mayor número y longitud de tallo y un notable desarrollo radical. Contrario a esto, ZURITA (1993) demostró que la misma especie al ser sometida a condiciones de cultivo *in vitro* similares, no forma raíces.

En el Cuadro 16, se presentan las respuestas alcanzadas por los explantes con este biorregulador en las distintas variables de crecimiento, frente a la interacción de cuatro concentraciones de paclobutrazol y dos tipos de ambiente, para *Lobelia bridgesii*.

² SEEMANN, P (2008) Ing. Agr., Dr. rer. hort. Universidad Austral de Chile. Comunicación personal.

CUADRO 16 Efecto de la interacción de cuatro dosis de paclobutrazol en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Lobelia bridgesii*.

Niveles (mg/L)	Nº de tallos	Long. de tallos (cm)	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)	Color (1-5)
0 x A	1,1 **	4,5 d*	1,1 **	1,2 b*	3,1 **
1 x A	1,0	4,5 d	2,9	1,4 b	3,3
1,5 x A	1,3	3,4 cd	0,9	0,4 ab	3,2
2 x A	1,0	2,5 bc	0,0	0,0 a	1,4
0 x B	1,3	1,6 ab	0,0	0,0 a	3,7
1 x B	1,0	0,5 a	0,0	0,0 a	4,1
1,5 x B	0,4	0,1 a	0,0	0,0 a	1,5
2 x B	1,0	0,4 a	0,0	0,0 a	2,7
Significancia		0,3		0,2	

(*)Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**)En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

Estos resultados arrojan una diferencia significativa en dosis 1,5 mg/L en el ambiente B, con menor luz y temperaturas más bajas en la variable número de brotes. KOSAK (2006), suprimió perceptiblemente el crecimiento del brote en *Tibouchina urvilleana* con la aplicación de este compuesto.

HUSSEY y STACEY (1984), señalan que la formación de brotes depende intrínsecamente de las condiciones ambientales, aunque también de factores hormonales, los que influyen en la habilidad que cada meristema axilar tiene para dar origen a un nuevo brote.

La longitud de tallos en este ambiente obtuvo una menor altura y no existió desarrollo radical. La coloración del explante presentó diferencias

significativas entre los tratamientos, donde las dosis más altas de paclobutrazol en ambas condiciones ambientales, presentaron una coloración con leves síntomas de clorosis en el tejido.

La reacción de la acción individual de los tratamientos aplicados en *Valdivia gayana*, en la reducción del crecimiento *in vitro*, se describe en el Cuadro 17.

CUADRO 17 Efecto de cuatro dosis de paclobutrazol y de dos tipos de ambientes *in vitro* en *Valdivia gayana*.

Niveles	Desarrollo del explante (1 – 4)	Longitud de tallo (cm)	Color (1-5)
Dosis paclobutrazol (mg/L)			
0	2,3 **	2,5 b*	4,0 **
1	2,0	1,5 ab	3,9
1,5	1,7	1,1 a	3,0
2	1,6	1,3 a	2,7
Significancia		0,3	
Condiciones Ambientales			
Ambiente A	2,3 **	2,1 b	2,9 **
Ambiente B	1,5	1,1 a	3,8
Significancia		0,2	

(*) Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**) En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

El efecto de los tratamientos aplicados en esta especie presentó diferencias significativas según las dosis aplicadas y las condiciones ambientales proporcionadas a los explantes en las tres variables, que fueron evaluadas. A medida que aumentó la dosis de paclobutrazol el crecimiento fue menor, presentando diferencias significativas entre el testigo 0 y dosis 1,5 y 2

mg/L en el número de brotes y en longitud del tallo, pero su coloración se tornó color verde más amarillento con respecto a las dosis 0 y 1 mg/L, que obtuvieron una coloración más verdosa.

No hubo desarrollo radicular de los explantes. Estos resultados fueron contrarios a lo reportado por KOSAK (2006), quien investigó el efecto de diversos reguladores de crecimiento *in vitro* de *Tibouchina urvilleana*, en el medio de Murashige y Skoog (MS) suplidos con paclobutrazol, flurprimidol y CCC en distintas dosis; el resultado obtenido fue que los tres reguladores suprimieron perceptiblemente el crecimiento y promovieron la rizogénesis, con respecto al testigo. El tratamiento con paclobutrazol presentó la mayor reducción de la longitud, hinchazón de raíces e inhibición de alargamiento de raíz. ROBERT *et al.* (1991) utilizó paclobutrazol en el medio de cultivo *in vitro* y obtuvo un aumento en el espesor de las raíces y en el contenido de clorofila en las plántulas.

En el Cuadro 17 se desprende que los mejores resultados para mantención de explantes ocurrieron en una cámara bioclimática. Para esta especie aparentemente, para la conservación *in vitro* es necesario utilizar temperaturas más bajas y menos luz para obtener un menor crecimiento y una buena coloración de los explantes. Esto coincide con lo investigado por CANIGGIA (1997) donde bajo estas mismas condiciones ambientales, las plántulas de *Solanum tuberosum*, se apreciaron con una menor altura, coloración verde y un escaso desarrollo radical.

En el Cuadro 18, se muestran los resultados adquiridos con la aplicación de paclobutrazol para la acción combinada de los tratamientos aplicados a los explantes en *Valdivia gayana*.

CUADRO 18 Efecto de la interacción de cuatro dosis de paclobutrazol en dos tipos de ambientes *in vitro* en *Valdivia gayana*.

Niveles	Desarrollo de explante	Longitud de tallo (cm)	Color (1-5)
0 x A	2,8 **	3,7 b*	3,3 **
1 x A	2,0	1,5 a	2,8
1,5 x A	2,2	1,5 a	3,0
2 x A	2,2	1,7 a	2,8
0 x B	1,8	1,3 a	4,8
1 x B	2,0	1,6 a	5,0
1,5 x B	1,0	0,8 a	3,0
2 x B	1,0	0,9 a	2,8
Significancia		1,5	

(*) Letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNCAN).

(**) En la columna indican diferencias estadísticamente significativas, al 5% (DUNN).

