



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Agronomía

**Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de
Lapageria rosea Ruiz et Pav.
mediante el uso de auxinas sintéticas.**

Memoria presentada como parte de los
requisitos para optar al título de
Ingeniero Agrónomo.

María Soledad Núñez Luengo

Valdivia – Chile

2011

PROFESOR PATROCINANTE:

Peter Seemann F.
Ing. Agr., Dr. Rer. Hort.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

PROFESORES INFORMANTES:

Judith Carrasco P.
Lic. Cs. Biológicas, M. Sc.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

Nancy Andrade S.
Ing. Agr., M. Sc.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

INDICE DE MATERIAS

| Capítulo | | Página |
|-----------------|--|---------------|
| | RESUMEN | 1 |
| | SUMMARY | 3 |
| 1 | INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2 | REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 2.1 | Generalidades y requerimientos ambientales del copihue (<i>Lapageria rosea</i> Ruiz <i>et</i> Pav.) | 7 |
| 2.2 | Sistemas de multiplicación de la especie | 9 |
| 2.2.1 | Multiplicación por semillas | 9 |
| 2.2.2 | Multiplicación vegetativa | 9 |
| 2.2.2.1 | Mugrón o acodo aéreo | 9 |
| 2.2.2.2 | Esquejes o estacas | 10 |
| 2.2.2.3 | Micropropagación | 10 |
| 2.3 | Micropropagación de especies vegetales | 10 |
| 2.3.1 | Etapas de la micropropagación | 10 |
| 2.3.2 | Ventajas y desventajas de la micropropagación | 11 |
| 2.3.3 | Principales factores incidentes sobre la micropropagación | 11 |
| 2.3.3.1 | Planta madre | 11 |
| 2.3.3.2 | Explante | 11 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.3.3.3 | Medio de cultivo | 12 |
| 2.3.3.4 | Fitohormonas | 12 |
| 2.3.3.5 | Factores físicos | 13 |
| 2.3.4 | Enraizamiento <i>in vitro</i> de copihue | 14 |
| 2.3.5 | Aclimatación de especies | 16 |
| 3 | MATERIAL Y METODOS | 19 |
| 3.1 | Material biológico | 19 |
| 3.2 | Medio de cultivo y sustrato | 20 |
| 3.3 | Etapas del ensayo | 20 |
| 3.3.1 | Enraizamiento <i>in vitro</i> | 20 |
| 3.3.2 | Enraizamiento <i>ex vitro</i> | 22 |
| 4 | PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 24 |
| 4.1 | Efecto de tres auxinas y cuatro concentraciones sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de copihue | 24 |
| 4.1.1 | Porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento | 24 |
| 4.1.2 | Número de tallos | 27 |
| 4.1.3 | Longitud de tallos | 31 |
| 4.1.4 | Número de raíces | 34 |
| 4.1.5 | Longitud de raíces | 37 |
| 4.2 | Efecto del ácido indol butírico y tres concentraciones sobre el enraizamiento <i>ex vitro</i> de copihue | 40 |
| 5 | CONCLUSIONES | 42 |

| | | |
|---|--------------|----|
| 6 | BIBLIOGRAFÍA | 44 |
| 7 | ANEXOS | 49 |

INDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Copihue variedad Collinge | 19 |
| 2 | Porcentaje de sobrevivencia de <i>Lapageria rosea</i> Ruiz et Pav. según hormona y concentración hormonal utilizada | 24 |
| 3 | Porcentaje de enraizamiento de <i>Lapageria rosea</i> Ruiz et Pav. según hormona y concentración hormonal utilizada | 25 |
| 4 | Variabilidad en la longitud de tallos de copihue | 27 |
| 5 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de tallos de copihue para la fecha 1 | 28 |
| 6 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de tallos de copihue para la fecha 2 | 28 |
| 7 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de tallos de copihue para la fecha 3 | 29 |
| 8 | Interacción entre tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de tallos | 30 |
| 9 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de tallos de copihue para la fecha 1 | 31 |
| 10 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de tallos de copihue para la fecha 2 | 32 |
| 11 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud | 32 |

| | | |
|----|---|----|
| | de tallos de copihue para la fecha 3 | |
| 12 | Interacción entre tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de tallos para la fecha 3 | 33 |
| 13 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de raíces para la fecha 1 | 34 |
| 14 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de raíces para la fecha 2 | 35 |
| 15 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de raíces para la fecha 3 | 35 |
| 16 | Interacción entre tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de raíces para la fecha 3 | 36 |
| 17 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de raíces de copihue para la fecha 1 | 37 |
| 18 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de raíces de copihue para la fecha 2 | 38 |
| 19 | Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de raíces de copihue para la fecha 3 | 38 |
| 20 | Variabilidad en el número y longitud de raíces en plantas de copihue | 39 |
| 21 | Plantas de copihue en preaclimatación luego de tres semanas de trasplante | 41 |

INDICE DE ANEXOS

| Anexo | | Página |
|--------------|---|---------------|
| 1 | Concentración hormonal por tratamiento utilizado en el medio de cultivo de enraizamiento de copihue | 50 |
| 2 | Valores reales arrojados en la última medición realizada durante el ensayo | 51 |
| 3 | Porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de copihue | 52 |
| 4 | Prueba de Rangos Múltiples para cuatro variables evaluadas en el enraizamiento <i>in vitro</i> de copihue para la fecha 1 | 54 |
| 5 | Prueba de Rangos Múltiples para cuatro variables evaluadas en el enraizamiento <i>in vitro</i> de copihue para la fecha 2 | 55 |
| 6 | Prueba de Rangos Múltiples para cuatro variables evaluadas en el enraizamiento <i>in vitro</i> de copihue para la fecha 3 | 56 |
| 7 | Valor – P para el análisis de varianza y Test no paramétrico Kruskal – Wallis para todas las variables y fechas evaluadas | 57 |

RESUMEN

El copihue (*Lapageria rosea* Ruiz *et* Pav.) es una especie endémica de nuestro país, que presenta un serio problema de enraizamiento cuando se trata de propagación vegetativa manejada por el hombre, sin embargo, es capaz de reproducirse satisfactoriamente en su hábitat natural por medio de semillas. Es por esto que se han realizado diversos estudios basados en la micropropagación con el fin de reproducir la especie y lograr su enraizamiento.

En la presente investigación se ha planteado el uso de dosis específicas de auxinas sintéticas que permitan el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de plántulas de copihue mantenidas bajo condiciones de laboratorio, y su posterior aclimatación en invernadero.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile, donde se diseñaron dos ensayos. En el primero de ellos, enraizamiento *in vitro*, se utilizaron plántulas de copihue mantenidas en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ácido naftalén acético, las cuales fueron tratadas con ácido indol acético (AIA), ácido indol butírico (AIB) y ácido naftalén acético (ANA), en concentraciones de 0, 1, 5 y 10 μ M/L en medio WPM (Lloyd y McCown, 1980). Para la segunda etapa del ensayo, enraizamiento *ex vitro*, se utilizaron plántulas de la misma procedencia que en la primera etapa, tratadas con AIB en concentraciones de 0 mg/L, 25 mg/L por 24 horas y 1000 mg/L por 1 minuto en soluciones acuosas. Posterior al enraizamiento *ex vitro*, las plántulas serían llevadas a invernadero.

Las variables evaluadas para cada uno de los tratamientos fueron porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento, número de tallos, longitud de tallos, número de raíces y longitud de raíces.

Los resultados obtenidos luego de ser analizados estadísticamente indicaron que el mayor porcentaje de sobrevivencia se obtuvo con AIB y concentraciones de 0 μ M/L,

siendo estos de 43,8 y 80% respectivamente. Por su parte, el mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo con ANA (16,3%) y con una concentración de 5 $\mu\text{M/L}$ (18,3%).

En cuanto a las demás variables evaluadas, el mayor número y longitud de tallos fue obtenido por medio de la utilización de medios WPM que contenían AIA y concentraciones de 10 $\mu\text{M/L}$, donde los promedios fueron de 0,27 y 0,33 tallos por planta, y 0,34 y 0,35 cm, respectivamente.

El mayor número de raíces fue obtenido con ANA (0,50 raíces por planta) y con concentraciones de 10 $\mu\text{M/L}$ (0,78 raíces por planta). En cuanto a su longitud, la mayor de ellas se obtuvo con AIA con un promedio de 0,47 cm, y con concentraciones de 10 $\mu\text{M/L}$, obteniéndose raíces con una longitud de 0,68 cm.

No todas las variables fueron estadísticamente significativas, sin embargo, puede inferirse qué auxina y qué concentración fue la que obtuvo mejores resultados.

Para el enraizamiento *ex vitro* no se obtuvieron resultados positivos debido a la mortandad de las plántulas al ser traspasadas a condiciones de invernadero.

SUMMARY

Copihue (*Lapageria rosea* Ruiz *et* Pav.) is endemic in our country. It presents a serious problem when it comes to rooting in vegetative propagation managed by man. However, it is possible to reproduce it successfully by seed in its natural habitat. This is why there have carried out several studies based on micropropagation to reproduce the species and ensure its rooting.

In the present investigation the use of specific doses of synthetic auxins to induce *in vitro* and *ex vitro* rooting of copihue plantlets under laboratory conditions, and subsequent acclimatization in greenhouse, was studied.

This research was carried out at the Plant Tissue Culture Laboratory at the Institute of Plant Production and Health of Universidad Austral de Chile, where two experiments were designed. The first one, *in vitro* rooting, copihue plantlets maintained on Murashige and Skoog (1962) basal medium supplemented with benzyl amino purine (1 mg/L) and naphthalene acetic acid (0.1 mg/L) were used, which were treated with indole acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA) and naphthalene acetic acid (NAA) at concentrations of 0, 1, 5 and 10 μ M/L grown on WPM culture media (Lloyd and McCown, 1980). For the second phase, *ex vitro* rooting, plantlets from the same source as the first stage were treated with IBA at concentrations of 0 mg/L, 25 mg/L for 24 hours and 1000 mg/L for 1 minute in aqueous solutions. After *ex vitro* rooting, plantlets would be taken to the greenhouse.

The variables evaluated for each treatment were survival and rooting rate, number of stems, stem length, root number and roots length.

The results were statistically analyzed after being reported that the highest survival rate was obtained by IAA and concentrations of 0 μ M/L, being these of 43.8 and 80% respectively. On the other hand, the highest rooting rate was obtained with NAA (16.3%) and with concentrations of 5 μ M/ L (18.3%).

As for the other variables investigated, the highest number and length of stems was obtained through WPM media containing IAA and concentrations of 10 μ M/L, where the

averages were 0.27 and 0.33 stems per plant, and 0.34 and 0.35 cm in length, respectively.

The highest number of roots was obtained with NAA (0.50 roots per plant) and with concentrations of 10 $\mu\text{M/L}$ (0.78 roots per plant). About its length, the largest of which was obtained with IAA with an average of 0.47 cm, and concentrations of 10 $\mu\text{M/L}$, with roots with a length of 0.68 cm.

Not all variables were statistically significant, however, it can be inferred which auxin and which concentration yielded better results.

For *ex vitro* rooting no positive results were obtained due to mortality of plantlets to be transferred to greenhouse conditions.

1 INTRODUCCION

El copihue es una especie endémica de Chile, la cual crece en bosques húmedos y sombríos entre las regiones IV^a y X^a de nuestro país.

Posee flores de diversos colores variando desde el blanco hasta el rojo intenso. Florece desde el verano hasta fines de otoño, creciendo su tallo hasta 4 metros de altura.

Tiene un gran potencial ornamental, sin embargo, en las regiones del Bío – Bío y La Araucanía se ha abusado de su comercio como flor de corte, con lo cual ha disminuido el reservorio natural presente en estas zonas. En rigor, la única forma que existe de comercializar esta flor, es mediante la compra en viveros certificados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Se reproduce principalmente por semillas de forma natural, y por mugrones en vivero. Sin embargo, se han aplicado nuevas metodologías para su propagación, entre la que destaca el cultivo de tejidos *in vitro*, que permite obtener gran número de plantas en periodos cortos de tiempo, manteniendo variedades de interés y bajo condiciones asépticas.

El principal problema que acarrea la propagación *in vitro* y en vivero, es su difícil enraizamiento, por lo que se han realizado diversos estudios y ensayos en distintos países enfocados en la micropropagación, obteniéndose de éstos, resultados poco efectivos en cuanto a los medios de cultivo, y a las concentraciones específicas de auxinas utilizadas.

Se han utilizado distintas auxinas para la inducción del enraizamiento *in vitro* de otras especies, donde las más utilizadas han sido ácido indol acético (AIA), ácido indol butírico (AIB) y ácido naftalén acético (ANA). Los resultados variaron según la

concentración de la fitohormona y otras características del medio de cultivo como la fuente de carbohidratos y el agente solidificante.

Presentados estos antecedentes, se plantea como hipótesis que el uso de dosis específicas de auxinas sintéticas permiten el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de plántulas de copihue, y su aclimatación en invernadero.

Esta investigación tiene como objetivo general desarrollar un protocolo para el adecuado enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de copihue (*Lapageria rosea* Ruiz *et* Pav.) a partir de tejido cultivado *in vitro* y mejorar la aclimatación en condiciones de invernadero.

Dentro de los objetivos específicos se encuentran:

- Evaluar distintas concentraciones de auxinas sintéticas en copihue para su enraizamiento *in vitro*.
- Comprobar el enraizamiento *ex vitro* mediante el uso de ácido indol butírico en distintas concentraciones en invernadero.
- Determinar el éxito en la aclimatación de plántulas enraizadas *ex vitro*.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Generalidades y requerimientos ambientales del copihue (*Lapageria rosea* Ruiz et Pav.)

El copihue es una especie perteneciente a la familia *Philesiaceae*, la cual es originaria de Chile y Argentina, siendo ésta la única especie perteneciente a su género. En nuestro país se desarrolla en los bosques húmedos comprendidos entre las provincias de Valparaíso (33° L.S) hasta Llanquihue (43° L.S) (SEEMANN, 1984).

Esta especie se encuentra asociada a flora nativa del país, como coligüe (*Colliguaya odorifera*), quillay (*Quillaja saponaria*), y boldo (*Peumus boldus*) en la selva o bosque de la zona central; y con canelo (*Drimys winteri*), lingue (*Persea lingue*), y peumo (*Cryptocarya alba*), entre otras especies, en el bosque sureño (JORDAN *et al.*, 1983).

