

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



“GERMINACIÓN *IN VITRO* DE ***ORITES MYRTOIDEA*** (PROTEACEAE)
Y ***MAYTENUS CHUBUTENSIS*** (CELASTRACEAE).

Especies vegetales insuficientemente conocidas de la Flora de Chile”.

MEMORIA DE TÍTULO
PRESENTADA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

ISABEL STEPHANIA FUENTEALBA JARA

LOS ÁNGELES – CHILE

2016

“Germinación *in vitro* de *Orites myrtoidea* (Proteaceae) y *Maytenus chubutensis* (Celastraceae). Especies vegetales insuficientemente conocidas de la Flora de Chile”.

Isabel Stephania Fuentealba Jara

Profesor Guía

Dr. Mauricio Rondanelli Reyes
Profesor Asociado U. de Concepción
Biólogo

Profesora Co- Guía

Dra. Alejandra Zúñiga Feest
Profesora Asociada U. Austral de Chile
Bióloga

Profesor Comisión de Título

Dr © José Máj Troncoso Castro
Mag. Cs mención Botánica
Ingeniero Ejec. Forestal

Jefe de Carrera

Dr. Carlos Schneider Barrera
Profesor Asociado U. de Concepción
Químico Farmacéutico

Director de Departamento

Mag. Pablo Novoa Barra
Profesor Asistente U. de Concepción
Ingeniero Ejec. Forestal

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer con todo mi corazón a mi madre, mi padre, mis hermanos, mi sobrina, mi tía y Pedro por el inmenso amor, paciencia y apoyo que me entregaron durante todo mi proceso universitario.

Agradecer a mis amigos por su apoyo incondicional, Nico, Clau, Danielito y Zapatita.

Agradecer a mi Profesor guía Dr. Mauricio Rondanelli Reyes, por sus consejos, apoyo, ayuda incondicional, conocimiento y el vamos que se puede en todos estos años, desde que llegué a su Laboratorio.

A la Profesora Dr. Alejandra Zúñiga- Feest, que con mucho cariño, empatía, y conocimiento me recibió en Valdivia.

A Mag. Cs. José Max Troncoso, por su apoyo en el Laboratorio.

Al Laboratorio de Biología Vegetal del Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas de la Universidad Austral de Chile por sus análisis.

A la Corporación Nacional Forestal, CONAF, en especial a Yuri Cid, Jefe de Guarda Parques del Parque Nacional Laguna del Laja, por su colaboración para que esta investigación fuese llevada a cabo.

Y finalmente a mis profesores del Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, que me entregaron las herramientas y conocimiento para llegar a ser una profesional.

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Características químicas del suelo en tres sitios de muestreo en Parque Nacional Laguna del Laja entre 0 a 10 cm de profundidad.	39
Tabla 2	Características químicas del suelo en tres sitios de muestreo en Parque Nacional Laguna del Laja entre 10 a 20 cm de profundidad.	39
Tabla 3	Concentración de nitrógeno (N), fósforo (P), aluminio (Al) y relación nitrógeno- fósforo en hojas maduras y senescentes de la especie <i>Orites myrtoidea</i> en los tres sitios de muestreo.	40
Tabla 4	Concentración de nitrógeno (N), fósforo (P), aluminio (Al) y relación nitrógeno- fósforo en hojas maduras y senescentes de la especie <i>Maytenus chubutensis</i> en los tres sitios de muestreo.	40



ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	<i>Orites myrtoidea</i> , Radal enano. A) Hojas mostrando yemas axilares. B) Flores blancas en racimos. C) Folículos abiertos que contienen las semillas. D) Semillas aladas.	14
Figura 2	Distribución de la especie <i>Orites myrtoidea</i> en Chile	15
Figura 3	<i>Maytenus chubutensis</i> , Maitén del Chubut. A) Hojas y tallos verde amarillentos. B) Flores pequeñas. C- D) Fruto ovoide con dos semillas en forma de arilo.	16
Figura 4	Distribución de la especie <i>Maytenus chubutensis</i> en Chile	18
Figura 5	Etapas de la regeneración de una planta a partir de un explante mediante la técnica de cultivo <i>in vitro</i> .	22
Figura 6	Sitios de muestreo en el Parque Nacional Laguna del Laja. Sector 1: El Torbellino (37° 23' 23.161"S; 71° 24' 48.538"W). Sector 2: Asociación <i>Austrocedrus- Orites- Maytenus</i> (37° 23' 20.339" S; 71° 24' 46.08" W). Sector 3: "Escorial bajo" (37° 23' 17.34" S; 71° 24' 32.281" W).	26
Figura 7	Contaminación con hongos en cultivo de yemas axilares de <i>Orites myrtoidea</i> .	33
Figura 8	Cultivo <i>in vitro</i> de hojas de 5 mm x 5 mm en medio de cultivo 1 mg/L BAP. A) hojas necrosadas de <i>Orites myrtoidea</i> . B) Hojas necrosadas de <i>Maytenus chubutensis</i> .	33
Figura 9	Germinación <i>in vitro</i> de <i>Orites myrtoidea</i> en medio de cultivo MS para los sitios de muestreo 2 y 3.	34
Figura 10	Germinación <i>ex vitro</i> con semillas de <i>Orites myrtoidea</i> rescatadas desde el medio de cultivo WPM, pertenecientes al sector 1 y 2.	35
Figura 11	Segundo ensayo de germinación <i>ex vitro</i> de semillas de <i>Orites myrtoidea</i> pertenecientes al sector 2.	36
Figura 12	Ensayo en cámara de germinación. A la izquierda, primera fila, semillas de <i>Maytenus chubutensis</i> , a la derecha, tres filas de semillas de <i>Orites myrtoidea</i> .	36

- Figura 13** Estados del desarrollo de la germinación observados en *Orites myrtoidea* hasta el momento de su siembra. La primera figura a la izquierda, indica el momento en el que emerge la radícula. **37**
- Figura 14** Se observa el porcentaje de sobrevivencia de los esquejes realizados en *O. myrtoidea*, **37**



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1. Características edafoclimáticas del Parque Nacional Laguna del Laja	19
2.2. Cultivo de tejidos vegetales.....	20
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1. Descripción de los sectores de muestreo	25
5.2. Medios de cultivo	26
5.3. Tratamiento pre germinativo.....	27
5.4. Desinfección del material vegetal.....	27
5.5. Establecimiento <i>in vitro</i>	28
5.6. Germinación <i>in vitro</i> y en cámara de germinación	29
5.7. Ensayo en cámara de germinación	29
5.8. Porcentaje y vigor en la germinación	30
5.9. Establecimiento en sustrato	31
5.9.1. Propagación por esquejes	31
5.9.2. Análisis de suelo de los sitio de colecta	32



5.9.3. Análisis nutricional foliar de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis*32

5.9.4. Análisis estadístico.....32

6. RESULTADOS33

7. DISCUSIÓN.....41

8. CONCLUSIÓN46

9. BIBLIOGRAFÍA.....48

ANEXOS.....56



RESUMEN

Orites myrtoidea (Radal enano) y *Maytenus chubutensis* (Maitén del Chubut) son dos especies nativas chilenas que tienen distribución en Centro- Sur de Chile y en el Parque Nacional Laguna del Laja, Comuna de Antuco, Provincia de Bío-Bío, que presentan problemas de conservación principalmente al escaso conocimiento botánico que existe sobre ambas especies. Debido a esta razón, surge el interés de realizar estudios sobre su biología y ecología para establecer planes de conservación. El presente estudio se realizó con el objetivo de estudiar la propagación de estas especies mediante el cultivo de hojas, yemas axilares y semillas. La micropropagación de hojas de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis* se realizó con medio MS con vitaminas, 1 mg/L BAP (Bencil amino purina); este mismo medio se utilizó para la propagación de yemas axilares de *O. myrtoidea*. El medio de cultivo utilizado para las semillas de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis* fue Woody plant medium (WPM) con vitaminas y aminoácidos y medio MS con vitaminas, 7 g/L de agar y 3 g/L de sacarosa. La propagación por esquejes se realizó con 0,15 grs de IBA (Ácido indol butírico) y 6 grs de Captan, luego se plantaron los esquejes una mezcla de tierra, turba y vermiculita (3:2:1 v/v, respectivamente). Además, se evaluó la concentración de nutrientes en el suelo de los sitios de colecta. Así también debido que la nutrición de los esquejes podría afectar la capacidad de enraizamiento se midió la concentración foliar de hojas maduras y senescentes. El resultado obtenido en la micropropagación de hojas de ambas especies fue 100% de necrosis. Los cultivos que contenían yemas axilares de *O. myrtoidea* tuvieron un 100% de contaminación. La propagación por esquejes presentó un 30% de sobrevivencia en la quinta semana de estudio. Finalmente, en el análisis mineralógico del suelo se observó que la disponibilidad del fósforo (P- Olsen) para el sector 1 de muestreo fue de 23.473 mg kg⁻¹, 26.429 mg kg⁻¹ para el sector 2, disminuyendo a 4.878 mg kg⁻¹ para el sector 3. En el análisis de nutrientes foliar se observó que *O. myrtoidea* moviliza N y P en sus hojas maduras, en tanto, en *M. chubutensis* sólo se observó que se acumularía grandes cantidades de Aluminio en sus hojas senescentes.

ABSTRACT

Orites myrtoidea (Radal enano) and *Maytenus chubutensis* (Maitén del Chubut) are two native Chilean vegetable species which have a distribution, in a few areas in center-south of Chile, like Laguna del Laja National Park, commune of Antuco, Province of Bio Bio; that present conservation problems due to the lack of botanical knowledge about these species. Due to these reasons, this Information is supported to the awareness of phylogenetic sources from the country as an efficient measure for its preservation in both species. The following research was made with the aim to study the spreading of both species through leaves explants, axial buds and seeds. The leaves micropropagation of *O. myrtoidea* and *M. chubutensis* was made with culture media MS with vitamins, supplemented with 1 mg/L BAP; besides it was used for the propagation of axillary buds of *O. myrtoidea*. The culture media used for *O. myrtoidea* and *M. chubutensis* seeds was Woody plant medium (WPM) supplemented with vitamins and amino acids and culture media MS with vitamins, with 7g/L of agar and 3 g/L of sucrose. The propagation through cuttings was prepared with 0.15 grs of IBA and 6 grs of Captan, to then plant the cuttings in soil substrate, peat moss and vermiculite (3:2:1 v/v, respectively).

It was made a mineralogical soil analysis and leaves' nutrients analysis in both species. The result given in the micropropagation of leaves in both species was 100 % of necrosis. The explants that contained axillary buds of *O. myrtoidea* had 100% of pollution. The spreading through cuttings in the fifth week of assessment, it showed 30% of survival. Finally, the mineralogical soil analysis was observed that the phosphorus availability (P-Olsen) for sector 1 in the sample was 23,473 mg kg⁻¹, 26,429 mg kg⁻¹ for sector 2, reducing to 4,878 mg kg⁻¹ for sector 3. In the foliar nutrients analysis was observed that *O. myrtoidea* moves N and P in their mature leaves, in other hand, in *M. chubutensis* there is not differences, only in the case of Al, where the specie would accumulating large quantities of this nutrient in its senescent leaves.

1. INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional Laguna del Laja, pertenece al Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado de Chile (SNASPE), quien a pesar de ser un área protegida por ley, se ve afectado por una serie de irregularidades administrativas como la construcción de caminos y represas, disponer de pistas de sky abiertas a turistas, lugar de ejercicio y práctica militar, además ser parte del paso público internacional hacia La República Argentina (Paso Pichachén). Estos antecedentes han sido descritos por la literatura, como de amenaza para la flora y fauna del lugar. Según un informe sobre áreas Protegidas de Chile del Ministerio del Medio Ambiente (2011), no existen programas nacionales estables de seguimiento, monitoreo e investigación científica en las áreas protegidas de Chile.

En este sentido, el Parque Nacional Laguna del Laja alberga varias especies nativas con algún grado de problemas de conservación como lo son, en el caso de la vegetación, las especies *Orites myrtoidea* (Poepp.& Endl) Benth y Hooker (Radal enano) y *Maytenus chubutensis* (Speg.) Lourteig, O'Donnell & Sleumer (Maitén del Chubut) cuya fragilidad ecológica radica principalmente en ser dos especies muy poco estudiadas. Por lo tanto, existe la necesidad de realizar estudios sobre su biología y ecología para establecer planes de conservación para ambas especies. Un punto importante lo constituye el hecho de que existen escasos (a nulos) estudios sobre la propagación de ambas especies nativas.

Es en este último punto donde el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* toma relevancia, definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal, que pueden ser protoplastos – células desprovistas de pared celular– células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al*, 2010). Además, se pueden utilizar técnicas de propagación como el uso de esquejes para la multiplicación asexual en especies vegetales. Así, en base de estos antecedentes, es posible mediante técnicas de propagación de cultivo de tejidos *in vitro* y técnicas *ex situ*, establecer la capacidad de ambas especies para regenerar en laboratorio e invernadero

2. MARCO TEÓRICO

El Parque Nacional Laguna del Laja se encuentra ubicado en la en la comuna de Antuco (37°26' S; 71°19' W), Provincia del Bío Bío, Región del Bío Bío. Fue creado el 25 de Junio de 1958 (Corporación Nacional Forestal, 2016). Posee una superficie total de 11.933,3 Há. con lluvias y nieve en los meses de junio a septiembre, alcanzando un promedio anual de 2.170 mm. La temperatura máxima media anual es de 13,6 °C y la mínima de -0,3°C. El área protegida incluye al Volcán Antuco, incluyendo el macizo montañoso de la Sierra Velluda y la Laguna Laja que desagua subterráneamente en los Saltos Las Chilcas y El Torbellino, dando origen al Río Laja. El registro de la vegetación del Sistema Nacional de Información Ambiental informó el 55,8% de cobertura de vegetación de la cuenca del Lago Laja, distribuidos de la siguiente manera: 53% de bosque nativo, el 27,8% de arbustos, 16% estepa andina, y praderas 3,2% anuales y perennes (Torres *et al*, 2008). Actualmente, la vegetación dominante en la cuenca del Lago Laja se compone de *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizz, *Lomatia hirsuta* (Lam.) Diels ex Macbr, *Maytenus boaria* Mol., *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera, *Colletia ulicina* Gill. et Hook., *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz, *Orites myrtoidea* (Poepp.& Endl) Benth y Hooker *Ephedra chilensis* K. Presl *Maytenus chubutensis* (Speg.) Lourteig, O'Donnell & Sleumer, *Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst., *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst., *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst., *Nothofagus pumilio* (P. et E.) Krasser, y *Maihuenia poeppigii* (Otto ex Pfeiff.) F.A.C. Weber ex K. Schum (Veblen and Schlegel, 1982; Hoffmann, 1982; Donoso, 1982; Torres, 2008; Ministerio del Medio Ambiente, 2012; Corporación Nacional Forestal, 1993).