Al discutir los tratamientos en forma individual, como también la interacción entre ellos, las distintas variables presentaron diferencias significativas. Es posible destacar que el testigo en el ambiente A (0xA) presentó un normal desarrollo del explante y el promedio de longitud de tallo alcanzó los 3,7 cm., con respecto a las distintas dosis de paclobutrazol aplicadas. Los resultados permiten determinar que las dosis 1,5 y 2,0 mg/L en el ambiente B, reducen el desarrollo del explante de modo que a los 180 días su longitud no fue superior a un centímetro, pero presentan una coloración de una tonalidad verde inferior a la obtenida con dosis 0 y 1 mg/L. BECERRA (1999) aplicó 1,5 mg/L de paclobutrazol en *Lapageria rosea* y no permitió diferenciar una respuesta clara en el desarrollo de brotes y raíces, pues entonces determino que la aplicación

de este compuesto puede causar efectos distintos en la fisiología como en la morfología de la planta según la especie

4.2 Supervivencia porcentual observada en *L. bridgesii* y *V. gayana* por la aplicación de cuatro de biorreguladores *in vitro* después de 60, 120 y 180 días.

Se evaluó cual biorregulador de crecimiento provocaba una disminución del crecimiento útil, para la conservación a mediano plazo de germoplasma *in vitro*, pero que permitiera la obtención de altos porcentajes de supervivencia, en los seis tratamientos descritos en el Cuadro 2. Se evaluó la supervivencia promedio de las plántulas de *Lobelia bridgesii* y *Valdivia gayana* tratadas en un ambiente de cámara bioclimática (ambiente B), en estas condiciones ambientales de 8° C y una intensidad luminosa entre 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, las plantas mostraron una supervivencia porcentualmente superior a los 180 días.

CUADRO 19 Supervivencia (%) promedio de explante transcurrido 60, 120 y 180 días post siembra en *Lobelia bridgesii*.

Tratamiento	60 días		120 días		180 días	
	VR	VT	VR	VT	VR	VT
T1	100	1,5 a	91,6	1,3 a	83,3	1,2 a
T2	83,3	1,2 ab	66,6	0,9 ab	41,6	0,6 b
T3	83,3	1,2 ab	83,3	1,2 ab	66,6	0,9 ab
T4	58,3	0,8 b	58,3	0,8 b	33,3	0,6 b
T5	66,6	0,9 b	50,0	0,7 b	50,0	0,7 b
T6	100	1,5 a	91,6	1,3 a	83,3	1,2 a
Significancia		0,6		0,5		0,5

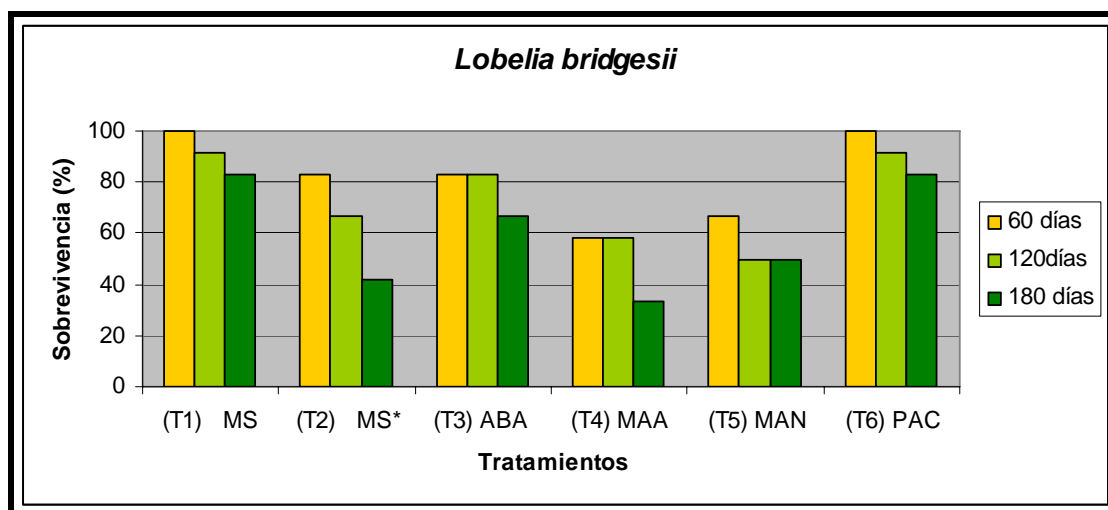
VR: Valor real (%)

VT: Valor transformado por $\arcsen\sqrt{p}$

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los promedios según la prueba de Duncan ($\alpha=0,05$).

De acuerdo a los análisis de varianza realizados se puede observar que existieron diferencias significativas en la sobrevivencia a los 60, 120 y 180 días en las dos especies. Los resultados se observan en los Cuadros 19 y 20 y detalles en Anexos 36 a 41.

Como se observa en el Cuadro 19, la sobrevivencia promedio de los explantes de *L. bridgesii*, a los 60 días presentó diferencias significativas en los tratamientos (T1) MS, completo sin regulador de crecimiento y (T6) con 1,5 mg/L paclobutrazol donde el 100% de los explantes sobrevivieron a las condiciones otorgadas. Esta situación fue similar a los 120 y 180 días, alcanzando los mayores porcentajes de sobrevivencia en el ensayo, con 83% de plantas vivas a los 180 días. El tratamiento que presentó menor porcentaje de sobrevivencia fue (T4) con 2,5 mg/L ácido maleico con apenas un 53% a los 60 días y un 33,3% a los 180 días.



(MS*) Medio basal, sin adición de sacarosa.

FIGURA 11 Porcentaje de sobrevivencia de *Lobelia bridgesii*, según tratamiento aplicado.

Al comparar la sobrevivencia *in vitro* de *Lobelia bridgesii*, en un ambiente de cámara bioclimática, sometido a distintos tratamientos, evaluada después de un periodo de 60, 120 y 180 días (Figura 11), se puede destacar que el porcentaje de sobrevivencia disminuyó a los 180 días, con respecto a la primera evaluación a los 60 días en todos los tratamientos.

Los mejores resultados para la conservación de germoplasma *in vitro* de esta especie, fueron el tratamiento T1, MS sin aplicación de biorregulador de crecimiento y T6 (paclobutrazol 1,5mg/L), que presentaron porcentaje de sobrevivencia de 83,3% a los 180 días. Estos resultados evidencian un importante aspecto a considerar en el ensayo, ya que la sobrevivencia en estos tratamientos fue la misma. En otras variables como longitud de tallo existieron diferencias, T1 alcanzó una altura de 1,6 cm y T6 de 0,1 cm, lo cual permite comprobar la acción de paclobutrazol como retardante de crecimiento. KOSAK (2006) también logró con este compuesto una reducción de la longitud y mayor sobrevivencia en *Tibuochina urvilleana*.

En el tratamiento T2, donde las plántulas fueron expuestas a un medio MS sin adición de sacarosa y la sobrevivencia fue baja (41,2% a los 180 días), no permite justificar la ausencia de este compuesto para retardar el crecimiento del explante.