El copihue fue descrito en el año 1802 por dos botánicos españoles, Hipólito Ruiz y José Antonio Pavón en su publicación "*Flora peruviana et chilensis*", y fue bautizado con el nombre de *Lapageria* en honor a la primera esposa de Napoleón Bonaparte, la emperatriz Josefina Tasher de La Pagerie. Fue declarada como "flor nacional de Chile" mediante el Decreto Supremo N° 62 del Ministerio del Interior, que fue publicado en el Diario Oficial el 24 de febrero de 1977 (SEEMANN, 1984).

Esta monocotiledónea siempreverde posee tallos no herbáceos, flexibles y resistentes, llegando a alcanzar una altura aproximada de 4 metros (TOLEDO, 1984).

Sus hojas son simples y coriáceas, de forma oval – oblonga, con ápice apiculado y base acorazonada, de un tamaño de lámina entre 4 a 12 cm. de largo. Son pecioladas y poseen un color verde oscuro en el haz y verde claro por el envés, además de poseer nervadura reticulada, lo cual lo hace una excepción con respecto al resto de las monocotiledóneas (SEEMANN, 1984; FLORACHILENA, 2010).

Sus flores poseen una longitud aproximada entre 5 y 10 cm., son hermafroditas, solitarias y pediceladas. Están compuestas por 6 tépalos libres, variando su coloración entre el rojo, blanco y rosado. También poseen 6 estambres, un estilo largo, y un estigma trilobulado (FLORACHILENA, 2010).

La floración se presenta entre los meses de marzo y mayo, pudiendo también aparecer flores solitarias durante la época de verano (Gedda y Gedda, 1983, citados por BECERRA, 1999).

Su fruto es una baya, que tiene un tamaño entre 2 y 6 cm. de longitud, y un diámetro de 1 a 3 cm. En su interior se encuentran alrededor de 120 semillas de color amarillento, de forma esférica u ovoide, cubiertas por un tejido viscoso y dulce que es comestible (SEEMANN, 1984).

La raíz es profundizadora, la cual forma raíces secundarias carnosas, muy sensibles al trasplante, lo cual es un gran inconveniente al querer cultivarlas desde un ambiente artificial (SEEMANN, 1984).

El copihue es una especie que se destaca por poseer un crecimiento continuo a través del año, reduciéndose éste cuando se encuentra en receso. Durante la floración disminuye la velocidad de elongación del tallo, no así su expansión foliar, siendo simultáneos su crecimiento vegetativo y reproductivo. Su máxima actividad fotosintética se ve reflejada en verano, cuando hay una leve detención de crecimiento (TOLEDO, 1984).

Para SEEMANN (1984) el copihue debe cultivarse en suelos de preferencia ligeramente ácidos (pH 5 – 6), que posean una buena aireación, buen drenaje, alto contenido de materia orgánica, y muy fértiles.

El copihue crece de preferencia en lugares marginales del bosque, ya que la intensidad luminosa no debe ser inferior al 20 % de la luz exterior (TOLEDO, 1984).

La temperatura requerida por esta planta fluctúa entre los 5 y 25° C. Es capaz de soportar heladas moderadas, sin embargo, los brotes tiernos pueden sufrir algún estrés debido a éstas (SEEMANN, 1984).

El vivero “El Vergel” ubicado en Angol, dedicado a la propagación de copihue, ha editado un catálogo donde se incluyen algunas variedades de copihue, entre las que destacan Ligtromu, Nahuelbuta, Colcopiu, Collinge, Relmutrai, Contulmo, Raimilla, Cobquecura, El Vergel, Toqui, Rayén y Caupolicán (SEEMANN, 1984).

A su vez, CHAIT y PLAZA (2009) describen las características florales de 25 variedades, las cuales fueron diferenciadas según su color, tamaño, distribución del color en la flor, intensidad de color, grosor de tépalos, tipo de abertura floral y número de tépalos. Las variedades mencionadas se encuentran disponibles en la

Comercializadora de Copihues Orgánicos Ltda., ubicada en la Región de La Araucanía, la cual los comercializa bajo el nombre de Alupra Copihues Premium (www.alupra.cl).

2.2 Sistemas de multiplicación de la especie

Según MAACK (1984), el copihue se caracteriza por poseer dos tipos de propagación, estas son de forma natural por medio de semillas, y de forma artificial o vegetativa.

2.2.1 Multiplicación por semillas. Para el uso de semillas, éstas deben ser frescas y extraídas de frutos recién cosechados, ya que pierden rápidamente su poder germinativo. Éstas pueden lavarse, eliminando el mucílago que las recubre, o bien, utilizarse con él incorporado. SEEMANN (1984) afirma, que se logra una alta germinación sembrando estas semillas en un sustrato compuesto de 50% de tierra de hojas y 50% de arena, cubriéndolas con una capa de alrededor 1 cm. de esta mezcla. A partir de la cuarta semana después de la siembra, y con una temperatura entre los 20 y 25 ° C se puede observar la emergencia de las primeras plántulas.

Según lo descrito por MAACK (1984), se recomienda realizar este procedimiento en un ambiente protegido, ya que el proceso de floración se reduce notablemente (2 a 3 años), en comparación con uno al aire libre donde demoran entre 6 a 7 años en florecer.

2.2.2 Multiplicación vegetativa. Este método de propagación consiste principalmente en la mantención de las características deseadas de una variedad, obteniéndose así plantas genéticamente idénticas a la planta madre (SEEMANN, 1984). A continuación se describen tres tipos de propagación vegetativa en copihue:

2.2.2.1 Mugrón o acodo aéreo. Este tipo de multiplicación se realiza enterrando una guía o brote lateral en una caja o macetero que contenga un sustrato similar al utilizado en la multiplicación por semillas. Una vez que ésta ha enraizado puede separarse de la planta madre, y ser trasplantada por separado (SEEMANN, 1984).

Según MAACK (1984), es el método más utilizado para la propagación vegetativa de la especie, sin embargo, realza que ésta técnica tarda alrededor de dos años de cultivo para poder obtener plantas nuevas.

2.2.2.2 Esquejes o estacas. Consiste en poner a enraizar brotes maduros (no leñosos) con 3 a 4 yemas que son cortados de la parte apical de la planta, los cuales se ubican en un sustrato similar al anteriormente nombrado. Principalmente se requiere de bandejas o macetas cubiertas con un polietileno donde plantarlas, para evitar la deshidratación de los esquejes. También debe evitarse la exposición directa al sol, pero en un lugar luminoso, además de procurar mantener temperaturas alrededor de los 20° C, que es la ideal para su desarrollo. Sin embargo, el estaquillado de copihue, en general, ha sido poco exitoso, debido, probablemente, por la existencia de un anillo de células esclerenquimáticas, que impiden la salida de nuevas raíces (SEEMANN, 1984; GUTIERREZ, 1988).

2.2.2.3 Micropropagación. Esta técnica de propagación consiste en la multiplicación *in vitro* del copihue, mediante el cultivo de distintas secciones de plántulas, como: yemas axilares (JORDAN *et al.*, 1983, SEEMANN, 1983, BARRALES *et al.*, 1987, McKINLESS Y ALDERSON, 1988, 1991, y 1993), yemas terminales (JORDAN *et al.*, 1983), yemas de rizoma y ovarios (BARRALES *et al.*, 1987).

2.3 Micropropagación de especies vegetales

Esta técnica consiste en la propagación vegetativa de plantas mediante el cultivo *in vitro* de meristemos, yemas o cualquier tejido u órgano de una planta, también denominado explanto. MEDEROS *et al.*, (2002) afirman que las aplicaciones más importantes de esta técnica en agricultura se orientan a la propagación, saneamiento y mejora genética.

2.3.1 Etapas de la micropropagación. HARTMANN y KESTER (1994) diferencian cuatro etapas:

- Establecimiento: consiste en el establecimiento de un explante estéril en un medio de cultivo. Los factores que afectan esta etapa incluyen la selección del explante, eliminación de contaminación de éste, y las condiciones ambientales del medio donde se cultive.
- Multiplicación: el objetivo de esta etapa es incrementar el número de propágulos, para luego ser enraizados en un nuevo medio de cultivo.

- Pretrasplante: consiste en preparar a la plántula para ser llevada a condiciones *ex vitro*, donde se promueve la iniciación de raíces y el alargamiento del tallo.
- Trasplante: etapa que abarca la transferencia de las plántulas desde un medio aséptico de cultivo a uno de vida natural.

2.3.2 Ventajas y desventajas de la micropropagación. Las principales ventajas que presenta esta forma de multiplicación de especies vegetales son que permite obtener un alto volumen de plantas en períodos cortos de tiempo; hay una rápida liberación de nuevas variedades o clones; el tiempo de multiplicación es menor; se puede propagar independiente de las condiciones medioambientales; presenta un aumento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y saneamiento; garantiza homogeneidad; facilidad en la comercialización de plantas; permite la programación de cultivos a lo largo del año; creación de bancos de germoplasma, y por último, asegura buena calidad sanitaria (FUENTEVILLA, 2004).

Una de las principales desventajas es la infraestructura necesaria para realizar tales procedimientos, las cuales tienen un alto costo y en muchas ocasiones no se justifica tal inversión. También se indica como desventaja el requerimiento de personal capacitado y adiestrado para realizar los procedimientos en laboratorio, y por último, al introducir a cultivo *in vitro* especies que contengan patógenos, éstos se multiplicarán rápidamente, teniendo así gran cantidad de material contaminado (HARTMANN y KESTER, 1994).

2.3.3 Principales factores incidentes sobre la micropropagación. La micropropagación puede verse afectada por distintos factores tanto bióticos como abióticos, estos son:

2.3.3.1 Planta madre. Según MURASHIGE (1974) el estado fisiológico de la planta madre y la época en que el explante es extraído de ésta pueden afectar el potencial organogenético.

2.3.3.2 Explante. La edad fisiológica del explante tiene una gran influencia en la morfogénesis. Si el tejido es más joven y menos diferenciado al sembrar, mejor será la

respuesta que tenga al ser cultivado en condiciones *in vitro*. A partir de secciones de tallo cercanas a los ápices caulinares, se puede producir una mayor cantidad de meristemoides en comparación con los que pueden producirse de la porción baja del tallo.

En la selección del explante se toma en cuenta el tipo de propagación que tenga la planta. Para especies propagadas de forma vegetativa, la fuente de los explantes son los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos; por otra parte, el tamaño del explante también juega un rol importante en la respuesta que se tenga en el cultivo *in vitro* (George y Sherrington, 1984 citado por BECERRA, 1999).

2.3.3.3 Medio de cultivo. Según SEEMANN (1993), la composición química del medio de cultivo es un factor importante en la morfogénesis. Éste se compone de macro y microelementos, aminoácidos, vitaminas, fitohormonas, carbohidratos y un gelificante. FUENTEVILLA (2004) afirma que “la constitución del medio de cultivo depende de la planta (genotipo), de las interacciones de éste con el ambiente (factores físicos), del tamaño del explante y del objetivo o etapa de la micropropagación”.

No existe un medio de cultivo universal a ser utilizado en la propagación de plantas *in vitro*, sin embargo, el medio basal MS propuesto por Murashige y Skoog (1962) con alguna variación de sus ingredientes, ha sido el más utilizado para esta técnica (Izquierdo y Quiones, 2001 citado por FUENTEVILLA, 2004).

El establecimiento de cultivos *in vitro*, así como también su posterior propagación clonal, se ven afectados por problemas que reducen considerablemente las posibilidades de éxito; entre los que destacan la contaminación y pardeamiento de explantes y del medio de cultivo (SEEMANN, 1993).

2.3.3.4 Fitohormonas. Las fitohormonas o reguladores del crecimiento son sustancias mensajeras, las cuales se activan a muy bajas concentraciones. Éstas promueven el crecimiento y diferenciación celular, por lo tanto, el crecimiento en longitud de la planta, la iniciación de la formación de la radícula y de las raíces adventicias. También estimulan la floración, el crecimiento y maduración de frutos, la senectud y el geotropismo (BENITEZ *et al.*, 2004).

Las auxinas están relacionadas con actividades fisiológicas de las plantas, tales como el crecimiento del tallo, la inhibición de yemas laterales, la abscisión de hojas y frutos,

el desarrollo de los frutos, la activación de las células del cambium, entre otras. Las auxinas producidas de forma natural son sintetizadas en las yemas apicales y en las hojas jóvenes, moviéndose desde el ápice a las base de las plantas. Existen compuestos químicos sintéticos que poseen actividad auxínica, entre los que destacan el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolbutírico (AIB), y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 – D) (HARTMANN y KESTER, 1994).

Según RETAMALES (2007), las giberelinas participan en muchas funciones asociadas a la elongación de tejidos y respuestas mediadas por fitocromo. Éstas tienen por función la elongación y expansión celular, estimulación de la germinación de semillas, estimulación de la actividad de α – amilasa en semillas, elongación de tallos florales en bulbos vernalizados, y reversión de “enanismo fisiológico”. La giberelina más conocida lleva por nombre GA₃ o bien, ácido giberélico.

HARTMANN y KESTER (1994) indican que las giberelinas no son necesarias para la iniciación de raíces adventicias en estacas de tallo, por su parte, existen pruebas en diversas especies de plantas donde se muestra inhibición del enraizamiento.

Por otra parte, las citoquininas son sustancias químicas que estimulan la división celular. Existen diversos compuestos naturales y sintéticos que poseen actividad de citoquininas, así como la adenina, la kinetina y la 6 – benziladenina (BA).

Según HARTMANN y KESTER (1994) se ha demostrado en segmentos de tallo de tabaco que cuando la concentración de auxina es relativamente alta se favorece la formación de raíces adventicias, pero se impide la formación de yemas. A su vez, cuando los niveles de adenina y kinetina se encuentran en niveles altos en la planta, hay formación de yemas, pero se inhibe la formación de raíces.

2.3.3.5 Factores físicos. Para HARTMANN y KESTER (1994) la organogénesis puede ser afectada por distintos factores abióticos como lo son la luz, la temperatura, la consistencia y pH del medio de cultivo, la polaridad del explante, la humedad relativa y la fase gaseosa del medio de cultivo. La temperatura de incubación para la mayoría de las especies propagadas fluctúa entre los 24 y 28 °C. La luz, que también cumple un rol determinante en el crecimiento y desarrollo del explante, está involucrada en la diferenciación de órganos. Los componentes que afectan al explante en cuestión son la intensidad, el fotoperiodo y su calidad.