Orites myrtoidea (Radal enano), especie nativa de Chile y Argentina, perteneciente a la familia Proteaceae. Es una especie altamente endémica y de hábitat estricto, con poblaciones muy endogámicas (Hebel & Torres, 2009). En Chile sólo se encuentran seis especies de Proteaceae: *Gevuina avellana* Mol., *Embothrium coccineum* J. R. Forst. et G. Forst, *Lomatia ferruginea* Cav. R. Br., *Lomatia hirsuta*, *Lomatia dentata* Ruiz y Pavón R. Br. y *Orites myrtoidea* Poepp. Y Endl (Donoso 2006; Prance & Plana 1998; Zúñiga Feest et al., 2015). *O. myrtoidea* crece en zonas altoandinas, en laderas rocosas y también al

interior de bosques abiertos, en ambientes relativamente xéricos. Es un arbusto siempreverde que puede alcanzar a medir hasta 2m de altura, a menudo bajo y extendido, usualmente formando matorrales grandes (Hoffmann 1995; Hechenleitner *et al*, 2005). Presenta hojas coriáceas, oblongas a elípticas u oblongas a lanceoladas, margen entero, ápice obtuso o con una pequeña punta (Figura 1a). Flores en densos racimos originándose desde las axilas de la hoja, con floración entre octubre y noviembre (Figura 1b). Frutos de 1,6 a 2 cm de largo por 0,6 a 0,8 cm de ancho, elipsoidal, leñoso, glabro y de color canela con maduración entre febrero y marzo (Figura 1c) (Hoffmann 1995; Hechenleitner *et al*, 2005), con semillas aladas color canela (Figura 1d). El 34% se encuentra inmerso en zonas con cobertura de bosque nativo, principalmente asociado a especies como *A. chilensis* y *N. dombeyi*. Los restantes puntos de presencia se encuentran asociados a coberturas de matorrales en sectores altos de la Cordillera de los Andes (Echeverría & Rodríguez, 2014).





Figura 1. *Orites myrtoidea*, Radal enano. A) Hojas mostrando yemas axilares. B) Flores blancas en racimos. C) Folículos abiertos que contienen las semillas. D) Semillas aladas.

En el Parque Nacional Laguna del Laja, *Orites* se encuentra como especie dominante junto con *Austrocedrus chilensis*, además, donde se conoce que ésta población corresponde a la más abundante.

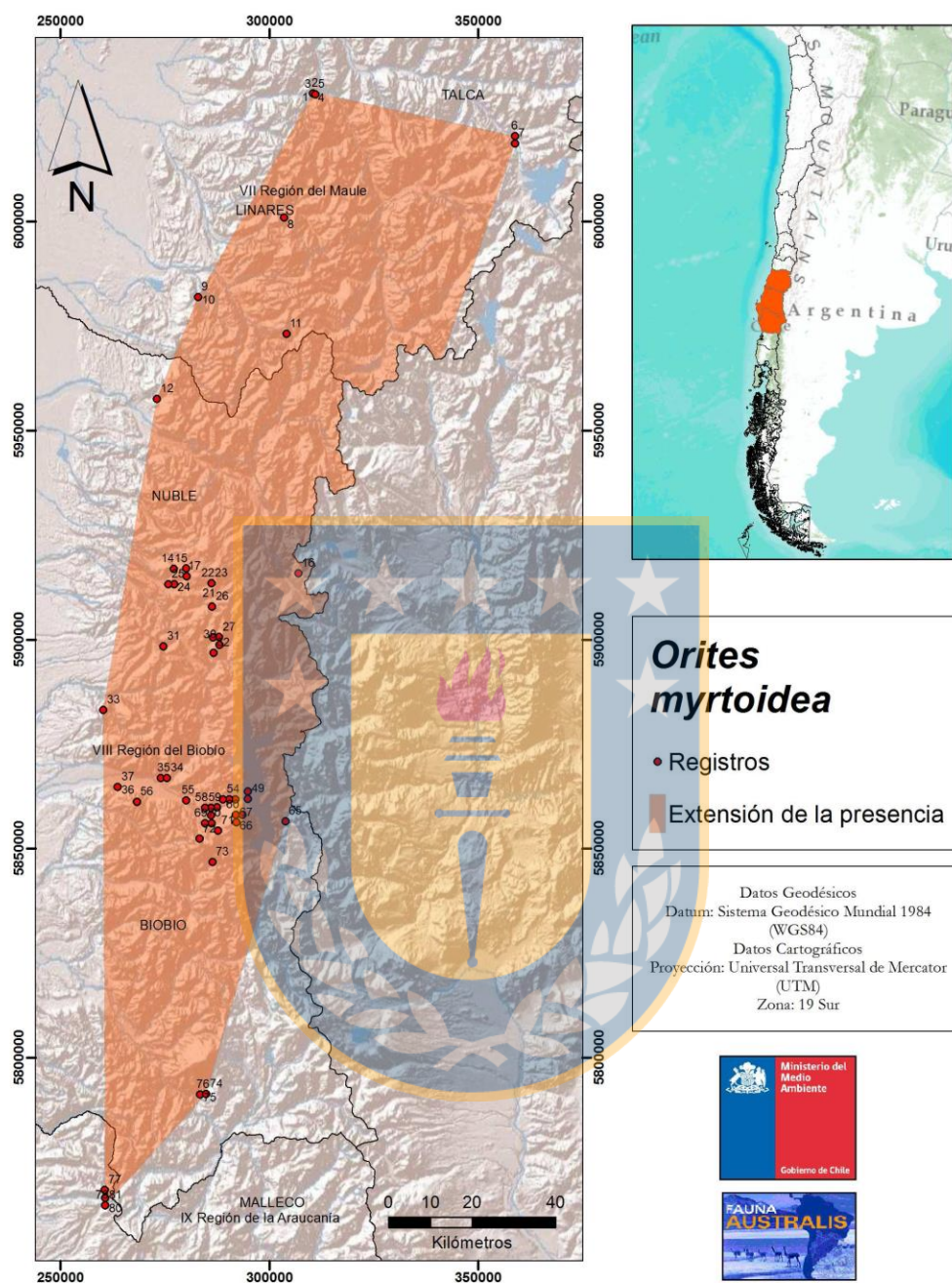


Figura 2. Distribución de la especie *Orites myrtoidea* en Chile. Fuente: Ministerio del Medio Ambiente 2016.

Maytenus chubutensis (Maitén del Chubut, Chaurilla), arbusto nativo de Chile y Argentina, perteneciente a la familia Celastraceae, es un arbusto siempreverde de hasta 1 m de

altura, con hábito arbustivo denso; ramillas amontonadas hacia los extremos, 1,5-9 mm en diámetro; tallos nuevos verde-amarillentos o café-oro con un indumento denso de pelos cortos y rígidos. Hojas dispuestas en forma de espiral; pecíolo corto, grueso, 0,5-1,5 mm de largo (Figura 3a), diminutamente tomentoso con pelos rígidos y erectos; lámina ampliamente ovada a ampliamente elíptica, ápice obtuso, o algunas veces redondeado, o agudo o con mucrones caducifolios negruscos, redondeada a subcordada en la base, 4-18 x 2-13 mm, margen generalmente con pocos dientes pequeños. Inflorescencia densa, sésil, con pocas flores y agrupada en las axilas, pétalos color burdeo intenso (Figura 3b). Cápsula ovoide, 5-6 x 4,5- 6 mm. Dos semillas, 4-5 x 2-2,5 mm, rodeadas por un arilo rojo (Figura 3 c-d) (Hoffmann 1995; Hechenleitner *et al*, 2005).

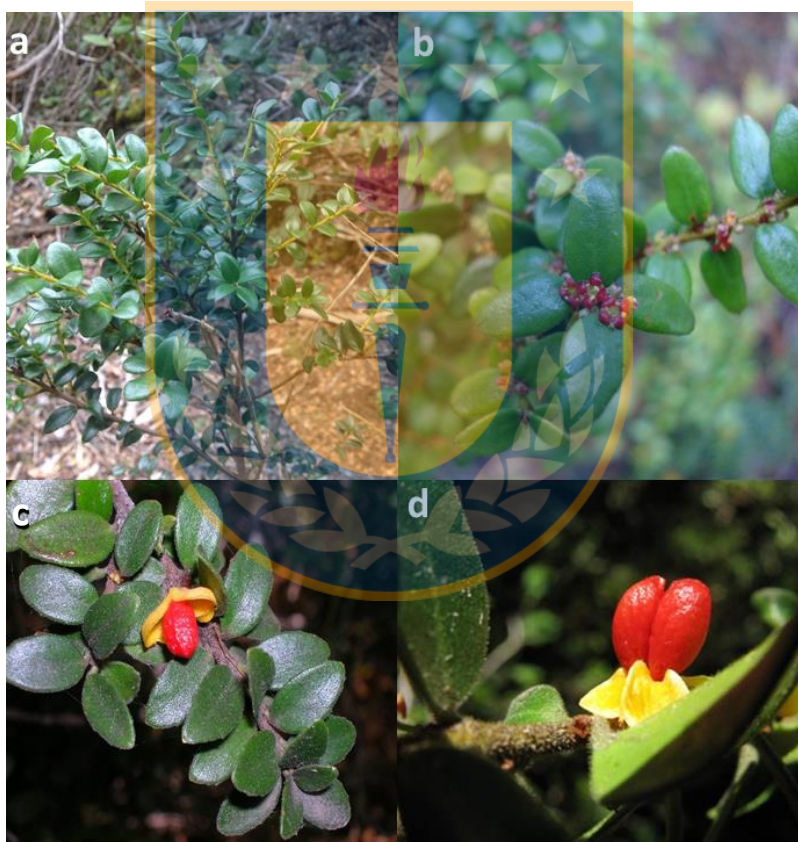


Figura 3. *Maytenus chubutensis*, Maitén del Chubut. A) Hojas y tallos verde amarillentos. B) Flores pequeñas. C- D) Fruto ovoide con dos semillas en forma de arilo.

En Chile, se distribuye en la Cordillera de los Andes y de la Costa desde la Región Metropolitana (provincia de Melipilla, 34° 08' S) hasta la región de Los Lagos (provincia de

Osorno, 40°47' S) (Figura 4) (Hechenleitner *et al*, 2005). Esta especie se asocia con bosques de *Nothofagus*, pero también puede crecer junto con *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch y *Austrocedrus chilensis*. En todos estos bosques crece como arbusto asociado al sotobosque formando densos matorrales (P. Becerra, comunicación personal, 2011; Ministerio del Medio Ambiente, 2012).

En el Parque Nacional Laguna del Laja, *Maytenus chubutensis* se encuentra asociado al bosque de *Austrocedrus chilensis*, ocupando el sotobosque y con baja cantidad de individuos.

Debido a su distribución y abundancia, la especie *Maytenus chubutensis* no fue considerada según el criterio de la UICN, como una especie en categoría de amenaza, por lo tanto, es considerada, según el Reglamento de Clasificación de Especies Silvestres (RCE), como de “Preocupación menor (LC)”, a pesar de encontrarse en poblaciones muy poco densas a lo largo de Chile. En cuanto a *Orites myrtoidea*, es considerada una especie en categoría “Casi amenazada (NT)” (Reglamento de Clasificación de Especies, Ministerio del Medio Ambiente, 2016), además de ser hasta la fecha, una especie muy poco estudiada así como también lo es *Maytenus chubutensis*.

O. myrtoidea y *M. chubutensis* son especies con problemas de conservación. Hay escasos estudios realizados en *O. Myrtoidea* hasta la fecha, y según Echeverría & Rodríguez en 2014, éstos indican que se ha logrado reproducción por semillas y que a pesar de poseer éstas un alto grado de germinación, no ha sido posible establecer plántulas en invernadero. Además, no hay información acerca de propagación por medio de estacas. En cuanto a *M. chubutensis*, la información es nula con respecto a su reproducción y establecimiento *ex situ*.