Los tratamientos con ácido abscísico 20mg/L (T3), ácido maleico 2,5 mg/L (T4) y manitol 60 mg/L (T5), alcanzaron porcentajes de sobrevivencia inferiores al testigo a los 60, 120 y 180 días. La sobrevivencia promedio de las plántulas tratadas con ácido abscísico (20mg/L) fue del orden del 66,6%, siendo superior a los obtenidos con manitol (T4) y a ácido maleico (T5), donde se obtuvieron los más bajos porcentajes de sobrevivencia. Si bien estos biorreguladores poseen buenos efectos retardantes, posiblemente pueden

limitar el desarrollo de la regeneración *in vitro*, ya que presentan una baja sobrevivencia (ROSALES *et al.*, 2006).

RODRIGUEZ (1997) investigó el comportamiento *in vitro* de *Lobelia bridgesii*, con la aplicación de promotores para aumentar el crecimiento, obteniendo los menores índices de sobrevivencia cercanos al 80%, en el tratamiento sin regulador de crecimiento, resultados que son similares a los obtenidos en este ensayo con el testigo 0 (T1). Esto hace pensar que existe dependencia de promotores que aumenten el crecimiento *in vitro* de esta especie para obtener mayores porcentajes de sobrevivencia y justifica los resultados de esta investigación, donde se obtuvo una baja respuesta con la aplicación de biorreguladores que inhiben el crecimiento.

CUADRO 20 Sobrevivencia (%) promedio de explante transcurrido 60, 120 y 180 días post siembra en *Valdivia gayana*.

Tratamientos	60 días		120 días		180 días	
	VR	VT	VR	VT	VR	VT
T1	83,3	1,2 ab	75,0	1,1 ab	75,0	1,1 ab
T2	83,3	1,2 ab	58,3	0,9 b	50,0	0,8 b
T3	83,3	1,2 ab	75,0	1,0 ab	66,6	0,9 ab
T4	83,3	1,2 ab	83,3	1,2 ab	83,3	1,2 ab
T5	100	1,5 a	100	1,5 a	100	1,5 a
T6	75,0	1,0 b	66,6	0,9 b	58,3	0,8 b
Significancia		0,3		0,6		0,6

VR: Valor real (%)

VT: Valor transformado por $\arcseno\sqrt{p}$

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los promedios según la prueba de Duncan ($\alpha=0,05$).

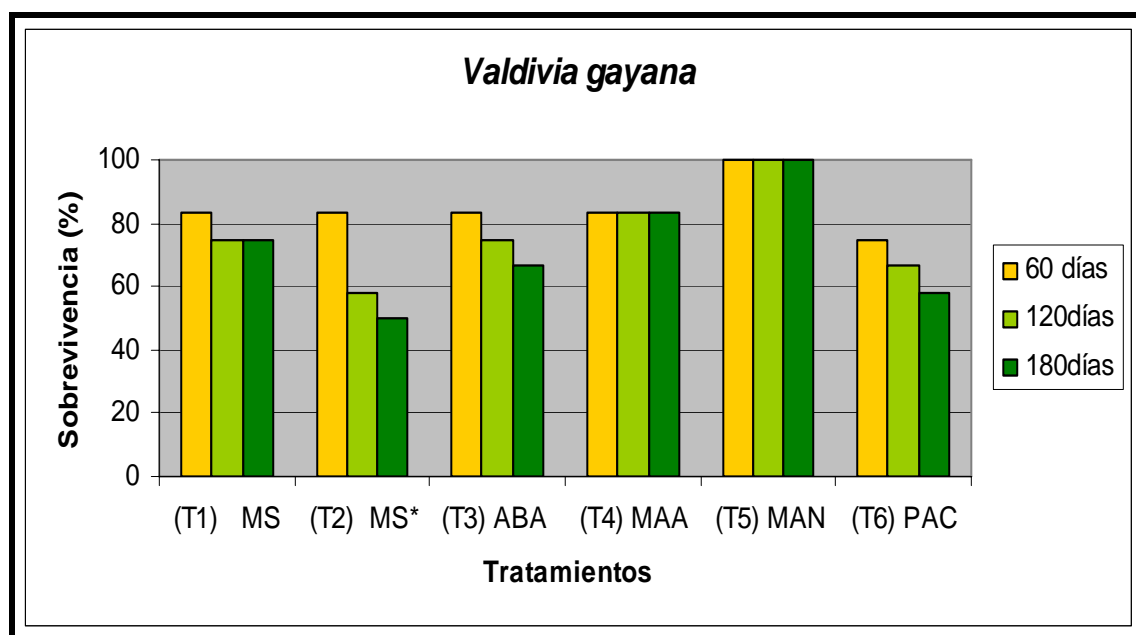
La sobrevivencia porcentual de las plántulas de *V. gayana* a los 60 días en todos los tratamientos fue superior al 75%. El tratamiento con 60 mg/L de manitol (T5), presentó diferencias significativas con respecto a los demás tratamiento con el 100% de las plántulas vivas. Según ROSALES *et al.* (2006) en *Allium sativum*, no se detectó diferencia estadística en términos de sobrevivencia entre los tratamientos con respecto al testigo, por lo que no existe razón para pensar que los medios de cultivos que contienen retardantes de crecimiento influyen en la sobrevivencia de las plántulas, en consecuencia se puede atribuir la muerte de plantas *in vitro* a cualquier otra razón, que no sean los tratamientos con retardantes de crecimiento. En el estudio de ZURITA (1993), en *Valdivia gayana* no hubo respuesta a las condiciones de cultivo *in vitro*.

A los 120 días de conservación el tratamiento MS, sin sacarosa (T2) y 1,5 mg/L paclobutrazol (T6), presentaron los menores porcentajes de plantas vivas, con un 58,3% y un 66%, respectivamente. El tratamiento (T5) con 60 mg/L de manitol mantuvo todas las plantas evaluadas vivas.

En la sobrevivencia a los 180 días, la tendencia fue similar a la observada los 120 días donde (T2) y (T6) presentaron los valores porcentuales más bajos, y (T5) mantuvo el 100% de sobrevivencia, seguido por (T4) con 2 mg/L ácido maleico con un 83,3% (Figura 12).

