



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES-PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS FORESTALES**



**CONTRIBUCIÓN A LA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN *EX SITU* DE
Gomortega keule (Mol.) Baillon MEDIANTE ESTUDIOS MOLECULARES,
FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.**

**CATHERINE LOUISE DELAVEAU SÁEZ
CONCEPCIÓN – CHILE
2013**

**Profesor Guía: Sofía Valenzuela Aguilar
Dpto. de Silvicultura
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción**



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES-PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS FORESTALES**

**CONTRIBUCIÓN A LA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN *EX SITU* DE
Gomortega keule (Mol.) Baillon MEDIANTE ESTUDIOS MOLECULARES,
FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.**

**CATHERINE LOUISE DELAVEAU SÁEZ
CONCEPCIÓN – CHILE
2013**

**Profesor Guía: Sofía Valenzuela Aguilar
Dpto. de Silvicultura
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción**

**CONTRIBUCIÓN A LA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN *EX SITU* DE
Gomortega keule (Mol.) Baillon MEDIANTE ESTUDIOS MOLECULARES,
FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.**

COMISIÓN EVALUADORA:

SOFÍA VALENZUELA AGUILAR (Profesor Guía)

Bioquímica, Dr. rer. nat. _____

MATILDE URIBE MORAGA (Profesor Co-guía)

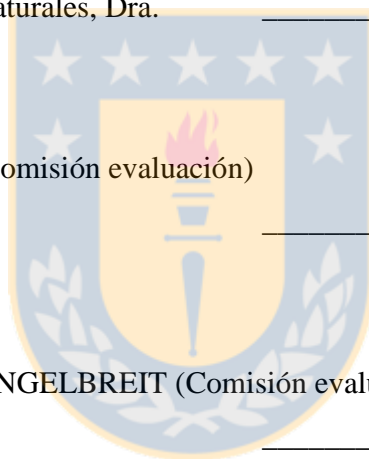
Profesora de Biología y Cs. Naturales, Dra. _____

EDUARDO RUIZ PONCE (Comisión evaluación)

Lic. en Biología, Dr. _____

ROSEMARIE WILCKENS ENGELBREIT (Comisión evaluación)

Lic. en Biología, Dr. rer. nat. _____



DIRECTORA DE POSTGRADO:

DARCY RÍOS LEAL

Profesora de Biología y Química, Dra. _____

DECANO FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES:

MANUEL SÁNCHEZ OLATE

Ing. Forestal, Dr. _____

ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

ABA: (\pm)-*cis*, *trans*-ácido abscísico.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

AFLPs: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados

AIA: ácido indol 3 acético.

AIB: ácido indolbutírico.

ANA: ácido α -naftalenacético.

BAP: 6-bencilaminopurina.

BTM: Broadleaved Tree Medium.

DKW: Driver y Kuniyuki Walnut medium

EcoRI: Endonucleasa de digestión

ES: Embriogénesis somática

GA₃: ácido giberélico.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

MS: Murashige y Skoog.

PCR: Reacción en cadena de la ADN polimerasa.

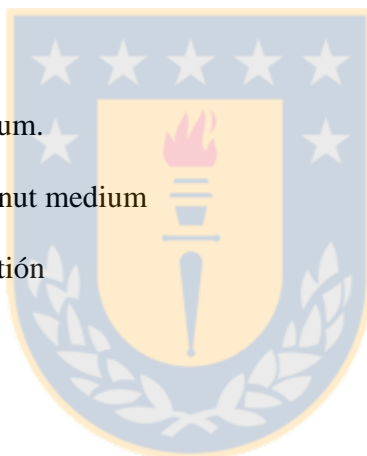
PPMTM: Plant preservative mixture.

PVP: polivinilpirrolidona.

TZ: tetrazolio.

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

WPM: Woody Plant Medium.



INDICE GENERAL

<i>TEMA</i>	<i>Nº</i> <i>PÁGINA</i>
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO 1. VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE AFLP EN TRES RELICTOS DE <i>Gomortega keule</i> (Mol.) Baillon, ESPECIE ENDÉMICA CHILENA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN.	22
CAPÍTULO 2. RESPUESTA MORFOGÉNICA DE MATERIAL ADULTO Y EMBRIONARIO DE <i>Gomortega keule</i> (Mol.) Baillon EN CONDICIONES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>.	36
CAPÍTULO 3. GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>Gomortega keule</i> (Mol.) Baillon Y LA PRESENCIA DE INHIBIDORES RELACIONADOS A ESTE PROCESO.	68
DISCUSIÓN GENERAL.....	102
CONCLUSIONES.....	108

ÍNDICE DE TABLAS

TÍTULO TABLA:	N°	PÁGINA
1.1. Porcentaje de polimorfismo detectado en 24 individuos de <i>Gomortega keule</i> con tres combinaciones selectivas de marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados).....		28
1.2. Índices de diversidad genética detectados en tres relictos de <i>Gomortega keule</i> utilizando marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados).....		28
2.1. Concentración y tiempo de exposición a los antisépticos en segmentos nodales de <i>Gomortega keule</i>		41
2.2. Tratamientos de proliferación para material adulto y juvenil de <i>Gomortega keule</i>		43
2.3. Dosis hormonales utilizados en la inducción callogénica de material embrionario y adulto de <i>Gomortega keule</i>		44
2.4. Porcentaje de oxidación, contaminación y supervivencia de segmentos nodales de <i>Gomortega keule</i> después de 20 días de cultivo.....		47
2.5. Supervivencia (%) de segmentos nodales de <i>Gomortega keule</i> provenientes de 5 individuos del relicto Coroney según medio de cultivo ensayado.....		48
2.6. Brotación (%) de segmentos nodales de <i>Gomortega keule</i> provenientes de 5 individuos del relicto Coroney según medio de cultivo ensayados.....		48

2.7. Respuesta al medio de cultivo, brotación y supervivencia (%), provenientes del árbol 5 de <i>Gomortega keule</i>	48
2.8. Supervivencia (%) de segmentos nodales de <i>Gomortega keule</i> provenientes de tres relictos.....	48
3.1. Tejido vegetal seminal de <i>Gomortega keule</i> utilizado en la extracción de fenoles totales.....	72
3.2. Descripción del material vegetal utilizado para la cuantificación de GA ₃ , AIA y ABA en semillas de <i>Gomortega keule</i> provenientes de dos temporadas.....	74
3.3. Valores promedios de germinación y conversión a plántula, en condiciones <i>in vitro</i> , de <i>Gomortega keule</i> en respuesta a la aplicación de distintas concentraciones de GA ₃	79
3.4. Concentración promedio de GA ₃ , AIA y ABA ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) en semillas y embriones cigóticos de <i>Gomortega keule</i> provenientes de dos temporadas mediante análisis con HPLC.....	81
3.5. Presencia de diferentes compuestos visualizados a través de pruebas histoquímicas específicas en los diferentes tejidos de la semilla de <i>Gomortega keule</i>	84

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>TÍTULO FIGURA:</i>	<i>Nº</i> <i>PÁGINA</i>
1. <i>Gomortega keule</i> . A. Árbol en relicto de la Provincia de Concepción. B. Flores terminales, C. Fruto. D. Semilla.....	3
2. Distribución geográfica de <i>Gomortega keule</i> (Imagen modificada de Muñoz-Concha y Davey 2011).....	3
1.1. Localización de los relictos de <i>Gomortega keule</i> estudiados y rango de distribución de la especie. Mapa modificado de García-González <i>et al.</i> (2008).....	25
2.1. Segmento nodales de <i>Gomortega keule</i> a los 20 días de su introducción <i>in vitro</i> . A. Contaminación bacteriana. B. Oxidación. C. Brotes sanos.....	47
2.2. Número de brotes promedio según tratamientos utilizados en material adulto y juvenil de <i>Gomortega keule</i> . Número de brotes promedio según tratamientos utilizados en material adulto y juvenil de <i>Gomortega keule</i> . T1: 0,1 ml L ⁻¹ BAP y 0,01 ml L ⁻¹ AIB, T2: 0,5 ml L ⁻¹ BAP y 0,01 ml L ⁻¹ AIB, T3: 0,1 ml L ⁻¹ BAP y 0,01 ml L ⁻¹ ANA, T4: 0,05 ml L ⁻¹ BAP y 0,01 ml L ⁻¹ ANA. Distintas letras indican diferencias significativas de acuerdo a test de Tukey ($p \leq 0,05$).....	50
2.3. Respuesta macromorfológica luego de un mes de cultivo de brotes de <i>Gomortega keule</i> en los tratamientos de proliferación en material adulto y juvenil. A-B. Brotes hiperhidratados de material adulto. C-D. Brotes y hojas alargadas de material juvenil.....	50

<p>2.4. Porcentaje de callogénesis obtenida a los 75 días de iniciada la inducción a partir de material embrionario en distintas soluciones minerales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas de acuerdo a el test de Tukey ($p \leq 0,05$).....</p>	51
<p>2.5. Aspectos macromorfológicos e histológicos de estructuras callogénicas según medio de cultivo en embriones cigóticos de <i>Gomortega keule</i>, a los 75 días de iniciada la inducción. A-Aa. Medio BTM, callo blanco, acuoso sin nódulos. B-Bb. Medio DKW, callo compacto, color marrón. C-Cc. Medio WPM, Callo blanco-amarillo, compacto, friable y con presencia de nódulos. D-Dd. Medio MS, callo acuoso no friable. A-D. Barra = 0,3 cm. Aa-Cc. Barra = 200 μm. Dd. Barra = 100 μm.....</p>	52
<p>2.6. Callos y estructuras proembriogénicas de <i>Gomortega keule</i> inducidos a partir del tratamiento T1 (1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de Kin). A-B. Callos en hoja a los 130 días de inducción A. Sección distal. B. Sección central. C-D. Material embrionario a los 90 días de inducción. C. Cara adaxial. D. Zona proximal al embrión con nódulos. E-H. Estructuras proembriogénicas a partir de cotiledones luego de 8 meses y medio de inducción. E. Estructuras globulares. F. Estado globular. G. Estado torpedo. H. Estado cotiledonar-amorfo.....</p>	53
<p>2.7. Corte histológico longitudinal de estructura proembriogénica y embriode obtenido a partir de callos cotiledonares de <i>Gomortega keule</i> inducidos con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de Kin).....</p>	54
<p>3.1. Test de viabilidad de embriones de <i>Gomortega keule</i>. A. Embriones provenientes de semillas de temporadas anteriores a 2010. B. Embriones provenientes de frutos de la temporada 2010.....</p>	78
<p>3.2. Germinación <i>in vitro</i> de embriones de <i>Gomortega keule</i>. A. Oxidación de cotiledones a los 30 días de iniciada la germinación asincrónica. B. Plántula de</p>	

Gomortega keule con cotiledones con bordes despigmentados a los 75 días. C. Plántula a los 100 días..... 79

3.3. Contenido promedio de fenoles totales (expresados en equivalentes de ácido gálico (mg L⁻¹)) en diferentes tejidos vegetales en semillas de *Gomortega keule* de temporada anterior a 2011 y temporada 2011. Ctrl: Control (hoja queule), Sc: semilla completa, Tg: tegumento; Sstg: semilla sin tegumento. n.d.: no detectable. Letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p \leq 0.05$)..... 80

3.4. Macromorfoanatomía de la semilla de *Gomortega keule*. A. Vista externa de la semilla (endocarpio). B. Semilla al interior del endocarpio. C. Corte longitudinal de la semilla, se observa los tegumentos, endospermo y embrión. D. Embrión. E: endocarpio, S: semilla, Tg: tegumento, En: endospermo, Eb: embrión, Cot: cotiledones, Eeb: eje embrionario..... 82

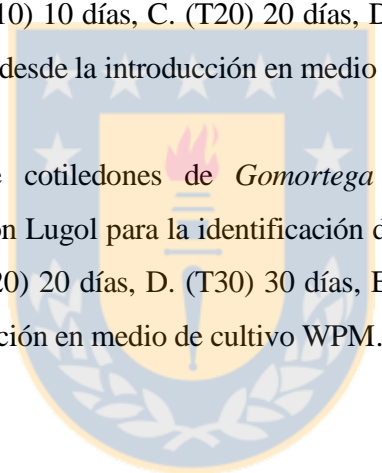
3.5. Caracterización histoquímica en cortes longitudinales de semillas de *Gomortega keule*. A-B. Caracterización blanco o control, en el cual la semilla no fue expuesta a ningún reactivo. A. Vista general de la semilla, distinguiéndose tegumento, embrión y endospermo. B. Detalle del tegumento y endospermo, obsérvese coloración natural marrón del tegumento interno, endospermo denso por presencia de material de reserva. C. Tinción con cloreto de Fe III con reacción positiva del tegumento interno por presencia de compuestos fenólicos. D. Vista general del tegumento y endospermo teñido con azul de toluidina. E. Detalle de los tegumentos externos e internos teñido con azul de toluidina. Tegumento externo formado por células con paredes gruesas, presencia de elementos conductores del xilema. F. Vista general del embrión teñido con Sudan Black B. G. Cotiledón: reacción positiva de xylydine ponceau indicando presencia de proteínas como material de reserva. H. Cotiledón: reacción positiva de lugol indicando presencia de gránulos de almidón. I. Cotiledón: reacción positiva a Sudan Black B, indicando presencia de lípidos como material de reserva. J.

Endospermo coloreado con xylidine ponceau, cuerpos proteicos en forma de cristales. Tg: tegumentos, En: endospermo, Eb: embrión, Te: tegumento externo, Ti: tegumento interno, Xi: xilema..... 85

3.6. Sección longitudinal de cotiledones de *Gomortega keule* durante la germinación *in vitro* teñidos con Sudan Black B para la identificación de lípidos totales. A. (T0) 0 día, B. (T10) 10 días, C. (T20) 20 días, D. (T30) 30 días, E. (T40) 40 días, F. (T60) 60 días desde la introducción en medio de cultivo WPM... 87

3.7. Sección longitudinal de cotiledones de *Gomortega keule* durante la germinación *in vitro* teñidos con xylidine ponceau para la identificación de proteínas. A. (T0) 0 día, B. (T10) 10 días, C. (T20) 20 días, D. (T30) 30 días, E. (T40) 40 días, F. (T60) 60 días desde la introducción en medio de cultivo WPM... 88

3.8. Sección longitudinal de cotiledones de *Gomortega keule* durante la germinación *in vitro* teñidos con Lugol para la identificación de almidón. A. (T0) 0 día, B. (T10) 10 días, C. (T20) 20 días, D. (T30) 30 días, E. (T40) 40 días, F. (T60) 60 días desde la introducción en medio de cultivo WPM..... 89



RESUMEN

Gomortega keule (Mol.) Baillon, queule, es una especie arbórea, endémica, monotípica y catalogada en peligro de extinción. La especie habita en pequeñas superficies de la Cordillera de la Costa, entre las provincias de Cauquenes 35°46' S y Arauco 37°41' S. Las poblaciones descritas se encuentran insertas en plantaciones exóticas, poseen un bajo número de individuos y existe una escasa regeneración *in situ*, principalmente sexual. Por estas razones, resulta imprescindible estudiar alternativas a la propagación tradicional, como lo es el cultivo de tejidos vegetales. Además, investigar posibles factores, como la existencia de compuestos inhibidores tales como ácido abscísico (ABA) y fenoles que pueden influir en la baja tasa de germinación. Por otro lado, dado que la diversidad genética es requerida para adaptarse a cambios en las condiciones medioambientales, conocer la variabilidad genética de las poblaciones remanentes permite capturar individuos genéticamente distintos para fines de conservación. Es por ello, que el objetivo de esta investigación fue micropropagar individuos de *Gomortega keule* para la conservación *ex situ* de la especie y cuantificar inhibidores asociados a su germinación.

La variabilidad genética se estimó en tres relictos de la Provincia de Concepción utilizando la técnica AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados). El sitio con mayor porcentaje de polimorfismos correspondió a Cerro Neuque, con un 84,6%, seguido por Coroney y Hualqui, con 59,6% y 42,3%, respectivamente. Se obtuvo respuesta morfogénica a partir de material vegetal de diferentes edades (embrionario, juvenil y adulto) y se determinó que el mayor porcentaje de establecimiento en material adulto se logró utilizando una asepsia con etanol al 30% (v/v) por dos min y 50% (v/v) de hipoclorito de sodio por 20 min. La solución mineral Murashige y Skoog (MS) resultó ser significativamente mejor sólo para la brotación de un genotipo (30%). La inducción callogénica de material adulto y embrionario se logró en medio Woody Plant Medium (WPM) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1 mL L⁻¹) y Kinetina (Kin, 1 mL L⁻¹) y sólo en tejido embrionario se observaron estructuras proembriogénicas. La cantidad de fenoles totales en tegumentos de semillas de la temporada fue significativamente mayor que en tegumentos de semillas de temporadas anteriores. La germinación *in vitro* no se vió influenciada por la aplicación exógena de ácido giberélico (GA₃), obteniendo un porcentaje de conversión a plántula máximo de

29,17%. La relación giberelinas:ABA fue en todos los tratamientos positiva y el ácido indol acético (AIA) significativamente mayor en embriones en proceso de germinación *in vitro*. Las principales sustancias de reserva en semillas de *G. keule* en orden decreciente fueron lípidos, proteínas y almidón, durante las primeras etapas se observó consumo de lípidos y proteínas. En cambio, los gránulos de almidón fueron siempre pequeños, escasos y sin evidencia de ser una fuente de carbohidratos durante el período germinativo estudiado.

La información obtenida sirve de base para investigaciones futuras, además de contribuir al desarrollo de estrategias de conservación que permitan avanzar en la protección, mejoramiento genético y regeneración de esta especie amenazada.



ABSTRACT

Gomortega keule (Mol.) Baillon, queule, is an endemic tree species and the only member of the Gomortegaceae family. It is listed as an endangered species. Queule live in small, confined areas in the Chilean Coast Cordillera, between Cauquenes 35°46' S and Arauco 37°41' S. The remaining populations have low numbers of individuals, are surrounded by exotic plantations and have a low rate of *in situ* sexual regeneration. For this reasons, it is essential to study alternatives to traditional propagation, such as plant tissue culture and to investigate possible germination inhibitors, like abscisic acid (ABA) and phenols that may influence the low rate of germination. Additionally, the importance of genetic variability in determining a species ability to adapt to changing environmental conditions, it is necessary to study the genetic variability of queule's remaining populations in order to make an informed conservation strategy for the species as whole. Therefore, the aim of this research was to micropropagate *Gomortega keule* individuals for *ex situ* conservation and to quantify inhibitors affecting the germination of its seeds.

The genetic variability of three isolated, relict populations of queule from the Province of Concepción was estimated using AFLP. The relict population with the highest percentage of polymorphism was located in Cerro Neuque with 84.6%, followed by Coroney and Hualqui with 59.6% and 42.3%, respectively. Morphogenic response was obtained from plant material of different ages (embryonic, juvenile and adult) and the highest percentage of adult tissue establishment was obtained by following an aseptic protocol of 30% (v/v) ethanol wash for two minutes and 50% (v/v) sodium hypochlorite soak for 20 minutes. The mineral solution Murashige and Skoog (MS) was only significantly better medium for the sprouting of a genotype (30%). The callogenic induction of adult and embryonic plant material was achieved in Woody Plant Medium (WPM) supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, 1 mL L⁻¹) and Kinetin (Kin, 1 mL L⁻¹). Proembryonic structures were only observed in embryonic tissue cultures. Total phenols in seed integuments were significantly higher in seeds collected from the current season than those collected from previous seasons. *In vitro* germination was not influenced by the exogenous application of gibberellic acid (GA₃) and plant conversion rate of 29.17% was obtained. The balance between gibberellins and abscisic acid was positive in all treatments and indolacetic acid was high only in germinating embryos.

The main *G. keule* seed reserves in descending order were lipids, proteins, and starch. During the early germination stages, lipids and proteins were primarily consumed. In contrast, the starch granules were always small and scarce, and there was no evidence that starch was an important source of nutrition during the germination period studied.

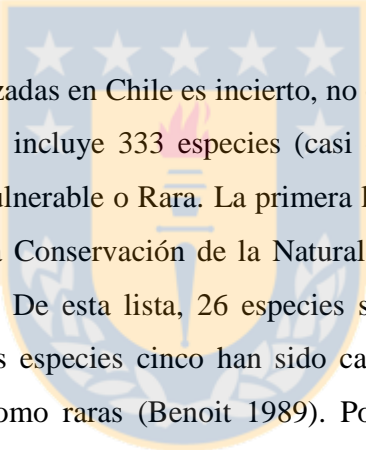
The information obtained provides a basis for future research and contributes to the development of conservation strategies to better protect, improve and regenerate this endangered species.



INTRODUCCIÓN GENERAL

Antecedentes generales de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon

Las especies nativas chilenas han ido recuperando su importancia ecológica y económica luego de haber sufrido un fuerte deterioro, producto de la extracción indiscriminada de los mejores individuos del bosque para ser sustituidos por plantaciones forestales (Bustamante *et al.* 2005). Sin embargo, el conocimiento del estado de conservación de la flora chilena es aún escaso y difuso. Mediante catastros se ha determinado que los mayores problemas de conservación se concentran entre las regiones de Valparaíso y del Bío-Bío, producto de la mayor concentración de población humana y actividades agroindustriales (Marticorena *et al.* 1995).



El número total de plantas amenazadas en Chile es incierto, no obstante, el Libro Rojo de la Flora Terrestre de Chile (Benoit 1989) incluye 333 especies (casi el 6% de la flora chilena) en las categorías Extinta, En Peligro, Vulnerable o Rara. La primera lista global de plantas amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) incluyó 323 especies chilenas (Walter y Gillett 1998). De esta lista, 26 especies se encuentran en las regiones del Maule y del Bío-Bío. Entre estas especies cinco han sido catalogadas en riesgo de extinción, nueve como vulnerables y 12 como raras (Benoit 1989). Por su parte, Arroyo *et al.* (2004) informan que estas regiones han sido consideradas dentro de los *hotspot* de biodiversidad chilenos. Por otro lado, Villagrán (1994) expone que la mayor cantidad de especies leñosas de Chile se presentan entre el río Maule y el río Bío-Bío (36 y 38°S), zona geográfica en que se concentran buena parte de los endemismos arbóreos. Recurrente en esta área geográfica es la marcada fragmentación que exhiben las comunidades naturales (Bustamante y Grez 1995), principalmente en la Cordillera de la Costa, la cual presenta una profunda alteración del paisaje producto de la prolongada historia de perturbaciones antrópicas (desmonte, actividades agrícolas, ganadería extensiva, actividades mineras e industriales). Adicionalmente, durante las últimas décadas, la sustitución y establecimiento de cultivos forestales exóticos y emplazamientos urbanos densamente poblados ha restringido la vegetación natural a escasos remanentes localizados en quebradas (Bustamante *et al.* 2005, Smith-Ramírez *et al.* 2005).

Con el propósito de proteger los ecosistemas forestales, la Corporación Nacional Forestal (CONAF) ha desarrollado líneas de gestión que apuntan a la conservación y uso sustentable de los recursos (CONAF 2005). Dentro de estas líneas se establece a *Gomortega keule* como una de las especies prioritarias para promover su conservación, dado principalmente a su condición de especie monotípica y endémica (Rodríguez *et al.* 2005, Allendorf y Luikart 2007). Por lo tanto, las herramientas de gestión deben apuntar a estrategias que permitan cambiarla de su actual estado “En Peligro de Extinción” a una categoría de menor riesgo o vulnerabilidad.

Gomortega keule (Mol.) Baillon (queule), es una especie arbórea monotípica y monogénica de la familia Gomortegaceae. Queule es un árbol monoico, perennifolio que puede alcanzar 25-30 m de altura, frondoso, de tronco recto, cilíndrico, de hasta 60 cm de diámetro y generalmente multifustal producto del rebrote de tocón (**Figura 1A**). Presenta flores en inflorescencia terminal o axilar (**Figura 1B**). El fruto es una drupa ovoide o globosa (**Figura 1C**) y sus semillas se encuentran al interior de un endocarpio grueso y pétreo (**Figura 1D**). Florece, por lo general, de abril a mayo, aunque durante gran parte del año produce flores. Los frutos completan su madurez en 17-20 meses y se encuentran desde fines de marzo a comienzos de mayo (Muñoz 1973, Rodríguez *et al.* 1983, Marticorena y Rodríguez 2001, Rodríguez *et al.* 2005, Le Quesne y Stark 2006, Muñoz- Concha y Saud, 2011).

Queule despierta gran interés científico debido a su escasa área de distribución. Habita en pequeñas y fragmentadas superficies, restringiéndose a quebradas húmedas y faldeos preferentemente de exposición sur en la Cordillera de la Costa, desde la provincia de Cauquenes (35°46'S) hasta la de Arauco (37°41'S) (**Figura 2**) (Armesto *et al.* 1995, Hechenleitner *et al.* 2005, Le Quesne y Stark 2006). Los pequeños rodales se presentan formando unidades fisonómicas homogéneas y puras, aunque en ocasiones se presenta asociado a especies higrófilas como el pitao, avellano y lingue, entre otros, con los que conforma remanentes del Bosque Maulino (Armesto *et al.* 1995). Según San Martín y Sánchez (1999) se conocen solamente 22 poblaciones, las que se encuentran insertas en una matriz de vegetación exótica y afectada por un intenso efecto de borde encontrándose en constante amenaza de ser talados para ser reemplazados por plantaciones artificiales (Marticorena y Rodríguez 2001). Sólo se encuentran protegidas dos

poblaciones, en la Reserva Nacional Los Queules y la Reserva Nacional Los Ruiles, y desde el año 1995 fue declarado Monumento Natural (CONAF 2005).



Figura 1. *Gomortega keule*. A. Árbol en relicto de la Provincia de Concepción. B. Flores terminales. C. Fruto. D. Semilla.

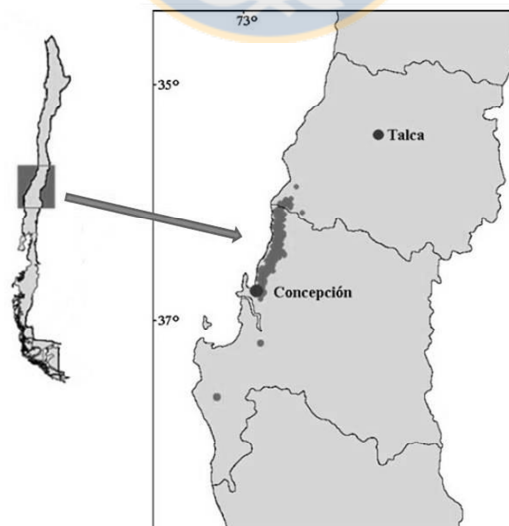


Figura 2. Distribución geográfica de *Gomortega keule* (Imagen modificada de Muñoz-Concha y Davey 2011).

La literatura establece diversos factores que contribuyen a mantener a una especie en amenaza de extinción y éstos actuarían sinérgicamente. Producto de la intervención antrópica se produce la pérdida del hábitat, la introducción de especies, la sobre explotación y contaminación. Adicionalmente, la interacción de factores estocásticos ambientales, demográficos y genéticos incrementarían el riesgo de extinción principalmente a poblaciones de reducido tamaño (Primack 2000, Frankham *et al.* 2004, Hunter y Gibbs 2007).

Importancia de la variabilidad genética para la conservación de *Gomortega keule*

Reportes señalan que la pérdida de variabilidad genética en las poblaciones contribuye a la extinción, dado que disminuye su capacidad de adaptación a cambios medioambientales, por lo cual es vital su conocimiento en especies raras o con algún grado de amenaza (Frankham *et al.* 2004).

La variabilidad genética, en consecuencia, se ha establecido como un objetivo prioritario en los planes de conservación, siendo de gran interés los estudios que evalúan poblaciones naturales para detectar variantes genéticas únicas y/o centros de diversidad genética, diseñando actividades de conservación *in situ* y *ex situ* para proteger la integridad de reservas genéticas nativas (Toribio y Celestino 2000). En este contexto, las zonas que concentran los mayores niveles de variabilidad son las más importantes desde el punto de vista de la conservación de una especie.

Entre las técnicas utilizadas para estimar la variabilidad genética se encuentran los marcadores moleculares. Estos permiten reconocer directamente las diferencias genéticas entre individuos, obteniéndose un "perfil molecular" o "fingerprinting" característico para cada especie o variedad, independiente de las condiciones de crecimiento de las plantas (Wang y Szmidt 2001, Weising *et al.* 2005, Semagn *et al.* 2006). Además, permiten obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada, así como información sobre frecuencias alélicas, nivel de heterocigosidad de una población y subdivisión de poblaciones, entre otras, en un período de tiempo menor al ocupado mediante estrategias convencionales (Parker *et al.* 1998, Toro y Caballero 2005). Se estima por tanto, que un programa orientado a recuperar las especies debiera

considerar la variabilidad genética de poblaciones naturales aisladas entre sí (Rao 2004). Deben ser considerados varios criterios al momento de escoger un marcador molecular. En este sentido, es importante considerar si el marcador es reproducible entre laboratorios, si es dominante o codominante, lo que permitiría distinguir entre homocigoto y heterocigoto, la cantidad de sitios polimórficos que este detecta y la cantidad de material inicial requerido para el análisis (Osman *et al.* 2003, Semagn *et al.* 2006).

En especies con algún grado de amenaza se han utilizado distintos marcadores moleculares para estimar la variabilidad genética y realizar análisis de paternidad, entre ellos: RAPDs (polimorfismo del ADN amplificado al azar) (Torres *et al.* 2003, Jayaram y Prasad 2008), ISSR (intermicrosatélites) (Cao *et al.* 2006, Huang *et al.* 2009), SSR o microsatélites (Azpilicueta *et al.* 2004) y AFLPs (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) (Palacios *et al.* 1999, Kim *et al.* 2005, Ni *et al.* 2006, Xiao *et al.* 2006).