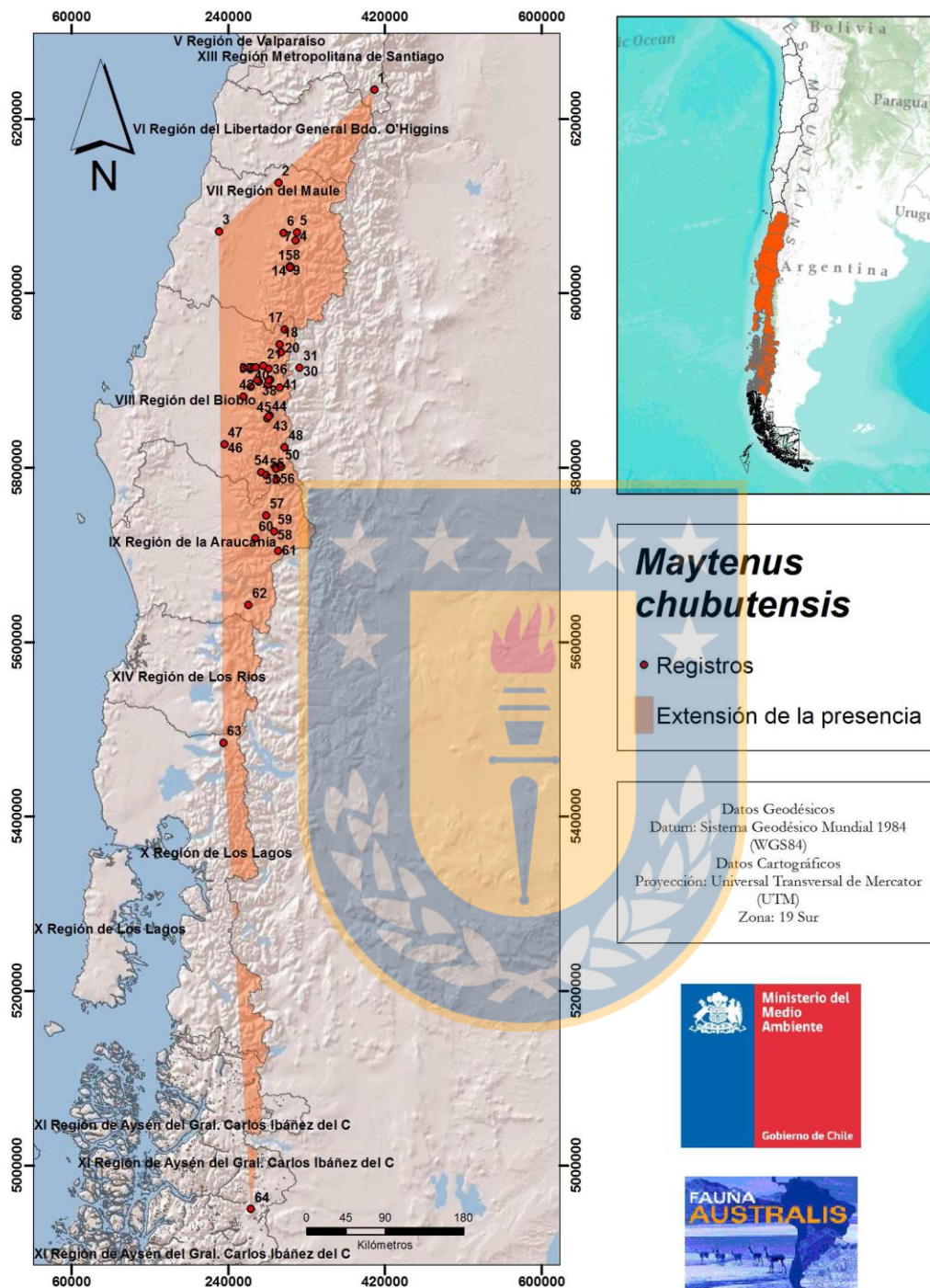


Figura 4. Distribución de la especie *Maytenus chubutensis* en Chile. Fuente: Ministerio del Medio Ambiente 2016.

2.1. Características edafoclimáticas del Parque Nacional Laguna del Laja

El Parque Nacional Laguna del Laja es un área protegida que comprende al Volcán Antuco, La Sierra Velluda y La Laguna Laja. El Volcán Antuco que corresponde a un estratovolcán mixto y compuesto, de composición fundamentalmente basáltica y andesítico-basáltica, cuya actividad se inició a comienzos del Pleistoceno superior, ca. 130.000 a A.P (Thiele *et al*, 2008). Consta de dos unidades principales: un primer edificio volcánico (Antuco 1) que culminó con la formación de un anfiteatro y un cono central posterior (Antuco 2), el cual se desarrolló en su interior (Brüggen, 1914; Vegara y Katsui, 1969; Thiele *et al*, 1998).

En Chile, la actividad volcánica produce depósitos que provocan importantes cambios en el suelo, pudiendo afectar negativamente la vegetación (Ávila, 2014). Los suelos volcánicos están caracterizados por poseer una gran cantidad de materia orgánica, pH bajo, alto contenido de aluminio (Al), y altas concentraciones de fósforo total (P) aunque con baja disponibilidad de fósforo (P). En estos suelos, este elemento está fuertemente adsorbido por los coloides del suelo; y la falta de P es una de las principales limitaciones del establecimiento y crecimiento de las plantas (Borie & Zunino, 1983; Borie *et al.*, 1989; Delgado *et al*, 2015).

El fósforo forma parte de las nucleoproteínas y fosfolípidos, y tal vez la función más importante de este nutriente es que a través de los grupos fosfatos, constituye el principal agente de transferencia de energía en el metabolismo de la planta. Las deficiencias de P, producen diferentes anomalías en el metabolismo y desarrollo de las plantas (Donoso, 1990).

El fósforo es un nutriente comúnmente limitante para el crecimiento de plantas en muchos suelos, incluyendo suelos de Chile, suelos de cenizas volcánicas, principalmente derivados Andisoles y Ultisoles que se caracterizan por un alto contenido de fósforo total (Redel *et al*, 2008).

El nitrógeno, después de C, H, y O, es el elemento más común encontrado en los árboles. Es un compuesto que está presente en proteínas, aminoácidos, y muchas vitaminas.

Debido a que el nitrógeno es un componente de múltiples sustancias, las deficiencias de este nutriente significan interferencias con el crecimiento de las plantas (Donoso, 1990).

La vida vegetal en un sistema empobrecido de nutrientes, está asociado a una gama de mecanismos de adaptación para adquirir y utilizar el fósforo y micronutrientes apenas disponibles (Denton *et al.*, 2007). Las plantas son capaces de responder a la falta de P cambiando su arquitectura radical, incluyendo su morfología, topología y patrones de distribución. Un aumento de la relación raíz/tallo, ramificación lateral, elongación radical y formación de pelos radicales son comúnmente observados en plantas con deficiencias nutricionales, incluyendo deficiencias en P (Lambers *et al.*, 2008). Es así como las especies pertenecientes a la familia *Proteaceae* ha desarrollado estructuras en sus raíces denominadas raíces proteoideas (RP) o “cluster roots (CR)”, que son una estrategia para la adquisición de P desde el suelo. Estas estructuras aumentan la superficie disponible para absorber nutrientes (Lambers *et al.* 2002, 2006; Zúñiga- Feest *et al.*, 2015) y exudan una gran cantidad de carboxilatos y fosfatasas (Gilbert *et al.* 1999; Neumann *et al.* 1999; Redel *et al.* 2008; Zúñiga- Feest *et al.*, 2015). El factor principal que induce esta formación de raíces es la deficiencia de P (Zúñiga *et al.*, 2015). *Orites myrtoidea* es capaz de formar abundantes CR en condiciones naturales en suelos de origen volcánico (pumacita), exudando citrato y malato (Ávila, 2014).

2.2. Cultivo de tejidos vegetales

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas (Segretín, 2008). En este sentido, la totipotencialidad celular, es caracterizada por un grupo de células vegetales, denominados meristemas (presentes en distintos órganos de la planta), que son capaces de generar tejidos nuevos y posteriormente, un organismo completo. Teoría planteada por

Gottlieb Haberlandt en 1902, cuando aisló células y tejidos de plantas superiores y las colocó en soluciones nutritivas para estimular su crecimiento. Por lo tanto, Haberlandt fue quién propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas (Radice, 2004), dando origen a la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, siendo el pionero en esta técnica.

Cuando a estos tejidos o células vegetales se les proporciona un medio de cultivo adicionado con hormonas vegetales en condiciones asépticas, puede dividirse en dos tipos de respuestas:

1) Una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento de tipo tumoral, dando lugar a células indiferenciadas denominadas callos, quienes en condiciones adecuadas pueden generar órganos o embriones somáticos.

2) Una respuesta morfogénica por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones somáticos (Segretín, 2008).

Entonces, el cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta, denominada explante, como un ápice, hoja o segmento de ésta misma, tallo, meristema, embrión, semilla, anteras, y depositarla en un medio de cultivo nutritivo, con o sin hormonas, que puede ser sólido, semilíquido o líquido, en condiciones de asepsia, donde, finalmente, se regenerarán nuevas plantas (Figura 5).

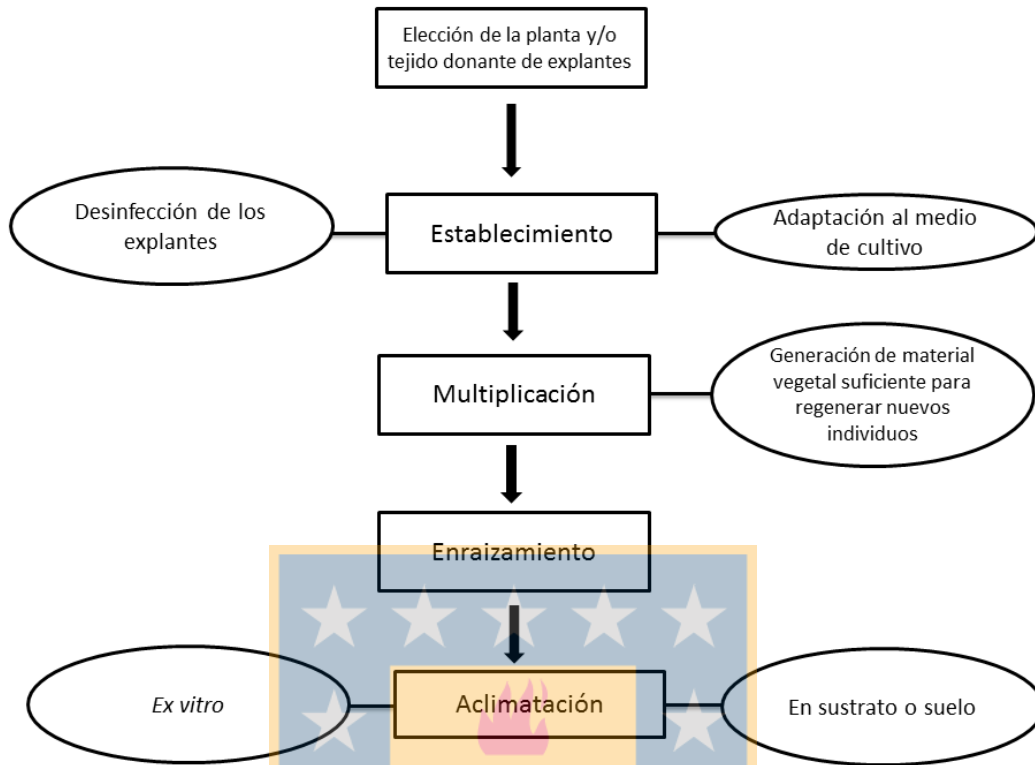


Figura 5. Etapas de la regeneración de una planta a partir de un explante mediante la técnica de cultivo *in vitro*.

Para llevar a cabo un cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es necesario contar con un medio de cultivo que puede ser sólido o semisólido y líquido, que deberá estar formado con algún agente gelificante como agar, además de poseer en su contenido, macro y micronutrientes esenciales, hidratos de carbono como la sacarosa y vitaminas, para que la planta pueda sobrevivir, además de contener agentes reguladores de crecimiento como las hormonas vegetales.

Los factores físicos también juegan un rol determinante en el establecimiento de los explantes. La luz y la temperatura han sido factores ampliamente estudiados (Roca & Mroginski, 1991).

La incubación de los explantes se hace en una sala *ad hoc* que debe ser de acceso restringido. El área de incubación debe proporcionar condiciones adecuadas en cuanto a temperatura, luz y humedad relativa (Seemann, 1993; Weldt, 2008).

Además, dentro de las técnicas de propagación asexual, existe la propagación por estacas, donde solo es necesario que se forme un nuevo sistema de raíces adventicias, ya que existe un sistema caulinar en potencia y una yema. Esta capacidad para regenerar la estructura entera de la planta, depende, de dos características: Una es la totipotencia celular; la otra, es la desdiferenciación celular, es decir, la capacidad de células maduras de volver a una condición meristemática y desarrollar un punto de crecimiento nuevo (Hartmann *et al*, 1997; López 2007).

Para el caso de las especies chilenas de Proteaceae como *Orites myrtoidea* y la Celastraceae *Maytenus chubutensis* no hay estudios que profundicen su micropropagación, por lo que se postula que el cultivo *in vitro* es una técnica válida para la multiplicación masiva con fines de conservación de estas especies (Seemann, *et al*, 2013).

De acuerdo a lo anterior y considerando la necesidad de seguir realizando estudios botánicos para un mejor conocimiento de la biodiversidad vegetal presente en Chile y contando con un área de protección en la Provincia de Biobío, como el Parque Nacional Laguna del Laja, en dónde se distribuyen naturalmente ambas poblaciones referidas, en un ecosistema que presenta evidente fraccionamiento y pérdida de hábitat debido a varios factores relacionados con la intervención antrópica (Hechenleitner *et al*, 2005), se hace necesario realizar estudios acerca de la reproducción y germinación de ambas especies, de manera que con esta información base se pueda contribuir de manera preliminar con planes de restauración para ambas especies nativas.

3. HIPÓTESIS

La reproducción sexual y asexual *ex situ* de *Orites myrtoidea* y *Maytenus chubutensis* es factible bajo condiciones controladas de laboratorio e invernadero.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo general*

Propagar individuos de las especies nativas *Orites myrtoidea* y *Maytenus chubutensis* mediante técnicas de cultivo de tejido *in vitro* y de reproducción sexual y asexual bajo condiciones controladas de laboratorio e invernadero.