La sobrevivencia de las plántulas tratadas con manitol 60 mg/L (T5) fue de un 100%, porcentaje de sobrevivencia superior a todos los demás tratamientos, superando al testigo (T1). Esta situación es favorable para la conservación *in vitro* de esta especie si el material vegetal es realmente escaso. ROSALES *et al.* (2006) afirma que el manitol, posee buenas características para retardar el crecimiento y en general ofrece un nivel alto de sobrevivencia. Sin embargo, esta similitud con el testigo obliga a derivar que el uso de este compuesto, no

es necesario en plantas provenientes de un proceso de micropropagación, puesto que sin la adición de compuesto alguno, se puede realizar la conservación del material genético de *Allium sativum*, al menos por un período de cuatro meses.



(MS*) Medio basal, sin adición de sacarosa.

FIGURA 12 Porcentaje de sobrevivencia de *Valdivia gayana*, según tratamiento aplicado.

El tratamiento (T4) con 2 mg/L ácido maleico, mantuvo el mismo porcentaje de sobrevivencia durante todo el ensayo. Tendencia distinta se observó en los demás tratamientos, ya que disminuyeron el porcentaje de sobrevivencia desde los 60 días a los 180 días. La principal causa de este fenómeno puede ocurrir debido a que después de seis meses las plántulas ya no tienen medio de cultivo ni espacio donde crecer, por lo que comienzan a senecer y los tejidos no sobreviven (Fuentealba 1987, citado por CANIGGIA,1997). Esta situación depende de la velocidad de crecimiento y

desarrollo del explante durante el periodo de almacenamiento, como también del medio utilizado (ESPINOZA *et al.*, 1992).

Al establecer una comparación porcentual de sobrevivencia obtenidos en *L. bridgesii* y *V. gayana* después de un periodo de conservación de 180 días. Se puede afirmar que existe una alta respuesta diferencial a la conservación según el material genético del que se trate ROSALES *et al.* (2006). Ello implica que los diferentes genotipos requieren de distintos medios y condiciones de cultivo (BECERRA, 1999). Esta variabilidad de respuestas además de la condición genética de las plantas, depende del biorregulador de crecimiento utilizado y de los factores ambientales en los que se conservaron (CANIGGIA, 1997). A pesar que en los tratamientos: T3, T4, T5 y T6 que contienen biorregulador de crecimiento, se logró retardar el crecimiento, el porcentaje de sobrevivencia a los 180 días fue distinto para cada especie. Estos resultados permiten discriminar el uso de algunos biorreguladores de crecimiento, si el porcentaje de sobrevivencia es inferior al tratamiento testigo (T1). Lo anterior es importante, según los resultados obtenidos es posible afirmar que de acuerdo a los tratamientos con la aplicación de biorreguladores y a las distintas condiciones ambientales seleccionadas, es posible reducir el crecimiento de las plantas *in vitro*, en términos de sobrevivencia la conservación para estas especies, se puede lograr sin necesidad de realizar la inversión en el producto y esfuerzo en la medición y preparación de soluciones para retardar el crecimiento.

Al finalizar los análisis de los resultados de esta investigación; la conservación de germoplasma *in vitro* de una especie por un período de tiempo prolongado igual o superior a 180 días, se puede lograr a través del uso de biorreguladores de crecimiento, sin embargo deben ser estudiadas todas las variables que influyen en la sobrevivencia de las especies. Este sistema de propagación posibilita la producción de una gran cantidad de individuos,

partiendo de algunos trozos de tejido, de modo que para la perpetuación y supervivencia de una especie no hace falta contar con una gran cantidad de individuos (SEEMANN, 1985). Se debe señalar que para aquellos casos críticos en que la población se reduce a unos pocos individuos y la especie se encuentra destinada a la extinción a corto plazo, la conservación *in vitro* puede constituir la única manera de mantener una representación viva de dicha especie.

5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que:

- Se confirma la hipótesis de trabajo, ya que frente a determinadas concentraciones de biorreguladores de crecimiento y bajo distintas condiciones ambientales las especies vegetales reducen su crecimiento.
- Existió una gran variabilidad en la respuesta de *Lobelia bridgesii* y *Valdivia gayana*, sobre los parámetros evaluados.
- La condición ambiental más efectiva para retardar el crecimiento en ambas especies fue la proporcionada por una cámara bioclimática con temperatura de 8° C, 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luminosidad y un fotoperíodo semicontrolado de 16 horas luz, donde las plántulas tratadas presentaron una menor altura, vigor, escaso desarrollo radicular y un mayor porcentaje de sobrevivencia.
- Se puede concluir para cada biorregulador lo siguiente:

Acido abscísico:

En *Lobelia bridgesii*, el mejor resultado se obtuvo al emplear 20 mg/L de ácido abscísico independiente de la condición ambiental, produce reducción de longitud de brotes e inhibición radical en los explantes. En cambio en *Valdivia gayana*, las plántulas incubadas en cámara bioclimática presentaron menor desarrollo del explante y longitud de tallo, junto con el tratamiento con aplicación de 10 mg/L de ABA, incubadas en cámara de crecimiento.

Acido maleico:

En *Lobelia bridgesii*, la aplicación de 2,5 mg/L del compuesto, produjo disminución del crecimiento, inhibición de rizogénesis y una coloración verde normal en condiciones ambientales de cámara bioclimática. En *Valdivia gayana*, no se justifica la aplicación de este compuesto.

Manitol:

Los resultados para ambas especies ensayadas, destacan que una aplicación de 60 mg/L, bajo condiciones ambientales de cámara bioclimática, reduce el crecimiento del explante, inhibe la formación de raíces y proporciona un color verde en el explante, situaciones favorables para la conservación *in vitro* de material vegetal.

Paclobutrazol:

En general los resultados obtenidos en *Lobelia bridgesii* y *Valdivia gayana* la dosis 1,5 mg/L fue favorable, al disminuir la longitud de tallos, mantener coloración adecuada y no formar de raíces, en ambiente de cámara bioclimática.

- Al evaluar el porcentaje de sobrevivencia deben ser estudiadas todas las variables que influyen en la conservación, ya que se puede lograr un alto porcentaje de plantas vivas, pero un mayor crecimiento del explante, sin necesidad de emplear un biorregulador para retardar el crecimiento.

6 RESUMEN

La conservación de la flora nativa chilena está sufriendo procesos amenazantes que afectan la conservación y biodiversidad, esto deriva a una disminución de especies y un aumento del número de especies amenazadas.