2.3.4 Enraizamiento *in vitro* de copihue. GARCIA *et al.* (2007) indican que la organogénesis es un evento morfológico que se caracteriza por su desarrollo unipolar, es decir, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote vegetativo, donde siempre existe una conexión entre los nuevos brotes y el tejido parental. Estos brotes son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa. Por su parte, la rizogénesis es el fenómeno de organogénesis más implicado en la multiplicación vegetativa. El estudio de este fenómeno pretende tener más en cuenta las interacciones complejas de factores, pero queda dominado por el problema de la regulación hormonal y en particular por el rol que cumplen las auxinas en la organogénesis (Sivory, 1980 y Hu y Wang, 1983, citado por GARCIA *et al.*, 2007). Respecto del origen de los meristemos de raíz, se distinguen varias categorías, donde los meristemos laterales de la raíz principal se forman de una manera espontánea en condiciones naturales; los meristemos adventicios son producidos por órganos diversos (tallo, tubérculo, bulbo, hoja, etc.) ya sea espontánea o accidentalmente, como consecuencia de una herida; y los meristemos neoformados a partir de un callo en cultivo *in vitro* pueden ser considerados como un caso particular de meristemos adventicios.

La intervención de las auxinas en el enraizamiento de plantas en el estado inicial de crecimiento de las raíces se divide en dos estados: cuando la auxina se encuentra activa, la cual se encuentra presente continuamente, y proviene de brotes terminales o laterales o de una aplicación externa. La segunda etapa o etapa inactiva es cuando la auxina se encuentra en la raíz alrededor de cuatro días más, pero no tiene ningún efecto adverso en su formación. Ocurrido todo ésto, comienza la etapa de elongación de los primordios radicales, donde la nueva raíz atraviesa la corteza hasta emerger de la epidermis del tallo, para lo cual, la nueva raíz ya ha formado su sistema vascular que se encuentra fusionado a los tejidos vasculares del tallo; una vez que se ha llegado a esta etapa, no hay mayor respuesta a las auxinas (GARCIA *et al.*, 2007).

Para la propagación de copihue se han utilizado distintos medios de cultivo, con distintas concentraciones hormonales, los cuales difieren según el autor y la sección de la plántula utilizada en cada caso. Así SEEMANN (1983) utilizó como material vegetal en su ensayo explantes de 2 mm de grosor, los cuales fueron obtenidos de brotes laterales de plántulas de dos años de edad. Como medio de cultivo utilizó macroelementos según Knudson (1946), y microelementos de acuerdo a Heller (1953),

al cual agregó como fuente de hierro FeNa EDTA, vitaminas y aminoácidos según lo planteado por Nitsch y Nitsch (1969), y como fuente de carbohidratos se utilizó sacarosa. Las fitohormonas utilizadas fueron naftalénacetato de potasio (KNA) y bencilaminopurina (BAP). Con este medio de cultivo el 50% de los explantes presentó después de 60 días un buen desarrollo de callo, y presencia de centros meristemáticos, para su posterior división. Además, el autor afirma que al agregar una mayor concentración de auxinas al medio de cultivo y eliminando las citoquininas, se promueve el desarrollo de raíces, observándose a los 130 días la presencia de éstas en la totalidad de explantes, variando entre 3 y 10 raíces por brote.

Por su parte, el medio para la regeneración de plántulas de copihue mediante cultivo de tejidos utilizado por JORDAN *et al.* (1983) fue Murashige Skoog (1962) y Jordan *et al.* (1978) suplementado con ANA, AIA, AIB, GA₃, Kinetina y BAP. El medio MS suplementado con ANA no presentó formación de raíces durante un período de 2 meses, no obstante, al suplementar con AIA hubo un 80% de formación de raíces del total de explantes, en aproximadamente 2 semanas.

BARRALES *et al.* (1987) utilizó distintos medios: White, Harada, Anderson y Murashige Skoog, adicionando ANA, BAP y GA₃, 6 – gg – dimetilaminopurina (2iP), carbón activado, y zeatina. El tratamiento aplicado a yemas de rizoma no dio resultados positivos en la inducción de formación de raíces. Sin embargo, logró enraizamiento en medio Anderson con carbón activado y sacarosa, al igual que Harada (1975), debido a que este medio es de baja molaridad, además de que los tallos en crecimiento sintetizan auxinas, que son esenciales en la diferenciación de raíces.

McKINLESS y ALDERSON (1988) utilizaron el medio Murashige y Skoog (1962) utilizando BAP, ANA y paclobutrazol como reguladores de crecimiento. Los resultados arrojados en este ensayo indican que de la mayoría de las yemas de rizoma cultivadas en el medio con paclobutrazol no se obtuvo un crecimiento visible de raíces. Sin embargo, al cambiar al medio Woody Plant Medium (WPM) propuesto por Lloyd y McCown, 1980, con 10 µM de ANA se observó un 76% de enraizamiento en un período de 30 días.

Estos mismos autores, en el año 1991 utilizaron el medio MS para la inducción de yemas de rizoma, de yemas axilares o aéreas, siguiendo con la proliferación de yemas de rizoma en el medio WPM. Como medio de enraizamiento utilizaron el medio Lloyd y

McCown (1980) con 10 μM de ANA, donde los explantes cultivados mostraron formación de raíces a los 21 días de cultivo, con un rango entre 0 y 5 mm de longitud. En el año 1993, McKINLESS Y ALDERSON, estudiaron la inducción de la emergencia de raíces de yema de rizomas después de su proliferación con paclobutrazol, donde se indujeron brotes aéreos con el medio Murashige y Skoog (1962) 6 – benciladenina (BA) y paclobutrazol. Para el enraizamiento de yemas de rizoma se utilizó el medio para plantas leñosas WPM. De este trabajo destacan que un medio de cultivo con una buena concentración de sacarosa, pero carente de otros componentes, puede ser un buen medio para el enraizamiento de copihue, y que ni el inositol, vitaminas, sales minerales y ANA tienen alguna influencia sobre el número de raíces en los brotes. Sin embargo, altas concentraciones de ANA (10 μM) influyen el largo de raíces, en comparación a 0 y 1 μM , y que el agente solidificante no tuvo ningún efecto aparente sobre el número de raíces.

BECERRA (1999) realizó un ensayo con la variedad Collinge de copihue, donde el medio de enraizamiento fue WPM, el mismo que utilizaron McKinless y Alderson (1991). En este ensayo destacó la concentración de sacarosa, que fue el principal estimulante en la emergencia de raíces, no así la utilización de paclobutrazol. Sin embargo, los datos arrojados no fueron estadísticamente significativos, por lo que no se pudo inferir qué concentración fue la más adecuada para inducir la rizogénesis.

La misma autora realizó dos ensayos más con variedades distintas de copihue, arrojando el mismo resultado anterior. Esto quiere decir que la aplicación de auxinas, antigiberelinas y sacarosa, no permiten diferenciar una respuesta clara en el desarrollo radical.

2.3.5 Aclimatación de especies. Debido a que no existen estudios sobre la aclimatación *ex vitro* de copihue que permitan proponer o mejorar un protocolo para este fin, se darán a conocer algunos aspectos fundamentales sobre el tema en cuestión.

La aclimatación se refiere a un proceso durante el cual plantas u otros organismos son ajustados o acostumbrados a un nuevo clima o situación ambiente como el resultado de un proceso natural (PREECE y SUTTER, 1991).

Un número importante de plantas micropropagadas no sobreviven la transferencia desde condiciones *in vitro* a invernadero o ambientes de campo. Los invernaderos y

campo poseen menor humedad relativa, mayores niveles de luminosidad, ambientes sépticos, los que son estresantes para plantas micropropagadas en comparación con aquellas *in vitro*. Cualquier sistema de micropropagación es considerado benéfico cuando el trasplante de las plántulas desde cultivo *in vitro* a ambientes *ex vitro* es exitoso. La mayoría de las especies que crecen en condiciones *in vitro* requieren de un proceso de aclimatación para asegurar un alto porcentaje de sobrevivencia de plantas, además de crecer vigorosas al ser transferidas al suelo (HAZARIKA, 2003).

Existen factores anatómicos, morfológicos y fisiológicos que deben ser considerados al trasplantar plantas desde condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Entre ellos se puede destacar el **estrés por agua**, que puede resultar de una excesiva transpiración de algunas partes de la planta, especialmente las hojas, aunque de igual modo puede darse cuando las raíces son poco eficientes en la absorción de agua. Las principales vías de pérdida de agua desde la hoja son la cutícula, los estomas, y en menor importancia se encuentran los hidatodos. La **anatomía de la hoja, tallo y raíz** también deben tenerse en consideración, así las hojas de plantas cultivadas *in vitro* son más delgadas, tienen muy poco desarrollada la capa de células en empalizada con un mayor espacio de aire del mesófilo, algunos pecíolos no poseen colénquima, y también poseen una pequeña cantidad de fibras de floema; además las hojas poseen una menor cantidad de contenido citoplasmático, y un pobre desarrollo de cloroplastos. Por su parte los tallos son más delgados, y poseen una cantidad considerablemente menor de colénquima y esclerénquima como tejido de soporte. Las raíces al igual que los tallos, tienden a ser mucho más delgadas, se encuentran cubiertas de pelos radiculares y poseen menos peridermis que aquellas que se encuentran en plantas cultivadas *ex vitro*. Por último, la **fotosíntesis** se convierte en una herramienta fundamental en las plantas que son trasplantadas, ya que son forzadas de ser heterotróficas a autotróficas. Las plantas en cultivo *in vitro* reciben los carbohidratos desde el medio de cultivo y no deben obtenerlo desde sus órganos de reserva, en este caso las hojas; y la luz que emite el sol es proporcionada por medio de luz artificial (PREECE y SUTTER, 1991)

FUENTEVILLA (2004) indica que para llevar plantas tanto enraizadas como no enraizadas a un medio *ex vitro*, se deben lavar para eliminar completamente restos de agar y posibles fuentes contaminantes, para luego ser trasplantadas a una mezcla de suelo estándar pasteurizada, en macetas pequeñas. Inicialmente, éstas se deben

proteger bajo algún tipo de sombreadero, con alta humedad relativa, o bien, bajo niebla.

Boutherin y Bron (1994) citado por FUENTEVILLA (2004), señalan que las raíces nacidas en un medio de cultivo *in vitro* son extremadamente frágiles, y que al ser traspasadas a un sustrato, mueren. Por lo tanto, se hace necesario esperar a la formación y crecimiento de nuevas raíces para que la planta se nutra. En esta etapa se deberá tener los mismos cuidados nombrados anteriormente: humedad elevada, temperatura cercana a los 20°C, sombreado eventual, y un especial cuidado en enfermedades que puedan atacar.

3 MATERIAL Y METODO

Esta 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 la especie *Lapageria rosea* Ruiz *et* Pav., utilizando distintas sustancias auxínicas para inducir enraizamiento, a finales del año 2010.

3.1 Material biológico

Para realizar este ensayo el material vegetal se obtuvo a partir de plántulas de copihue variedad Collinge (Figura 1), la cual posee flores de tamaño mediano, blancas con borde rojo o morado, mantenidos en medio basal propuesto por MURASHIGE y SKOOG (1962) suplementado con 1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA, conservados en el Banco de Germoplasma de plantas nativas de la Universidad Austral de Chile.



FIGURA 1 Copihue variedad Collinge.

FUENTE: <http://www.roselandhouse.co.uk/climbers/lapageriacollinge>

3.2 Medio de cultivo y sustrato

El medio de cultivo que se utilizó para la etapa de enraizamiento *in vitro* fue WPM (Anexo 2), al cual se le agregaron auxinas (AIA, ANA, y AIB) en distintas concentraciones, para favorecer el crecimiento radical de los explantes. Para los testigos se preparó el mismo medio, pero sin adición de hormonas, para no afectar el crecimiento de las plántulas por efecto hormonal.

El medio de cultivo se preparó en base a soluciones madre en frascos de 8 cm de altura y 2,5 cm de diámetro, tapados con una lámina de papel aluminio, esterilizados durante 15 minutos en autoclave a 1,2 atmósferas de presión y a 121° C.

Para la etapa de aclimatación se preparó un sustrato de uso hortícola (arena/turba en una proporción 1:1) tinalizado en autoclave, el cual se dispuso en bandejas plásticas transparentes rectangulares. Las microplántulas fueron tratadas con soluciones acuosas de AIB para inducir su enraizamiento *ex vitro*.

3.3 Etapas del ensayo

Esta investigación se realizó en dos etapas, la primera de ellas consistió en la multiplicación de la especie y enraizamiento *in vitro* de ésta durante 90 días y, la segunda, en el enraizamiento *ex vitro* de plántulas y su posterior aclimatación en invernadero, evaluando su comportamiento por un período de 30 días.

3.3.1 Enraizamiento *in vitro*. El primer paso consistió en multiplicar las plántulas de la variedad Collinge de copihue existentes en el Banco germosplasma del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, para conseguir el número de explantes necesarios para montar el ensayo.

La multiplicación y homogenización de los explantes se realizó en una cámara de flujo laminar que aseguró la asepsia del proceso, utilizando también materiales de disección estériles (bisturí y pinzas).

Una vez que las plántulas alcanzaron alrededor de 2,5 cm de altura, fueron disectadas, dejando explantes homogéneos de un solo tallo. Dado que las plántulas de origen se encontraban contaminadas con bacterias, se las remojó por 3 minutos en hipoclorito de sodio al 10% de producto comercial, luego lavadas en agua destilada estéril para evitar toxicidad por cloro, y finalmente remojadas en una solución antibiótica compuesta por 100 mg/L de Penicilina y 0,25 mg/L de Streptomina durante 30 minutos. Luego se

procedió a traspasar los nuevos explantes al medio WPM con las distintas concentraciones de auxina.

Todos los tratamientos, se mantuvieron en una cámara de incubación a 22 ± 3 °C un fotoperíodo de 16 horas, y una intensidad lumínica entre 2.000 a 4.000 lux (50 a 60 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{seg}$).

Para este ensayo se usaron como tratamientos auxínicos: ácido indol acético, ácido naftalén acético y ácido indol butírico, en cuatro concentraciones cada una (0 – 1 – 5 y 10 $\mu\text{M}/\text{L}$). De cada uno de los tratamientos se realizaron veinte repeticiones, siendo la concentración de 0 $\mu\text{M}/\text{L}$ el medio testigo preparado sin hormonas (Ver Anexo 1 de concentraciones en mg/L).

El diseño experimental fue ordenado como un diseño factorial 3x4, donde el primer factor es la hormona con tres niveles (AIA, AIB y ANA), y el segundo factor correspondió a la concentración de éstas con cuatro niveles (0, 1, 5 y 10 $\mu\text{M}/\text{L}$). Cada unidad experimental consistió en un frasco con 10 mL de medio de cultivo con su respectiva concentración hormonal. Cada tratamiento constó de 20 repeticiones cada uno.