4.2. *Objetivos específicos*

- Estudiar la capacidad de micropropagación de distintos tejidos de *O. myrtoidea* y *Maytenus chubutensis*.
- Estudiar la capacidad germinativa de estas dos especies.
- Comparar la capacidad de formación de esquejes de las dos especies.
- Relacionar la capacidad de formación de esquejes y de germinación de ambas especies, con la concentración de nutrientes en el suelo y en el tejido vegetal respectivo, desde los distintos sitios de colecta.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Descripción de los sectores de muestreo

El material vegetal fue colectado en marzo de 2016, en el Parque Nacional Laguna del Laja (S 37°26'; W 71°19') ubicado en la Comuna de Antuco, Región del Bío- Bío, en tres sectores: Sector 1 (S 37° 23.386'; W 71° 24. 809') "El Torbellino", sector 2 (S 37° 23.339'; W 71° 24.768') "Asociación *Austrocedrus- Orites- Maytenus*" y sector 3 (S 37° 23.289'; W 24. 538') "Escorial bajo", donde se colectó semillas, yemas axilares y hojas de las especies de *Orites myrtoidea* y *Maytenus chubutensis* por cada sector de muestreo (Fig. 6).

i) Sector 1 "El Torbellino"

El estrato arbóreo está dominado por un bosque de *Austrocedrus chilensis*, con presencia en el sotobosque de *Maytenus chubutensis*, *Orites myrtoidea*, *Fuchsia magellanica*, *Aristotelia chilensis*, *Lomatia hirsuta* e individuos de la especie introducida *Rosa rubiginosa* L.

ii) Sector 2 "Asociación *Austrocedrus- Orites- Maytenus*"

Presencia de un pequeño bosque dominando el estrato arbóreo por *Nothofagus dombeyi* asociado a *Austrocedrus chilensis*. Además, se observan individuos de *Hydrangea serratifolia* y *Rosa rubiginosa*. *Maytenus chubutensis* crece asociado a *Orites myrtoidea* en el sotobosque, donde también hay individuos de *Lomatia hirsuta* y *Raukaua laetevirens* y *Aristotelia chilensis*.

iii) Sector 3 "Escorial bajo"

Es un sector que corresponde a sedimentos volcánicos del tipo brecha y toba, dejados por la última erupción del Volcán Antuco, denominado en general como escoria

volcánica, donde no existe composición vegetal. Se presentan sólo algunos individuos de *Orites myrtoidea* que se encuentran totalmente expuestos al sol.

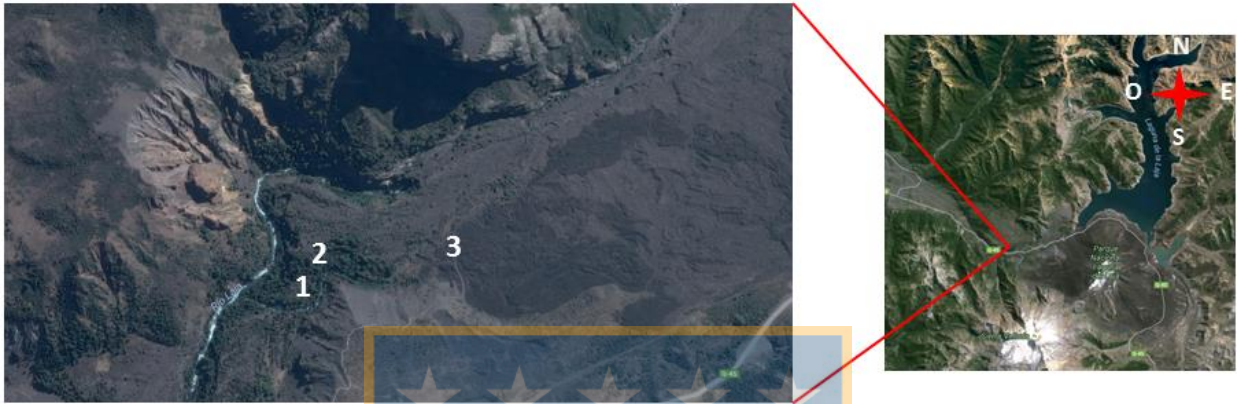


Figura 6. Sectores de muestreo en el Parque Nacional Laguna del Laja. Sector 1: El Torbellino ($37^{\circ} 23' 23.161''\text{S}$; $71^{\circ} 24' 48.538''\text{W}$). Sector 2: Asociación *Austrocedrus- Orites- Maytenus* ($37^{\circ} 23' 20.339''\text{S}$; $71^{\circ} 24' 46.08''\text{W}$). Sector 3: “Escorial bajo” ($37^{\circ} 23' 17.34''\text{S}$; $71^{\circ} 24' 32.281''\text{W}$).

5.2. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el establecimiento *in vitro* de yemas axilares y hojas fue Medio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con la hormona vegetal 1 mg/L BAP (Bencilaminopurina) con adición de sacarosa 3%, utilizando como gelificante agar al 0.7%.

Se realizaron dos ensayos de germinación de semillas de *O. myrtoidea*. Para el primero de ellos, se utilizó el medio de cultivo Woody plant medium (WPM) formulado por Lloyd & McCown (1981), sacarosa 3%, utilizando como gelificante agar al 0.7%. Para el segundo ensayo, se utilizó medio MS con adición de sacarosa 3%, utilizando como gelificante agar al 0.7%.

El medio de cultivo utilizado para las semillas de *M. chubutensis* se realizó según Bueno *et al.* (2009), MS con adición de sacarosa 3%, utilizando como gelificante agar al 0.7%

Todos los medios de cultivo utilizados fueron ajustados a un pH de 5.7 ± 1 . Luego, los medios fueron llevados a un horno microondas para licuarlos y luego, dispensar 20 mL del medio de cultivo en frascos de vidrios de 100 mL tapados con papel aluminio para posteriormente llevar a autoclave y ser esterilizados a 121°C , presión de 1 atmósfera durante 20 minutos.

5.3. Tratamiento pre germinativo

Las semillas fueron colectadas en los tres sectores de muestreo mencionados anteriormente. Éstas fueron almacenadas durante 5 meses en refrigerador a 5°C .

Antes de someter a las semillas a este tratamiento, se les eliminó el ala, en el caso de *O. myrtoidea*, y en el caso de *M. chubutensis* se le eliminó el arilo. Las semillas fueron dejadas en una solución con 62.5 mg/mL de ácido giberélico. Se dejaron durante 48 horas y luego se llevaron bajo cámara de flujo laminar para realizar el proceso de desinfección y la posterior siembra.

5.4. Desinfección del material vegetal

El material vegetal de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis* (yemas axilares y hojas) fueron lavadas con agua de la llave (de manera abundante) para eliminar el material externo al que se utilizó. Posteriormente, el material vegetal fue depositado en vasos precipitados para luego lavarlos con alcohol 70% por 30 segundos en agitador magnético. Luego, se dejó en cloro 10% por 10 minutos. Finalmente, se realizaron enjuagues 3 veces con agua desionizada estéril.

Las semillas de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis* se llevaron a cámara de flujo laminar y posteriormente se lavaron con agua desionizada estéril. Luego, se lavaron con una solución de agua desionizada estéril con captan 2,7 g/L 1 hora en agitación.

Posteriormente, fueron lavadas con agua desionizada estéril para luego dejarlas en etanol 70% durante 30 segundos, seguido de un lavado con agua desionizada estéril y finalmente

se dejaron por 12 minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5%, para luego realizar tres enjuagues con agua desionizada estéril.

Finalmente, para el primer ensayo de germinación, al final de la desinfección se utilizó el protocolo de Wu & Toit (2012) con modificaciones para evitar la exudación de fenoles que consistió depositar las semillas en una solución antioxidante, compuesta por 25 mg/L de ácido cítrico y 37.5 mg/L de ácido ascórbico (filtrados previamente bajo cámara de flujo laminar) durante 15 minutos previo a la siembra bajo condiciones de asepsia. En este ensayo, se utilizaron semillas de los tres sectores de muestreo (sector, 1, 2 y 3). Para el segundo ensayo de germinación, no se utilizó la solución antioxidante y se utilizaron semillas de sólo dos sectores de muestreo, sector 2 y 3, ya que no se contaba con material disponible del sector 1.

La esterilización en superficie de las semillas de *M. chubutensis* se realizó según Bueno *et al.* (2009) y consistió en dejarlas en etanol al 96% durante 5 segundos, 20 minutos en hipoclorito de sodio al 2% y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

5.5. Establecimiento *in vitro*

Los ensayos fueron realizados bajo cámara de flujo laminar. Para ello, se tomó cada yema axilar de radial enano y se cortó en la parte inferior de ésta, siempre cuidando las medidas de asepsia. Luego se tomó cada yema de radial enano y fueron depositadas en los frascos de vidrio que contenían el medio de cultivo con 1 mg/L de BAP.

Posteriormente, se tomaron hojas de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis*, las cuales fueron cortadas en cuadros de aproximadamente 5 mm cada hoja y fueron depositadas en frascos que contenían medio de cultivo con 1.0 mg/L de BAP.

Los explantes (yemas axilares, hojas y semillas) utilizados fueron llevados a cámara de crecimiento, con condiciones controladas de temperatura a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz día/noche, durante 1 mes, sin embargo, se evaluaron semanalmente los cultivos.

Para cultivos *in vitro*, la unidad muestral fue de 10 frascos con 5 yemas axilares de *O. myrtoidea* y para hojas de ambas especies, la unidad muestral fue de 3 placas con 8 cuadros foliares.

El primer ensayo de germinación contempló los tres sectores de muestreo, siendo la unidad muestral de 11 frascos con 4 semillas por frasco para *Orites myrtoidea*. Para el segundo ensayo de germinación, se utilizó como unidad muestral 10 frascos con 2 semillas de *O. myrtoidea* por cada frasco de medio de cultivo. En cuanto al ensayo de germinación de *M. chubutensis*, se utilizó 14 frascos con 5 semillas cada uno.

5.6. Germinación *in vitro* y en cámara de germinación

Cuando comenzó a emerger la raíz de las semillas *in vitro*, éstas fueron cambiadas a la cámara de germinación ya que se comenzaron a contaminar. Éstas fueron lavadas con el mismo protocolo de desinfección para su establecimiento y luego dejadas en el papel filtro y tapadas con campanas de vidrio. Se dejaron 4 semillas bajo campanas de vidrio, realizado 3 repeticiones para el sector 1. Para el sector 2, sólo se lograron rescatar 8 semillas, por tanto se dejaron 4 semillas por campana, logrando realizar 2 repeticiones.

5.7. Ensayo en cámara de germinación

Se montó otro tipo de ensayo de germinación llamado Tanque Copenhagen según metodología de Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (2000) que consistió en el llenado de un tanque de aluminio contenedor de agua que posee un termostato que controla la temperatura del agua ajustada a 10°C, donde en su parte superior posee 10 celdas de vidrio de aproximadamente 100 x 15 cm cada una. Se cortaron círculos de papel filtro de aproximadamente 10 cm y rectángulos de 23x5 cm de este mismo. El papel filtro rectangular, llamado “mecha”, se dobla por la mitad y luego en sus extremos para que una parte de este descienda y tenga contacto con el agua, de manera tal que el papel filtro sirva para mantener la humedad apropiada, ya que sube por capilaridad. Luego se depositó encima de la mecha el papel filtro circular, y se le adicionó

una capa de fungicida Captan, distribuyéndolo de manera uniforme por toda la superficie del papel filtro. Luego las semillas se sembraron encima del papel, y posteriormente fueron tapadas con una campana de vidrio, que en su extremo superior posee un orificio, para evitar la contaminación y evaporación. Las semillas permanecieron bajo una intensidad lumínica de 8,125 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En relación al ensayo en cámara de germinación con semillas del sector 2, se utilizó 14 campanas con 4 semillas cada una para *O. myrtoidea*, y para *M. chubutensis*, se utilizaron 6 campanas con 4 semillas cada una.

5.8. Porcentaje y vigor en la germinación

Se determinó el porcentaje de germinación de las semillas germinadas en la cámara de germinación a los 38 días desde la siembra. En relación al porcentaje de germinación de las semillas *in vitro* éstas se determinaron a los 33 días desde la siembra para ambas especies, calculado por las semillas germinadas por las semillas sembradas, estimándolas en porcentaje.

Además, se evaluó el vigor de las semillas, a través de la velocidad de germinación (VG), propuesto por Kotowski en 1926 (Bueno *et al*, 2009), y el tiempo medio para alcanzar la germinación máxima (TM), propuesto por Edmond y Drapala en 1958 (Bueno *et al*, 2009). Para calcular ambos índices, se realizó la aplicación de las siguientes formulas:

$$VG = \frac{\sum C_i \times 100}{\sum C_i T_i}$$

$$TM = \frac{\sum C_i T_i}{\sum C_i}$$

Donde C_i : Número de semillas germinadas por día y T_i : Tiempo

Se evaluó un registro diario de todos los ensayos de germinación, dejando como criterio de evaluación si la semilla germinó. Desde el momento que se observó la emergencia del cotiledón contaba como semilla germinada.

5.9. Establecimiento en sustrato

Las 19 plántulas de los sector 1 y 2 pertenecientes al primer ensayo de germinación, una vez que alcanzaron alrededor de 4 cm, fueron trasplantadas a sustrato de tierra de hoja, turba y perlita (en proporción de 3:2:1 v/v, respectivamente), previamente autoclavado.

Se dejaron en almaciguera, con luz fría, tapadas con las campanas de vidrio durante 5 días para evitar el estrés del cambio de atmósfera. Luego se les sacó la campana, y se dejaron a temperatura ambiente.