En especies nativas se ha informado el uso de marcadores moleculares para estimar la variabilidad genética en *Fitzroya cupressoides* (Allnut *et al.* 1999), *Pilgerodendron uviferum* (Allnut *et al.* 2003), *Berberidopsis collarina* (Etisham-UI-Haq *et al.* 2001) y en el género *Nothofagus spp.* (Gallo *et al.* 2006). En *G. keule* se determinó la variabilidad genética mediante ISSR en tres poblaciones ubicadas en el rango norte de su distribución, obteniéndose un 30,26% y un 69,74% de variabilidad entre y dentro de poblaciones, respectivamente (Herrera *et al.* 2005). Posteriormente se amplió el estudio hasta el rango sur de su distribución obteniéndose un 27% de variabilidad entre poblaciones y un 73% dentro de las poblaciones; siendo aquellas con mayor número de individuos las de mayor variabilidad (García-González *et al.* 2008). Además, Lander *et al.* (2007) reportan el desarrollo de 8 microsatélites, los cuales fueron utilizados por los mismos autores (2009, 2010) para dilucidar el flujo de genes existente dentro y entre poblaciones de *G. keule* distanciadas hasta 6 km, así como también la efectiva polinización existente entre áreas de bosque nativo y sistemas agrícolas no intensivos.

Para conservar y reproducir especies raras o amenazadas es primordial capturar la mayor variabilidad genética (Harding 2003, Harris 2003). Dentro de las técnicas utilizadas para este fin,

los AFLPs permiten analizar una amplia porción del genoma y no requiere previo conocimiento de la secuencia de ADN para su aplicación. Esta técnica se basa en la amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de fragmentos de ADN digeridos con dos enzimas de restricción (Vos *et al.* 1995, Wang y Szmidt 2001, Xiao *et al.* 2006).

Micropropagación de *Gomortega keule* y su conservación *ex situ*

La conservación de una especie incluye estrategias que permitan su preservación, mantenimiento, uso sostenible, restauración y mejoramiento del ambiente natural. Si las estrategias se desarrollan en su hábitat natural se denomina conservación *in situ* y si se realizan fuera de él, *ex situ* (Hechenleitner *et al.* 2005). Por ello, dentro de un plan de conservación, es vital conocer o determinar la variabilidad genética de una especie, no obstante, también es necesario definir la técnica de propagación más adecuada a utilizar según la especie en estudio.

En tal sentido, la propagación vegetativa convencional o micropropagación *in vitro* de árboles adultos, ofrecen la ventaja común de transferir toda la ganancia genética desde el árbol donante hacia la descendencia, por lo cual, son consideradas como el medio más efectivo para el establecimiento de huertos clonales a partir de individuos de interés ecológico o con características de interés económico como calidad de madera, producción de frutos, vigor, resistencias, entre otros (Pierik 1990). La propagación vegetativa, constituye un modo rápido y alternativo a la reproducción sexual para la captura de la ganancia genética, cuando el árbol alcanza una edad crítica de conservación o desarrollo (adulto). Como consecuencia de esto, individuos con una edad adulta que permitan una evaluación adecuada de sus características para selección, son difíciles de propagar (recalcitrantes), junto con otras características inherentes a la biología de los árboles (Hasbún 2006). La producción forestal ha desarrollado métodos de propagación vegetativa, entre ellos, el cultivo *in vitro* de órganos, tejidos y células, que presenta ventajas incuestionables en determinar y programar la regeneración de plántulas capaces de crecer y desarrollarse en condiciones naturales. Además de obtener material vegetal aséptico, es una ventaja adicional para facilitar sin problemas el intercambio fitosanitario y garantizar el mantenimiento de colecciones *in vitro* (Fay y Clemente 1997, Sarasan *et al.* 2006).

Gomortega keule presenta una difícil propagación por la vía convencional, reportándose una baja capacidad germinativa atribuida a la dureza de su endocarpio (Maldonado 1990). Estudios de propagación sexual indican germinación a partir del quinto mes de iniciados los ensayos, con tasas de 4% realizando remoción de la testa (Maldonado 1990) y de 24% utilizando semillas escarificadas naturalmente por más de una temporada en el suelo (Donoso y Escobar 1985). A su vez, Orellana (1996) aplicó a semillas provenientes del suelo 10 g L^{-1} de ácido giberélico (GA_3) obteniendo un 17% de germinación. Según Hechenleitner *et al.* (2005) las plántulas alcanzarían de 8 a 10 cm luego de un año de crecimiento. Respecto a la propagación vegetativa, Peña (1995) informó bajas tasas de enraizamiento de estacas (2%) a pesar de utilizar ácido indol butírico (AIB) como inductor. En base a esto, el cultivo *in vitro* permite la propagación de especies en las cuales otros métodos son inviables (recalcitrantes, perennes de largos ciclos, amenazadas de extinción, entre otros) (Fay y Clemente 1997, Sarasan *et al.* 2006).

La micropropagación se basa en vías morfogénicas por las cuales es posible la regeneración de plantas. Estas vías son la organogénesis y embriogénesis somática. La organogénesis consiste en la formación de yemas o de meristemas radiculares inducidos por reguladores del crecimiento (citoquininas y auxinas principalmente), la que puede ser en forma directa, a partir de explantos (células, tejidos u otros órganos vegetales), o en forma indirecta, a partir de callos generando la diferenciación de plantas. Variables como la edad fisiológica y el tamaño de los explantos, el estado de la planta madre y el período del año durante el cual se inicia el cultivo son claves para el éxito de éste. También la luz, la temperatura, la consistencia del medio de cultivo y el pH son factores críticos para la iniciación de yemas *in vitro* (Margara 1988, Pierik 1990). Este proceso consta, al menos, de cuatro etapas: inducción de yemas sobre explanto inicial, desarrollo y multiplicación de brotes, enraizamiento y, por último aclimatación. En especies amenazadas, cuyas poblaciones son extremadamente reducidas puede constituir una etapa clave para el establecimiento de un banco de germoplasma de éstas, lo cual indudablemente tiene un gran valor no sólo para la investigación, sino también para la conservación (Lynch 2003).

La embriogénesis somática (ES), asexual o adventicia, es un evento morfogénico que ocurre bajo condiciones controladas y consiste en obtener *in vitro*, a partir de embriones maduros e

inmaduros, de células o tejidos somáticos (haploides o diploides) estructuras bipolares o embriones somáticos que siguen las mismas fases de desarrollo de la embriogénesis cigótica, pero a diferencia de esta última el nuevo embrión es genéticamente igual al material parental (Celestino *et al.* 2005).

Se pueden distinguir dos tipos de embriogénesis somática, dependiendo si existe ausencia o presencia de callo: embriogénesis somática directa (ESD) y embriogénesis somática indirecta (ESI). En el primer caso el embrión se forma directamente, de una célula o tejido sin que se produzca una formación previa de callo. Las células a partir de las cuales se forman los embrioides reciben el nombre de células determinadas pro-embriogénicas y el material inicial para este tipo de embriogénesis se encuentra ya plenamente rejuvenecido. Para ello es necesario inducir la formación de agregados embriogénicos en un medio que contenga una elevada cantidad de auxina. En el caso de leñosas se puede inducir una ESD a partir de óvulos, embriones inmaduros y maduros, cotiledones, entre otros. Por otro lado, se conoce bien que la utilización exógena de reguladores del crecimiento, particularmente auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), no sólo inicia el desarrollo de los embriones somáticos, sino que también estimula la multiplicación clonal de estas células predeterminadas (Celestino *et al.* 2005, George *et al.* 2008).

En la ESI primero se forma un callo, a partir del cual se generan los embrioides. Las células a partir de las cuales se forman estos embrioides se denominan células determinadas embriogénicamente inducidas. En este caso las células diferenciadas deben ser primero desdiferenciadas para ser “redeterminadas” como células embriogénicas después de la división celular (Pierik 1990). En general, las etapas de la embriogénesis somática son: inducción, iniciación, proliferación de cultivos embriogénicos, maduración, germinación y obtención de plántulas. Los embriones somáticos se multiplican por embriogénesis secundaria, lo que genera un proceso recurrente. La capacidad de multiplicación clonal mediante embriogénesis recurrente es muy elevada, aparentemente ilimitada en el tiempo y libre de condicionantes estacionales, lo que proporciona un enorme potencial multiplicativo a esta técnica. El principal cuello de botella se encuentra en la producción sincrónica de embriones de calidad, que den lugar a plantas

vigorosas, esto debido a que pocos genotipos responden positivamente frente a los tratamientos de maduración (Celestino *et al.* 2005).

En este contexto, existen estudios sobre flora nativa realizados en Chile utilizando técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* y de conservación de germoplasma; entre estos, cabe destacar investigaciones que han abordado la propagación de especies con algún grado de amenaza, como por ejemplo, *G. keule* (Calderón-Baltierra *et al.* 1993, Jordan *et al.* 2005, Muñoz-Concha y Davey 2011, Muñoz-Concha *et al.* 2012), *Beilschmiedia berteriana* (Calderón-Baltierra y Rotella 1998, Uribe *et al.* 2011), *Drymis winteri* (Jordan 1999), *Araucaria araucana* (Jérez 1999), *Pitavia punctata* (Araneda 2000), *Legrandia concinna* (Uribe y Cifuentes 2004), *Berberidopsis corallina* (Uribe *et al.* 2008) así como la recuperación de genotipos de avellano chileno (*Gevuina avellana*) (Mardones 1999). En el género *Nothofagus* existen algunos trabajos preliminares de producción de plantas a partir de semillas, yemas axilares o ápicales, secciones nodales y lámina foliar de individuos juveniles y adultos (Martínez-Pastur y Arena 1997, Peralta 2001, Sánchez-Olate *et al.* 2004, Sabja *et al.* 2008, Uribe *et al.* 2012). En raulí se ha logrado obtener embriones somáticos a partir de semilla madura, previa generación de masas proembriogénicas condicionadas por la aplicación de altas dosis de auxinas y citoquininas en la fase de inducción (Castellanos *et al.* 2005).

Germinación *in vitro* de *Gomortega keule* y presencia de inhibidores

Según lo expuesto por Koul-Moza y Bhatnagar (2007) el conocimiento que puede obtenerse sobre el estudio de la biología reproductiva de una especie amenazada es crucial para cualquier propuesta de conservación. Por consiguiente, conocer algunos aspectos de la fisiología y bioquímica de la semilla de *G. keule* podrían ayudar a desarrollar protocolos para mitigar las causas que están impidiendo la regeneración de la especie y que complementarían las técnicas de propagación actualmente utilizadas.

La comprensión de los aspectos mencionados han sido analizados en especies modelos como *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, entre otras, avalando el rol

que cumplen los reguladores del crecimiento, como el ácido abscísico (ABA) libre en semillas inhibiendo la germinación y manteniendo la dormancia. Por otro lado, la germinación se encuentra regulada principalmente por la relación existente entre las cantidades endógenas de giberelinas (GAs) y ABA y la sensibilidad de los tejidos a dichas fitohormonas. Así, un mayor contenido de ABA bloquearían la germinación, y por el contrario, un mayor contenido de GAs la promueven (Bewley 1997, Kucera *et al.* 2005, Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006, Bentsink y Koornneef 2008).

Adicionalmente, los ácidos fenólicos (cafeico, p-cumárico, ferúlico, cinámico y coumarina) y sustancias fenólicas (polifenoles y flavonoides) contenidas en semillas y frutos tendrían un efecto inhibitorio de la germinación al incrementar la impermeabilidad al agua y gases (Bewley y Black 1994, Debeaujon *et al.* 2007). Muchos de ellos se encontrarían en los tejidos de la semilla como protección contra la depredación (Srivastava 2002, Tavares *et al.* 2003, Lattanzio *et al.* 2006). La información acerca de la presencia de estos inhibidores en el embrión o en tejidos que lo rodean es aún escasa para muchas especies (Magnitskiy y Plaza 2007), incluyendo *G. keule*. Además, para que una especie logre establecerse, las principales sustancias de reserva de la semilla (carbohidratos, proteínas y lípidos) deben estar disponibles tanto para la formación de estructuras físicas (paredes celulares) como para procesos asociados a la respiración y síntesis de intermediarios metabólicos (Borges-Corte *et al.* 2006).

Los serios problemas de conservación que afectan a *G. keule*, entre ellos, los problemas asociados a su distribución, regeneración y escasa respuesta a los tratamientos de propagación generan la necesidad de investigaciones que tiendan a comprender y esclarecer las causas que han llevado a la especie a tan frágil situación. Es por ello, que el estudio de la biología reproductiva, la implementación de técnicas de micropropagación en conjunto con los estudios de la variabilidad genética ofrece la posibilidad de aumentar el número de individuos, conservar *ex situ* y ser una alternativa a bancos de semillas, con el fin de avanzar en protección, mejoramiento genético y regeneración de esta especie amenazada y convertirse en una alternativa para utilizarse en conjunto con programas de conservación tradicional (Lynch 2003, Pence 2003, Reed *et al.* 2011).

HIPÓTESIS

Debido a lo expuesto anteriormente, en esta Tesis Doctoral se postulan las siguientes hipótesis de trabajo:

1. “Individuos de *Gomortega keule* provenientes de poblaciones con mayor variabilidad genética poseen una mayor supervivencia bajo condiciones *in vitro* y la capacidad morfogénica de los tejidos determinan su micropropagación”.
2. “La presencia de inhibidores de la germinación en *Gomortega keule* determinan la escasa regeneración de esta especie”.



OBJETIVO GENERAL

Micropropagar individuos de *Gomortega keule* para la conservación *ex situ* de la especie y cuantificar inhibidores asociados a su germinación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estimar la variabilidad genética de *Gomortega keule* en tres relictos de la provincia de Concepción mediante AFLP.
2. Evaluar la respuesta morfogénica de material adulto y embrionario de *Gomortega keule* en condiciones de cultivo *in vitro*.
3. Evaluar la germinación *in vitro* de *Gomortega keule* y la presencia de inhibidores relacionados a este proceso.

LITERATURA CITADA.

- Allendorf FW, G Luikart. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing. Oxford. UK.
- Allnut TR, AC Newton, A Lara, A Premoli, JJ Armesto, R Vergara, M Gardner. 1999. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce) a threatened South America conifer. *Molecular Ecology* 8(6): 975-987.
- Allnut TR, AC Newton, A Premoli, A Lara. 2003. Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgerodendron uviferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. *Biological Conservation* 11: 245-253.
- Araneda M. 2000. Alternativas de recuperación de una especie en peligro mediante cultivo y multiplicación *in vitro*. El caso de *Pitavia punctata* (R. et P.) Mol. Memoria de Título. Fac. Cs. Forestales. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
- Armesto J, C Villagrán, MK Arroyo. 1995. Ecología de los bosques nativos de Chile. Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Arroyo MTK, PA Marquet, C Marticorena, JA Simonetti, L Cavieres, F Squeo, R Rozzi. 2004. Chilean winter rainfall-Valdivian forest. In: Mittermeier RA, PR Gil, M Hoffmann, J Pilgrim, T Brooks, CG Mittermeier, J Lamoreux, GA da Fonseca (eds.). Hotspots revisited: Earth's biologically wealthiest and most threatened ecosystems. Cemex. México D.F. México. pp. 99-103.
- Azpilicueta MM, H Caron, C Bodénès, LA Gallo. 2004. SSR markers for analyzing South American *Nothofagus* species. *Silvae Genetica* 53(5-6): 240-243.
- Benoit I. 1989. Libro Rojo de la Flora Terrestre de Chile. Primera Parte. CONAF. Santiago. Chile.
- Bentsink L, M Koornneef. 2008. Seed dormancy and germination. The Arabidopsis Book 6. The American Society of Plant Biologists. Rockville. MD. USA.

- Bewley JD, M Black. 1994. Seeds: physiology of development and germination. 2nd ed. Plenum Press. New York. USA.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Borges-Corte V, EEL Borges, CA Pontes, IT Almeida, CA Pontes, D Pinho. 2006. Mobilização das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Árvore* 30(6): 941-949.
- Bustamante R, A Grez. 1995. Consecuencias ecológicas de la fragmentación de los bosques nativos. *Ambiente y Desarrollo* 11: 58-63.
- Bustamante RO, JA Simonetti, AA Grez, J San Martín. 2005. Fragmentación y dinámica de regeneración del bosque maulino: diagnóstico actual y perspectivas futuras. En: Smith-Ramírez C, JJ Armesto, C Valdovinos (eds.). *Historia, biodiversidad y ecología de los bosques de la Cordillera de la Costa*. Editorial Universitaria. Santiago. Chile. pp. 555-564.
- Calderón-Baltierra X, F Pérez, A Rotella. 1993. Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (Magnoliopsidae, Gomortegaceae). *Bosque* 14(1): 23-28.
- Calderón-Baltierra X, A Rotella. 1998. Establecimiento *in vitro* de *Beilschmiedia berteriana* (Gay) Kosterm (Lauraceae). *Información Tecnológica* 9(5): 219-275.
- Cao P, QF Yao, BY Ding, HY Zeng, YX Zhong, CX Fu, XF Jin. 2006. Genetic diversity of *Sinojackia delichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 231-239.
- Castellanos H, M Sánchez-Olate, D Ríos. 2005. Embriogénesis somática como alternativa potencial para la regeneración *in vitro* del género *Nothofagus*. En: Gutiérrez B, O Ortiz, MP Molina (eds.). *Clonación de raulí. Estado actual y perspectivas*. INFOR CEFOR UACH. Concepción. Chile. pp. 59-74.
- Celestino C, I Hernández, E Careros, D López-Vela, M Toribio. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 14(3): 345-357.

- CONAF. 2005. Planes nacionales de conservación del queule, *Gomortega keule* (Mol.) Baillon, y pitao, *Pitavia punctata* (Ruiz et Pavón) Mol., en Chile. CONAF. Santiago. Chile.
- Debeaujon I, L Lepiniec, L Pourcel, JM Routaboul. 2007. Seed coat development and dormancy. In: Bradford K, H Nonogaki (eds.). Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing Plant Science. Oxford. UK. pp: 25-49.
- Donoso C, B Escobar. 1985. Germinación de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon. Bosque 6(2): 120-122.
- Etisham-UI-Haq M, RT Allnut, C Smith-Ramírez, MF Gardner, JJ Armesto, AC Newton. 2001. Patterns of genetics variation in *in* and *ex situ* populations of the threatened chilean vine *Berberidopsis corallina*, detected using RAPD markers. Annals of Botany 87: 813-821.
- Fay M, M Clemente. 1997. Aplicación de las técnicas de cultivo en la propagación y conservación de especies amenazadas. Monografías del Jardín Botánico de Córdoba 5: 43-50.
- Finch-Savage WE, G Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171: 501-523.
- Frankham R, JD Ballou, DA Briscoe, KH McInnes. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- Gallo LA, P Marchelli, MM Azpilicueta, P Crego. 2006. El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. Bosque 27(1): 3-15.
- García-González R, B Carrasco, P Peñailillo, L Letelier, R Herrera, B Lavandero, M Moya, P Caligari. 2008. Genetic variability and structure of *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (Gomortegaceae) relict populations: geographical and genetic fragmentation and its implications for conservation. Botany 86: 1299-1310.
- George EF, MA Hall, GJ De Klerk. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3rd Edition, Vol. 1. The background. Springer. Dordrecht. The Netherlands.

- Harding K. 2003. Stability assessments of conserved plant germplasm. In: Benson EE (ed.). Plant conservation biotechnology. Taylor & Francis e-library. London. UK. pp: 97-103.
- Harris SA. 2003. Molecular approaches to assessing plant diversity. In: Benson EE (ed.). Plant conservation biotechnology. Taylor & Francis e-library. London. UK. pp: 11-19.
- Hasbún R. 2006. Monitorización (epi)-genética del desarrollo y producción de planta de castaño (*Castanea sativa* Mill.). Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. España.
- Hechenleitner P, MF Gardner, PI Thomas, C Echeverría, B Escobar, P Brownless, C Martínez. 2005. Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Primera Edición. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. Valdivia. Chile.
- Herrera R, M Arias, M Moya-León, P Peñailillo, M Wilkinson. 2005. Genetics variation in a chilean endangered endemic: *Gomortega keule* (Molina) Baillon. Biodiversity and Conservation 14: 2871-2881.
- Huang Y, CQ Zhang, DZ Li. 2009. Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalo gramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservations. Journal of Systematics and Evolution 47: 103-109.
- Hunter ML, JP Gibbs. 2007. Fundamentals of Conservation Biology. 3th Edition. Blackwell Publishing. New York. USA.
- Jayaram K, MNV Prasad. 2008. Genetic diversity in *Oroxylum indicum* (L.) Vent. (Bignoniaceae), a vulnerable medicinal plant by random amplified polymorphic DNA marker. African Journal of Biotechnology 7(3): 254-262.
- Jérez J. 1999. Propagación de *Araucaria araucana* Mol. mediante cultivo *in vitro* de embriones maduros aislados. Memoria de Título. Facultad de Cs. Forestales. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
- Jordan M. 1999. Morphogenic responses and *in vitro* regeneration of canelo (*Drimys winteri* J.R. et Forster), a forest species used in chilean traditional medicine. Acta Horticulturae 502: 289-294.

- Jordan M, J González, C Rovraro. 2005. *In vitro* regeneration of *Gomortega keule* (Gomortegaceae), a chilean endemic tree in danger of extinction. *European Journal of Horticultural Science* 70(4): 202-206.
- Kim SC, C Lee, A Santos-Guerra. 2005. Genetic analysis and conservation of the endangered Canary Island woody sow-thistle, *Sonchus gandogeri* (Asteraceae). *Journal of Plant Research* 118: 147-153.
- Koul-Moza M, AK Bhatnagar. 2007. Plant reproductive biology studies crucial for conservation. *Current Science* 92(9): 1207.
- Kucera B, MA Cohn, G Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307.
- Lander TA, DH Boshier, SA Harris. 2007. Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the endangered, endemic chilean tree *Gomortega keule* (Gomortegaceae). *Molecular Ecology Notes* 7: 1332-1334.
- Lander TA, DH Boshier, SA Harris. 2009. Flower and fruit production and insect pollination of the endangered chilean tree, *Gomortega keule* in native forest, exotic pine plantation and agricultural environments. *Revista Chilena de Historia Natural* 82(3): 403-412.
- Lander TA, DH Boshier, SA Harris. 2010. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered chilean tree. *Biological Conservation* 143(11): 2583-2590.
- Lattanzio V, VMT Lattanzio, A Cardinali. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* 2: 23-67.
- Le Quesne C, D Stark. 2006. Latifoliadas chilenas: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon. En: Donoso C (ed.). *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Autoecología. Marisa Cuneo Ediciones. Valdivia. Chile. pp. 277-284.
- Lynch PT. 2003. Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. In: Benson EE (ed.). *Plant conservation biotechnology*. Taylor & Francis e-library. London. UK. pp. 41- 55.

- Magnitskiy SV, GA Plaza. 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana* 25(1): 96-103.
- Maldonado C. 1990. Caracterización del hábitat de *Gomortega keule* (Mol) Baillon en su rango de distribución y algunos antecedentes de su reproducción sexuada. Memoria de Título. Fac. Cs. Agronómicas, Veterinarias y Forestales. Universidad de Concepción. Chile.
- Mardones L. 1999. Recuperación de genotipos de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.), mediante cultivo *in vitro* de embriones. Memoria de Título. Fac. Cs. Forestales. Universidad de Concepción. Chile.
- Margara J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Marticorena C, C Bohnlen, M Muñoz, MTK Arroyo. 1995. Dicotiledóneas. En: Simonetti JA, MTK Arroyo, A Spotorno, L Losada (eds.). *Diversidad biológica de Chile*. CONICYT. Santiago. Chile. pp. 77-89.
- Marticorena C, R Rodríguez. 2001. *Flora de Chile*. Vol. 2. Winteraceae-Ranunculacea. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
- Martínez-Pastur G, M Arena. 1997. Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. *Bosque* 18(2): 43-50.
- Muñoz C. 1973. *Chile plantas en extinción*. Ed. Universitaria. Santiago. Chile.
- Muñoz-Concha D, MR Davey. 2011. Micropropagation of the endangered chilean tree, *Gomortega keule*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47:170-175.
- Muñoz-Concha D, G Saud. 2011. Flowering and fruiting phenology of the endangered chilean tree *Gomortega keule*. *New Zealand Journal of Botany* 49(4): 497-502.
- Muñoz-Concha D, S Mayes, G Ribas, MR Davey. 2012. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and shoot-tips of the chilean tree *Gomortega keule*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 109(1): 123-130.

- Ni X, Y Huang, L Wu, R Zhou, S Deng, D Wu, B Wang, G Su, T Tang, S Shi. 2006. Genetic diversity of the endangered Chinese endemic herb *Primulina tabacum* (Gesneriaceae) revealed by amplified length polymorphism (AFLP). *Genetica* 127: 177-183.
- Orellana C. 1996. Efecto del ácido giberélico (GA₃) sobre la germinación de semillas de queule (*Gomortega keule* (Mol.) Baillon). Tesis Licenciado en Ciencias Forestales. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Forestal. Universidad de Talca. Chile.
- Osman A, B Jordan, PA Lessard, N Muhammad, MR Haron, NM Riffin, AJ Sinskey, C Rha, DE Housman. 2003. Genetic diversity of *Eurycoma longifolia* Inferred from Single Nucleotide Polymorphisms. *Plant Physiology* 131: 1294-1301.
- Palacios C, S Kresovich, F González-Candelas. 1999. A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 8: 645-657.
- Parker P, A Snow, M Schug, G Booton, P Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Peña KA. 1995. Enraizamiento en queule (*Gomortega keule* (Mol.) Baillon) y su relación con el contenido y tipo de fenoles. Tesis Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Departamento de Silvicultura. Universidad de Chile. Santiago. Chile.
- Pence VC. 2003. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. In: Benson EE (ed.). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis e-library. London. UK. pp. 227-241.
- Peralta J. 2001. Evaluación del efecto de la concentración auxínica y tiempo de inducción hormonal en la rizogénesis *in vitro* de la especie *Nothofagus alpina* ((Poepp. et Endl.) Oerst). Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Forestal. Fac. Cs. Agropecuarias y Forestales. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile.
- Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Primack RB. 2000. *A primer of conservation biology*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. USA.

- Rao NK. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3: 136-145.
- Reed BM, V Sarasan, M Kane, E Bunn, VC Pence. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47: 1-4.
- Rodríguez R, E Ruiz, JP Elissetche. 2005. Árboles en Chile. Editorial Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
- Rodríguez R, O Matthei, M Quezada. 1983. Flora arbórea de Chile. Editorial Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
- Sabja AM, O Ortiz, C Treviño. 2008. Avances de clonación *in vitro* de árboles adultos de raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) Oerst.) para propagación comercial. *Agrociencia* 42: 595-603.
- San Martín J, A Sánchez. 1999. Las comunidades relictas de *Gomortega keule* (Gomortegaceae, Magnoliopsida) en Chile Central. *Anales del Jardín Botánico Madrid* 57(2): 317-326.
- Sánchez-Olate M, D Ríos, M Pedraza, G Pereira, H Castellanos, R Escobar. 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* (Poepp. Et Endl) Oerst. a partir de embriones aislados. *Bosque* 25(1): 123-128.
- Sarasan V, R Cripps, MM Ramsay, C Atherton, M McMichen, G Prendergast, JK Rowntree. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 42: 206-214.
- Semagn K, Å Bjørnstad, MN Ndjioudjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25): 2540-2568.
- Smith-Ramírez C, J Armesto, C Valdovinos. 2005. Biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile. Editorial Universitaria. Santiago. 708 p.
- Srivastava L. 2002. Plant growth and development: hormones and environment. Academic Press. San Diego. USA.

- Tavares F, EO Ono, JD Rodrigues, JR Souza. 2003. Effects of some phenolic compounds on soybean seed germination and on seed-borne fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46(2): 155-161.
- Toribio M, C Celestino. 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 2: 249-260.
- Toro A, A Caballero. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360: 1367-1378.
- Torres E, JM Iriondo, C Pérez. 2003. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. *American Journal of Botany* 90(1): 85-92.
- Uribe ME, L Cifuentes. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque* 25(1): 129-135.
- Uribe ME, C Delaveau, M Garcés, R Escobar. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 29(1): 58-64.
- Uribe ME, M Sandoval, A Méndez, F Mora, C Delaveau. 2011. *In vitro* rooting of *Beilschmiedia berteriana*, endemic to the South Central area of Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 38(1): 107-115.
- Uribe ME, J Ulloa, C Delaveau, K Sáez, F Muñoz, P Cartes. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Botánica* 69(1): 52-59.
- Villagrán C. 1994. Quaternary history of the mediterranean vegetation of Chile. In: Kalin MT, P Zedler, M Fox (eds.). *Ecology and biogeography of mediterranean ecosystems in Chile, California and Australia*. Springer-Verlag. New York. USA. pp. 3-20.
- Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, T Van de Lee, M Hornesand, A Frijters, J Pot, J Peleman, M Kuiper, M Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414.

Walter KS, HJ Gillett. 1998. 1997 IUCN Red list of threatened plants. IUCN. The World Conservation Union. Morges. Switzerland.

Wang XR, A Szmidt. 2001. Molecular markers in population genetics of forest trees. Scandinavian Journal of Forest Research 16: 199-220.

Weising K, H Nybom, K Wolf, G Kahl. 2005. DNA fingerprinting in plants. Principles, methods and applications. 2nd Edition. Taylor & Francis Group. London. UK.

Xiao Meng, Li Q, L Guo, T Luo, W Duan, W He, L Wang, F Chen. 2006. AFLP analysis of genetic diversity of the endangered species *Sinopodophyllum hexandrum* in the Tibetan region of Sichuan Province, China. Biochemical Genetics 44: 47-60.