Las evaluaciones fueron realizadas mensualmente durante 3 meses, a partir del asentamiento de las plántulas en el medio WPM, siendo estas:

- Fecha 1: 30 días después de la siembra (13.10.2010),
- Fecha 2: 60 días después de la siembra, y
- Fecha 3: 90 días después de la siembra.

Las variables evaluadas durante esta etapa fueron:

- porcentaje de sobrevivencia (%),
- porcentaje de enraizamiento (%),
- número de tallos (n°),
- longitud de tallos (cm),
- número de raíces (n°), y
- longitud de raíces (cm).

Las variables continuas para esta etapa del ensayo (longitud de tallos y longitud de raíces) fueron analizadas mediante el análisis de varianza ANDEVA y Test de Duncan

(95% de confianza), siempre que cumplieran los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad, mientras que las variables discretas (número de tallos y número de raíces) y aquellas que no fueron significativas para ser analizadas mediante ANDEVA, fueron analizadas mediante el test no paramétrico de Kruskal–Wallis y las comparaciones múltiples de Dunn al 95% de confianza. Los valores porcentuales de enraizamiento y sobrevivencia fueron expresaron como una proporción del total de las observaciones por tratamiento.

Los datos fueron analizados estadísticamente por medio del programa Statgraphics Centurion XV.II para cada una de las mediciones realizadas durante el ensayo, con lo cual se pudo determinar el crecimiento de tallos y raíces durante el tiempo de evaluación.

3.3.2 Enraizamiento *ex vitro*. Como se mencionó anteriormente, este proceso constó de dos etapas, las cuales serían preaclimatación y aclimatación en invernadero.

Preaclimatación. En esta etapa del ensayo las plántulas provenientes del Banco de Germoplasma de la UACH se homogeneizaron a una altura de 2,5 cm de altura aproximadamente, las cuales fueron lavadas para retirar excesos del medio de cultivo en el cual se encontraban. Una vez realizado esto, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 10% de producto comercial durante 3 minutos para ser desinfectadas, y luego sumergidas en la misma solución antibiótica que la etapa anterior durante 30 minutos. Posteriormente se sumergió la base de las plántulas en solución acuosa de AIB en tres concentraciones: 0 ppm o testigo, 25 mgL⁻¹ por 24 horas, y 1000 mgL⁻¹ por un minuto, para luego ser traspasadas a bandejas con el sustrato preparado. Cada tratamiento se montó sobre tres bandejas rectangulares, las cuales contenían 10 plántulas cada una, por lo que se requirieron 90 plántulas o unidades experimentales.

Las plántulas fueron preaclimatadas por un período de dos semanas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad, donde el fotoperiodo era de 16 horas, la intensidad lumínica de 2.000 lux, y una temperatura entre 10 a 18 °C.

Esta etapa consideraba la aclimatación definitiva en invernadero, bajo las condiciones ambientales de temperatura y luminosidad existentes en la época (octubre – noviembre), utilizando un sistema de nebulización, que aportaría las necesidades

hídricas de las plántulas, sin embargo, no fue posible llevarla a cabo debido a la mortandad de plántulas en la primera etapa.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Efecto de tres auxinas y cuatro concentraciones sobre el enraizamiento *in vitro* de copihue

Los resultados obtenidos indicaron que tanto la hormona como la concentración utilizada tuvieron algún efecto sobre las variables consideradas en el estudio. Para dar a conocer cada uno de los efectos causados por los tratamientos sobre las plantas mantenidas en cultivo *in vitro*, el capítulo se dividirá según la variable evaluada, las cuales fueron:

4.1.1 Porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento. La evaluación se realizó según la auxina y según la concentración hormonal de éstas utilizada en cada tratamiento. Debido a la similitud de los datos para estos dos parámetros, no pudo realizarse un análisis estadístico, por lo que se hizo una comparación porcentual de las medias de cada tratamiento (ANEXO 3).

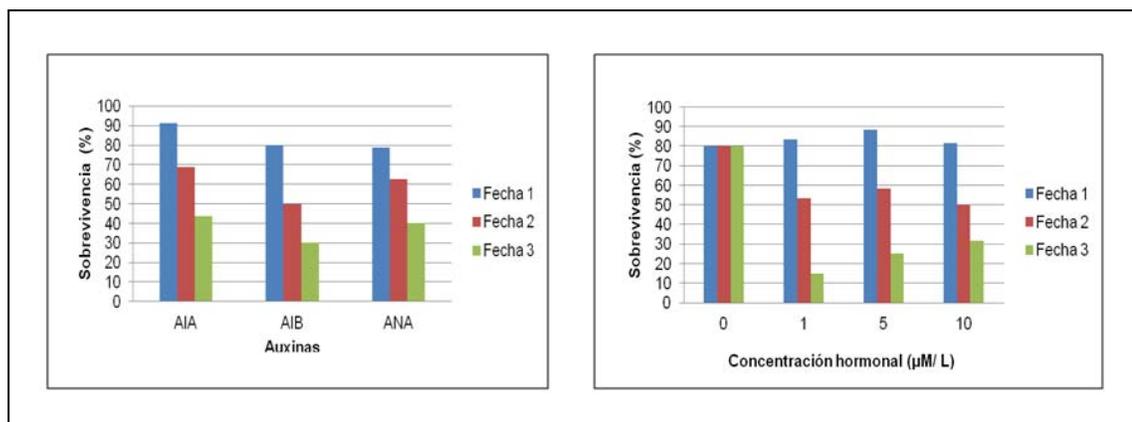


FIGURA 2 Porcentaje de sobrevivencia de *Lapageria rosea* Ruiz et Pav. según hormona y concentración hormonal utilizada

Como se puede apreciar en la Figura 2, la auxina AIA presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia para todas las mediciones realizadas, obteniéndose un 43,75% en la última medición, por su parte, la menor respuesta se vió reflejada en los tratamientos donde se agregó AIB al medio de cultivo con un 30% de sobrevivencia.

Por su parte, la concentración de 0 $\mu\text{M/L}$ mantuvo constante en un 80% la sobrevivencia de plantas a través de todo el ensayo, sin embargo, las demás concentraciones siguen una tendencia decreciente a través de las mediciones, donde se obtuvo el resultado más bajo con 1 $\mu\text{M/L}$ con un 15% de sobrevivencia de explantes.

SEEMANN (1983) obtuvo un 40% de sobrevivencia de plántulas provenientes de yemas axilares al utilizar naftalénacetato de potasio (KNA) en concentraciones de 0,1 – 0,2 y 0,5 mg/L en el medio de enraizamiento de copihue, sin embargo, transcurridos 60 días de la medición, el porcentaje de sobrevivencia se redujo a la mitad por contaminación del material.

Por su parte AULT (1995), realizó un experimento donde utilizó 0 – 4,14 y 8,29 $\mu\text{M/L}$ de AIB y 0 – 4,46 y 8,92 $\mu\text{M/L}$ de ANA en el medio de enraizamiento de *Lachenalia spp.*, especie monocotiledónea ornamental, obteniendo entre 93 a 95% de sobrevivencia en plantúlas enraizadas, y entre 71 a 91% de sobrevivencia en aquellas no enraizados, después de 10 semanas de cultivo. En ninguno de los dos casos se hace referencia a cuál de las hormonas y cuál de las concentraciones es más efectiva en el % de sobrevivencia.

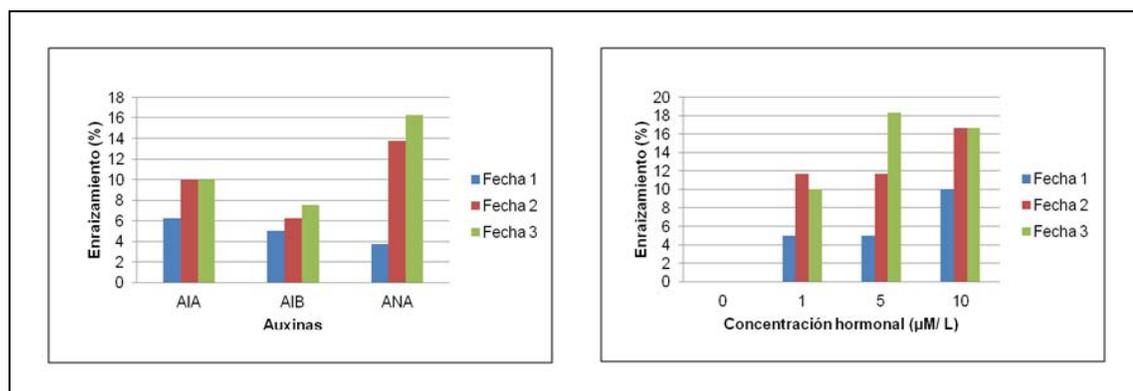


FIGURA 3 Porcentaje de enraizamiento de *Lapageria rosea* Ruiz et Pav. según hormona y concentración hormonal utilizada

Si bien ANA resultó ser la hormona con mayor éxito en el enraizamiento del ensayo, ésta no superó el 16,25%, porcentaje bajísimo en comparación a MCKINLESS y ALDERSON (1988 y 1993) que obtuvieron entre un 76 y hasta un 100% de enraizamiento respectivamente, utilizando la misma hormona.

Los resultados para la concentración hormonal arrojados indican que en la última medición (Figura 3) la concentración 5 $\mu\text{M/L}$ fue aquella donde se encontró mayor enraizamiento (18,33%), seguida de 10 $\mu\text{M/L}$ donde el porcentaje de enraizamiento no superó el 16,67%.

SEEMANN (1983) a los 130 días de subcultivo de yemas axilares obtuvo un 100% de enraizamiento con KNA (0,2 mg/L), haciéndose presente raíces en todos los explantes tratados.

JORDAN *et al.* (1983) utilizó un medio de cultivo que contenía 10 – 50 mg/L de ANA, el cual no dio resultado tras dos meses de incubación, sin embargo, al cambiar los explantes en un medio enriquecido con 0,5 mg/L de AIA, obtuvo un 80% de enraizamiento.

MCKINLESS y ALDERSON (1988) utilizaron 10 $\mu\text{M/L}$ de ANA en medio WPM ajustado con dos pH distintos, el que fue ajustado a pH 5,2 obtuvo un 76% de enraizamiento en 30 días, y al ser ajustado a pH 4,0 obtuvo el mismo porcentaje pero en 50 días.

Ensayos realizados por SHIGETA *et al.* (1996) en espárrago (*Asparagus officinalis* L.), indican que utilizando 0,1 mg/L de ANA y una adecuada concentración del agente gelificante del medio de cultivo se puede lograr entre un 40 y un 96% de enraizamiento. Esta especie posee un hábito de crecimiento y enraizamiento *in vitro* similar al copihue.

AULT (1995) utilizó 4,14 y 8,29 $\mu\text{M/L}$ de AIB en el medio de cultivo para enraizamiento de *Lachenalia spp.*, lo cual arrojó un porcentaje de enraizamiento de un 81% para ambas concentraciones. También estudió el efecto de ANA en una concentración de 8,92 $\mu\text{M/L}$, con la cual obtuvo un 59% de enraizamiento.

AFOLAYAN y ADEBOLA (2004), proponen un posible protocolo para el enraizamiento de Liliáceas (antigua clasificación para las Philesiáceas) como *Thuranthos basuticum*, donde el medio de cultivo óptimo para el enraizamiento es MS más 5 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA.

4.1.2 Número de tallos. La evaluación de ésta y las demás variables se realizó de forma independiente tanto para hormona como para la concentración utilizada. Además se explicarán las interacciones de ambos factores si las hubiese para cada medición realizada.

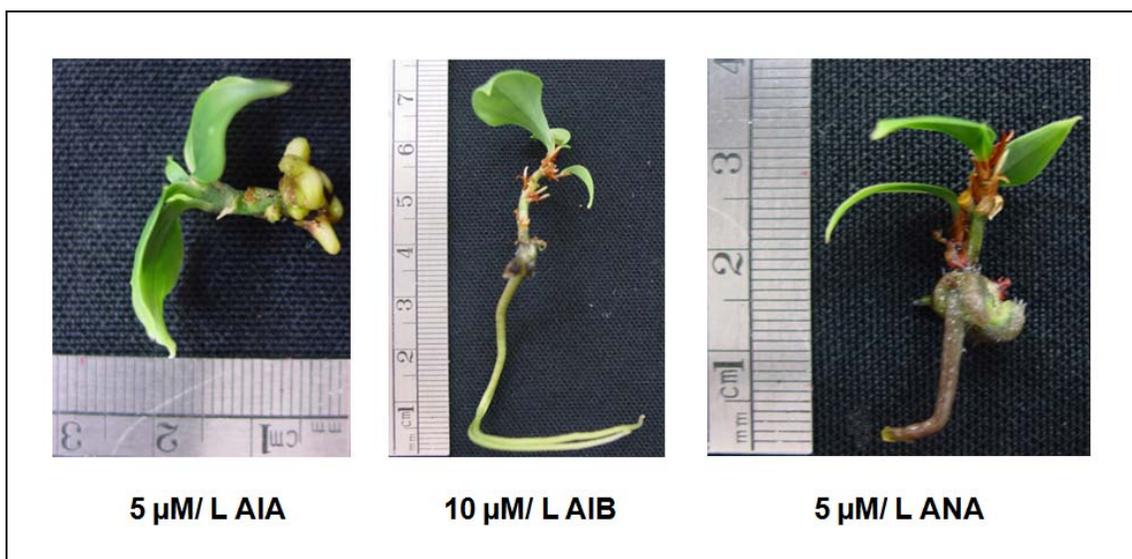


FIGURA 4 Variabilidad en la longitud de tallos de copihue

Como se aprecia en la Figura 4, la cantidad de tallos no varía según la hormona y concentración utilizada, sin embargo, puede observarse la variabilidad existente en la longitud de ellos.

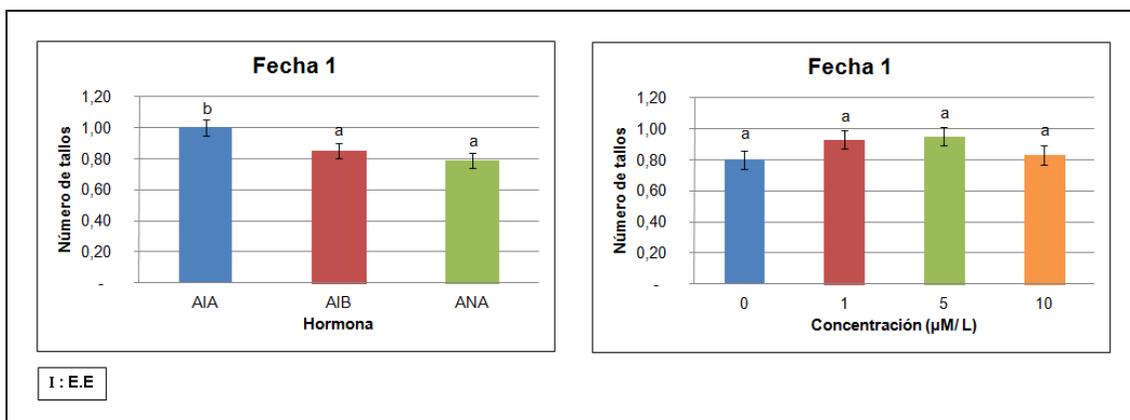


FIGURA 5 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de tallos de copihue para la fecha 1.