5.9.1. Propagación por esquejes

Se utilizaron esquejes de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis* de 10- 14 cm de longitud, realizando el corte del tallo en bisel, con un ángulo de 45° justo por debajo del nudo (Parker, 2000; López *et al*, 2008). Posteriormente, se cortó el ápice del esqueje. Luego se lavó la parte inferior de éste con agua destilada, para posteriormente empaparlo con enraizante Anasac que contiene 0,15 grs de la hormona vegetal IBA (Ácido Indol butírico), Captan 6 grs, un fungicida y otros componentes (siguiendo las indicaciones del producto comercial). Finalmente, se plantaron los esquejes en sustrato de tierra, turba y vermiculita (en proporción de 3:2:1 v/v, respectivamente). Para los esquejes la unidad muestral fue de 7 por cada sector de muestreo.

5.9.2. Análisis de suelo

Para analizar el potencial nutricional para la planta, evaluando la disponibilidad de nutrientes. Además permite suministrar información de los nutrientes asimilables o disponibles para la planta (Azcón- Bieto & Talón, 2000). Por lo tanto, se realizó un análisis mineralógico del suelo en los tres sectores muestreados. En el sector 1 y 2, se tomaron muestras de suelo de 0 a 10 cm y de 10 a 20 cm de profundidad en 3 réplicas por cada sector, con excepción para el sector 3, se colectó muestras de 0 a 10 cm de profundidad, en 3 réplicas. El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto

de Ciencias Ambientales y Evolutivas de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia, donde se determinaron macro y micronutrientes: Fósforo, aluminio, calcio, magnesio, potasio y sodio.

5.9.3. Análisis nutricional de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis*

Las concentraciones de nutrientes foliares y la reabsorción de éstos, desempeñan un papel importante en la determinación de la eficiencia del uso de nutrientes en la hoja. Además, las concentraciones de nutrientes en las hojas senescentes también influyen en el ciclo de nutrientes de un ecosistema, donde pueden afectar la hojarasca, y por tanto, la descomposición de la hojarasca (Crews *et al.* 1995; Aerts & Chapin 2000; Kitayama *et al.* 2004; Wardle *et al.* 2009; Hayes *et al.*, 2014). El estudio de las concentraciones de nutrientes foliares, puede indicar como las plantas individualmente, hacen frente ante la baja de disponibilidad de nutrientes (Small 1972; Boerner 1984; Aerts & Chapin 2000; Hayes *et al.*, 2014). Por tanto, estos estudios son importantes, especialmente para el ciclo del nitrógeno (N) y el fósforo (P), los dos macronutrientes que más a menudo limitan la productividad de la planta (Elser *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2014). Por tanto, se colectaron hojas maduras (verdes y vigorosas) y hojas senescentes (amarillas y a punto de caerse) de diferentes individuos de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis* en los tres sectores muestreados, con excepción del sector 3, donde sólo se colectó hojas de *O. myrtoidea*. Éstas fueron guardadas en bolsas de papel. Posteriormente, fueron lavadas con abundante agua de la llave y se dejaron nuevamente en bolsas de papel y secándolas a temperatura ambiente. El análisis nutricional de nitrógeno, fósforo y aluminio se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia.

5.9.4. Análisis estadístico

Los resultados para los ensayos de germinación *in vitro*, *ex vitro*, y esquejes fueron realizados con ANOVA de una vía, utilizando Test de Tukey, con un nivel de confianza del 95%. Para el análisis de suelo y foliar se utilizó ANOVA de dos vías, con test de Tukey, con un nivel de confianza de 95%. Ambos análisis se realizaron utilizando el software STATISTICA versión 7.0.

6. RESULTADOS

Los ensayos realizados en el cultivo *in vitro* de yemas axilares de *O. myrtoidea*, presentaron 100% de contaminación a los tres días de establecer el cultivo (Figura 7) además de presentarse oxidación en todas las yemas. En relación al cultivo de hojas de *O. myrtoidea* y *M. chubutensis*, todas presentaron necrosis (Figura 8).



Figura 7. Contaminación con hongos en cultivo de yemas axilares de *Orites myrtoidea*.

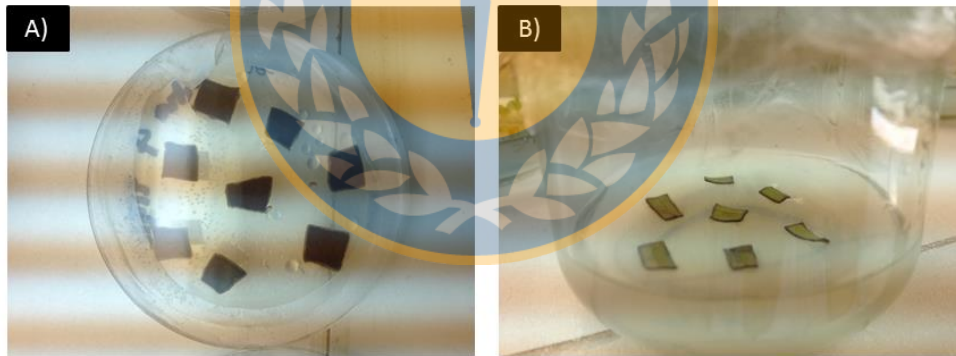


Figura 8. Cultivo *in vitro* de hojas de 5 mm x 5 mm en medio de cultivo 1 mg/L BAP. A) hojas necrosadas de *Orites myrtoidea*. B) Hojas necrosadas de *Maytenus chubutensis*.

En cuanto a la germinación *in vitro* de semillas *Orites myrtoidea* en WPM (primer ensayo), éstas presentaron 100% de contaminación en el sector 3, después de una semana de ser sembradas. De modo contrario, tres frascos del sector 1, lograron sobrevivir (27%) con este medio de cultivo. En relación al sector de muestreo 2, sólo un 18% logró sobrevivir.

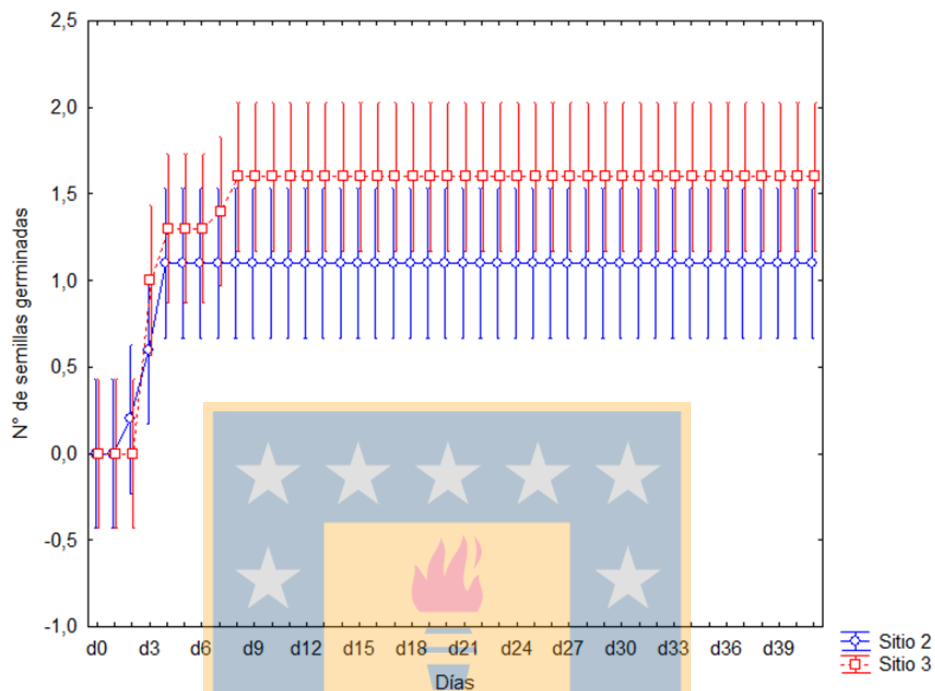


Figura 9. Germinación *in vitro* de *Orites myrtoidea* en medio de cultivo MS para los sectores de muestreo 2 y 3.

La germinación *in vitro* del segundo ensayo en medio MS para el sector 2 fue cercano a 2 semillas germinadas (60%) a los 33 días de realizada la siembra. Para el sector 3 las semillas germinaron casi en su totalidad (85%) a los 33 días (Figura 9). Además, el tiempo para alcanzar la velocidad máxima fue 33 y el vigor de las semillas fue de 3% para el sector 2 y 3.

Las semillas germinadas *in vitro* que fueron rescatadas desde el medio de cultivo WPM y que luego fueron transferidas a la cámara de germinación *ex vitro*, lograron establecerse en su mayoría (92%) pertenecientes al sector 1 y en su totalidad en el sector 2 (Fig.10). En el día 7, las semillas del sector 2 se establecieron y ya se encontraban todas germinadas.

De modo contrario las semillas del sector 1, éstas comenzaron a establecerse al día 15. Estas, una vez que alcanzaron un tamaño de 4 cm, se transfirieron a sustrato (Fig. 13).

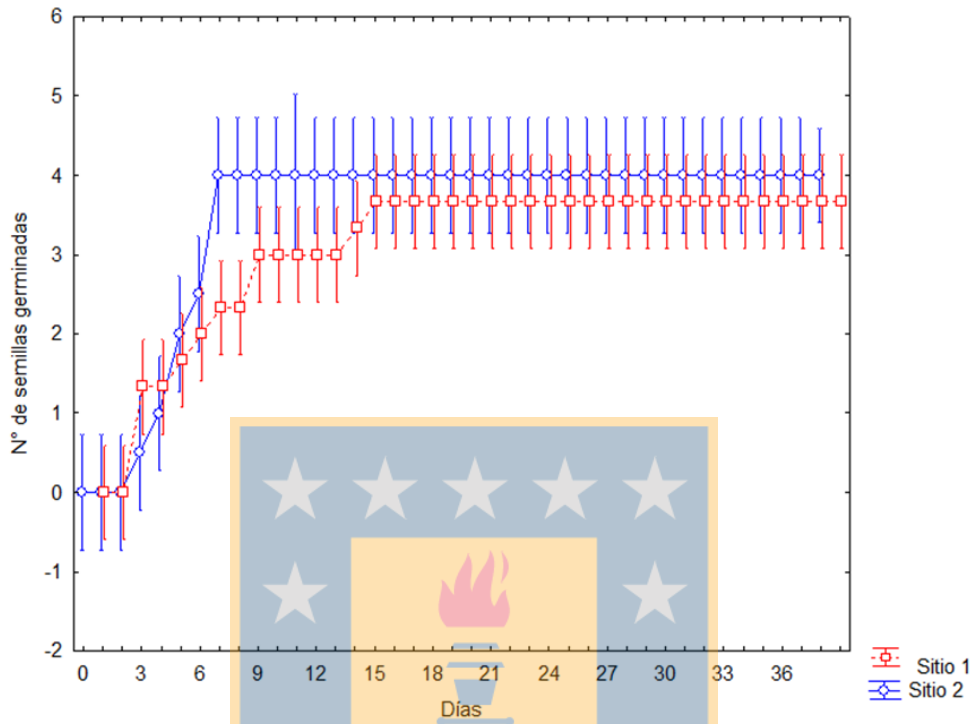


Figura 10. Germinación *ex vitro* con semillas de *Orites myrtoidea* rescatadas desde el medio de cultivo WPM, pertenecientes al sector 1 y 2.

En relación al segundo ensayo de germinación *ex vitro* en cámaras de germinación, semillas pertenecientes al sector 2, hubo un retraso significativo en la germinación, ya que éstas al día 35, lograron establecerse (Fig. 11 y 12).

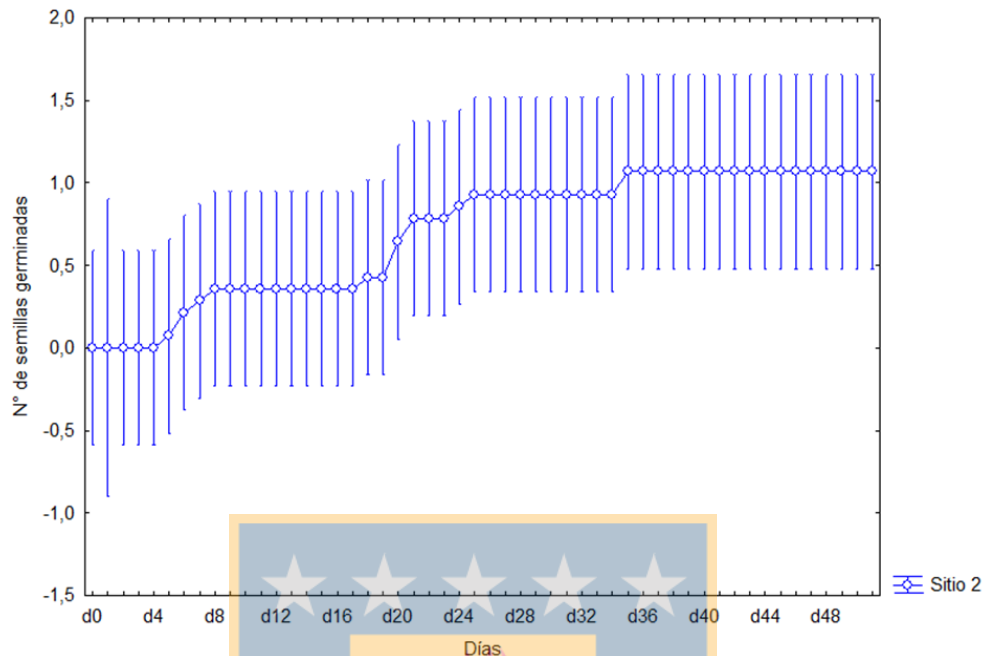


Figura 11. Segundo ensayo de germinación *ex vitro* de semillas de *Orites myrtoidea* pertenecientes al sector 2.