CAPÍTULO 1

Variabilidad genética mediante AFLP en tres relictos de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon, especie endémica chilena en peligro de extinción

Genetic diversity revealed by AFLP in three relicts of *Gomortega keule* (Mol.) Baillon, endemic and endangered chilean species

Catherine Delaveau^{1*}, Glenda Fuentes-Arce², Eduardo Ruiz², Rodrigo Hasbún¹, Matilde Uribe¹, Sofía Valenzuela^{1,3}

¹Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

³Genómica Forestal S.A., Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

*catherine.delaveau@gmail.com

RESUMEN

Gomortega keule es una especie arbórea endémica de Chile y única representante de la familia Gomortegaceae. Se encuentra catalogada en peligro de extinción y despierta gran interés científico por su restringida área de distribución. El objetivo de este trabajo fue estimar la variabilidad genética de 24 individuos de *G. keule* ubicados en tres relictos de la provincia de Concepción mediante marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) para futuros estudios de conservación. Se probaron 16 combinaciones de partidores y se eligieron las tres combinaciones más informativas para detectar diferencias entre individuos. Estas combinaciones generaron un total de 156 fragmentos, siendo un 62% de ellos polimórficos. El sitio con mayor porcentaje de polimorfismos correspondió a Cerro Neuque, con un 84,6%, seguido por Coroney y Hualqui con 59,6% y 42,3%, respectivamente. El análisis de varianza molecular detectó un 73% de variación dentro de las poblaciones y un 27% de variación entre ellas. El estudio muestra que la técnica de AFLP puede ser utilizada en *G. keule* de forma rápida y confiable para identificar poblaciones remanentes y apoyar su conservación tanto *ex situ* como *in situ*.

Palabras clave: Gomortegaceae, Laurales, marcadores moleculares, *loci* polimórficos.

ABSTRACT

Gomortega keule is an endemic woody species from Chile and the only member of the Gomortegaceae family. It is currently an endangered species and is of great scientific interest due to its small area of distribution. The aim of this research was to estimate genetic diversity of 24 individuals of *G. keule* selected from three isolated relict populations from the province of Concepción using AFLP (Amplified fragment length polymorphism) for future conservation issue. Sixteen combinations of primers for AFLP were tested and three combinations of them were selected as the most informative, revealing differences between individuals. These primer combinations generated 156 fragments, of which 62% were polymorphic. The relict population with the highest percentage of polymorphisms was located in Cerro Neuque with 84.6%, followed by Coroney and Hualqui with 59.6% and 42.3%, respectively. The analysis of molecular variance detected 73% variation within populations and 27% variation among populations. This study supported that AFLP can be used in *G. keule* as a fast and reliable test to identify remaining populations of the species. Thus, this technique can be used to support *ex situ* or *in situ* conservation of *G. keule*.

Keywords: Gomortegaceae, Laurales, molecular markers, polymorphic *loci*.

INTRODUCCIÓN

Gomortega keule (queule) es una especie arbórea en estado crítico de conservación (González 1998) que habita en áreas pequeñas y fragmentadas de la cordillera de la Costa entre Cauquenes 35°46' S y Arauco 37°41' S (Hechenleitner *et al.* 2005). Queule pertenece a la familia Gomortegaceae, la cual es endémica y monotípica (Rodríguez *et al.* 2005). Se reportan sólo 22 poblaciones insertas en plantaciones exóticas, lo que las mantiene en constante amenaza (San Martín y Sánchez 1999, Marticorena y Rodríguez 2001). Además de la restringida distribución, la regeneración de la especie se ve afectada por factores como depredación de semillas por roedores, colecta de frutos por los lugareños y apertura del

bosque, así como también por la baja capacidad germinativa de la semilla y el lento crecimiento durante los primeros años (Donoso y Escobar 1985, Le Quesne y Stark 2006).

Los antecedentes disponibles concluyen que la especie se estaría propagando, principalmente, por vía asexual, al observarse escasa o nula regeneración sexual en terreno (Villegas *et al.* 2003).

La utilización de marcadores moleculares es una herramienta útil en numerosos estudios de diversidad genética, aportando información para desarrollar planes de conservación en especies amenazadas. Algunas de las técnicas empleadas son: polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) (Torres *et al.* 2003), intermicrosatélites (ISSR) (Huang *et al.* 2009), microsatélites (SSR) (Azpilicueta *et al.* 2004) y AFLP (Wen-Kun *et al.* 2008). En específico, esta última técnica ha demostrado ser exitosa por su reproducibilidad, además de detectar un gran número de fragmentos polimórficos sin requerir conocimiento previo de la secuencia de ADN de la especie en estudio (Mueller y Wolfenbarger 1999, Meudt y Clarke 2007).

En *G. keule* la diversidad genética fue estimada en 33 individuos de poblaciones del rango norte de su distribución mediante ISSR (Herrera *et al.* 2005). Posteriormente García-González *et al.* (2008) ampliaron el estudio a su rango sur utilizando la misma técnica en 11 poblaciones. En tanto, Lander *et al.* (2007) aislaron y caracterizaron ocho microsatélites sin realizar estudios de variabilidad genética.

Considerando el estado de conservación de *G. keule* y la falta de información de su presencia en algunos sectores de su rango de distribución, el objetivo de este estudio fue estimar la variabilidad genética de *G. keule* mediante marcadores AFLP en tres relictos de la provincia de Concepción con el fin de contribuir a futuras propuestas de conservación *ex situ* de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En tres relictos de *G. keule* ubicados en la provincia de Concepción se colectaron hojas en pleno crecimiento. Se muestrearon 8 individuos en cada relicto, los cuales se encontraban a más de 3 m de distancia, fueron identificados con GPS (*Global Positioning System*) y denominados: 1) Cerro Neuque (36°34' S; 72°54' O), 2) Coroney (36°40' S; 72°51' O) y 3) Hualqui (36°53' S; 72°55' O) (**Figura 1.1**). El material fue almacenado a -80 °C hasta su análisis.

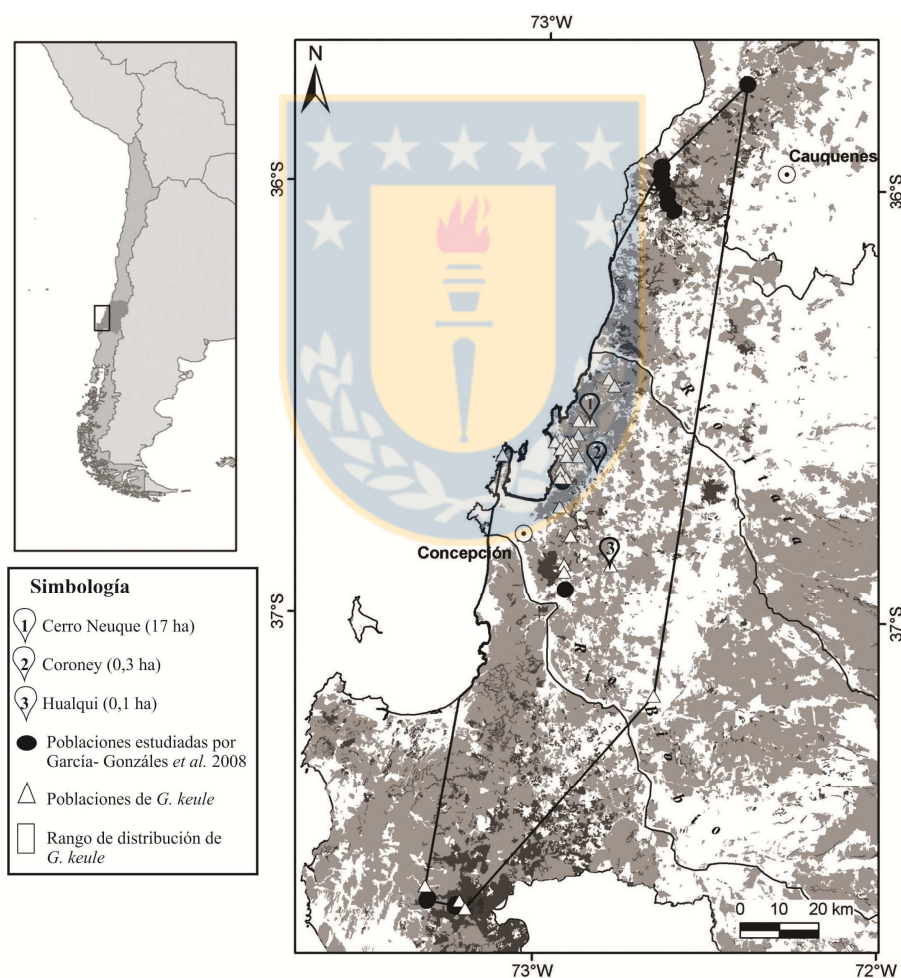


Figura 1.1. Localización de los relictos de *Gomortega keule* estudiados y rango de distribución de la especie. Mapa modificado de García-González *et al.* (2008).

Figure 1.1. Locating relict populations of *Gomortega keule* studied and distribution range of the species. Modified map from García-González *et al.* (2008).

Extracción ADN

Se aisló ADN utilizando el protocolo de extracción de ADN para plantas *DNeasy Plant Mini* (QIAGEN). Se utilizaron 100 mg de tejido vegetal el que fue homogenizado con un equipo de lisis mecánica, adicionándole microesferas de cerámica a una velocidad de 6 m s^{-1} durante 15 s.

El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260). Usando este método también se obtuvo una estimación de la pureza del ADN por medio de las relaciones de absorbancia (A260/A280) y (A260/A230).

Para evaluar la integridad del ADN extraído se mezclaron alícuotas de 5 μL con 1 μL de tampón de carga (6X DNA *loading dye*, Fermentas) y se analizó mediante electroforesis a 60 V durante 30 min en gel de agarosa al 1% (p/v). La visualización del ADN en los geles se realizó usando un transiluminador y digitalización mediante fotografía digital.

AFLPS

La técnica de AFLP se desarrolló según el protocolo publicado por Hasbún *et al.* (2012). Éste está basado en el método descrito por Vos *et al.* (1995), pero utilizando fluoróforos adheridos a los partidores de la amplificación selectiva, con el fin de ser separados por electroforesis capilar y reconocidos con un secuenciador automático.

La técnica consta de tres pasos: 1) Digestión- ligación: se realizó la digestión a $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN de *G. keule* con las enzimas EcoRI y MseI, posteriormente se ligó el producto de la digestión con adaptadores de doble cadena, específicos para cada enzima, 2) Amplificación preselectiva: con el producto del paso anterior se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando partidores del tipo EcoRI +AC y MseI +C, 3) Amplificación selectiva: se probaron 16 combinaciones de partidores selectivos del tipo EcoRI+3/MseI+3 o +4 marcados con fluoróforos.

Para realizar el análisis genético de todos los individuos se procedió primero a elegir las combinaciones más informativas. Esta selección se realizó según los siguientes criterios;

capacidad de amplificación, fragmentos polimórficos y nitidez de banda. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% (p/v) con 2 μ L de bromuro de etidio, posteriormente se realizó la electroforesis capilar con el secuenciador automático ABI PRISM 3130xl *Genetic Analyzer*.

Los datos fueron analizados utilizando el software *GeneMapper v4.0* con el cual se confeccionó una matriz binaria (0/1) representando la ausencia o presencia del fragmento.

Análisis de datos

A partir de la matriz binaria y utilizando el programa GenAlEx versión 6.1 (Peakall y Smouse 2006), se calcularon los siguientes índices de variabilidad genética: porcentaje de *loci* polimórficos (% P), heterocigosidad esperada (He) e índice de Shannon (S). La estructuración genética se estimó a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) y se realizó una prueba de Mantel para correlacionar valores de distancia genética y distancia geográfica.

RESULTADOS

De las 16 combinaciones de partidores AFLP evaluadas en *G. keule*, se seleccionaron tres combinaciones que permitieron visualizar bandas nítidas con más de 12 fragmentos polimórficos cada una (**Tabla 1.1**). Con ellas se obtuvo un total de 156 fragmentos de ADN y de los cuales el 62% fue polimórfico. Las combinaciones restantes no fueron consideradas por no amplificar fragmentos en la especie o generar un patrón de fragmentos poco reproducible y con escasos polimorfismos.

La combinación EcoRI+ACA/MseI+CAT presentó el mayor porcentaje de polimorfismo, arrojando 39 fragmentos polimórficos que corresponden al 68,42% del total de fragmentos detectados para esta combinación. A su vez, con EcoRI+ACA/MseI+CCG y EcoRI+ACC/MseI+CAT se detectaron un 58,8 y 41,6% de polimorfismo, respectivamente.

Tabla 1.1. Porcentaje de polimorfismo detectado en 24 individuos de *Gomortega keule* con tres combinaciones selectivas de marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados).

Table 1.1. Polymorphic percentage in 24 *Gomortega keule* individuals detected with three selective AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) primer sequences.

Combinación selectiva*	N° Fragmentos		% de polimorfismo
	Total	Polimórficos	
EcoRI+ACA/MseI+CAT	57	39	68,42
EcoRI+ACC/MseI+CAT	48	28	41,66
EcoRI+ACA/MseI+CCG	51	30	58,82
Total	156	97	-
Promedio	52	-	-

*A, C, G, T representan los nucleótidos adenina, citosina, guanina, timina.

*A, C, G, T symbolize nucleotides adenine, guanine, cytosine, thymine.

Para el análisis genético, con el total de fragmentos obtenidos con las tres combinaciones de partidores, los índices de diversidad genética detectados por AFLP en los relictos de *G. keule* indican que el mayor porcentaje de *loci* polimórficos se observó en individuos de Cerro Neuque, con un 84,6% de polimorfismo seguido por Coroney, con 59,6%, y Hualqui, con 42,3% de polimorfismo (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Índices de diversidad genética detectados en tres relictos de *Gomortega keule* utilizando marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados).

Table 1.2. Genetic diversity index detected with AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) marker in three *Gomortega keule* relict.

Relicto	Fragmentos polimórficos	P (%)	S	He
Coroney	31	59,62	0,30 (0,03)	0,20 (0,02)
Hualqui	22	42,31	0,19 (0,03)	0,12 (0,02)
Cerro Neuque	44	84,62	0,46 (0,03)	0,31 (0,02)
Promedio		62,18	0,32 (0,02)	0,21 (0,01)

P: porcentaje de polimorfismo; S: índice de Shannon; He: heterocigosidad esperada. Valores entre paréntesis indican error estándar

P: polymorphic percentage; S: Shannon index; He: expected heterozygosity. Values in parentheses represent standard error.

El mayor porcentaje de la variación detectado por el análisis de varianza molecular se registró dentro de las poblaciones, con un 73%, mientras que entre los tres relictos de *G. keule* se registró el 27% restante. El grado de estructuración genética entre las poblaciones de *G. keule* medido por el coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) fue 0,267, indicando que las poblaciones se encuentran altamente diferenciadas. Además, al realizar la prueba de Mantel no se obtuvo una correlación entre valores de distancia genética y distancia geográfica ($R^2 = 0,691$; $p = 0,160$).

Cabe indicar que sólo en Coroney se observó regeneración sexual; sin embargo, en visitas posteriores se pudo constatar la nula supervivencia de las plántulas.

DISCUSIÓN

Al comparar los resultados obtenidos en *G. keule* con otras Lauraceae y en categoría de amenaza, mediante marcadores dominantes, tales como RAPD en *Neolitsea sericeae* ($P = 50,5\%$, Wang *et al.* 2005) y AFLP en *Litsea szemaois* ($P = 80,79\%$ y ISSR, $P = 87,01\%$, Ci *et al.* 2008) se puede ordenar a *G. keule* en un rango intermedio. Por otro lado, si se consideran los valores de diversidad genética reportados por Hamrick y Godt (1989) para especies leñosas longevas ($P = 49,3\%$, $He = 0,148$), *G. keule* presenta mayores niveles de diversidad ($P = 62,18\%$, $He = 0,212$). No obstante, estos valores de diversidad genética se asemejan a los obtenidos para especies endémicas ($He = 0,2$) por medio de RAPD (Nybom 2004).

Lander *et al.* (2009, 2010) determinaron que la polinización de la especie es entomófila y el polen de *G. keule* se mueve hasta 6 km desde pequeños parches o árboles aislados hasta sitios de mayor tamaño y viceversa, siendo los primeros fundamentales en la conectividad del flujo génico. Esto se ve reflejado en los valores obtenidos en la prueba de Mantel ($R^2 = 0,691$; $p = 0,160$), los cuales concuerdan a los reportados por García-González *et al.* (2008) ($r = -0,000$; $p = 0,72$) que señalan que las poblaciones no presentan aislamiento por distancia.

Adicionalmente, al comparar el índice de Shannon promedio para *G. keule* ($S = 0,322$) con una especie endémica longeva, tal como *Araucaria araucana* ($S = 0,65$, Bekessy *et al.* 2002), se observa que la variabilidad genética de *G. keule* es menor. Esto puede deberse a la dispersión entomófila del polen de *G. keule*, ya que especies cuyo polen es dispersado anemófilamente, como es el caso de *A. araucana*, presentan mayor diversidad genética (Hamrick y Godt 1996).

Estudios realizados por Herrera *et al.* (2005) en 33 individuos de *G. keule* y utilizando ISSR reportaron valores de variación entre y dentro de la población (30% y 70%, respectivamente). García-González *et al.* (2008) por su parte, a través del mismo marcador molecular y en 223 individuos de *G. keule* obtuvieron valores idénticos a los de este estudio (27%, 73%), los cuales son los esperados para especies perennes leñosas y de polinización cruzada (Hamrick *et al.* 1992).

El nivel de diferenciación genética ($F_{st} = 0,267$) determinado para *G. keule* en este estudio fue similar al informado por García-González *et al.* (2008) ($F_{st} = 0,275$) siendo ambos valores mayores al descrito para especies longevas, perennes y de polinización cruzada ($F_{st} = 0,094$) (Hamrick y Godt 1996). La limitada dispersión de la semilla puede ser la responsable de este resultado, ya que las semillas suelen encontrarse intactas bajo el dosel y a pocos metros del árbol. Según Villegas *et al.* (2003) y García-González *et al.* (2008), al encontrarse los relictos de *G. keule* rodeados por plantaciones exóticas se favorece la pérdida de agentes dispersores (del polen y la semilla).

Los tres relictos estudiados, al igual que otras poblaciones de *G. keule*, se encuentran aislados e insertos en plantaciones de pino, reproduciéndose sólo vegetativamente. Durante el período de colecta de material se observó reiterada intervención antrópica como el control de malezas con el fin de evitar incendios forestales. Esto genera daño al eliminar plántulas y evitar la regeneración natural de la especie. A pesar de las condiciones en las cuales se encuentra *G. keule* en los sitios de estudio, se obtuvo una mayor variabilidad genética en los relictos de mayor superficie (**Figura 1.1**). Según Hamrick y Godt (1996) los factores que más influyen sobre la variabilidad genética entre las poblaciones son el

número de individuos y la superficie. Esto se corrobora en este trabajo dado que se utilizó la misma técnica e igual número de individuos para todos los relictos y sólo la superficie fue distinta.

En este estudio se reafirma que los AFLP son una poderosa herramienta para estudios de genética de poblaciones, ya que con sólo 3 combinaciones selectivas de AFLP se estimó la variabilidad de *G. keule* en los relictos analizados. Resultados similares se lograron en otras especies amenazadas utilizando tres o cuatro combinaciones de AFLP (Palacios *et al.* 1999, Ni *et al.* 2006, Ci *et al.* 2008). A su vez, empleando ISSR en *G. keule* se obtuvo una estructuración genética similar a la obtenida en este estudio (Herrera *et al.* 2005, García-González *et al.* 2008).

Adicionalmente, la variabilidad genética presentada en los relictos contribuye a ampliar los antecedentes en la especie, ya que reportes anteriores y de zonas cercanas al área de estudio presentan menores niveles de variabilidad. Por ejemplo, Penco (P= 67,95%, S= 0,3708, García-González *et al.* 2008) en comparación con Cerro Neuque (P= 84,62%, S= 0,46).

Por lo tanto, es posible estimar la variabilidad genética en las poblaciones naturales remanentes de *G. keule* y detectar a futuro variantes genéticos únicos y/o centros de variabilidad genética con el fin de contribuir en estudios enfocados a la conservación *ex situ* de esta especie amenazada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto DIUC N° 209.142.028-1.0 de la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción por el financiamiento y a Genómica Forestal S.A. por la cooperación en este estudio. Catherine Delaveau agradece a CONICYT por su beca doctoral.

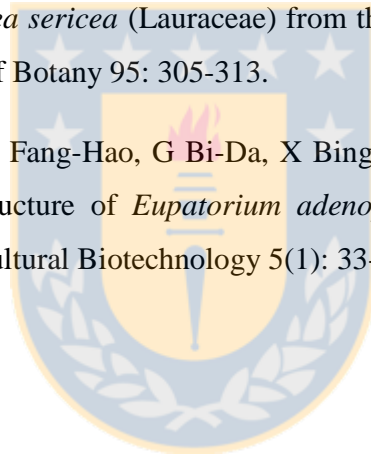
LITERATURA CITADA

- Azpilicueta M, H Caron, C Bodénes, L Gallo. 2004. SSR markers for analysing South American *Nothofagus* species. *Silvae Genetica* 53(5-6): 240-243.
- Bekessy S, T Allnutt, A Premoli, A Lara, R Ennos, M Burgman, M Cortes, A Newton. 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity* 88: 243-249.
- Ci X, JQ Chen, QM Li, J Li. 2008. AFLP and ISSR analysis reveals high genetic variation and inter-population differentiation in fragmented populations of the endangered *Litsea szemaois* (Lauraceae) from Southwest China. *Plant Systematic and Evolution* 273: 237-246.
- Donoso C, B Escobar. 1985. Germinación de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon. *Bosque* 6(2): 120-122.
- Excoffier L, P Smouse, J Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- García-González R, B Carrasco, P Peñailillo, L Letelier, R Herrera, B Lavandero, M Moya, P Caligari. 2008. Genetic variability and structure of *Gomortega keule* (Molina) Baillon (Gomortegaceae) relict populations: geographical and genetic fragmentation and its implications for conservation. *Botany* 86: 1299-1310.
- González M. 1998. *Gomortega keule*. IUCN Red list of threatened species. Version 2012.2. URL: <http://www.iucnredlist.org/details/31357/0> Viewed: march 03, 2013.
- Hamrick J, M Godt 1989. Allozyme diversity in plant species. In Brown AHD, MT Cregg, AL Kahler, BS Weir (eds.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. pp. 43-63. Sinauer, Sunderland, MA. USA.
- Hamrick J, M Godt, S Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.

- Hamrick L, M Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- Hasbún R, C Iturra, P Moraga, P Wachtendorff, P Quiroga, S Valenzuela. 2012. An efficient and reproducible for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection. *Tree Genetics and Genome* 8(4): 925-931.
- Hechenleitner P, M Gardner, P Thomas, C Echeverría, B Escobar, P Brownless, C Martínez. 2005. *Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Primera Edición. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. Valdivia, Chile.*
- Herrera R, M Arias, M Moya-León, P Peñailillo, M Wilkinson. 2005. Genetics variation in a chilean endangered endemic: *Gomortega keule* (Molina) Baillon. *Biodiversity and Conservation* 14: 2871-2881.
- Huang Y, C Zhang, D Li. 2009. Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation. *Journal of Systematics and Evolution* 47(2): 103-109.
- Lander T, D Boshier, S Harris. 2007. Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite *loci* for the endangered, endemic chilean tree *Gomortega keule* (Gomortegaceae). *Molecular Ecology Notes* 7: 1332-1334.
- Lander T, D Boshier, S Harris. 2009. Flower and fruit production and insect pollination of the endangered chilean tree, *Gomortega keule* in native forest, exotic pine plantation and agricultural environments. *Revista Chilena de Historia Natural* 82(3): 403-412.
- Lander T, D Boshier, S Harris. 2010. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered chilean tree. *Biological Conservation* 143(11): 2583-2590.

- Le Quesne C, D Stark. 2006. Latifoliadas chilenas: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon. En Donoso C. (ed.). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. pp. 277-284. Marisa Cuneo Ediciones. Valdivia, Chile.
- Marticorena C, R Rodríguez. 2001. Flora de Chile. Vol. 2. Winteraceae-Ranunculacea. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Meudt H, A Clarke. 2007. Almost forgotten or latest practice AFLP applications, analyses and advances. *Plant Science* 12(3): 106-117.
- Mueller U, L Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 389-394.
- Ni X, Y Huang, L Wu, R Zhou, S Deng, D Wu, B Wang, G Su, T Tang, S Shi. 2006. Genetic diversity of the endangered Chinese endemic herb *Primulina tabacum* (Gesneriaceae) revealed by amplified length polymorphism (AFLP). *Genetica* 127: 177-183.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Palacios C, S Kresovich, F González- Candelas. 1999. A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 8: 645-657.
- Peakall R, P Smouse. 2006. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Rodríguez R, E Ruiz, J Elissetche. 2005. Árboles en Chile. Ed. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- San Martín J, A Sánchez. 1999. Las comunidades relictas de *Gomortega keule* (Gomortegaceae, Magnoliopsida) en Chile Central. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 57(2): 317-326.

- Torres E, J Iriondo, C Pérez. 2003. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. *American Journal of Botany* 90(1): 85-92.
- Villegas P, C Le Quesne, C Lusk. 2003. Estructura y dinámica de una población de *Gomortega keule* (Mol) Baillon en un rodal antiguo de bosque valdiviano, Cordillera de Nahuelbuta, Chile. *Gayana Botánica* 60(2): 107-113.
- Vos P, R Hogers, M Bleeker, M ReijanS, T Van De Lee, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Peleman, M Kuiper, M Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414.
- Wang ZS, SQ An, H Liu, X Leng, JW Zheng, YH Liu. 2005. Genetic structure of the endangered plant *Neolitsea sericea* (Lauraceae) from the Zhoushan Archipelago using RAPD markers. *Annals of Botany* 95: 305-313.
- Wen-Kun H, G Jian-Ying, W Fang-Hao, G Bi-Da, X Bing-Yan. 2008. AFLP analyses on genetic diversity and structure of *Eupatorium adenophorum* populations in China. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 5(1): 33-41.



CAPÍTULO 2

Respuesta morfológica de material adulto y embrionario de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon en condiciones de cultivo *in vitro*

Catherine Delaveau¹; Kelly Paredes¹; Katia Sáez²; Sofía Valenzuela¹; Matilde Uribe¹

¹Universidad de Concepción. Facultad Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, casilla 160-C, Concepción, Chile, teléfono (56) 41-2207241, fax: (56) 41-2207310. catherine.delaveau@gmail.com.

²Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Avda. Esteban Iturra s/n - Barrio Universitario, Concepción, Chile.

RESUMEN

Queule (*Gomortega keule*) es una especie arbórea endémica de Chile y en peligro de extinción. La especie se encuentra en pequeñas y fragmentadas superficies de la Cordillera de la Costa entre Cauquenes (35°46'S) y Arauco (37°41'S). Su escasa regeneración y lenta respuesta a los tratamientos de propagación conlleva a la búsqueda de alternativas para su conservación. Por esta razón, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la respuesta morfológica de material adulto y embrionario de *G. keule* en condiciones *in vitro* para su conservación *ex situ*. Se cultivó material vegetal de *G. keule* de edades diferentes (embrionario, juvenil y adulto) y se determinaron las condiciones de establecimiento *in vitro* para la inducción de organogénesis y callogénesis. El mayor porcentaje de establecimiento en material adulto se logró utilizando una asepsia con etanol al 30% (v/v) por 2 min y 50% de hipoclorito de sodio por 20 min. La solución mineral Murashige y Skoog (MS) resultó ser significativamente mejor sólo para la brotación (30%) de un genotipo. La inducción callogénica de material adulto y embrionario se logró en medio Woody Plant Medium (WPM) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1 mL L⁻¹) y Kinetina (Kin, 1 mL L⁻¹) y sólo en tejido embrionario se observó estructuras proembriónicas.

Palabras clave: Conservación *ex situ*, peligro de extinción, organogénesis, callogénesis.

INTRODUCCIÓN

Gomortega keule (Mol.) Baillon (queule) es una especie arbórea, pertenece a la familia monogenérica y monotípica, Gomortogaceae, la cual es endémica de la zona centro-sur de Chile (Rodríguez *et al.* 2005a). Se encuentra en estado crítico de conservación (González 1998) y habita áreas pequeñas y fragmentadas de la cordillera de la Costa entre Cauquenes 35°46' S y Arauco 37°41' S (Hechenleitner *et al.* 2005). Se reportan sólo 22 poblaciones (San Martín y Sánchez 1999), las que se encuentran insertas en una matriz de vegetación exótica, lo que las mantiene en constante amenaza de ser taladas (Marticorena y Rodríguez 2001), a pesar de haber sido declarada Monumento Natural en el año 1995 (CONAF 2005). En tal sentido, *G. keule*, es una de las especies prioritarias para promover su conservación, debido principalmente a su condición de monotípica y endémica (Rodríguez *et al.* 2005a, Allendorf y Luikart 2007).

La conservación *ex situ* a través del uso de cultivo de tejidos o células *in vitro* es una alternativa para especies amenazadas, ya que preserva la biodiversidad fuera de sus hábitats naturales (Bunn *et al.* 2011, Reed *et al.* 2011). Existen especies de plantas que no pueden conservarse como semillas puesto que presentan diferentes problemáticas (recalcitrantes, perennes de largos ciclos, amenazadas de extinción, entre otras) (Fay y Clemente 1997, Sarasan *et al.* 2006). En ellas, la propagación y conservación *in vitro* es el único método disponible (Reed *et al.* 2011). A su vez, estas técnicas se perfeccionan cada día más, por lo cual actualmente su utilización a gran escala es posible en una amplia gama de especies (Bioversity International 2011).

Sin duda, el cultivo *in vitro* ofrece una serie de ventajas para la conservación de especies amenazadas, tales como, el reducido espacio para almacenar un gran número de genotipos, material vegetal libre de patógenos en el tiempo, multiplicación de genotipos selectos y disponibles en el momento deseado (banco de germoplasma), entre otras (Bunn *et al.* 2011). Sin embargo, el cultivo *in vitro* de material vegetal se encuentra influenciado por diversos factores que pueden determinar el éxito del cultivo. Estos factores son el efecto del genotipo, edad y estado fisiológico del explanto, contaminación exógena, soluciones minerales, reguladores del crecimiento (tipo y

concentración), entre otros (Gómez 1998). Entre estos factores mencionados, el efecto del genotipo tiene gran importancia para lograr una propagación estable y adecuada tasa de proliferación, ya que esto puede variar según la especie, variedad e incluso clon dentro de la misma especie, es decir, algunos genotipos de la misma especie exhiben una alta capacidad de regeneración, mientras que otros son recalcitrantes o no muestran la capacidad de regenerar órganos (Orellana 1998, Nontaswatsri *et al.* 2002, Landi y Mezzetti 2006).