Por ello, fue conveniente desarrollar un método de conservación *in vitro* a mediano plazo de dos plantas nativas: *Lobelia bridgesii* y *Valdivia gayana*, con el fin de disminuir la frecuencia de subcultivos y minimizar su crecimiento sin que disminuyera la viabilidad. Para determinar los medios de cultivo y condiciones óptimas para esta conservación, se utilizaron diferentes medios de cultivo conteniendo medio base MURASHIGE y SKOOG (1962), suplementados con cuatro biorreguladores, conservando los cultivos bajo diferentes condiciones ambientales, por un período de 180 días. Los reguladores de crecimiento utilizados fueron: ácido abscísico (ABA) en dosis 0, 10, 20, 30 mg/L; ácido maleico (MAA) en dosis 0, 1, 2 y 2.5 mg/L sin adición de sacarosa; manitol (MAN) en dosis 0, 20, 40 y 60 mg/L y paclobutrazol (PAC) en dosis 0, 1, 1.5 y 2 mg/L. Las condiciones ambientales proporcionadas fueron: ambiente A; en cámara de crecimiento con temperatura ambiente constante de 25° C, bajo un flujo luminoso de 50-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y ambiente B; en cámara bioclimática con una temperatura ambiente de 8° C, bajo una intensidad luminosa de 20-23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Se evaluaron las siguientes variables: número de brotes, longitud de brotes, número de raíces, longitud de raíces, crecimiento y color del explante,

utilizando escalas de apreciación visual para estos últimos. El porcentaje de sobrevivencia en ambas especies se evaluó a los 60, 120 y 180 días.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza Andeva y para las variables no paramétricas mediante el Test de Kruskall – Wallis. La determinación de diferencias se determinó a través del test de Duncan y Dunn al 5%, respectivamente. Estos análisis indicaron que los tratamientos usados son capaces de retardar el crecimiento de los explantes, reducen el crecimiento del explante e inhiben la rizogénesis en ambas especies.

En cuanto a los resultados de los biorreguladores aplicados a los distintos tratamientos, el ácido abscísico en la especie *Lobelia bridgesii*, presentó una buena respuesta al emplear una dosis de 20 mg/L en las dos condiciones ambientales otorgadas. En *Valdivia gayana*, con aplicación de 10 mg/L de ABA se logró los mejores resultados, en cámara de crecimiento. Para ácido maleico, en *Lobelia bridgesii*, se recomienda la aplicación de 2,5 mg/L, en condiciones ambientales de cámara bioclimática. En *Valdivia gayana*, no se justifica la aplicación de este compuesto. El uso de manitol para ambas especies, alcanzó diferencias significativas con la aplicación de 60 mg/L, bajo condiciones ambientales de cámara bioclimática. Finalmente, para paclobutrazol los resultados obtenidos en *Lobelia bridgesii* y *Valdivia gayana* con una dosis de 1,5 mg/L fue favorable en ambas especies, en ambiente de cámara bioclimática.

Se concluye que los resultados entregaron una buena respuesta a la utilización de biorreguladores para la conservación de germoplasma *in vitro*, siendo posible reducir el crecimiento. En términos de sobrevivencia la conservación se puede lograr sin necesidad de realizar la inversión en el producto para retardar el crecimiento.

SUMMARY

The conservation of native plants in Chile is suffering threatening processes which affect the conservation and biodiversity, deriving in a decrease of species and an increase of the number of threatened ones.

That's why it's convenient to develop *in vitro* conservation methods in a medium term time scale of two native plants: *Lobelia bridgesii* and *Valdivia gayana*, with the purpose of diminishing their subculture frequency and minimizing their growth with out decreasing viability.

In order to determine the culture medium and optimal environmental conditions for this conservation, the culture medium used was the basal MS medium (MURASHIGE and SKOOG, 1962), plus the use of four growth regulators, for a period of 180 days. The bioregulators used were : abscisic acid (ABA) at 0, 10, 20, 30 mg/L; maleic acid (MAA) at 0, 1, 2 and 2,5 mg/L without the addition of sucrose; manitol (MAN) at 0, 20, 40 and 60 mg/L; paclobutrazol (PAC) at 0, 1, 1,5 and 2 mg/L. The environmental conditions were: environment A: In growth chamber at a temperature of 25° C, whit a light intensity of 50 – 55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and a controlled photoperiod of 16 hours; environment B: in a bioclimatic chamber at a temperature of 8°C, with a light intensity of 21 - 23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 16 hours.

The number and length of sprouts was quantified, so as the number and length of roots. Development and foliage coloration of the plantlets was measured using visual scales. The survival percentage in both species was assesed at 60, 120 and 180 days after the study began.

The results shown by the statistical analysis indicated that the treatments used were able to inhibit the growth of the plantlets.

The result of the different growth regulators were as following abscisic acid in *Lobelia bridgesii*, showed a good response when in both the environmental conditions 20 mg/L ABA were applied. In *Valdivia gayana*, with the application of 10 mg/L ABA, in growth chamber was the best. For maleic acid, in *Lobelia bridgesii*, in bioclimatic chamber conditions it is recommended to apply 2.5 mg/L. In *Valdivia gayana*, the application of this compound does not justify itself. Mannitol used for both species, attained significant differences under the 60 mg/L application in bioclimatic chamber conditions. Finally, for paclobutrazol the results obtained in *Lobelia bridgesii* and *Valdivia gayana* with a dose of 1.5 mg/L was favorable in both species, in bioclimatic chamber conditions.

It can be concluded that the results delivered a good response to regulator use in *in vitro* conservation of germplasm, being able to reduce growth. In terms of survival, the conservation can turn out well without the need to investing in the product, to delay growth.

7 BIBLIOGRAFÍA

- AHUJA, M.R.1983. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of Aspen. *Silvae Genética* 32 (3-4) 131-135.
- BECERRA, L. 1999. Respuesta al enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) y copihue (*Lapagerea rosea* Ruiz et Pav) Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 216 p.
- BENOIT, G.; STANLEY, C.; GRANT, W. y TORREY, B. 1983. Potato top growth as influenced by temperatures. *American Potato Journal* 60:489- 501.
- BHOJWANI, S y RAZDAN, M. 1983. *Plant Tissue Culture. Theory and Practice.* Amsterdam, Elsevier. 502 p.
- BLANCO, A. 2006. Validación y Desarrollo de Protocolos de Multiplicación *in vitro* de *Alstroemeria* sp. y *Lapageria rosea*. Tesis Lic. Agr. Santiago. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. 60 p.
- CALDIZ, D.; LANFRANCONI, L; FERNÁNDEZ, V. y NASETTA, M. 1999. Aplicación de hidrazida maleica en papa (*Solanum tuberosum* L cv. Spunta) y sus efectos sobre el rendimiento, la brotación y el nivel de residuos en los tubérculos. *Revista Latinoamericana de la papa.* 11(1):164-172