La hormona resultó ser altamente significativa estadísticamente, donde se puede apreciar que la mayor cantidad de tallos obtenidos fue con AIA con una media de 1 tallo por plántula, mientras que la menor fue obtenida por ANA con 0,79 tallos por plántula de copihue.

Para las concentraciones propuestas en el ensayo no se observaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, se puede observar en la Figura 5 un mayor número de tallos obtenidos en concentraciones de 5 µM/L.

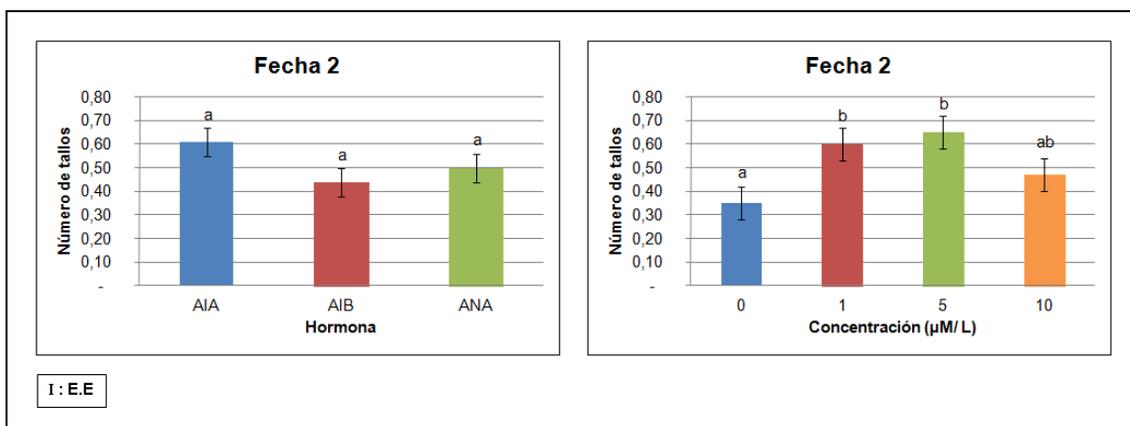


FIGURA 6 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de tallos de copihue para la fecha 2

Para la siguiente fecha evaluada se puede ver que la hormona no tuvo mayor significancia, sin embargo, la concentración muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada una de ellas, donde 1 y 5 $\mu\text{M/L}$ obtienen las puntuaciones más altas con 0,60 y 0,65 tallos respectivamente. En contraste con lo anterior, 0 $\mu\text{M/L}$ obtiene el menor número de tallos, con un total de 0,35 en promedio. La concentración de 10 $\mu\text{M/L}$ se encuentra entre los máximos y mínimo, alcanzando una media de 0,47 tallos por planta.

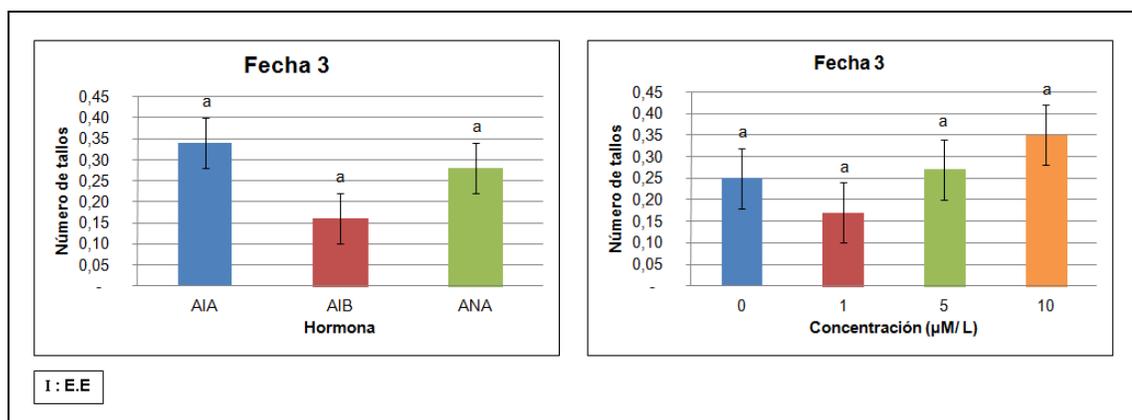


FIGURA 7 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de tallos de copihue para la fecha 3

En la última medición realizada para este ensayo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos factores evaluados, pero queda en evidencia que AIA sigue siendo la auxina que induce la mayor cantidad de tallos. Para el efecto de concentración sobre el número de tallos, ocurre algo particular, donde 10 $\mu\text{M/L}$ posee la mayor cantidad de tallos, presentando una tendencia distinta a las otras dos mediciones.

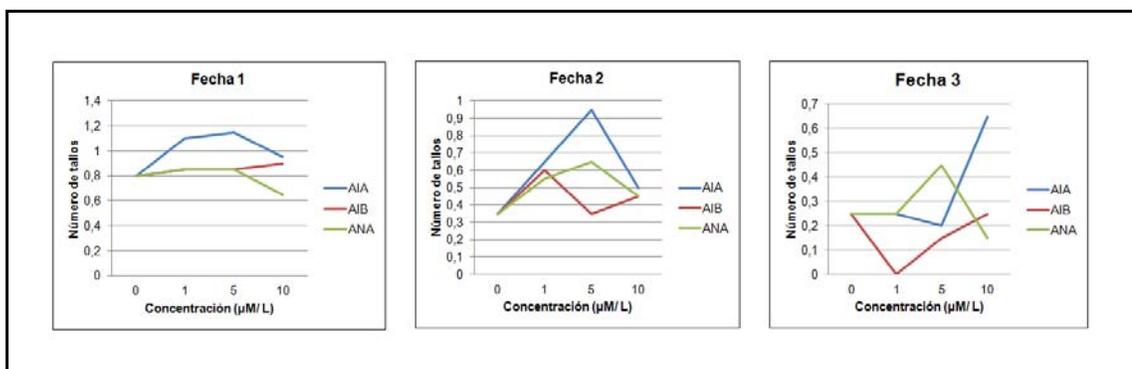


FIGURA 8 Interacción entre tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de tallos

Para el número de tallos hubo interacción para las tres mediciones realizadas, como se puede apreciar en la Figura 8. La primera medición arrojó diferencias estadísticamente significativas, donde las tres hormonas aumentan entre 0 y 1 µM/L, luego AIA tiene un mayor aumento con respecto a AIB y a ANA que se mantienen más o menos constantes entre 1 y 5 µM/L, finalmente, AIA y ANA decrecen hacia la concentración más alta, mientras que AIB aumenta.

Para la fecha 2, la interacción de los factores resulta ser significativa estadísticamente, donde las tres hormonas aumentan entre las dos primeras concentraciones, y luego AIB decrece entre 1 y 5 µM/L. Entre 5 µM/L y 10 µM/L se invierte lo anteriormente mencionado, ya que es AIB la que aumenta, y ANA y AIA decrecen.

La interacción presentada en la fecha 3 es altamente significativa estadísticamente, donde AIA y ANA se mantienen constantes en 0,25 tallos como promedio entre 0 y 1 µM/L, mientras que AIB decrece hasta cero. Luego AIB y ANA aumentan en el tramo siguiente, y finalmente tenemos un fuerte incremento de AIA, donde se obtienen 0,65 tallos, siendo la mayor cantidad observada. También existe un leve incremento de AIB, y una disminución de ANA hacia los 10 µM/L. No obstante, este comportamiento altamente errático para las interacciones entre fuentes de auxina y concentraciones, es difícil de explicar.

SEEMANN (1983) obtuvo un promedio entre 0 y 3 tallos por planta con el tratamiento hormonal que aplicó a las plántulas de copihue cultivadas *in vitro*, lo cual indica que los datos que se obtuvieron en este ensayo se encuentran por debajo de lo anteriormente

mencionado, sin embargo, al revisar los datos originales de la última medición (Anexo 2), sin ser ingresados al programa estadístico y considerando sólo plantas que presentaban tallos, resultan ser similares a los obtenidos por este autor.

4.1.3 Longitud de tallos. Tanto como para la fecha 2 como la 3 (Figuras 10 y 11) no se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto para auxinas y concentraciones, no así en la fecha 1 (Figura 9), donde el mayor valor obtenido para el factor hormona se dio para AIA con 0,86 cm en promedio, y en contraparte, ANA con los menores resultados, obteniéndose sólo 0,67 cm de longitud. En el caso de las concentraciones, en ninguna de ellas los valores fueron estadísticamente significativos. En cuanto a la interacción entre hormona y concentración, la fecha 3 fue la única que presentó diferencias significativas, en que AIA 10 $\mu\text{M/L}$ produjo los mayores valores para dicho factor.

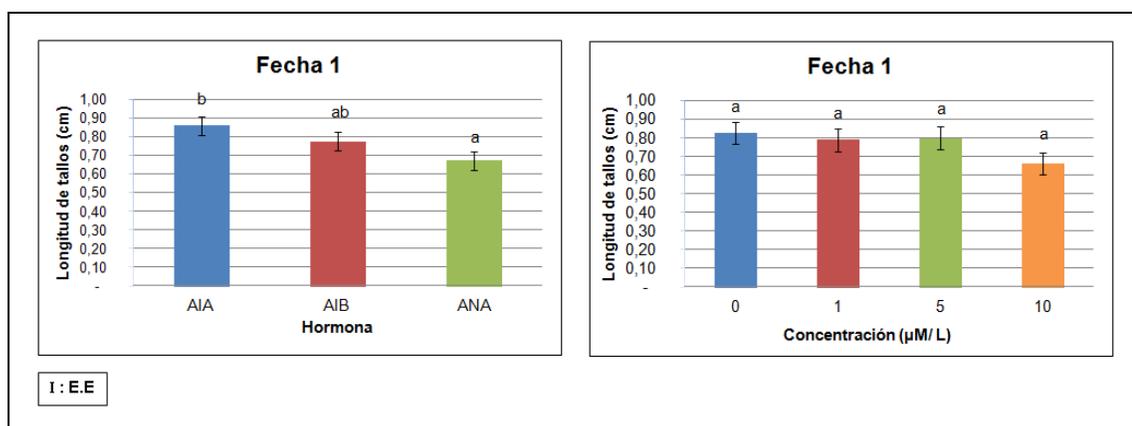


FIGURA 9 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de tallos de copihue para la fecha 1

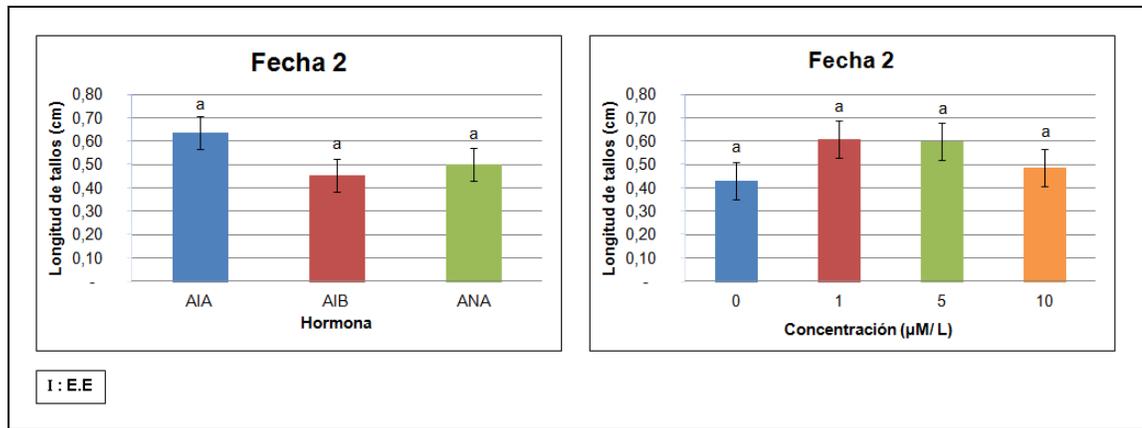


FIGURA 10 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de tallos de copihue para la fecha 2

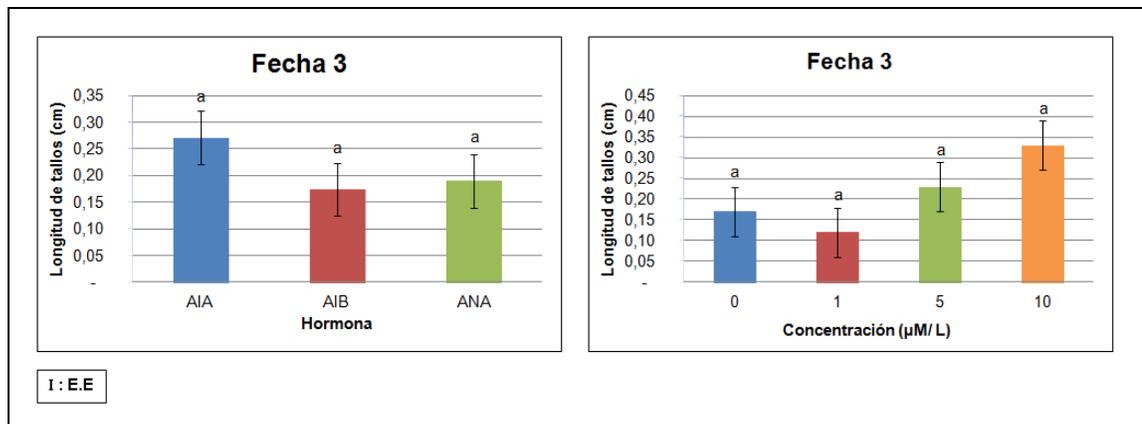


FIGURA 11 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de tallos de copihue para la fecha 3