La edad del material vegetal es otro factor importante. Los tejidos de individuos juveniles poseen cierta facilidad de ser propagados, a diferencia de individuos adultos, sin embargo, aún no se expresan sus características fenotípicas (Rodríguez *et al.* 2005b). Por lo tanto, la capacidad morfogénica o facilidad de los individuos para propiciar la desdiferenciación de sus tejidos va a depender del grado de madurez o fase de desarrollo en la que se encuentren (Greenwood 1995, Fraga *et al.* 2002).

El cultivo de callos es muy utilizado para expresar rutas morfogénicas orientadas tanto a la organogénesis como embriogénesis somática (Manjkhola *et al.* 2005). En ambos casos, la iniciación callogénica implica una etapa inicial de la diferenciación del tejido parental, por lo cual, éste es un factor fundamental para lograr la respuesta deseada (Payghamzade y Kazemitabar 2011). Embriones cigóticos, hipocótilos, cotiledones, hojas, pecíolo y raíces, entre otros, han sido utilizados con diferentes repuestas en la inducción de callogénesis (Castellanos *et al.* 2005, Sauer y Wilhelm 2005, Gómez *et al.* 2006, Al-Sabah *et al.* 2012).

En este contexto, *G. keule* presenta una escasa respuesta a los métodos convencionales de propagación. Según Maldonado (1990), la baja capacidad germinativa sería debido a la dureza de su endocarpio. Estudios de propagación sexual realizados en la especie, reportan germinación a partir del quinto mes de iniciados los ensayos, con tasas de 4% realizando remoción del endocarpio (Maldonado 1990) y de 24% utilizando semillas escarificadas naturalmente por más de una temporada en el suelo (Donoso y Escobar 1985).

En condiciones de cultivo *in vitro*, Calderón-Baltierra *et al.* (1993) reportan iniciación de brotes adventicios a partir de la base cotiledonar de embriones cigóticos de *G. keule*. Jordan *et al.* (2005) logró regenerar la especie utilizando segmentos nodales. No obstante, en ninguno de los dos estudios se logró la obtención de plántulas en condiciones *ex vitro*. Trabajos recientes de Muñoz-Concha y Davey (2011) y Muñoz-Concha *et al.* (2012) consiguieron regenerar brotes de *G. keule* a partir de embriones cigóticos vía organogénesis y la inducción de embriogénesis somática en medios de cultivos líquidos.

Por otro lado, durante el desarrollo del cultivo *in vitro*, las oxidaciones fenólicas pueden constituir un serio problema en el establecimiento de meristemas o yemas, más aún, en especies leñosas (Benson 2000). Cuando los tejidos son dañados se produce un pardeamiento en la base del explanto y que puede extenderse a todo el medio de cultivo, debido a que los compuestos fenólicos se liberan desde las vacuolas y sirven de sustrato para las polifenoloxidasas, sintetizándose taninos de color negro-marrón. Como consecuencia, se detiene el crecimiento del explanto e incluso puede morir (Jiménez 1998). Estudios realizados en *G. keule* por Muñoz-Concha y Davey (2011) reportan la necesidad de utilizar antioxidantes en el medio de cultivo para reducir los efectos negativos de los compuestos fenólicos en los tejidos.

Los reguladores del crecimiento como auxinas, giberelinas (GAs), citoquininas, entre otros, juegan un papel fundamental en el proceso de revigorización, formación y desarrollo de las plantas (Su *et al.* 2011). Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para el desarrollo de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas (Jiménez 1998). Las citoquininas juegan un rol esencial en la regulación de la citocinesis, el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Azcón-Bieto y Talón 2000, Howell *et al.* 2003). El ácido abscísico (ABA) y las GAs, según Greenwood (1995), regulan el proceso de maduración de semillas y sugieren que las proporciones de auxinas y citoquininas tienen un papel primordial en el cambio de fase.

La aplicación de reguladores de crecimiento ha sido estudiada en *G. keule* por Orellana (1996), quién aplicó a semillas provenientes del suelo 10 g L^{-1} de ácido giberélico (GA_3) obteniendo un 17% de germinación. Según Hechenleitner *et al.* (2005), utilizando una solución de 100 mg L^{-1} de GA_3 , la germinación comenzaría al mes y las plántulas alcanzarían de 8 a 10 cm luego de un año de crecimiento. Respecto a la propagación vegetativa, Peña (1995) informó bajas tasas de enraizamiento de estacas (2%) a pesar de utilizar ácido indol butírico (AIB) como inductor.

En relación a lo planteado, *G. keule* es una especie única que requiere alternativas de propagación para su conservación. Por lo tanto, el cultivo *in vitro* permite buscar una respuesta morfológica necesaria para avanzar en la recuperación de esta especie con problemas de conservación. Es por ello, que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta morfológica de material adulto y embrionario de *G. keule* en condiciones *in vitro* para su conservación *ex situ*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción morfológica de segmentos nodales a partir de material adulto

Asepsia. Se colectaron brotes epicórmicos de individuos de *G. keule* ubicados en el relicto Coroney ($36^{\circ}40' \text{ S}$; $72^{\circ}51' \text{ O}$), Provincia de Concepción. Se eliminaron las hojas de los brotes y se les realizó una asepsia superficial con los fungicidas Captan[®] y Benomilo (Polyben 50WP, 2 g L^{-1}) durante 90 min. Luego se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril (5, 15 y 20 min) en cámara de flujo laminar. Posteriormente, se cortaron segmentos de 3 cm de longitud cada uno con, al menos, 2 yemas. A continuación, se realizaron los tratamientos de asepsia de los segmentos nodales (**Tabla 2.1**). Una vez desinfectados fueron dispuestos en tubos de ensayo conteniendo 20 mL de solución mineral Woody Plant Medium (WPM, Lloyd y McCown 1981), suplementado con 30 g L^{-1} sacarosa, 1% (p/v) polivinilpirrolidona (PVP, Calbiochem[®]) y solidificado con $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de agar (Merck[®]), adicionando los reguladores del crecimiento bencilaminopurina (BAP) ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) y AIB ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$). El medio fue ajustado a pH 5,8 y esterilizado en autoclave durante 20 min a 1 atmósfera de presión y $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura. Los explantos fueron cultivados en cámara de

crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura a 25 ± 1 °C, fotoperiodo de 16/8 h y densidad de flujo fotónico de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 2.1. Concentración y tiempo de exposición a los antisépticos en segmentos nodales de *Gomortega keule*.

Tratamiento	Etanol		Hipoclorito de sodio	
	% (v/v)	Minutos	% (v/v)	Minutos
T1	30	1	50	20
T2	50	1	50	20
T3	70	1	50	20
T4	30	2	50	20
T5	50	2	50	20
T6	70	2	50	20

Elección solución mineral. Se utilizaron varetas de 20-30 cm de 5 individuos de *G. keule* del relicto Coroney ($36^{\circ}40' \text{ S}$; $72^{\circ}51' \text{ O}$), Provincia de Concepción. Se eliminaron las hojas de las varetas y se realizó una asepsia superficial con los fungicidas Captan® y Benomilo (2 g L^{-1}) durante 90 min. Luego se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril (5, 15 y 20 min) en cámara de flujo laminar. Posteriormente, se colocaron en un recipiente de vidrio conteniendo 150 mL de agua destilada estéril y cubiertas con una bolsa de polietileno, ajustándola con una banda elástica en la base. Para evitar condensación, se realizaron pequeñas perforaciones en la parte superior de la bolsa. La estimulación se llevó a cabo en cámara climatizada con fotoperiodo de 16/8 h, temperatura de 25 ± 1 °C y densidad de flujo fotónico de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Transcurridos 40 días, se extrajeron los brotes que presentaban 3 yemas. A los brotes se les efectuó una asepsia en cámara de flujo laminar con 30% (v/v) de etanol por 2 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min) y 50% (v/v) de hipoclorito de sodio por 20 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min). Luego se introdujeron en tubos de ensayo con solución mineral estéril Murashige y Skoog (MS, 1962) o WPM, ambos suplementados con 30 g L^{-1} sacarosa, 1% (p/v) PVP y solidificado con $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de agar agar, adicionando los reguladores del crecimiento BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) y AIB ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) y regulado a pH 5,8. Los brotes fueron cultivados en cámara de crecimiento bajo

condiciones controladas de temperatura a 25 ± 1 °C, fotoperiodo de 16/8 h y densidad de flujo fotónico de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Distintas procedencias. Se utilizaron varetas de 20–30 cm de 24 individuos de *G. keule* de los relictos Cerro Neuque, Coroney y Hualqui, Provincia de Concepción. Se eliminaron las hojas de las varetas y se realizó una asepsia superficial con los fungicidas Captan® y Benomilo (2 g L^{-1}) durante 90 min. Luego se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril (5, 15 y 20 min) en cámara de flujo laminar. Posteriormente, se estimularon las varetas siguiendo el mismo procedimiento que el punto anterior y se mantuvieron en cámara climatizada con fotoperiodo de 16/8 h, temperatura de 25 ± 1 °C y densidad de flujo fotónico de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Transcurridos 30 días, se extrajeron los brotes producidos y se les realizó una asepsia en cámara de flujo laminar consistente en 30% (v/v) de etanol por 2 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min) y 50% (v/v) de hipoclorito de sodio por 20 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min). A continuación, se dispusieron en solución mineral WPM estéril, suplementada con 30 g L^{-1} sacarosa, 1% (p/v) PVP, 1 mL L^{-1} PPM™ (*Plant Preservative Mixture*) y solidificado con $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de agar agar, adicionando los reguladores del crecimiento BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) y AIB ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) y ajustado a pH 5,8. Los explantos fueron cultivados en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura a 25 ± 1 °C, fotoperiodo de 16/8 h y densidad de flujo fotónico de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Proliferación. Se utilizaron segmentos nodales de *G. keule* provenientes de vivero (material juvenil) y brotes de varetas del relicto Coroney estimuladas en cámara climatizada (material adulto). Al material vegetal se le realizó una asepsia en cámara de flujo laminar consistente en 30% (v/v) de etanol por 2 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min) y 50% (v/v) de hipoclorito de sodio por 20 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min). Luego, los segmentos nodales se dispusieron en solución mineral WPM estéril, suplementada con 30 g L^{-1} sacarosa, 1% (p/v) PVP, 1 mL L^{-1} PPM™ y solidificado con $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de agar agar, adicionando los reguladores del crecimiento (**Tabla 2.2**) y ajustado el pH a 5,8. Los segmentos

fueron cultivados en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura a 25 ± 1 °C, fotoperiodo de 16/8 h y densidad de flujo fotónico de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 2.2. Tratamientos de proliferación para material adulto y juvenil de *Gomortega keule*.

Material	Tratamiento	BAP (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)
Adulto	T1	0,1	0,01	-
	T2	0,5	0,01	-
Juvenil	T3	0,1	-	0,01
	T4	0,05	-	0,01

BAP: bencilaminopurina, AIB: ácido indolbutírico, ANA: ácido naftalenacético

Inducción morfogénica de material embrionario y adulto

Inducción callogénica según solución mineral

Para la determinación del medio de cultivo se utilizaron semillas de *G. keule* provenientes de frutos maduros colectados en el relicto Coroney durante la temporada 2009. Con ayuda de una prensa se retiró el endocarpio de las semillas. Posteriormente, se realizó una asepsia superficial que consistió en etanol al 30% (v/v) por 1 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min) e hipoclorito de sodio al 50% (v/v) por 20 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min). A continuación, con ayuda de pinzas, bisturí y lupa estereoscópica se realizó la extracción de los embriones. Posteriormente los embriones (eje embrionario y cotiledones) fueron dispuestos en placas Petri que contenían distintas soluciones minerales estériles Broadleaved Tree Medium (BTM, Chalupa 1983), Driver y Kuniyuki Medium (DKW, Driver y Kuniyuki 1984), WPM y MS. Las soluciones se suplementaron con 30 g L^{-1} sacarosa, 0,5% (p/v) PVP, 1 mL L^{-1} PPM™ y reguladores del crecimiento, 1 mL L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) y 1 mL L^{-1} de kinetina (Kin), ajustado a pH 5,8 y solidificado con $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de agar agar. Las placas fueron cultivadas en cámara oscura a una temperatura a 25 ± 1 °C.

Inducción callogénica según dosis hormonal y tipo de explanto

Para determinar la dosis hormonal se colectaron frutos maduros y brotes epicórmicos de *G. keule* en el relicto Coroney durante temporada 2010. Las semillas fueron extraídas de los endocarpios con ayuda de una prensa y las varetas estimuladas en cámara climatizada. A las semillas se les efectuó una asepsia, bajo cámara de flujo laminar, que consistió en etanol al 70% (v/v) por 1 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min) e hipoclorito de sodio al 50% (v/v) por 20 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min). A las hojas producidas, se les efectuó asepsia, bajo cámara de flujo laminar, con etanol al 30% (v/v) por 2 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min) e hipoclorito de sodio al 50% (v/v) por 20 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril (3, 4 y 5 min). Los embriones fueron extraídos con ayuda de pinzas, bisturí y lupa estereoscópica y las hojas seccionadas en cuadrados de 0,5 x 0,5 cm, aproximadamente. Los explantos fueron dispuestos en placas Petri con solución mineral MS estéril, suplementado con 30 g L⁻¹ sacarosa, 0,5% (p/v) PVP, 1 mL L⁻¹ PPM™, reguladores del crecimiento según el tratamiento (**Tabla 2.3**), solidificado con 7,0 g L⁻¹ de agar agar y regulado a pH 5,8. Los explantos fueron cultivados en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura a 25 ±1 °C y oscuridad constante.

Tabla 2.3. Dosis hormonales utilizados en la inducción callogénica de material embrionario y adulto de *Gomortega keule*.

Tratamiento	2,4 D (mg L⁻¹)	Kin (mg L⁻¹)
T0	0	1
T1	1	1
T2	5	1
T3	10	1

2,4 D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, Kin: kinetina.

Histología

Para corroborar las respuestas obtenidas en la inducción callogénica de material embrionario se realizó un análisis histológico. Las muestras fueron fijadas en FAA 70% (formol, ácido acético,

alcohol) durante 48 h y posteriormente en etanol al 70% (v/v). A continuación, las muestras fueron embebidas en parafina después de la deshidratación. Se cortaron secciones longitudinales de 10 μm de espesor y se tiñeron con Safranina y Fast Green (Johansen 1940).

Diseño Experimental

Inducción morfogénica de segmentos nodales a partir de material adulto

Asepsia. Diseño completamente al azar con una unidad muestral de 4 tubos con un explanto cada uno y cuatro repeticiones. La evaluación se realizó 20 días después de iniciado el ensayo y las variables calculadas fueron oxidación (%), contaminación (%) y supervivencia (%).

Elección Solución mineral. Diseño completamente aleatorio. Se utilizaron dos medios de cultivo y 5 árboles, cada tratamiento tuvo 27 repeticiones. Se evaluó a los 20 días, y se determinó la supervivencia (%).

Distintas procedencias. Diseño completo al azar. Se evaluó tres procedencias, Cerro Neuque, Coroney y Hualqui, con 134, 113 y 66 explantos, respectivamente. A los 20 días se registró la supervivencia (%).

Proliferación. Diseño completo al azar. La unidad muestral correspondió a 4 tubos con un microtallo cada uno. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. La evaluación fue a los 30 días y se cuantificó el número de nuevos brotes por microtallo. Se consideraron los brotes mayores a 1 cm.

Inducción morfogénica de material embrionario y adulto

Inducción callogénica. Diseño completamente al azar. La unidad muestral correspondió a una placa con 6 explantos cada una y tres repeticiones. Se evaluó el porcentaje (%) de callogenésis y aspectos macromorfológicos.

Para la comparación de medias entre los tratamientos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA). En caso de ser significativo este análisis se aplicó el test de comparaciones múltiples de Tukey. Se utilizó el test Chi-cuadrado para determinar la relación entre variables categóricas. En todos los test se utilizó un nivel de significancia del 0,05 y cada vez que el valor p asociado a un test fue menor que 0,05 se consideró significativo. Se utilizó el software estadístico SAS versión 9.2.



Inducción morfogénica de segmentos nodales a partir de material adulto

Asepsias. A los 20 días de introducidos los segmentos nodales de *G. keule* no hubo diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia. No obstante, los tratamientos de asepsia probados arrojaron diferencias significativas en el porcentaje de oxidación y contaminación con respecto a T1 (30% etanol por 1 min y 50% hipoclorito de sodio por 20 min) ($p \leq 0,05$) (**Tabla 2.4**). El menor porcentaje de oxidación se obtuvo al utilizar la menor concentración de etanol (T1 y T4). En cambio, se presentó un menor porcentaje de contaminación cuando la concentración de etanol aumentó (T5 y T6).

Si bien no existieron diferencias significativas en la variable supervivencia de los segmentos nodales de *G. keule* sometidos a diferentes tratamientos, usando la asepsia T4 se logró un mayor porcentaje de explantos establecidos (**Figura 2.1**).

Tabla 2.4. Porcentaje de oxidación, contaminación y supervivencia de segmentos nodales de *Gomortega keule* después de 20 días de cultivo.

Tratamiento	Oxidación (%)	Contaminación (%)	Supervivencia (%)
T1	8	83	17
T2	38*	88 n.s.	4 n.s.
T3	25 n.s.	88 n.s.	13 n.s.
T4	21 n.s.	71 n.s.	29 n.s.
T5	58*	46*	13 n.s.
T6	83*	33*	4 n.s.

*: Significativo en comparación a T1 ($p \leq 0,05$). n.s.: no significativo en relación a T1.

T1: 30% etanol por 1 min y 50% hipoclorito de sodio por 20 min, **T2:** 50% etanol por 1 min y 50% hipoclorito de sodio por 20 min, **T3:** 70% etanol por 1 min y 50% hipoclorito de sodio por 20 min, **T4:** 30% etanol por 2 min y 50% hipoclorito de sodio por 20 min, **T5:** 50% etanol por 1 min y 50% hipoclorito de sodio por 20 min, **T6:** 70% etanol por 2 min y 50% hipoclorito de sodio por 20 min.

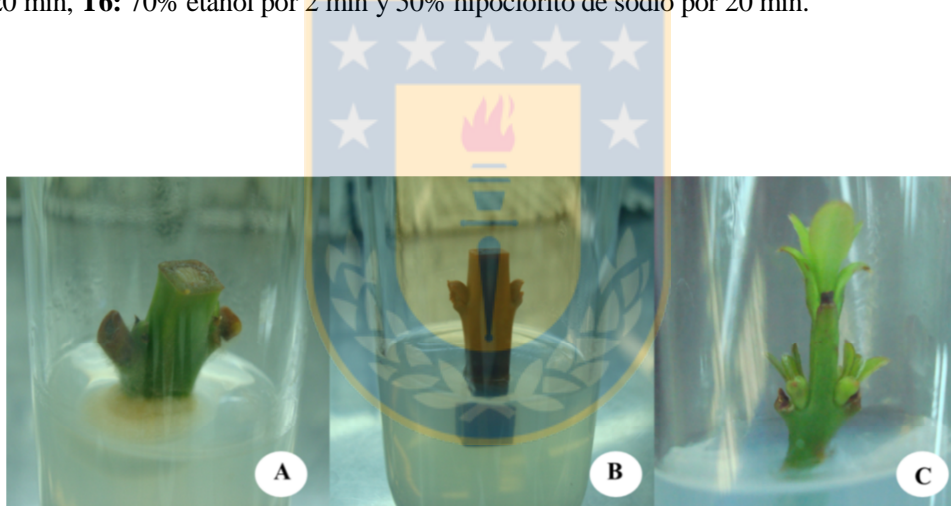


Figura 2.1. Segmentos nodales de *Gomortega keule* a los 20 días de su introducción *in vitro*. A. Contaminación bacteriana. B. Oxidación. C. Brotes sanos (1 cm).

Solución mineral. Luego de 20 días de iniciado el cultivo no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de supervivencia entre los medios de cultivo ensayados y el material obtenidos de diferentes árboles (**Tabla 2.5**).

Tabla 2.5. Supervivencia (%) de segmentos nodales de *Gomortega keule* provenientes de 5 individuos del relicto Coroney según el medio de cultivo ensayado.

Medio de cultivo	Árbol				
	1	2	3	4	5
MS	48n.s.	30n.s.	7n.s.	11n.s.	37n.s.
WPM	44n.s.	26n.s.	4n.s.	11n.s.	33n.s.

n.s.: no significativo según el test Chi-cuadrado ($p \leq 0,05$).

El porcentaje de brotación obtenido según el medio de cultivo ensayado en los 5 individuos del relicto Coroney fue significativo sólo para el árbol 5 (**Tabla 2.6**).

Tabla 2.6. Brotación (%) de segmentos nodales de *Gomortega keule* provenientes de 5 individuos del relicto Coroney según el medio de cultivo ensayado.

Medio de cultivo	Árbol				
	1	2	3	4	5
MS	41n.s.	22n.s.	0n.s.	4n.s.	30*
WPM	33n.s.	19n.s.	0n.s.	4n.s.	7*

*: significativo, n.s.: no significativo según el test Chi-cuadrado $p \leq 0,05$.

Dada la diferencia significativa encontradas en el árbol 5, con un 30% de brotación en medio MS y 7% en el medio WPM, se realizó un análisis estadístico (Chi-cuadrado) específico para dicho individuo (**Tabla 2.7**).

Tabla 2.7. Respuesta al medio de cultivo, brotación y supervivencia (%) de árbol 5 de *Gomortega keule* del relicto Coroney.

Medio de cultivo	Brotación	Supervivencia
MS	30%	37%
WPM	7%	33%
valor $p \leq 0,05$	0,036*	0,776n.s.

*: significativo, n.s.: no significativo según test Chi-cuadrado $p \leq 0,05$.

Se determinó que el árbol 5 presentó un porcentaje de brotación significativamente mayor al cultivar los segmentos nodales en la solución mineral MS ($p = 0,036$) (**Tabla 2.7**) respecto al WPM.

Distintas procedencias. A los 20 días de introducidos los segmentos nodales de *G. keule* en medio de cultivo se obtuvo diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia con respecto al relicto Coroney ($p \leq 0,05$). La supervivencia de los segmentos nodales provenientes de Hualqui fue significativa ($p = 0,0084$) comparada a los segmentos nodales de Coroney, mientras que los del relicto Cerro Neuque no evidenciaron supervivencia (%) significativa en relación a los provenientes de Coroney ($p = 0,0509$). Por lo tanto, la mayor supervivencia se observó en los relictos de Cerro Neuque y Coroney (**Tabla 2.8**).

Tabla 2.8. Supervivencia (%) de segmentos nodales de *Gomortega keule* provenientes de tres relictos.

Relicto	Número de explantos			Supervivencia (%)
	Muertos	Vivos	Total	
Neuque	75	59	134	44 n.s.
Coroney	77	36	113	32
Hualqui	57	9	66	14*

*: Significativo en comparación al relicto Coroney. n.s.: no significativo en comparación al relicto Coroney ($p \leq 0,05$).

Proliferación. Al cabo de un mes de establecidos los ensayos, se presentaron diferencias significativas entre tratamientos provenientes de diferente material vegetal (adulto y juvenil) ($p = 0,0017$), obteniéndose el mayor número promedio de brotes con material adulto, independiente del tratamiento hormonal aplicado (**Figura 2.2**).

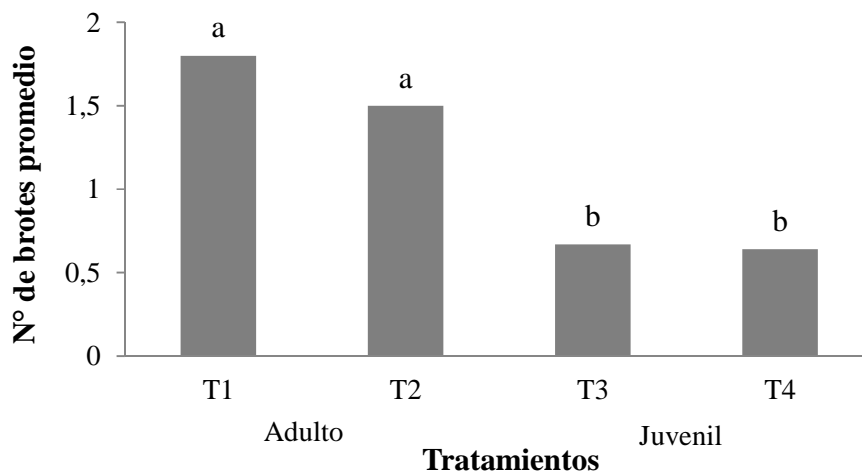


Figura 2.2. Número de brotes promedio, según tratamientos utilizados a partir de material adulto y juvenil de *Gomortega keule*. **T1:** 0,1 mg L⁻¹ BAP y 0,01 mg L⁻¹ AIB, **T2:** 0,5 mg L⁻¹ BAP y 0,01 mg L⁻¹ AIB, **T3:** 0,1 mg L⁻¹ BAP y 0,01 mg L⁻¹ ANA, **T4:** 0,05 mg L⁻¹ BAP y 0,01 mg L⁻¹ ANA. Distintas letras indican diferencias significativas de acuerdo a test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Los resultados macromorfológicos de los brotes de *G. keule* sometidos a los tratamientos de proliferación mostraron un mayor número de brotes en el material adulto (**Figura 2.3A-B**). Se visualizan en roseta, hiperhidratados y con la base necrosada. El material juvenil presentó menor número de brotes, hojas delgadas y alargadas (**Figura 2.3C-D**).

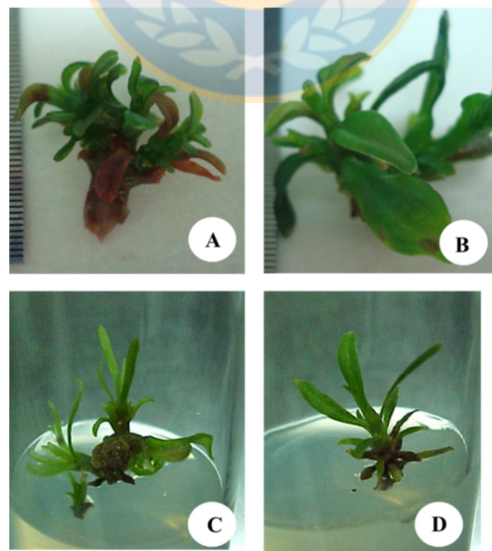


Figura 2.3. Respuesta macromorfológica al cabo de un mes de cultivo de brotes de *Gomortega keule* en los tratamientos de proliferación de material adulto y juvenil. A-B. Brotes hiperhidratados de material adulto. C-D. Brotes y hojas alargadas de material juvenil.

Inducción morfogénica de material embrionario y adulto

Inducción callogénica según solución mineral. A los 75 días de iniciada la inducción callogénica de embriones cigóticos de *G. keule* no existió diferencia significativa entre las soluciones minerales ensayadas ($p = 0,363$) (**Figura 2.4**).

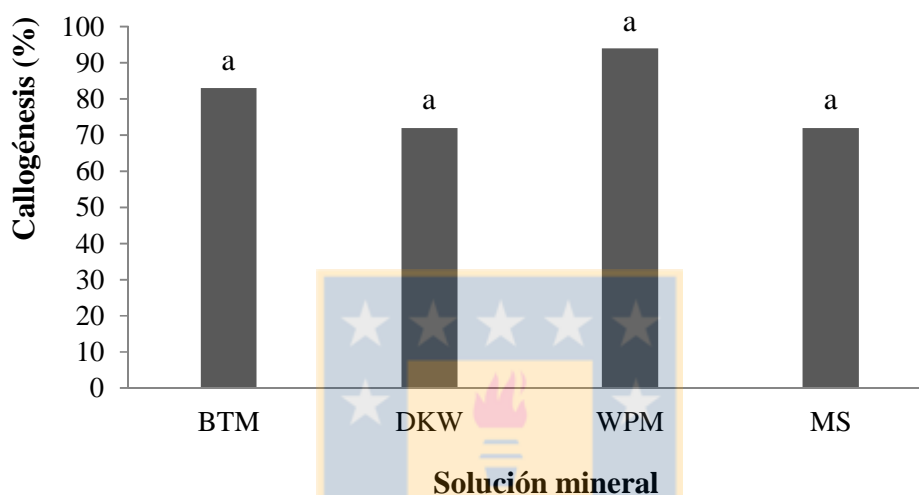


Figura 2.4. Porcentaje de calogénesis obtenida a los 75 días de iniciada la inducción a partir de material embrionario en distintas soluciones minerales. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas de acuerdo a el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Además, se realizó una caracterización macromorfológica e histológica de los callos obtenidos. En el medio BTM se presentó un callo blanco, acuoso y sin presencia de nódulos (**Figura 2.5A**) y células sin características meristemáticas (**Figura 2.5Aa**). Con el medio DKW se formaron callos compactos de color marrón (**Figura 2.5B**), pero sin la manifestación de estructuras morfogénicas (**Figura 2.5Bb**). En el medio WPM los callos fueron de mayor tamaño, de color blanco amarillentos, compactos, friables y con alta presencia de nódulos (**Figura 2.5C**), los que pueden observarse como agrupaciones de tejidos en división (**Figura 2.5Cc**). Los callos obtenidos a partir del medio MS tuvieron apariencia acuosa y no friable (**Figura 2.5D**), con células con grandes vacuolas y sin núcleo (**Figura 2.5Dd**).