- CANIGGIA, G. 1997. Optimización del sistema de conservación *in vitro* de cultivares comerciales de papa. (*Solanum tuberosum* L ssp. *tuberosum* Hawkes). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 140 p.
- CHEN, J.; HALL, D. y DE LUCA, V. 2005. Effects of the Growth Retardant Paclobutrazol on Large-scale Micropropagation of Daylily (*Hemerocallis* spp.). *in vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant. 41 (1): 58–62.
- CONAF, CONAMA, BIRF, UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE, UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO, 1999. Catastro y evaluación de los recursos vegetacionales nativos de Chile. Informe nacional con variables ambientales. Santiago, Chile. 88 p.
- CONTRERAS, A.; ALBERDI, M.; ANDRADE, N.; BOHM, L.; FUENTEALBA, J.; MEZA, L.; ROMERO, M.; SEEMANN, P. y CARRILLO, R. 1990. Mantención y evaluación del germoplasma chileno de papas. Informe presentado al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Universidad Austral de Chile, Valdivia. 30 p.
- ELIAS, K. 1998. *In vitro* culture and plant genetic resources . A new approach: *in vitro* collecting. Lettere d' Informazione. Instituto Agronómico Mediterraneo 3: 33-34.
- ESPINOZA, N.; LIZARRAGA, R.; RODRIGUEZ, D.; BUITRON, F.; BRYAN, J. y DODDS, J. 1992. Tissue culture, micropropagation, conservation and export of potato germplasm. 2. ed.. International Potato Center (CIP). CIP Research Guide. N°1. Lima. Perú. 19 p.

- HARTMAN, H. y KESTER, D. 1994. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 2ª ed. Editorial Continental. México. 814 p.
- HECHENLEITNER, P.; GARDNER, M.; THOMAS, P.; ECHEVERRÍA, C.; ESCOBAR, B.; BROWNLESS, P.: y MARTÍNEZ, C. 2005. Plantas amenazadas del centro-sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo, Valdivia.Chile. 188 p.
- HOFFMANN, A. 2005. Flora silvestre de Chile. Guía. Zona Araucana. Fundación Claudio Gay. 5ª ed. Santiago. Chile. 258 p.
- HUSSEY, G. y STACEY, N. 1984. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L). *Annals of Botany* 48:787-796.
- JAMES, W. 1953. The use of respiratory inhibitors. *Plant Physiology*. 4:59 – 90.
- JARA, G. y SEEMANN, P. 2007. Manual de procedimientos, uso de equipos e Instrumentos de laboratorio de tejidos vegetales. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. 60 p.
- JARRET, R. y GAWEL, N. 1991. Chemical and environmental growth regulation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:153-159.
- KOSAK, D. 2006. The Influence of growth retardants and BA on the growth and development of *Tibouchina urvilleana* Cong. *in vitro*. (on line) <http://www.actahort.org/members/showpdf?booknr=725_60>. (2 agosto, 2007)

- KRAUSE, E. 1988. Estudio autoecológico de *Lobelia bridgesii* Hook et Arn., planta chilena en extinción. Tesis Lic. Ing. Forestal Valdivia. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile. 77 p.
- LARA, A.; SOLARI, P.; RUTHERFORD, O.; THIERS, R.; TRECAMAN, R.; PRIETO, A.; y MONTORY, C.1999. Cobertura de la vegetación original de la ecoregión de los bosques valdivianos en Chile hacia 1550. Informe técnico Proyecto FB 49 WWF/Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- LEAL, G. 1990. Uso de biorreguladores del crecimiento en la conservación de germoplasma chileno de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 51 p.
- LOPEZ, H. y SCOTT, I. 1997. Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 151: 74-78.
- LUGO, E. 2007 El manejo de la biodiversidad en el siglo XXI (on line). <http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442001001000011&lng=es&nrm=iso>. (27 julio, 2007).
- MARINO, G. 2004. The effect of paclobutrazol on in vitro rooting, transplant establishment and growth of fruit plants. *Plant Growth Regulation*.0167-6903 (CAB Abstracts). Original no consultado,.
- MARTICORENA, C.1990. Contribución a la estadística de la flora vascular de Chile. *Gayana Botanical*.47 (3-4):85-113.

- MILBORROW, B. 1974. The chemistry and physiology of abscisic acid. Annual Review of Plant Physiology 25:259-307.
- MUÑOZ, M. 1980. Flora del Parque Nacional Puyehue. Santiago. Chile. Editorial Universitaria. 557 p.
- MUÑOZ, M. y MOREIRA, A. 2002. El Herbario Nacional y la Conservación de la Flora Chilena. Sitio Web del Museo Nacional de Historia Natural de Chile.(on line) <<http://www.mnhn.cl/botanica/Herbario/index.htm>> (20 abril, 2008).
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid Growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15: 473-497.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology 25:135-166.
- PEREZ, M.; FOMBELLIDA, A.; CALVO, M. y SANCHEZ, M. 2001. Inhibición de la brotación del ajo en postcosecha mediante aplicacion de hidracida maleica. Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario (ITAGRA.CT). Producción Vegetal y Recursos Forestales. (on line) <<http://www.terraia.com/articulo.php?recordID=5705>> (26 junio 2008).
- ROBERT, A.; SMITH, E. y MOTLLEY, J.1991. The preparation of micropropagated plantlets for transplantation (CAB Abstracts), 52 (3): 1163B. Original no consultado.
- ROCA, W. 1985. El Cultivo de tejidos para la conservación de recursos genéticos *in vitro*. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos. Serie de lecturas sobre Recursos Filogenéticos N° 3. Colombia. 39 p.

- ROCA, W. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia. 969 p.
- RODRIGUEZ, C. 1997. Cultivo *in vitro* de especies vegetales nativas chilenas en peligro de extinción: *Corynabutilum ochsenii* Phil., *Lobelia bridgesii* Hook.et Arn. y *Valdivia gayana* Remy. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 83 p.
- ROSALES, F.; PEREZ, G. y SANTIZO, M. 2006. Estudio del efecto de tres retardadores de crecimiento sobre la regeneración *in vitro* de tres genotipos de ajo (*Allium sativum* L.) (on line) <<http://www.icta.gob.gt/fpdf/infop/Ajo>> (1 de Agosto, 2007).
- SALGADO, R. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas para colaborar con su conservación. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. México. 12 p.
- SALISBURY, F. y ROSS, C. 1994. Fisiología Vegetal. Mexico. Iberoamericana. 759 p.
- SEEMANN, P. y JARA, G. 2007. Manual de Guías de Práctico y Bibliografía de Cultivo de Tejidos Vegetales (PSVE 355). Cultivo de Tejidos Vegetales. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 47 p.
- SEEMANN, P 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. In Barriga, P y Neira, M (eds). Avances en Producción y Sanidad Vegetal. Cultivos no Tradicionales. Universidad Austral de Chile, Instituto de Producción y sanidad Vegetal, Valdivia, pp 87-145.