Figura 12. Ensayo en cámara de germinación. A la izquierda, primera fila, semillas de *Maytenus chubutensis*, a la derecha, tres filas de semillas de *Orites myrtoidea*.

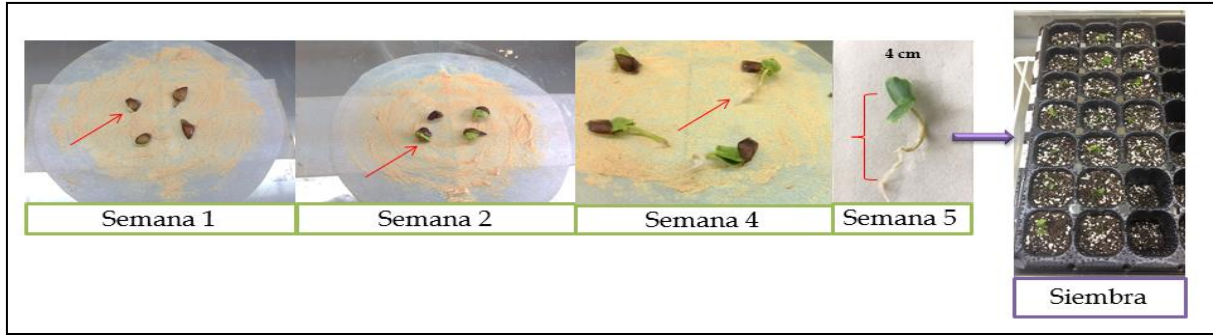


Figura 13. Estados del desarrollo de la germinación observados en *Orites myrtoidea* hasta el momento de su siembra. La primera figura observada a la izquierda, indica el momento en el que emerge la radícula.

Los esquejes de *O. myrtoidea* del sector 3 presentaron un 100% de mortalidad (Fig. 14) a la tercera semana de ser plantados, en contraste con el sector 1, donde a la quinta semana de evaluación, el 70% de los esquejes presenta vigorosidad. Y finalmente, los esquejes del sector 2, el 29% de los esquejes presenta vigorosidad. Todos los esquejes realizados en *M. chubutensis* a la segunda semana de establecerlos en el sustrato tubieron un 100% de mortalidad.

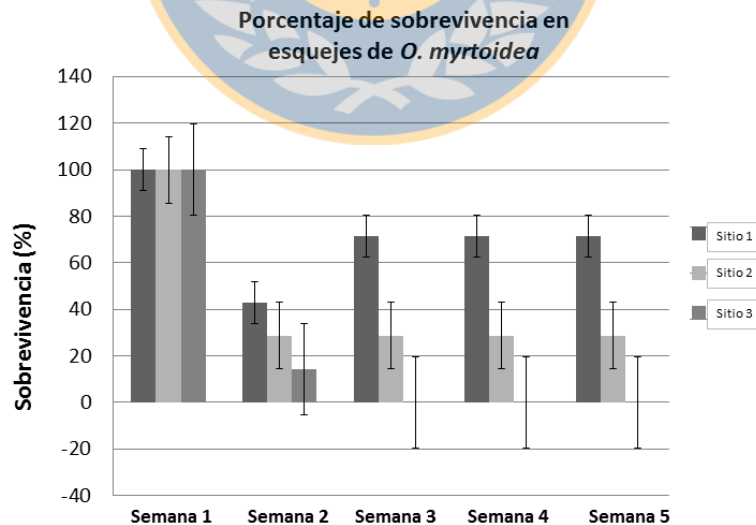


Figura 14. Se observa el porcentaje de sobrevivencia de los esquejes realizados en *O. myrtoidea*

Finalmente, en relación al análisis mineralógico del suelo, se observó que la disponibilidad del fósforo (P- Olsen) en la profundidad de 0 a 10 cm, fluctuó en un rango de 23.473 mg kg⁻¹ y 26.429 mg kg⁻¹ para el sector 1 y 2 respectivamente. El sector 3 presentó una disponibilidad de 4.878 mg kg⁻¹, representando el valor más bajo de la disponibilidad de fósforo en el suelo (Tabla 1). En relación al fósforo total (P total), se encontraron diferencias significativas entre los tres sectores de muestreo y con la disponibilidad del nitrógeno mineral (N min), también se encontró diferencias significativas para el sector 2 (Tabla 1). En la tabla 1, también pueden observarse diferencias en el contenido de Ca en los tres sectores.

En relación a la profundidad de 10 a 20 cm, no se encontraron diferencias significativas para el P- Olsen. Para el P total, sí se encontraron en los dos sectores de muestreo (sector 1 y 2), encontrando también diferencias en N min (Tabla 2).

En el análisis foliar se observó que hay diferencias significativas para *O. myrtoidea* en hojas senescentes y maduras (Tabla 3). Además, se observó en la relación N/P que *O. myrtoidea* está limitada por P en hojas maduras, y casi limitada por este nutriente en la hoja senescente. En el caso de *M. chubutensis*, también se encontraron diferencias significativas (Tabla 4). En esta especie, se observó que maitén está limitada por nitrógeno en hojas senescentes y maduras.

Esto se traduce en que la relación N/P foliar es un indicador de suma importancia en la limitación de nutrientes en ecosistemas terrestres (Gallardo *et al* 2012). Hay estudios en los que se exponen valores de dicha relación, como lo reportado por Tessier & Raynal (2003), donde valores menores a 12.5 representaría una limitación por N y por el contrario, valores mayores a 12.5 representaría una limitación por P. Pero a su vez, estos índices pueden variar, como por ejemplo en ambientes acuáticos, donde por regla general, si la relación N/P es menor a 16, se esperaría que el factor limitante sea P, cuando la relación N/P= 16, ninguno de los dos nutrientes es el limitante, y cuando la relación N/P es mayor a 16, el nutriente limitante debería ser N (Redfield, 1958; Rivas *et al.*, 2009).

Tabla 1. Características químicas del suelo en tres sectores de muestreo en Parque Nacional Laguna del Laja entre 0 a 10 cm de profundidad.

Muestra	Profundidad	P-Olsen	pH	Ca	Mg	K	Na	Al	Suma de Bases	CICE	Sat Al	P total	N min	
		mg·kg ⁻¹	H ₂ O	CaCl ₂	cmol+ kg ⁻¹						%	(mg·kg ⁻¹)		
Sector 1	0- 10	23.473	5.910	5.060	11.878	1.705	0.295	0.036	0.051	13.915	13.966	0.680	559.650 b	26.133
Sector 2	0- 10	26.429	6.010	5.530	21.335	3.811	1.302	0.293	0.025	26.741	26.767	0.096	740.063 a	37.100 d
Sector 3	0- 10	4.879	6.047	5.237	0.688	0.049	0.090	0.020	0.095	0.847	0.942	20.870	276.483 c	20.767

Letras distintas representan diferencias significativas, según Test de Tukey (p<0,05).

Tabla 2. Características químicas del suelo en tres sectores de muestreo en Parque Nacional Laguna del Laja entre 10 a 20 cm de profundidad.

Muestra	Profundidad	P-Olsen	pH	Ca	Mg	K	Na	Al	Suma de Bases	CICE	Sat Al	P total	N min	
		mg·kg ⁻¹	H ₂ O	CaCl ₂	cmol+ kg ⁻¹						%	(mg·kg ⁻¹)		
Sector 1	10 - 20	18.756	6.047	5.043	5.847	0.976	0.189	0.029	0.152	7.042	7.194	6.195	427.067 b	21.467
Sector 2	10- 20	18.898	6.167	5.600	13.174	3.494	0.993	0.118	0.035	17.779	17.814	0.226	612.200 a	30.333 c

Letras distintas representan diferencias significativas, según Test de Tukey (p<0,05)

Tabla 3. Concentración de nitrógeno (N), fósforo (P), aluminio (Al) y relación nitrógeno- fósforo en hojas maduras y senescentes de las especies *Orites myrtoidea* en los tres sectores de muestreo.

Especie	Hoja	N	P	Al	N/P
<i>Orites myrtoidea</i>	Madura	8.1150 b	0.4157 b	1.3871 b	19.5502 a
<i>Orites myrtoidea</i>	Senescente	3.3550 b	0.2064 b	2.7608 b	18.5918 a

Letras distintas representan diferencias significativas, según Test de Tukey (p<0,05)

Tabla 4. Concentración de nitrógeno (N), fósforo (P), aluminio (Al) y relación nitrógeno- fósforo en hojas maduras y senescentes de las especies *Maytenus chubutensis* en los tres sectores de muestreo.

Especie	Hoja	N	P	Al	N/P
<i>Maytenus chubutensis</i>	Madura	4.1720 c	0.4445 bc	0.0329 b	9.6989 a
<i>Maytenus chubutensis</i>	Senescente	4.2420 c	0.3144 bc	0.1420 bc	13.7723 a

Letras distintas representan diferencias significativas, según Test de Tukey (p<0,05)

7. DISCUSIÓN

La contaminación de los explantes de yemas axilares de *O. myrtoidea* puede explicarse por un protocolo de desinfección deficiente, un ambiente poco aséptico o una mala manipulación *in vitro*. Se debe mejorar el protocolo de desinfección para disminuir la contaminación por hongos y bacterias. Además, la contaminación puede ser causada por microorganismos que se encuentran al interior de la planta y no pueden ser eliminados por esterilización externa (Hartmann & Kester, 1989; Pierik, 1990)

En relación a la micropropagación realizada en hojas de ambas especies, es probable que el medio de cultivo utilizado, no fuera el más idóneo para inducir callogénesis. Cuellar (1997), indujo callogénesis, agregando 3 mg/L de 2,4- D en caña de azúcar. Se deben realizar más ensayos probando con diferentes hormonas, como 2,4- D en una alta concentración, o aumentar la concentración de BAP para obtener resultados deseados de proliferación. Además, es probable que se deba realizar un protocolo para prevenir la exudación de fenoles en yemas y hojas.

En la germinación *in vitro*, se esperaba que al utilizar el medio de cultivo (Woody Plant Medium) WPM, se obtuviera un 60% de sobrevivencia a los 45 días, como lo indicado por Barrientos (2013), quien realizó germinación de Avellanillo (*Lomatia dentata*) y radial (*Lomatia hirsuta*), realizando previamente protocolos de desinfección. En nuestros resultados, si bien las semillas que sobrevivieron a la contaminación, lograron germinar, el problema de contaminación es clave en el establecimiento *in vitro*. Con el medio de cultivo MS, *Orites myrtoidea* logró germinar en un 60% para el sector 2 "Asociación *Austrocedrus-Orites-Maytenus* y para el sector 3 Escorial bajo, un 85%. Estos valores podrían indicar que sí es posible establecer germinación *in vitro* para esta especie, pero se debe considerar, para obtener mejores resultados, realizar un buen tratamiento pre-germinativo como lo fue la solución con ácido giberélico. De acuerdo a estos resultados, no sería

necesaria la utilización de un medio especializado como el WPM; el medio MS con vitaminas resultó ser eficiente en nuestro caso. Es probable que las semillas de *Orites* que no lograron germinar en el segundo ensayo, correspondiente a la cámara de germinación *ex vitro*, se hayan encontrado en estado de dormancia, algo propio de estas especies de zonas cordilleranas que proporciona un mecanismo de protección a las condiciones poco favorables e inestables, como por ejemplo, las que ocurren al interior del Parque Nacional (Donoso *et al*, 2004; Díaz, 2010). También, Grinbergs *et al* (1986) estudió la germinación en semillas de *Gevuina avellana*, y sus resultados concluyen que el 25% de las semillas son destruidas por contaminación con microorganismos antes de que estas germinen cuando sólo se les elimina el pericarpio. Cuando se esteriliza el fruto completo y luego también la semilla extraída de él, se alcanza un 100% de efectividad, obteniendo plántulas sanas.

Además, la germinación *ex vitro* se retrasó respecto de la germinación *in vitro*, probablemente por las condiciones lumínicas y de temperatura, estandarizadas para la cámara de germinación ($8.125 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 10°C), valores distintos a los utilizados por Seemann *et al.*, (2013), quienes utilizaron una temperatura de $22-24^{\circ}\text{C}$, 16h de luz fría con $60 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y también Ávila (2014), donde utilizó un fotoperíodo de 16 horas día, con $150 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 20°C y una humedad relativa del 80%, ambos trabajos en realizados en proteáceas chilenas.

En relación a la germinación de *Maytenus chubutensis*, se esperaba que al ser cultivadas en medio MS, se obtuviera un alto porcentaje de germinación, como ha sido reportado por Bueno *et al* (2009), quienes realizaron germinación de *Maytenus vitis-idaea*, obteniendo un 92% de germinación a los 40 días después de la siembra, realizando previamente una desinfección de las semillas. En nuestro trabajo, *M. chubutensis*, no logró germinar en ninguno de los dos ensayos, ni *in vitro* ni en cámara de germinación.

Según Bueno *et al* (2009), para obtener buenos resultados en la germinación se recomienda antes de establecer la desinfección, extraer el arilo y lavarlo con agua para luego secarlos a temperatura ambiente y almacenarlas en frascos a 3°C , durante unos

minutos antes de la siembra. En nuestro trabajo, el almacenamiento en frío antes de la siembra no fue realizado.