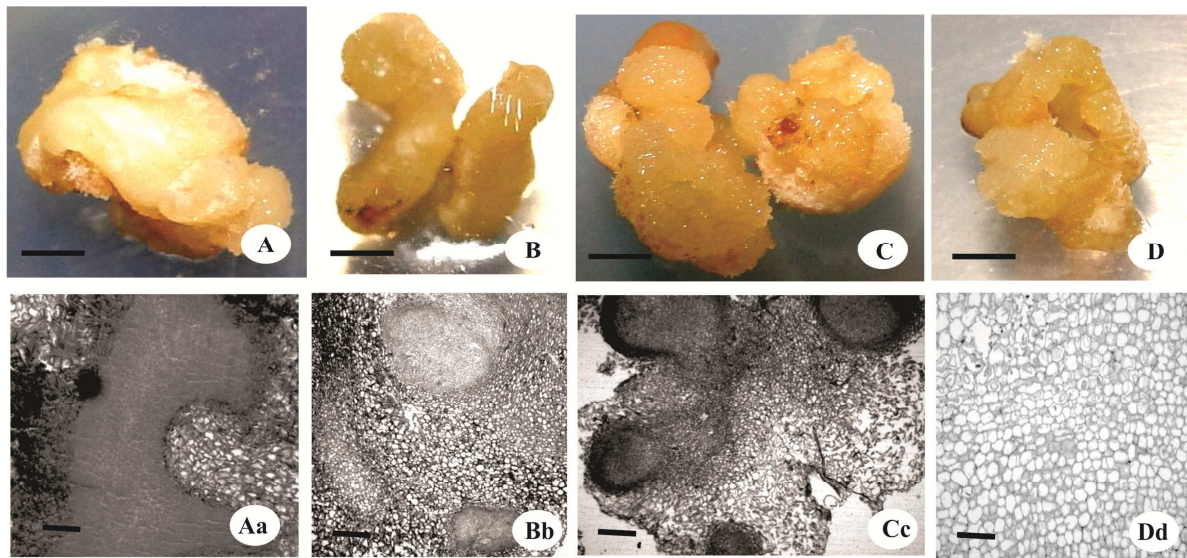


Figura 2.5. Aspectos macromorfológicos e histológicos de estructuras callogénicas según medio de cultivo en embriones cigóticos de *Gomortega keule*, a los 75 días de iniciada la inducción. A-Aa. Medio BTM, callo blanco, acuoso sin nódulos. B-Bb. Medio DKW, callo compacto, color marrón. C-Cc. Medio WPM, Callo blanco-amarillo, compacto, friable y con presencia de nódulos. D-Dd. Medio MS, callo acuoso no friable. A-D. Barra = 0,3 cm. Aa-Cc. Barra = 200 μm . Dd. Barra = 100 μm .

Inducción callogénica según dosis hormonal y tipo de explanto. Se obtuvo respuesta callogénica en el material en estudio (embrionario y adulto) sólo en el tratamiento T1, que consistió en 1 mg L^{-1} de 2,4-D y 1 mg L^{-1} de Kin (**Tabla 2.3**). Se evidenció respuesta callogénica en el material adulto a partir de la nervadura principal y secundaria de la hoja (**Figura 2.6A-B**) y en el material embrionario a partir de los cotiledones formando estructuras friables, compactas y homogéneas (**Figura 2.6C-D**). A los 8 meses y medio de inducido el material se observaron estructuras proembriogénicas en distintos estados (**Figura 2.6E-H**).

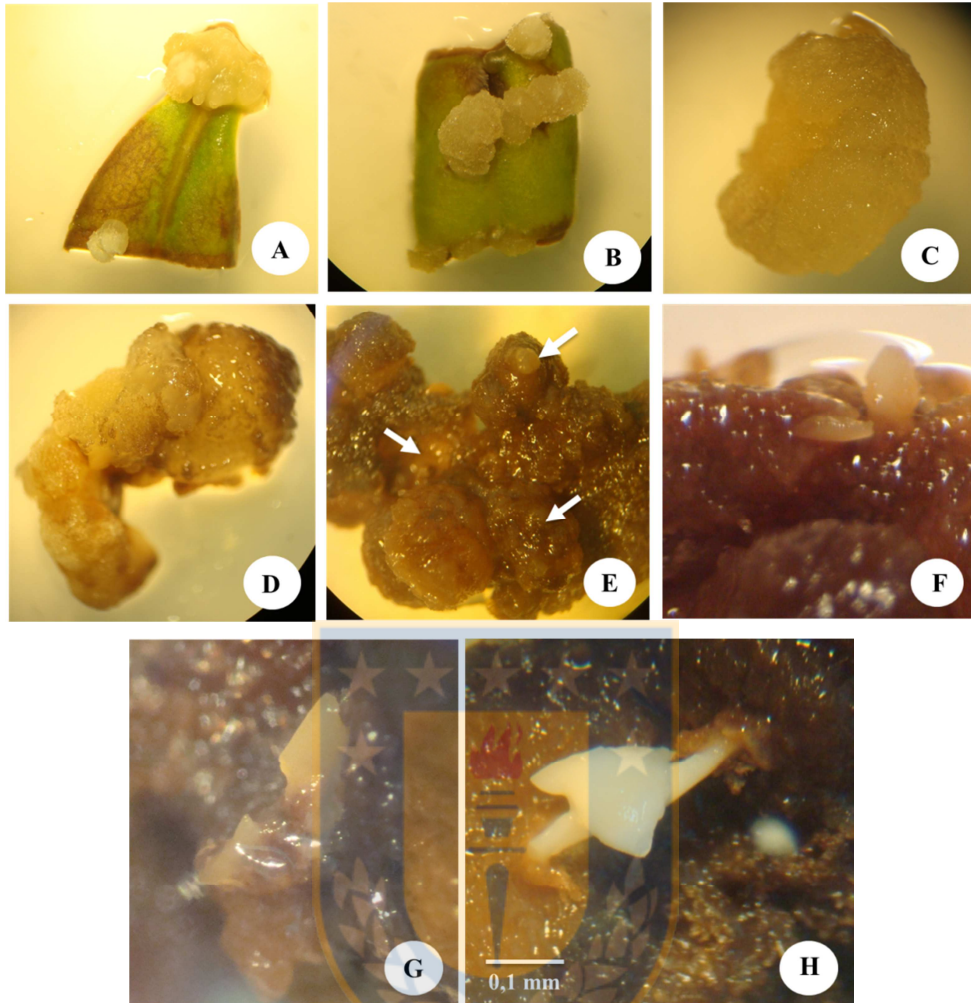


Figura 2.6. Callos y estructuras proembriogénicas de *Gomortega keule* inducidos a partir del tratamiento T1 (1 mg L^{-1} de 2,4-D y 1 mg L^{-1} de Kin). A-B. Callos en hoja a los 130 días de inducción A. Sección distal. B. Sección central. C-D. Material embrionario a los 90 días de inducción. C. Cara adaxial. D. Zona proximal al embrión con nódulos. E-H. Estructuras proembriogénicas a partir de cotiledones luego de 8 meses y medio de inducción. E. Estructuras globulares. F. Estado globular. G. Estado torpedo. H. Estado cotiledonar-amorfo.

A los 8 meses y medio se observaron estructuras proembriogénicas en la superficie de los callos y se tomó un explanto para realizar un análisis histológico, logrando visualizar estructuras globulares sobre la epidermis del explanto (**Figura 2.7**).

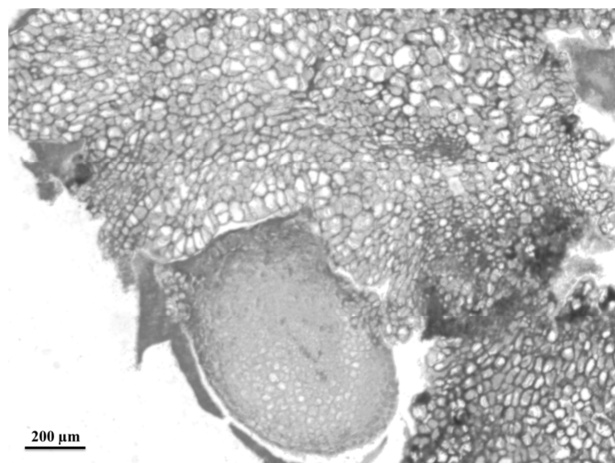


Figura 2.7. Corte histológico longitudinal de estructura proembriogénica y embriode obtenido a partir de callos cotiledonares de *Gomortega keule* inducidos con 1 mg L^{-1} de 2,4-D y 1 mg L^{-1} de Kin.

DISCUSIÓN

Inducción morfogénica de segmentos nodales de material adulto

Asepsias. El establecimiento de cultivos asépticos es una de las ventajas de la técnica de micropropagación para la regeneración de plantas (Margara 1988, George *et al.* 2008). No obstante, la utilización de compuestos como etanol e hipoclorito de sodio para la desinfección de los tejidos a introducir depende, entre otros factores, de la especie en estudio y puede traer consigo otras problemáticas como la oxidación de los tejidos (Pelegri *et al.* 2011). *Gomortega keule* no se encuentra exento de estas problemáticas, como se observó en los resultados obtenidos, ya que a medida que aumentó la concentración y el tiempo de inmersión en etanol e hipoclorito de sodio, aumentó el porcentaje de oxidación en los explantos (**Tabla 2.4**). Sin embargo, disminuyó la contaminación de los tejidos. A pesar de contrarrestar el efecto de la oxidación y contaminación a un 8% y 33%, respectivamente, la supervivencia de los segmentos nodales no logró superar el 29%. Resultados similares se han reportado en estudios realizados en especies tales como *Fragaria x ananassa* (Sánchez y Salaverría 2004), *Berberidopsis corallina* (Uribe *et al.* 2008) y *Dioscorea alata* (Borges *et al.* 2009), en las cuales, se mostró que la utilización conjunta de altas concentraciones de etanol e hipoclorito de sodio no logran controlar la contaminación fúngica y

bacteriana del explanto, o simplemente provocan la muerte (necrosis) de los tejidos por la toxicidad de los compuestos aplicados (**Figura 2.1A-B**).

Por otra parte, la presencia de contaminación y oxidación de los explantos evidenció que ésta se relaciona con: el estado fitosanitario de la planta donante, las concentraciones de etanol e hipoclorito de sodio empleadas e incluso con el alto contenido de alcaloides, coumarinas y aceites esenciales que posee la especie (Urzúa *et al.* 1982, Bittner *et al.* 2008). Para disminuir el efecto de estos factores limitantes durante la introducción y establecimiento del cultivo *in vitro* de *G. keule*, la literatura sugiere aumentar las concentraciones utilizadas de PVP o incorporar otros antioxidantes, como cisteína, ácido ascórbico, entre otros (García-González *et al.* 2010). También es recomendable disminuir la intensidad de luz incidente sobre el cultivo. Este último procedimiento ayudaría a reducir la actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis y oxidación de los fenoles (Sánchez y Salaverría 2004).

En consecuencia, se confirma la importancia de la condición de asepsia en la técnica de cultivo de tejidos, puesto que un determinado tratamiento no siempre es el más adecuado, dado que dependerá de la especie en estudio.

Solución mineral. La mayoría de las publicaciones científicas señalan al medio nutritivo Murashige y Skoog (1962) como el más utilizado y a partir de este se generaron nuevos protocolos para distintas especies (Orellana, 1998). En *G. keule*, Calderón-Baltierra *et al.* (1993) y Muñoz-Concha y Davey, (2011) reportan el establecimiento de embriones cigóticos maduros en condiciones *in vitro* utilizando la solución mineral MS. Sin embargo, en ambos ensayos debieron cambiar la solución mineral por el medio MIII6 (Mosella *et al.* 1979) y WPM, respectivamente, al entrar en la fase de proliferación y elongación de los explantos. En el presente trabajo los medios de cultivos ensayados (MS y WPM) no arrojaron diferencias estadísticas en sus resultados (**Tabla 2.5**). No obstante, existió una influencia de los genotipos introducidos, tal como se observó en el número de brotes obtenidos *in vitro* de *G. keule* (**Tabla 2.7**). Muñoz-Concha y Davey (2011) encontraron respuesta

genotipo-dependiente en el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos maduros. Kong y Von Aderkas (2007) confirman esta relación genotipo-dependencia en la maduración de embriones somáticos de *Pinus glauca* sometidos a concentraciones exógenas de ácido abscísico. A su vez, en Raúl Sabja *et al.* (2008) señalan diferentes tasas de brotación según genotipo ensayado. De esta manera se puede señalar que los medios de cultivo más apropiados para una respuesta determinada dependen, entre otros factores, de la especie y, más aún, del genotipo en estudio.

Distintas procedencias. El cultivo *in vitro* es una alternativa viable para la reproducción y conservación de especies difíciles de cultivar y permite generar un gran número de individuos con la misma identidad genética (Pierik 1990). Algunos investigadores indican que la identificación de ecotipos o procedencias y la regeneración *in vitro* de los mismos es el mecanismo más apropiado para obtener la mayor tasa de multiplicación de estas especies (Reed *et al.* 2011). En este contexto, el potencial de producción de brotes varió según la procedencia del material inicial, la mayor supervivencia se observó en los relictos de Cerro Neuque y Coroney (**Tabla 2.8**). Esto podría indicar que genéticamente son materiales diferentes. De hecho, como se señala en el capítulo 1, la mayor variabilidad genética se registró en los relictos Cerro Neuque y Coroney. Similares resultados se han obtenido en *Psychotria acuminata* por Lara *et al.* (2003), quienes estudiaron cuatro procedencias y obtuvieron mayor proliferación de brotes de una de ellas. Esto es atribuible a dos factores: a que la permanencia *in vitro* haya inducido a los tejidos a un estado juvenil (mayor producción) o estar en presencia de genotipos superiores y con una mayor capacidad de multiplicación. Por otro lado, Hernández (2007) afirma que durante el proceso de inducción de embriogénesis somática en *Quercus suber* es más importante la influencia del genotipo que la procedencia de los individuos.

Proliferación. La literatura plantea que un tejido adulto u ontogénicamente más viejo debería tener una menor respuesta morfogénica que un tejido juvenil, ya que este último ha sido generado a partir de tejidos meristemáticos latentes, los cuales son cronológicamente más antiguos pero con menor número de divisiones celulares, manteniendo su identidad juvenil (Sánchez-Olate *et al.* 2005, Hasbún 2006). No obstante, en el presente ensayo se obtiene una mayor respuesta morfogénica, expresada en el número de brotes, a partir de material adulto que material juvenil, independiente del

tratamiento hormonal utilizado (**Figura 2.2**). Esto podría explicarse a través de los resultados macromorfológicos de los brotes de *G. keule* sometidos a los tratamientos de proliferación. El material adulto se visualizó en roseta, hiperhidratados y base necrosada (**Figura 2.3A-B**). En cambio, el material juvenil presentó hojas delgadas y alargadas (**Figura 2.3 C-D**). Estudios realizados en *Quercus petraea* por Morisset *et al.* (2012) señalan que la importancia de los brotes epicórmicos, como material morfogénico, radica no tan sólo en su edad ontogénica, sino que en la cantidad de agua, luz y carbohidratos que recibieron desde el material parental durante su desarrollo y si a esto se le suman condiciones de cultivo *in vitro*, se puede generar una mayor respuesta morfogénica, pero con mayor hiperhidratación de los tejidos por una acumulación de nutrientes y hormonas (auxinas y citoquininas, principalmente) durante su cultivo. Características similares presentan los brotes organogénicos obtenidos en *Persea lingue* por Cob *et al.* (2010), sometidos a las mismas concentraciones de BAP. Específicamente en *G. keule*, al igual que en *P. lingue*, se reporta la succulencia de sus tejidos como una característica propia de la especie, que en presencia de citoquininas promovería la hiperhidricidad de los brotes, generando vástagos no definidos y en forma de roseta (Calderón-Baltierra *et al.* 1993).

Inducción morfogénica de material embrionario y adulto

Inducción callogénica según solución mineral. En el presente ensayo de inducción, no hubo una diferencia significativa en relación a la solución mineral utilizada. No obstante, mediante la caracterización macromorfológica de los callos obtenidos en los medios utilizados (**Figura 2.5A.B.D**) se observó, en general, callos acuosos o traslucidos, no compactos o de color marrón con indicios de oxidación, excepto para el medio WPM, que generó callos de mayor tamaño, de color blanco amarillento, compactos, friables y con alta presencia de nódulos (**Figura 2.5C**). Muñoz-Concha y Davey (2011) señalan la solución mineral WPM como la óptima para la proliferación de brotes *in vitro* provenientes de embriones cigóticos y, a su vez, Muñoz-Concha *et al.* (2012) señalan a la solución mineral MS como óptima para el desarrollo de embriones somáticos de *G. keule*, dejando en manifiesto que la respuesta morfogénica está fuertemente influenciada por el genotipo más que por la solución mineral. En general, para las especies vegetales no existe una norma exitosa en la respuesta morfogénica de sus callos (embrionarios u organogénicos) producidos en diferentes medios de cultivos según el explanto inicial. Por ejemplo, se obtuvo callo morfogénico utilizando la

solución mineral BTM en cultivos de *Juglans regia* (Avilés *et al.* 2009) a partir de hojas adultas. En cambio, en la misma especie Fatima *et al.* (2006) obtuvo una respuesta positiva en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales utilizando el medio de cultivo MS.

A nivel macromorfológico e histológico se estableció que los callos con mejores características morfológicas, en términos de la organización del tejido, se originaron a partir de los medios de cultivo WPM (**Figura 2.5C-Cc**). Sin embargo, para obtener una manifestación o desarrollo de estas estructuras en la superficie del callo, es necesario conocer, entre otros factores, tiempo de inducción, tipo y concentración de reguladores del crecimiento, genotipo y fuente de hidratos de carbono (Corredoira *et al.* 2003, Miguel *et al.* 2004). En relación a la descripción histológica, específicamente para los callos provenientes del medio nutritivo WPM, se pudo observar algunas agrupaciones de tejidos meristemáticos o en división, debido, principalmente, a la presencia de células pequeñas, compactas e isodiamétricas, con alto contenido citoplasmático, característico de células pro-embriogénicas (Michelangeli de Clavijo *et al.* 2003, Yan *et al.* 2012). A su vez, estudios realizados en *Coffea canephora* (Cevallos *et al.* 2002), *Quercus robur* (Corredoira *et al.* 2006) y *Juglans regia* (Avilés *et al.* 2009) describen como característica común la presencia de estructuras meristemáticas en la cara adaxial del callo.

Inducción callogénica según dosis hormonal y tipo de explanto. Los resultados obtenidos mostraron que en el medio de cultivo se requirió la misma concentración de los reguladores del crecimiento 2,4-D y Kin para desencadenar el proceso morfológico. Esto, debido a que sólo los agregados celulares derivados del tratamiento T1 expresaron respuesta morfológica a partir de la nervadura principal y secundaria de la hoja, en material adulto, y similar respuesta se obtuvo con el mismo tratamiento a partir de cotiledones maduros, evidenciado callos friables, compactos y homogéneos (**Figura 2.6A-D**).

La presencia del ácido 2,4-D en el medio de cultivo ha sido reportada como uno de los estímulos auxínicos de mayor aplicación en la inducción de embriogénesis somática, tanto en plantas

leñosas como herbáceas (Castellanos *et al.* 2005, Gómez *et al.* 2006, González *et al.* 2012). Las características macromorfológicas del tipo de callo que se obtuvieron en este ensayo concuerdan con la descripción realizada por Muñoz-Concha *et al.* (2012), tras inducir embriones cigóticos de *G. keule* en presencia de 2,4-D, destacando la friabilidad y presencia nodular en los agregados obtenidos al culminar la etapa de inducción y durante la proliferación callogénica.

En la **Figura 2.6E** se evidenció la presencia de un callo compacto con estructuras globulares que trascurridos 8 meses y medio de cultivo se manifestó como un embrión corazón-torpedo poco desarrollado (**Figura 2.6F-H**). Al observar la histología de ésta estructura, se determinó la presencia de una estructura embriogénica (**Figura 2.7**), no así el cambio de fase globular a corazón-torpedo. Similares características fueron observadas por Cartes (2012) en embriones somáticos de *Nothofagus alpina* en fase globular, quien describe embrioides con tendencia a aplanarse, formar una concavidad en uno de sus lados y desconectarse del tejido materno; para luego, en la fase de estadio corazón, iniciar la polarización de los ápices caulinar y radical. Además, Cartes (2012) destaca que las masas pro-embriogénicas presentan gran organización tisular, células pequeñas con núcleos prominentes, desarrollo de células epidérmicas y bandas procambiales en fases iniciales. Otros estudios, con características morfológicas e histológicas similares a las presentadas, se han informado en una gran variedad de especies como: *Eucalyptus nitens*, *Musa* spp., *Pinus pinaster*, *Acrocomia aculeata*, *Passiflora edulis*, entre otras (Bandyopadhyay y Hamill 2000, Vidal *et al.* 2000, Tereso *et al.* 2007, Moura *et al.* 2008, Pinto *et al.* 2011).

CONCLUSIONES

La respuesta morfogénica de segmentos nodales de *G. keule* fue exitosa, permitiendo la revigorización del material vegetal adulto. Se confirmó la respuesta genotipo-dependiente de la especie sobre las condiciones de cultivo. Mediante la adición de 2,4-D en el medio de cultivo se obtuvo respuesta embriogénica a partir de cotiledones maduros, corroborada por análisis

histológicos. Así mismo, se evidenció que, las fases de proliferación y elongación caulinar fueron las etapas críticas del estudio. Se obtuvieron datos científicos que podrían ayudar a disminuir algunas limitantes que afronta esta especie endémica chilena en su propagación; además de plantear nuevas interrogantes que deben ser incorporadas en estudios futuros.

LITERATURA CITADA

- Allendorf FW, G Luikart. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing. Oxford, UK.
- Al-Sabah L, C Sudherson, SJ Manuel. 2012. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in Amla. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 6(4): 417-421.
- Avilés F, D Ríos, R González, M Sánchez-Olate. 2009. Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.). Chilean Journal of Agricultural Research 69(3): 460-467.
- Azcón-Bieto J, M Talón. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGrawHill/Interamericana. Barcelona, España.
- Bandyopadhyay S, J Hamill. 2000. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. Annals of Botany (86): 237-244.
- Benson EE. 2000. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 36: 141-148.
- Bioversity International. 2011. A training module for the international course on the management and utilization of field genebanks and *in vitro* collections. TARI, Fengshan, Taiwán.
- Bittner ML, ME Casanueva, CC Arbert, MA Aguilera, VJ Hernández, JV Becerra. 2008. Effects of essential oils from five species against the granary weevils *Sitophilus zeamais* and

Acanthoscelides obtectus (Coleoptera). Journal of the Chilean Chemical Society 53(1): 1455-14-59.

Borges M, E Estrada, I Pérez, S Meneses. 2009. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología 11(2): 127-135.

Bunn E, SR Turner, KW Dixon. 2011. Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 47: 188-200.

Calderón-Baltierra X, F Pérez, A Rotella. 1993. Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (Magnoliopsidae, Gomortegaceae). Bosque 14(1): 23-28.

Cartes P. 2012. Validación de rutas morfogénicas para la clonación de raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de tejidos embrionarios y adultos. Tesis Doctoral. Universidad de Concepción. Chile.

Castellanos H, M Sánchez-Olate, D Ríos. 2005. Embriogénesis somática como alternativa potencial para la regeneración *in vitro* del género *Nothofagus*. En: Gutiérrez B, O Ortiz, MP Molina (eds.). Clonación de raulí. Estado actual y perspectivas. INFOR CEFOR UACH. Concepción. Chile. pp. 59-74.

Cevallos M, IS Sánchez, S Montes. 2002. Caracterización histológica de la embriogénesis en *Coffea canephora* P var. robusta. Revista de Protección Vegetal 17(1): 14-19.

Cob J, AM Sabja, D Ríos, A Lara, PJ Donoso, L Arias, B Escobar. 2010. Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación *in vitro* de *Persea lingue* en la zona centro-sur de Chile. Bosque 31(3): 202-208.

CONAF. 2005. Planes nacionales de conservación del queule, *Gomortega keule* (Mol.) Baillon, y pitao, *Pitavia punctata* (Ruiz et Pavón) Mol., en Chile. CONAF. Santiago, Chile.

Corredoira E, A Ballester, AM Vieitez. 2003. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. Annals of Botany 92: 129-136.

- Corredoira E, S Valladares, AM Vieitez. 2006. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42: 525–533.
- Chalupa V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39.
- Donoso C, B Escobar. 1985. Germinación de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon. *Bosque* 6(2): 120-122.
- Driver J, A Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19: 507-509.
- Fatima A, AN Kamili, AM Shah. 2006. Plantlet regeneration from excised embryonal axes, shoot apices and nodal segments of *Juglans regia* L. *Acta Horticulturae* 705: 387-392.
- Fay M, M Clemente. 1997. Aplicación de las técnicas de cultivo en la propagación y conservación de especies amenazadas. *Monografías del Jardín Botánico de Córdoba* 5: 43-50.
- Fraga MF, R Rodríguez, MJ Cañal. 2002. Genomic DNA methylation demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata* D. Don. *Tree Physiology* 22: 813-816.
- García-González R, K Quiroz, B Carrasco, P Caligari. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria* 37(3): 5-30.
- George E, M Hall, G De Klerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd Edition. Volume 1. The Background. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Gómez R. 1998. Cultivo de células y tejidos. En: Pérez JN (Ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 25-44.
- Gómez C, M Uribe, D Ríos, M Sánchez-Olate. 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *Interciencia* 31(10): 734-738.

- González M. 1998. *Gomortega keule*. IUCN Red list of threatened species. Version 2012.2. URL: <http://www.iucnredlist.org/details/31357/0>. Viewed: march 03, 2013.
- González G, MG Pacheco, C Décima, VJ Etchart, MV Kandus, JC Salerno, G Eyherabide, D Presello, D Lewi. 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electronic Journal of Biotechnology* 15(1). doi: 10.2225/vol15-issue1-fulltext-7
- Greenwood M. 1995. Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree Physiology* 15: 433-438.
- Hasbún R. 2006. Monitorización (epi)-genética del desarrollo y producción de planta de castaño (*Castanea sativa* Mill.). Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. España.
- Hechenleitner P, M Gardner, P Thomas, C Echeverría, B Escobar, P Brownless, C Martínez. 2005. Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Primera Edición. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. Valdivia, Chile. pp. 74-75.
- Hernández I. 2007. Regeneración clonal de alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. España.
- Howell SH, S Lall, P Che. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science* 8: 453-459.
- Jiménez E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez JN (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 13-24.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. Mc Graw-Hill Book Co. Inc. New York, USA.
- Jordan M, J González, C Rovraro. 2005. *In vitro* regeneration of *Gomortega keule* (Gomortegaceae), a chilean endemic tree in danger of extinction. *European Journal of Horticultural Science* 70(4): 202-206.

- Kong L, Von Aderkas P. 2007. Genotype effects on ABA consumption and somatic embryo maturation in interior spruce (*Picea glauca* x *engelmanni*). *Journal of Experimental Botany* 58 (6): 1525-1531.
- Landi L, B Mezzetti. 2006. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Reports* 25: 281-288.
- Lara A, R Valverde, L Gómez, N Hidalgo. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(2): 7-20.
- Lloyd G, B McCown. 1981. Woody plant medium (WPM). A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience* 16: 453.
- Maldonado C. 1990. Caracterización del hábitat de *Gomortega keule* (Mol) Baillon en su rango de distribución y algunos antecedentes de su reproducción sexual. Tesis de Grado. Fac. Cs. Agronómicas, Veterinarias y Forestales. Universidad de Concepción. Chile.
- Manjkhola S, U Dhar, M Josgi. 2005. Organogenesis, embryogenesis and synthetic seed production in *Arnebia euchroma* an critically endangered medicinal plant of the Himalaya. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 244-248.
- Margara J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Marticorena C, R Rodríguez. 2001. Flora de Chile. Vol. 2. Winteraceae-Ranunculacea. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Michelangeli de Clavijo CC, PI Artioli, AM Medina. 2003. Anatomía y ultraestructura de la embriogénesis somática en *Onoto*. *Agronomía Tropical* 53(1): 33-48.
- Miguel C, S Gonçaves, S Tereso, L Marum, MM Oliveira. 2004. Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated seed families of portuguese plus trees of maritime pine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76: 121-130.

- Morriset JB, F Mothe, J Bock, N Bréda, F Colin. 2012. Epicormic ontogeny in *Quercus petraea* constrains the highly plausible control of epicormic sprouting by water and carbohydrates. *Annals of Botany* 109: 365-377.
- Mosella L, CM Riedel, R Jonard, P Signoret. 1979. Développement *in vitro* d'apex de pecher (*Prunus persica* Batsch): possibilités d'application. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 289: 1335-1338.
- Moura EF, MC Ventrella, SY Motoike, AQ Júnior, M Carvalho, CE Manfio. 2008. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95(2): 175-183.
- Muñoz-Concha D, MR Davey. 2011. Micropropagation of the endangered chilean tree, *Gomortega keule*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 47:170-175.
- Muñoz-Concha D, S Mayes, G Ribas, MR Davey. 2012. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and shoot-tips of the chilean tree *Gomortega keule*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 109(1): 123-130.
- Murashige T, F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nontaswatsri C, S Fukai, T Touma, M Goi. 2002. Comparison of adventitious shoot formation of various carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 520-525.
- Orellana C. 1996. Efecto del ácido giberélico (GA₃) sobre la germinación de semillas de queule (*Gomortega keule* (Mol.) Baillon). Tesis Licenciado en Ciencias Forestales. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Forestal. Universidad de Talca. Chile.
- Orellana P. 1998. Introducción a la propagación masiva. En: Pérez JN (Ed.) *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 125-133.
- Payghamzadeh K, SK Kazemitabar. 2011. *In vitro* propagation of walnut: A review. *African Journal of Biotechnology* 10(3): 290-311.

- Pelegrini L, LF Ribas, F Zanette, HS Koehler. 2011. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. *African Journal of Biotechnology* 10(9): 1527-1523.
- Peña KA. 1995. Enraizamiento en queule (*Gomortega keule* (Mol.) Baillon) y su relación con el contenido y tipo de fenoles. Tesis Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Departamento de Silvicultura. Universidad de Chile. Chile.
- Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Pinto DL, AM Almeida, MM Rêgo, ML Silva, MJ Oliveira, WC Otoni. 2011. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107: 521-530.
- Reed BM, V Sarasan, M Kane, E Bunn, VC Pence. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 47: 1-4.
- Rodríguez R, E Ruiz, JP Elissetche. 2005a. Árboles en Chile. Ed. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Rodríguez R, M Fernández, J Pacheco, MJ Cañal. 2005b. Envejecimiento vegetal, una barrera a la propagación. Alternativas. En: Sánchez-Olate M, D Ríos (Eds.). *Biotechnología vegetal en especies leñosas de interés forestal*. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. pp. 29-48.
- Sabja AM, O Ortiz, C Triviño. 2008. Avances de clonación *in vitro* de árboles adultos de raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) Oerst.) para propagación comercial. *Agrociencia* 42: 595-603.
- San Martín J, A Sánchez. 1999. Las comunidades relictas de *Gomortega keule* (Gomortegaceae, Magnoliopsida) en Chile Central. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 57(2): 317-326.
- Sánchez MC, JL Salverría. 2004. Control de la oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch). *Revista UDO Agrícola* 4(1): 21-26.