- SEEMANN, P.1985. El cultivo de tejidos como método de conservación de plantas en vía de extinción. *Agro Sur (Chile)* 13(2):136-146.
- SERRA, M.T. y GAJARDO, R. 1988. *Lobelia bridgesii* Hook et Ar. programa de protección y recuperación de la flora nativa de Chile. Ficha técnica de especies amenazadas, Santiago Corporación Nacional Forestal. 8 p.
- SOLIS, J. 1993. Regeneración y microtuberación in vitro de cultivares y genotipos nativos de papa (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* Hawkes). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 86 p.
- TEILLIER, S. 2005. Curso de botánica sistemática. Universidad Central de Santiago Chile. (on line) <<http://www.chlorischile.cl>.>(1 agosto,2007)
- WEAVER, R. 1976. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Universidad de California. México. Trillas. 622 p.
- ZURITA, R. 1993. Propagación de tres especies arbustivas valdivianas con problemas de conservación. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 84 p.

ANEXOS

**ANEXO 1 Composición base del medio de cultivo de Murashige y Skoog
(1962)**

Nutrientes	(mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ * 2H ₂ O	440
MgSO ₄ * 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	37.25
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27.85
MnSO ₄ * H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.025
Vitaminas	
Tiamina	0.4
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina HCL	0.5
Glicina	2
Myo-inositol	100
Sacarosa	20000
Gelrite	3500

FUENTE JARA, G. y SEEMANN, P. 2007.

ANEXO 2 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de tallos con la aplicación de ácido abscísico en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	VALOR P
Dosis	23,9	0,000 *
Ambiente	14,4	0,000 *
Dosis x Ambiente	42,3	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 3 Análisis de Varianza para la variable longitud de tallos con la aplicación de ácido abscísico en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	15,1209	1	15,1209	14,92	0,0002 *
Dosis	137,974	3	45,9912	45,38	0,0000 *
Interacción	26,9336	3	8,97788	8,86	0,0000 *
Residuos	89,1858	88	1,01348		
Total (Corregido)	269,214	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 4 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de raíces con la aplicación de ácido abscísico en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	33,02	0,000 *
Ambiente	11	0,000 *
Dosis x Ambiente	77,03	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 5 Análisis de Varianza para la variable longitud de raíces con la aplicación de ácido abscísico en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	12,0417	1	12,0417	45,58	0,0002 *
Dosis	36,125	3	12,0417	45,58	0,0000 *
Interacción	36,125	3	12,0417	45,58	0,0000 *
Residuos	23,2467	88	0,264167		
Total (Corregido)	107,538	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 6 Test No Paramétrico Kruskal Wallis para la variable color con la aplicación de ácido abscísico en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	43,2	0,00 *
Ambiente	0,2	0,65 n.s.
Dosis x Ambiente	45,9	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

n.s: Indica diferencias no significativas.

ANEXO 7 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable desarrollo de explante con la aplicación de ácido abscísico en *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	VALOR P
Dosis	27,87	0,000 *
Ambiente	7,94	0,047 *
Dosis x Ambiente	45,11	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 8 Análisis de Varianza para la variable longitud de tallos con la aplicación de ácido abscísico en *Valdivia gayana*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	9,94594	1	9,94594	68,12	0,0078 *
Dosis	1,84865	3	0,616215	4,22	0,0000 *
Interacción	3,29365	3	1,09788	7,52	0,0002 *
Residuos	12,8492	88	0,146013		
Total (Corregido)	27,9374	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 9 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable color con la aplicación de ácido abscísico en *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	1,88	0,664 n.s
Ambiente	34,1	0,000 *
Dosis x Ambiente	59,71	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

n.s: Indica diferencias no significativas.

ANEXO 10 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de tallos con la aplicación de ácido maleico en *Lobelia bridgesii*

Factor	Test Kruskal Wallis	VALOR P
Dosis	16,3	0,000 *
Ambiente	0,338	0,53 n.s
Dosis x Ambiente	32,96	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

n.s: Indica diferencias no significativas.

ANEXO 11 Análisis de Varianza para la variable longitud de tallos con la aplicación de ácido maleico en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	64,8459	1	64,8459	54,01	0,0000 *
Dosis	123,414	3	41,1379	34,27	0,0000 *
Interacción	29,7478	3	9,91594	8,26	0,0001 *
Residuos	105,649	88	1,20056		
Total (Corregido)	323,657	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 12 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de raíces con la aplicación de ácido maleico en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	33,02	0,000 *
Ambiente	11	0,000 *
Dosis x Ambiente	77,03	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 13 Análisis de Varianza para la variable longitud de raíces con la aplicación de ácido maleico en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	12,0417	1	12,0417	45,58	0,0002 *
Dosis	36,125	3	12,0417	45,58	0,0000 *
Interacción	36,125	3	12,0417	45,58	0,0000 *
Residuos	23,2467	88	0,264167		
Total (Corregido)	107,538	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 14 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable color con la aplicación de ácido maleico en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	12,2	0,74 n.s
Ambiente	0,12	0,000 *
Dosis x Ambiente	13,5	0,06 n.s

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

n.s: Indica diferencias no significativas.