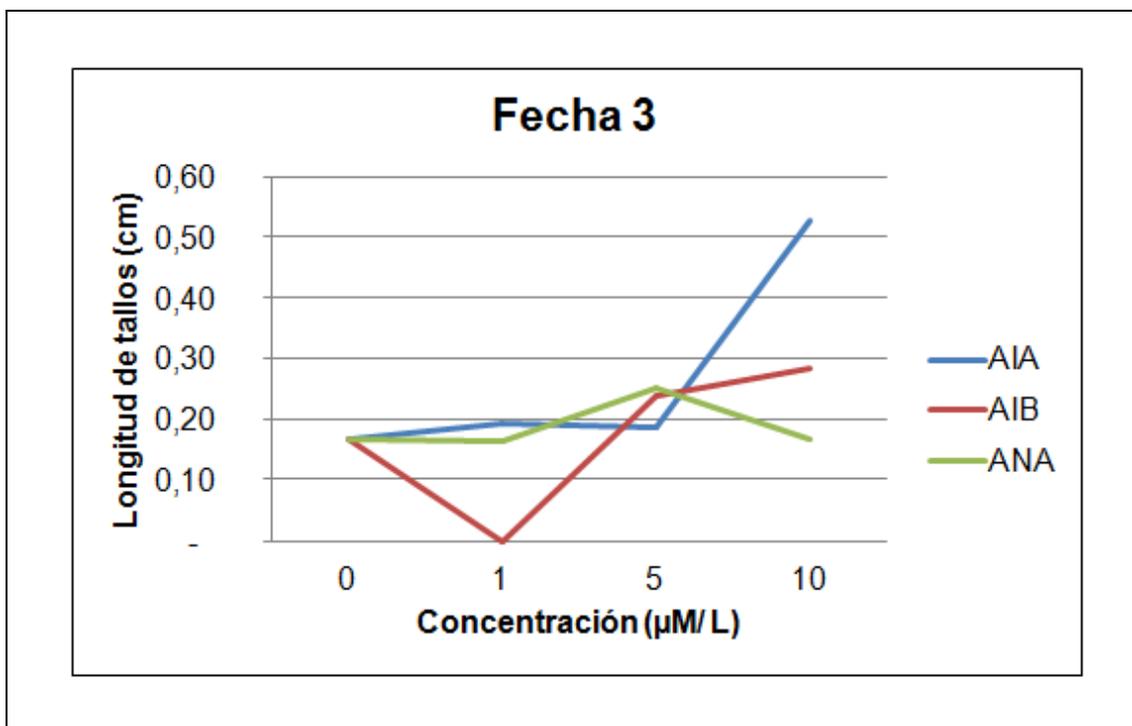


FIGURA 12 Interacción entre tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de tallos para la fecha 3

Como se observa en la Figura 12, la primera interacción que muestra el gráfico es entre las concentraciones 0 y 1 µM/L, donde AIB y ANA decrecen, mientras que AIA aumenta levemente. Luego en el siguiente rango de concentraciones, AIB y ANA aumentan, pero AIA decrece moderadamente. Por último, en el último rango comprendido entre los 5 y 10 µM/L, ANA disminuye, mientras que AIB y AIA aumentan, siendo AIA la que alcanza los mayores valores, con 0,53 cm de longitud.

SEEMANN (1983), obtuvo un promedio de 7,6 mm en la longitud de tallos cultivados con KNA en distintas concentraciones a 180 días de montado el ensayo. El rango de longitud de tallos varió entre los 0 y 35 mm.

BECERRA (1999) analizó el efecto de ANA sobre la longitud de brotes de copihue cultivado *in vitro*, donde el mayor resultado obtenido (a los 60 días de cultivo) fue cuando no se aplicó la hormona al medio de cultivo. Se puede inferir según sus datos, que al aumentar la concentración de esta hormona, de 0 mg/L a 20 mg/L la longitud disminuye desde 3,10 a 2,78 cm.

GANTAIT *et al.* (2009), a pesar de no enfocarse en el estudio de copihue, sino de una orquideácea, obtiene resultados que pueden ser comparables con las mediciones realizadas en este ensayo, debido a la similitud de las concentraciones hormonales. Es así que los tallos de *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. cv. Golden Boy alcanzaron 5,43 cm de longitud en promedio por planta en un medio de cultivo que poseía 0,2 mg/L de AIB y 2 g/L de carbón activado.

4.1.4 Número de raíces. En la fecha 1 no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias tanto para hormona como para concentración (Figura 13), aunque puede apreciarse que el mayor número de raíces se obtuvo con AIA y concentraciones de 10 $\mu\text{M/L}$.

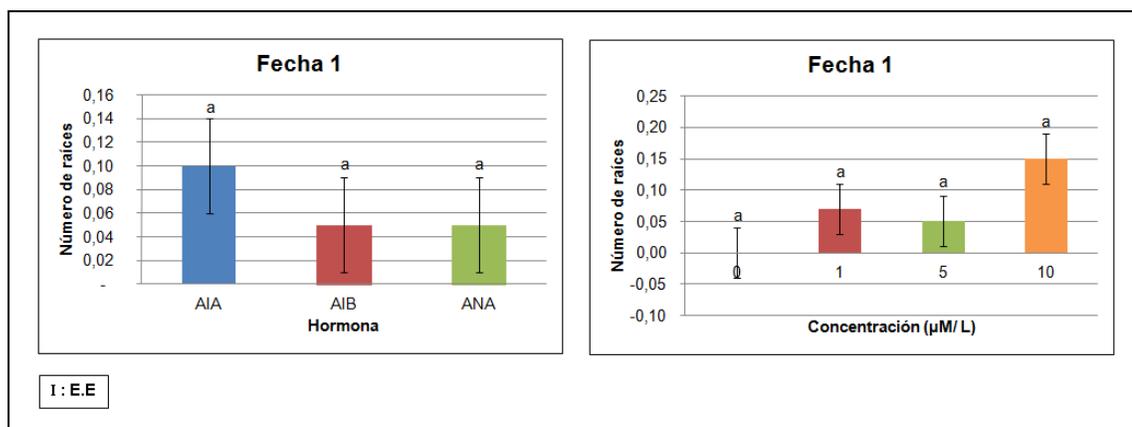


FIGURA 13 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de raíces para la fecha 1

Por su parte, en la Figura 14 se encuentran diferencias estadísticamente significativas para el factor concentración, no así para hormona.

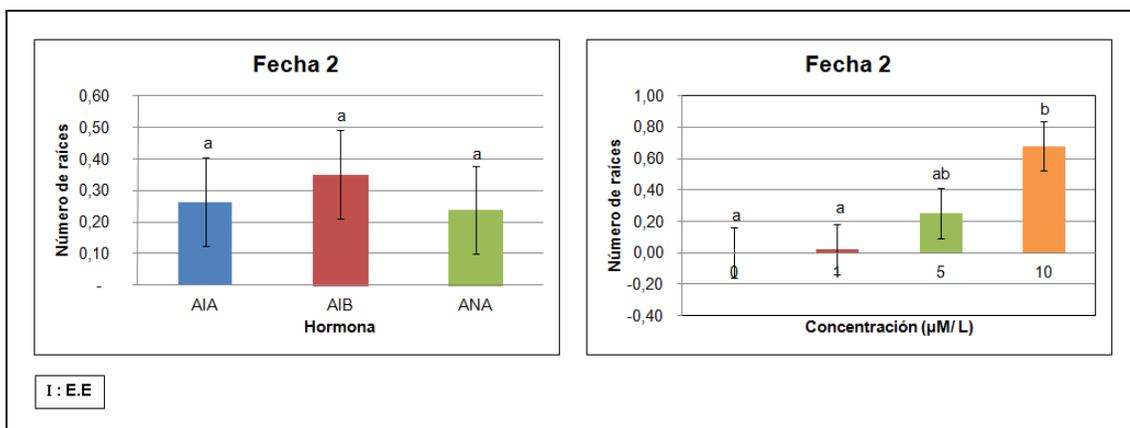


FIGURA 14 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de raíces para la fecha 2

El mayor valor obtenido fue con 10 µM/L que produjo 0,68 raíces por plántula. En contraste con lo anterior, 0 y 1 µM/L arrojan los menores resultados, donde el testigo 0 µM/L no produce ningún crecimiento de raíz.

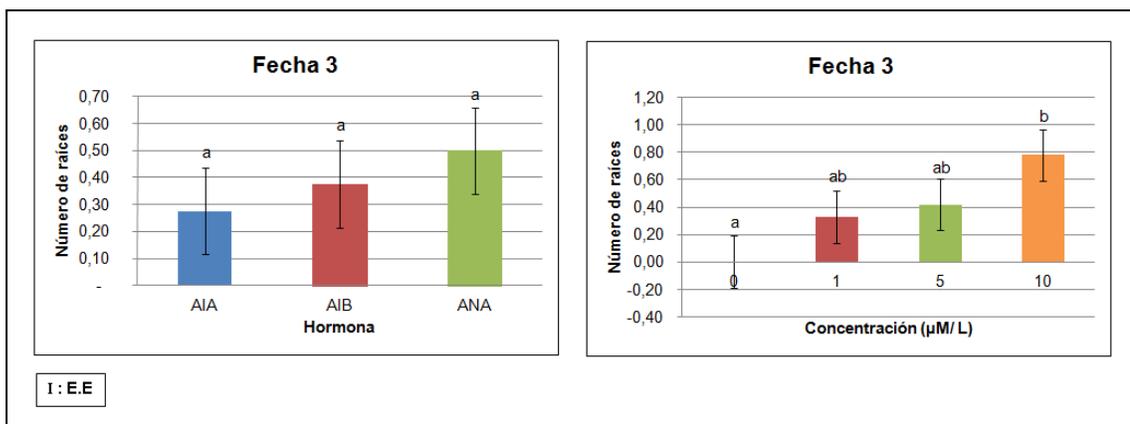


FIGURA 15 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de raíces para la fecha 3

Para la fecha 3 (Figura 15) sólo se observan diferencias estadísticamente altamente significativas para la concentración. El mayor número de raíces obtenidas en este caso se encuentran en 10 µM/L, alcanzando un promedio de 0,78, mientras que para 1 y 5 µM/L obtuvieron 0,33 y 0,42 raíces respectivamente. Para la concentración 0 µM/L no se observó crecimiento de raíces.

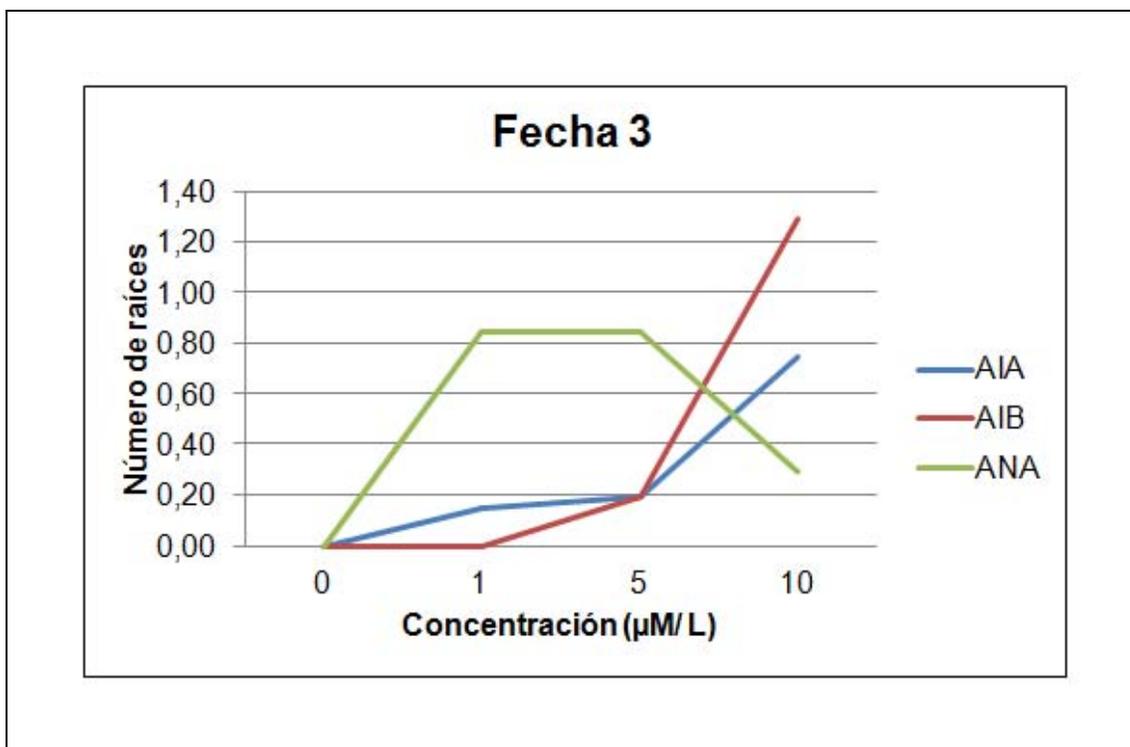


FIGURA 16 Interacción entre tres hormonas y cuatro concentraciones sobre el número de raíces para la fecha 3

Si bien no se encontró interacción entre los dos factores para las dos primeras fechas, sí se encontraron para la medición final como lo muestra la Figura 16, donde AIA y ANA aumentan entre 0 y 1 µM/L, mientras que AIB se mantiene constante dentro de este rango. Entre 1 y 5 µM/L AIB aumenta significativamente a 0,2 raíces, mientras que AIA lo hace levemente. Para este mismo rango de concentraciones ANA se mantiene constante en 0,85 raíces. Finalmente, ANA decrece, mientras que AIA y AIB aumentan.

SEEMANN (1983) trató 36 explantes con 0,2 mg/L de KNA con lo cual obtuvo gran variabilidad en el número de raíces de copihue con un rango que comprendía entre las 2 y 18 raíces por planta, resultado que se acerca bastante a los obtenidos realmente por las plántulas en concentración de 10 µM/L de AIB.

Del cultivo de yemas de rizoma de copihue realizado por McKINLESS y ALDERSON (1993) se obtuvo 2 raíces por cada una de ellas con un tratamiento que implicaba la aplicación de 0 y 1 µM/L de ANA al medio de cultivo. Estos autores indican que al

aplicar mayores concentraciones de ANA al medio (10 $\mu\text{M/L}$) la longitud de raíces se ve notoriamente disminuida.

El número de raíces de *D. chrysotoxum* obtenidos por GANTAIT *et al.* (2009) fue de 12,7 en promedio, con una concentración de 0,2 mg/L de AIB más 2 g/L de carbón activado en el medio de cultivo MS. Este mismo autor explica que al utilizar mayores concentraciones de AIB el número de raíces comienza a decrecer sustancialmente.