- Sánchez-Olate M, D Ríos, R Escobar. 2005. La biotecnología vegetal y el mejoramiento genético de especies leñosas de interés forestal y sus proyecciones en Chile. En: Sánchez-Olate M, D Ríos (Eds.). Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción, Chile. pp.17-28.
- Sarasan V, R Cripps, MM Ramsay, C Atherton, M McMichen, G Prendergast, JK Rowntree. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past Decade. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant 42: 206-214.
- SAS OnlineDoc[®] Versión 9.2. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Sauer U, E Wilhelm. 2005. Somatic embryogenesis from ovaries, developing ovules and immature zygotic embryos and improved embryo development of *Castanea sativa*. Biologia Plantarum 49: 1-6.
- Su YH, YB Liu, XS Zhang. 2011. Auxin-Cytokinin interaction regulates meristem development. Molecular Plant 4(4): 616-625.
- Tereso S, K Zoglauer, A Milhinhos, C Miguel, M Oliveira. 2007. Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. Tree Physiology 27: 661-669.
- Uribe ME, C Delaveau, M Garcés, R Escobar. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque 29(1): 58-64.
- Urzúa A, S Espinosa, R Gaona. 1982. Coumarins from the bark of *Gomortega keule*. Fitoterapia 53: 89-90.
- Vidal MC, TE Vargas, E García. 2000. Estudios anatómicos y morfológicos de la iniciación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices meristemáticos de *Musa sp.* Acta Científica Venezolana 51: 78-83.
- Yan J, Y Wang, J Li, L Tao, Q Deng, X Lv. 2012. Morphological and histological observations on the induction of anther calluses and embryos in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). African Journal of Agricultural Research 7(1): 123-127.

CAPÍTULO 3

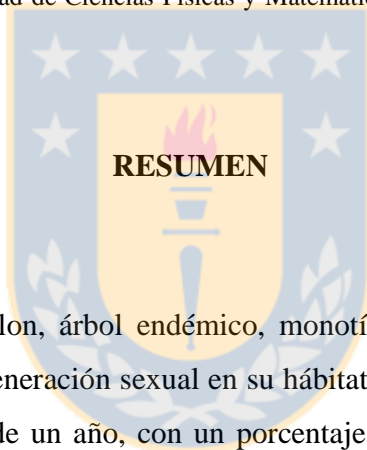
Germinación *in vitro* de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon y la presencia de inhibidores relacionados a este proceso

Catherine Delaveau¹; Lays Araújo Nery²; Marília Contín Ventrella²; Katia Sáez³; Sofía Valenzuela¹; Matilde Uribe¹

¹Universidad de Concepción. Facultad Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Casilla 160-C, Concepción, Chile, teléfono (56) 41-2207241, fax: (56) 41-2207310, catherine.delaveau@gmail.com

²Universidad Federal de Viçosa, Laboratorio de Anatomía Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Av. PH Rolfs s/n, Viçosa, Brasil.

³Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Avda. Esteban Iturra s/n - Barrio Universitario, Concepción, Chile.



Gomortega keule (Mol.) Baillon, árbol endémico, monotipo y catalogado en peligro de extinción, presenta escasa regeneración sexual en su hábitat natural. La germinación de sus semillas se produce después de un año, con un porcentaje de germinación no superior al 40% y la propagación por estacas ha sido infructuosa. Por esta razón, es pertinente ahondar en posibles causas de su baja germinación. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar la germinación *in vitro* de *G. keule* y la presencia de inhibidores relacionados a este proceso. La germinación *in vitro* no se vio influenciada por la aplicación exógena de ácido giberélico (GA₃), obteniendo un porcentaje de conversión a plántula máximo de 29,17%. La cantidad de fenoles totales fue mayor en tegumentos de semillas de la temporada que en tegumentos de semillas de temporadas anteriores. La relación giberelinas: ácido abscísico (GA:ABA) fue mayor en todos los tratamientos y la concentración de ácido indol acético (AIA) fue mayor en embriones en proceso de germinación *in vitro*. Las principales sustancias de reserva en las semillas de *G. keule*, en orden decreciente son lípidos, proteínas y almidón. Durante los primeros 60 días de la germinación *in vitro* de *G. keule* se observó

utilización de lípidos y proteínas. En cambio, los gránulos de almidón fueron siempre pequeños, escasos y sin evidencia de ser utilizado como fuente de carbohidratos durante el período germinativo estudiado.

Palabras clave: Gomortegaceae, histoquímica, sustancias de reserva, fenoles, giberelina.

INTRODUCCIÓN

La germinación es un proceso fisiológico complejo que se inicia con la imbibición de la semilla quiescente y termina con la emergencia de parte del eje embrionario a través de las cubiertas seminales. El signo visible de la finalización de este proceso es cuando la radícula atraviesa la cubierta seminal que la rodea (Bewley 1997, Azcón-Bieto y Talón 2000, Bewley *et al.* 2013).

Para que ocurra la germinación, no sólo las condiciones ambientales como humedad, temperatura, luz y pH deben ser adecuadas, sino también el desarrollo del embrión y la maduración de la semilla deben haber concluido (Bentsink y Koornneef 2008). Sin embargo, las semillas de algunas especies no germinan aunque las condiciones sean favorables. Esta situación se conoce como dormancia y es una de las adaptaciones más importantes de las plantas, ya que permite a la semilla germinar sólo cuando las condiciones sean óptimas con el fin de perpetuar la especie (Bewley 1997).

La dormancia en las semillas está determinada por múltiples factores morfológicos y fisiológicos. Entre los factores fisiológicos, los reguladores del crecimiento cumplen un rol importante. Entre ellos, el ácido abscísico (ABA) libre, que inhibe la germinación y mantiene la dormancia, ha sido estudiado en varias especies modelos (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006, Debeaujon *et al.* 2007, Nonogaki *et al.* 2010). Adicionalmente, la germinación se encuentra regulada, principalmente, por la relación entre las cantidades

endógenas de giberelinas (GA) y ABA y la sensibilidad de los tejidos a dichas fitohormonas. Así, un mayor contenido de ABA bloquearía la germinación, mientras que un mayor contenido de GA la promueve (Kucera *et al.* 2005, Bentsink y Koornneef 2008, Hilhorst *et al.* 2010, Bewley *et al.* 2013).

Por otro lado, las cubiertas seminales son importantes puesto que protegen al embrión frente a factores del ambiente, impidiendo la entrada de agua y limitando el intercambio gaseoso entre los tejidos (Bewley *et al.* 2013). También actuarían como barrera mecánica al ejercer resistencia a la elongación del embrión y al contener sustancias inhibitoras de la germinación (Baskin y Baskin 1998). Entre estas sustancias inhibitoras se encuentran los compuestos fenólicos, derivados del metabolismo secundario de las plantas, que inhiben la germinación al incrementar la impermeabilidad al agua y/o gases e incluso influir sobre la síntesis temprana de proteínas (Srivastava 2002, Debeaujon *et al.* 2007, Siddiqui y Khan 2010).

Adicionalmente, para que una especie logre establecerse, las principales sustancias de reserva de la semilla (carbohidratos, proteínas y lípidos) deben estar disponibles, tanto para la formación de estructuras físicas (paredes celulares, membranas y organelos) como para procesos asociados a la respiración y síntesis de intermediarios metabólicos (Corte *et al.* 2006). A su vez, la composición química de la semilla le confiere características que determinan su comportamiento durante el almacenamiento, la germinación y los procesos metabólicos que ocurren para la degradación de esas sustancias, afectando el vigor de la misma (Magalhães *et al.* 2010).

El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos es una de las técnicas utilizadas para el rescate de embriones que se encuentran en estado inmaduro. Las condiciones artificiales del medio de cultivo sustituyen el endospermo, y el control de las condiciones micro medioambientales promueven su desarrollo a una planta viable (Reed 2005). Dado lo exitoso de la técnica se le ha utilizado en especies que se encuentran en algún grado de amenaza, con el fin de

lograr la conservación de dichas especies (Fay y Clemente 1997, Rambabu *et al.* 2006, Sugii 2011, Junior y Schwerwinski-Pereira 2012, Kagithoju *et al.* 2013).

En la especie en estudio, *G. keule*, la escasa germinación en condiciones naturales representa uno de los factores que han llevado a la especie a encontrarse en peligro de extinción. Estudios de propagación sexual reportan germinación a partir del quinto mes de iniciados los ensayos, con una tasa del 4% realizando remoción del endocarpio (Maldonado 1990) y de un 24% utilizando semillas escarificadas naturalmente por más de una temporada en el suelo (Donoso y Escobar 1985). Orellana (1996) usó semillas colectadas desde el suelo, les aplicó 10 g L^{-1} de ácido giberélico (GA_3) y transcurridos 5 meses obtuvo un 17% de germinación. Morales y Calquin (2004) rompieron el endocarpio y al cabo de 14 meses obtuvieron un 42% de germinación.

La baja capacidad germinativa de *G. keule* es atribuida a la dureza de su endocarpio y al largo período que requiere para su germinación (Maldonado 1990), así como también a la carga microbiana de origen endógeno que poseen las semillas (Aburto 2002). Según Hechenleitner *et al.* (2005) las plántulas alcanzarían una altura de 8 a 10 cm luego de un año de crecimiento.

Calderón-Baltierra *et al.* (1993), utilizando la técnica de cultivo *in vitro*, introdujeron embriones cigóticos de *G. keule* reportando altos niveles de contaminación e hiperhidratación de los tejidos. Los autores lograron la iniciación de brotes adventicios a partir de la base cotiledonar luego de 4 meses de cultivo en medio MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 1 mg L^{-1} de bencilaminopurina (BAP) y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenacético (ANA) y posteriormente su proliferación en medio MIII6 (Mosella *et al.* 1979) suplementado con 1 mg L^{-1} BAP, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ANA y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 . Muñoz-Concha y Davey (2011) cultivaron en condiciones *in vitro* más de 400 embriones cigóticos en medio Woody Plant Medium (WPM, Lloyd y McCown 1981) con $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, logrando seis plántulas aptas para la inducción de brotes y de las cuales sólo dos fueron reactivas en la etapa de proliferación de brotes.

La información existente de los posibles factores que estarían afectando la germinación de *G. keule* es un espacio abierto para el desarrollo de investigaciones que contribuyan a la conservación de tan importante especie para Chile. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue evaluar la germinación *in vitro* y la presencia de inhibidores de la germinación en *G. keule*, con el fin de contribuir a dilucidar las posibles causas que dificultan la germinación de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron semillas con endocarpio y frutos maduros de *G. keule* en el relicto Coroney (36°40' S; 72°51' O) durante las temporadas 2010 y 2011. En todas las semillas fueron removidos los endocarpios con ayuda de una prensa y desechados. Las semillas se denominaron: 1) temporada 2010 ó 2011, cuando provenían de los frutos maduros y 2) temporadas anteriores al año de colecta, cuando no presentaban epicarpio y mesocarpio. Se asumió que al no presentar estas estructuras ya habían pasado al menos una temporada en el suelo. Las semillas fueron almacenadas en un lugar fresco y seco hasta su utilización.

Germinación in vitro

A semillas de *G. keule* colectadas durante la temporada 2010 se les realizó una prueba de viabilidad, utilizando tetrazolio (TZ) al 1% (p/v) (ISTA 1999). Posteriormente las semillas extraídas de los frutos fueron embebidas en diferentes concentraciones de GA₃ (50, 100, 200 mg L⁻¹) durante 24 h. Luego, en una cámara de flujo laminar se realizó una asepsia superficial con etanol al 70% (v/v) por 1 min seguido de tres lavados de agua destilada estéril (3, 4 y 5 min) continuando con hipoclorito de sodio al 50% (v/v) por 15 min, finalizando con tres lavados en agua destilada estéril (3, 4 y 5 min). La extracción de embriones se realizó bajo lupa estereoscópica. Los embriones fueron dispuestos en tubos de ensayos con medio de cultivo WPM con macronutrientes diluidos a la mitad, suplementado con 30 g L⁻¹ sacarosa, 7

g L⁻¹ agar agar (Merck®) y 0,115 g L⁻¹ de vitrofural® ajustado a pH 5,8. Las condiciones de cultivo fueron 15 días en oscuridad y posteriormente fotoperíodo de 16/8h (luz/oscuridad) y ±25 °C.

Cuantificación de fenoles totales

Se utilizaron semillas colectadas durante la temporada 2011 y se definió en que tejido seminal se iba a cuantificar los fenoles (**Tabla 3.1**). La semilla completa comprendió al tegumento, endospermo y embrión.

Tabla 3.1. Tejido vegetal seminal de *Gomortega keule* utilizado en la extracción de fenoles totales.

Temporada	Tejido vegetal
-	Ctrl: Control (Hoja)
Anterior a 2011	Sc: Semilla completa
	Tg: Tegumento
	Sstg: Semilla sin tegumento
2011	Sc: Semilla completa
	Tg: Tegumento
	Sstg: Semilla sin tegumento

La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante la prueba colorimétrica de Folin-Ciocalteu descrita por Waterhouse (2002), adaptada a muestras de pequeño volumen. Se pesó 200 mg del material vegetal, que se dispuso en un tubo Eppendorf color ámbar y se agregó 2 mL de metanol al 100%. A continuación, se trituró cada muestra con ayuda de una varilla de plástico y se llevaron a agitación constante por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) durante 10 min y se extrajo el sobrenadante de cada tubo disponiéndolo en un nuevo tubo Eppendorf color ámbar, denominado extracto.

Posteriormente se tomaron 20 μL de extracto y se colocaron en un tubo Eppendorf color ámbar de 2 mL, se le agregó 1.580 μL de agua destilada estéril y 100 μL de reactivo Fenol según Folin-Ciocalteu (Merck[®]), se mezclaron los líquidos y se incubaron por 8 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregó 300 μL de Na_2Ca_3 (Merck[®]) al 20% diluido en agua (p/v), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Se realizaron 4 extracciones por tratamiento. Finalmente, se midió la concentración de fenoles en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Spectronic Genesys 2) a 765 nm. El contenido total de fenoles se expresó en equivalentes de ácido gálico (Merck[®]) (mg L^{-1}). La curva patrón se preparó con una solución madre de ácido gálico de 5.000 mg L^{-1} . Para la calibración de la curva se prepararon diluciones sucesivas de 100, 200, 300, 400 y 500 mg L^{-1} .

Cuantificación de GA_3 , AIA y ABA

La extracción de GA_3 , AIA y ABA libre se realizó según la metodología propuesta por Kamal y Bano (2008) con algunas modificaciones. Se utilizaron semillas colectadas durante la temporada 2011. El control correspondió a embriones de *G. keule* en proceso de germinación *in vitro* (Tabla 3.2) y la semilla completa comprendió tegumentos, endospermo y embrión.

Tabla 3.2. Descripción del material vegetal utilizado para la cuantificación de GA_3 , AIA y ABA en semillas de *Gomortega keule* provenientes de dos temporadas.

Temporada	Material vegetal
-	Ctrl: Control
Anterior 2011	Eb: Embriones
	En: Endospermo
	Sc: Semilla completa
2011	Eb: Embriones
	En: Endospermo
	Sc: Semilla completa

La extracción de cada una de las hormonas se realizó utilizando 50 y 100 mg de material vegetal. En ambos casos se congeló el tejido vegetal con nitrógeno líquido y posteriormente se trituró. Luego, se agregó 10 mL de metanol al 80% en agua destilada (v/v) y se mantuvo en agitación constante a 150 rpm a 4 °C durante 12 h. Transcurrido este período se filtró la muestra usando una jeringa y filtros desechables de 0,22 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Millex[®]-Merck Millipore) y se dispuso en un balón de vidrio de 25 mL. Posteriormente, se concentró la muestra en rotavapor a 50 °C por aproximadamente 15 a 20 min. Luego se agregó 5 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 2,0 con HCl (1N) y se efectuó una nueva extracción con 10 mL de acetato de etilo (Merck[®]). La separación de la fase acuosa y orgánica se repitió tres veces. Para eliminar los residuos acuosos y contaminantes de la fase orgánica se adicionó una punta de espátula de sulfato de sodio (Na₂SO₄). Posteriormente, la fase orgánica obtenida, que contiene GA₃, AIA y ABA, fue nuevamente concentrada en un rotavapor a 50 °C hasta obtener un residuo completamente seco. Finalmente el residuo fue resuspendido en 300 µL de metanol absoluto y mantenido en frío (-80 °C) hasta la cuantificación, denominado extracto.

La curva standard de GA₃, AIA y ABA se preparó con soluciones de GA₃ Merck[®], AIA Merck[®] y ABA Sigma[®] (99% de pureza) a una concentración de 25 µg mL⁻¹. Para la calibración de la curva se prepararon diluciones sucesivas de 1,5, 2,5, 3,5, y 4,5 µg mL⁻¹ de GA₃; 1,5, 2,5, 3,5, y 4,5 µg mL⁻¹ de AIA; 1,0, 2,0, 3,0 y 4,0 µg mL⁻¹ de ABA.

El extracto resuspendido en 300 µL de metanol absoluto en la fase de extracción se filtró utilizando un filtro desechable con 0,22 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Millex[®]-Merck Millipore) antes de realizar la cuantificación en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Shimadzu, con detector con arreglo de diodo SPD-M10Av, sistema controlador SCL-10Avp y bomba FCV-10ALvp. Para separar GA₃, AIA y ABA se usó una columna HPLC BioRad RP-18 Lichrospher[®] 100 (250 mm) a una temperatura de 30 °C, con un flujo de 0,8 mL min⁻¹ y eluidas en fase móvil de metanol, ácido acético y agua (30:1:70). El contenido hormonal se expresó en µg g⁻¹ de PF (peso fresco) de material vegetal.

Histoquímica

Se utilizaron semillas de *G. keule* extraídas de frutos maduros colectados durante la temporada 2011. Para la descripción histoquímica de la semilla de *G. keule* se utilizaron semillas completas y para describir la movilización de sustancias de reserva durante la germinación, se emplearon embriones cultivados en condiciones *in vitro* según lo descrito anteriormente, sin la adición de GA₃. Los embriones germinados *in vitro* fueron colectados cada 10 días durante 60 días (T0, T10, T20, T30, T40, T60). Todas las muestras fueron fijadas en 70% (v/v) de FAA (5% formaldehído, 5% ácido acético, 90% alcohol, v/v/v) durante 48 h y posteriormente mantenidas en etanol al 70% (v/v) hasta su deshidratación (Johansen 1940). A continuación, el material fue incluido en metacrilato (Historesina Leica) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante del kit. El material incluido fue cortado longitudinalmente en micrótopo rotativo de avance automático (Modelo RM2155, Leica Microsystems Inc.) con navajas de vidrio descartables a 10 µm de espesor. Los cortes fueron sometidos a distintas pruebas histoquímicas y se montaron con resina sintética (Permount).

Para detectar almidones se utilizó lugol (Johansen 1940), xylydine ponceau para proteínas totales (Vidal 1970), Sudan Black B para lípidos totales (Pearse 1972), cloreto de fierro III para compuestos fenólicos totales (Johansen 1940) y azul de toluidina pH 4,0 para obtener un contraste metacromático (O'Brien *et al.* 1964). La preparación y procedimiento de las pruebas histológicas se realizó según Ventrella *et al.* (2013).

Para la evaluación se utilizó un control blanco, material sin aplicación de reactivo o colorante, con el fin de determinar una posible pigmentación natural de algunos compuestos que podría interferir en el resultado de la coloración obtenido con los diferentes reactivos (Ventrella *et al.* 2013). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical Olympus AX-70) equipado con un sistema registrador de imágenes. Se evaluó cualitativamente de acuerdo a la reacción observada en cada prueba.

Los análisis histoquímicos se realizaron en el Laboratorio de Anatomía Vegetal perteneciente al Departamento de Biología Vegetal de la Universidad Federal de Viçosa, Brasil.

Diseño Experimental

Germinación *in vitro*. El diseño estadístico utilizado fue completamente aleatorio. La unidad experimental consistió en 4 tubos con 1 embrión cada uno y 6 repeticiones. A los 30 días de iniciado el ensayo se evaluó el porcentaje de germinación de los embriones considerando la emergencia de la radícula y a los 75 días el porcentaje de conversión a plántula. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia $p \leq 0,05$. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS 9.2.

Extracción de fenoles totales. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. El diseño utilizado fue completamente aleatorio y con el software estadístico SAS, versión 9.2 se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia de medias se determinó a través del test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Extracción GA_3 , AIA y ABA. Se realizaron 5 extracciones por tratamiento y 3 lecturas por muestra en HPLC. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se realizó mediante el test de Tukey al nivel $p \leq 0,05$. Se utilizó el software estadístico SAS, versión 9.2.

Histoquímica. El diseño fue completamente al azar y se tomaron 3 muestras por material. De cada muestra incluida en metacrilato se realizaron 3 láminas conteniendo 8 cortes cada una.

RESULTADOS

Germinación in vitro

La coloración de los embriones después de la aplicación del test de TZ demostró que las semillas de temporadas anteriores a 2010 no eran viables (**Figura 3.1A**). Mientras que, los embriones de semillas que estaban en los frutos de la temporada eran viables (**Figura 3.1B**). Por esta razón, los ensayos de germinación *in vitro* se realizaron utilizando sólo los embriones de esta última fuente.

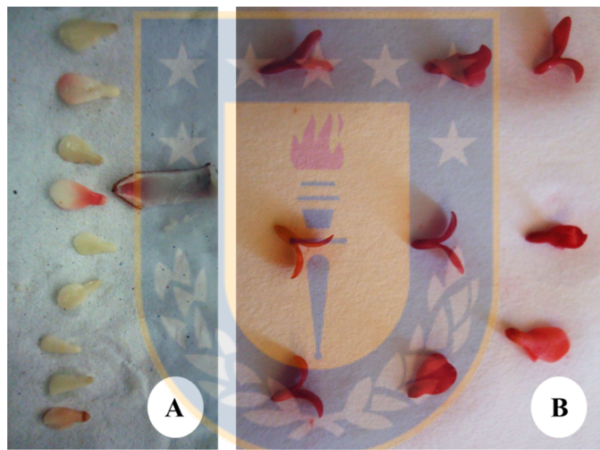


Figura 3.1. Test de viabilidad de embriones de *Gomortega keule*. A. Embriones provenientes de semillas de temporadas anteriores a 2010. B. Embriones provenientes de frutos de la temporada 2010.

A los 30 días de iniciado el ensayo se observó que no hubo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de GA₃ utilizadas para promover la germinación ($p= 0,5578$) (**Tabla 3.3**). Transcurridos 75 días, la conversión a plántula tampoco fue diferente entre los tratamientos aplicados ($p= 0,6698$) (**Tabla 3.3**). Sin embargo, al tratarse de una especie con serios problemas de conservación, la utilización de GA₃ en una concentración de 200 mg L⁻¹ permitió incrementar el porcentaje de plántulas (29,17%).

Tabla 3.3. Valores promedios de germinación y conversión a plántula, en condiciones *in vitro*, de *Gomortega keule* en respuesta a la aplicación de distintas concentraciones de GA₃.

GA ₃ (mg L ⁻¹)	Germinación ⁽¹⁾ (%)	Conversión a plántula ⁽²⁾ (%)
0	25,00 n.s.	16,57 n.s
50	20,83 n.s.	12,50 n.s
100	33,33 n.s	20,83 n.s
200	37,50 n.s.	29,17 n.s

n.s.: no significativo ($p \leq 0,05$). (1): evaluado a los 30 días, (2): evaluado a los 75 días.

Macro-morfológicamente, la mayoría de los embriones de *G. keule* introducidos *in vitro* presentaron pigmento fotosintético (clorofila) en la zona cotiledonar. Sin embargo, después de 30 días se observó una oxidación de dichos tejidos (**Figura 3.2A**). Otra característica recurrente, incluso en embriones que germinaron, fue la despigmentación del borde externo del cotiledón (**Figura 3.2B**). A los 100 días se obtuvo plántulas con características fenotípicas normales (**Figura 3.1C**). Sin embargo, se observó una lenta elongación del tallo principal, alcanzando una longitud de 3 mm a los 100 días.

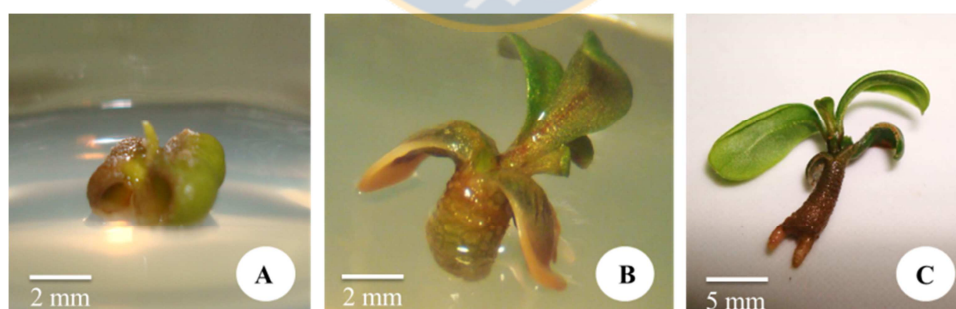


Figura 3.2. Germinación *in vitro* de embriones de *Gomortega keule*. A. Oxidación de cotiledones a los 30 días de iniciada la germinación asincrónica. B. Plántula de *Gomortega keule* con cotiledones con bordes despigmentados a los 75 días. C. Plántula a los 100 días.

Cuantificación de fenoles

El contenido de fenoles totales en semillas de *G. keule* arrojó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los diferentes tejidos vegetales utilizados. La mayor cantidad de fenoles totales se detectó en el control (hojas de *G. keule*) con $1.524,16 \text{ mg L}^{-1}$ equivalentes de ácido gálico. Las cubiertas seminales (Tg) de las semillas de la temporada 2011 presentaron un mayor contenido de fenoles totales en comparación al proveniente de temporadas anteriores a 2011 y semillas completas (Sc) de la temporada 2011. No fue posible detectar fenoles totales en semillas sin tegumentos (Sstg) de ninguna de las temporadas (**Figura 3.3**).

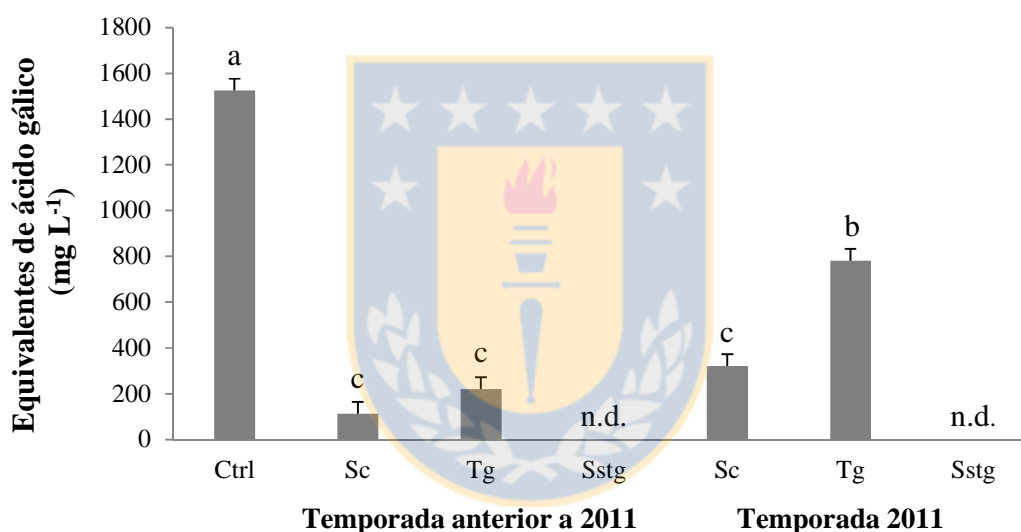


Figura 3.3. Contenido promedio de fenoles totales (expresados en equivalentes de ácido gálico (mg L^{-1})) en diferentes tejidos vegetales en semillas de *Gomortega keule* de temporada anterior a 2011 y temporada 2011. Ctrl: Control (hoja queule), Sc: semilla completa, Tg: tegumento; Sstg: semilla sin tegumento. n.d.: no detectable. Letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuantificación de GA_3 , AIA y ABA

Cuando se empleó 50 mg de muestra vegetal no fue posible detectar hormonas por la metodología utilizada. La cuantificación de hormonas sólo se logró al utilizar 100 mg de muestra. No fue posible determinar la presencia de GA_3 , AIA y ABA en los tejidos seminales

de temporadas anteriores a 2011 mediante el análisis con HPLC. Sin embargo, tejidos seminales provenientes de semillas de frutos maduros de la temporada 2011 mostraron diferencias significativas para GA₃ (p = 0,0369), AIA (p < 0,0001) y ABA (p = 0,0008). La concentración promedio de GA₃ fue similar en el control (Ctrl), en el endospermo (En) y en la semilla completa (Sc) de la temporada 2011. Por otro lado, el contenido en el embrión (Eb) de la temporada 2011 no fue distinto al Ctrl y endospermo (En) de la temporada 2011 (**Tabla 3.4**). En el caso de AIA, la mayor concentración promedio se encontró en el Ctrl y las menores concentraciones, aunque similares entre sí, en embriones (Eb), endospermo (En) y semilla completa (Sc) de la temporada 2011. Finalmente, la concentración de ABA promedio fue mayor en el Ctrl, y diferente a la semilla completa (Sc) y el endospermo (En). Este último fue igual al contenido en los embriones (Eb) de la temporada 2011 (**Tabla 3.4**).