Otros autores, como Varela & Arana (2011), han indicado que se debe realizar una escarificación con agua fría y arena para eliminar el arilo que es una película rojiza que recubre la semilla y retarda la germinación en *Maytenus boaria*. Esto podría explicar el que las semillas no hayan germinado durante más de 40 días. Es probable que ésta especie necesite ese golpe de frío, para estimular su germinación, por lo tanto, se debe probar el almacenamiento de semillas de maitén con arilo, luego extraerlo y dejar las semillas en frío antes de efectuar la siembra. Además, las semillas de maitén, son de vida corta o recalcitrantes, presentan latencia y deben sembrarse en otoño (Cabello, 1993; Cabello & Camelio, 2003). También se deben realizar ensayos previos de germinación para determinar la viabilidad de las semillas, como la prueba bioquímica del tetrazolio (Lakon, 1950), que es un ensayo basado en las reacciones de oxidación- reducción que se producen en las células vivas del embrión (Rodríguez *et al*, 2008). Estas células poseen enzimas hidrogenasas, y al entrar en contacto con el tetrazolio, reaccionan positivamente a esta prueba, tiñéndose de color rojo. Este ensayo no fue realizado por poseer muy pocas semillas para probar si estas eran viables o no. De acuerdo a Varela y Arana (2011), probablemente las semillas de ambas especies se hayan encontrado en estado de latencia morfológica, y que no hayan desarrollado por completo el embrión en la época de maduración.

En relación a los esquejes, es probable que los explantes utilizados se hayan encontrado sin actividad metabólica ya que estos llevaban alrededor de 3 semanas desde la colecta, almacenadas a 5°C en un refrigerador y sería por esta razón que hayan presentado sólo un 30% de sobrevivencia (Fig. 14). Por otro lado, es probable que el sustrato de los esquejes, al ser un sustrato orgánico, no haya sido el adecuado para enraizarlos, sino que se necesita utilizar sustratos similares donde crecen estas especies en su hábitat natural, como lo es un sustrato volcánico.

En el análisis de suelo, el sector 3 “Escorial bajo” presentó 4,87 mg kg⁻¹ de fósforo disponible (P- Olsen) correspondiente a la profundidad 0 a 10 cm, coincidiendo

aproximadamente, con el rango para el mismo análisis en suelos del sur de Chile (entre 3 y 4 kg⁻¹, mg kg⁻¹) pero difiriendo para el P total, que en nuestro caso fue de 276.48 mg kg⁻¹ versus 2600 mg kg⁻¹ para los suelos del sur (Ávila, 2014). Para los sectores 1 “El Torbellino” y sector 2 “Asociación *Austrocedrus- Orites- Maytenus*”, se observó que las concentraciones de P- Olsen y P total son altas, en comparación con el sector 3. Esto se debe a que en esos sectores hay una mayor cantidad de materia orgánica favorecida por el dosel boscoso existente. En términos generales, la profundidad referida constituye el piso del bosque o litera, que corresponde aproximadamente al material vegetal que se acumula anualmente sobre el suelo (Donoso, 1990). Es en estos mismos sectores (1 y 2) donde se desarrolla *M. chubutensis*, probablemente por esta misma razón, la cantidad de materia orgánica disponible. Por el contrario, *O. myrtoidea* crece principalmente en estratos y laderas rocosas casi desprovistos de suelo, en material volcánico y también al interior de bosques relativamente abiertos (Pfanzelt *et al.*, 2008; Lambers *et al.*, 2012; Hechenleitner *et al.*, 2005; Ávila, 2014), al igual que en el Parque Nacional Laguna del Laja, donde crece sobre material volcánico y bajo bosque. Es de esperarse que las especies como *M. chubutensis*, crezca en zonas con mayor cantidad de hojarasca aunque aún se desconoce si esta especie posee algún tipo de modificación en sus raíces o tenga algún tipo de asociación con otros microorganismos y debe ser más estudiada-

Hayes *et al.* (2014) informaron que las concentraciones foliares de P y N y la eficiencia de la reabsorción de estos en las plantas difieren de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes en el suelo, tal como lo que se observa en las tablas 1, 2, 3 y 4, del presente estudio. El presente análisis foliar muestra que la concentración de P y N en hojas senescentes y maduras es similar con lo citado en la literatura, respecto de proteáceas (Delgado *et al.*, 2015).

En nuestro trabajo, se observó que *Orites myrtoidea* estaría casi limitada por nitrógeno y estaría acumulando aluminio hacia las hojas senescentes, para su posterior eliminación. Por otra parte, Ávila (2014) señala que *O. myrtoidea* no removilizaría el P desde hojas senescentes, tal como se registró en la presente investigación, en donde se observa que las hojas maduras removilizan más este nutriente. Ávila (2014) indica también que la

sobrevivencia de *O. myrtoidea* en sustrato orgánico es de un 27%, a diferencia de lo observado en sustrato volcánico, donde hubo una sobrevivencia del 100%. Según Ávila (2014), las plantas de *O. myrtoidea* poseen una baja capacidad de captación de P quizás por la baja producción de raíces proteoideas, pero esto dependería de la característica del suelo y de su origen geográfico.

Según Lambers *et al.* (2012) las proteáceas chilenas actuarían como verdaderos “ingenieros ecosistémicos” movilizándolo desde las hojas senescentes a las maduras, a través del acúmulo de la hojarasca y también expone que las proteáceas chilenas, hacen que el fósforo se encuentre encerrado en ácido, y en suelos volcánicos disponibles para plantas vecinas, proporcionando un estrato rico en fósforo. En el estudio de Ávila (2014), se destaca a *Orites myrtoidea* como ingeniero ecosistémico ya que aumentaría en un 129% el fósforo disponible en su zona rizosférica en sustratos volcánicos jóvenes, y esto podría facilitar la nutrición de especies vecinas. Es posible que el rol ecosistémico de esta especie colonizadora de sustratos volcánicos recientes sea muy relevante, ya que podría mejorar las condiciones edáficas para otras especies que se presenten más tardíamente en este tipo de ambientes. La cantidad de semillas producidas y su viabilidad, así como su capacidad germinativa son también factores clave en la conservación de esta especie. Los resultados encontrados muestran que al parecer no posee un potencial de reproducción y establecimiento, lo que la hace aún más una especie de distribución muy limitada.

En el caso de *Maytenus chubutensis* aún es desconocido su mecanismo de movilización de nutrientes, sobre todo del fósforo. Nuestros análisis indican que esta especie estaría limitada por fósforo y estaría acumulando gran cantidad de aluminio en sus hojas senescentes. Otro aspecto a destacar en este punto es que las hojas senescentes recolectadas, para esta especie, no eran precisamente hojas que estaban a punto de caer; eran hojas más firmes que las hojas senescentes de otras especies. Esto podría explicarse porque sus hojas, al removilizar menos, intentarían retener por más tiempo el nitrógeno y sus hojas serían un poco más longevas y es por esta razón, que no hay diferencias en el nitrógeno de sus hojas maduras y senescentes. Se desconoce si esta especie interactúa con otros organismos en la rizósfera, como algún tipo de micorriza.

8. CONCLUSIÓN

- La micropropagación de explantes de hojas y yemas de *Orites myrtoidea* y de hojas de *Maytenus chubutensis*, no dio resultado positivo probablemente a causa de la contaminación de los explantes y exudación de fenoles. Necesariamente, deben protocolizarse ambas situaciones para obtener una producción de explantes sanos, libres de patógenos y reacciones no deseadas.
- La germinación de semillas de *Orites myrtoidea in vitro* y *ex vitro* tuvo resultado positivo, pero el porcentaje de germinación para nuestro estudio fue menor al reportado en otros estudios relacionados. Es importante realizar un tratamiento pre-germinativo para obtener resultados deseados.
- La germinación *in vitro* y *ex vitro* de *Maytenus chubutensis* tuvo resultado negativo. Ninguna de las semillas presentó germinación. Se hace necesario conocer el estado fenológico de las semillas y realizar análisis de viabilidad antes de establecer el ensayo de germinación, para esta especie.
- El desarrollo por esquejes para ambas especies vegetales, no fue exitoso, ya que probablemente el almacenamiento de estos, por semanas, antes de ser pasados a sustrato, fue demasiado prolongado para la activación de los tejidos correspondientes.
- Mineralógicamente, se observó que en el sector 3 de muestreo (Asociación *Austrocedrus- Orites- Maytenus*), hubo un menor contenido de fósforo disponible.
- Ambas especies, *Orites myrtoidea* y *Maytenus chubutensis*, movilizan N y P de forma diferente; es necesario seguir estudiando acerca de cuál es el mecanismo que utilizan para este proceso y si existe algún tipo de interacción con micorrizas.

- Por razones de tiempo y de escases de material vegetal, no se pudo realizar un estudio para evaluar el contenido de P y N en semillas de ambas especies, ni de formación de RP. Estos resultados podrían revelar datos más concluyentes acerca del mecanismo de captación de nutrientes para ambas especies.



9. BIBLIOGRAFÍA

Aerts, R. & Chapin, F.S. (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research*, 30, 1–67.

Ávila A (2014). Evaluación de la capacidad de extracción de Fósforo en Proteáceas chilenas. Tesis de magíster. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, 90 páginas.

Azcón- Bieto J, Talón M (2000) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Primera Edición, Mc Graw- Hill Interamericana de España. Ediciones Universidad de Barcelona, España, 522 pp.

Barrientos K (2013) Establecimiento *in vitro* de tres especies chilenas del género *Lomatia* (Proteaceae). Seminario de Tesis, Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Valdivia. 71 pp.

Borie F, Zunino H (1983) Organic matter-phosphorus associations as a sink in p-fixation processes in allophanic soils of Chile. *Soil Biol.Biochem.* 15, 599-603.

Borie F, Zunino H, Martínez L (1989) Macromolecule- P associations and inositol phosphates in some Chilean volcanic soils of temperate regions. *Commun. Soil Sci.Plant Anal.* 20, 1881-1894.

Boerner R (1984) Foliar nutrient dynamics and nutrient use efficiency of four deciduous tree species in relation to site fertility. *Journal of Applied Ecology*, 21, 1029–1040.

Bueno M, Severin C, Carnevale C, Alzugaray C, Giubilo G (2006) *In vitro* germination and production of *Maytenus vitis- idaea* plants in two culture media. *Molecular Medicinal Chemistry*, Vol 11: 8-9.

Bueno M, Alzugaray C, Giubileo G, Severin C, Carnevale N (2009) Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de *Maytenus vitis-idaea* cultivadas *in vitro*. *Bosque* 30 (3): 146- 150.

Brüggen J (1914) Los carbones del Valle Longitudinal y la Zona Carbonífera al Sur de Curanilahue, en la provincia de Arauco. Sociedad Nacional de Minería, Imprenta Barcelona, 56 p. Santiago.

Cabello, A. 1993. Propagación de especies nativas: aspectos claves. En Avances en Silvicultura. Primera Reunión. Santiago. Univ. de Chile, Fac. de Ciencias Agrarias y Forestales, Opto. de Silvicultura. Publicaciones Misceláneas Forestales N° 1. pp. 41-43.

Cabello A, Camelio M (2003) Germinación de semillas de maitén (*Maytenus boaria*) y producción de plantas en vivero. Proyecto Propagación de plantas leñosas forestales y ornamentales. Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile. 14 pp.

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 2000. Técnicas para la escarificación de semillas forestales. Serie técnica, Manual técnico N°36. Programa de Investigación, Proyecto de semillas forestales. Turrialba, Costa Rica.

Corporación Nacional Forestal (Conaf) (1993) Plan de Manejo Parque Nacional Laguna del Laja. Región del Bio Bio, Chile.

Corporación Nacional Forestal (Conaf) (2016) Parque Nacional Laguna del Laja. <http://www.conaf.cl/parques/parque-nacional-laguna-del-laja/>. Consultada el 14 de Abril de 2016.

Cuéllar J. 1997. Propagación vegetativa *in vitro* a partir de hojas jóvenes de Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Agronomía Mesoamericana* 8(1): 74-80.

Crews T, Kitayama K, Fownes J, Riley R, Herbert D, Mueller- Dombois D, Vitousek P (1995) Changes in soil phosphorus fractions and ecosystem dynamics across a long chronosequence in Hawaii. *Ecology*, 76, 1407–1424.

Díaz R (2010). Regeneración de *Orites myrtoidea* (Poepp. & Endl) Benth & Hook. Ex BD. Jacks. En el Parque Nacional Laguna del Laja (37° 22' S- 71° 24' W), Chile. Seminario de título. Universidad de Concepción, 37 pp.

Delgado M, Zúñiga A, Borie F (2015) Review: Ecophysiological role of *Embothrium coccineum*, a Proteaceae species bearing cluster roots, increasing phosphorus availability in its rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15 (2), 307-320.

Denton M, Veneklaas E, Freimoser F, Lambers H (2007) *Banksia* species (Proteaceae) from severely phosphorus-impooverished soils exhibit extreme efficiency in the use and remobilization of phosphorus. *Plant, Cell and Environment* (2007) 30, 1557–1565.

Donoso C (1982) Reseña ecológica de los bosques mediterráneos de Chile. *Bosque* 4, 117–146.

Donoso C (1990) *Ecología Forestal: el Bosque y su medio Ambiente*, Quinta Edición, Editorial Universitaria, Universidad Austral de Chile. 368 páginas.

Donoso C (2006) Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina, Autoecología. Marisa Cúneo Ediciones, Valdivia Drummond L, Maher M.

Donoso C, Premoli A, Gallo L, Ipinza R (2004) Variación individual en especies forestales nativas de los bosques costeros templados lluviosos de Chile y Argentina. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 420 pp.

Echeverría, C Rodríguez, R (2014) Categorización de *Eucryphia glutinosa*, *Citronella mucronata*, *Prumnopitys andina* y *Orites Myrtoidea* según los criterios de la UICN. . Informe Final Fondo de Investigación del Bosque Nativo. Laboratorio de Ecología de Paisaje, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile.

Edmond JB, WJ Drapala. (1958) The effect of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. Proceeding of the American Society for Horticultural Science 71: 738-34.