ANEXO 15 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable desarrollo de explante con la aplicación de ácido maleico en *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	10,1	0,0174*
Ambiente	51,9	0,0 *
Dosis x Ambiente	63,1	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 16 Análisis de Varianza para la variable longitud de tallos con la aplicación de ácido maleico en *Valdivia gayana*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	14,5704	1	14,5704	96,79	0,0078 *
Dosis	4,5775	3	1,52583	10,14	0,0000 *
Interacción	1,67875	3	0,559583	0,0144	0,0002 *
Residuos	13,2467	88	0,15053		
Total (Corregido)	34,0733	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 17 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable color con la aplicación de ácido maleico en *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	5,433	0,0197 *
Ambiente	39,8	0,000 *
Dosis x Ambiente	47,16	0,001 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 18: Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de tallos con la aplicación de manitol en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test W Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	11,49	0,000 *
Ambiente	26,19	0,000 *
Dosis x Ambiente	48,6	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 19 Análisis de Varianza para la variable longitud de tallos con la aplicación de manitol en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	382,4	1	382,4	160,5	0,0000 *
Dosis	28,6	3	9,5	4	0,0101 *
Interacción	10,3	3	3,4	1,45	0,2352 *
Residuos	209,5	88	2,3		
Total (Corregido)	630,9	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 20 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de raíces con la aplicación de manitol en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	4,53	0,000 *
Ambiente	20,20	0,21 n.s.
Dosis x Ambiente	29,3	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 21 Análisis de Varianza para la variable longitud de raíces con la aplicación de manitol en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	29,59	1	29,59	25,67	0,0000 *
Dosis	8,52115	3	2,84038	2,46	0,0676 n.s
Interacción	8,52115	3	2,84038	2,46	0,0676 n.s
Residuos	101,443	88	1,15276		
Total (Corregido)	148,077	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

n.s: Indica diferencias no significativas.

ANEXO 22 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable color con la aplicación de manitol en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	22,3	0,25 n.s
Ambiente	1,3	0,000 *
Dosis x Ambiente	40,57	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 23 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable desarrollo del explante con la aplicación de manitol *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	27,65	0,0000 *
Ambiente	39,7	0,0000 *
Dosis x Ambiente	70.3	0,001 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 24 Análisis de Varianza para la variable longitud de tallos con la aplicación de manitol en *Valdivia gayana*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	61,7604	1	61,7604	208,11	0,0000 *
Dosis	46,5788	3	15,5263	52,32	0,0000 *
Interacción	6,55542	3	2,18514	7,36	0,0002 *
Residuos	26,115	88	0,296761		
Total (Corregido)	141,01	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 25 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de raíces con la aplicación de manitol en *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	21,48	0,0000 *
Ambiente	3,84	0,278 *
Dosis x Ambiente	25,88	0,0005 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 26 Análisis de Varianza para la variable longitud de raíces con la aplicación de manitol en *Valdivia gayana*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	1,31329	1	0,437764	5,88	0,0011*
Dosis	1,85998	3	1,85998	24,97	0,0000 *
Interacción	1,31329	3	0,437764	5,88	0,0011 *
Residuos	6,55595	88	0,0744994		
Total (Corregido)	11,0425	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 27 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable color con la aplicación de manitol en *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	28,8	0,0000 *
Ambiente	11,5	0,001 *
Dosis x Ambiente	44,3	0,0000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 28 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de tallos con la aplicación de paclobutrazol en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	8,94	0,079 n.s
Ambiente	3,09	0,03 *
Dosis x Ambiente	23,9	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

n.s: Indica diferencias no significativas.

ANEXO 29 Análisis de Varianza para la variable longitud de tallos con la aplicación de paclobutrazol en *Lobelia bridgesii*.

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	224,482	1	224,482	120,53	0,0000 *
Dosis	37,8246	3	12,6082	6,77	0,0004 *
Interacción	11,655	3	3,885	2,09	0,1078 n.s
Residuos	163,898	88	1,86248		
Total (Corregido)	437,86	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

n.s: Indica diferencias no significativas.

ANEXO 30 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable número de raíces con la aplicación de paclobutrazol en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test	Valor P
	Kruskal Wallis	
Dosis	6,7	0,000 *
Ambiente	13,5	0,08 *
Dosis x Ambiente	27	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 31 Análisis de Varianza para la variable longitud de raíces con la aplicación de paclobutrazol en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	14,2604	1	14,2604	16,34	0,0001 *
Dosis	8,05375	3	2,68458	3,19	0,0276 *
Interacción	8,05375	3	2,68458	3,19	0,0276 *
Residuos	74,0917	88	0,841951		
Total (Corregido)	104,46	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 32 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable color con la aplicación de paclobutrazol en *Lobelia bridgesii*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	14,8	0,61 n.s
Ambiente	0,26	0,002 *
Dosis x Ambiente	25,6	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

n.s: Indica diferencias no significativas.

ANEXO 33 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable desarrollo de explante con la aplicación de paclobutrazol en *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	16,5	0,0008 *
Ambiente	38,1	0,000 *
Dosis x Ambiente	65,43	0,000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 34 Análisis de Varianza par la variable longitud de tallos con la aplicación de paclobutrazol en *Valdivia gayana*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Ambiente	21,5651	1	21,5651	5,71	0,0190 *
Dosis	28,227	3	9,40899	2,49	0,0655 *
Interacción	18,9595	3	6,31983	1,67	0,1787 *
Residuos	332,511	88	3,77853		
Total (Corregido)	401,262	95			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 35 Test No paramétrico Kruskal Wallis para la variable color con la aplicación de paclobutrazol en *Valdivia gayana*.

Factor	Test Kruskal Wallis	Valor P
Dosis	24,01	0,0000 *
Ambiente	16,6	0,0000 *
Dosis x Ambiente	58,6	0,0000 *

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 36 Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia a los 60 en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medios	Razón F	Valor P
Tratamientos	1,29	5	0,25	6,82	0,03 *
Error experimental	0,45	12	0,03		
Total (Corregido)	1,75	17			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

ANEXO 37 Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia a los 120 en *Lobelia bridgesii*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medios	Razón F	Valor P
Tratamientos	1,08	5	0,21	4,06	0,032 *
Error experimental	0,63	12	0,05		
Total (Corregido)	1,72	17			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

**ANEXO 38 Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia a los 180 en
Lobelia bridgesii.**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medios	Razón F	Valor P
Tratamientos	1,03	5	0,20	4,96	0,01 *
Error experimental	0,50	12	0,04		
Total (Corregido)	1,54	17			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

**ANEXO 39 Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia a los 60 en
*Valdivia gayana***

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medios	Razón F	Valor P
Tratamientos	0,44	5	0,08	1,45	0,27 *
Error experimental	0,73	12	0,06		
Total (Corregido)	1,17	17			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

**ANEXO 40 Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia a los 120 en
*Valdivia gayana***

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medios	Razón F	Valor P
Tratamientos	0,79	5	0,15	1,67	0,21 *
Error experimental	1,14	12	0,09		
Total (Corregido)	1,93	17			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.

**ANEXO 41 Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia a los 180 en
Valdivia gayana.**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medios	Razón F	Valor P
Tratamientos	1,08	5	0,21	1,96	0,15 *
Error experimental	1,32	12	0,11		
Total (Corregido)	2,4	17			

*: Indica diferencias significativas al 95% de confianza.