Tabla 3.4. Concentración promedio de GA₃, AIA y ABA (µg g⁻¹ PF) en semillas y embriones cigóticos de *Gomortega keule* provenientes de dos temporadas determinada mediante análisis con HPLC.

Temporada	Material vegetal	Concentración promedio (µg g ⁻¹ PF)			Relación hormonal
		GA ₃	AIA	ABA	GA:ABA
-	Ctrl	24,00 ab	29,60 a	17,40 a	1,38
Anterior a 2011	Eb	n.d.	n.d.	n.d.	-
	En	n.d.	n.d.	n.d.	-
	Sc	n.d.	n.d.	n.d.	-
2011	Eb	5,33 b	1,73 b	3,69 c	1,4
	En	19,67 ab	3,40 b	6,70 bc	2,9
	Sc	25,00 a	4,62 b	11,26 b	2,2

Ctrl: control (embriones cigóticos en proceso de germinación *in vitro*), Eb: embriones, En: endosperma, Sc: semilla completa, n.d.: no detectable. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según test de Tukey (p ≤ 0,05).

Se encontró una alta relación, entre las hormonas GA:ABA en todos los tratamientos en que la técnica HPLC permitió detectarlas (**Tabla 3.4**).

Histoquímica

Caracterización de semillas de Gomortega keule

Macroanatómicamente, la semilla de *G. keule* está protegida externamente por el endocarpio del fruto, el cual tiene una forma globosa u oval, siendo leñoso y extremadamente duro (**Figura 3.4A**). La semilla presenta forma ovalo-lanceolada, aplanada con tegumento grueso color marrón (**Figura 3.4B**). Se distinguió los diferentes tejidos de la semilla: cubierta seminal, endospermo y embrión. Por tanto, la semilla es albuminada, con abundante endospermo de color blanquecino que ocupa la mayor proporción de la semilla (**Figura 3.4C**). El embrión es linear, simétrico, con dos cotiledones y polo apical y radicular diferenciado (**Figura 3.4D**).

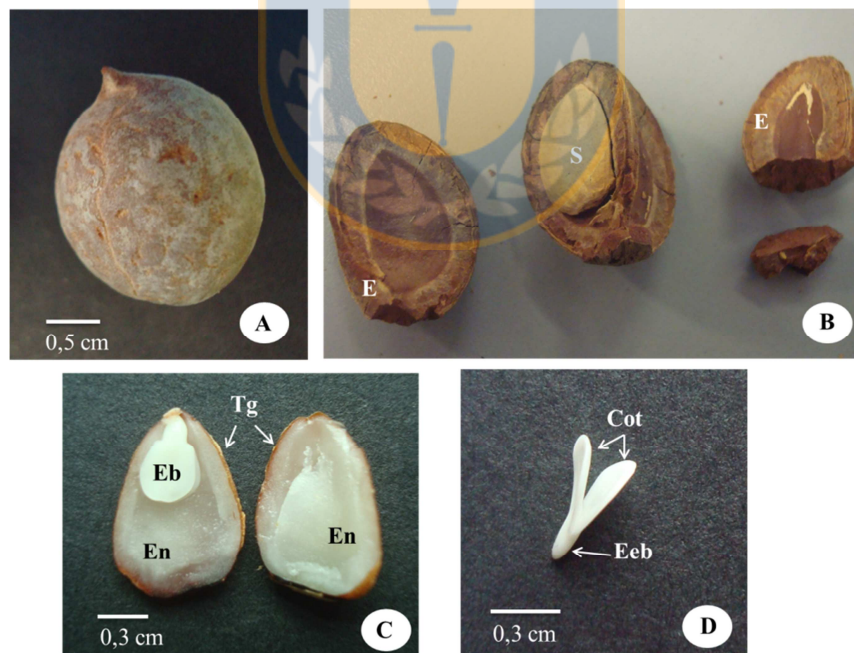


Figura 3.4. Macromorfoanatomía de la semilla de *Gomortega keule*. A. Vista externa de la semilla (endocarpio). B. Semilla al interior del endocarpio. C. Corte longitudinal de la semilla, se observa los tegumentos, endospermo y embrión. D. Embrión. E: endocarpio, S: semilla, Tg: tegumento, En: endospermo, Eb: embrión, Cot: cotiledones, Eeb: eje embrionario.

Al observar cortes histológicos de semillas de *G. keule* (**Figura 3.5A**) se distinguieron los principales tejidos seminales, tegumento (Tg), endospermo (En) y embrión (Em). La cubierta seminal está compuesta por dos capas espesas y oblicuas, una externa (Te) y otra interna (Ti) (**Figura 3.5B**), en que se localizan sustancias fenólicas reveladas por la tinción con cloreto de fierro III (**Figura 3.5C**) y con la tinción con azul de toluidina (**Figura 3.5D-E**). La capa exterior contiene compuestos fenólicos estructurales, incluidos en una pared lignificada, semejante a las de las células del xilema. La capa interior, en cambio, almacena los compuestos fenólicos al interior del protoplasto (**Figura 3.5E**).

En el embrión y endospermo se encuentran almacenados, principalmente, lípidos, proteínas y en menor proporción, almidón. Los lípidos son la principal sustancia de reserva en semillas de *G. keule* (**Tabla 3.5**), observándose en forma abundante en las células del endospermo y embrión. Se evidenció mayor cantidad de proteínas en el endospermo que en el embrión. Mientras que, el almidón se encontró en bajas proporciones en ambas estructuras anteriormente mencionadas (**Tabla 3.5**). En la semilla seccionada se pudo visualizar mediante la tinción con Sudan Black B gotas de aceites presentes en el endospermo. Los cuerpos lipídicos se visualizan como esferas de 25-30 μm de diámetro, ocupando la mayor proporción de las células con distribución uniforme en el endospermo y embrión (**Figura 3.5F e I**). Las proteínas totales se evidenciaron mediante el test con xylidine ponceau, apareciendo estructuras de forma y tamaño variable, de 5-25 μm de diámetro, globosas o angulares, denominadas cuerpos proteicos (**Figura 3.5G y J**). El almidón fue detectado mediante la tinción con lugol y se determinó baja cantidad en las células del embrión, conformando granos de almidón de 2-5 μm (**Figura 3.5H**). Aparentemente, el endospermo contiene una mayor cantidad de proteína que el embrión, conformando cuerpos proteicos cristalizados (**Figura 3.5J**).

Tabla 3.5. Presencia de diferentes compuestos visualizados a través de pruebas histoquímicas específicas en los diferentes tejidos de la semilla de *Gomortega keule*.

Estructura	Prueba histoquímica	Reacción	Compuesto visualizado
Tegumento	Cloreto de fierro III	+	Compuestos fenólicos
	Azul de toluidina	+	Compuestos fenólicos (lignina y taninos)
	Lugol	-	-
	Sudan Black B	-	-
	Xylidine ponceau	-	-
Endosperma	Cloreto de fierro III	-	-
	Azul de toluidina	+	Compuestos fenólicos (lignina y taninos)
	Lugol	+	Almidón
	Sudan Black B	+++	Lípidos totales
	Xylidine ponceau	++	Proteínas totales
Embrión	Cloreto de fierro III	-	-
	Azul toluidina	+	Compuestos fenólicos (lignina y taninos)
	Lugol	+	Almidón
	Sudan Black B	+++	Lípidos totales
	Xylidine ponceau	+	Proteínas totales

+: presente, -: ausente, el número de + indica la intensidad de la reacción.

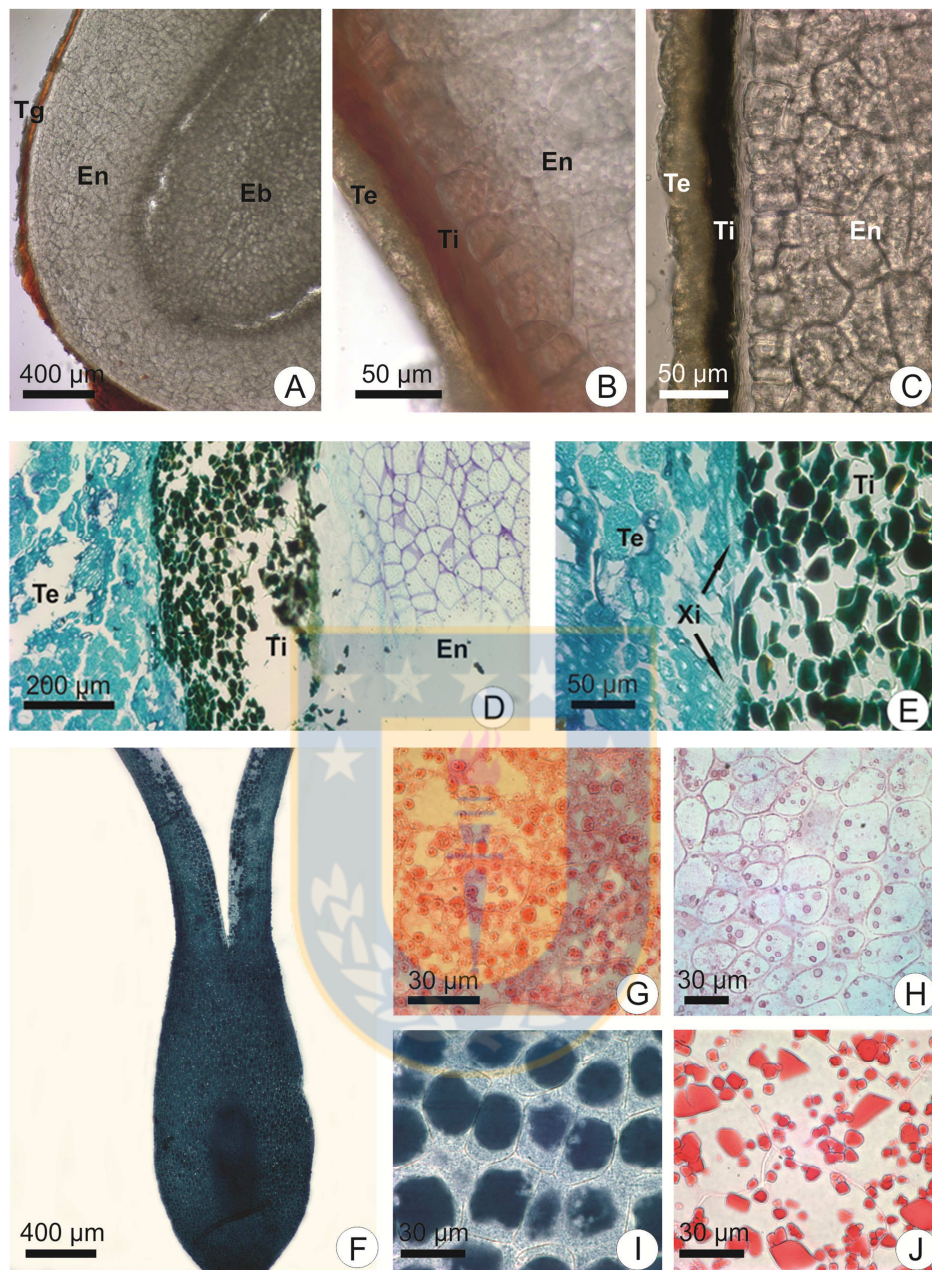


Figura 3.5. Caracterización histoquímica en cortes longitudinales de semillas de *Gomortega keule*. **A-B.** Caracterización blanco o control, en el cual la semilla no fue expuesta a ningún reactivo. **A.** Vista general de la semilla, distinguiéndose tegumento, embrión y endospermo. **B.** Detalle del tegumento y endospermo, obsérvese coloración natural marrón del tegumento interno, endospermo denso por presencia de material de reserva. **C.** Tinción con cloreto de Fe III con reacción positiva del tegumento interno por presencia de compuestos fenólicos. **D.** Vista general del tegumento y endospermo teñido con azul de toluidina. **E.** Detalle de los tegumentos externos e internos teñido con azul de toluidina. Tegumento externo formado por células con paredes gruesas, presencia de elementos conductores del xilema. **F.** Vista general del embrión teñido con Sudan Black B. **G.** Cotiledón: reacción positiva de xylidine ponceau indicando presencia de proteínas como material de reserva. **H.** Cotiledón: reacción positiva de lugol indicando presencia de gránulos de almidón. **I.** Cotiledón: reacción positiva a Sudan Black B, indicando presencia de lípidos como material de reserva. **J.** Endospermo coloreado con xylidine ponceau, cuerpos proteicos en forma de cristales.

Tg: tegumentos, En: endospermo, Eb: embrión, Te: tegumento externo, Ti: tegumento interno, Xi: xilema.

Movilización de las reservas en los cotiledones durante la germinación in vitro

En los cortes histológicos de cotiledones, teñidos con Sudan Black B al inicio del proceso de germinación, se observaron cuerpos lipídicos que ocupan casi por completo el espacio celular (**Figura 3.6A**). Estos fueron consumiéndose lentamente durante los primeros 30 días desde iniciado el ensayo de germinación *in vitro* (T0-T10-T20-T30) (**Figura 3.6A-D**). En T40 se observó un leve consumo (**Figura 3.6E**). Posteriormente, en T60 se evidenció una reducción de esta sustancia de reserva (**Figura 3.6F**).

Las proteínas se detectaron mediante la tinción con xylidine ponceau y en T0 se observó cuerpos proteicos de 3-5 μm , distribuidos uniformemente al interior de las células del cotiledón (**Figura 3.7A**). En T10, estos cuerpos proteicos comenzaron a consumirse (**Figura 3.7B**), siendo más evidente su utilización en T20 (**Figura 3.7C**). Y se mantuvo hasta T40 (**Figura 3.7D-E**), reanudándose en T60.

De acuerdo a la tinción con lugol realizada a los cortes histológicos de cotiledones, durante los primeros 60 días desde la introducción *in vitro*, no se evidenció movilización o consumo de almidón. En general, los gránulos de almidón fueron muy pequeños y poco visibles (**Figura 3.8A-F**).

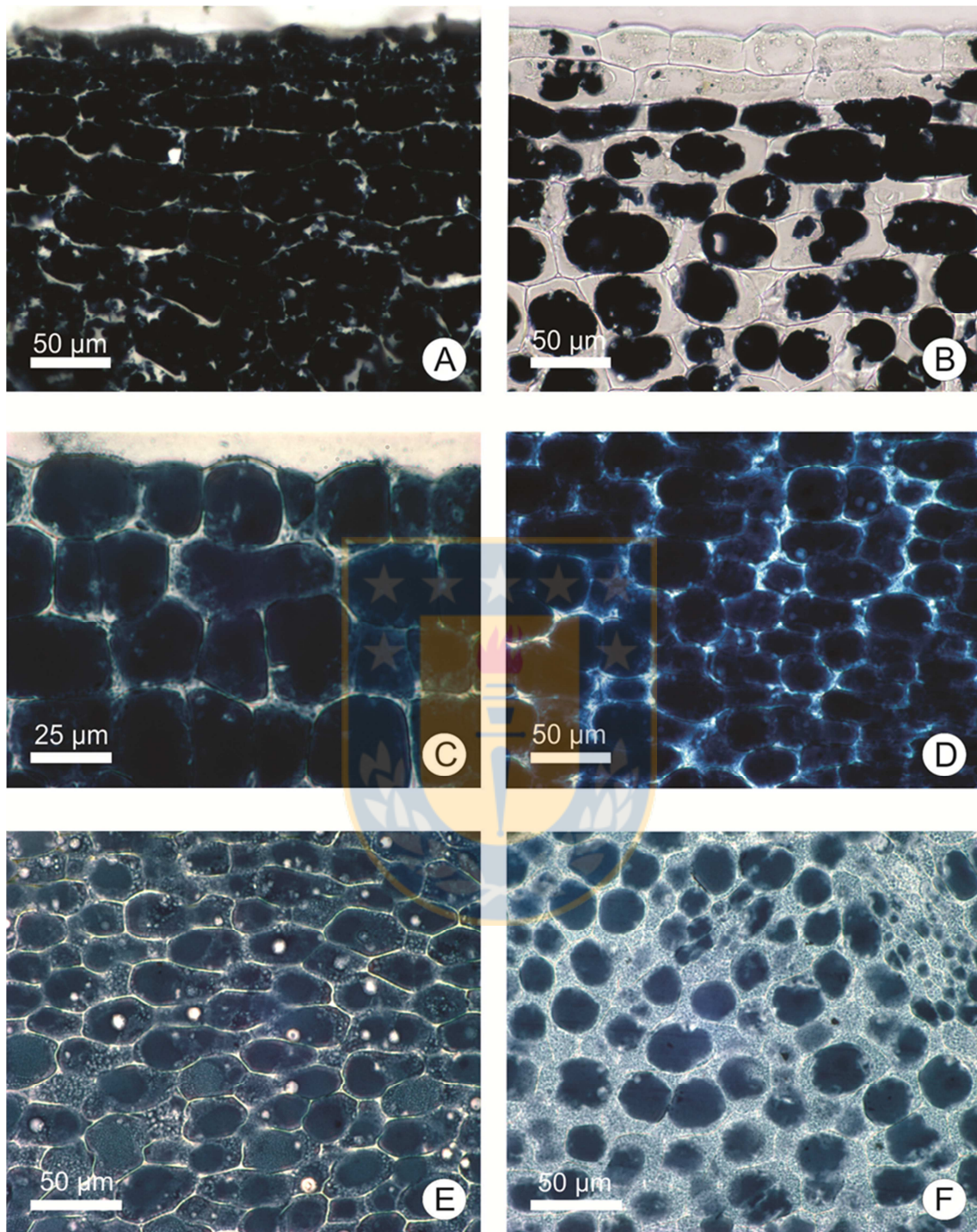


Figura 3.6. Sección longitudinal de cotilodones de *Gomortega keule* durante la germinación *in vitro* teñidos con Sudan Black B para la identificación de lípidos totales. **A.** (T0) 0 día, **B.** (T10) 10 días, **C.** (T20) 20 días, **D.** (T30) 30 días, **E.** (T40) 40 días, **F.** (T60) 60 días desde la introducción en medio de cultivo WPM.

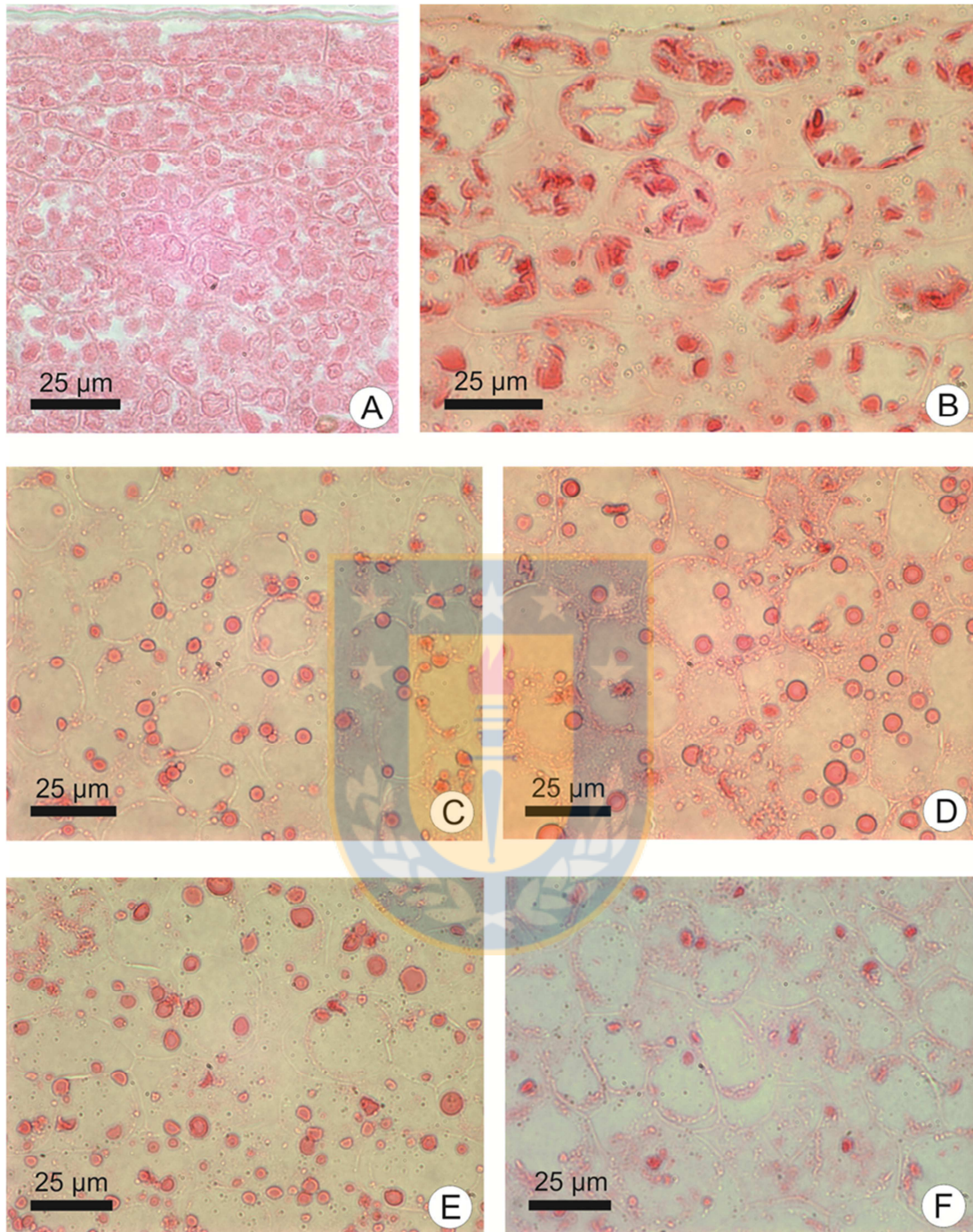


Figura 3.7. Sección longitudinal de cotiledones de *Gomortega keule* durante la germinación *in vitro* teñidos con xylydine ponceau para la identificación de proteínas. **A.** (T0) 0 día, **B.** (T10) 10 días, **C.** (T20) 20 días, **D.** (T30) 30 días, **E.** (T40) 40 días, **F.** (T60) 60 días desde la introducción en medio de cultivo WPM.

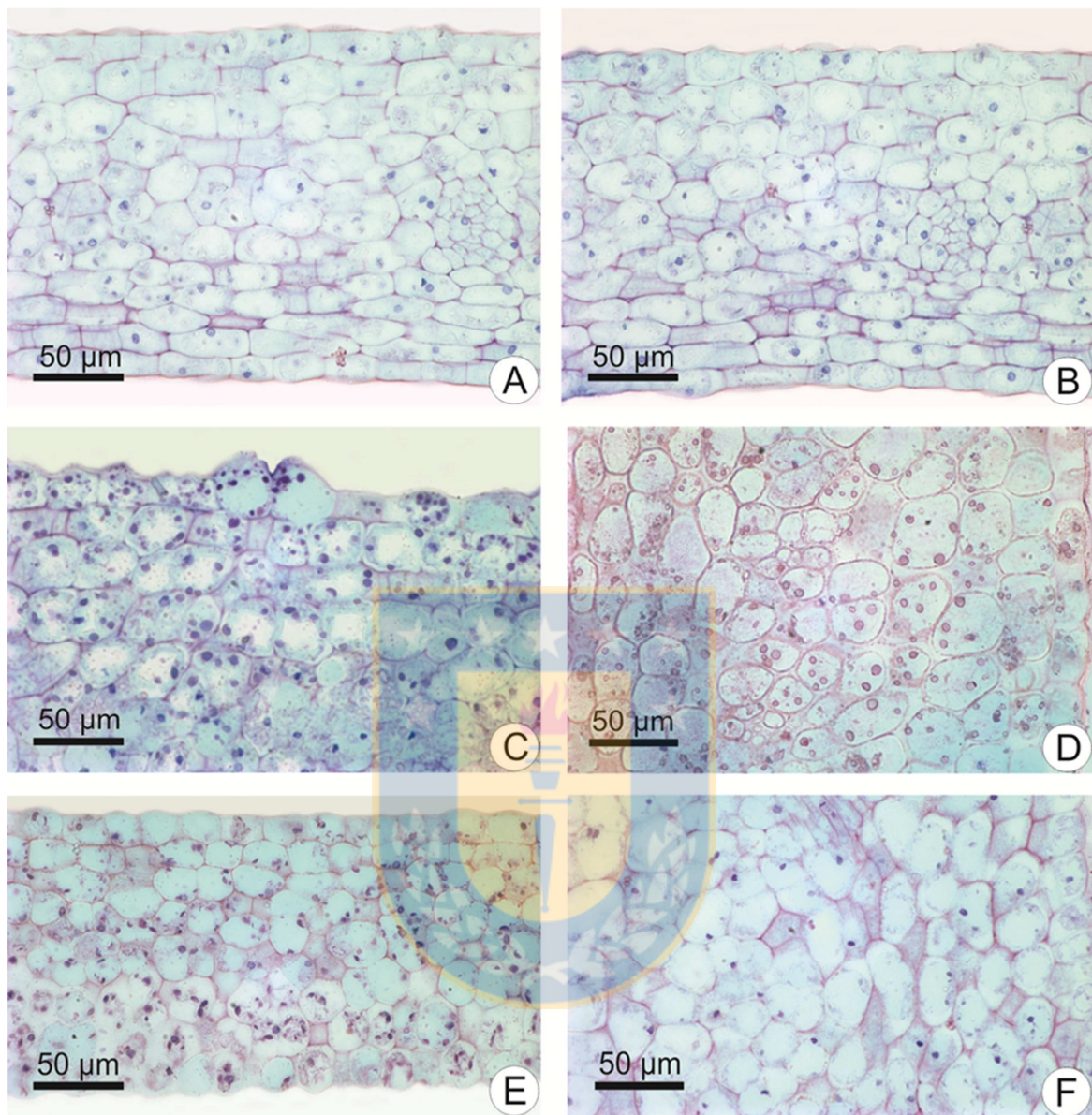
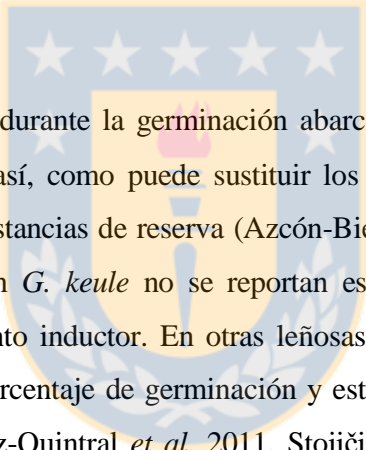


Figura 3.8. Sección longitudinal de cotiledones de *Gomortega keule* durante la germinación *in vitro* teñidos con Lugol para la identificación de almidón. **A.** (T0) 0 día, **B.** (T10) 10 días, **C.** (T20) 20 días, **D.** (T30) 30 días, **E.** (T40) 40 días, **F.** (T60) 60 días desde la introducción en medio de cultivo WPM.

DISCUSIÓN

Germinación in vitro

La utilización de GA₃ en los tratamientos de germinación *in vitro* de *G. keule* aumentó el número de plántulas obtenidas (**Tabla 3.3**) aunque no fueron estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$). Esto es beneficioso, ya que se obtiene una mayor cantidad de material vegetal para su micropropagación. No obstante, la germinación observada fue asincrónica en el desarrollo de sus polos (apical y radicular), similar a lo descrito por Kong *et al.* (2012). Además, se visualizó tejido despigmentado por el borde de los cotiledones, infiriendo una posible lesión celular.



El rol que desempeña la GA₃ durante la germinación abarca un amplio rango de procesos fisiológicos en la semilla. Es así, como puede sustituir los requerimientos de luz o frío o promover la degradación de sustancias de reserva (Azcón-Bieto y Talón 2000, Taiz y Zeiger 2006, Bewley *et al.* 2013). En *G. keule* no se reportan estudios de germinación *in vitro* utilizando GA₃ como tratamiento inductor. En otras leñosas, la utilización de GA₃ *in vitro* incrementa positivamente el porcentaje de germinación y estimula el desarrollo del embrión (Samuel *et al.* 2009, Bojórquez-Quintral *et al.* 2011, Stojičić *et al.* 2012). Sin embargo, el tratamiento con GA₃ en algunos casos puede ser ineficaz, como ocurre en *Boswellia serrata*, un árbol en peligro de extinción (Ghorpade *et al.* 2010). Cabe señalar que, Muñoz- Concha y Davey (2011) introdujeron, en condiciones *in vitro*, más de 400 embriones cigóticos de *G. keule* obteniendo sólo en 6 de ellos brotes para iniciar el cultivo, de los cuales sólo 2 permitieron la proliferación de brotes.

El tiempo requerido en este estudio para la germinación *in vitro* de embriones de *G. keule* fue menor que los reportados *ex vitro*. Los estudios realizados *ex vitro* en la especie en estudio, aplicando GA₃ en dosis de 10 g L⁻¹ y 1g L⁻¹ a la semilla reportaron una germinación de 17,5% después de 5 meses y 21% de emergencia radicular al cabo de 3 semanas, respectivamente

(Orellana 1996, Espejo *et al.* 2000). Por otro lado, Morales y Calquín (2004), eliminando el endocarpio y sembrando las semillas de *G. keule* en compost, obtuvieron un 2% de germinación luego de 14 meses y 42% a los 18 meses. Adicionalmente, es probable que una mayor concentración de GA₃ sea necesaria para obtener un mayor porcentaje de germinación, considerando, además, que las semillas provenían de frutos maduros de la misma temporada.

Cuantificación de fenoles totales

La cantidad de fenoles totales en semillas de *G. keule* provenientes de temporadas anterior a 2011 fue menor que en las semillas extraídas de los frutos maduros de la temporada 2011 (**Figura 3.3**). Esto guardaría relación al período que se mantuvieron en el suelo, produciéndose un proceso de estratificación natural. Los compuestos fenólicos presentes en la cubierta seminal de *G. keule* podrían inhibir la germinación. Estos fenoles se relacionan con la inhibición de la germinación, al impedir el intercambio gaseoso (Baskin y Baskin 1998, Azcón-Bieto y Talón 2000, Taiz y Zeiger 2006). Similar evidencia se encontró en la especie endémica y en peligro de extinción *Picconia azorica*, cuya cubierta seminal y endosperma con embrión contienen menor concentración de fenoles, expresado en equivalentes de ácido gálico, en comparación a *G. keule* y cuyo porcentaje de germinación alcanza el 48% (Martins *et al.* 2012). En otras especies, tales como *Coffea arabica*, *Carica papaya* y *Palicourea rigida*, los compuestos fenólicos también contribuyen a su lenta germinación y dormancia (Pereira *et al.* 2002, Tokuhisa *et al.* 2007, Inácio *et al.* 2013). Estos compuestos actuarían inhibiendo la elongación celular o consumiendo oxígeno durante el proceso de germinación, restringiendo su disponibilidad al embrión (Bewley *et al.* 2013). A pesar de lo expuesto, los compuestos fenólicos de las semillas son indispensables como mecanismo de defensa frente a agentes patógenos (Lattanzio *et al.* 2006, Gallagher *et al.* 2010).