QUINTEROS *et al.* (2003) utilizó concentraciones ascendentes de ANA (0 – 0,3 – 0,6 – 0,9 mg/L) en el enraizamiento de *Dioscoreas sp.*, donde la mayor cantidad de raíces la obtuvo con 0,9 mg/L presentándose un promedio de 3,5 raíces por planta.

4.1.5 Longitud de raíces.

Para esta variable no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las fechas 1 y 2 como puede apreciarse en las Figuras 17 y 18. Tampoco se encontró interacción para ninguna de las fechas evaluadas.

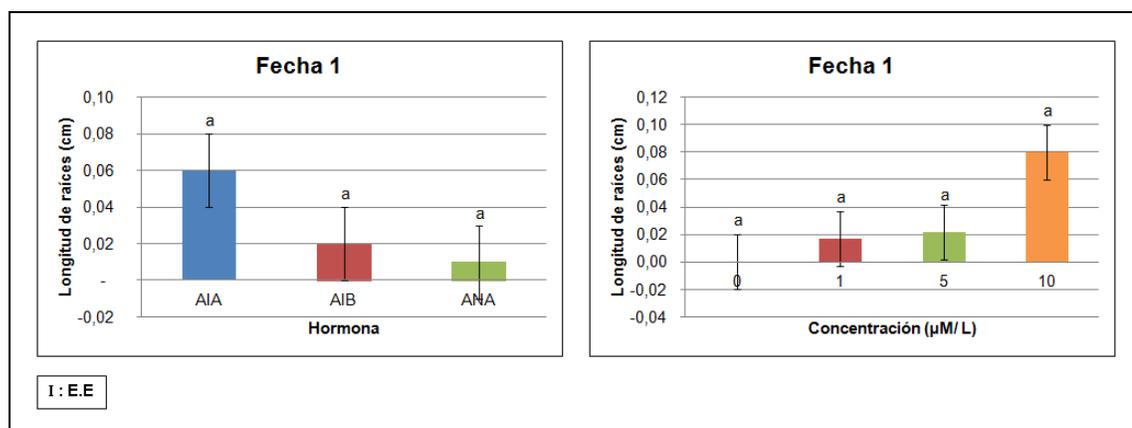


FIGURA 17 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de raíces de copihue para la fecha 1

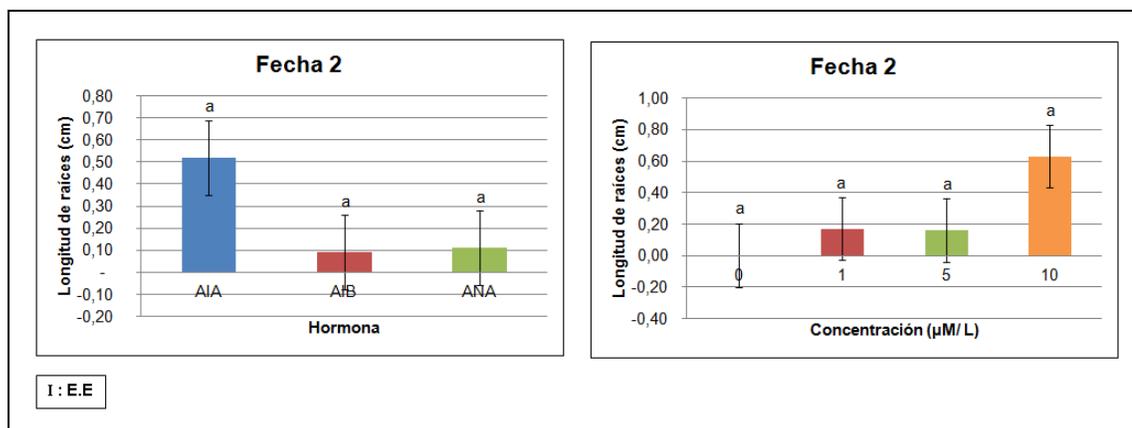


FIGURA 18 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de raíces de copihue para la fecha 2

En cambio, para la fecha 3 (Figura 19) se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el factor concentración, obteniéndose promedios de 0,53 y 0,68 cm de longitud de raíces para las concentraciones 5 y 10 µM/L respectivamente, siendo éstos los valores más altos alcanzados. Para 1 µM/L la longitud de raíces alcanzó un valor de 0,29 cm, siendo bastante inferior a los anteriores, en cambio, el testigo no produjo raíces.

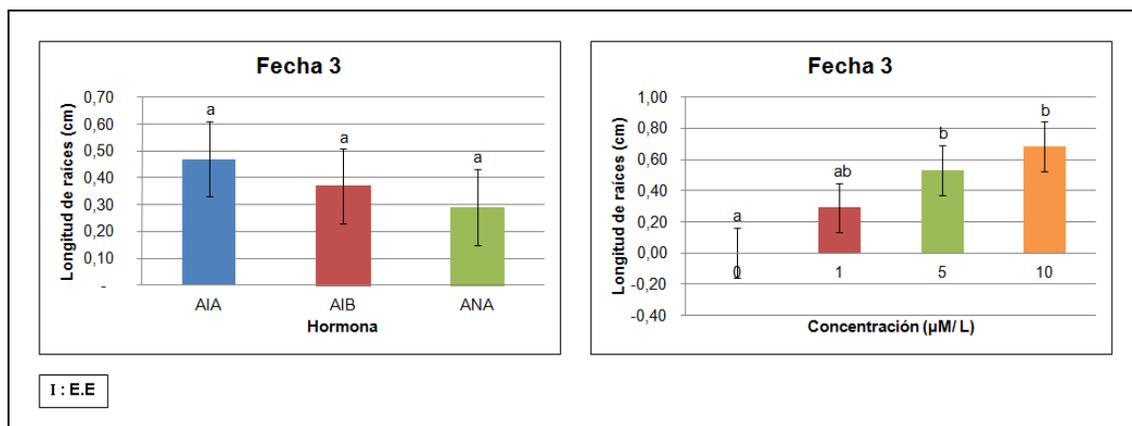


FIGURA 19 Efecto de tres hormonas y cuatro concentraciones sobre la longitud de raíces de copihue para la fecha 3

La longitud de raíces obtenidas del tratamiento aplicado por SEEMANN (1983) en su ensayo de propagación *in vitro* de copihue fue entre 2 y 8 mm por planta, recordando que la auxina utilizada fue KNA y no alguna de las utilizadas en este ensayo, pero bien puede compararse por su concentración.

GANTAIT *et al.* (2009) indican que utilizando 0,2 mg/L de AIB y 2 g/L de carbón activado se puede lograr una longitud promedio de 9,6 cm en *D. chrysotoxum*. BECERRA (1999) por su parte no obtuvo significancia en cuanto al número y longitud de raíces en estacas de copihue, por lo que se puede inferir que los tratamientos aplicados en su ensayo fueron erróneos en cuanto a sus concentraciones, o bien se trató de algún factor interno de la planta tratada.



FIGURA 20 Variabilidad en el número y longitud de raíces en plantas de copihue

a) 5 $\mu\text{M/L}$ AIA; b) 10 $\mu\text{M/L}$ AIA; c) 1 $\mu\text{M/L}$ AIB; d) 10 $\mu\text{M/L}$ AIB.

Como se aprecia en las Figuras 4 y 20, la cantidad de raíces varía según la hormona y la concentración utilizada, sin embargo, a pesar de que todos los explantes utilizados fueron homogeneizados, hubo una mayor formación de raíces y mayores longitudes en unos que en otros. Esto pudo deberse probablemente a que la fuente auxínica y/ o su concentración no fueron las adecuadas para el enraizamiento *in vitro*, o bien, que estas fuentes se agotaron durante el transcurso del ensayo en el medio de cultivo, impidiendo la posterior generación de nuevas raíces y la elongación de las que ya se encontraban.

4.2 Efecto del ácido indol butírico y tres concentraciones sobre el enraizamiento *ex vitro* de copihue.

Para el segundo ensayo de esta tesis, los resultados fueron negativos. Una vez que los explantes fueron traspasados al sustrato, se les asperjó agua para mantener la humedad en la cámara de preaclimatación. Al pasar una semana en ella, las plántulas presentaron ataque de hongos lo cual fue combatido con benomilo y captan, como fue mencionado anteriormente, observándose una gran efectividad al comienzo del tratamiento sobre el hongo agresor. Sin embargo, transcurridas dos semanas de aplicaciones, nuevamente hubo presencia de hongos. Durante la tercera semana de observación, se volvió a aplicar la mezcla de productos, sin embargo, las plantas murieron, alcanzando una población del 50%, y una vez finalizado el seguimiento de las plantas *ex vitro*, la mortandad había alcanzado el 100% de las plantas establecidas. Al cabo de cinco semanas en preaclimatación, las plantas simplemente no presentaron ningún tipo de crecimiento, tanto aéreo como radicular, por lo que se rechaza la hipótesis planteada para la segunda etapa de este ensayo, de que es posible enraizar *ex vitro* plántulas de copihue micropropagadas. Esto es comparable con el ensayo realizado por GUTIERREZ (1988), en que la inducción de enraizamiento por estacas de copihue en condiciones *ex vitro* no tuvo resultados positivos.

Margara (1988) citado por BECERRA (1999), indica que la rizogénesis involucra interacciones complejas de factores, los cuales pueden dominarse por el problema que acarrea la regulación hormonal, particularmente el rol que cumplen las auxinas en la organogénesis. Además debe tenerse en cuenta que la facilidad que tenga una estaca para desarrollar raíces adventicias o no, se debe a factores bioquímicos, en que no

puede pasarse por alto las relaciones que existen entre la anatomía del tallo con el enraizamiento (Hartmann y Kester, 1975, citados por GUTIERREZ, 1988). TOLEDO (1984) dice que al analizar la estructura caular del copihue, se puede reconocer en tallos jóvenes que la característica más relevante es la presencia de un anillo continuo de tejido mecánico o periciclo que divide al tallo en dos sectores. Es por esto que GUTIERREZ (1988) y HARTMANN Y KESTER (1994) señalan que existen capas continuas de esclerénquima en estacas de especies difíciles de enraizar, las que constituirían una barrera morfológica en la iniciación de raíces, o bien, una barrera mecánica en la emergencia de éstas.

Si bien los tallos utilizados no se encontraban lignificados por ser tejido relativamente joven, es posible que el genotipo de la especie haya presentado todas las condiciones anteriormente mencionadas, por lo que no hubo crecimiento de raíces *ex vitro*.

Al no obtener resultados en la segunda etapa del experimento, no se realizó el análisis estadístico respectivo, ya que no se obtuvo ningún dato sobre las variables a evaluar.



FIGURA 21 Plantas de copihue en preaclimatación luego de tres semanas de trasplante.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos en la presente investigación se puede concluir que existe una gran variabilidad en la respuesta de *Lapageria rosea* Ruiz *et* Pav. ante el tratamiento con distintas auxinas y distintas concentraciones de estas.

- El mayor porcentaje de sobrevivencia hacia el final del ensayo se obtuvo cuando el medio de cultivo estaba provisto de AIA y en aquellos donde no se aplicó ninguna concentración hormonal.
- El mayor porcentaje de enraizamiento fue observado cuando se aplicó ANA y concentraciones de 5 $\mu\text{M}/\text{L}$ al medio WPM.
- Ni el número de tallos ni su longitud respondieron significativamente al tipo de auxina ni a la concentración utilizada en la última fecha evaluada.
- Tanto para número como longitud de raíces, la auxina utilizada no arrojó resultados significativos, sin embargo, con concentraciones de 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ se obtuvo mayores promedios de raíces por plántula y mayores longitudes.
- Para la interacción de ambos factores (hormona y concentración), la mayor respuesta para número y longitud de tallos se vio reflejada en 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ de AIA, no así para el número de raíces, donde el mayor valor se obtuvo con 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ de AIB.
- Aunque la longitud de raíces no tuvo una respuesta significativa estadísticamente ante la acción de hormona y concentración, el mayor valor también fue logrado con 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ de AIB.

- La aclimatación de copihue no pudo llevarse a cabo debido a la gran mortandad de plántulas traspasadas desde condiciones *in vitro* a *ex vitro*.

6 BIBLIOGRAFIA

- AFOLAYAN, A. y ADEBOLA, P. 2004. *In vitro* propagation: A biotechnological tool capable of solving the problem of medicinal plants decimation in South Africa. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (12), pp. 683-687. (On line). <<https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/6573/1/jb04132.pdf>> (13 jul. 2011).
- AULT, J. 1995. *In vitro* rooting and greenhouse acclimatization of *Lachenalia* shoots. HortScience 30 (6): 1304 – 1305. (On line). <<http://www.chicagobotanic.org/downloads/staff/ault/lachenalia.pdf>> (15 ago. 2011).
- BARRALES, P.; MANCINELLI, S. y ORELLANA, B. 1987. Micropropagación de *Lapageria rosea* R. et P. (*Monocotyledoneae*, *Liliaceae*). Boletín Sociedad Biológica. Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción de Chile. 13 - 18.
- BECERRA, L. 1999. Respuesta al enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) y copihue (*Lapageria rosea* Ruiz et Pav.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 216 p.
- BENITEZ, H.; FUENTES, M. y GARRIDO, A. 2004. Desarrollo de metodologías para el enraizamiento *in vitro* de *Dioscorea cayenensis* cv. “Ñame Amarillo” y su aclimatación a condiciones *in vivo*. Facultad de Educación y Ciencias, Programa de Biología con énfasis en Biotecnología. Universidad de Sucre, Colombia. (On line). <<http://www.monografias.com/trabajos-ppt/metodologias-enraizamiento-dioscorea-cayenensis-amarillo/metodologias-enraizamiento-dioscorea-cayenensis-amarillo.shtml>> (18 abr. 2010).