Elser J, Bracken M, Cleland E, Gruner D, Harpole W, Hillebrand H, Ngai J, Seabloom E, Shurin J, Smith J (2007) Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. Ecology Letters, 10, 1135–1142.

Gallardo M, Pérez C, Núñez- Ávila M, Armesto J (2012) Desacoplamiento del desarrollo del suelo y la sucesión vegetal a lo largo de una cronosecuencia de 60 mil años en el volcán Llaima, Chile. Revista Chilena de Historia Natural, vol.85 no.3.

Gilbert GA, Knight JD, Vance CP, Allan DL (1999) Acid phosphatase activity in phosphorus-deficient white lupin roots. Plant Cell Environ 22:801–810.

Grinbergs J, Valenzuela E, Ramírez C (1986) Germinación *in vitro* de *Gevuina avellana* Mol. (Proteaceae). Revista Bosque 7(2): 95-101.

Haberlandt G (1902) Experimentos de cultivo con células vegetales aisladas. Sitzungsber. Akad. Wiss. Viena. Facultad de Matemáticas y Ciencias Naturales. Kl., Abt. J. 111, 69-92.

Hartmann H, Kester D (1989) Propagación de Plantas, Principios y Prácticas 5ta Edición, U.S.A. Prentice- Hall. 456 pp.

Hartmann H, Kester D, Davies J, Geneve R (1997) Plant propagation: principles and practices. 6th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. p. 199–209.

Hayes P, Turner B, Lambers H, Laliberté E. 2014. Foliar nutrient concentrations and resorption efficiency in plants of contrasting nutrient acquisition strategies along a 2-million-year dune chronosequence. *Journal of Ecology* N° 102, 396-410.

Hebel L. Torres T (2009) Polen Fósil de Isla Rey Jorge (Antártica) y Chile Continental, a fin a Proteaceae chilenas. *Anales Instituto Patagonia (Chile) Volumen 37 (1):7-22* Punta Arenas, Chile.

Hechenleitner P, Gardner MF, Thomas PI, Echeverría C, Escobar B, Brownless P & Martínez C (2005) Plantas amenazadas del centro-Sur de Chile. Distribución, Conservación y Propagación. Primera Edición. Universidad Austral de Chile, Real jardín Botánico de Edimburgo, 188 páginas.

Hoffmann A (1982) *Flora silvestre de Chile*. Editorial Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile.

Hoffmann A (1995) *Flora Silvestre de Chile*. Zona Central. Tercera Edición, Editorial Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile.

Kotowski F. (1926). Temperature relations to germination of vegetable seeds. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 23: 176-184.

Kitayama K, Aiba S, Takyu M, Majalap N, Wagai R (2004) Soil phosphorus fractionation and phosphorus-use efficiency of a Bornean tropical montane rain forest during soil aging with podzolization. *Ecosystems*, 7, 259–274.

Lakon G (1950) Die “Triebkraft” von Samen und ihre Feststellung nach dem topographischen Tetrazolium-Verfahren. *Saatgutwirtschaft*, 2, 37-41.

Lambers H, Juniper D, Cawthray GR, Veneklaas EJ, Martínez- Ferri E (2002) The pattern of carboxylate exudation in *Banksia grandis* (Proteaceae) is affected by the form of phosphate added to the soil. *Plant Soil* 238:111–122.

Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann Bot* 98:693–713.

Lambers H, Raven J, Shaver G, Smith S (2008) Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology & Evolution* 23: 95-103.

Lambers H, Bishop J, Hopper S, Laliberté E, Zuñiga- Feest A. (2012) Phosphorus mobilization ecosystem engineering: the roles of cluster roots and carboxylate exudation in young P-limited ecosystems. *Annals of Botany* 110: 329-348.

Lloyd G & McCown, B (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Propag. Soc.* 30:421–427.

López J, Guío N, Fischer G, Miranda D (2007) Propagación de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) mediante diferentes tipos de esquejes y sustratos. *Revista Facultad Nacional Agronomía de Medellín* 61 (1): 4347-4357.

Ministerio del Medio Ambiente (MMA) (2011) Las áreas Protegidas de Chile, Antecedentes, Institucionalidad, Estadísticas y Desafíos. Sierralta et al (eds.). 35 pp.

Ministerio del Medio Ambiente (MMA) (2012) Clasificación especies. Ficha *Maytenus chubutensis*. Gobierno de Chile.

Ministerio del Medio Ambiente (MMA) (2016) Inventario Nacional de Especies, Reglamento de clasificación de especies. Gobierno de Chile.

Mroginski L, Sansberrio P, Flaschland E (2010) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, Levitus et al (eds.). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio). Argentin. 650 pp.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.

Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Römheld V (1999) Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208:373–382.

Parker R (2000) *La ciencia de las plantas*. Paraninfo, Thomson Learning, Madrid.p. 255-276.

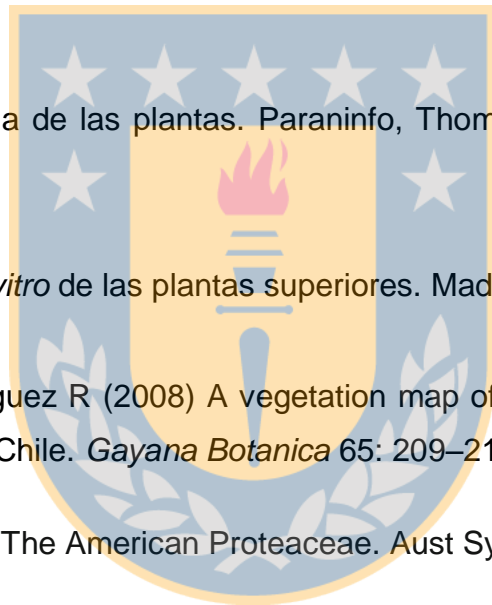
Pierik R (1990) *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, Editorial Prensa. 350 pp.

Pfanzelt S, Grau J, Rodriguez R (2008) A vegetation map of Nevados de Chillan volcanic complex, Bio-Bio Region, Chile. *Gayana Botanica* 65: 209–219.

Prance G, Plana V (1998) The American Proteaceae. *Aust Syst Bot* 11:287–299.

Radice S (2004) Capítulo 1, Morfogénesis *in vitro*. En *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, Levitus et al (eds) Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio). Argentina. 650 pp.

Redel Y, Rubio R, Godoy R, Borie F (2008) Phosphorus fractions and phosphatase activity in an Andisol under different forest ecosystems. *Geoderma* 145:216–221.



Redfield A (1958) The biological control of chemical factors in the environment. Am. Sci. 46: 206-221.

Rivas Z, Sánchez J, Troncone F, Márquez R, Ledo de Medina H, Colina M, Gutiérrez E (2009). Nitrógeno y fósforo totales de los ríos tributarios al sistema Lago de Maracaibo, Venezuela. INCI v.34 n.5 Caracas.

Roca W, Mroginski L (1991) Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 969p.

Rodríguez I, Adam G, Durán G (2008) Semillas Hortícolas: Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. Revista Agropecuaria Agricultura, N°912, pp. 836- 842.

Seemann P (1993) Utilización de técnicas de Micropropagación. En: Barriga P y Neira M. (eds.). Avances en Producción y Sanidad Vegetal, Cultivos No Tradicionales. Universidad Austral de Chile, Valdivia, pp 87-145.

Seemann P, Carrasco J, Ávila A, Muñoz F, Barrientos K (2013) Avances y Problemas en el Establecimiento *in vitro* de Proteáceas Chilenas. Simiente 83 (1- 4): 106- 201. Sociedad Agronómica Chilena.

Segretín M (2008) Los cultivos celulares y sus aplicaciones (cultivos de células vegetales). Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio). Argentina.

Small E (1972) Photosynthetic rates in relation to nitrogen recycling as an adaptation to nutrient deficiency in peat bog plants. Canadian Journal of Botany, 50, 2227–2233.

Tessier J, Raynal D. 2003. Use of nitrogen to phosphorus ratios in plant tissue as an indicator of nutrient limitation and nitrogen saturation. Journal of Applied Ecology 40, 523–534.

Thiele R, Moreno H, Elgueta S, Lahsen A, Rebolledo S, Petit- Breuilh M, (1998). Evolución geológico-geomorfológica cuaternaria del tramo superior del valle del río Laja. Rev. geol. Chile v.25 n.2 Santiago.

Torres L, Parra O, Araneda A, Urrutia R, Cruces F, Chirinos L (2008) Vegetational and climatic history during the late Holocene in Lake Laja basin (central Chile) inferred from sedimentary pollen record. Review of Palaeobotany and Palynology 149, pp 18–28.

Varela, S & Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Cuadernillo número 3, Serie técnica “Sistemas Forestales Integrado”, Silvicultura en vivero. S.A. Y Aparicio, A Editores. Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias, INTA. Bariloche, Argentina, 10 páginas.

Veblen T, Schlegel F (1982) Reseña ecológica de los bosques del sur de Chile. Bosque 4 (2), 73–115.

Vergara M, Katsui Y (1969) Contribución a la Geología y Petrología del Volcán Antuco, Cordillera de los Andes, Chile Central. Universidad de Chile, Instituto de Geología, Publicación, No. 35, p. 25-47.

Wardle D, Bardgett R, Walker R, Bonner K (2009) Among and within-species variation in plant litter decomposition in contrasting long-term chronosequences. Functional Ecology, 23, 442–453.

Weldt E (2008) Establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Rosa canina* L. Memoria de Título. Escuela de Agronomía, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Wu H & Toit E (2012) *In vitro* multiplication of *Protea cynaroides* L. microshoots and the effects of high phosphorous concentration on explant growth. African Journal of Biotechnology Vol. 11(63), pp. 12630- 12633.

Zúñiga A, Delgado M, Bustos A, Ochoa V (2015) The southern South American Proteaceae, *Embothrium coccineum* exhibits intraspecific variation in growth and cluster-root formation depending on climatic and edaphic origins. Plant Soil Volume 396, pp 201-213.



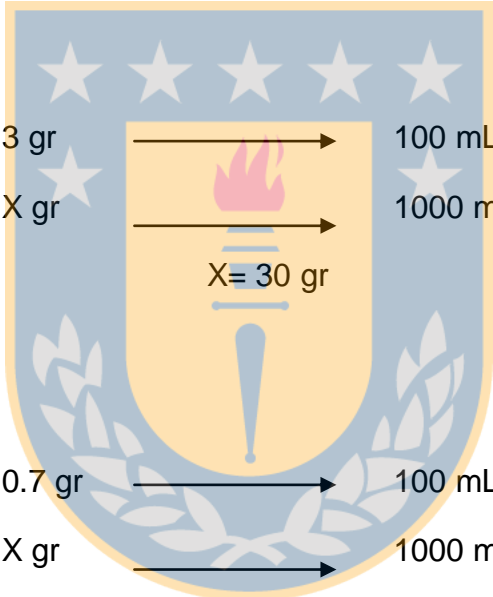
ANEXOS

Anexo 1. Cálculos medio de cultivo

Medio MS

$$\begin{array}{l} 4.43 \text{ gr} \longrightarrow 100 \text{ mL} \\ X \text{ gr} \longrightarrow 1000 \text{ mL} \\ X = 4.43 \text{ gr} \end{array}$$

Sacarosa 3%



The diagram features a shield-shaped logo with a blue background and a yellow border. Inside the shield, there are five white stars at the top, a central emblem with a pink flame and a blue base, and a blue exclamation mark at the bottom. The shield is surrounded by a decorative wreath of leaves. The calculation for Sacarosa 3% is overlaid on the logo:

$$\begin{array}{l} 3 \text{ gr} \longrightarrow 100 \text{ mL} \\ X \text{ gr} \longrightarrow 1000 \text{ mL} \\ X = 30 \text{ gr} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 0.7 \text{ gr} \longrightarrow 100 \text{ mL} \\ X \text{ gr} \longrightarrow 1000 \text{ mL} \\ X = 7 \text{ gr} \end{array}$$

Agar 0.7%

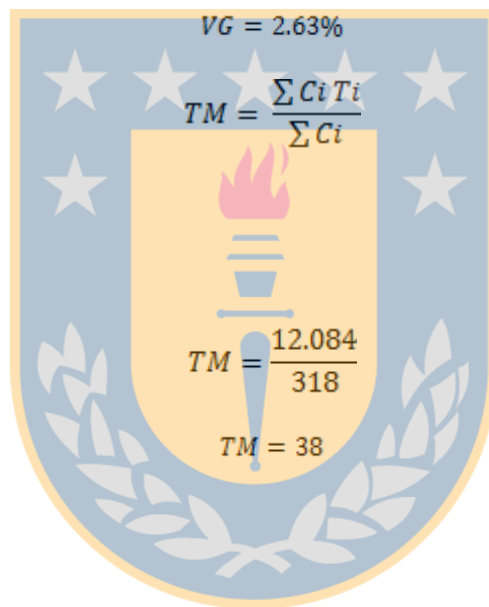
Anexo 3. Germinación *ex vitro* en cámara de germinación

Sector 2

$$VG = \frac{\sum Ci x 100}{\sum Ci Ti}$$

$$VG = \frac{(0+0+0+0+1+2+4+5+5+5+5+5+5+5+5+5+5+5+6+6+9+11+11+11+12+13+13+13+13+13+14+14+14+14+14+15+15+15+15)}{318 x 38}$$

$$VG = \frac{318}{318 x 38} x 100$$



Anexo 4. Figuras germinación



Figura 1. Plántulas *in vitro* de *Orites myrtoidea* pertenecientes al sector 2 "Asociación Austrocedrus- Orites- Maytenus"



Figura 2. Plántulas *in vitro* de *Orites myrtoidea* pertenecientes al sector 3 "Escorial bajo".



Figura 3. Aclimatación de plátulas de *Orites myrtoidea*.