Cuantificación de GA₃, AIA y ABA

Aparentemente las semillas de temporadas pasadas a 2011 no contenían hormonas (**Tabla 3.4**). Este resultado pudo deberse a que las semillas que permanecieron en la cubierta vegetal

del suelo por más de una temporada ya no eran viables, hecho que fue confirmado por test de TZ (**Figura 3.1A**).

Los resultados mostraron que la relación GA:ABA fue alta en todos los tejidos embrionarios usados (**Tabla 3.4**). A pesar de ello, los niveles de germinación de *G. keule* fueron bajos. Esto podría deberse a que las cantidades endógenas de las hormonas cuantificadas no es la óptima para gatillar el proceso de germinación de la especie o tal vez, no ocurre una translocación adecuada al embrión en el tiempo oportuno (Azcón-Bieto y Talón 2000, Bewley *et al.* 2013). La literatura menciona al ABA como un importante inhibidor de la germinación, ya que induce y mantiene la dormancia. Por otro lado, el balance interno que existe entre GA:ABA regula la germinación o dormición. Así, semillas con una baja relación de GA:ABA permanecerían dormantes, en cambio una mayor relación GA:ABA promovería la germinación (Kucera *et al.* 2005, Hilhorst *et al.* 2010, Bewley *et al.* 2013). Además, la translocación de estas hormonas se puede ver limitada por altas concentraciones de lípidos y compuestos fenólicos, detectados en los cortes histológicos de semillas de esta especie (**Figura 3.5C-E y 3.6**) (Vilegas *et al.* 1991, Heo *et al.* 2004).

Histoquímica

Los análisis histoquímicos realizados en cortes histológicos de la semilla de *G. keule* revelaron que el tegumento seminal (**Figura 3.5C-E**) está formado por dos capas, una externa y otra interna, similar a lo reportado por Heo *et al.* (2004) y que corresponderían a la testa y el tegmen. Según Massa y Sartori (2006), una semilla se denomina testal cuando su principal capa de tejido mecánico está presente en la epidermis externa y exotestal cuando la capa externa presenta células esclerosadas y lignificadas. En consecuencia, de acuerdo a lo observado en los cortes realizados, la semilla de *G. keule* es exotestal, coincidiendo con lo reportado por Heo *et al.* (2004) y contradiciendo a lo expuesto por Doweld (2001), quien la clasifica como endotestal-endotégmica. Los estudios anatómicos e histológicos previos realizados a la semilla de *G. keule* sólo se concentraron en clarificar su posición sistemática (Doweld 2001, Heo *et al.* 2004).

Las principales sustancias de reserva en las células del embrión y endosperma de *G. keule* son lípidos y proteínas, en forma de cuerpos lipídicos y proteicos, siendo escaso el almidón (**Figura 3.5F-J**). Esto último sería una característica propia de las semillas que contienen mayor cantidad de lípidos y proteínas (Barclay y Earle 1974). Doweld (2001) y Heo *et al.* (2004) también informan que las semillas de *G. keule* contienen gran cantidad de lípidos. Los triglicéridos son los principales lípidos presentes en las semillas y se encuentran almacenados en cuerpos lipídicos (Bewley *et al.* 2013).

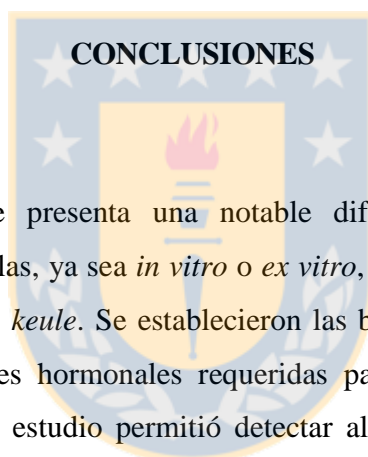
En las células de semillas de *G. keule* las proteínas se encuentran en cuerpos proteicos cristaloides (**Figura 3.5J**). Según Lott (1981), si en las células de las semillas se encuentran cuerpos proteicos de estructura angular, tipo cristaloides, corresponden a cuerpos proteicos deshidratados. De allí que el endospermo de *G. keule* se deshidrataría rápidamente al ser extraídas del endocarpio. El embrión, por su parte, presentó cuerpos proteicos globoides, lo cual podría corresponder a reservas de fitina (Lott 1981) y la presencia de cuerpos cristaloides indicaría que el embrión también se encontraba en proceso de deshidratación.

Durante la germinación *in vitro* de *G. keule*, la presencia de lípidos en los cotiledones disminuyó lentamente durante 60 días de evaluación (**Figura 3.6**). En *Caesalpinia peltophoides*, *Passiflora edulis* y *Sterculia urens* ocurre algo similar pero en un menor periodo de tiempo (Corte *et al.* 2008, Satyanarayana *et al.* 2011, Tozzi y Takaki 2011). En otras especies la cantidad de lípidos permanece estable en la etapa temprana de la germinación y es consumido tardíamente (Muto y Beevers 1974, Lopes *et al.* 2013).

En *G. keule* se observó que las proteínas se utilizaron hasta los 10 días, posteriormente no varió su contenido, reanudándose el consumo a los 60 días (**Figura 3.7**). Tal vez, el lento crecimiento de la especie justificaría una utilización posterior a los 60 días. En otras especies se indica que el contenido de proteínas aumenta durante los primeros días de germinación y posteriormente disminuyen por consumo. Esto, producto de la mayor síntesis de proteínas

requeridas para el mantenimiento celular (Corte *et al.* 2008, Satyanarayana *et al.* 2011, Bewley *et al.* 2013, Lopes *et al.* 2013).

Los gránulos de almidón en los cotiledones de *G. keule* durante la germinación *in vitro* fueron poco visibles y no se evidenció consumo (**Figura 3.8**). Es posible que, debido a la mayor cantidad de lípidos y proteínas en los cotiledones, éstos impidieran la visualización del almidón, como se detectó en otras especies por Gallão *et al.* (2006) y Lopes *et al.* (2011). Mientras que en *Euphorbia heterophylla*, los carbohidratos acumulados en las células fueron siempre visible durante la germinación (Suda y Giorgini 2000).



A pesar de que la especie presenta una notable dificultad para producir plantas masivamente a partir de semillas, ya sea *in vitro* o *ex vitro*, es posible aumentar los niveles de germinación *in vitro* de *G. keule*. Se establecieron las bases de investigaciones futuras para optimizar las condiciones hormonales requeridas para germinación *in vitro* de la especie. Adicionalmente, este estudio permitió detectar algunos de los inhibidores de la germinación de *G. keule* y, presentar por primera vez, la caracterización histoquímica de su semilla. Mediante esta última técnica se observó la movilización de sustancias de reserva en los cotiledones durante los primeros días del proceso germinativo.

LITERATURA CITADA

Aburto A. 2002. Extracción, caracterización y germinación de semillas de queule (*Gomortega keule* (Mol.) Baillon). Tesis de Grado. Fac. Cs. Forestales. Universidad de Concepción. Chile.

- Azcón-Bieto J, M Talón. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGrawHill/Interamericana. Barcelona. España.
- Barclay AS, FR Earle. 1974. Chemical analyses of seeds III: Oil and protein content of 1253 species. *Economic Botany* 28:178-236.
- Baskin CC, JM Baskin. 1998. Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press. San Diego, USA.
- Bentsink L, M Koornneef. 2008. Seed dormancy and germination: The *Arabidopsis* Book 6:e0119. doi:10.1199/tab.0119.
- Bewley JD, KJ Bradford, HWM Hilhorst, H Nonogaki. 2013. Seeds. Physiology of development, germination and dormancy, 3rd Edition. Springer-Verlag, New York. USA.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bojórquez- Quintal JE, LA Sánchez-Cach, NF Gamboa-Tec, F Quintal-Tun, Y Minero-García, M Martínez- Estévez, CF Fuentes- Cerda, C De los Santos- Briones. 2011. Effect of plant growth regulators on *in vitro* germination of coffee zygotic embryos. *African Journal of Biotechnology* 10(82): 19056-19065.
- Calderón-Baltierra X, F Pérez, A Rotella. 1993. Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (Magnoliopsidae, Gomortegaceae). *Bosque* 14(1): 23-28.
- Corte VB, EEL Borges, CA Pontes, IT Almeida, CA Pontes, D Pinho. 2006. Mobilização das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Árvore* 30 (6): 941-949.
- Corte VB, EEL Borges, MC Ventrella, ITA Leite, AJT Braga. 2008. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. *Revista Árvore* 32(4): 641-650.

- Debeaujon I, L Lepiniec, L Pourcel, JM Routaboul. 2007. Seed coat development and dormancy. In: Bradford K, H Nonogaki (eds.). Seed development, dormancy and germination. Annual Plant Reviews, Volume 27. Blackwell Publishing. pp: 25-49.
- Donoso C, B Escobar. 1985. Germinación de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon. Bosque 6(2): 120-122.
- Doweld AB. 2001. Carpology and phermatology of *Gomortega keule* (Gomortegaceae): systematic and evolutionary implications. Acta Botanica Malacitana 26: 19-37.
- Espejo J, C Le Quesne, JA Celhay, J Rodríguez, P Valenzuela, C Pacheco. 2000. Antecedentes sobre la germinación de *Gomortega keule* (Gomortegaceae), especie endémica de Chile con problemas de Conservación. Gayana Botánica 1: 57-85.
- Fay M, M Clemente. 1997. Aplicación de las técnicas de cultivo en la propagación y conservación de especies amenazadas. Monografías del Jardín Botánico de Córdoba 5: 43-50.
- Finch-Savage WE, G Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171: 501- 523.
- Gallagher RS, KL Granger, LH Keser, J Rossi, D Pittmann, S Rowland, M Burnham, EP Fuerst. 2010. Shade and drought stress induced changes in phenolic content of wild Oat (*Avena fatua* L.) seeds. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 6: 90-107.
- Gallão MI, LF Damasceno, ES De Brito. 2006. Avaliação química e estrutural da semente de Moringa. Revista Ciência Agronômica 37(1): 106-109.
- Ghorpade RP, A Chopra, TD Nikam. 2010. *In vitro* zygotic embryo germination and propagation of an endangered *Boswellia serrate* Roxb., a source of boswellic acid. Physiology and Molecular of Plants 16(2): 159-165.
- Hechenleitner P, MF Gardner, PI Thomas, C Echeverría, B Escobar, P Brownless, C Martínez. 2005. Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. Valdivia. Chile.

- Heo K, Y Kimoto, M Riveros, H Tobe. 2004. Embryology of Gomortegaceae (Laurales): characteristics and character evolution. *Journal of Plant Research* 117: 221-228.
- Hilhorst HWM, WE Finch-Savage, J Buitink, W Bolingue, G Leubner-Metzger. 2010. Dormancy in plant seeds. In: Lubzens *et al.* (eds.). Dormancy and resistance in harsh environments. *Topics in Current Genetics* 21: 43-67.
- Inácio MC, RM Moraes, PC Mendonça, LJF Morel, SC França, BW Bertoni, AMS Pereira. 2013. Phenolic compounds influence seed dormancy of *Picourea rigida* H.B.K (Rubiaceae), a medicinal plant of the Brazilian Savannah. *American Journal of Plant Sciences* 4: 129-133.
- ISTA (International Seed Testing Association). 1999. Biochemical test for viability. *Seed Science Technology* 27: 201-244.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Co. Inc. New York. USA.
- Junior PPF, JE Schwerwinski-Pereira. 2012. *In vitro* germination and propagation of Cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith- Fabaceae). *Ciência Florestal* 22(1): 1-9.
- Kagithoju S, V Godishala, M Kairamkonda, RS Nanna. 2013. Embryo culture is an efficient way to conserve a medicinally important endangered forest tree species *Strychnos potatorum*. *Journal of Forestry Research* 24(2): 279-283.
- Kamal J, A Bano. 2008. Allelopathic potencial of sunflower (*Helianthus annus* L.) on soil metals and its leaves extracts on physiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *African Journal of Biotechnology* 7(18): 3261-3265.
- Kong DM, JE Preece, HL Shen. 2012. Somatic embryogenesis in immature cotyledons of Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 108(3): 485-492.
- Kucera B, MA Cohn, G Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307.

- Lattanzio V, VMT Lattanzio, A Cardinali. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* 2: 23:67.
- Lopes LS, MI Gallão, CHC Bertini. 2013. Mobilization of reserves during germination of *Jatropha* seeds. *Revista Ciência Agronômica* 44(2): 371-378.
- Lott JNA. 1981. Protein body in seeds. *Nordic Journal of Botany* 1: 421-432.
- Lloyd G, B McCown. 1981. Woody Plant Medium. A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience* 16: 453.
- Magalhães SR, EEL Borges, APA Berger. 2010. Seed reserve mobilization in the embryonic axis and cotyledons of *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake during germination. *Ciência Florestal* 20(4): 589-595.
- Maldonado C. 1990. Caracterización del hábitat de *Gomortega keule* (Mol) Baillon en su rango de distribución y algunos antecedentes de su reproducción sexual. Tesis de Grado. Fac. Cs. Agronómicas, Veterinarias y Forestales, Universidad de Concepción. Chile.
- Martins JM, OCB Moreira, NFP Rainha, JAB Baptista, L Silva, MMT Moura. 2012. Morphophysiological dormancy and germination in seeds of the Azorean tree *Picconia azorica*. *Seed Science and Technology* 40: 163-176.
- Massa C, AA Sartori. 2006. Semente. En: Appezzato-Da Gloria B, SM Carmello-Guerreiro (eds.). *Anatomía Vegetal*. 2ª edición. Editora UFV. Viçosa. Brasil. pp. 399-424.
- Morales E, R Calquín. 2004. Experiencia en germinación de Queule (*Gomortega keule* (Mol.) Baillon. *Mundo Forestal* 4: 22-25.
- Mosella L, CM Riedel, R Jonard, P Signoret. 1979. Développement *in vitro* d'apex de pecher (*Prunus persica* Batsch): possibilités d'application. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* 289: 1335-1338.

- Muñoz-Concha D, MR Davey. 2011. Micropropagation of the endangered Chilean tree, *Gomortega keule*. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 47:170-175.
- Murashige T, F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Muto S, H Beevers. 1974. Lipase activities in Castor Bean endosperm during germination. *Plant Physiology* 54: 23-28.
- Nonogaki H, GW Bassel, JD Bewley. 2010. Germination- Still a mystery. *Plant Science* 170: 574-581.
- O'Brien TP, N Feder, ME McCully. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 367-373.
- Orellana C. 1996. Efecto del ácido giberélico (GA₃) sobre la germinación de semillas de queule (*Gomortega keule* (Mol.) Baillon). Tesis Licenciado en Ciencias Forestales. Facultad de Recursos Naturales. Universidad de Talca. Chile.
- Pearse AGE. 1972. *Histochemistry: theoretical and applied*. Vol. 2. 3rd ed. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. USA.
- Pereira CE, EV Resende, DF Oliveira, ALP Kikutí. 2002. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 24: 306- 311.
- Rambabu M, M Upender, D Ujjwala, T Ugandhar, M Praveen, N Rama-Swamy. 2006. *In vitro* zygotic embryo culture of an endangered forest tree *Givotia rottleriformis* and factors affecting its germination and seedling growth. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42:418-421.
- Reed, SM. 2005. Embryo rescue. In: Trigiano RN, D J Gray (eds). *Plant development and biotechnology*. CRC Press, New York. pp. 235-239.

- Samuel K, D Debashish, B Madhumita, G Padmaja, SR Prasad, VB Ramana Murthy, PS Rao. 2009. *In vitro* germination and micropropagation of *Givotia rottleriformis* Griff. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 45: 466-473.
- Satyanarayana B, P Subhashinini-Devi, A Arundhati. 2011. Biochemical changes during seed germination of *Sterculia urens* Roxb. Notulae Scientia Biologicae 3(3): 105-108.
- Siddiqui ZS, MA Khan. 2010. The role of seed coat phenolics on water uptake and early protein synthesis during germination of dimorphic of *Halopyrum mucronatum* (L.) Staph. Pakistan Journal of Botany 42(1): 227-238.
- Srivastava L. 2002. Plant growth and development: hormones and environment. Academic Press. Oxford. UK.
- Stojičić D, D Janošević, B Uzelac, V Cokeša and S Budimir. 2012. *In vitro* zygotic embryo culture of *Pinus peuce* Gris.: Optimization of culture conditions affecting germination and early seedling growth. Archives of Biological Sciences Belgrade 64(2): 503-509.
- Suda CNK, JF Giorgini. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12(3): 226-245.
- Suggi NC. 2011. The establishment of axenic seed and embryo cultures of endangered Hawaiian plant species: special review of disinfection protocols. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 47: 157-169.
- Taiz L, E Zeiger. 2006. Plant Physiology. 4th Edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. USA.
- Tokuhisa D, DC Fernandes, EM Alvarenga, PC Hilst, AJ Demuner. 2007. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de Mamão (*Carica papaya* L.). Revista Brasileira de Sementes 29: 180-188.
- Tozzi HH, M Takaki. 2011. Histochemical analysis of seed reserve mobilization in *Passiflora edulis* Sims fo. *flavicarpa* O. Deg. (yellow passion fruit) during germination. Brazilian Journal of Biology 71(3): 701-708.

Ventrella MC, AL Almeida, LA Nery, VP Coelho. 2013. Métodos histoquímicos aplicados às sementes. Editora UFV. Viçosa. Brasil.

Vidal BC. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-ponceau 2R. *Annales d'Histochemie* 15: 289-296.

Vilegas JHY, OR Gottlieb, MAC Gottlieb. 1991. A cinnamoylglucose from *Gomortega keule*. *Phytochemistry* 30: 1200-1201.

Waterhouse AL. 2002. Polyphenolics: Determination of total phenolics. In: Wrolstad, R.E (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. JohnWiley and Sons, Inc. New York. pp: 1-4.



DISCUSIÓN GENERAL

El queule, *Gomortega keule* (Mol.) Baillon ha despertado gran interés en las distintas áreas del conocimiento por diversas razones, tales como: ser el único representante de la familia Gomortegaceae, ser una especie endémica de Chile, estar restringido a un acotado rango geográfico y formar parte remanente del Bosque Maulino. Por otro lado, *G. keule* posee un incipiente potencial económico por el alto contenido de aceites esenciales con propiedades antisépticas y como árbol frutal. Estos temas están siendo abordado recientemente por algunos investigadores (Bittner *et al.* 2008, Becerra *et al.* 2010, Muñoz-Concha *et al.* 2012) y que en un futuro podría significar un mayor valor para la sociedad, ayudando a crear conciencia y evitar su avance hacia la extinción. Sin embargo, la principal problemática que presenta la especie es la escasa germinación de sus semillas y el difícil enraizamiento de sus estacas hace necesario buscar nuevas alternativas de propagación y ahondar en los procesos relativos a su germinación, así como también continuar con los estudios para su conservación *ex situ*.

Los resultados obtenidos aportan información valiosa para una mejor comprensión de los factores que serían causales de la baja propagación de la especie, en la cual también influye la variabilidad genética en los relictos estudiados y factores morfo-fisiológicos relacionados con su germinación. Por otro lado, aporta en las técnicas de cultivo *in vitro* que permitirían a futuro implementar otras herramientas biotecnológicas para la conservación *ex situ* de *G. keule*.

Dentro de un plan de conservación *ex situ*, la literatura señala que es necesario conocer la variabilidad genética de las poblaciones e individuos, con el fin de capturar dicha variabilidad (Toribio y Celestino 2000, Frankham *et al.* 2004). Así, mediante tres combinaciones selectivas de partidores AFLP se estimó la variabilidad genética de *G. keule* en tres relictos de la Provincia de Concepción que no se encontraban reportados en estudios previos, por lo cual se contribuyó a aumentar los antecedentes genéticos en la especie. Es necesario indicar que durante el período en estudio los relictos con mayor y menor variabilidad, Cerro Neuque y Hualqui, respectivamente, no evidenciaron regeneración sexual y la producción de semillas

fue escasa. Este punto representó una de las principales limitantes para la óptima ejecución de la investigación, razón por la cual el relicto Coroney fue clave en la obtención del material necesario para la mayor parte de los estudios. Por consecuencia, el reporte de dicho relicto como fuente de germoplasma es un valioso aporte en este estudio y debiera ser considerado como fuente de semillas y resguardarse de los efectos antrópicos, tales como tala de árboles y pérdida de plántulas.

Mediante la micropropagación se evaluó la respuesta al cultivo *in vitro* de *G. keule*. La contaminación influyó negativamente en los primeros intentos de establecimiento *in vitro*, tanto en material adulto como embrionario. La alta carga de microorganismos del material inicial requirió la utilización de desinfectantes para su eliminación, acarreado como consecuencia la oxidación de los tejidos. Sin embargo, la incorporación de biocidas como PPM y vitrofural al medio de cultivo permitieron obtener un cultivo aséptico con la carga bacteriana endógena controlada, permitiendo así la mantención de los cultivos *in vitro* (Orlikowska *et al.* 2012).

En cuanto a la respuesta morfogénica obtenida en *G. keule*, en general, se comportó de manera similar a otras leñosas, tales como *Juglans regia*, *Persea lingue*, *Ocotea porosa* (Avilés *et al.* 2009, Cob *et al.* 2010, Pelegrini *et al.* 2011) e independiente del tratamiento y material vegetal utilizado (adulto o embrionario), la respuesta siempre estuvo marcada por el genotipo. Este hecho concuerda con lo reportado para esta especie por Muñoz-Concha y Davey (2011). Por tanto, se podría considerar la respuesta genotipo-dependiente de *G. keule* de vital importancia la identificación de genotipos selectos con respuesta morfogénica deseada para que formen parte de futuros programas de conservación de germoplasma. Como aporte a dicho desafío, se logró un protocolo de inducción callogénica a partir de material embrionario que permitió la obtención de estructuras proembriogénicas. Así, se sientan bases para continuar con estudios conducentes a la obtención de embriones somáticos y avanzar en técnicas de crioconservación.

Los aspectos morfo-fisiológicos estudiados durante la germinación *in vitro* de *G. keule*, comenzaron con la eliminación, en primera instancia, del endocarpio, característica distintiva de resistencia mecánica para la germinación en la especie y la aplicación exógena de reguladores de la germinación como GA₃, metodologías que permitieron obtener una germinación en 75 días. A su vez, la técnica de rescate de embriones fue clave para la obtención de plántulas de *G. keule in vitro*. Mediante esta técnica se eliminaron los tegumentos seminales y el endosperma, aislando el embrión (eje embrionario y cotiledones) y se utiliza en especies que han perdido su capacidad de reproducción sexual (Mohanty *et al.* 2009). La técnica libera al embrión de las capas externas que lo cubren, como la cubierta seminal y el endospermo. Este último, en algunas semillas, es la mayor barrera (Nonogaki *et al.* 2010). Si bien el procedimiento realizado disminuyó el tiempo requerido para la germinación, esta sigue siendo lenta y errática. Nasreen *et al.* (2002) indican que en algunas especies los cotiledones inhiben el crecimiento del eje embrionario. Por tanto, es probable que al remover los cotiledones del embrión de *G. keule* podría obtenerse alguna respuesta satisfactoria, tal como ocurre en *Fraxinus sp.* y *Coryllus avellana* (Bewley *et al.* 2013). Adicionalmente, dentro de los inhibidores de la germinación cuantificados, el ABA parece no ser el responsable de las bajas tasas de germinación de la especie dada la alta relación obtenida entre GA:ABA. No obstante, la alta cantidad de fenoles totales en los tegumentos y la presencia de lípidos en endospermo y cotiledones podrían limitar la translocación de estas hormonas (Vilegas *et al.* 1991, Heo *et al.* 2004). Por otro lado, los compuestos fenólicos en la semilla afectarían la germinación en condiciones *ex vitro*, ya que debe transcurrir un tiempo para disminuir su efecto, aumentando la posibilidad de pérdida de viabilidad de las semillas.

Las características detectadas mediante los estudios histoquímicos en las semillas de *G. keule*, tales como: alto contenido de fenoles en los tegumentos, lípidos como principal sustancia de reserva y evidencia de rápida deshidratación en las proteínas almacenadas en las células seminales, apunta a la recalcitrancia de su semilla. Sin embargo, es necesario realizar estudios cuantitativos de las sustancias de reserva, establecer condiciones y período de almacenaje para poder comprender mejor la fisiología de esta especie. Este punto es crucial en nuevas investigaciones, ya que de ello dependería la posibilidad del almacenaje en bancos de semillas

o desviar todos los esfuerzos para continuar con propuestas alternativas (Bioversity International 2011, Bunn *et al.* 2011).

Los resultados obtenidos en esta investigación contribuyen a ampliar los antecedentes referentes a la propagación y conservación *ex situ* de *G. keule*, así como también aportar información que permite avanzar en la protección, mejora y regeneración de esta especie amenazada. Así mismo, se establecen nuevos horizontes para futuros estudios conducentes a la conservación *ex situ* de Queule.

LITERATURA CITADA

- Avilés F, D Ríos, R González, M Sánchez-Olate. 2009. Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.). Chilean Journal of Agricultural Research 69(3): 460-467.
- Becerra J, M Bittner, V Hernández, C Brintrup, J Becerra, M Silva. 2010. Actividad de aceites esenciales de canelo, queule, bailahuén y culén frente a hongos fitopatógenos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 9 (3): 212-215.
- Bewley JD, KJ Bradford, HWM Hilhorst, H Nonogaki. 2013. Seeds. Physiology of development, germination and dormancy, 3rd Edition. Springer-Verlag, New York. USA.
- Bioversity International. 2011. A training module for the international course on the management and utilization of field genebanks and *in vitro* collections. TARI, Fengshan. Taiwán.
- Bittner ML, ME Casanueva, CC Arbert, MA Aguilera, VJ Hernández, JV Becerra. 2008. Effects of essential oils from five species against the granary weevils *Sitophilus*

- zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). Journal of the Chilean Chemical Society 53(1): 1455-14-59.
- Bunn E, SR Turner, KW Dixon. 2011. Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 47: 188-200.
- Cob J, AM Sabja, D Ríos, A Lara, PJ Donoso, L Arias, B Escobar. 2010. Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación in vitro de *Persea lingue* en la zona centro-sur de Chile. Bosque 31(3): 202-208.
- Frankham R, JD Ballou, DA Briscoe, KH McInnes. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- Heo K, Y Kimoto, M Riveros, H Tobe. 2004. Embryology of Gomortegaceae (Laurales): characteristics and character evolution. Journal of Plant Research 117: 221-228.
- Mohanty A, B Chrungu, N Verman, KR Shivanna. 2009. Broadening the genetic base of crop brassicas by production of new intergenetic hybrid. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 45(3): 117-122.
- Muñoz-Concha D, MR Davey. 2011. Micropropagation of the endangered chilean tree, *Gomortega keule*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 47:170-175.
- Muñoz-Concha D, S Mayes, G Ribas, MR Davey. 2012. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and shoot-tips of the chilean tree *Gomortega keule*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 109(1): 123-130.
- Nasreen S, M Yousaf, AS Mohmand, MA Mailk. 2002. Study of seed dormancy mechanisms: causes and control. Asian Journal of Plant Sciences 1(2): 210-212.
- Nonogaki H, GW Bassel, JD Bewley. 2010. Germination-Still a mystery. Plant Science 170: 574-581.
- Orlikowska T, M Zawadzka, E Zenkteler, P Sobiczewski. 2012. Influence of the biocides PPM and vitrofural on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on

plant microshoots grown on various media. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 87(3): 223-230.

Pelegrini L, LF Ribas, F Zanette, HS Koehler. 2011. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. *African Journal of Biotechnology* 10(9): 1527-1523.

Toribio M, C Celestino. 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 2: 249-260.

Vilegas JHY, OR Gottlieb, MAC Gottlieb. 1991. A cinnamoylglucose from *Gomortega keule*. *Phytochemistry* 30: 1200-1201.



CONCLUSIONES

- Con sólo 3 combinaciones selectivas de AFLP se estimó la variabilidad de *G. keule* en los relictos analizados.
- La variabilidad genética presentada en los relictos contribuye a ampliar los antecedentes en la especie.
- Es posible estimar la variabilidad genética en las poblaciones naturales remanentes de *G. keule* y detectar a futuro variantes genéticos únicos y/o centros de variabilidad genética.
- La mayor supervivencia *in vitro* se observó en los relictos con mayor variabilidad genética, Cerro Neuque y Coroney.
- La respuesta morfogénica de *G. keule*, a partir de segmentos nodales, revigorizó el material vegetal adulto, además se confirmó la respuesta genotipo-dependiente de la especie sobre las condiciones de cultivo.
- Se evidenció que las fases de proliferación y elongación caulinar fueron las etapas críticas en el proceso de propagación vía organogénesis *in vitro*.
- Mediante la presencia de 2,4-D y Kin en el medio de cultivo se obtuvo respuesta embriogénica en cotiledones, corroborada por análisis histológicos.
- Se validó el proceso organogénico y se generó un aporte al desarrollo de cultivos embriogénicos.
- Es posible aumentar los niveles de germinación *in vitro* de *G. keule* mediante la utilización de GA₃ como inductor.
- Se detectaron algunos de los inhibidores de la germinación de *G. keule*.
- Se presentó la primera caracterización de la semilla de *G. keule* mediante análisis histoquímicos.

- La movilización de sustancias de reserva en los cotiledones durante los primeros días del proceso germinativo estarían influyendo sobre la germinación de la especie.