- CHAIT, E. y PLAZA, J. 2009. Diferenciación floral y su utilidad para la identificación de 25 variedades de *Lapageria rosea* (*Philesiaceae*) mantenidas en vivero en Chile. VII Simposio De Recursos Genéticos Para América Latina Y El Caribe. Pucón, Chile. INIA: 252 – 253.
- FLORACHILENA. 2010. Copihue, colcopiú, voqui – copihue, nupo, copíu, copihue. Enciclopedia de la flora chilena. (On line). <http://www.florachilena.cl/Niv_tax/Angiospermas/Ordenes/Liliales/Philesiaceae/Lapageria/Copihue.htm> (15 abr. 2011).
- FUENTEVILLA, C. 2004. Propagación *in vitro* de algunas especies de *Leucocoryne*. Taller de licenciatura. Facultad de Agronomía, Área de Hortalizas y Flores. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso de Chile. Quillota, Chile. 71 p.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N. y DAS, P. 2009. Impact of auxins and activated charcoal on *in vitro* rooting of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. Cv. Golden Boy. (On line). <<http://jtropag.in/index.php/ojs/article/viewFile/562/231>> (13 jul. 2011).
- GARCIA, M.; HERNANDEZ, R.; BUSTIOS, S.; ESTEVES, M.; ECHEVARRIA, Y.; CRUZ, R.; LEON, L. y DEL BUSTO, A. 2007. Algunas experiencias en la utilización del *Aloe vera* L. en la preparación de medios de cultivo. Departamento de Biología y Departamento Agropecuario de la Universidad de Pinar del Río, Cuba. 28 p. (On line). <<http://www.buscagro.com/www.buscagro.com/biblioteca/Maria-Jo-Garcia/Aloe-vera-medios-de-cultivo.pdf>> (15 ago. 2011).
- GUTIERREZ, T. 1988. Enraizamiento de estacas de cuatro especies nativas chilenas mediante el uso de auxinas sintéticas. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 74 p.
- HARTMANN, H. y KESTER, D. 1994. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 2a ed. Continental. México. 814 p.

- HAZARIKA, B. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, India. 85 (12): 9. (On line). < <http://www.ias.ac.in/currsci/dec252003/1704.pdf>> (17 ago. 2011).
- JORDAN, M.; CORTÉS, I. y MONTENEGRO, G. 1983. Regeneration of *Lapageria rosea* plantlets by tissue culture (Family Philesiaceae). *Gartenbauwissenschaft* (Alemania). 48 (3): 97 – 100.
- LLOYD, G. y McCOWN, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant. Prop. Soc.* 30: 421 – 427.
- MAACK, E. 1984. El copihue y su cultivo. Universitaria. Concepción, Chile. 48 p.
- McKINLESS, J. y ALDERSON, P. 1988. Rooting of *Lapageria rosea* shoots multiplied *in vitro*. *Acta Horticulturae* 226: 73 – 79.
- McKINLESS, J. y ALDERSON, P. 1991. An anatomical study of rhizome bud formation induced by paclobutrazol and adventitious root formation in *in vitro* cultures of *Lapageria rosea* (Ruiz et Pav.). *Annals of Botany* 67: 331 – 338.
- McKINLESS, J. y ALDERSON, P. 1993. Promotion of root emergence *in vitro* from rhizome buds of *Lapageria rosea* cv. Nashcourt after proliferation in the presence of paclobutrazol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35: 115 – 120.
- MEDEROS, S.; PLASENCIA, I. y VARELA, C. 2002. Biotecnología vegetal: obtención de plantas *in vitro*. Universidad de Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España. (On line). <<http://webpages.ull.es/users/apice/pdf/311-086.pdf>> (18 abr. 2011).
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497.

- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology 25: 135-166.
- PREECE, J. y SUTTER, E. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp: 71 – 93.
- QUINTERO, I.; POLO, J.; JARMA, A. y ESPITIA, A. 2003. Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas sp.* Revista Colombiana de Biotecnología 5 (2): 51 – 56 . (On line). <<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/776/77650206.pdf>> (17 ago. 2011).
- RETAMALES, J. 2007. Hormonas Vegetales y Reguladores de Crecimiento: Aspectos Básicos y Modos de Acción. Taller de Reguladores de Crecimiento y Bioestimulantes en Cultivos Extensivos. Mar del Plata, Argentina (On line). <<http://www.inta.gov.ar/balcarce/actividad/capacita/agron2007/regulcrec/RetamalesGraficaColor.pdf>> (25 abr. 2011).
- SEEMANN, P. 1983. Propagación *in vitro* del copihue (*Lapageria rosea* Ruiz et Pav.). Agro Sur (CHILE) 11 (2): 130 – 134.
- SEEMANN, P. 1984. La conservación del copihue mediante su cultivo. Revista Naturaleza (Chile). 2 (11): 26 – 28.
- SEEMANN, P. 1984. Cómo propagar y cultivar el copihue. Revista Chile Agrícola 9 (97): 314 – 315.
- SEEMANN, P. 1984. Variedades cultivadas de copihue. Revista Chile Agrícola 9 (98): 349 – 350.
- 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.

SHIGETA, J.; SATO, K.; TANAKA, S.; NAKAYAMA, M. y MII, M. 1996. Efficient plant regeneration of asparagus by inducing normal roots from *in vitro* multiplied shoot explants using gellan gum and glucose. *Plant Science* 113: 99 – 104.

TOLEDO, M. 1984. Dinámica de crecimiento, estructura y antecedentes ecológicos de trepadoras comunes en la región valdiviana. Valdivia, Chile. Tesis Universidad Austral de Chile, Facultad de Filosofía y Humanidades. 86 p.

7 ANEXOS

ANEXO 1 Concentración hormonal por tratamiento utilizado en el medio de cultivo de enraizamiento de copihue.

| HORMONA | $\mu\text{M/ L}$ | mg/L |
|----------------|------------------------------------|-------------|
| AIA | 0 | 0 |
| | 1 | 0,18 |
| | 5 | 0,88 |
| | 10 | 1,75 |
| AIB | 0 | 0 |
| | 1 | 0,20 |
| | 5 | 1,02 |
| | 10 | 2,03 |
| ANA | 0 | 0 |
| | 1 | 0,19 |
| | 5 | 0,93 |
| | 10 | 1,86 |

ANEXO 2 Valores reales arrojados en la última medición realizada durante el ensayo.

| | Tratamiento | * | Número de tallos | Longitud de tallos (cm) | ** | Número de raíces | Longitud de raíces (cm) |
|------------|---------------------------|----|------------------|-------------------------|----|------------------|-------------------------|
| AIA | 0 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 3 | 1 – 3 | 0,7 – 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 4 | 1 – 2 | 0,7 – 1,2 | 2 | 1 – 2 | 3,5 – 7,1 |
| | 5 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 4 | 1 | 0,5 – 1,3 | 2 | 1 – 3 | 3,8 – 4,9 |
| | 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 11 | 1 – 3 | 0,5 – 1,6 | 4 | 1 – 7 | 3,5 – 5,1 |
| AIB | 0 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 3 | 1 – 3 | 0,7 – 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 3 | 1 | 1,2 – 2 | 2 | 1 – 3 | 3,9 – 6 |
| | 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 5 | 1 | 0,5 – 1,8 | 4 | 1 – 16 | 3,1 – 8,9 |
| ANA | 0 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 3 | 1 – 3 | 0,7 – 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 5 | 1 | 0,3 – 1 | 4 | 2 – 6 | 0,7 – 4,1 |
| | 5 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 8 | 1 – 2 | 0,3 – 1 | 7 | 1 – 3 | 0,9 – 2,8 |
| | 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ | 3 | 1 | 1 – 1,4 | 2 | 3 | 0,9 – 2,5 |

* Número de plantas con tallos

** Número de plantas con raíces

ANEXO 3 Porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento *in vitro* de plántulas de copihue.

| FECHA 1 | | | | |
|------------------------|------------|------------|------------|-----------------|
| % Sobrevivencia | | | | |
| μM/ L/ HORMONA | AIA | AIB | ANA | PROMEDIO |
| 0 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| 1 | 100 | 65 | 85 | 83,3 |
| 5 | 95 | 85 | 85 | 88,3 |
| 10 | 90 | 90 | 65 | 81,7 |
| PROMEDIO | 91,3 | 80 | 78,8 | |
| % Enraizamiento | | | | |
| μM/ L/ HORMONA | AIA | AIB | ANA | PROMEDIO |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 5 | 10 | 5 |
| 5 | 10 | 0 | 5 | 5 |
| 10 | 15 | 15 | 0 | 10 |
| PROMEDIO | 6,3 | 5 | 3,8 | |

| FECHA 2 | | | | |
|------------------------|------------|------------|------------|-----------------|
| % Sobrevivencia | | | | |
| μM/ L/ HORMONA | AIA | AIB | ANA | PROMEDIO |
| 0 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| 1 | 65 | 40 | 55 | 53,3 |
| 5 | 75 | 35 | 65 | 58,3 |
| 10 | 55 | 45 | 50 | 50 |
| PROMEDIO | 68,8 | 50 | 62,5 | |
| % Enraizamiento | | | | |
| μM/ L/ HORMONA | AIA | AIB | ANA | PROMEDIO |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 10 | 5 | 20 | 11,7 |
| 5 | 10 | 0 | 25 | 11,7 |
| 10 | 20 | 20 | 10 | 16,7 |
| PROMEDIO | 10 | 6,3 | 13,8 | |

| FECHA 3 | | | | |
|------------------------|------------|------------|------------|-----------------|
| % Supervivencia | | | | |
| µM/ L/ HORMONA | AIA | AIB | ANA | PROMEDIO |
| 0 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| 1 | 20 | 0 | 25 | 15 |
| 5 | 20 | 15 | 40 | 25 |
| 10 | 55 | 25 | 15 | 31,7 |
| PROMEDIO | 43,8 | 30 | 40 | |
| % Enraizamiento | | | | |
| µM/ L/ HORMONA | AIA | AIB | ANA | PROMEDIO |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 10 | 0 | 20 | 10 |
| 5 | 10 | 10 | 35 | 18,3 |
| 10 | 20 | 20 | 10 | 16,7 |
| PROMEDIO | 10 | 7,5 | 16,3 | |

ANEXO 4 Prueba de Rangos Múltiples para cuatro variables evaluadas en el enraizamiento *in vitro* de copihue para la fecha 1.

| | | Nº TALLOS | LONG. TALLOS | Nº RAÍCES | LONG. RAÍCES |
|---|-----|------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| HORMONA | AIA | 1,00 b * | 0,86 b * | 0,10 n.s | 0,06 n.s |
| | AIB | 0,85 b * | 0,77 ab * | 0,05 n.s | 0,02 n.s |
| | ANA | 0,79 a * | 0,67 a * | 0,05 n.s | 0,01 n.s |
| CONCENTRACIÓN (μM/ L) | 0 | 0,80 n.s | 0,83 n.s | 0,00 n.s | 0,00 n.s |
| | 1 | 0,93 n.s | 0,79 n.s | 0,07 n.s | 0,02 n.s |
| | 5 | 0,95 n.s | 0,80 n.s | 0,05 n.s | 0,02 n.s |
| | 10 | 0,83 n.s | 0,66 n.s | 0,15 n.s | 0,08 n.s |

(*): Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza (Duncan).

(n.s): Indica que no existen diferencias significativas.

ANEXO 5 Prueba de Rangos Múltiples para cuatro variables evaluadas en el enraizamiento *in vitro* de copihue para la fecha 2.

| | | Nº TALLOS | LONG. TALLOS | Nº RAÍCES | LONG. RAÍCES |
|----------------------------------|-----|-----------|--------------|-----------|--------------|
| HORMONA | AIA | 0,61 n.s | 0,64 n.s | 0,26 n.s | 0,52 n.s |
| | AIB | 0,44 n.s | 0,45 n.s | 0,35 n.s | 0,09 n.s |
| | ANA | 0,50 n.s | 0,50 n.s | 0,24 n.s | 0,11 n.s |
| CONCENTRACION (µM/ L) | 0 | 0,35 a * | 0,43 n.s | 0,00 a * | 0,00 n.s |
| | 1 | 0,60 b * | 0,61 n.s | 0,02 a * | 0,17 n.s |
| | 5 | 0,65 b * | 0,60 n.s | 0,25 ab * | 0,16 n.s |
| | 10 | 0,47 ab * | 0,49 n.s | 0,68 b * | 0,63 n.s |

(*): Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza (Duncan).

(n.s): Indica que no existen diferencias significativas

ANEXO 6 Prueba de Rangos Múltiples para cuatro variables evaluadas en el enraizamiento *in vitro* de copihue para la fecha 3.

| | | Nº TALLOS | LONG. TALLOS | Nº RAÍCES | LONG. RAÍCES |
|---|-----|-----------|--------------|-----------|--------------|
| HORMONA | AIA | 0,34 n.s | 0,27 n.s | 0,28 n.s | 0,47 n.s |
| | AIB | 0,16 n.s | 0,17 n.s | 0,38 n.s | 0,37 n.s |
| | ANA | 0,28 n.s | 0,19 n.s | 0,50 n.s | 0,29 n.s |
| CONCENTRACION (μM/ L) | 0 | 0,25 n.s | 0,17 n.s | 0,00 a * | 0,00 a * |
| | 1 | 0,17 n.s | 0,12 n.s | 0,33 ab * | 0,29 ab * |
| | 5 | 0,27 n.s | 0,23 n.s | 0,42 ab * | 0,53 b * |
| | 10 | 0,35 n.s | 0,33 n.s | 0,78 b * | 0,68 b * |

(*): Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza (Duncan).

(n.s): Indica que no existen diferencias significativas.

ANEXO 7 Valor – P para el análisis de varianza y Test no paramétrico Kruskal – Wallis para todas las variables y fechas evaluadas.

| TRATAMIENTO | NÚMERO DE TALLOS | | | LONGITUD DE TALLOS | | |
|--------------------------|------------------|---------------|-------------|--------------------|---------------|-------------|
| | Hormona | Concentración | Interacción | Hormona | Concentración | Interacción |
| VALOR - P Fecha 1 | 0,006 ** | 0,26 n.s | 0,02 * | 0,034 * | 0,19 n.s | 0,51 n.s |
| VALOR - P Fecha 2 | 0,08 n.s | 0,03 * | 0,049 * | 0,15 n.s | 0,31 n.s | 0,67 n.s |
| VALOR - P Fecha 3 | 0,09 n.s | 0,09 n.s | 0,009 ** | 0,14 n.s | 0,07 n.s | 0,02 * |

| TRATAMIENTO | NÚMERO DE RAÍCES | | | LONGITUD DE RAÍCES | | |
|--------------------------|------------------|---------------|-------------|--------------------|---------------|-------------|
| | Hormona | Concentración | Interacción | Hormona | Concentración | Interacción |
| VALOR - P Fecha 1 | 0,77 n.s | 0,09 n.s | 0,11 n.s | 0,73 n.s | 0,09 n.s | 0,10 n.s |
| VALOR - P Fecha 2 | 0,48 n.s | 0,02 * | 0,06 n.s | 0,15 n.s | 0,14 n.s | 0,27 n.s |
| VALOR - P Fecha 3 | 0,19 n.s | 0,006 ** | 0,006 ** | 0,69 n.s | 0,02 * | 0,35 n.s |

(*): Indica que es estadísticamente significativo ($P < 0,05$).

(**): Indica que es altamente significativo estadísticamente ($P < 0,01$).

(n.s): Indica que no es significativo.